UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

Francisco Barbara Abreu Barros

Expressão de moesina e podoplanina no câncer de boca e sua relação com o processo de invasão tumoral

Bauru
2014

FRANCISCO BARBARA ABREU BARROS

Expressão de moesina e podoplanina no câncer de boca e sua relação com o processo de invasão tumoral

Dissertação apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Patologia Bucal.

Orientadora: Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira

BAURU
2014

B278e Barros, Francisco Barbara Abreu
Expressão de moesina e podoplanina no câncer
de boca e sua relação com o processo de invasão
tumoral / Francisco Barbara Abreu Barros – Bauru,
2014.
107 p. : il. ; 31cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de
Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientadora: Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a
reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos
fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da Faculdade de Odontologia de Bauru - USP
Protocolo nº: 21329113.5.0000.5417
Data: 26 de fevereiro de 2014

DEDICATÓRIA

Aos meus pais,

Nazaré da Silva Barbara Barros e Francisco de Paula Vitor Barros, como reconhecimento por todo amor e carinho e por sempre me apoiarem na busca pelos meus sonhos, zelando sempre pela minha formação e pelo meu amadurecimento.

À minha orientadora,

Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira, que sempre se colocou a disposição para me ensinar e guiou meus passos durante essa caminhada.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me presenteou com a vida, com uma família que me apoia em todas as minhas decisões e por me dar a oportunidade de crescer profissionalmente em Bauru em meio a pessoas muito especiais.

À minha mãe, Nazaré da Silva Barbara Barros, meu exemplo de vida, que não poupa esforços para que eu possa realizar meus sonhos, pelo amor incondicional e pela dedicação. Eu te amo!

Ao meu pai, Francisco de Paula Vitor Barros, pelo amor, incentivo e confiança depositada em mim nessa caminhada e que também não poupa esforços para que eu possa realizar meus sonhos. Eu te amo!

A toda minha família e amigos de Três Pontas pelo apoio, carinho e por sempre se mostrarem preocupados e interessados na minha trajetória fazendo dos meus momentos na minha cidade os melhores.

À minha orientadora, Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira, pela confiança e oportunidade a mim oferecida, pelo exemplo de dedicação, doação, profissionalismo e por todo ensinamento que me presenteou.

Ao Prof. Dr. João Adolfo Costa Hanemann, exemplo de ser humano e de profissional que me mostrou um mundo novo e guiou meus passos para que eu pudesse iniciar mais essa caminhada.

Ao Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira, pelo auxílio, pelos conhecimentos compartilhados, pela ótima convivência e amizade. Muito obrigado!

À Profa. Dra. Vanessa Soares Lara e ao Prof. Dr. Alberto Consolaro, pela boa convivência e pelos conhecimentos que me foram passados. Muito obrigado!

Aos Professores da Faculdade de Odontologia de Bauru pelos conhecimentos que me foram passados durante as aulas das disciplinas da pós-graduação.

À Suely Nonogaki, do Laboratório de Patologia do Centro de Tratamento e Pesquisa da Fundação Antônio Prudente, do Hospital do Câncer A. C. Camargo, pela ajuda na realização da técnica imuno-histoquímica.

Ao Prof. Dr. José Roberto Pereira Lauris, pelo auxílio na análise estatística desse trabalho.

Ao Professor André Lopes de Carvalho e ao bioestatístico Cleyton Zanardo de Oliveira, do Instituto de Ensino e Pesquisa do Hospital do Câncer de Barretos, Fundação Pío XII, por compartilhar seus conhecimentos, pelo auxílio e sugestões durante análise estatística desse trabalho.

Às funcionárias, Fátima Aparecida Silveira, Maria Cristina Carrara Filippi e Marina dos Santos Corrêa, pela ótima convivência, pelo carinho, amizade, apoio e por estarem sempre prontas e bem dispostas a me ajudar. Realmente me senti em casa na presença de vocês.

Aos funcionários da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, por toda a eficácia.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, por todos os esclarecimentos e eficiência.

À minha amiga, Natália Galvão García, por estar ao meu lado em todos os momentos em Bauru, pelo apoio, companheirismo, amizade, confiança e conhecimentos compartilhados. Obrigado por dividir comigo os momentos de alegria, mas principalmente por tornar meus dias difíceis mais amenos.

Ao meu amigo, Diego Maurício Bravo Calderón, pelos conhecimentos compartilhados, apoio e por sempre se mostrar muito bem disposto na hora de me ajudar.

Aos amigos e colegas do curso, Mariana Rates, Alexandre Simões García, Kellen Cristina Tjoe, Agnes Assao, Paula Nascimento, Bruna Maria Rodrigues Vilardi, Laís De Santis, Ana Paula Madi, Karen Henriette Pinke, Taiane Gardizani, Felipe Alavarce, Rafaela Alves da Silva Alavarce, Heliton Gustavo de Lima, Pepe Burgos, Ana Regina Cassaroto, Regina Barrachi, Maria Carolina Vaz Goulart e Taísa Maria Rodrigues Vilardi, pela boa convivência, conhecimentos compartilhados e amizade.

Aos alunos da turma LI, pela boa convivência durante as aulas e amizade.

Aos amigos que fiz em Bauru, em especial Rayane Pinto, Valéria DÍ Giácomo e Wellington Yanaguízawa, pela amizade e pelas ótimas lembranças que ficarão para sempre marcados na memória. Com certeza minha presença em Bauru não seria a mesma sem o convívio com todos vocês.

Muito Obrigado!

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, na pessoa do **Prof. Dr. José Carlos Pereira**, diretor desta instituição.

À comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, na pessoa do **Prof. Dr. Paulo César Rodrigues Conti**.

À **Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira**, coordenadora da Área de Concentração em Patologia Bucal do Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas Aplicadas da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo.

Ao **CNPq**, pela bolsa de mestrado concedida.

À **FAPESP**, pelo auxílio pecuniário (processo #2012/13411-6).

*Para tudo há um tempo, para tudo há um momento
debaixo dos céus.” (Ecle 3,1).*

RESUMO

A proteína moesina, uma das proteínas do complexo ERM (ezrina, radixina e moesina), participa do processo de migração de células tumorais controlando a ligação entre o citoesqueleto de actina e os receptores transmembrana. As proteínas ERM vêm sendo investigadas como ligantes de outras glicoproteínas, como a podoplanina, cuja expressão é encontrada em células malignas de diversas neoplasias, incluindo o carcinoma espinocelular (CEC) de boca. O objetivo desse estudo foi avaliar as expressões imuno-histoquímicas da moesina e da podoplanina pelas células malignas no front de invasão de 84 pacientes com CEC de boca e suas associações com a evolução clínica e com o prognóstico dos pacientes. A associação entre a expressão imuno-histoquímica da moesina e da podoplanina pelas células malignas e as variáveis demográficas, clínicas e microscópicas foi avaliada pelo teste qui-quadrado ou teste exato de Fisher. As análises de sobrevida global e livre de doença em 5 e 10 anos foram calculadas pelo estimador produto-limite de Kaplan-Meier e a comparação das curvas de sobrevida realizada pelo teste de log-rank. Os resultados mostraram que houve expressão da moesina pelas células malignas na região do front de invasão tumoral, entretanto, nenhuma associação estatisticamente significativa foi encontrada entre esta proteína e as características clínicas, demográficas e microscópicas. A expressão da podoplanina, pelas células malignas, foi significativamente associada à radioterapia ($p=0,004$), à invasão muscular ($p=0,006$) e ao comprometimento linfonodal ($p=0,013$). Não houve associação significativa entre a expressão das duas proteínas nos CECs de boca ($p=0,460$). A forte expressão da moesina pelas células malignas constituiu um fator de prognóstico desfavorável para os pacientes com CEC de boca e estadiamento clínico II e III. O comprometimento linfonodal histopatológico também se mostrou fator de prognóstico significativo para a recidiva da doença ($p=0,018$). Estes resultados sugerem que a expressão de moesina, pelas células malignas juntamente com o comprometimento linfonodal pode contribuir para determinar os pacientes com CEC de boca que apresentam um pior prognóstico. Além disso, verificamos que as proteínas moesina e podoplanina se expressam pelas células neoplásicas nos CEC de boca mas não parecem estar associadas no processo de invasão tumoral.

Palavras-chave: Câncer de boca. Carcinoma de células escamosas. Biomarcadores Farmacológicos.

ABSTRACT

Expression of moesin and podoplanin in oral cancer and its relation to the process of tumor invasion

The moesin protein, one of the proteins of the ERM complex (ezrin, radixin and moesin) takes part in the migration of tumor cells process by controlling the relation between actin cytoskeleton and transmembrane receptors. The ERM proteins have been investigated as ligands of other glycoproteins, such as podoplanin, which are found in malignant cells of malignant, including oral squamous cell carcinoma (OSCC). The aim of this study was to evaluate the immunohistochemical expressions of moesin and podoplanin by malignant cells in the invasive front of 84 patients with oral squamous carcinoma and its association with clinical outcome and patients' prognosis. Chi-square or Fisher's exact test was used to analyze the association between the moesin and podoplanin expressions by malignant cells and demographic, clinical and microscopic variables in oral squamous cell carcinoma patients. The 5 and 10 years survival rates were calculated by Kaplan-Meier method and the comparison of survival curves were performed using log-rank test. The results showed that there was moesin expression by malignant cells in the invasive front, however, no statistically significant association was found between this protein and demographic, clinical and microscopic features. The expression of podoplanin by malignant cells was significantly associated with radiotherapy ($p=0.004$), with muscular invasion ($p=0.006$) and lymph node involvement ($p=0.013$). There was no significant association between the expression of two proteins in OSCC ($p=0.460$). The strong expression of moesin by malignant cells was a factor of unfavorable prognosis for patients with OSCC and clinical stage II and III. The histopathological lymph node involvement was also significant prognostic factor for disease recurrence ($p=0.018$). These results suggest that the expression of moesin by malignant cells and lymph node involvement may help to determine patients with squamous cell carcinoma who have a poor prognosis. Furthermore, we found that moesin and podoplanin proteins are expressed by neoplastic cells in oral squamous cell carcinoma but not appear to be associated in the process of tumor invasion.

Keywords: Oral cancer. Squamous Cell Carcinoma. Pharmacological Biomarkers.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

- Figura 1 - Imunoexpressão da moesina pelas células malignas do carcinoma espinocelular de boca. Em A, B, C e D imunoexpressão forte da proteína com padrão citoplasmático (A,B e C) ou membranoso (D) da moesina. Em C, notar que as pérolas córneas não expressaram a moesina (A, IHQ 20X; B, IHQ 40X; C, IHQ 10X; D, IHQ 20X). Em E e F imunoexpressão fraca da proteína (E, IHQ 10X; F, IHQ 40X)..... 63
- Figura 2 - Imunoexpressão da podoplanina pelas células malignas do front de invasão dos carcinomas espinocelulares de boca. Em A e B imunoexpressão citoplasmática forte (A, IHQ 20X; B IHQ 40X), em C imunoexpressão forte com padrão membranoso (IHQ 40X) e em D imunoexpressão fraca (IHQ 20X)..... 71
- Figura 3 - Sobrevida global dos pacientes com carcinoma espinocelular de boca de acordo com a expressão da proteína moesina. Porcentagem de sobrevida acumulada por meio da técnica de KaplanMeier..... 77
- Figura 4 - Sobrevida livre de doença dos pacientes com carcinoma espinocelular de boca de acordo com o comprometimento linfonodal cervical mediante análise histopatológica. Porcentagem de sobrevida acumulada por meio da técnica de Kaplan-Meier..... 79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Graduação de malignidade do front de invasão tumoral de acordo com Bryne et al. (1989).....	45
Tabela 2 -	Distribuição dos 84 pacientes com carcinoma espinocelular de boca, segundo as características demográficas, os fatores de risco (tabaco e álcool), estadiamento e evolução clínica. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1963 a 2012.....	54
Tabela 3 -	Graduação de malignidade dos 84 carcinomas espinocelulares de boca. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1963 a 2012.....	56
Tabela 4 -	Distribuição da expressão imuno-histoquímica da moesina e da podoplanina pelas células malignas dos 84 pacientes com carcinoma espinocelular de boca, segundo a graduação de malignidade tumoral. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1963 a 2012.....	56
Tabela 5 -	Distribuição da expressão imuno-histoquímica da moesina pelas células malignas dos 84 pacientes com carcinoma espinocelular de boca, segundo as características demográficas e os fatores de risco (tabaco e álcool). Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1963 a 2012.....	59
Tabela 6 -	Distribuição da expressão imuno-histoquímica da moesina pelas células malignas dos 84 pacientes com carcinoma espinocelular de boca, segundo tratamento, estadiamento e evolução clínica. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1963 a 2012.....	60
Tabela 7 -	Distribuição da expressão imuno-histoquímica da moesina pelas células malignas dos 84 pacientes com carcinoma espinocelular de boca, segundo a evolução clínica e as características microscópicas. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1963 a 2012.....	61
Tabela 8 -	Distribuição da expressão imuno-histoquímica da podoplanina pelas células malignas dos 84 pacientes com carcinoma espinocelular de boca, segundo as características demográficas e os fatores de risco (tabaco e álcool). Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1963 a 2012.....	67
Tabela 9 -	Distribuição da expressão imuno-histoquímica da podoplanina pelas células malignas dos 84 pacientes com carcinoma espinocelular de boca, segundo tratamento, estadiamento e evolução clínica. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1963 a 2012.....	68

Tabela 10 -	Distribuição da expressão imuno-histoquímica da podoplanina pelas células malignas dos 84 pacientes com carcinoma espinocelular de boca, segundo a evolução clínica e as características microscópicas. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1963 a 2012.....	69
Tabela 11 -	Associação entre a expressão imuno-histoquímica da moesina e da podoplanina pelas células malignas dos 84 pacientes com carcinoma espinocelular de boca. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1963 a 2012.....	73
Tabela 12 -	Análise da sobrevida global acumulada por meio da técnica de Kaplan-Meier dos 84 pacientes com carcinoma espinocelular de boca, segundo as características demográficas, os fatores de risco (tabaco e álcool), o comprometimento linfonodal histopatológico (pN) e a expressão da moesina e da podoplanina. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1963 a 2012.....	76
Tabela 13 -	Análise da sobrevida livre de doença acumulada por meio da técnica de Kaplan-Meier dos 84 pacientes com carcinoma espinocelular de boca, segundo as características demográficas, os fatores de risco (tabaco e álcool), o comprometimento linfonodal histopatológico (pN) e a expressão da moesina e da podoplanina. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1963 a 2012.....	78
Tabela 14 -	Análise da expressão de moesina por meio do modelo de Cox. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1963 a 2012.....	80

