

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

GABRIELA TONINI PETERLE

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DA VIA DE HIPÓXIA EM
CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CAVIDADE ORAL: RELAÇÃO COM
O TABAGISMO, COM AS CARACTERÍSTICAS
CLINICOPATOLÓGICAS E PROGNÓSTICAS**

VITÓRIA

2014

GABRIELA TONINI PETERLE

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DA VIA DE HIPÓXIA EM
CARCINOMA EPIDERMOIDE DE CAVIDADE ORAL: RELAÇÃO COM
O TABAGISMO, COM AS CARACTERÍSTICAS
CLINICOPATOLÓGICAS E PROGNÓSTICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Adriana Madeira Álvares da Silva Conforti

Co-orientador: Prof. Dr. Iúri Drumond Louro

VITÓRIA

2014

Dados Internacionais de Catalogação-na-publicação (CIP)
(Biblioteca Central da Universidade Federal do Espírito Santo, ES, Brasil)

P478a Peterle, Gabriela Tonini, 1989-
Avaliação da expressão de proteínas da via de hipóxia em carcinoma epidermoide de cavidade oral: relação com o tabagismo, com as características clinicopatológicas e prognósticas / Gabriela Tonini Peterle. – 2014.
100 f. : il.

Orientador: Adriana Madeira Álvares da Silva Conforti.
Coorientador: Iúri Drumond Louro.

Dissertação (Mestrado em Biotecnologia) – Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Carcinoma. 2. Cisto Epidérmico. 3. Neoplasias de Cabeça e Pescoço. 4. Imuno-Histoquímica. I. Conforti, Adriana Madeira Álvares da Silva. II. Louro, Iúri Drumond. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 61

GABRIELA TONINI PETERLE

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS DA VIA DE HIPÓXIA EM
CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE CAVIDADE ORAL: RELAÇÃO COM O
TABAGISMO, COM AS CARACTERÍSTICAS CLINICOPATOLÓGICAS E
PROGNÓSTICAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em 20 de fevereiro de 2014.

**Prof^a. Dr^a. Adriana Madeira Álvares da Silva
Conforti
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora**

**Prof. Dr. Iúri Drumond Louro
Universidade Federal do Espírito Santo
Co-Orientador**

**Prof. Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira
Universidade Federal do Espírito Santo**

**Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes
Universidade de São Paulo**

VITÓRIA

2014

À Vovó Dete e ao Vovô Chico

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora, por toda proteção, amparo e por todo o amor.

À Universidade Federal do Espírito Santo, ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, ao Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), à Fundação de Amparo à Pesquisa do Espírito Santo (FAPES) e ao Head and Neck Genome Project (GENCAPO), pela oportunidade de cursar um mestrado em uma instituição respeitada, pelos auxílios financeiros e pelas amostras biológicas utilizadas neste trabalho.

Ao professor Dr. Iúri Drumond Louro pelo exemplo de integridade e por toda gentileza.

Ao professor Dr. Fábio Daumas Nunes pela parceria no desenvolvimento desta pesquisa e por toda generosidade.

Ao professor Dr. Fausto Edmundo Lima Pereira pela participação na banca avaliadora.

Ao amigo e professor Me. Marcelo dos Santos pela ajuda na seleção da casuística, na elaboração da estatística e das discussões.

Ao amigo e professor Me. Leonardo Oliveira Trivilin pela ajuda com as análises e pelas aulas de patologia.

Ao irmão do coração Me. Renato Graciano de Paula, pelas correções e sugestões referentes à escrita do trabalho, pelo companheirismo e carinho de sempre.

À Isabela Binotti pelo companheirismo e ajuda durante as análises, pelos conselhos e pela amizade sincera.

Aos técnicos do Laboratório de Patologia Cirúrgica da Faculdade de Odontologia/USP (Elisa e Juvani) e à Pós-Doutoranda Lília Alves Rocha, pela paciência e solicitude no desenvolvimento desta pesquisa.

