

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

FRANCINE OSMARINI

AVALIAÇÃO DA TRANSIÇÃO EPITÉLIO- MESENQUIMAL EM CARCINOMA ESPI-
NOCELULAR DE CABEÇA E PESCOÇO E SUA RELAÇÃO COM O PROGNÓSTICO

Porto Alegre
2017

FRANCINE OSMARINI

AVALIAÇÃO DA TRANSIÇÃO EPITÉLIO- MESENQUIMAL EM CARCINOMA ESPI-
NOCELULAR DE CABEÇA E PESCOÇO E SUA RELAÇÃO COM O PROGNÓSTICO

Trabalho de Conclusão de Curso a-
presentado ao Curso de Graduação
em Odontologia da Faculdade de O-
dontologia da Universidade Federal
do Rio Grande do Sul, como requisito
parcial para obtenção do título de Ci-
rurgião-Dentista.

Orientadora: Prof^a Dr^a Márcia Gaiger
de Oliveira

Porto Alegre

2017

AGRADECIMENTOS

A Deus, por ter me dado saúde e força para superar as dificuldades.

Aos meus pais, pelo amor, incentivo nas horas difíceis de desânimo e cansaço e pelo apoio incondicional em todos os momentos da minha vida.

Ao Prof. Dr. Manoel Sant'Ana Filho, por ter sido meu orientador até a sua aposentadoria, pelo empenho, oportunidade e apoio na elaboração deste trabalho.

À minha orientadora Márcia Oliveira, pelo suporte no pouco tempo que lhe coube, pelas suas correções e incentivos.

À Rúbia Vieira, primeiramente pela amizade, por todo apoio, confiança, paciência e esforço despendido nesse trabalho.

RESUMO

O carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (CECP) é uma neoplasia maligna que implica em baixas taxas de sobrevivência e prognóstico desfavorável. Para realizar invasão e metástase as células epiteliais (E-caderina +) tem de expressar um fenótipo de célula mesenquimal (N-caderina e/ou vimentina +), evento conhecido como Transição Epitélio- Mesênquima (EMT) e após as células voltam a expressar o fenótipo epitelial sendo Transição Mesênquima- Epitélio (MET). Outra característica importante na progressão tumoral é a análise da atividade proliferativa e invasiva das células que determina sua agressividade (podoplanina +). Acredita-se ainda que as células epiteliais desta neoplasia se comportam de maneira diferente dependendo da zona analisada. 16 amostras de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço foram submetidas à técnica de imunohistoquímica para verificação da presença do processo de EMT/MET por meio da imunomarcagem das proteínas: E-caderina (e-cad), N-caderina (n-cad), Vimentina (vim) e Podoplanina (podo) no Centro do tumor (CT), Zona de Invasão (ZI) e Epitélio não neoplásico adjacente ao tumor (EA). Dessas 16 amostras, 6 são do grupo Vivos sem recidiva (Grupo 1) e 10 do Grupo Óbitos (Grupo 2). Nos dois grupos analisados, a e-caderina mostrou alta expressão no EA e baixa expressão na ZI enquanto que no centro do tumor mostrou baixa expressão no grupo vivos sem recidiva e alta expressão no grupo óbitos. A alta expressão de e-caderina teve associação significativa ao MET no CT e ZI. A n-caderina e vimentina e podoplanina mostraram uma baixa expressão nos dois grupos analisados. Podemos concluir que a e-caderina, pela técnica imunohistoquímica, parece ser a mais indicada para analisar o processo de EMT em carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço.

Palavras-chave: Carcinoma espinocelular. Transição epitélio-mesenquimal. Prognóstico.

ABSTRACT

Squamous cell carcinoma of the head and neck (CECP) is a malignant neoplasm that implies low survival rates and unfavorable prognosis. To perform invasion and metastasis epithelial cells (E-cadherin +) must express a mesenchymal cell phenotype (N-cadherin and / or vimentin +), an event known as Epithelial-mesenchymal transition (EMT) and after cells re-express the epithelial phenotype being referred to as Mesenchymal-Epithelial Transition (MET). Another important feature in tumor progression is the analysis of the cells' proliferative and invasive activity that determines their aggressiveness (podoplanin +). It is also believed that the epithelial cells of this neoplasia behave differently depending on the area analyzed. 16 samples of squamous cell carcinoma of the head and neck were submitted to the immunohistochemical technique to verify the presence of the EMT / MET process by means of the immunostaining of the proteins: E-cadherin (e-cad), N-cadherin (n-cad), Vimentin (vim) and Podoplanin (podo) in the Tumor Center (CT), Invasion Zone (ZI), and non-neoplastic epithelium adjacent to the tumor (EA). Of these 16 samples, 6 were from the living group without relapse (Group 1) and 10 from the group deaths (Group 2). In the two groups analyzed, e-cadherin showed high expression in EA and low expression in the ZI whereas in the center of the tumor showed low expression in the alive group without relapse and high expression in the group of deaths. The high expression of e-cadherin had a significant association to MET in CT and ZI. The n-cadherin and vimentin and podoplanin showed low expression in the two groups analyzed. We can conclude that e-cadherin, by the immunohistochemical technique, seems to be the most indicated to analyze the TMS process in squamous cell carcinoma of the head and neck.

Keywords: Squamous cell carcinoma. Epithelial-mesenchymal transition. Prognostic.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	5
1.1	CECP	5
1.2	EMT, MET E TRANSIÇÃO	5
1.3	E-CADERINA	5
1.4	N-CADERINA	6
1.5	VIMENTINA	6
1.6	PODOPLANINA	6
2	OBJETIVO	7
3	METODOLOGIA	8
3.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS	8
3.2	LOCAIS DA REALIZAÇÃO DO PROJETO	8
3.3	DELINEAMENTO DO ESTUDO	8
3.4	DESCRIÇÃO DAS AMOSTRAS	8
3.5	MORFOLOGIA E GRADUAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DOS TUMORES	8
3.6	IMUNOISTOQUÍMICA	9
3.7	ANÁLISE ESTATÍSTICA	11
4	RESULTADOS	12
4.1	PARÂMETROS SOCIODEMOGRÁFICOS DOS PACIENTES	12
4.2	CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E HISPOPATOLOGICAS DOS PACIENTES	12
4.3	ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE E-CADERINA, N-CADERINA, VIMENTINA E PODOPLANINA NAS DIFERENTES ZONAS DO TUMOR E EPITÉLIO ADJA- CENTE AO TUMOR	13
4.4	AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE EMT E MET NO CENTRO DO TUMOR E ZONA DE INVASÃO	19
4.5	AVALIAÇÃO DO EPITELIO ADJACENTE NOS GRUPOS ESTUDADOS	19
4.6	CORRELAÇÃO DOS MARCADORES COM A FASE DA CÉLULA EPITELIAL	20
5	DISCUSSÃO	21
6	CONCLUSÃO	24
	REFERÊNCIAS	25
	ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	28

1 INTRODUÇÃO

1.1 CEC

O carcinoma espinocelular (CEC) é a décima neoplasia maligna mais prevalente em homens no mundo (JEMAL; BRAY et al., 2011) e representa, aproximadamente, 95% dos tipos de câncer de cabeça e pescoço (CECP) (DEDIVITIS RA, 2004). Sendo assim, o CECP foi classificado como a quinta neoplasia mais incidente em homens, o quinto tipo de câncer mais frequente no Brasil, possuindo uma taxa de sobrevivência de 50% em 5 anos (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2014). Segundo a Organização Mundial da Saúde o câncer é a segunda causa de morte mais frequente em países desenvolvidos e existe uma previsão de que nos países em desenvolvimento ocupe novamente o segundo lugar. Existe uma estimativa que, no ano de 2030, haverá 27 milhões de casos novos de câncer, 17 milhões de mortes pela doença e 75 milhões de pessoas vivendo com câncer (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2015).