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

%	porcentagem
°C	grau Celsius
<	menor
>	maior
=	igual
nº	número
µm	micrometro
BSA	Soro albumina bovino
CEC	Carcinoma espinocelular
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos
DAB	Diaminobenzidine Tetrahydrochloride
DMSO	Dimetilsulfóxido
ERM	Ezrina, Radixina, Moesina
EUA	Estados Unidos da América
FOB	Faculdade de Odontologia de Bauru
GTP	Guanosina Trifosfato
H ₂ O ₂	Peróxido de Hidrogênio
mL	mililitro
mM	milimol
MOASS	Morte por outras causas não relacionadas ao câncer
MOCA	Morte decorrente do tumor primário
MOCI	Morte por intercorrência cirúrgica
N	Classificação clínica dos linfonodos regionais
N+	Presença de linfonodos regionais palpáveis
N0	Ausência de linfonodos regionais palpáveis
NA	Não se aplica
NaN ₃	Azida sódica
OSCC	Oral squamous cell carcinoma
p	Valor de teste estatístico
PBS	Phosphate buffered saline (solução salina fosfatada tamponada)
pH	concentração hidrogeniônica
pN	Classificação patológica dos linfonodos
pN+	Presença de comprometimento linfonodal cervical na análise histopatológica
pN0	Ausência de comprometimento linfonodal cervical na análise histopatológica
RNA	ácido ribonucléico
SP	Estado de São Paulo
SPSS	Pacote estatístico para ciências sociais
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
USP	Universidade de São Paulo
X ²	qui-quadrado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	25
2.1	PROTEÍNA MOESINA	27
2.2	PAPEL DA MOESINA NO PROCESSO DE INVASÃO CELULAR	28
2.3	PROTEÍNA MOESINA NO CÂNCER DE BOCA	30
2.4	PROTEÍNA PODOPLANINA NO CÂNCER DE BOCA	33
2.5	INTERAÇÃO ENTRE AS PROTEÍNAS MOESINA E PODOPLANINA	35
3	PROPOSIÇÃO	37
4	CASUÍSTICA E MÉTODOS	41
4.1	POPULAÇÃO DE ESTUDO E SELEÇÃO DA AMOSTRA	43
4.2	REGISTRO DE DADOS CLÍNICOS E MICROSCÓPICOS	43
4.3	ANÁLISE MICROSCÓPICA	44
4.3.1	Graduação da malignidade tumoral	44
4.3.2	Técnica imuno-histoquímica	45
4.3.3	Avaliação imuno-histoquímica	47
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	49
4.5	AQUISIÇÃO DAS FOTOMICROGRAFIAS	49
4.6	COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP)	50
5	RESULTADOS	51
5.1	CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO	53
5.2	ANÁLISE MICROSCÓPICA	55
5.2.1	Graduação da malignidade tumoral	55

5.2.2	Variáveis microscópicas analisadas	55
5.2.3	Expressão da moesina nos carcinomas espinocelulares de boca	57
5.2.4	Expressão da podoplanina nos carcinomas espinocelulares de boca	65
5.2.5	Associação da expressão da moesina e da podoplanina nos carcinomas espinocelulares de boca	73
5.3	ANÁLISE DA SOBREVIVÊNCIA	74
6	DISCUSSÃO	81
7	CONCLUSÕES	91
	REFERÊNCIAS	95
	ANEXO	103

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

Um dos fenômenos mais estudados no câncer é o processo metastático, por meio do qual as células malignas disseminam e invadem outros tecidos e órgãos, via vasos sanguíneos e/ou linfáticos (SAHAI, 2007; ESTECHA et al., 2009; BOLZONI VILLARET et al., 2010; HUBER et al., 2011).

A metástase ocorre em múltiplas etapas envolvendo a mobilidade celular, o intravasamento, o transporte da célula para órgãos distantes por meio de fluidos, o extravasamento e o crescimento do tumor neste novo local (CONDEELIS; SINGER; SEGALL, 2005; SAHAI, 2007; ESTECHA et al., 2009; HE et al., 2010; LOWE; NAVARRO-NUNEZ; WATSON, 2012). Em algumas destas fases, a célula necessita modificar sua morfologia por meio da reorganização do citoesqueleto aumentando assim sua flexibilidade e capacidade de migração (ESTECHA et al., 2009). A capacidade de migração celular depende essencialmente da presença de proteínas relacionadas ao citoesqueleto e que estão superexpressas em muitos tumores (KOBAYASHI et al., 2003; KOBAYASHI et al., 2004; BELBIN et al., 2005; MADAN et al., 2006; CHARAFE-JAUFFRET et al., 2007; CUI et al., 2009; ESTECHA et al., 2009; KINOSHITA et al., 2012; WANG et al., 2012; JUNG et al., 2013). Entre estas moléculas que desempenham um papel central na mobilidade e no controle da morfologia celular, controlando a ligação entre o citoesqueleto de actina e os receptores transmembrana, encontram-se as proteínas da família ERM, que compreendem a ezrina, a radixina e a moesina (SPECK et al., 2003; BATCHELOR; WOODWARD; CROUCH, 2004).

Nos últimos anos, o significado biológico das proteínas do complexo ERM na evolução tumoral e principalmente sua importância no processo metastático tem sido foco de muitos estudos (KOBAYASHI et al., 2003; KOBAYASHI et al., 2004; BELBIN et al., 2005; MADAN et al., 2006; KINOSHITA et al., 2012; MCCLATCHEY, 2012; SCHLECHT et al., 2012; WANG et al., 2012).

Uma das proteínas do complexo ERM, a proteína moesina, além de sua participação essencial no controle do citoesqueleto, desempenha importante função

no estabelecimento da polaridade celular após a fixação inicial da célula neoplásica ao endotélio antes do extravasamento e ainda, executa um papel crucial no achatamento das células antes da invasão e migração (ESTECHA et al., 2009). Assim sendo, alguns autores (KOBAYASHI et al., 2004; CHARAFE-JAUFFRET *et al.*, 2007; CUI et al., 2009; SCHLECHT et al., 2012; WANG et al., 2012; JUNG et al., 2013) tem sugerido que a expressão da moesina pelas células malignas poderia contribuir para discriminar entre pacientes com metástases e aqueles com um melhor prognóstico, auxiliando a definição da terapia apropriada para cada paciente

Particularmente no câncer de boca, poucos estudos foram realizados sobre a expressão de moesina pelas células epiteliais malignas e sua importância na evolução e/ou progressão tumoral (KOBAYASHI et al., 2003; KOBAYASHI et al., 2004; BELBIN et al., 2005; MADAN et al., 2006; KINOSHITA et al., 2012; SCHLECHT et al., 2012).

Algumas investigações como de Kobayashi et al. (2003) mostraram, ao avaliarem amostras de mucosa oral normal, epitélio oral displásico, carcinomas verrucosos e carcinomas espinocelulares de boca, que a expressão de moesina diminuía na membrana e aumentava no citoplasma proporcionalmente ao aumento da graduação de malignidade da lesão. Posteriormente, estes mesmos autores (KOBAYASHI et al., 2004), pela primeira vez, afirmaram que o padrão de expressão da moesina era um indicador de prognóstico independente para pacientes com carcinoma espinocelular de boca, podendo ser clinicamente um marcador útil para a seleção de pacientes para tratamentos específicos. Também Madan et al. (2006), ao analisarem a correlação entre a localização subcelular das proteínas do complexo ERM e a sobrevida dos pacientes com carcinoma espinocelular da região de cabeça e pescoço, sugeriram que a moesina poderia ser utilizada como um potencial biomarcador associada com a progressão tumoral e que outros estudos precisavam ser realizados para validarem sua importância clínica.

Recentemente, as proteínas ERM (ezrina/radixina/moesina), além de atuarem como agentes de ligação do citoesqueleto a estruturas da membrana plasmática foram investigadas como ligantes de moléculas como a podoplanina (MARTIN-VILLAR et al., 2006; WICKI et al., 2006; WICKI; CHRISTOFORI, 2007; LOWE; NAVARRO-NUNEZ; WATSON, 2012), uma glicoproteína transmembrana expressa por células malignas de diversas neoplasias, incluindo o carcinoma espinocelular de boca (YUAN et al., 2006; CUENI et al., 2010; KREPPEL et al.,

2010; MARGARITESCU et al., 2010; HUBER et al., 2011; KREPPEL et al., 2011; FUNAYAMA et al., 2011; DOS SANTOS ALMEIDA et al., 2013; FOSCHINI et al., 2013; OHTA et al., 2013).

A superexpressão da podoplanina nos carcinomas espinocelulares da região de cabeça e pescoço tem sido associada à metástase linfonodal, a estágios tumorais mais avançados e a um pior prognóstico da doença (KAWAGUCHI et al., 2008; VORMITTAG et al., 2009; KREPPEL et al., 2010; HUBER et al., 2011; KREPPEL et al., 2011; BARTULI et al., 2012; KREPPEL et al., 2013).

Em um estudo realizado em 2006, Wicki et al. observaram que a podoplanina promove a invasão de células tumorais “in vitro “ e “in vivo”. Além disso, esta proteína parece induzir a migração coletiva de células malignas regulando a atividade das pequenas GTPases da família RhoA. Concluíram então que ela induz uma via alternativa de invasão de células tumorais na ausência da transição epitélio-mesênquima.

Embora a moesina e a podoplanina sejam associadas ao pior prognóstico dos pacientes com carcinomas espinocelulares de boca e suas expressões pelas células malignas estejam relacionadas ao processo de migração celular, nenhum estudo avaliando a imunoexpressão conjunta dessas proteínas no câncer de boca foi encontrado na literatura científica. Portanto, o presente estudo visa contribuir com o conhecimento sobre o significado clínico da expressão destas proteínas na evolução do câncer de boca.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PROTEÍNA MOESINA

As proteínas da família ERM, compreendendo a ezrina, a radixina e a moesina, funcionam na célula como ligantes moleculares entre o citoesqueleto de actina e os receptores transmembrana (SPECK et al., 2003; BATCHELOR; WOODWARD; CROUCH, 2004; LOWE; NAVARRO-NUNEZ; WATSON, 2012). Elas estão envolvidas em diversos processos fisiológicos, agindo como moduladores críticos da arquitetura celular, além de desempenharem um papel crucial em muitas atividades celulares como adesão, mobilidade, migração e mitose (CONDEELIS; SINGER; SEGALL, 2005; KUNDA et al., 2008; MCCLATCHEY, 2012; DENG; CHO; LI, 2013; EMERY; RAMEL, 2013; MANITI; CARVALHO; PICART, 2013).

A proteína moesina, do complexo ERM, foi isolada pela primeira vez no músculo liso bovino e descrita como uma proteína de 78KDa (LANKES et al., 1988) composta por um domínio N terminal e por um domínio C terminal. A associação entre os domínios N e C terminais deixa a moesina em um estado inativo no citoplasma da célula. Após a ativação da moesina, o domínio N terminal se torna disponível para a ligação com o domínio citoplasmático de uma série de receptores transmembrana, enquanto que a outra extremidade, C terminal, se liga a filamentos de actina (BATCHELOR; WOODWARD; CROUCH, 2004; KUNDA et al., 2008; LOWE; NAVARRO-NUNEZ; WATSON, 2012; MCCLATCHEY, 2012; DENG; CHO; LI, 2013; MANITI; CARVALHO; PICART, 2013; JIANG et al., 2014).

Algumas evidências mostraram que a moesina contribui com a arquitetura celular agindo como um elo na ligação estrutural entre a membrana plasmática e o citoesqueleto de actina (BATCHELOR; WOODWARD; CROUCH, 2004; LOWE; NAVARRO-NUNEZ; WATSON, 2012; DENG; CHO; LI, 2013; EMERY; RAMEL, 2013; MANITI; CARVALHO; PICART, 2013; JIANG et al., 2014). Além disso, esta proteína proporciona um suporte mecânico para o fuso mitótico (KUNDA et al., 2008; MCCLATCHEY, 2012) e desempenha importante função no estabelecimento da polaridade celular após a fixação inicial da célula neoplásica ao endotélio antes do

extravasamento e ainda, executa um papel crucial no achatamento das células antes da invasão e migração (ESTECHA et al., 2009).

A moesina é constitutivamente expressa no citoplasma de células inflamatórias (MADAN et al., 2006; JUNG et al., 2013), por fibroblastos (CHARAFE-JAUFFRET et al., 2007), por células endoteliais (MADAN et al., 2006; CHARAFE-JAUFFRET et al., 2007; JUNG et al., 2013), por células mioepiteliais de glândulas mamárias (CHARAFE-JAUFFRET et al., 2007) e em glândulas do tecido gástrico normal (JUNG et al., 2013).

Na pele normal a moesina se expressa fortemente na camada basal e diminui nas camadas superiores, apresentando um padrão membranoso (ICHIKAWA et al., 1998). Na mucosa bucal normal, a expressão predominantemente membranosa de moesina pode ser observada na camada basal e suprabasal e na camada espinhosa não se observa expressão desta proteína (KOBAYASHI et al., 2003; KOBAYASHI et al., 2004).

Adicionalmente a sua função fisiológica, o significado da expressão desregulada da moesina tem sido estudada em várias neoplasias malignas, inclusive na região de cabeça e pescoço (KOBAYASHI et al., 2003; KOBAYASHI et al., 2004; BELBIN et al., 2005; MADAN et al., 2006; KINOSHITA et al., 2012; SCHLECHT et al., 2012).

2.2 PAPEL DA MOESINA NO PROCESSO DE INVASÃO CELULAR

A disseminação metastática requer que as células cancerosas, de um tumor primário, passem por certo número de alterações a fim de adquirir um fenótipo migratório e invasivo, degradem a matriz extracelular que as rodeia e se movam para os vasos linfáticos e sanguíneos. A entrada na corrente sanguínea ou linfática permite a sua translocação para órgãos anatomicamente distantes onde após o extravasamento, estas células neoplásicas colonizam os tecidos para desenvolver metástases (CONDEELIS; SINGER; SEGALL, 2005; SAHAI, 2007; ESTECHA et al., 2009; BOLZONI VILLARET et al., 2010; HE et al., 2010; HUBER et al., 2011; LOWE; NAVARRO-NUNEZ; WATSON, 2012).

Nas últimas décadas, inúmeros biomarcadores relacionados com o processo de metástase têm sido investigados e entre estes se encontram as

proteínas do complexo ERM (Ezrina/radixina/moesina), importantes elos entre o citoesqueleto e a membrana plasmática e, que atuam desempenhando um papel chave no controle da morfologia, adesão, forma, mobilidade celular e transdução de sinal (KOBAYASHI et al., 2003; KOBAYASHI et al., 2004; BELBIN et al., 2005; MADAN et al., 2006; KINOSHITA et al., 2012; MCCLATCHEY, 2012; SCHLECHT et al., 2012; WANG et al., 2012).

Em relação à proteína moesina, algumas investigações foram realizadas visando entender como a expressão desta proteína, pelas células epiteliais malignas, afeta o desenvolvimento do câncer e a sua progressão (KOBAYASHI et al., 2003; KOBAYASHI et al., 2004; BELBIN et al., 2005; MADAN et al., 2006; CHARAFE-JAUFFRET et al., 2007; CUI et al., 2009; ESTECHA et al., 2009; HE et al., 2010; KINOSHITA et al., 2012; WANG et al., 2012).

Estecha et al. (2009) realizaram um estudo em que foram utilizadas células de melanoma, eles conseguiram mostrar como a moesina pode influenciar na capacidade que as células malignas têm na colonização de tecidos “in vivo”. Os autores injetaram, na veia da cauda de ratos, linhagens celulares de melanoma e observaram que a maioria das células com depleção de moesina havia desaparecido dos pulmões, enquanto que uma parte significativa, das células neoplásicas, continuou dentro do parênquima pulmonar. Em outra parte do estudo, também utilizando células com depleção ou não de moesina, desta vez em matriz de colágeno, foi observado que a depleção desta proteína causou uma mudança na morfologia celular, reduziu acentuadamente o número de células invasoras e a profundidade da invasão. Com base nestes resultados os autores concluíram que a moesina contribui para a invasão celular e a colonização pulmonar precoce.

He et al. (2010) investigaram, pela técnica da imunofluorescência, como o VEGF- C atua na via de sinalização da GTPase RhoA regulando a proteína moesina e consequentemente na remodelação do citoesqueleto, migração e invasão celular. Utilizando linhagens celulares de câncer do colo do útero, mostraram que a exposição ao VEGF-C desencadeia a remodelação do citoesqueleto de actina que é necessário para a movimentação celular, aumenta significativamente a migração horizontal de células e a invasão tridimensional em matriz gel que são ações dependentes do aumento da expressão e fosforilação da proteína moesina. Concluíram que VEGF-C atua na via de sinalização que regula a proteína moesina e

mostraram que através desta interação há um aumento nos processos de remodelação, migração e invasão celular.