À Dr^a. Raquel Ajub Moysés pelos cortes histológicos para a realização das imunohistoquímicas e pelas lâminas com marcação para VEGF.

Aos professores que me orientaram ao longo da graduação em Ciências Biológicas e/ou que contribuíram com minha formação pessoal e profissional: Josimar Ribeiro, Erika Takagi Nunes, Adriane Cristina Araújo Braga, Andréia Barcelos Passos Lima, Luceli de Souza e Magnus Régios Dias da Silva.

Às queridas Kárita e Catarina, por nos atenderem na secretaria do programa com um profissionalismo admirável e uma gentileza sem igual.

Aos meus pais e irmãos (Daniel e André): Obrigada pelas alegrias, companheirismo, dedicação, amor e por estarem ao meu lado em todos os momentos. Principalmente quero prestar homenagens aos pais que me ensinaram o valor e a força das mãos que trabalham e me conduziram pelo caminho do bem. Vocês são o motivo maior de qualquer conquista: **"Obrigada pela caminhada, pela luta, pela lida. Aprendi com vocês a ter coragem e a não desanimar. Obrigada pelas mãos entrelaçadas na minha, doando-me confiança, na certeza de estar indo por caminhos seguros e na certeza de que terei sempre onde me amparar caso eu tropece."** (Mena Moreira)

Ao meu amor (André), pelo companheirismo, cumplicidade, afeto, paciência e ajuda.

Aos pais que a vida tão generosamente me concedeu: Tia Iara, Tio César, Tia Cláudia, Tio Peroba, Tia Janete e Tio Edison. Jamais teria chegado até aqui sem a certeza que depositaram na minha vitória e sem o amparo ao longo da caminhada. Especialmente agradeço à Tia Iara, pelo amor de mãe, amizade e pelos inesquecíveis bolos de cenoura, à Tia Cláudia e ao Tio Peroba, por serem peças fundamentais no meu desenvolvimento pessoal e profissional.

Aos avós que não se encontram mais neste plano, mas que deixaram inúmeros ensinamentos e uma imensa saudade. Vovó Dete e Vovô Chico, apesar de não estarem fisicamente ao meu lado, a certeza de que olham por mim e torcem pela minha vitória me motiva a seguir com coragem e confiança.

Ao Tio Val, Vovô Darli e Vovó Luzia, por sempre me acolherem com um brilho no olhar, com um imenso sorriso e com os braços abertos, mostrando que estar em Peçanha é voltar para o lar.

Aos primos que me acolheram como irmã em suas casas e que com carinho sempre me apoiaram. Rick, Raquel e Pedro, muito obrigada.

À Tia Luciara, Tia Teka e Tia Franci, por se preocuparem comigo e por torcerem pela minha vitória. Especialmente agradeço à Tia Teka pelos pães, bolos e doces, que foram primordiais nas noites de estudos e pelas caronas até Peçanha.

À Elenir e ao seu Delson, pela torcida, apoio e carinho ao longo da vida.

Às amigas de longa data: Nádia, Lílian, Leiliane, Liliane, Dani Bollis, Jana, Jussara e Cinthia. Espero que os laços de amor e amizade nos mantenham unidas por toda a vida.

Aos queridos amigos que entraram em minha vida ao longo deste mestrado: Lucas, Dani Camporez, Lidi, Elaine e Carol Mayumi. Foi uma honra conhecê-los! Obrigada pelo companheirismo, pelas risadas e por toda ajuda.

Aos membros do Núcleo de Genética Humana e Molecular e aos membros do Grupo de Estudo em Biologia Molecular do Câncer/Alegre. Desejo que continuem a desenvolver pesquisas com sabedoria e humildade e que tenham infinitas conquistas ao longo de suas trajetórias científicas. Principalmente agradeço aos meus "pseudos" (Thabata, Paola, Mayara e Joaquim) por confiarem em mim e por todo carinho.