1.2 EMT, MET E FASE DE TRANSIÇÃO

Para realizar invasão e metástase, ou seja, para que ocorra o evento conceituado Transição epitélio-mesenquimal (EMT) deverá ocorrer uma troca do fenótipo epitelial das células tumorais por um fenótipo mesenquimal (SHIMAZUI, SCHALKEN, GIROLDI, et al., 1996). A MET (Transição mesênquima-epitélio) é quando as células já expressaram o fenótipo para realizar a invasão e já se encontram novamente em seu estado natural. Para que haja a troca do fenótipo a célula deixa de expressar algumas proteínas e ganham a expressão de outras. (LAMOUILLE et al., 2014; THIERY et al., 2009; CHU et al., 2006; HALBLEIB; NELSON, 2006). No entanto, alguns autores afirmam que as células não oscilam entre um estado epitelial total e mesenquimal completos, mas sim, se movendo por meio de fases intermediárias, ou seja, em transição para o EMT ou MET (HUANG et al., 2012).

1.3 E-CADERINA

De acordo com a Literatura, e-cad é mencionada como uma glicoproteína transmembrana e desempenha um papel importante no contato entre as células epiteliais e medeia a adesão célula-célula (NOLLET et al., 2000). A e-cad contribui para os fenótipos epiteliais, e, portanto, funciona como um forte repressor do processo de EMT. A sua regulação negativa, ou seja, baixa expressão, é uma característica marcante nesse processo e leva à separação de células vizinhas e à migração das mesmas. A marcação positiva da e-cad, em tecidos sem

alteração, se dá na membrana citoplasmática das células. Observa-se também uma marcação em Glândulas salivares.

1.4 N- CADERINA

A n- cad é encontrada em tecidos neuronais e fibroblastos. Segundo Markovic-Lipkovski et al. (2001), a expressão da n-caderina pode estar presente tanto em tumores benignos quanto em malignos, além disso se faz presente em tecidos neoplásicos originários do epitélio e mesênquima. A n-cad é pouco citada na literatura, e pouco se sabe sobre seu verdadeiro papel no carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço.

1.5 VIMENTINA

Segundo a literatura a vim é uma metaloproteinase que está presente dentro das células mesenquimais de vários tipos teciduais e em condições normais não expressa células epiteliais, e sim fibroblastos, linfócitos, células do endotélio e células intersticiais. Ela é responsável por manter a integridade das células e tecidos (COULOMBE; WONG., 2004). A alta expressão da vimtem sido relatada como possuindo associação com a invasão e piores prognósticos em vários tipos de câncer, como o de mama e o de próstata (SATELLI; LI., 2011; LEHTINEN et al., 2013). Além disso, ela induz a malignidade das células cancerígenas ao agir na arquitetura celular (LIU et al., 2015).

1.6 PODOPLANINA

A podo é uma glicoproteína transmembrana sialomucina e possui uma ação de separação de sangue e atua na vasculatura linfática durante a angiogênese (SCHULTE-MERKER et al., 2011). No entanto, segundo Weber et al. (2012), ela só é detectável no endotélio de vasos linfáticos e não no sangue. Sua expressão se dá em células endoteliais dos vasos linfáticos e tem sido utilizado como um marcador de tumores sólidos em linfangiogênese (WICKI; CHRISTOFORI., 2007). Em tecido humano normal, podo é expresso no rim, pelos podócitos (BREITENEDER-GELEFF et al, 1999), no músculo esquelético, placenta, pulmão e coração (MARTIN-VILLAR et al., 2005). Também existe relatos de sua expressão em miofibroblastos da mama e glândulas salivares, em osteoblastos e células mesoteliais (ORDONEZ., 2006). Além disso, se tem relato na literatura que a sua expressão é regulada positivamente em diversos tipos de cancer, incluindo carcinoma de células escamosas da cavidade oral, do pulmão, e cabeça e pescoço (MARTIN-VILLAR et al., 2010; ASTARITA et al., 2012).

2 OBJETIVO

Avaliar a presença do processo de EMT por meio da análise da imunexpressão de E-caderina, N-caderina, Vimentina e Podoplanina na Zona de Invasão (ZI), Centro do Tumor (CT) e Epitélio não neoplásico Adjacente ao Tumor (EA) de amostras de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (CECP) primários e correlacionar os resultados com o tempo de acompanhamento de 7 anos.

3 METODOLOGIA

3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este projeto de pesquisa foi sequência do projeto “Avaliação das células tronco tumorais em carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço: centro do tumor, zona de invasão e campo de cancerização” aprovado sob número 17493 pelo Sistema de pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS) e pelo número GP09-315 no Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GPPG/HCPA), no ano de 2009.

3.2 LOCAIS DA REALIZAÇÃO DO PROJETO

Todos os experimentos deste estudo foram realizados no Núcleo de Pesquisa Básica em Odontologia da Faculdade de Odontologia da UFRGS utilizando o Laboratório de Patologia Bucal J. J. D. Barbachan, Laboratório de imunohistoquímica Prof Hardy Ebling e a Unidade de Histometria e Morfometria.

3.3 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Estudo observacional transversal analítico.

3.4 DESCRIÇÃO DAS AMOSTRAS

Para realização deste estudo, foram utilizados 16 blocos de parafina de CECPs primários utilizados em estudo anterior - GPPG HCPA n°09-315.

Os pacientes que fizeram parte deste estudo foram atendidos no Ambulatório de Cirurgia de Cabeça e Pescoço (CAP) do HCPA no período de Outubro de 2009 a Outubro de 2010.

Todos os indivíduos incluídos nesta pesquisa, assinaram um Termo de Consentimento Livre Esclarecido. Os dados sobre os hábitos de fumo e álcool, idade, sexo, etnia, localização do tumor e presença de metástase regional ou à distância foram obtidos do prontuário do paciente.

3.5 MORFOLOGIA E GRADUAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DOS TUMORES

A morfologia e a graduação histopatológica dos tumores foi segundo critérios de Bryne e realizadas previamente por Hildebrand et al., (2014). As 16 amostras foram divididas em

2 grupos, aonde 6 são do grupo Vivos sem reidiva (Grupo 1) e 10 do Grupo Ôbitos (Grupo 2) e em cada amostra foram identificadas e analisadas as seguintes zonas: Epitélio não neoplásico Adjacente ao Tumor (EA), Centro do tumor (CT) e Zona de Invasão (ZI). As amostras também foram classificadas em MET, Fase de Transição e EMT. Foram consideradas em EMT as amostras que apresentaram baixa expressão da proteína epitelial e-cad e alta expressão das proteínas mesenquimais n-cad e/ou vim e em MET quando da alta expressão da e-cad e baixa expressão de n-cada e/ou vim. Quando qualquer uma das proteínas citadas, e-cad, n-cad e vim se apresentaram alteradas, ou seja, nem em EMT e nem em MET, foram consideradas em Fase de Transição. Foi considerado Epitélio Normal as amostras que possuíram alta expressão da e-cad e baixa expressão de n-cada e/ou vim e Epitélio Alterado quando da baixa expressão de e-cad e alta expressão de n-cad e/ou vim.