Charafe-Jauffret et al. (2007) e Wang et al. (2012) ao analisarem câncer de mama, mostraram uma correlação estatisticamente significativa entre a forte expressão da moesina e uma menor sobrevida global dos pacientes. Além disso, Wang et al. (2012) mostraram uma correlação significativa também, dessa forte expressão com o grau de diferenciação tumoral. Já Cui et al. (2009) apresentaram em seus resultados uma correlação significativa entre a forte expressão desta proteína com metástases linfonodais em câncer de pâncreas.

2.3 PROTEÍNA MOESINA NO CÂNCER DE BOCA

Poucos estudos analisaram a expressão da moesina nos carcinomas espinocelulares da região de cabeça e pescoço, entretanto, nestas investigações foi observada uma maior expressão desta proteína pelas células malignas quando comparada com o epitélio da mucosa bucal normal (KOBAYASHI et al., 2003; KOBAYASHI et al., 2004; BELBIN et al., 2005; MADAN et al., 2006; KINOSHITA et al., 2012; SCHLECHT et al., 2012).

Em 2003 Kobayashi e colaboradores realizaram um estudo, imunohistoquímico, avaliando a expressão e a localização da moesina em epitélio oral normal, em espécimes apresentando vários graus de displasia epitelial, em carcinoma verrucoso e em carcinoma espinocelular, sendo todas as amostras de origem oral. Observaram que no epitélio oral normal, todas as amostras apresentaram um padrão de expressão membranoso nas células da camada basal. Nas amostras de displasia epitelial a proteína foi expressa de forma homogênea no estrato basal e estrato espinhoso, sendo que na maioria dos espécimes, a expressão foi predominantemente observada na membrana celular e não diferia entre os vários graus de displasia epitelial. Nos carcinomas verrucosos e carcinomas espinocelulares, a quase totalidade das células epiteliais foi corada com o anticorpo anti-moesina. Nas amostras de carcinoma espinocelular a proteína foi expressa de forma crescente no citoplasma e decrescente na membrana da célula, quando em comparação com displasia epitelial e carcinoma verrucoso, sendo assim, afirmaram que a expressão de moesina diminuiu na membrana e aumentou no citoplasma de acordo com o grau de malignidade. Verificou-se ainda uma correlação significativa

entre o padrão de expressão de moesina e o grau de diferenciação tumoral, não sendo observada associação entre o padrão de expressão e qualquer um dos fatores clínicos como idade, sexo, local do tumor e estadiamento clínico. Os autores mostraram ainda que a moesina foi fortemente expressa nas células em proliferação durante a formação do tecido e que ela foi inativada e liberada a partir da membrana para o citoplasma por associação intramolecular entre os domínios N e C-terminais. A proteína ativada localizava-se abaixo da membrana celular e funcionava como um agente de ligação cruzada entre a membrana e o citoesqueleto. Portanto, uma explicação para a expressão citoplasmática de moesina nos carcinomas espinocelulares se baseou no deslocamento da proteína para o citoplasma por uma diminuição dos sinais de ativação ou aumento dos sinais de inativação. Assim sendo, sugeriram que a moesina consiste em um novo biomarcador útil para o diagnóstico histopatológico de carcinoma espinocelular de boca.

Posteriormente, Kobayashi et al. (2004) avaliaram pela técnica imunohistoquímica e, pela primeira vez, puderam afirmar que o padrão de expressão de moesina é um indicador de prognóstico independente para pacientes com carcinoma espinocelular de boca podendo ser clinicamente um marcador útil para a seleção de pacientes para tratamentos específicos. Nesse estudo a expressão imunohistoquímica de moesina foi investigada em 103 carcinomas espinocelulares de boca, sendo que em 30 pacientes havia metástase linfonodal loco-regional. O padrão de expressão da moesina nos carcinomas espinocelulares de boca foi dividido em três grupos: padrão membranoso, padrão misto e padrão citoplasmático. Estes padrões de expressão da moesina foram correlacionados com o tamanho do tumor, com as metástases linfonodais, com o modo de invasão tumoral, com o grau de diferenciação e com a infiltração linfocitária. Em aproximadamente dois terços dos pacientes com metástases linfonodais, a expressão citoplasmática homogênea da moesina foi detectada nos linfonodos metastáticos. Além disso, ao avaliarem o *front* de invasão tumoral, os autores observaram um padrão citoplasmático da moesina nas células malignas e sugeriram que esta proteína provavelmente participa de processos como invasão tumoral e metástases. Foram analisados também camundongos transplantados com duas linhagens de células derivadas de carcinoma espinocelular de língua humano, sendo uma linhagem com baixo potencial metastático, que mostrou expressão predominantemente membranosa de moesina, e uma segunda linhagem com alto potencial metastático que exibiu uma

regulação negativa da expressão membranosa e um aumento na expressão citoplasmática desta proteína. Em relação à evolução tumoral, os resultados mostraram que, pacientes cujos tumores apresentavam expressão citoplasmática de moesina tiveram uma menor sobrevida global quando comparados com os pacientes cujos tumores apresentaram expressão membranosa da proteína. A análise multivariada mostrou que o padrão de expressão da moesina pode ser um fator independente de prognóstico para os pacientes com carcinoma espinocelular de boca. Os autores sugeriram que a expressão da moesina contribui para discriminar entre pacientes com metástase loco-regional e aqueles com um melhor prognóstico, podendo melhorar assim a definição da terapia apropriada para cada paciente.

Em 2005, Belbin et al. analisaram por meio de microarranjo a expressão genética da moesina em nove pacientes com estágio III ou estágio IV de carcinoma de células escamosas da cavidade oral, sendo as análises realizadas no tumor primário, nas metástases linfonodais e na mucosa oral normal. Os autores observaram expressão, negativa ou algumas vezes positiva, apenas da camada basal em epitélio normal de língua. Nos carcinomas espinocelulares de língua e nos gânglios linfáticos houve uma expressão positiva membranosa e citoplasmática da moesina pelas células neoplásicas. Concluíram que a moesina consistentemente aumentou sua expressão durante a progressão tumoral.

Visando investigar a correlação entre a localização subcelular das proteínas do complexo ERM e a sobrevida dos pacientes com carcinoma espinocelular, Madan et al. (2006) analisaram imuno-histoquimicamente a expressão e a localização das proteínas ezrina, radixin e moesina em 47 carcinomas espinocelulares da região de cabeça e pescoço, sendo 18 de boca e 29 de laringe. Os resultados mostraram uma fraca expressão de moesina citoplasmática na camada basal da mucosa bucal normal. Nenhuma expressão nuclear ou membranosa foi observada na camada basal do epitélio da mucosa bucal. Nos tumores, a expressão citoplasmática da moesina envolveu camadas em proliferação quando comparada com células tumorais mais diferenciadas e as pérolas de queratina foram negativas para a proteína. A expressão membranosa de moesina foi observada em 13 dos 44 tumores. Enquanto a ezrina e a moesina foram localizadas na membrana, a willina foi encontrada no núcleo das células tumorais. A análise multivariada demonstrou que a expressão citoplasmática forte de ezrina foi independentemente associada com a menor sobrevida dos pacientes com

carcinoma espinocelular da região de cabeça e pescoço. Os autores sugeriram que a moesina poderia ser utilizada como um potencial biomarcador associado com a progressão do tumor. Sugeriram ainda a necessidade de outros estudos para validar a importância das proteínas do complexo ERM na evolução clínica tumoral.

Recentemente, Schlecht et al. (2012) analisaram, por meio de microarranjo e imuno-histoquímica, a expressão das proteínas ezrina, moesina, merlina e willina em 128 carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço, com a finalidade de encontrar biomarcadores que podem distinguir fenótipos agressivos em um diagnóstico inicial. Seus resultados mostraram que altos níveis de expressão citoplasmática da moesina e ezrina estão associados a pobre sobrevida dos pacientes com câncer, mas como a amostra utilizada se mostrou bem heterogênea sugeriram novos estudos a fim de testar associações entre o local do tumor e a forma de tratamento.

Também em 2012, Kinoshita et al. estudaram o micro-RNA 133a, que atua como um gene supressor de tumor, e como ele pode regular a expressão da moesina. Para avaliar esta regulação utilizaram a técnica de western blotting em linhagens celulares de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, com isso, ao silenciar a expressão da moesina demonstraram uma inibição da proliferação, migração e invasão celular. Além disso, em uma análise imuno-histoquímica de 23 carcinomas espinocelulares da região de cabeça e pescoço observaram uma maior expressão da proteína moesina em epitélio neoplásico quando comparada com o tecido epitelial normal adjacente. Com base nos resultados os autores concluíram que a moesina tem uma atuação significativa nos processos de proliferação, migração e invasão celular.

2.4 PROTEÍNA PODOPLANINA NO CÂNCER DE BOCA

A podoplanina é uma glicoproteína transmembrana que encontra-se superexpressa em diversas neoplasias malignas originadas do epitélio estratificado escamoso (MARTIN-VILLAR et al., 2010; OHTA et al., 2013). Os mecanismos que regulam a sua expressão permanecem desconhecidos (KREPPEL et al., 2010; OHTA et al., 2013; TSUNEKI et al., 2013), mas sabe-se que ela aumenta a mobilidade das células tumorais facilitando assim seu processo de invasão tecidual

local (CUENI et al., 2010). A expressão da podoplanina vem sendo investigada em diversas neoplasias malignas sendo associada principalmente a um aumento na migração, na invasão celular e na ocorrência de metástase (WICKI; CHRISTOFORI, 2007; CUENI et al., 2010; KREPPEL et al., 2010; MARTIN-VILLAR et al., 2010; FERNANDEZ-MUNOZ et al., 2011; HUBER et al., 2011; INOUE et al., 2012a; INOUE et al., 2012b; MASHHADIABBAS et al., 2012; DOS SANTOS ALMEIDA et al., 2013; OHTA et al., 2013; TSUNEKI et al., 2013).

Recentes estudos (KAWAGUCHI et al., 2008; SAINTIGNY et al., 2009; FUNAYAMA et al., 2011; INOUE et al., 2012a; KREPPEL et al., 2012; DE VICENTE et al., 2013) utilizaram lesões cancerizáveis como a leucoplasia bucal com a finalidade de mostrar, que a podoplanina pode ser uma alternativa valiosa para avaliar o risco de transformação maligna destas lesões. Os resultados mostraram que o grau de expressão imuno-histoquímica da podoplanina foi associado com a intensidade da displasia epitelial e com o risco de progressão para o câncer bucal. Os autores sugeriram que a podoplanina pode ser considerada um biomarcador útil para avaliar o risco da progressão para o câncer de bucal e também auxiliar na escolha do tratamento mais adequado para o paciente.

No câncer de boca foi demonstrado que a podoplanina se expressa positivamente em mais de 80% das células do *front* de invasão (YUAN et al., 2006; KREPPEL et al., 2010), podendo ser um indicador do comportamento tumoral (DE SOUZA et al., 2012), pois a sua expressão esta inversamente relacionada com o grau de diferenciação das células escamosas (OHTA et al., 2013). Além disso, sua superexpressão foi associada à metástase linfonodal, a estágios mais avançados e a um pior prognóstico da doença (VORMITTAG et al., 2009; KREPPEL et al., 2010; MARGARITESCU et al., 2010; HUBER et al., 2011; KREPPEL et al., 2011; BARTULI et al., 2012; DOS SANTOS ALMEIDA et al., 2013; DUNKEL et al., 2013; FOSCHINI et al., 2013; OHTA et al., 2013).

Uma interessante e recente investigação de Tsuneki et al. (2013) buscou elucidar o papel da podoplanina na adesão, na proliferação e na migração das células do carcinoma espinocelular de boca. Quarenta e quatro espécimes cirúrgicas de carcinoma espinocelular de boca foram utilizadas para análise imuno-histoquímica da podoplanina sendo o perfil de expressão correlacionado com as propriedades clinico-patológicas. Usando ZK-1, um sistema de carcinoma espinocelular de boca humano e 5 outros sistemas celulares, os autores

examinaram os níveis de expressão da podoplanina pela imunofluorescência, western blotting e real time PCR (reação em cadeia da polimerase). Os efeitos transitórios do bloqueio da podoplanina via silenciamento do RNA (siRNA) nas células ZK-1 foram determinados para as funções celulares em termos de proliferação, adesão, migração e invasão celular em associação com CD44 e com o ácido hialurônico. Os tumores sem células positivas para a podoplanina foram histopatologicamente classificados como carcinomas espinocelulares menos diferenciados e invadiram mais frequentemente vasos linfáticos. As propriedades adesivas do ZK-1 foram significativamente inibidas pelo siRNA e a podoplanina colaborou com o CD44 na adesão celular. A migração celular não foi afetada pelo bloqueio da podoplanina. Os autores concluíram que a função fundamental da podoplanina nos carcinomas espinocelulares de boca consiste em mediar a adesão celular por meio da ligação cruzada entre CD44 e ácido hialurônico, ou seja, ela participa da adesão das células malignas à matriz extracelular.

Alguns autores verificaram a importância da expressão de podoplanina pelas células malignas na sobrevida dos pacientes com carcinoma espinocelular de boca (YUAN et al., 2006; VORMITTAG et al., 2009; CUENI et al., 2010; KREPPEL et al., 2010; KREPPEL et al., 2013, DOS SANTOS-ALMEIDA et al., 2013) e, embora alguns destes trabalhos correlacionaram esta proteína com um pior prognóstico para os pacientes (YUAN et al., 2006; VORMITTAG et al., 2009; CUENI et al., 2010; KREPPEL et al., 2010; KREPPEL et al., 2013), em outros estudos a podoplanina não influenciou a evolução da doença (DOS SANTOS ALMEIDA et al., 2013; DUNKEL et al., 2013).

2.5 INTERAÇÃO ENTRE AS PROTEÍNAS MOESINA E PODOPLANINA

As proteínas ERM (ezrina/radixina/moesina), além de atuarem como agentes de ligação do citoesqueleto a estruturas da membrana plasmática foram investigadas como ligantes de moléculas como a podoplanina (MARTIN-VILLAR et al., 2006; WICKI et al., 2006; WICKI; CHRISTOFORI, 2007; LOWE; NAVARRO-NUNEZ; WATSON, 2012).

Martin-Villar et al. (2006) e Wicki et al. (2006) por meio de estudos “in vitro” de linhagens celulares de rim canino e de câncer de mama humano,

respectivamente, mostraram que a podoplanina interage com a ezrina e a moesina através de um conjunto de aminoácidos básicos na sua cauda citoplasmática por meio da regulação das atividades da GTPase RhoA. Através desta interação ocorre um aumento da migração e invasão celular.

Embora a ligação da moesina com outras proteínas transmembrana como a podoplanina tenham sido sugeridas, maiores investigações são necessárias para comprovar se elas estão envolvidas conjuntamente ou isoladamente nos mecanismos de migração e invasão celular.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

A partir da análise de 84 carcinomas espinocelulares de boca com estadiamento clínico II e III, propôs-se:

- avaliar a expressão imuno-histoquímica da moesina e da podoplanina pelas células neoplásicas no *front* de invasão tumoral;
- verificar a associação entre a expressão destas duas proteínas pelas células malignas;
- verificar a relação entre a expressão dos marcadores com as características clínicas e demográficas dos pacientes;
- investigar a importância clínica da moesina e da podoplanina na evolução tumoral e no prognóstico dos pacientes;
- contribuir com o conhecimento sobre o papel da moesina e da podoplanina no mecanismo de invasão e progressão do câncer de boca.