A todos que torceram, acreditaram, ajudaram e/ou rezaram por mim, meu muito obrigada!

Especialmente gostaria de agradecer à **Prof^a. Dr^a. Adriana Madeira Álvares da Silva Conforti** que com sabedoria me ensina a importância do desenvolvimento científico aliado ao amor ao próximo e que me ajuda a crescer profissional e espiritualmente: **"Mestre é aquele que caminha com o tempo, propondo paz, fazendo comunhão, despertando sabedoria. Mestre é aquele que estende a mão, inicia o diálogo, encaminha para a aventura da vida. Não é só aquele que ensina fórmulas, regras, raciocínios, mas aquele que também questiona e desperta para a realidade. Não é aquele que dá de seu saber, mas aquele que faz germinar o saber do discípulo. Feliz é aquele que transfere o saber e aprende o que ensina"**. (Cora Coralina)

“Talvez, meio caminho andado seja a gente acreditar no que faz. Mas acima de tudo, o que mais nos incentiva, o que mais nos valoriza e também mais nos torna conscientes de nossa responsabilidade é saber que outros creem em nós. E não há palavras que descrevam o que sentimos ao saber dos sacrifícios a que eles se impõem por crerem não apenas em nós, mas também no que cremos”. (Albert Einstein)

RESUMO

PETERLE, G.T. **Análise da expressão de proteínas da via de hipóxia em carcinoma epidermoide de cavidade oral: relação com o tabagismo, com as características clinicopatológicas e prognósticas**, 2014, 100f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Espírito Santo.

O carcinoma epidermoide de cavidade oral (CEC oral) é uma causa significativa de mortalidade e morbidade e está relacionado, principalmente, ao uso do álcool e tabaco. Alguns marcadores genéticos de resposta ao tratamento e evolução clínica já foram identificados para esse carcinoma, como a HIF1 α , a qual promove a transcrição de genes como CA-IX, PAI-1 e VEGF envolvidos na resposta celular à depleção de oxigênio. Com o intuito de observar as influências de algumas proteínas da via de hipóxia nas características clinicopatológicas e no prognóstico dos pacientes, bem como observar a atuação dos constituintes do tabaco no mecanismo de hipóxia, foi realizada uma análise semi-quantitativa de 52 pacientes com CEC oral, por meio de imuno-histoquímica, sendo os cálculos e gráficos estatísticos feitos através do software Epi Info[®] v3.4.3, 2007. A frequência de positividade da expressão CA-IX confirmou a existência de diferenças biológicas entre as expressões negativa e positiva da proteína ($p=0,027$). Desta forma, a expressão citoplasmática positiva mostrou uma relação significativa com a ocorrência de linfonodos acometidos ($p=0,025$) e a expressão membranar negativa de CA-IX foi predominante nos casos com o infiltrado inflamatório intenso ($p=0,044$). Em relação às curvas de sobrevida, as expressões positivas fraca e forte de CA-IX membranar mostraram significância referente à Sobrevida Livre de Doença Local (LDL) ($p=0,038$); já as expressões citoplasmáticas negativa e positiva da proteína apresentaram significância para a Sobrevida Doença Específica (DE) ($p=0,022$). A análise multivariada confirmou a expressão citoplasmática de CA-IX como um fator de risco para a ocorrência de óbito doença específica, aumentando esse risco em aproximadamente 3x (HR=2,84; IC= 1,02-7,87). Em relação ao PAI-1, o nível da expressão citoplasmática da proteína mostrou relação significativa com o grau de diferenciação tumoral ($p=0,027$) e as expressões citoplasmáticas e membranares positivas apresentaram associação com o infiltrado inflamatório moderado ($p=0,013$;