3.6 - IMUNOISTOQUÍMICA

Foram realizados cortes histológicos com 03 micrometros provenientes de cada bloco de parafina previamente selecionados com o cuidado para incluir uma área de tumor e uma área de epitélio normal. Os cortes histológicos foram submetidos à técnica de imunohistoquímica para verificação da presença do processo de EMT por meio da imunomarcção das proteínas: e-cad, n-cad, vim e podo.

Os cortes histológicos, colocados previamente em lâminas silanizadas, foram desparafinizados em xilol, reidratados em gradiente de álcool em água e imersos em solução de peróxido de hidrogênio a 3% para bloqueio da peroxidase endógena. A seguir, os cortes foram submetidos à recuperação antigênica conforme indicação do fabricante. Após, foram incubados os anticorpos primários Anti-e-caderina, Anti-n-caderina, Anti-vimentina e Anti-podoplanina. Na tabela 1 estão descritos a marca comercial, diluição, tipo de recuperação antigênica e tempo de incubação de cada anticorpo a ser avaliado neste estudo. O sistema de detecção a ser empregado foi o *Envision dual link*; (Dako[®], USA). As revelações das reações foram realizadas através de solução cromógena, contendo 0,03% de 3-3,3'-Diaminobenzidina (DAB, DakoCytomation[®], USA) e foram contra-coradas com solução de hematoxilina de Mayer.

Tabela 1- Marca comercial, diluição, tipo de recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos

<i>Anticorpo</i>	<i>Marca</i>	<i>Diluição</i>	<i>Recuperação antigênica</i>	<i>Tempo incubação</i>
E-caderina	Cell Signaling [®]	1:200	Panela de pressão (115°C – 3’30’)	Overnight (4°C)
N-caderina	Abcam [®]	1:300	Panela de pressão (115°C – 3’30’)	Overnight (4°C)
Vimentina	Dako [®]	1:100	Panela de pressão (110°C – 3’)	Overnight (4°C)
Podoplanina	Dako [®]	1:100	Panela de pressão (110°C – 25’)	Overnight (30° C)

Todas as reações foram acompanhadas de controles positivos de acordo com as instruções do fabricante. Para o controle negativo será utilizado soro não imune da mesma espécie animal de desenvolvimento do anticorpo primário.

A expressão imunohistoquímica para e-cad, n-ca, vim e podop foi avaliada em cada caso, por meio de microscopia de luz, nas diferentes zonas de interesse (EA, ZI, CT). Foram consideradas imunomarcção positiva para os quatro marcadores, as células que apresentaram a coloração marrom, independentemente da intensidade da marcação. Foi realizada a análise semiquantitativa do percentual de células positivas para cada marcador de acordo com os seguintes escores do quadro 1:

Quadro 1- Percentual de células imunopositivas para cada marcador e seus respectivos escores

<i>Escore</i>	<i>Porcentagem das células imunopositivas</i>
1	0% a 50%
2	51% a 100%

Fonte: da autora, 2017

O Escore 1 foi classificado como baixa expressão e o Escore 2 como alta expressão.

A reprodutibilidade foi confirmada ao longo do estudo, onde a cada 20 lâminas avaliadas de cada proteína, uma foi sorteada para reavaliação após um período de 7 dias. Foi aceito valor de Kappa maior que 0,7. Durante a avaliação, os examinadores encontraram-se cegos para qual paciente pertence o material.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Todas as análises foram realizadas utilizando o programa *Statistical Package for the Social Sciences*, versão 21 (IBM Corporation, EUA). Os dados obtidos foram submetidos à análise de normalidade para verificar se os dados seguem uma distribuição normal.

As associações entre os resultados obtidos pela imunomarcagem de e-cad, n-cad, vim e podoa nas regiões avaliadas e os parâmetros clínicos tumorais (TNM e graduação histopatológica), prognóstico, recidiva e metástases foram avaliadas por meio do teste Qui quadrado (nível de significância $p < 0,05$). Os tumores foram classificados conforme Bryne.

4 RESULTADOS

4.1 PARÂMETROS SOCIODEMOGRÁFICOS DOS PACIENTES

A média de idade dos pacientes avaliados no presente estudo foi de 59,12 (39 a 71 anos), com predominância pelo sexo masculino (87,5%) e origem étnica branca (75%). Em relação aos hábitos nocivos 37,5% dos pacientes são tabagistas e 68,5% fazem uso de álcool (etilista e raramente bebe) enquanto que 31,25% são ex etilistas.

O período total de acompanhamento dos pacientes foi de 7 anos e a maioria destes encontram-se mortos (62,5%). Os dados sociodemográficos estão detalhados na tabela 2.

Tabela 2 - Perfil sociodemográfico e comportamental dos pacientes do estudo

VARIÁVEIS	GRUPO 1 n=6 (%)	GRUPO 2 n=10 (%)	<i>p VALOR</i>
SEXO			
FEMININO	1 (16,7)	0 (0,00)	0,375
MASCULINO	5 (83,3)	10 (100)	
ORIGEM ÉTNICA			
BRANCO	3 (50,0)	9 (90,0)	0,118
NÃO BRANCO	3 (50,0)	1 (10,0)	
TABACO			
TABAGISTA	3 (50,0)	3 (30,0)	0,607
EX TABAGISTA	3 (50,0)	7 (70,0)	
ÁLCOOL			
ETILISTA	3 (50,0)	1 (10,0)	0,159
EX ETILISTA	2 (33,3)	3 (30,0)	
RARAMENTE BEBE	1 (16,7)	6 (60,0)	

Teste do Qui-quadrado (nível de significância de $p < 0,05$)

4.2 CARACTERÍSTICAS FÍSICAS E HISPOPATOLÓGICAS DOS TUMORES

Dos tumores selecionados 62,5% foram classificados como T1 ou T2 e 37,5% como T3 ou T4. A maioria dos pacientes não apresentavam metástase regional (56,25%) e nenhum apresentou metástase a distância no momento do estudo. Quanto à graduação dos tumores, 12,5% foram classificados como Diferenciados, 25% Pouco Diferenciados e 62,5% se encon-

traram Indiferenciados. Quanto à localização, 50% dos tumores encontravam-se em cavidade bucal e 50% em região de pescoço. Os dados detalhados dos parâmetros clínicos tumorais estão expostos na tabela 3.