4 Casuística e Métodos

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO E SELEÇÃO DA AMOSTRA

A população de estudo foi constituída por 84 pacientes portadores carcinoma espinocelular de boca, submetidos a tratamento no Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, Brasil, no período de 1970 a 2000. Parte desta amostra de carcinoma espinocelular de boca foi previamente estudada por Bravo-Calderón et al. (2011) sendo utilizados os seguintes critérios de inclusão.

- biópsias de carcinomas espinocelulares de boca, localizados na língua, assoalho bucal, gengiva inferior e área retromolar, confirmados por exame anatomopatológico;
- pacientes não submetidos a tratamento prévio;
- seguimento clínico completo;
- fragmentos tumorais suficientes para análise imuno-histoquímica e;
- disponibilidade dos blocos de parafina, bem como a adequada conservação dos espécimes;

4.2 REGISTRO DE DADOS CLÍNICOS E MICROSCÓPICOS

As informações clínicas e microscópicas referentes aos pacientes e à biópsia foram obtidas a partir do banco de dados pertencentes ao Hospital do Câncer A.C. Camargo. Estes registros incluíram a identificação e os dados demográficos dos pacientes como (gênero, idade e raça), informações relativas à história clínica como localização, sintomatologia, diâmetro e tempo de duração da lesão, bem como microscopia da biópsia e evolução do paciente, sendo que esta incluiu recidiva e a situação do paciente na última informação objetiva de

seguimento (1-vivo e sem evidência da doença (000); 2-vivo com câncer; 3-morte por intercorrência cirúrgica (MOCI); 4-morte decorrente do tumor primário (MOCA); 5-morte por outras causas não relacionadas ao câncer (MOASS) e 6-perdido de vista. Pacientes assintomáticos que foram perdidos de vista, após cinco anos de seguimento, foram classificados como vivos e livres de doença.

4.3 ANÁLISE MICROSCÓPICA

4.3.1 Graduação da malignidade tumoral

A graduação da malignidade tumoral foi realizada por dois examinadores (F.B.A.B. e D.T.O.), sem o conhecimento prévio dos dados clínicos dos pacientes, utilizando-se um microscópio óptico binocular (Axioskop2 Plus, ZEISS), contendo uma objetiva de 40X.

A área do *front* de invasão tumoral de cada espécime foi percorrida e analisada utilizando-se o índice histopatológico de malignidade proposto por Bryne et al., (1989), que analisa as características morfológicas apresentadas pelas células malignas e do estroma na região do *front* de invasão tumoral, conforme descrito na Tabela 1.

Para cada carcinoma espinocelular de boca o componente individual do sistema de graduação foi analisado e, posteriormente, somado em um escore final de malignidade, que variou de 5 a 20 pontos. Os espécimes tumorais foram então classificados como pouco agressivos (escore final ≤ 12) ou muito agressivos (escore final > 12).

Tabela 1 - Graduação de malignidade do *front* de invasão tumoral de acordo com Bryne et al. (1989).

Características morfológica	Escores de malignidade			
	1	2	3	4
Queratinização	Intensa (>50% das células)	Moderada (20-50% das células)	Baixa (5-20% das células)	Ausente (0-5% das células)
Polimorfismo nuclear	Discreto (>75% das células maduras)	Moderado (50-75% das células maduras)	Intenso (25-50% das células maduras)	Extremo (0-25% das células maduras)
Número de mitoses	0 a 1	2 a 3	4 a 5	>5
Padrão de invasão	Compressivo e com bordas bem definidas	Cordões sólidos e grossos de células tumorais	Cordões finos de células tumorais	Células tumorais isoladas ou dissociadas em pequenos grupos
Resposta do hospedeiro	Intensa	Moderada	Leve	Ausente

4.3.2 Técnica imuno-histoquímica

As marcações imuno-histoquímicas realizadas nessa pesquisa seguiram o protocolo de reações utilizado no Departamento de Anatomia Patológica do Hospital do Câncer A.C. Camargo, com diluições dos anticorpos primários previamente padronizados. A técnica está descrita em detalhes a seguir:

- ❖ Desparafinizar os cortes microscópicos dos tumores de boca de 3 µm de espessura em estufa a 60°C por 24 horas;
- ❖ Hidratar os cortes microscópicos dos tumores:
 - Xilol a 60°C por 20 minutos;
 - Xilol a temperatura ambiente por 20 minutos;
 - Etanol 100% por 30 segundos;
 - Etanol 85% por 30 segundos e;
 - Etanol 70% por 30 segundos.
- ❖ Lavar as lâminas em água corrente e destilada;

- ❖ Ferver a solução de tampão citrato 10 mM, pH 6.0, em panela de pressão (Solar, Rapid Express, Tramontina®) destampada. Em seguida, mergulhar as lâminas na solução em ebulição e lacrar a panela. Após 3 minutos, desligar a panela e esperar sua refrigeração gradual em água corrente. Destampar a panela e lavar as lâminas em água corrente e destilada;
- ❖ Bloquear a peroxidase endógena com peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 3%, 4 trocas de 5 minutos cada. Lavar em água corrente e destilada e após esta etapa, lavar com solução salina fosfatada tamponada (PBS), 10 mM pH 7.4 por 5 minutos;
- ❖ Incubar as lâminas com os anticorpos primários diluídos em tampão PBS contendo albumina bovina (BSA) 1% (Sigma, cat A9647, EUA) e azida sódica (NaN_3) 0,1%, por 30 min a 37°C e por 18 horas a 4°C em câmara úmida:
 - Moesina Ab-1 - Clone 38/87 – Diluição 1:400, Thermo scientific Lab Vision, USA;
 - Podoplanina–Clone D2-40 – Diluição 1:200 – Dako, Califórnia, USA.
- ❖ Lavar em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada;
- ❖ Incubar por 30 min a 37°C com Post Primary Block (NovoLink Max Polymer, Leica cat # RE7260-k, Reino Unido);
- ❖ Lavar em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada;
- ❖ Incubar com NovoLink Polymer por 30 min a 37°C (NovoLink Max Polymer, Leica cat # RE7260-k, Reino Unido);
- ❖ Lavar em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada;
- ❖ Incubar as lâminas em solução substrato, composta por: 100mg de 3,3' Diaminobenzidina Tetrahydrocloreto (DAB) (Sigma, cat# D-5637, EUA); 1mL de Dimetilsulfóxido (DMSO) (JT Baker, Phillipsburg, NJ, EUA); 1mL de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 6% e 100mL de PBS; por 5 minutos a 37°C, ao abrigo da luz;
- ❖ Lavar em água corrente e destilada por 3 minutos;
- ❖ Contracorar com Hematoxilina de Harris por 1 minuto;
- ❖ Lavar em água corrente e destilada;
- ❖ Imergir 2 vezes em água amoniacal (hidróxido de amônio 0,5%), lavando em seguida em água corrente e destilada;
- ❖ Desidratar os cortes microscópicos:

- Etanol 80% por 30 segundos;
- Etanol 95% por 30 segundos;
- Etanol 100% por 30 segundos, 2 vezes e;
- Xilol por 30 segundos, 4 vezes.

❖ Montar as lâminas em Entellan Neu (Merck, cat# 1.07961, Alemanha).

Como controle positivo utilizou-se um corte de placenta para o anticorpo anti-moesina e um corte de tonsila palatina para o anticorpo anti-podoplanina. Como controle negativo para ambas as marcações, utilizou-se um corte do mesmo tecido com a omissão dos anticorpos primários.

4.3.3 Avaliação imuno-histoquímica

A avaliação da expressão imuno-histoquímica da moesina e da podoplanina nos carcinomas espinocelulares de boca foi feita na área mais profunda dos tumores (*front* de invasão), contendo células epiteliais neoplásicas. Utilizou-se um sistema computadorizado de captura de imagens visando registrar o maior número de campos microscópicos tumorais apresentando imunomarcagem da moesina e da podoplanina. Fotomicrografias foram obtidas com uma câmera digital de alta resolução (AxioCam MRc, ZEISS, Jena, Alemanha) acoplada a um microscópio binocular (Axioskop 2 Plus, ZEISS, Jena, Alemanha) contendo uma objetiva de 40X.

A câmera digital foi conectada a um microcomputador (Pentium IV, INTEL, Santa Clara, CA, EUA), enviando suas imagens a um software de aquisição e análise de imagens (Axiovision 4.6 ZEISS, Jena, Alemanha). Cada campo microscópico tumoral foi previamente padronizado neste programa com o intuito de evitar diferenças na intensidade de expressão dos anticorpos analisados. O controle interno da moesina foi feito pela coloração de células endoteliais e o da podoplanina foi feito pela coloração dos vasos linfáticos presentes no corte.

Para cada carcinoma espinocelular de boca, imunomarcado com moesina ou podoplanina, foram capturados 10 campos microscópicos distintos na região do *front* de invasão tumoral, contendo o maior número de células epiteliais neoplásicas por campo. Para cada anticorpo (anti-moesina e anti-podoplanina) foi criado um

arquivo no Microsoft Windows contendo pastas específicas com o registro das imagens tumorais capturadas dos carcinomas espinocelulares de boca.

A análise das imagens foi feita por dois avaliadores independentes (F.B.A.B. e D.T.O) sempre no mesmo ambiente e com mesmo computador (Core 2 Duo, HP), utilizando-se um software de visualização de imagens para ambos os anticorpos. A expressão imuno-histoquímica da moesina e da podoplanina nos carcinomas espinocelulares de boca foi avaliada e o escore final da expressão destas proteínas pelas células malignas foi determinado pela soma da intensidade da imunomarcção (0- sem marcação, 1- imunomarcção fraca, 2- imunomarcção moderada e 3- imunomarcção forte) com a porcentagem de células com imunomarcção positiva (0- nenhuma célula tumoral marcada; 1- até 25% das células tumorais marcadas; 2- de 26% a 50% das células tumorais marcadas; 3- de 51% a 75% das células tumorais marcadas; 4- mais de 75% das células tumorais imunomarcadas).

Para cada campo capturado foi feita análise da expressão imuno-histoquímica da moesina e da podoplanina. Os dados foram contabilizados em uma planilha do Microsoft Excel (Microsoft Co.).

O escore final de cada espécime foi dado pela moda dos valores obtidos na análise dos 10 campos capturados. Quando foi obtido mais de um valor como moda dos resultados, foi utilizado sempre o maior número. Por fim, o escore obtido dos tumores, na marcação membranosa e citoplasmática, foi classificado em três grupos.

- 0 (escore 0) = ausente;
- 1 (escores de 1 a 4) = fraco;
- 2 (escores de 5 a 7) = forte.

Ao final do processo de avaliação dos carcinomas espinocelulares de boca, os valores foram contabilizados em uma planilha, discriminando a identificação de cada neoplasia.

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa estatístico para microcomputador SPSS for Windows versão 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

A associação entre a expressão da moesina e da podoplanina com as características clínicas e microscópicas dos carcinomas espinocelulares de boca foi realizada pelo teste de qui-quadrado (χ^2), com um nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$). Para este teste os resultados fraco e negativo (1 e 0) foram considerados juntos formando o grupo de imunomarcção tumoral fraca e o com escore 2 formou o grupo de imunomarcção tumoral forte.

Para análise da sobrevida global utilizou-se o tempo de seguimento, em meses, entre a data da cirurgia do tumor primário e o óbito do paciente, independente da causa da morte, ou a data da última informação objetiva do seguimento.

Quanto à sobrevida livre de doença considerou-se para sua análise o tempo em meses transcorrido entre a data da remoção cirúrgica do tumor primário e o aparecimento da recidiva ou até a data da última informação objetiva do seguimento.

Para estas análises foram considerados “não censurados” os pacientes que apresentaram o evento de interesse (óbito para sobrevida global e recorrência do tumor primário para sobrevida livre de doença). Os casos considerados “censurados” foram aqueles em que até a data da última informação objetiva de seguimento não ocorreu nenhum evento de interesse.

As análises da sobrevida global e sobrevida livre de doença, acumuladas em 5 e 10 anos, foram feitas pelo estimador produto-limite de Kaplan-Meier. A comparação entre as curvas de sobrevida foi realizada pelo teste log-rank, com nível de significância igual a 5%.

4.5 AQUISIÇÃO DAS FOTOMICROGRAFIAS

As fotomicrografias apresentadas neste trabalho foram obtidas por meio do software de aquisição e análise de imagens Axiovision 4.6, ZEISS.

4.6 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP)

Essa pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Bauru – Universidade de São Paulo em reunião do dia 26 de fevereiro de 2014, sob o nº 21329113.5.0000.5417 (Anexo A).

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO

De acordo com os critérios de inclusão, foi feita a seleção dos 84 pacientes e a maior frequência de carcinoma espinocelular de boca foi detectada em pacientes do gênero masculino (85,7%) e da raça branca (95,2%), com idades variando entre 33 e 95 anos e média de 58 anos (Tabela 2).

Em relação aos fatores de risco para o desenvolvimento da neoplasia observou-se que, 84,5% dos pacientes eram tabagistas e 67,9% etilistas (Tabela 2).

Quanto às características clínicas dos tumores, a localização mais comum foi a língua (54,8%), seguida pelo assoalho de boca (28,6%). A área retromolar e a gengiva inferior mostraram uma frequência menor de ocorrência do carcinoma espinocelular de boca, conforme ilustrado na Tabela 2.

Levando em consideração os critérios de estadiamento clínico, 59,5% dos pacientes apresentaram tumores classificados como T2 e 40,5% como T3. Verificou-se ainda, que quase metade dos pacientes (48,8%) apresentou linfonodos regionais clinicamente palpáveis no momento do exame físico (N+).

De acordo com os critérios de inclusão dos pacientes neste estudo, em apenas 3 deles (3,6%) não foi realizado o esvaziamento cervical, em 78,8% foi realizado esvaziamento cervical ipsilateral e em 17,9% o esvaziamento cervical bilateral simultâneo. Em trinta e oito (45,2%) dos pacientes submetidos ao esvaziamento cervical foi comprovado, mediante análise histopatológica, o comprometimento linfonodal cervical (pN+).

A ocorrência de recidiva locorregional foi relatada em 41 pacientes (48,8%), acometendo mais comumente o próprio local do tumor primário (25%), seguida pela recidiva regional (16,7%). Em cinco pacientes (6%) a recidiva local e regional ocorreu simultaneamente (Tabela 2).

Como pode ser observado na Tabela 2, quase metade dos pacientes foram submetidos à radioterapia e em uma pequena parte foi descoberto um segundo tumor primário.

Tabela 2 - Distribuição dos 84 pacientes com carcinoma espinocelular de boca, segundo as características demográficas, os fatores de risco (tabaco e álcool), estadiamento e evolução clínica. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1963 a 2012.

Variável		Nº de pacientes	%
Gênero	Masculino	72	85,7
	Feminino	12	14,3
Idade	<=58	42	50
	>58	42	50
Cor	Branca	80	95,2
	Não branca	4	4,8
Tabagismo[#]	Sim	71	84,5
	Não	4	4,8
Etilismo[#]	Sim	57	67,9
	Não	19	22,6
Localização	Língua	46	54,8
	Assoalho bucal	24	28,6
	Gengiva inferior	7	8,3
	Área retromolar	7	8,3
Estadio clínico	II	26	31
	III	58	69
Recidiva locorregional	Sim	41	48,8
	Não	43	51,2
Radioterapia	Sim	37	44
	Não	47	56
Segundo tumor	Sim	14	16,7
	Não	70	83,3
TOTAL		84	100

[#] excluídos os pacientes com informação ignorada. **N:** número de paciente.

5.2 ANÁLISE MICROSCÓPICA

5.2.1 Graduação da malignidade tumoral

A graduação mediante análise histológica foi realizada conforme os parâmetros propostos por Bryne et al. (1989) e foram analisados, na região do front de invasão tumoral, o grau de queratinização, o polimorfismo nuclear, o número de mitoses, o padrão de invasão e a resposta do hospedeiro.