$p=0,033$, respectivamente). Já para o prognóstico, as expressões membranares negativa e positiva de PAI-1 apresentaram uma associação significativa com a recidiva local ($p=0,027$) e a análise multivariada confirmou a expressão membranar positiva da proteína como um fator de risco para a ocorrência de tal recidiva, aumentando esse risco em aproximadamente 14x (OR=14,49; IC= 1,40-150,01). O grau de diferenciação tumoral também foi significativamente associado com as expressões citoplasmáticas negativa e positiva de VEGF ($p=0,035$) e foi observada uma relação entre a presença do infiltrado inflamatório e as expressões positivas fraca e forte da proteína ($p=0,038$). Por fim, não foram encontradas significâncias estatísticas entre o hábito tabagista e as expressões de CA-IX, PAI-1 e VEGF, no entanto, acredita-se que este resultado seja decorrente da composição da casuística do trabalho. Assim, a busca de biomarcadores para o CEC oral é um desafio que deve ser assumido por grupos de pesquisas que trabalham com a doença, com o intuito de elucidar mecanismos da gênese tumoral que ainda não foram compreendidos.

Palavras-chave: carcinoma epidermoide de cavidade oral, imuno-histoquímica, VEGF, PAI-1, CA-IX.

ABSTRACT

PETERLE, G.T. **Análise da expressão de proteínas da via de hipóxia em carcinoma epidermoide de cavidade oral: relação com o tabagismo, com as características clinicopatológicas e prognósticas**, 2014, 100f. Dissertação de Mestrado – Universidade Federal do Espírito Santo.

Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) is a significant cause of mortality and morbidity and is mainly related to the use of alcohol and tobacco. Some genetic markers of treatment response and clinical evolution have been identified for this carcinoma, such as HIF1 α , which promotes transcription of more than 100 genes involved in cell hypoxia response, among these: CA IX, PAI-1 and VEGF. In order to observe the influence of these proteins in tumor clinicopathological and prognostic features, as well as observe the activity of the constituents of tobacco in hypoxic mechanism, a semi-quantitative analysis of 52 patients with oral cancer was performed, by means of immunohistochemistry, being the statistical calculations and graphics performed by Epi Info[®] v3.4.3, 2007. The frequency of CA-IX positive expression confirmed the existence of biological differences between the negative and positive expressions of protein ($p=0.027$). Furthermore, the cytoplasmic positive expression showed a significant relationship with the occurrence of regional lymph node metastases ($p=0.025$) and CA-IX membrane negative expression was predominant in cases with intense inflammatory infiltrate ($p=0.044$). Regarding to the survival curves, the CA-IX weak and strong expression of membrane showed significance with respect to the Local Disease-Free Survival ($p=0.038$), whereas positive and negative cytoplasmic protein expressions were significant for Disease Specific Survival ($p=0.022$). Multivariate analysis confirmed the cytoplasmic CA-IX expression as a risk factor for the occurrence of disease specific death, with approximately 3-fold increased risk (HR=2.84, CI=1.02-7.87). The cytoplasmic expression level of PAI-1 showed significant correlation with the degree of tumor differentiation ($p=0.027$) and both the cytoplasmic expressions and positive membrane were associated with mild infiltration ($p=0.013$, $p=0.033$, respectively). Concerning to prognostic characteristics, PAI-1 positive and negative membrane expression showed a significant association with local relapse ($p=0.027$). Moreover,

multivariate analysis confirmed the PAI-1 positive membrane expression of as a risk factor for the occurrence of this recurrence, with approximately 14-fold increased risk (OR=14.4, CI=1.40-150.01). The degree of tumor differentiation was also significantly associated with VEGF negative and positive cytoplasmic expression ($p=0.035$) and a relationship between the presence of inflammatory infiltrate and the weak and strong positive expression of the protein ($p=0.038$) was observed. Finally, statistical significance between the smoking habit and the CA-IX, PAI-1 and VEGF expression of were not found, but, it is believed that this result was due to the composition of the work casuistry. Thus, the search for biomarkers for OSCC is a challenge which must be faced by research groups, in order to elucidate mechanisms of tumorigenesis that are not yet understood.