Tabela 3 - Características clínicas e histopatológicas dos tumores

VARIÁVEIS	GRUPO 1 n=6 (%)	GRUPO 2 n=10 (%)	p valor
TAMANHO DO TUMOR			
T1 e T2	5 (83,3)	5 (50)	0,307
T3 e T4	1 (16,7)	5 (50)	
METÁSTASE REGIONAL			
PRESENÇA	1 (16,7)	6 (60)	0,145
AUSÊNCIA	5 (83,3)	4 (40)	
GRADUAÇÃO DO TUMOR			
DIFERENCIADO	0 (0)	2 (20)	0,613
POUCO DIFERENCIADO	2 (33,3)	2 (20)	
INDIFERENCIADO	4 (66,7)	6 (60)	
LOCALIZAÇÃO DO TUMOR			
CAVIDADE ORAL	2 (33,3)	6 (60)	0,608
REGIÃO DE PESCOÇO	4 (66,7)	4 (40)	

Teste do Qui-quadrado (nível de significância de $p < 0,05$)

4.3 ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE E-CADERINA, N-CADERINA, VIMENTINA E PODOPLANINA NAS DIFERENTES ZONAS DO TUMOR E EPITÉLIO ADJACENTE AO TUMOR

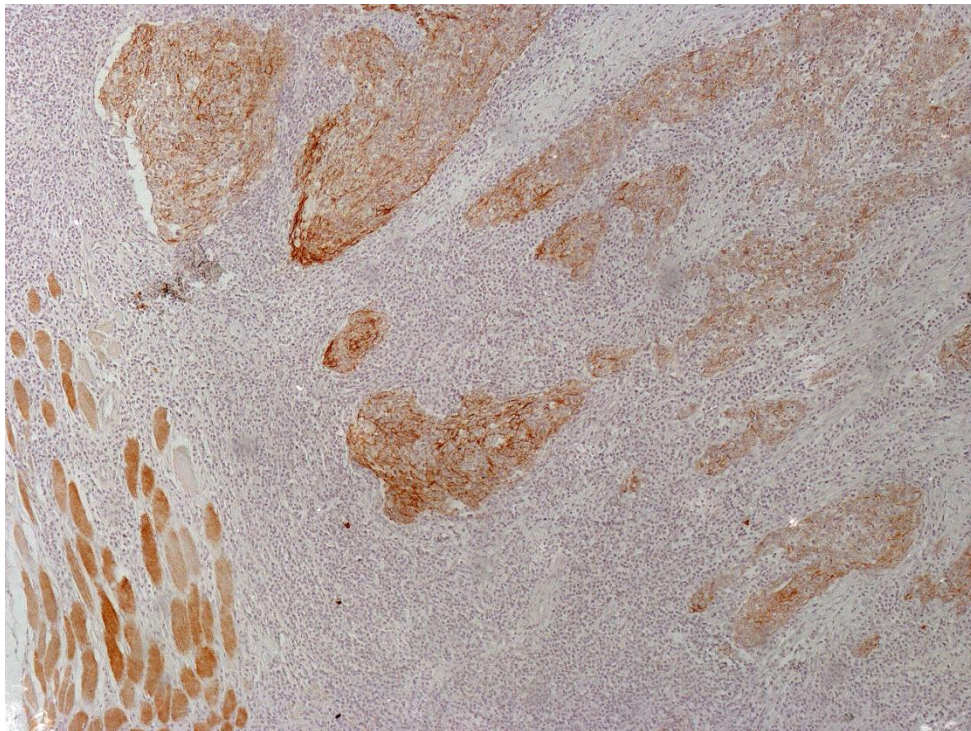
No grupo de pacientes vivos, a expressão de e-cad foi alta em 66,7% dos casos no EA, na ZI foi baixa em 66,7% dos casos e 83,3% dos casos no CT mostrou expressão baixa. No grupo óbitos, o EA mostrou expressão alta em 90% dos casos, na ZI 60% mostrou expressão baixa e no CT 70% mostrou expressão alta. Os dados detalhados estão expostos na tabela 4 e a sua expressão está exposta na figura 1 e 2.

Tabela 4 - Expressão de e-caderina no epitélio adjacente e nas diferentes zonas do tumor dos grupos estudados.

E-CADERINA	GRUPO 1 n=6 (%)	GRUPO 2 n=10 (%)	p VALOR
<i>Epitélio Adjacente</i>			
ESCORE 1	2 (33,3)	1 (10)	0,518
ESCORE 2	4 (66,7)	9 (90)	
<i>Zona de Invasão</i>			
ESCORE 1	4 (66,7)	6 (60)	>0,999
ESCORE 2	2 (33,3)	4 (40)	
<i>Centro do tumor</i>			
ESCORE 1	5 (83,3)	3 (30)	0,119
ESCORE 2	1 (16,7)	7 (70)	

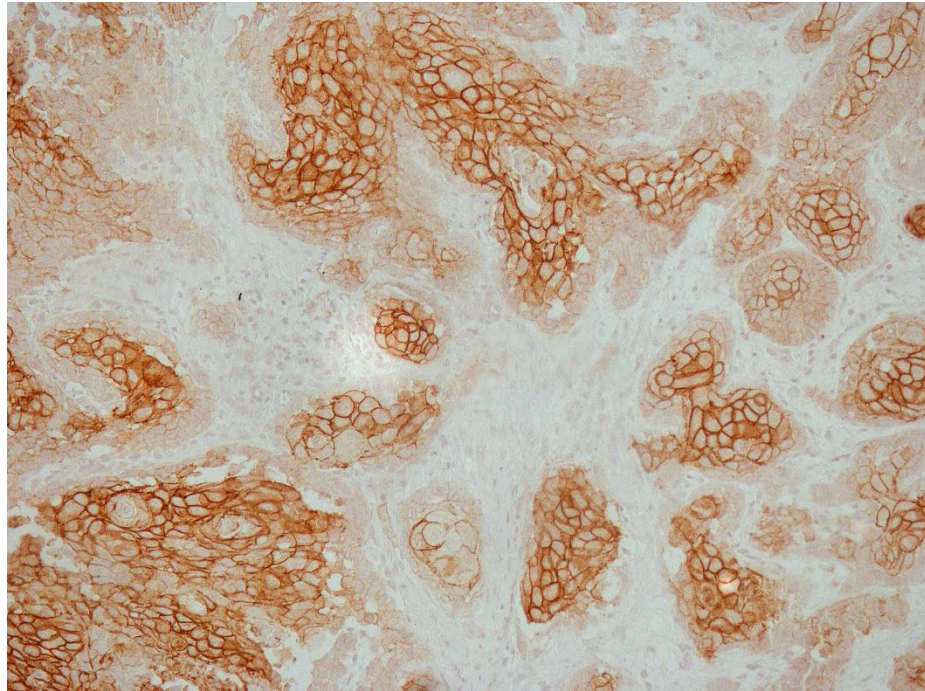
Teste do Qui-quadrado (nível de significância de $p < 0,05$)