Como pode ser observado, na Tabela 3, a maioria dos cacinomas espinocelulares de boca analisados era constituída de tumores bem a moderadamente diferenciados, com moderada queratinização e polimorfismo nuclear, apresentando de duas a cinco figuras de mitose por campo analisado, com padrão de invasão predominantemente por cordões grossos e sólidos, e com resposta do hospedeiro variando de intensa a moderada.

A variação do escore final dos carcinomas espinocelulares analisados variou de 5 a 14, sendo a maioria da amostra (86,9%) constituída por tumores bem a moderadamente diferenciados, ou seja, pouco agressivos e 11 (13,1%) muito agressivos. A imunomarcação, forte ou fraca, da proteína moesina e da podoplanina se deu de maneira semelhante entre os tumores considerados pouco agressivos e também entre aqueles considerados muito agressivos e nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada entre a graduação de malignidade tumoral e a expressão de moesina ($p=0,879$) e também de podoplanina ($p=0,788$) (Tabela 4).

5.2.2 Variáveis microscópicas analisadas

Segundo as características microscópicas analisadas, incluindo embolização vascular, infiltração muscular, neural e óssea, verificamos que 63,1% dos 84 carcinomas espinocelulares de boca apresentaram embolização vascular. Nestes tumores, a frequência de infiltração perineural foi de 67,9%, a muscular de 82,1% e a óssea foi de 6%.

Além disso, o comprometimento linfonodal mediante análise histopatológica (pN+) foi confirmado em 38 dos 81 pacientes que foram submetidos ao esvaziamento cervical.

Tabela 3 - Graduação de malignidade dos 84 carcinomas espinocelulares de boca. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1963 a 2012.

Características morfológica	Escores de malignidade			
	1	2	3	4
Queratinização	24 (28,57%)	31 (36,9%)	28 (33,33%)	1 (1,19%)
Polimorfismo nuclear	1 (3,57%)	60 (71,42%)	21 (25%)	0
Número de mitoses	1 (1,19%)	38 (45,23%)	35 (41,66%)	10 (11,9%)
Padrão de invasão	0	75 (89,28%)	9 (10,71%)	0
Resposta do hospedeiro	40 (47,61%)	33 (39,28%)	11 (13,09%)	0

Tabela 4 - Distribuição da expressão imuno-histoquímica da moesina e da podoplanina pelas células malignas dos 84 pacientes com carcinoma espinocelular de boca, segundo a graduação de malignidade tumoral. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1963 a 2012.

Variável		Graduação de malignidade				p
		Pouco agressivo		Muito agressivo		
		N	%	N	%	
Moesina	Fraca	35	47,9	5	45,4	0,879
	Forte	38	52,1	6	54,6	
Podoplanina	Fraca	43	58,9	6	54,6	0,788
	Forte	30	41,1	5	45,4	
TOTAL		73	100	11	100	

N: número de paciente. p: número descritivo do teste qui-quadrado ou teste exato de Fischer.

5.2.3 Expressão da Moesina nos carcinomas espinocelulares de boca

A expressão da proteína moesina foi analisada na região do *front* de invasão tumoral dos 84 carcinomas espinocelulares de boca. Em 40 tumores a expressão da proteína pelas células malignas foi considerada fraca e em 44 considerada forte (Figura 1).

O padrão de expressão da moesina pelas células neoplásicas foi predominantemente citoplasmático (Figuras 1A, 1B e 1C). Entretanto, a expressão membranosa da proteína também foi detectada em algumas células tumorais (Figura 1D). Além disso, regiões tumorais com células mais diferenciadas como as pérolas de queratina apresentaram perda da expressão da moesina (Figura 1C).

A relação da moesina com as características clínicas/demográficas e microscópicas avaliadas estão descritas nas Tabelas 5, 6 e 7.

A imunomarcacão forte foi observada na maioria dos pacientes do gênero masculino e feminino. Em relação a cor da pele e aos fatores de risco para o carcinoma espinocelular de boca, a maioria dos pacientes desta amostra era da cor branca, tabagista e etilista, e a expressão forte ou fraca da moesina foi distribuída de forma semelhante nestes pacientes (Tabela 5).

A distribuição da moesina com base na localização do tumor revelou que a maioria dos pacientes apresentavam carcinomas espinocelulares localizados na língua e no assoalho de boca, seguidos pela gengiva e área retromolar. Novamente a expressão forte ou fraca da moesina pelas células malignas ocorreu de forma semelhante em relação a localização tumoral (Tabela 5).

Nenhuma diferença estatisticamente significativa foi detectada entre a expressão da moesina e as características clínicas e demográficas incluindo o gênero, a idade, a cor, o tabagismo, o etilismo e a localização tumoral, conforme ilustrado na Tabela 5.

Como pode ser observado na Tabela 6, também não foi encontrada nenhuma diferença estatisticamente significativa entre a expressão fraca ou forte da moesina e as variáveis clínicas como estadiamento clínico, tratamento e evolução. Por vezes a intensidade da expressão da moesina apresentava distribuição semelhante, como nos tumores clinicamente classificados como T2, naqueles com estadio clínico II, nos pacientes que apresentaram recidiva locorregional, naqueles

submetidos a radioterapia adjuvante e também nos pacientes em que um segundo tumor primário foi encontrado.

Segundo as características microscópicas analisadas, a maioria dos carcinomas espinocelulares de boca mostrou embolização vascular, infiltração neural e infiltração muscular (Tabela 7). A infiltração óssea foi encontrada em uma pequena porcentagem da amostra. Novamente a expressão forte ou fraca da moesina, com base nestas características, ocorreu de forma semelhante e nenhuma diferença estatisticamente significativa foi encontrada, como ilustrado na Tabela 7.

A expressão forte e fraca da moesina pelas células malignas do *front* de invasão dos carcinomas espinocelulares de boca não mostrou diferenças significativas em relação a presença (pN+) ou não (pN0) de comprometimento linfonodal cervical (Tabela 7).

Tabela 5 - Distribuição da expressão imuno-histoquímica da moesina pelas células malignas dos 84 pacientes com carcinoma espinocelular de boca, segundo as características demográficas e os fatores de risco (tabaco e álcool). Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1963 a 2012.

Variável	EXPRESSÃO DA MOESINA					p
		Fraca		Forte		
		N	%	N	%	
Gênero	Masculino	35	87,5	37	84,1	0,656
	Feminino	5	12,5	7	15,9	
Idade	<=58	22	55	20	45,5	0,382
	>58	18	45	24	54,5	
Cor	Branca	39	97,5	41	93,2	0,618
	Não branca	1	2,5	3	6,8	
Tabagismo [#]	Sim	31	93,9	40	95,2	0,999
	Não	2	6,1	2	4,8	
Etilismo [#]	Sim	26	76,5	31	73,8	0,790
	Não	8	23,5	11	26,2	
Localização	Língua	21	52,5	25	56,8	NA
	Assoalho bucal	12	30	12	27,3	
	Gengiva inferior	2	5	5	11,4	
	Área retromolar	5	12,5	2	4,5	
TOTAL		40	100	44	100	

[#] excluídos os pacientes com informação ignorada. **N**: número de paciente. **p**: número descritivo do teste qui-quadrado ou teste exato de Fischer.

Tabela 6 - Distribuição da expressão imuno-histoquímica da moesina pelas células malignas dos 84 pacientes com carcinoma espinocelular de boca, segundo tratamento, estadiamento e evolução clínica. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1963 a 2012.

Variável	EXPRESSÃO DA MOESINA					
		Frac		Forte		p
		N	%	N	%	
Estadiamento T	T2	25	62,5	25	56,8	0,596
	T3	15	37,5	19	43,2	
Estadiamento N	N0	22	55	21	47,7	0,505
	N+	18	45	23	52,3	
Estadio clínico	II	13	32,5	13	29,5	0,770
	III	27	67,5	31	70,5	
Esvaziamento Linfonodal	Não	2	5	1	2,3	0,679
	Ipsilateral	30	75	36	81,8	
	Contralateral	8	20	7	15,9	
Recidiva locorregional	Sim	22	55	21	47,7	0,505
	Não	18	45	23	52,3	
Radioterapia	Sim	20	50	17	38,6	0,295
	Não	20	50	27	61,4	
Segundo tumor	Sim	10	25	4	9,1	0,061
	Não	30	75	40	90,9	
TOTAL		40	100	44	100	

N+: presença de comprometimento linfonodal cervical. **N0:** ausência de comprometimento linfonodal cervical. **N:** número de paciente. **p:** número descritivo do teste qui-quadrado ou teste exato de Fischer.

Tabela 7 - Distribuição da expressão imuno-histoquímica da moesina pelas células malignas dos 84 pacientes com carcinoma espinocelular de boca, segundo a evolução clínica e as características microscópicas. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1963 a 2012.

Variável		EXPRESSÃO DA MOESINA				p
		Fraca		Forte		
		N	%	N	%	
Embolização vascular	Sim	25	64,5	28	63,6	0,914
	Não	15	37,5	16	36,4	
Infiltração neural	Sim	28	70	29	65,9	0,688
	Não	12	30	15	43,1	
Infiltração muscular	Sim	31	77,5	38	86,4	0,289
	Não	9	22,5	6	13,6	
Infiltração óssea	Sim	2	5	3	6,8	0,999
	Não	38	95	41	93,2	
pN [#]	pN+	17	44,7	21	48,8	0,712
	pN0	21	55,3	22	51,2	
TOTAL		40	100	44	100	

pN+: presença de comprometimento linfonodal histopatológico. **pN0**: ausência de comprometimento linfonodal histopatológico. **#** excluídos os pacientes em quem não foi realizado o esvaziamento linfonodal. **N**: número de paciente. **p**: número descritivo do teste qui-quadrado ou teste exato de Fischer.

Figura 1 - Imunoexpressão da moesina pelas células malignas do carcinoma espinocelular de boca. Em A, B, C e D imunoexpressão forte da proteína com padrão citoplasmático (A, B e C) ou membranoso (D) da moesina. Em C, notar que as pérolas córneas não expressaram a moesina (A, IHQ 20X; B, IHQ 40X; C, IHQ 10X; D, IHQ 20X). Em E e F imunoexpressão fraca da proteína (E, IHQ 10X; F, IHQ 40X).

5.2.4 Expressão da podoplanina nos carcinomas espinocelulares de boca

A expressão da podoplanina também foi analisada na região do *front* de invasão tumoral e comparada, estatisticamente, pelo teste do qui-quadrado com nível de significância de 5%. Foi contabilizado um total de 49 carcinomas espinocelulares de boca com imunomarcacão fraca (Figura 2D) e 35 com imunomarcacão forte de podoplanina (Figuras 2A, 2B e 2C).

Quando presente, a expressão da podoplanina nas células malignas apresentava um padrão membranoso e citoplasmático (Figuras 2A e 2B) ou predominantemente membranoso (Figura 2C).

A relação da podoplanina com as características clínicas, demográficas e microscópicas avaliadas estão descritas nas Tabelas 8, 9 e 10.

Na maioria dos carcinomas espinocelulares de boca foi observada a imunomarcacão fraca da podoplanina pelas células neoplásicas do *front* de invasão tumoral, porém, a distribuição da expressão fraca ou forte se deu de maneira semelhante quando associada as características como gênero, idade, cor da pele, tabagismo e etilismo (Tabela 8).

Com base na localização a expressão fraca ou forte da podoplanina ocorreu na maioria das amostras localizadas na língua e de forma muito semelhante nos outros locais analisados e nenhuma diferença estatisticamente significativa foi detectada entre esta expressão da proteína e a localização do tumor (Tabela 8).

Em relação à variáveis clínicas como estadiamento, tratamento e evolução clínica a expressão forte ou fraca da podoplanina também ocorreu de maneira semelhante e nenhuma diferença estatisticamente significativa foi detectada (Tabela 9)

Houve uma associação significativa entre a expressão da podoplanina e a radioterapia, ou seja, a expressão forte da proteína foi significativamente maior do que a fraca expressão ($p=0,004$) naqueles pacientes que receberam radioterapia pós-operatória. Entretanto, nos pacientes com carcinoma espinocelular de boca que não foram submetidos a radioterapia, a expressão fraca da podoplanina ocorreu com maior frequência (Tabela 9).

Nos pacientes que apresentaram segundo tumor primário, a expressão forte foi encontrada mais frequentemente se comparada com a fraca expressão da proteína (Tabela 9).

Com base nas características microscópicas analisadas, nos carcinomas espinocelulares de boca com embolização vascular, infiltração neural e óssea, a distribuição fraca ou forte da podoplanina foi semelhante e sem significância estatística (Tabela 10).

Os pacientes com carcinoma espinocelular de boca que apresentaram invasão muscular, a forte expressão da podoplanina foi observada em menor frequência quando comparada com a fraca expressão desta proteína ($p=0,006$), conforme descrito na Tabela 10.

Houve ainda uma associação estatisticamente significativa ($p=0,013$) entre a expressão da podoplanina e o comprometimento linfonodal histopatológico (pN). Os pacientes com tumores que não apresentaram comprometimento linfonodal (pN0) apresentaram mais frequentemente uma forte expressão da proteína, enquanto que naqueles com comprometimento linfonodal (pN+) a expressão da podoplanina pelas células neoplásicas, foi predominantemente fraca (Tabela 10).

Tabela 8 - Distribuição da expressão imuno-histoquímica da podoplanina pelas células malignas dos 84 pacientes com carcinoma espinocelular de boca, segundo as características demográficas e os fatores de risco (tabaco e álcool). Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1963 a 2012.

Variável	EXPRESSÃO DA PODOPLANINA					p
	Fraca		Forte			
	N	%	N	%		
Gênero	Masculino	45	91,8	27	77,1	0,058
	Feminino	4	8,2	8	22,9	
Idade	<=58	24	49	18	51,4	0,825
	>58	25	51	17	48,6	
Cor	Branca	46	93,9	34	97,1	0,637
	Não branca	3	6,1	1	2,9	
Tabagismo [#]	Sim	43	95,6	28	93,3	0,999
	Não	2	4,4	2	6,7	
Etilismo [#]	Sim	32	71,1	25	80,6	0,346
	Não	13	28,9	6	19,4	
Localização	Língua	30	61,2	16	45,7	NA
	Assoalho bucal	13	26,5	11	31,4	
	Gengiva inferior	3	61,1	4	11,4	
	Área retromolar	3	6,1	4	11,4	
TOTAL		49	100	35	100	

[#] excluídos os pacientes com informação ignorada. **N:** número de pacientes. **p:** número descritivo do teste qui-quadrado ou teste exato de Fischer.

Tabela 9 - Distribuição da expressão imuno-histoquímica da podoplanina pelas células malignas dos 84 pacientes com carcinoma espinocelular de boca, segundo tratamento, estadiamento e evolução clínica. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1963 a 2012.

Variável	EXPRESSÃO DA PODOPLANINA					
		Fracá		Forte		p
		N	%	N	%	
Estadiamento T	T2	27	55,1	23	65,7	0,329
	T3	22	44,9	12	34,3	
Estadiamento N	N0	24	49	19	54,3	0,631
	N+	25	51	16	45,7	
Estadio clínico	II	16	32,7	10	28,6	0,690
	III	33	67,3	25	71,4	
Esvaziamento Linfonodal	Não	1	2	2	5,7	0,669
	Ipsilateral	39	79,6	27	77,1	
	Contralateral	9	18,4	6	17,1	
Recidiva locorregional	Sim	26	53,1	15	42,9	0,356
	Não	23	46,9	20	57,1	
Radioterapia	Sim	21	42,9	26	74,3	0,004
	Não	28	57,1	9	25,7	
Segundo tumor	Sim	6	12,2	8	22,9	0,198
	Não	43	87,8	27	77,1	
TOTAL		49	100	35	100	

N+: presença de comprometimento linfonodal cervical. **N0:** ausência de comprometimento linfonodal cervical.
N: número de pacientes. **p:** número descritivo do teste qui-quadrado ou teste exato de Fischer.