Keywords: oral squamous cell carcinoma, immunohistochemistry, VEGF, PAI-1, CA-IX.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Mecanismo de Hipóxia: (HRE): Elemento responsivo de hipóxia; (2-OG): 2-oxoglutarato; (ODDD, amarelo): C-Terminal Domínio de Degradação Oxigênio-Dependente; (C-TAD, laranja): C-Terminal Domínio de Ativação da Transcrição.....24
- Figura 2.** Atuação do Sistema Fibrinolítico.....30
- Figura 3.** Proteínas e processos envolvidos na regulação do pH em células tumorais: a conversão do CO₂ em bicarbonato é catalisada nas células tumorais pelas Anidrases Carbônicas IX e/ou XII, que são isoenzimas transmembranares e possuem um sítio extracelular ativo. Outras proteínas e processos envolvidos na regulação do pH são: (a) Transportador Monocarboxilato, (b) Canais de Na⁺-H⁺, (c) Canais ATP-dependentes Na⁺-K⁺, (d) Canais de H⁺, (e) Bombas de Prótons, (f) Aquaporinas e (g) Canais Trocadores de Ânions.....32
- Figuras 4 A-B.** Imuno-histoquímica: Marcações citoplasmáticas de VEGF em CEC oral. (A): Marcações citoplasmáticas. Aumento: 200x. (B): (CPFra): Citoplasmática positiva fraca, (CPFor): Citoplasmática positiva forte. Aumento: 400x.....48
- Figura 5 A-B.** Imuno-Histoquímica: Marcações citoplasmáticas e membranares de PAI-1 em CEC Oral. (A): Aumento: 200x. (B): Aumento: 400x.....49
- Figura 5 C-D.** Imuno-histoquímica: Marcações citoplasmáticas e membranares de PAI-1 em CEC oral. (C): Marcações citoplasmáticas: (CPFra): Citoplasmática positiva fraca, (CPFor): Citoplasmática positiva forte. (D): Marcações membranares: (MPFra): Membranar positiva fraca, (MPFor): Membranar positiva forte. Aumento: 400x.....50
- Figura 6 A-B.** Imuno-Histoquímica: Marcações citoplasmáticas e membranares de CA-IX em CEC Oral. Aumento: 100x.....51
- Figura 6 C-D.** Imuno-histoquímica: Marcações citoplasmáticas e membranares de CA-IX em CEC oral. (C): Marcações citoplasmáticas: (CPFra): Citoplasmática positiva fraca, (CPFor): Citoplasmática positiva forte. (D): Marcações membranares: (MPFra): Membranar positiva fraca, (MPFor): Membranar positiva forte. Aumento: 400x.....52
- Figura 7.** Sobrevida Livre de Doença (LD) para as expressões negativa e positiva de CA-IX citoplasmática em CEC oral.....76
- Figura 8.** Sobrevida Livre de Doença Local (LDL) para as expressões positiva fraca e positiva forte de CA-IX membranar em CEC oral.....77
- Figura 9.** Sobrevida Livre de Doença Local (LDL) para as expressões negativa e positiva de PAI-1 membranar em CEC oral.....78

Figura 10. Sobrevida Doença Específica (DE) para as expressões negativa e positiva de CA-IX citoplasmática em CEC oral.....79