Figura 1 - E-caderina escore 2 na zona de invasão. Ampliação 10x



Fonte: da autora, 2017

Figura 2 – E-caderina escore 2 no centro do tumor. Ampliação 40x



Fonte: da autora, 2017

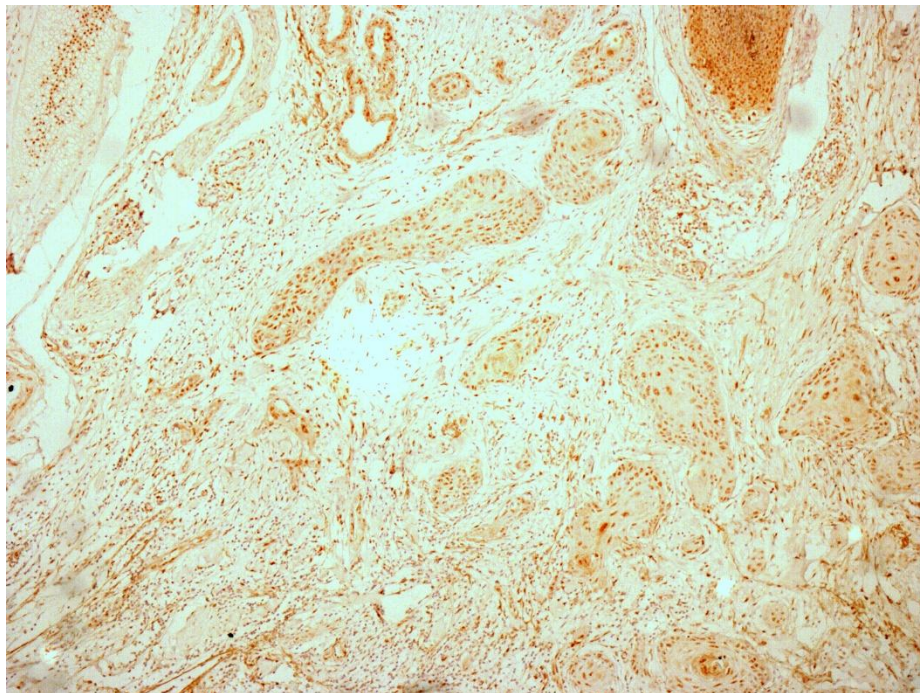
Em relação a imunomarcção para n-cad observou-se que tanto no grupo de pacientes vivos quanto no grupo óbitos a expressão foi predominantemente baixa nas três zonas analisadas. Os dados detalhados estão expostos na tabela 5 e a sua expressão está exposta nas figuras 3 e 4.

Tabela 5 - Expressão de n-caderina no epitélio adjacente e nas diferentes zonas do tumor dos grupos estudados.

N-CADERINA	GRUPO 1 n=6 (%)	GRUPO 2 n=10 (%)	<i>p</i> VALOR
<i>Epitélio Adjacente</i>			
ESCORE 1	5 (83,3)	9 (90)	>0,999
ESCORE 2	1 (16,7)	1 (10)	
<i>Zona de Invasão</i>			
ESCORE 1	6 (100)	8 (80)	0,500
ESCORE 2	0 (0)	2 (20)	
<i>Centro do tumor</i>			
ESCORE 1	6 (100)	8 (80)	0,500
ESCORE 2	0 (0)	2 (20)	

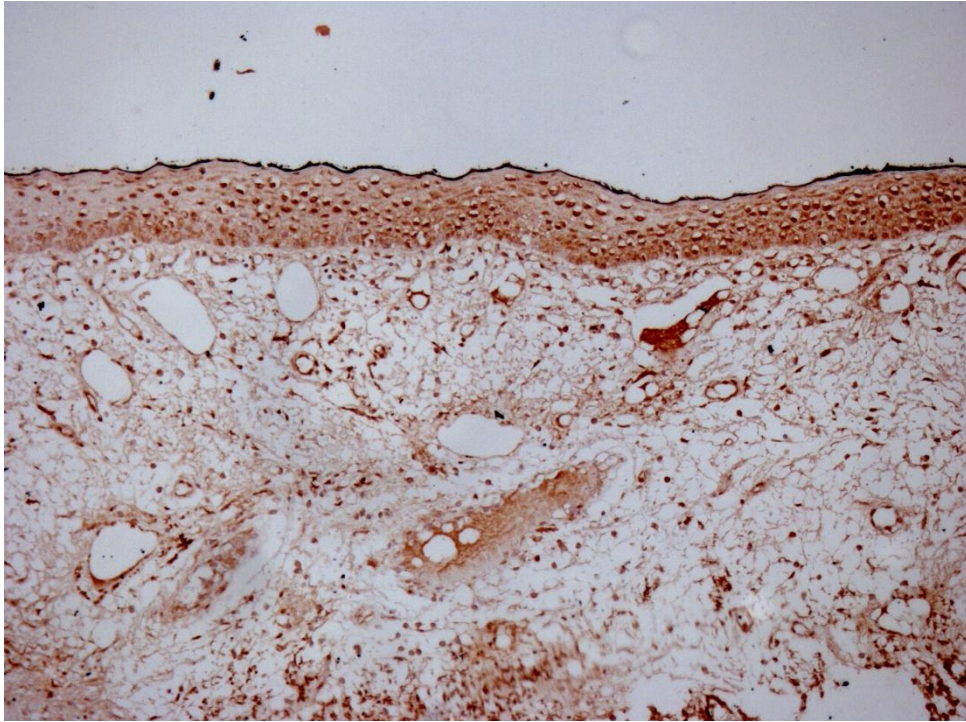
Teste do Qui-quadrado (nível de significância de $p < 0,05$)

Figura 3 - N-caderina escore 2 na zona de invasão. Ampliação 10x



Fonte: da autora, 2017

Figura 4 - N-caderina escore 2 no epitelio adjacente. Ampliação 40x



Fonte: da autora, 2017

Em relação a vim, observou-se um percentual de marcação no escore 1 de 100% nas tres zonas dos tumores estudadas tanto para o grupo vivos sem recidiva (Grupo 1) quanto para o grupo óbitos (Grupo 2).

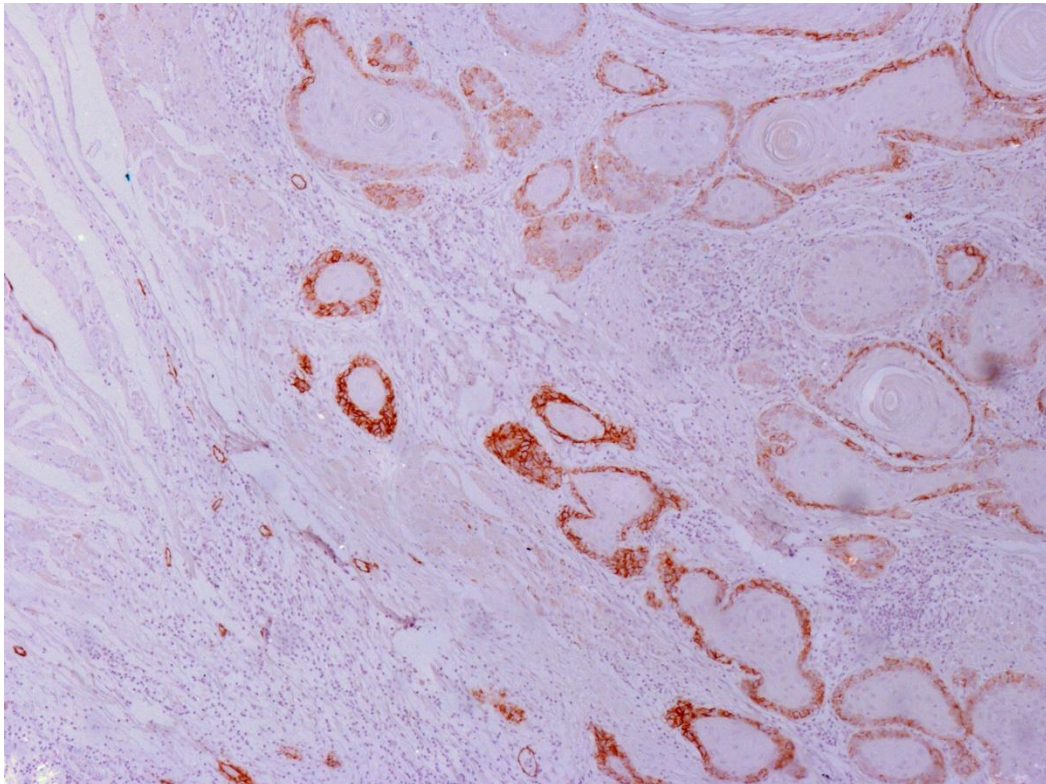
Quanto à expressão de podo observou-se uma marcação baixa nas 3 zonas analisadas tanto para o grupo de pacientes vivos quanto para o grupo óbitos. Sua expressão está exposta nas figura 5 e os dados detalhados expostos na tabela 6.