Tabela 10 - Distribuição da expressão imuno-histoquímica da podoplanina pelas células malignas dos 84 pacientes com carcinoma espinocelular de boca, segundo a evolução clínica e as características microscópicas. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1963 a 2012.

Variável		EXPRESSÃO DA PODOPLANINA				p
		Fraca		Forte		
		N	%	N	%	
Embolização vascular	Sim	35	71,4	18	51,4	0,061
	Não	14	28,6	17	48,6	
Infiltração neural	Sim	34	69,4	23	65,7	0,722
	Não	15	30,6	12	34,3	
Infiltração muscular	Sim	45	91,8	24	68,6	0,006
	Não	4	8,2	11	31,4	
Infiltração óssea	Sim	1	2	4	11,4	0,155
	Não	48	98	31	88,6	
pN [#]	pN+	28	58,3	10	30,3	0,013
	pN0	20	41,7	23	69,7	
TOTAL		49	100	35	100	

pN+: presença de comprometimento linfonodal histopatológico. **pN0**: ausência de comprometimento linfonodal histopatológico. **#** excluídos os pacientes em quem não foi realizado o esvaziamento linfonodal. **N**: número de pacientes. **p**: número descritivo do teste qui-quadrado ou teste exato de Fischer.

Figura 2 - Imunoexpressão da podoplanina pelas células malignas do front de invasão dos carcinomas espinocelulares de boca. Em A e B imunoexpressão citoplasmática forte (A, IHQ 20X; B IHQ 40X), em C imunoexpressão forte com padrão membranoso (IHQ 40X) e em D imunoexpressão fraca (IHQ 20X).

5.2.5 Associação da expressão da moesina e da podoplanina nos carcinomas espinocelulares de boca

A associação entre a expressão da moesina e da podoplanina pelas células malignas foi analisada na região do *front* de invasão dos carcinomas espinocelulares de boca e comparada, estatisticamente, pelo teste do qui-quadrado com nível de significância de 5%.

A proteína moesina mostrou uma expressão fraca em 40 tumores analisados. Em vinte e cinco destes a podoplanina também mostrou expressão consideravelmente fraca pelas células malignas, porém em quinze deles a expressão da podoplanina foi forte na região do *front* de invasão tumoral (Tabela 11).

Em quarenta e quatro carcinomas espinocelulares de boca analisados houve uma forte expressão citoplasmática da proteína moesina. Em vinte deles a podoplanina também se expressou fortemente e, em vinte e quatro sua expressão pelas células neoplásicas foi considerada fraca (Tabela 11).

Com base nos resultados obtidos, foi encontrada uma associação positiva entre a expressão das duas proteínas nos carcinomas espinocelulares de boca, porém sem significância estatística ($p = 0,460$), conforme descrito na Tabela 11.

Tabela 11 - Associação entre a expressão imuno-histoquímica da moesina e da podoplanina pelas células malignas dos 84 pacientes com carcinoma espinocelular de boca. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1963 a 2012.

Variável		MOESINA		p
		Fraca	Forte	
		N	N	
PODOPLANINA	Fraca	25	24	0,460
	Forte	15	20	
TOTAL		40	44	

N: número de pacientes. p: número descritivo do teste qui-quadrado ou teste exato de Fischer.

5.3 ANÁLISE DA SOBREVIDA

Ao final da análise e do período de seguimento, 7 pacientes estavam vivos e sem evidência da doença, 1 paciente vivo e com câncer, 6 morreram por intercorrência cirúrgica, 41 foram a óbito em decorrência do câncer e 29 também foram a óbito, porém por outras causas não relacionadas ao câncer. As análises foram feitas com base em variáveis como gênero, idade, comprometimento linfonodal (pN), radioterapia adjuvante, infiltração muscular, tabagismo, etilismo, moesina e podoplanina. As taxas de sobrevida acumuladas em 5 e 10 anos foram calculadas pela técnica de Kaplan-Meier e a comparação das curvas de sobrevida realizada pelo teste de log-rank.

A Tabela 12 ilustra, as taxas de sobrevida global em um período de seguimento que variou entre 0,01 mês a 288 meses e com média de 57,2 meses. A única variável entre gênero, idade, comprometimento linfonodal histopatológico, radioterapia, infiltração muscular, tabagismo, etilismo, moesina e podoplanina, que apresentou significância estatística foi a moesina.

A probabilidade de sobrevida global em cinco anos para pacientes com carcinoma espinocelular de boca que apresentaram uma fraca expressão da moesina foi 38,5% enquanto para aqueles que apresentaram uma forte expressão foi de 22,7%. Em dez anos esta probabilidade naqueles que apresentaram uma fraca expressão foi reduzida para 23,8% e nos que foram classificados com uma forte expressão para 6,8% (Tabela 12). A Figura 3 ilustra a comparação entre as curvas de sobrevida global acumulada referente a expressão forte ou fraca da moesina, sendo a diferença entre elas estatisticamente significativa ($p=0,024$).

As taxas de sobrevida livre de doença, nos pacientes com carcinoma espinocelular de boca, podem ser visualizadas na Tabela 13. O período de seguimento variou entre 0,01 mês a 288 meses e com média de 128 meses. A única variável entre gênero, idade, comprometimento linfonodal histopatológico, radioterapia, infiltração muscular, tabagismo, etilismo, moesina e podoplanina, que apresentou significância estatística foi a presença de comprometimento linfonodal histopatológico. Pode ser observado na Tabela 13 que, para os pacientes com carcinoma espinocelular de boca sem comprometimento linfonodal a probabilidade de sobrevida livre de doença em 5 anos foi de 66,7% e em 10 anos reduziram para 58,4%. Em pacientes com carcinoma espinocelular de boca com comprometimento

linfonodal histopatológico a probabilidade de sobrevida livre de doença em 5 anos foi de 27,8% permanecendo com o mesmo valor em 10 anos.

A significância estatística da sobrevida global da moesina foi também analisada pelo modelo de regressão de Cox conforme ilustrado na Tabela 14. Verifica-se que um paciente que apresenta carcinoma espinocelular de boca com forte expressão da moesina tem o risco de 1,737 vezes a mais de morrer quando comparado com aquele que apresentou uma fraca expressão da proteína.

Tabela 12 - Análise da sobrevida global acumulada por meio da técnica de Kaplan-Meier dos 84 pacientes com carcinoma espinocelular de boca, segundo as características demográficas, os fatores de risco (tabaco e álcool), o comprometimento linfonodal histopatológico (pN) e a expressão da moesina e da podoplanina. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1963 a 2012.

Variável		SOBREVIDA GLOBAL		p
		5 anos (%)	10 anos (%)	
Gênero	Masculino	33,8	15,4	0,145
	Feminino	8,3	8,3	
Idade	<=58	38,1	19,3	0,075
	>58	22	9,8	
Tabagismo	Sim	28,6	11,2	0,282
	Não	25	25	
Etilismo	Sim	25	9,6	0,512
	Não	31,6	12,6	
Radioterapia	Sim	32,4	11,8	0,802
	Não	28,4	16,5	
Infiltração muscular	Sim	30,9	11,5	0,313
	Não	26,7	26,7	
pN	pN0	39,5	21,2	0,081
	pN+	21,7	8,1	
Moesina	Fraca	38,5	23,8	0,024
	Forte	22,7	6,8	
Podoplanina	Fraca	27,1	5,0	0,133
	Forte	34,3	25,7	

pN+: presença de comprometimento linfonodal histopatológico. **pN0:** ausência de comprometimento linfonodal histopatológico.

Figura 3 - Sobrevida global dos pacientes com carcinoma espinocelular de boca de acordo com a expressão da proteína moesina. Porcentagem de sobrevida acumulada por meio da técnica de Kaplan-Meier.

Tabela 13 - Análise da sobrevida livre de doença acumulada por meio da técnica de Kaplan-Meier dos 84 pacientes com carcinoma espinocelular de boca, segundo as características demográficas, os fatores de risco (tabaco e álcool), o comprometimento linfonodal histopatológico (pN) e a expressão da moesina e da podoplanina. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1963 a 2012.

Variável		SOBREVIDA LIVRE DE DOENÇA		p
		5 anos (%)	10 anos (%)	
Gênero	Masculino	46,1	41	0,334
	Feminino	31,8	31,8	
Idade	<=58	50,6	43,4	0,678
	>58	45,9	45,9	
Tabagismo	Sim	40,6	33,8	0,898
	Não	33,3	33,3	
Etilismo	Sim	38,5	38,5	0,823
	Não	41,7	33,3	
Radioterapia	Sim	38,4	38,4	0,888
	Não	49,9	42,8	
Infiltração muscular	Sim	38,6	32,2	0,092
	Não	67,7	67,7	
pN	pN0	66,7	58,4	0,018
	pN+	27,8	27,8	
Moesina	Fraca	50,4	43,2	0,184
	Forte	37	37	
Podoplanina	Fraca	42,8	21,4	0,708
	Forte	53,9	53,9	

pN+: presença de comprometimento linfonodal cervical histopatológico. **pN0:** ausência de comprometimento linfonodal histopatológico.

Figura 4 - Sobrevida livre de doença dos pacientes com carcinoma espinocelular de boca de acordo com o comprometimento linfonodal histopatológico. Porcentagem de sobrevida acumulada por meio da técnica de Kaplan-Meier.

Tabela 14 - Análise da expressão de moesina por meio do modelo de Cox. Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, 1963 a 2012.

Variável		Sobrevida Global		p
		HR aj	IC (HR aj)	
Moesina	Fraca (0)	1,737	[1,083; 2,788]	0,022
	Forte (1)			

HR aj: Hazard ratio ajustado por gênero, idade, comprometimento linfonodal histopatológico, radioterapia, infiltração muscular, tabagismo, etilismo, moesina e podoplanina. **IC:** Intervalo de confiança.

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

Nas últimas décadas, o conhecimento do processo de metástase tem sido foco de muitos estudos visando entender cada passo de sua ocorrência. Já está bem estabelecido que a metástase é um processo de múltiplas etapas envolvendo essencialmente a mobilidade celular, o intravasamento, o transporte da célula para órgãos distantes por meio de fluidos, o extravasamento e o crescimento do tumor neste novo local (CONDEELIS; SINGER; SEGALL, 2005; SAHAI, 2007; ESTECHA et al., 2009; HE et al., 2010; LOWE; NAVARRO-NUNEZ; WATSON, 2012).

As proteínas do complexo ERM que atuam desempenhando um papel chave no controle da morfologia, adesão, forma, mobilidade celular e transdução de sinal, tem fundamental importância no processo de metástase tumoral. Algumas destas proteínas como a moesina, componente da família ERM, possuem múltiplas funções mantendo a arquitetura celular como um elo na ligação estrutural entre a membrana plasmática e o citoesqueleto de actina (BATCHELOR; WOODWARD; CROUCH, 2004; LOWE; NAVARRO-NUNEZ; WATSON, 2012; DENG; CHO; LI, 2013; EMERY; RAMEL, 2013; MANITI; CARVALHO; PICART, 2013; JIANG et al., 2014), proporcionando um suporte mecânico para o fuso mitótico (KUNDA et al., 2008; MCCLATCHEY, 2012) e desempenhando importante papel no estabelecimento da polaridade celular após a fixação inicial da célula neoplásica ao endotélio antes do extravasamento e também no achatamento das células antes da invasão e migração (ESTECHA et al., 2009).

Poucas investigações sobre a expressão da moesina e sua regulação nos tumores foram realizados (KOBAYASHI et al., 2003; KOBAYASHI et al., 2004; BELBIN et al., 2005; MADAN et al., 2006; CHARAFE-JAUFFRET et al., 2007; CUI et al., 2009; ESTECHA et al., 2009; HE et al., 2010; KINOSHITA et al., 2012; WANG et al., 2012), mas, particularmente no câncer de boca, alguns autores sugeriram que esta proteína está associada com a progressão tumoral (KOBAYASHI et al., 2004; BELBIN et al., 2005; MADAN et al., 2006) e poderia contribuir para identificar os pacientes com metástase loco-regional e/ou pior prognóstico (KOBAYASHI et al., 2004; BELBIN et al., 2005).

Além disso, a possibilidade da moesina se ligar a podoplanina (WICKI et al., 2006; WICKI; CHRISTOFORI, 2007; LOWE; NAVARRO-NUNEZ; WATSON, 2012), uma glicoproteína transmembrana que nos carcinomas espinocelulares da região de cabeça e pescoço tem sido associada à metástase linfonodal, a estágios tumorais mais avançados e a um pior prognóstico da doença (VORMITTAG et al., 2009; CUENI et al., 2010; KREPPEL et al., 2010; KREPPEL et al., 2011), motivou a realização do presente estudo. O objetivo foi investigar separadamente, porém nos mesmos carcinomas espinocelulares de boca, a expressão e a possível associação da moesina e da podoplanina na região do *front* de invasão tumoral, visando verificar a importância clínica destas proteínas na progressão e no prognóstico dos pacientes com câncer de boca.

Foi avaliada neste trabalho, uma amostra de 84 carcinomas espinocelulares de boca, os quais foram tratados no Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Centro de Tratamento e Pesquisa do Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, Brasil, no período de 1970 a 2000.

Como pode ser observado na Tabela 2, os carcinomas espinocelulares de boca com estadiamento clínico II e III, foram frequentemente detectados em pacientes do gênero masculino (85,7%) e da raça branca (95,2%). A idade destes pacientes variou entre 33 e 95 anos sendo a média de 58 anos.

Em relação aos fatores de risco para o desenvolvimento da neoplasia a maioria era tabagista (84,5%) e etilista (67,9%). No que diz respeito às características clínicas dos tumores, a localização mais comum foi na língua (54,8%), seguida pelo assoalho de boca (28,6%), conforme ilustrado na Tabela 2.

Estas características demográficas e clínicas encontradas nos pacientes com câncer de boca em nossa amostra, confirmam as informações consolidadas em outros estudos da literatura sobre este assunto (KOBAYASHI et al., 2004; MADAN et al., 2006; KREPPEL et al., 2012; MASHHADIABBAS et al., 2012; SCHLECHT et al., 2012; DOS SANTOS ALMEIDA et al., 2013; OHTA et al., 2013).

Clinicamente, a população de estudo foi composta, na sua grande maioria, por pacientes com carcinoma espinocelular de boca em estadiamento clínico III) e a ocorrência de recidiva locorregional foi identificada em 48,8% destes pacientes. Um total de 44% dos pacientes com câncer de boca da presente amostra foi submetido a radioterapia adjuvante, sendo um segundo tumor primário detectado em 16,7% destes pacientes (Tabela 2).

Resultados semelhantes em amostras de carcinomas espinocelulares do mesmo Hospital do Câncer A.C. Camargo, São Paulo, avaliadas previamente, foram encontrados por Bravo-Calderón et al. (2011) e Dos Santos-Almeida et al. (2013).

Com base nas características microscópicas analisadas, a maioria dos pacientes com câncer de boca apresentou embolização vascular (63,1%), infiltração perineural (67,9%) e muscular (82,1%). Estes resultados confirmam aqueles descritos por Bravo-Calderón et al. (2011) e Dos Santos-Almeida et al. (2013).

Em relação a presença da proteína moesina na região do *front* de invasão tumoral dos carcinomas espinocelulares de boca, verificamos que em 40 tumores houve uma fraca expressão e em 44 tumores uma forte expressão desta proteína pelas células neoplásicas, conforme ilustrado na Figura 1.