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características epidemiológicas dos pacientes diagnosticados com CEC oral.....	36
Tabela 2. Características clínicas dos pacientes diagnosticados com CEC oral.....	37
Tabela 3. Características histopatológicas dos pacientes diagnosticados com CEC oral.....	38
Tabela 4. Características do tratamento e do prognóstico para os pacientes diagnosticados com CEC oral.....	39
Tabela 5. Expressão de VEGF, PAI-1 e CA-IX em CEC oral.....	47
Tabela 6. Expressões negativa, positiva fraca e positiva forte das proteínas CA-IX, PAI-1 e VEGF em amostras tumorais de CEC oral e a relação com o hábito tabagista.....	53
Tabela 7. Expressões negativa e positiva, fraca e forte das proteínas CA-IX, PAI-1 e VEGF em amostras tumorais de CEC oral e a relação com o hábito tabagista.....	54
Tabela 8. Correlações entre as expressões citoplasmática e membranar, negativa, positiva fraca e positiva forte das proteínas CA-IX e PAI-1 em amostras tumorais de CEC oral.....	55
Tabela 9. Correlações entre as expressões citoplasmática e membranar, negativa e positiva, fraca e forte das proteínas CA-IX e PAI-1 em amostras tumorais de CEC oral.....	56
Tabela 10. Análise das expressões negativa e positiva, fraca e forte de CA-IX citoplasmática e as correlações com as características clinicopatológicas em pacientes com CEC oral.....	58
Tabela 11. Análise multivariada das expressões negativa e positiva de CA-IX citoplasmática, do tamanho do tumor e do risco para a ocorrência de linfonodos acometidos.....	59
Tabela 12. Análise das expressões negativa e positiva, fraca e forte de CA-IX membranar e as correlações com as características clinicopatológicas em pacientes com CEC oral.....	60
Tabela 13. Análise das expressões negativa e positiva, fraca e forte de PAI-1 citoplasmática e as correlações com as características clinicopatológicas em pacientes com CEC oral.....	62

Tabela 14. Análise das expressões negativa e positiva, fraca e forte de PAI-1 membranar e as correlações com as características clinicopatológicas em pacientes com CEC oral.....	64
Tabela 15. Análise das expressões negativa e positiva, fraca e forte de VEGF citoplasmática e as correlações com as características clinicopatológicas em pacientes com CEC oral.....	66
Tabela 16. Análise das expressões negativa e positiva, fraca e forte de CA-IX citoplasmática em pacientes com CEC oral e as correlações com o prognóstico.....	68
Tabela 17. Análise das expressões negativa e positiva, fraca e forte de CA-IX membranar em pacientes com CEC oral e as correlações com o prognóstico.....	70
Tabela 18. Análise das expressões negativa e positiva, fraca e forte de PAI-1 citoplasmática em pacientes com CEC oral e as correlações com o prognóstico.....	71
Tabela 19. Análise das expressões negativa e positiva, fraca e forte de PAI-1 membranar em pacientes com CEC oral e as correlações com o prognóstico.....	73
Tabela 20. Análise multivariada das expressões negativa e positiva de CA-IX membranar, PAI-1 membranar, do tratamento radioterápico e do risco para ocorrência de recidiva local.....	74
Tabela 21. Análise das expressões negativa e positiva, fraca e forte de VEGF citoplasmática em pacientes com CEC oral e as correlações com o prognóstico.....	75
Tabela 22. Análise multivariada das expressões citoplasmáticas e membranares de CA-IX, do tamanho do tumor, do tratamento radioterápico e das sobrevidas livre de doença local e doença específica.....	80

LISTA DE SIGLAS

CA - Anidrase Carbônica

CEC Oral - Carcinoma Epidermoide de Cavidade Oral

CECP - Carcinoma Epidermoide de Cabeça e Pescoço

DAB - Diaminobenzidina

DE - Sobrevida Doença Específica

DPX - *p*-xylene-bis (N-pyridinium bromide)

EBV - Vírus Epstein-Barr

FIH - Fator Inibidor de HIF

GENCAPO - Head and Neck Genome Project

HIF-1 - Transcricional Hypoxia-Inducible Factor-1

HPV - Papilomavírus Humano

HR - Hazard Ratio

IC - Intervalo de Confiança

IL-8 - Interleucina-8

INCA - Instituto Nacional do Câncer

JAK/STAT - Proteína Janus Kinase/Transdutores de sinais e ativadores de transcrição