Tabela 6 - Expressão da podoplanina no epitélio adjacente e nas diferentes zonas do tumor dos grupos estudados

D240	GRUPO 1 n=6 (%)	GRUPO 2 n=10 (%)	<i>p</i> VALOR
<i>Epitélio Adjacente</i>			
ESCORE 1	5 (83,3)	9 (90)	>0,999
ESCORE 2	1 (16,7)	1 (10)	
<i>Zona de Invasão</i>			
ESCORE 1	5 (83,3)	7 (70)	>0,999
ESCORE 2	1 (16,7)	3 (30)	
<i>Centro do tumor</i>			
ESCORE 1	5 (83,3)	7 (70)	>0,999
ESCORE 2	1 (16,7)	3 (30)	

Teste do Qui-quadrado (nível de significância de $p < 0,05$)

Figura 5 – Podoplanina escore 2 na zona de invasão. Ampliação 10x



Fon-

te:

4.4 AVALIAÇÃO DO PROCESSO DE EMT E MET NO CENTRO DO TUMOR E ZONA DE INVASÃO

No grupo de pacientes vivos sem recidiva, a maioria das amostras encontravam-se em processo de transição, tanto na ZI como no CT. No grupo óbitos, na ZI a maioria das amostras encontravam-se em processo de transição e no CT em processo de MET. Dados detalhados na Tabela 7.

Tabela 7 - Presença do processo de MET, EMT e Fase de transição na zona de invasão e centro do tumor dos grupos estudados.

VARIÁVEIS	GRUPO 1 n=6 (%)	GRUPO 2 n=10 (%)	<i>p VALOR</i>
Zona de Invasão			
MET	2 (33,3)	3 (30)	
TRANSIÇÃO	4 (66,7)	6 (60)	>0,999
EMT	0 (0)	1 (10)	
Centro do tumor			
MET	1 (16,7)	6 (60)	
TRANSIÇÃO	5 (83,3)	3 (30)	0,121
EMT	0 (0)	1 (10)	

Teste do Qui-quadrado (nível de significância de $p < 0,05$)

4.5 AVALIAÇÃO DO EPITÉLIO ADJACENTE NOS GRUPOS ESTUDADOS

No EA 68, 75% das amostras foram classificadas como normal e 31,25% como alterado. Nessa zona, 80% das amostras do Grupo 2 se encontravam normal e das amostras do Grupo 1 houve 50% normal e 50% alterado. Dados detalhados na tabela 8.

Tabela 8 - Avaliação do epitélio adjacente nos grupos estudados

VARIÁVEIS	GRUPO 1 n=6 (%)	GRUPO 2 n=10 (%)	<i>p VALOR</i>
Epitélio Adjacente			
NORMAL	3 (50)	8 (80)	
ALTERADO	3 (50)	2 (20)	>0,299

Teste do Qui-quadrado (nível de significância de $p < 0,05$)

4.6 CORRELAÇÃO DOS MARCADORES COM A FASE DA CÉLULA EPITELIAL

Quando analisamos a correlação dos marcadores com a fase da célula epitelial (transição, MET e EMT) observamos que no CT e ZI a baixa expressão de e-cad está associada à fase de transição e a alta expressão ao MET (Teste Qui Quadrado $p=0,02$).

No EA a baixa expressão de e-cad está associado ao epitélio alterado e a alta expressão associado ao epitélio normal (Teste Qui Quadrado, $p=0,018$).

5 DISCUSSÃO

No presente estudo o perfil demográfico foi o esperado e os dados vão ao encontro da literatura. A média de idade foi de 59 anos (39 a 71 anos), Houve predominância pelo sexo masculino, 93,75%. Em relação à origem étnica, 75% era branca. (FRANCO et al., 1989; MILLER et al., 2003),

Considerando os hábitos dos pacientes, 62,5% deles são ex-tabagistas, e 37,5% são tabagistas. Todos pacientes que vieram a óbito são fumantes ou já foram fumantes, esses últimos levaram de 20 a 54 anos da vida como fumantes e pararam de fumar somente há, no máximo, 1 ano e 7 meses enquanto que no grupo dos pacientes vivos sem recidiva, não chega a 40 o numero de anos permanecendo com o hábito e aqueles que pararam, que foi a maioria da amostra, estão há, pelo menos, 15 anos sem fumar. Segundo a literatura o risco de ter câncer só vai ser menor para ex-fumantes comparado com os que nunca fumaram quando chegar a dez anos sem possuir o hábito (FRANCO et al., 1989; BLOT et al; MACPHERSON et al., 2003).

Quanto à ingestão de álcool, no grupo óbito todos os pacientes são ou foram etilistas, com alta frequência de ingestão chegando a 2 garrafas por dia, há mais de 10 anos e pararam de beber álcool há no máximo 4 anos. Já os pacientes do grupo vivos sem recidiva pararam de beber a mais tempo, chegando a 7 anos e não passando de 1 garrafa por dia. Segundo Andre et al. (1995) até 1L de bebida alcoólica por dia aumenta em 34 vezes a chance de possuir câncer bucal.

O efeito do uso silmultâneo, de álcool e fumo, pode aumentar as chances de desenvolvimento de câncer bucal em até cem vezes (NEVILLE., 2002). Segundo Shen et al. (2015), em seu estudo, a mortalidade em pacientes com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço foi associado com o aumento da idade, sexo masculino, tamanho do tumor e estados avançados de graduação do tumor (T e N).

Analisando os dois grupos do presente estudo, podemos inferir que aqueles que vieram a óbito possuíam metástase regional, bem como um tumor maior e mais extenso quando comparados com o grupo dos vivos sem recidiva. Conforme a International Union Against Cancer (2004), quanto maior a classificação do estadiamento, pior é o prognóstico. Portanto, esse critério foi um fator muito importante, e parece estar relacionado com os óbitos desse mesmo grupo.

Nossos resultados mostram que no CT e ZI a baixa expressão de e-cad está associada à fase de transição e a alta expressão ao MET, ou seja, podemos afirmar que na fase de transi-

ção, tanto no CT quanto na ZI a proteína epitelial e-cad se encontra menos presente nas células deixando-as menos aderidas entre si e com maior potencial de invasão. A sua alta expressão associada ao MET demonstra que nesse processo as células estagnaram o processo de invasão e a-cad já está retornando ao seu estado de normalidade dentro das células. Outra associação significativa foi a da expressão de e-cad no EA, que mostrou que a baixa expressão está associada ao epitélio alterado enquanto que a alta expressão ao epitélio normal. Com esses dados confirmamos que a presença de-cad é fundamental na adesão celular, pois quando sua expressão na célula diminui, sua capacidade de mobilidade e invasão aos tecidos adjacentes fica aumentada resultando em um maior potencial metastático.