Não houve associação, estatisticamente significativa, entre a expressão da moesina e as características clínicas, demográficas e microscópicas conforme descrito nas Tabelas 5, 6 e 7. Estes resultados reforçam investigações anteriores onde a expressão de moesina em carcinomas espinocelulares de boca não foi significativamente associada com as características demográficas e clínicas como gênero, idade, local do tumor e estadiamento clínico (KOBAYASHI et al., 2003; KOBAYASHI et al., 2004; MADAN et al., 2006; SCHLECHT et al., 2012). Por outro lado, nossos resultados contrastam com aqueles de Kobayashi et al. (2004) que descreveram uma associação significativa entre o tamanho dos CECs de boca e a expressão de moesina ($p=0,0012$). Provavelmente isto ocorreu porque enquanto os autores acima citados (KOBAYASHI et al., 2004) utilizaram uma amostra com tumores apresentando tamanhos variados (T1, T2, T3 e T4) e analisaram a expressão membranosa, citoplasmática ou mista da moesina, em nosso estudo foram avaliados apenas carcinomas espinocelulares de boca com estadiamento T2 e T3 e a expressão da moesina foi predominantemente citoplasmática.

O padrão membranoso e citoplasmático da moesina, observado também em nosso estudo (Figuras 1A, 1B e 1D), tem sido descrito em diversos carcinomas espinocelulares de boca, porém, já foi comprovado que ocorre uma diminuição da expressão membranosa e um aumento da expressão citoplasmática nos tumores com comportamento metastático (KOBAYASHI et al., 2004; BELBIN et al., 2005; MADAN et al., 2006). Além disso, reforçando os achados de Kobayashi et al. (2003) e Madan et al. (2006), ao afirmarem que a expressão de moesina está correlacionada com o grau de diferenciação celular, em nosso estudo observamos

que áreas tumorais quiescentes com células mais diferenciadas como as pérolas de queratina perderam a expressão desta proteína (Figura 1C).

Quando avaliamos a expressão da moesina, com base no índice de malignidade de Bryne et al. (1989) que avalia o grau de queratinização, o polimorfismo nuclear, o número de mitoses, o padrão de invasão tumoral e a resposta do hospedeiro ao tumor, não encontramos diferenças no padrão morfológico da proteína nos tumores considerados pouco ou muito agressivos (Tabela 4). Provavelmente não foi possível encontrar diferenças na moesina entre os tumores, porque nossa amostra apresentava, na sua grande maioria, carcinomas espinocelulares bem diferenciados.

A outra proteína analisada no *front* de invasão tumoral foi a podoplanina sendo a imunomarcagem considerada fraca em 49 carcinomas espinocelulares de boca e forte em 35 destes tumores (Figura 2).

O padrão de expressão desta proteína, conforme observado na Tabela 8, não foi associado, significativamente, com as características como gênero, idade, cor da pele, localização do tumor e fatores de risco com tabagismo e etilismo, corroborando com prévios estudos em câncer de boca (YUAN et al., 2006; KREPPEL et al., 2010; KREPPEL et al., 2011; INOUE et al., 2012; MASHHADIABBAS et al., 2012; DOS SANTOS ALMEIDA et al., 2013; OHTA et al., 2013).

Em relação à variáveis clínicas como estadiamento clínico, tratamento e evolução clínica, conforme ilustrado na Tabela 9, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi detectada entre a distribuição fraca ou forte da podoplanina, exceto com a radioterapia pós-operatória. A maior frequência da forte expressão da podoplanina pelas células neoplásicas foi observada principalmente naqueles pacientes submetidos a radioterapia pós-operatória se comparado com aqueles que não receberam este tipo de tratamento ($p=0,004$), conforme pode ser verificado na Tabela 9. Muitos desses achados reforçam resultados encontrados por outros autores (YUAN et al., 2006; CUENI et al., 2010; KREPPEL et al., 2011; HUBER et al., 2011; OHTA et al., 2013).

Entretanto, nossos resultados não confirmam aqueles de Cueni et al. (2010) e Kreppel et al. (2010) que encontraram associação significativa entre o estadiamento T e a expressão da podoplanina, sendo esta expressão mais forte em tumores maiores. Também encontramos estudos onde a forte expressão da

podoplanina pelas células neoplásicas foi significativamente correlacionada com o estadiamento clínico N e a maior frequência de metástases linfonodais (YUAN et al., 2006; KREPPEL et al., 2010; KREPPEL et al., 2011; BARTULI et al., 2012; FOSCHINI et al., 2013). Os resultados de Dos Santos-Almeida et al. (2013) mostraram uma correlação significativa entre a expressão da podoplanina e o estadiamento clínico de carcinomas espinocelulares de boca e sugeriram que a expressão desta proteína está presente em fases precoces da tumorigênese, sendo mais frequentemente observada em tumores iniciais (estadiamento clínico I e II) se comparada com tumores mais avançados.

Esta variabilidade entre associação de variáveis clínicas e a expressão imuno-histoquímica de biomarcadores em carcinomas espinocelulares de boca são frequentes na literatura pois, geralmente, as casuísticas incluem tumores com estadiamento clínico diversos (I a IV), em diferentes sítios anatômicos e com protocolos de tratamento distintos.

Nesta última década a participação da podoplanina no câncer de boca vem sendo frequentemente investigada (YUAN et al., 2006; KAWAGUCHI et al., 2008; KREPPEL et al., 2010; MARGARITescu et al., 2010; FUNAYAMA et al. 2011; HUBER et al., 2011; KREPPEL et al., 2011; BARTULI et al., 2012; INOUE et al., 2012b; MASHHADIABBAS et al., 2012; DOS SANTOS ALMEIDA et al., 2013; DUNKEL et al 2013; FOSCHINI et al., 2013; KREPPEL et al., 2013; OHTA et al 2013) e trabalhos como o de Wicki et al. (2006) e Wicki e Christofori (2007), sugeriram que esta proteína é essencial no processo de invasão e migração de células neoplásicas para o estroma adjacente ao tumor. Segundo estes autores durante o processo de invasão das células epiteliais tumorais ocorreria uma perda de moléculas de adesão celular como a E-caderina e aumento da expressão de moléculas preferencialmente mesenquimais como a N-caderina, a vimentina e a podoplanina. Este processo de troca de marcadores celulares epiteliais para mesenquimais e vice-versa, de acordo com a necessidade de “locomoção” celular, é conhecido como transição epitelial-mesenquimal (WICKI; CHRISTOFORI, 2007). Adicionalmente, um estudo *in vitro* realizado por Tsuneki et al. (2013) demonstrou que o silenciamento do RNA (siRNA) da podoplanina em células de carcinoma espinocelular de boca afetou as propriedades adesivas das células colaborando com o CD44 na adesão celular, porém não interferiu na migração celular. Concluíram então, que a função fundamental da podoplanina nestes tumores consiste em

mediar a adesão celular por meio da ligação cruzada entre CD44 e ácido hialurônico, ou seja, ela participa da adesão das células malignas à matriz extracelular.

Por outro lado, torna-se importante ressaltar que embora muitos estudos tenham correlacionado a imunopositividade da podoplanina pelas células neoplásicas com um pior comportamento tumoral do câncer de boca (YUAN et al., 2006; VORMITTAG et al., 2009; CUENI et al., 2010; KREPPEL et al., 2010; KREPPEL et al., 2013), estudos recentes como o de Ohta et al. (2013) e Tsuneki et al. (2013) verificaram que a expressão desta proteína está inversamente correlacionada com o grau de diferenciação das células escamosas. Assim sendo, tumores sem células positivas para a podoplanina vem sendo histopatologicamente classificados como carcinomas espinocelulares menos diferenciados e com maior poder de invasão de vasos linfáticos (TSUNEKI et al., 2013).

Com base nestes trabalhos descritos acima (OHTA et al., 2013; TSUNEKI et al., 2013) e sabendo-se que a grande maioria dos carcinomas espinocelulares de boca do presente estudo eram tumores bem diferenciados, conforme definido pelo índice de malignidade de Bryne et al. (1989), nossos resultados (Tabela 10) confirmam uma frequência maior, estatisticamente significativa, da fraca/ausente expressão de podoplanina pelas células neoplásicas nos tumores com infiltração muscular e naqueles com comprometimento linfonodal (pN+). Portanto, outros estudos da podoplanina em carcinomas espinocelulares de boca contendo tumores menos diferenciados e/ou mais agressivos são necessários para uma análise mais precisa da expressão imuno-histoquímica e do papel exato desta proteína no processo de migração e invasão das células neoplásicas.

Ao avaliarmos se existia uma associação entre a moesina e a podoplanina no câncer de boca verificamos que houve uma associação positiva entre as duas proteínas, porém sem significância estatística ($p=0,460$), como pode ser observado na Tabela 11. Como este foi o primeiro estudo onde se investigou a associação entre a moesina e a podoplanina em carcinomas espinocelulares de boca, estes resultados precisam ser validados por outros trabalhos futuros.

A influência da moesina e da podoplanina no prognóstico dos pacientes com câncer de boca foi realizada com base nas análises de sobrevida global e sobrevida livre de doença. As principais variáveis investigadas, conforme ilustrado nas Tabelas 12 e 13, foram gênero, idade, comprometimento linfonodal

histopatológico, radioterapia pós-operatória, infiltração muscular, tabagismo, etilismo e expressão da moesina e da podoplanina pelas células neoplásicas.

Em nossos resultados a expressão da podoplanina pelas células epiteliais do carcinoma espinocelular de boca não influenciou na evolução da doença, reforçando prévios estudos de Dos Santos-Almeida et al. (2013) e Dunkel et al. (2013) e contrastando com aqueles de Yuan et al. (2006); Vormittag et al. (2009); Cueni et al. (2010); Kreppel et al. (2010); Kreppel et al. (2013), onde a proteína foi correlacionada com um pior prognóstico para os pacientes com câncer de boca.

Por outro lado, a expressão da moesina se mostrou fator de prognóstico significativo para os pacientes com câncer de boca (Tabela 12 e Figura 3). Em cinco anos a probabilidade de sobrevida global para os pacientes com carcinoma espinocelular de boca que apresentaram uma forte expressão da moesina foi de 22,7%, enquanto que para aqueles com a doença e fraca expressão da moesina foi de 38,5%. Em dez anos esta probabilidade de sobrevida global foi reduzida para 6,8% e 23,8% para os pacientes com câncer de boca e expressão forte e fraca de moesina, respectivamente. Além disso, verificou-se que um paciente com carcinoma espinocelular de boca e com forte expressão de moesina no tumor, apresentou um risco de 1,737 vezes a mais de morrer quando comparado com aquele cujo câncer de boca mostrava uma fraca expressão da proteína (Tabela 14).

Estes resultados reforçam aqueles de Kobayashi et al. (2004) e Schlecht et al. (2012), que também encontraram uma associação da expressão de moesina pelas células neoplásicas com o pior prognóstico para os pacientes com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço e os de Charafe-Jauffret et al. (2007) e Wang et al. (2012) onde a moesina foi descrita como fator de prognóstico desfavorável para pacientes com câncer de mama. Nossos resultados corroboram ainda, com os de Belbin et al. (2005), onde a expressão de moesina foi significativamente associada com a progressão dos carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço.

Na Tabela 13 observa-se que, entre as variáveis analisadas na probabilidade de sobrevida livre de doença para os pacientes com câncer de boca, a única variável que apresentou significância estatística foi a presença do comprometimento linfonodal histopatológico. Para os pacientes com carcinoma espinocelular sem comprometimento linfonodal histopatológico as probabilidades de sobrevida livre de doença em 5 anos foram de 66,7 e em 10 anos reduziram para 58,4. Em pacientes com câncer de boca e com comprometimento linfonodal

histopatológico a probabilidade de sobrevida livre de doença em 5 anos foi de 27,8 permanecendo com o mesmo valor em 10 anos (Figura 4). Estes dados reforçam informações comprovadas clinicamente onde a presença do comprometimento linfonodal nos pacientes com câncer de boca permanece como um fator que influencia diretamente o risco de morte ou de recidiva da doença (YUAN et al., 2006; KREPPEL et al., 2010; KREPPEL et al., 2011, BARTULI et al., 2012, DOS SANTOS ALMEIDA et al., 2013; FOSCHINI et al., 2013).

Assim sendo, baseados em nossos resultados, podemos sugerir que a expressão de moesina associada ao envolvimento linfonodal histopatológico pode ser útil para identificar pacientes com câncer de boca que apresentarão uma evolução clínica desfavorável.

Embora neste estudo não tenha sido possível determinar uma associação significativa entre a expressão da moesina e da podoplanina pelas células neoplásicas dos carcinomas espinocelulares de boca, nossos resultados fortemente sugerem que a presença destas proteínas influencia clinicamente a evolução tumoral.

Como a moesina faz parte do complexo ERM (ezrina, radixina, moesina), torna-se essencial continuar investigando qual a real importância clínica de cada proteína deste complexo e da perda de sua expressão na membrana celular ou no citoplasma das células epiteliais malignas. Este conhecimento poderá reforçar o papel destas proteínas, como demonstrado para a moesina neste estudo, como potenciais biomarcadores preditivos da sobrevida em pacientes com câncer de cabeça e pescoço, incluindo a boca.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

A análise da expressão das proteínas moesina e podoplanina nos 84 carcinomas espinocelulares de boca, com estadiamento clínico II e III, demonstrou:

- uma expressão predominantemente citoplasmática da proteína moesina pelas células do *front* de invasão tumoral;
- uma expressão membranosa da proteína podoplanina pelas células do *front* de invasão tumoral;
- ausência de associação entre a moesina e as variáveis clínicas, demográficas e microscópicas analisadas;
- associação significativa entre a expressão da podoplanina e a radioterapia ($p=0,004$), a infiltração muscular ($p=0,006$) e o comprometimento linfonodal mediante análise histológica ($p=0,013$);
- ausência de associação significativa entre a expressão das duas proteínas ($p=0,460$);
- que a forte expressão da moesina, pelas células malignas, constituiu um fator de prognóstico desfavorável para os pacientes com esta neoplasia maligna ($p=0,024$);
- que o comprometimento linfonodal histopatológico constituiu um fator de prognóstico significativo para a recidiva da doença ($p=0,018$).

Com base nestes resultados concluímos que a expressão da proteína moesina pode ajudar a determinar os pacientes com carcinoma espinocelular de boca que apresentam um pior prognóstico. Além disso, verificamos que as proteínas moesina e podoplanina se expressam pelas células neoplásicas, nos carcinomas espinocelulares de boca, mas não parecem estar associadas no processo de invasão tumoral.

Referências

REFERÊNCIAS

BARTULI, F. N. et al. Podoplanin in the development and progression of oral cavity cancer: a preliminary study. **Oral Implantol (Rome)**, v.5, n.2-3, p.33-41, Apr. 2012.

BATCHELOR, C.L.; WOODWARD, A. M.; CROUCH, D. H. Nuclear ERM (ezrin, radixin, moesin) proteins: regulation by cell density and nuclear import. **Exp Cell Res**, v. 296, n. 2, p. 208-22, Jun. 2004.

BELBIN, T. J. et al. Molecular profiling of tumor progression in head and neck cancer. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 131, n. 1, p. 10-8, Jan. 2005.

BOLZONI VILLARET, A. et al. Immunostaining patterns of CD31 and podoplanin in previously untreated advanced oral/oropharyngeal cancer: prognostic implications. **Head Neck**, v. 32, n. 6, p. 786-92, Jun. 2010.

BRAVO-CALDERÓN, D.M. et al. Prognostic significance of beta-2 adrenergic receptor in oral squamous cell carcinoma. **Cancer Biomark**, v. 10, n. 1, p. 51-9, 2011.

BRYNE, M. et al. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas. **J Oral Pathol Med**, v. 18, n. 8, p. 432-7, Sep. 1989.