Analisando a expressão das proteínas n-cad e vim observamos que houve uma baixa expressão nas três regiões analisadas tanto no grupo vivos sem recidiva quanto no grupo óbitos. Essa contribuição reduzida da expressão da n-cad e vim nas células exige uma análise de outros marcadores que podem avaliar melhor os fenótipos de EMT intermediários e uma possível relação entre as características mesenquimais e epiteliais (TSUJI et al., 2009). Nossos resultados sugerem que essas proteínas, pela técnica utilizada, não são capazes de avaliar o processo de transição epitélio-mesenquimal das células tumorais.

Na literatura, alguns autores afirmam que as células não oscilam entre um estado epitelial total e mesenquimais completos, mas sim, se movendo por meio de fases intermediárias, ou seja, um EMT parcial que seria o início desse processo, aonde as células não precisam ganhar características mesenquimais de imediato, bastando apenas diminuição das propriedades epiteliais como uma polaridade apico-basal e uma remodelação de complexos juncionais (HUANG et al., 2012), claro que essas células não vão se comportar com tamanha característica migratória como quando, além de perder e-cad possam ganhar n-cad, dado o seu comportamento adesivo diferente, promovendo assim uma migração coordenada mais eficiente (CHU et al, 2006; HALBLEIB; NELSON, 2006). Portanto, a regulamentação da EMT clássica centra-se na supressão da transcrição da molécula de adesão, e-cad (LAMOUILLE et al., 2014;. THIERY et al., 2009), fazendo com que a n-cad seja apenas um fator de avaliação temporal do EMT. Sendo assim para ocorrer o processo de EMT, não necessariamente deve haver baixa expressão de e-cad e alta da n-cad e vim que nem sugere alguns autores (THIERY et al., 2009), pois a expressão dessas proteínas podem não estar simultaneamente nas células malignas, a expressão ou inibição podem acontecer em diferentes estágios para cada proteína dentro de uma mesma célula e para cada indivíduo de forma diferente.

Analisando a podoplanina, no presente estudo, foi observado que na ZI a marcação se deu somente circundando as ilhas tumorais, enquanto que no CT se deu também no meio das

ilhas tumorais. Isso também se confirma em um outro estudo, aonde foi demonstrado, através de um corte imunohistológico, que no CT, ou seja, nas ilhas tumorais a marcação foi positiva somente na periferia das ilhas. (PATILl et al., 2015). Segundo Okamoto et al. (2010) esse padrão também foi observado nas ilhas epiteliais tumorais, porém não especifica se a expressão é somente nas células que circundam as ilhas. Com isso podemos sugerir que as células que se localizam dispersas no meio da ilha tumoral, no CT, passam a povoar somente a região mais periférica das ilhas quando essas passam a iniciar uma invasão, recrutando todas as células malignas para a periferia a fim de possuir maior capacidade migratória, invasiva e metastática.

6 CONCLUSÃO

O processo de EMT nas células epiteliais do carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço é um processo complexo e dinâmico em que as células parecem não oscilar de um padrão epitelial total para mesenquimal completo de maneira coordenada mas sim passando por fases intermediárias. A expressão dessas proteínas podem não estar simultaneamente nas células malignas, a expressão ou inibição podem acontecer em diferentes estágios para cada proteína dentro de uma mesma célula e para cada indivíduo de forma diferente.

Podemos inferir que o grau de estadiamento e metástase regional são norteadores do prognóstico, pois quanto maior a classificação do estadiamento, pior é o prognóstico, sendo esses fatores relacionados com o grupo Óbitos do presente estudo. Para se ter a capacidade de prever melhor o prognóstico, se faz necessário um maior número de amostras, pois para as variáveis avaliadas em nossas amostras as proteínas utilizadas nesse estudo não foram capazes de realizar essa previsão.

Pela técnica imunistoquímica utilizada neste estudo podemos sugerir que a proteína e-caderina foi a proteína que melhor retratou a fase em que as células epiteliais se encontravam no tumor.

REFERÊNCIAS

- Andre K, Schraub S, Mercier M, Bontemps P. Role of alcohol and tobacco in the aethiology of head and neck cancer: a case-control study in the Doubs Region of France. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1995;31B(5):301-9.
- Astarita J L, Acton S E, Turley SJ. Podoplanin: emerging functions in development, the immune system, and cancer. *Frontiers in Immunology.* 2012;3:1-11. Article 283.
- Blot WJ, McLaughlin JK, Winn DM, Austin DF, Greenberg RS, Preston-Martin S et al. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer Res.* 1988;48(11):3287-7.
- Brabletz T, Jung A, Reu S, Porzner M, Hlubek F, Kunz-Schughart LA et al. Variable beta-catenin expression in colorectal cancers indicates tumor progression driven by the tumor environment. *Proc Natl Acad Sci.* 2001; 98(18):10356–61.
- Breiteneder-Geleff S, Soleiman A, Kowalski H, Horvat R, Amann G, Kriehuber E et al. Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries: podoplanin as a specific marker for lymphatic endothelium. *Am J Pathol.* 1999;154:385–94.
- Chu YS, Eder O, Thomas WA, Simcha I, Pincet F, Ben-Ze'ev A, Perez E et al. Prototypical type I E-cadherin and type II cadherin-7 mediate very distinct adhesiveness through their extracellular domains *J Biol Chem.* 2006;281:2901–10.
- Coulombe PA, Wong P. Cytoplasmic intermediate filaments revealed as dynamic and multi-purpose scaffolds. *Nat Cell Biol.* 2004; 6(8):699-706.
- Dedivitis RA, França CM, Mafra ACB, Guimarães FT, Guimarães AV. Características clínico-epidemiológicas no carcinoma espinocelular de boca e orofaringe. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2004 ;70(1):35-40.
- Dumoff K L, Chu C, Xu X, Pasha T, Zhang P J, Acs G. Low D2-40 immunoreactivity correlates with lymphatic invasion and nodal metastasis in early-stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix. *Modern Pathology.* 2005;18(1):97–104.
- Halbleib JM, Nelson WJ. Cadherins in development: cell adhesion, sorting, and tissue morphogenesis. *Genes Dev.* 2006;20:3199–214.
- Han H, Yang Y, Lu Z, He K, Lin Z. Decreased D2-40 and increased p16^{INK4A} immunoreactivities correlate with higher grade of cervical intraepithelial neoplasia. *Diagn Pathol.* 2011;6:59–64.
- Hashimoto T, Soeno Y, Maeda G, Taya Y, Aoba T, Nasu M et al. Progression of oral squamous cell carcinoma accompanied with reduced e-cadherin expression but not cadherin switch. *PLoS One.* 2012; 7(10):1-8. Article e47899.
- Hildebrand LC, Carvalho AL, Lauxen IS, Nör JE, Cerski CT, Sant'Ana Filho M. Spatial distribution of cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinomas *J Oral Pathol Med.* 2014:499-506.
- Huang RY, Guilford P, Thiery JP. Early events in cell adhesion and polarity during epithelial-mesenchymal transition. *J Cell Sci.* 2012;125:4417– 22.

Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro;2014.

Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2015: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro;2015

International Union Against Cancer. [Internet]. TNM cancer staging: UICC TNM Prognostic Factors Committees. Geneva; c2004. [2004 Set 12]. Available from: <<http://www.uicc.org>>.

Jemal A, Bray F et al. Expression of E-cadherin and vimentin in oral squamous cell carcinoma Global cancer statistics. *CA Cancer J Clin.* 2001;61(2):69-90.