CHARAFE-JAUFFRET, E. et al. Moesin expression is a marker of basal breast carcinomas. **Int J Cancer**, v. 121, n. 8, p. 1779-85, Oct. 2007.

CONDEELIS, J.; SINGER, R. H.; SEGALL, J. E. The great escape: when cancer cells hijack the genes for chemotaxis and motility. **Annu Rev Cell Dev Biol**, v. 21, p. 695-718, 2005.

CUENI, L. N. et al. Tumor lymphangiogenesis and metastasis to lymph nodes induced by cancer cell expression of podoplanin. **Am J Pathol**, v. 177, n. 2, p. 1004-16, Aug. 2010.

CUI, Y. et al. Proteomic profiling in pancreatic cancer with and without lymph node metastasis. **Int J Cancer**, v. 124, n. 7, p. 1614-21, Apr. 2009.

DE SOUSA, S. F. et al. Lymphangiogenesis and podoplanin expression in oral squamous cell carcinoma and the associated lymph nodes. **Appl Immunohistochem Mol Morphol**, v. 20, n. 6, p. 588-94, Dec. 2012.

DE VICENTE, J. C. et al. Podoplanin expression in oral leukoplakia: tumorigenic role. **Oral Oncol**, v. 49, n. 6, p. 598-603, Jun. 2013.

DENG, W.; CHO, S.; LI, R. FERM Domain of Moesin Desorbs the Basic-Rich Cytoplasmic Domain of I-Selectin from the Anionic Membrane Surface. **J Mol Biol**, v. 425, n. 18, p. 3549-62, Sep. 2013.

DOS SANTOS ALMEIDA, A. et al. Podoplanin and VEGF-C immunoexpression in oral squamous cell carcinomas: prognostic significance. **Anticancer Res**, v. 33, n. 9, p. 3969-76, Sep. 2013.

DUNKEL, J. et al. Prognostic markers in stage I oral cavity squamous cell carcinoma. **Laryngoscope**, v. 123, n. 10, p. 2435-41, Oct 2013.

EMERY, G.; RAMEL, D. Cell coordination of collective migration by Rab11 and Moesin. **Commun Integr Biol**, v. 6, n. 4, p. 24587-90, Jul. 2013.

ESTECHA, A. et al. Moesin orchestrates cortical polarity of melanoma tumour cells to initiate 3D invasion. **J Cell Sci**, v. 122, n. 19, p. 3492-501, Oct. 2009.

FERNANDEZ-MUNOZ, B. et al. The transmembrane domain of podoplanin is required for its association with lipid rafts and the induction of epithelial-mesenchymal transition. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 43, n. 6, p. 886-96, Jun. 2011.

FOSCHINI, M. P. et al. Podoplanin and E-cadherin expression in preoperative incisional biopsies of oral squamous cell carcinoma is related to lymph node metastases. **Int J Surg Pathol**, v. 21, n.2, p. 133-41, Jan. 2013.

FUNAYAMA, A. et al. Enhanced expression of podoplanin in oral carcinomas in situ and squamous cell carcinomas. **Pathobiology**, v. 78, n. 3, p. 171-80, Mai. 2011.

- HE, M. et al. Vascular endothelial growth factor C promotes cervical cancer metastasis via up-regulation and activation of RhoA/ROCK-2/moesin cascade. **BMC Cancer**, v. 10, p. 170-82, Apr 2010.
- HUBER, G. F. et al. Podoplanin expression correlates with sentinel lymph node metastasis in early squamous cell carcinomas of the oral cavity and oropharynx. **Int J Cancer**, v. 129, n. 6, p. 1404-09, Sep. 2011.
- ICHIKAWA, T. et al. Expression of moesin and its associated molecule CD44 in epithelial skin tumors. **J Cutan Pathol**, v. 25, n. 5, p. 237-43, May 1998.
- INOUE, H. et al. Podoplanin expression during dysplasia-carcinoma sequence in the oral cavity. **Tumour Biol**, v. 33, n. 1, p. 183-94, Feb. 2012a.
- INOUE, H. et al. Podoplanin promotes cell migration via the EGF-Src-Cas pathway in oral squamous cell carcinoma cell lines. **J Oral Sci**, v. 54, n. 3, p. 241-50, Sep. 2012b.
- JIANG, L. et al. CLIC proteins, ezrin, radixin, moesin and the coupling of membranes to the actin cytoskeleton: A smoking gun? **Biochim Biophys Acta**, v. 1838, n. 2, p. 643-57, Feb 2014
- JUNG, W. Y. et al. Expression of moesin and CD44 is associated with poor prognosis in gastric adenocarcinoma. **Histopathology**, v. 63, n.4, p.474-81, Jun. 2013.
- KAWAGUCHI, H. et al. Podoplanin: a novel marker for oral cancer risk in patients with oral premalignancy. **J Clin Oncol**, v. 26, n. 3, p. 354-60, Jan 20 2008.
- KINOSHITA, T. et al. Tumor suppressive microRNA-133a regulates novel targets: moesin contributes to cancer cell proliferation and invasion in head and neck squamous cell carcinoma. **Biochem Biophys Res Commun**, v. 418, n. 2, p. 378-83, Feb. 2012.
- KOBAYASHI, H. et al. Shifts in cellular localization of moesin in normal oral epithelium, oral epithelial dysplasia, verrucous carcinoma and oral squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med**, v. 32, n. 6, p. 344-9, Jul 2003.

KOBAYASHI, H. et al. Clinical significance of cellular distribution of moesin in patients with oral squamous cell carcinoma. **Clin Cancer Res**, v. 10, n. 2, p. 572-80, Jan. 2004.

KREPPEL, M. et al. Impact of podoplanin expression in oral squamous cell carcinoma: clinical and histopathologic correlations. **Virchows Arch**, v. 456, n. 5, p. 473-82, May 2010.

KREPPEL, M. et al. Podoplanin expression predicts prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma treated with neoadjuvant radiochemotherapy. **Oral Oncol**, v. 47, n. 9, p. 873-78, Sep. 2011.

KREPPEL, M. et al. Podoplanin expression in oral leukoplakia: prognostic value and clinicopathological implications. **Oral Dis**, v. 18, n. 7, p. 692-9, Oct. 2012.

KREPPEL, M. et al. Podoplanin expression in cutaneous head and neck squamous cell carcinoma--prognostic value and clinicopathologic implications. **J Surg Oncol**, v. 107, n. 4, p. 376-83, Mar 2013.

KUNDA, P. et al. Moesin controls cortical rigidity, cell rounding, and spindle morphogenesis during mitosis. **Curr Biol**, v. 18, n. 2, p. 91-101, Jan. 2008.

LANKES, W. et al. A heparin-binding protein involved in inhibition of smooth-muscle cell proliferation. **Biochem J**, v. 251, n. 3, p. 831-42, May 1988.

LOWE, K. L.; NAVARRO-NUNEZ, L.; WATSON, S. P. Platelet CLEC-2 and podoplanin in cancer metastasis. **Thromb Res**, v. 129 Suppl 1, p. S30-7, Apr. 2012.

MADAN, R. et al. Differential tissue and subcellular expression of ERM proteins in normal and malignant tissues: cytoplasmic ezrin expression has prognostic significance for head and neck squamous cell carcinoma. **Head Neck**, v. 28, n. 11, p. 1018-27, Nov. 2006.

MANITI, O.; CARVALHO, K.; PICART, C. Model membranes to shed light on the biochemical and physical properties of ezrin/radixin/moesin. **Biochimie**, v. 95, n. 1, p. 3-11, Jan. 2013.

MARGARITESCU, C. et al. Podoplanin expression in tumor-free resection margins of oral squamous cell carcinomas: an immunohistochemical and fractal analysis study. **Histol Histopathol**, v. 25, n. 6, p. 701-11, Jun. 2010.

MARTIN-VILLAR, E. et al. Podoplanin binds ERM proteins to activate RhoA and promote epithelial-mesenchymal transition. **J Cell Sci**, v. 119, n. 21, p. 4541-53, Nov. 2006.

MARTIN-VILLAR, E. et al. Podoplanin associates with CD44 to promote directional cell migration. **Mol Biol Cell**, v. 21, n. 24, p. 4387-99, Dec. 2010.

MASHHADIABBAS, F. et al. The immunohistochemical characterization of MMP-2, MMP-10, TIMP-1, TIMP-2, and podoplanin in oral squamous cell carcinoma. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, v. 114, n. 2, p. 240-50, Aug. 2012.

MCCLATCHEY, A. I. ERM proteins. **Curr Biol**, v. 22, n. 18, p. R784-5, Sep. 2012.

OHTA, M. et al. Positive and negative regulation of podoplanin expression by TGF-beta and histone deacetylase inhibitors in oral and pharyngeal squamous cell carcinoma cell lines. **Oral Oncol**, v. 49, n. 1, p. 20-6, Jan. 2013.

SAHAI, E. Illuminating the metastatic process. **Nat Rev Cancer**, v. 7, n. 10, p. 737-49, Oct. 2007.

SAINTIGNY, P. et al. DeltaNp63 overexpression, alone and in combination with other biomarkers, predicts the development of oral cancer in patients with leukoplakia. **Clin Cancer Res**, v. 15, n. 19, p. 6284-91, Oct. 2009.

SCHLECHT, N. F. et al. Cytoplasmic ezrin and moesin correlate with poor survival in head and neck squamous cell carcinoma. **Head Neck Pathol**, v. 6, n. 2, p. 232-43, Jun. 2012.

SPECK, O. et al. Moesin functions antagonistically to the Rho pathway to maintain epithelial integrity. **Nature**, v. 421, n. 6918, p. 83-7, Jan. 2003.

TSUNEKI, M. et al. Podoplanin-mediated cell adhesion through extracellular matrix in oral squamous cell carcinoma. **Lab Invest**, v. 93, n. 8, p. 921-32, Aug. 2013.

VORMITTAG L. et al. Co-expression of Bmi-1 and podoplanin predicts overall survival in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck treated with radio(chemo)therapy. **Int J Radiat Oncol Biol**, v. 73, n. 3, p. 913-8, Mar. 2009.

WANG, C. C. et al. Differential expression of moesin in breast cancers and its implication in epithelial-mesenchymal transition. **Histopathology**, v. 61, n. 1, p. 78-87, Jul. 2012.

WICKI, A.; CHRISTOFORI, G. The potential role of podoplanin in tumour invasion. **Br J Cancer**, v. 96, n. 1, p. 1-5, Jan. 2007.

WICKI, A. et al. Tumor invasion in the absence of epithelial-mesenchymal transition: podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton. **Cancer Cell**, v. 9, n. 4, p. 261-72, Apr. 2006.

YUAN, P. et al. Overexpression of podoplanin in oral cancer and its association with poor clinical outcome. **Cancer**, v. 107, n. 3, p. 563-9, Aug. 2006.

Anexo

ANEXO A

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU-
USP

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Expressão de moesin e podoplanina no câncer de boca e sua relação com o processo de invasão tumoral

Pesquisador: Francisco Barbara Abreu Barros

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 21329113.5.0000.5417

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia de Bauru

Patrocinador Principal: MINISTERIO DA CIENCIA, TECNOLOGIA E INOVACAO

DADOS DA NOTIFICAÇÃO

Tipo de Notificação: Envio de Relatório Final

Detalhe:

Justificativa:

Data do Envio: 03/02/2014

Situação da Notificação: Parecer Consubstanciado Emitido

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 548.620

Data da Relatoria: 10/03/2014

Apresentação da Notificação:

Este trabalho objetivou correlacionar a expressão da moesin e da podoplanina pelas células malignas no front de invasão do carcinoma espinocelular de boca. Foi cumprido em tempo proposto no cronograma (inclusive antecipado), seguindo sem relato de modificações sob o ponto de vista ético, durante o percurso de seu desenvolvimento.

Objetivo da Notificação:

Enviar a documentação relativa ao processo de relatório final para conclusão do processo.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não houve relato de circunstâncias que resultassem nos riscos outrora apontados como possíveis. Da mesma forma, os benefícios apresentados, de cunho científico, resultaram em maior clareza no

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA CEP: 17.012-901
UF: SP Município: BAURU
Telefone: (14)3235-8356 Fax: (14)3235-8356 E-mail: cep@fob.usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU-
USP

Continuação do Parecer: 548.620

uso destas proteínas.

Comentários e Considerações sobre a Notificação:

O projeto apresentado fez parte do trabalho experimental de um aluno de pós graduação, cujo tema apresentou-se de forma cientificamente muito interessante e suportado pela literatura, buscando maior entendimento no mecanismo de estabelecimento e progressão do câncer bucal. Com as análises, as evidências para uso de proteínas que aparecem em tumores espinocelulares não se mostraram efetivas com esta finalidade, o que se propôs, caso possível como ferramenta no uso de diagnóstico e tratamento de futuras terapias mais. Foi utilizado material do arquivo do Serviço de Anatomia Patológica, do Departamento de Estomatologia- Área de Patologia da Faculdade de Odontologia de Bauru/USP, envolvendo dados microscópicos e clínicos que foram utilizados como unidades experimentais, sendo preservadas a identificação destes. Os resultados demonstraram não haver relação para nenhum desses marcadores, visto que houve expressões fortes e fracas simultaneamente dessas proteínas em CAs de diferentes estágios. Também não houve associação com gênero/idade.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentados adequadamente: Carta de encaminhamento, preenchimento do formulário e apresentação dos itens estruturados solicitados.

Recomendações:

No texto, recomenda-se apenas o cuidado de reescrever:

-

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências de ordem ética

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

APROVADO por unanimidade, em reunião deste CEP realizada no dia 26 de fevereiro de 2014, o parecer do relator sobre o Relatório Final do trabalho de pesquisa realizado.

Endereço: DOUTOR OCTAVIO PINHEIRO BRISOLLA 75 QUADRA 9
Bairro: VILA NOVA CIDADE UNIVERSITARIA CEP: 17.012-901
UF: SP Município: BAURU
Telefone: (14)3235-8358 Fax: (14)3235-8358 E-mail: cep@fob.usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE BAURU-
USP

Continuação do Parecer: 548.620

BAURU, 07 de Março de 2014

Assinador por:
Flaviana Bombarda de Andrade
(Coordenador)

**Hospital
A.C. Camargo**
Centro de Tratamento, Ensino e Pesquisa em Câncer

**Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP**

São Paulo, 19 de Abril de 2010.

Ao
Dr. Luiz Paulo Kowalski

Ref.: Projeto de Pesquisa nº. 1385/10
"Expressão de receptor beta-2-adrenérgico em carcinoma espinocelular de boca e sua associação com a evolução clínica tumoral".

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente - Hospital do Câncer - A.C. Camargo/SP, em sua última reunião de 13/04/2010, aprovaram a realização do projeto em referência e tomarão conhecimento dos seguintes documentos:

- Folha de Rosto para Pesquisa Envolvendo Seres Humanos;
- Termo de Compromisso do Pesquisador com as Resoluções do Conselho Nacional de Saúde;
- Termo de Dispensa do Consentimento Livre e Esclarecido;
- Orçamento Financeiro Detalhado;
- Declaração de Financiamento da Pesquisa;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia;
- Declaração de Ciência e Comprometimento do Departamento de Anatomia Patológica;
- Declaração de Ciência do Departamento de Odontologia da Faculdade de Odontologia de Bauru-USP.

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas à assistente do CEP dentro de 12 meses.

Atenciosamente,

Dr. Jefferson Luiz Gross
1º Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa

Fundação Antonio Prudente - CNPJ/MF N. 00.961.808/0001-06
Av. Prof. Antônio Almeida, 211 - Itardado - São Paulo, SP - 01508-900
Telefone: (11) 2188-5000
www.accamargo.org.br