Kato Y, Kaneko M, Sata M, Fujita N, Tsuruo T, Osawa M. Enhanced expression of Aggrus (T1alpha/podoplanin), a platelet-aggregation-inducing factor in lung squamous cell carcinoma. *Tumour Biol.* 2005;26:195–200.

Lamouille S, Xu J, Derynck R. Molecular mechanisms of epithelial-mesenchymal transition. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2014;15:178–96.

Lehtinen L, Ketola K, Makela R, Mpindi JP, Viitala M, Kallioniemi O et al. High-throughput RNAi screening for novel modulators of vimentin expression identifies MTHFD2 as a regulator of breast cancer cell migration and invasion. *Oncotarget.* 2013;4:48-63.

Liu CY, Lin HH, Tang MJ, Wang YK. Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation. *Oncotarget,* 2015; 6(18):15966-83.

Lu Z, Ghosh S, Wang Z, Hunter T. Downregulation of caveolin-1 function by EGF leads to the loss of E-cadherin, increased transcriptional activity of beta-catenin, and enhanced tumor cell invasion. *Cancer Cell.* 2003;4:499-515.

Macpherson LMD, Gibson J, Binnie VI, Conway DI. Oral cancer: aetiology. [Internet]. Glasgow: University of Glasgow; 2003 [cited 2004 Apr 20]. Available from: <<http://www.gla.ac.uk>>.

Markovic-Lipkovski J, Brasanac D, Muller GA, Muller CA. Cadherins and integrins in renal cell carcinoma: an immunohistochemical study. *Tumori* 2001, 87(3):173–8.

Martín-Villar E, Fernández-Muñoz B, Parsons M et al. Podoplanin associates with CD44 to promote directional cell migration. *Mol Biol Cell.* 2010;21(24):4387–99.

Martin-Villar E, Scholl FG, Gamallo C, Yurrita MM, Munoz-Guerra M, Cruces J et al. Characterization of human PA2.26 antigen (T1alpha-2, podoplanin), a small membrane mucin induced in oral squamous cell carcinomas. *Int J Cancer.* 2005;113: 899–910.

Miller CS, Henry RG, Rayens MK. Disparities in risk of and survival from oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003;95(5):570-5.

Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin.* 2002;52(4):195-215.

Nollet F, Kools P, van Roy F. Phylogenetic analysis of the cadherin superfamily allows identification of six major subfamilies besides several solitary members. *J Mol Biol.* 2000;299:551–72.

- Okamoto E, Kikuchi K, Miyazaki Y, Gonza´lez-Alva P, Oku Y, Tanaka A et al. Risk factors for oral cancer in Brazil: a case-control study. *Int J Cancer*. 1989;43(6):992-1000.
- Ordóñez NG. Podoplanin: a novel diagnostic immunohistochemical marker. *Adv Anat Pathol*. 2006;13:83–8.
- Patil A, Patil K, Tupsakhare S, Gabhane M, Sonune S, Shilpa Kandalgaonkar S. Evaluation of podoplanin in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. *Scientifica*. 2015;2015:1-8. Article ID 135298.
- Satelli A, Li S. Vimentin in cancer and its potential as a molecular target for cancer therapy. *Cell Mol Life Sci*. 2011; 68:3033-46.
- Schulte-Merker S, Sabine A, Petrova TV. Lymphatic vascular morphogenesis in development, physiology, and disease. *J Cell Biol*. 2011;193(4):607–18.
- Shen W, Sakamoto N, Yang L. Cancer-Specific mortality and competing mortality in patients with head and neck squamous cell carcinoma: a competing risks analysis. *Ann Surg Oncol*. 2015; 22: 264-71.
- Shimazui T, Schalken JA, Girolodi LA, Jansen CF, Akaza H, Koiso K et al. Prognostic value of cadherin-associated molecules (alpha-, beta-, and gamma-catenins and p120cas) in bladder tumors. *Cancer Res*. 1996;56(18):4154-8.
- Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelial-mesenchymal transitions in development and disease. *Cell*. 2009;139(5):871-90.
- Tsuji T, Ibaragi S, Hu GF. Epithelial-mesenchymal transition and cell cooperativity in metastasis. *Cancer Res*. 2009;69:7135–9.
- Weber SK, Sauerwald A, Polcher M, Braun M, Debald M, Serce NB, et al. Detection of lymphovascular invasion by D2-40 (podoplanin) immunoreactivity in endometrial cancer. *Int J Gynecol Cancer*. 2012;22(8):1442–8.
- Wicki A, Christofori G. The potential role of podoplanin in tumour invasion. *Br J Cancer*. 2007;96(1):1–5.
- Wicki A, Lehembre F, Wick N, Hantusch B, Kerjaschki D, Christofori G. Tumor invasion in the absence of epithelial-mesenchymal transition: Podoplanin-mediated remodeling of the actin cytoskeleton. *Cancer Cell*. 2006;9:261–72.

ANEXO A - TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Estamos realizando uma pesquisa sobre células tronco tumorais no carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço que irá nos ajudar a entender melhor esta doença, assim como a prevenção e o desenvolvimento de novos tratamentos. Você será submetido a uma cirurgia para o tratamento deste tumor e gostaríamos de guardar parte deste tecido para a pesquisa, bem como uma amostra de sangue.

Dados sobre a pesquisa realizada com seu tecido e/ou sangue estarão disponíveis para você ou seu cirurgião se houver interesse, porém estes dados não serão anexados ao seu prontuário. A pesquisa não terá nenhuma repercussão no seu tratamento. A escolha da utilização do tecido e/ou sangue para pesquisas futuras é sua. **Seu tratamento não será afetado independentemente da sua escolha.** Caso decida autorizar a utilização do seu tecido e/ou sangue para pesquisa, você poderá mudar de idéia a qualquer momento. Para isso você deve entrar em contato com o pesquisador responsável pela pesquisa e solicitar a retirada do seu material.

No futuro, pesquisadores poderão precisar de informações sobre sua saúde. Estes dados serão fornecidos pelo pesquisador responsável, porém sem conter seu nome, endereço, número de telefone ou qualquer outra informação que permita ao pesquisador ou outro membro da pesquisa identificá-lo. O tecido e/ou sangue poderão ser utilizados para pesquisas que estudem a relação de alterações no DNA com o estilo de vida de pessoas que desenvolveram carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço. Seu material será usado somente para pesquisa.

Não há riscos adicionais além da cirurgia já programada pelo seu cirurgião. O pesquisador responsável, bem como a equipe envolvida na pesquisa compromete-se manter em sigilo informações que possam identificá-lo, como nome, endereço e número de telefone.

Pelo presente consentimento, declaro que fui esclarecido, de forma detalhada e livre de qualquer constrangimento, da justificativa e dos procedimentos que serei submetido.

Fui igualmente informado da garantia de receber resposta a qualquer pergunta ou esclarecimento a qualquer dúvida dos procedimentos, riscos, benefícios e outros assuntos relacionados com a pesquisa.

Pesquisador responsável (Dr. Manoel Sant'Ana Filho): 51 33085011/51 99818795

Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre: 51 33598304

Nome _____ do _____ voluntário:

—

Assinatura _____ do _____ voluntário:

—

Data: _____ Telefone: _____

Observação: o presente documento, baseado no item IV das Diretrizes e Normas Regulamentares para Pesquisa em Saúde do Conselho Nacional de Saúde (resolução 196/96), será assinado em duas vias, de igual teor, ficando uma em poder do paciente e a outra do pesquisador responsável.