LD - Sobrevida Livre de Doença

LDL - Sobrevida Livre de Doença Local

LRP-1 - Proteína-1 relacionada ao Receptor de Lipoproteína de Baixa Densidade

MAP quinases - Proteínas quinases ativadas por mitógenos

nAChR - Receptor Nicotínico Acetilcolínico

NRP - Neuropilinas

OR - Odds Ratio

PAI-1 - Inibidor do Plasminogênio Ativador

PBS - Tampão Fosfato de Sódio

PHDs - Prolil Hidroxilases

P1GF - Fator de Crescimento Placentário

ROS - Espécies Reativas de Oxigênio

TNM - Estadiamento de Tumores Malignos

TRIS - Tris-(Hidroximetil)-Aminometano

uPA - Plasminogênio Ativador

uPAR - Receptor do Plasminogênio Ativador

VEGF - Fator de Crescimento Endotelial Vascular

VEGFR - Receptor do Fator de Crescimento Endotelial Vascular

VHL - von Hippel-Lindau

VPF - Fator de Permeabilidade Vascular

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	19
1.1. Carcinoma Epidermoide de Cabeça e Pescoço e a Cavidade Oral	19
1.2. Hipóxia e Tabagismo	22
1.3. Hipóxia, Angiogênese e Metástase	26
1.4. Hipóxia e Regulação do pH	30
2. OBJETIVOS	34
2.1. Objetivo Geral	34
2.2. Objetivos Específicos	34
3. METODOLOGIA	35
3.1. Ética	35
3.2. Seleção da Casuística	35
3.3. Imuno-Histoquímica	39
3.3.1. Confeção das Lâminas	40
3.3.2. Reação de Imuno-Histoquímica para VEGF	40
3.3.3. Reações de Imuno-Histoquímica para PAI-1 e CA-IX	42
3.4. Análise Semi-Quantitativa	44
3.5. Análise Estatística	46
4. RESULTADOS	47
4.1. Expressão de VEGF, PAI-1 e CA-IX em CEC Oral	47
4.2. Expressão de VEGF, PAI-1 e CA-IX e a Relação com o Tabagismo	53

4.3. Expressões Citoplasmáticas e Membranares de CA-IX e PAI-1	55
4.4. Características Clínicas e Patológicas.....	56
4.5. Prognóstico	67
4.6. Sobrevidas.....	76
5. DISCUSSÃO	81
6. CONCLUSÕES.....	89
7. REFERÊNCIAS	91
8. APÊNDICES	98

1. INTRODUÇÃO

1.1. Carcinoma Epidermoide de Cabeça e Pescoço e a Cavidade Oral

O carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (CECP) é o sexto tipo de câncer mais frequente, está associado a elevadas taxas de morbidade e mortalidade e a última estimativa mundial apontou uma incidência anual de 600 mil novos casos e 300 mil óbitos decorrentes da doença (SAMAN, 2012). O CECP ocorre, principalmente, no sudeste da Ásia, nas regiões centrais e no sudoeste da Europa, especialmente na Espanha e na França, e no Brasil. A América do Norte e o norte da Europa ocupam uma posição intermediária na distribuição geográfica desse carcinoma; já o Japão, a China e o oeste Africano apresentam proporções baixas de distribuição da doença (MONSJOU et al., 2013).

A epidemiologia dos tumores de cabeça e pescoço é extremamente complexa, devido à natureza multigênica da doença e aos fatores individuais de suscetibilidade genética, estilo de vida e ao grande número de agentes ambientais potenciais aos quais os indivíduos estão expostos. Assim, a diversidade de fatores relacionados com a gênese do CECP apoia a hipótese de doença multifatorial (HAN et al., 2010).

As características clínicas do CECP na população brasileira estão relacionadas, principalmente, a um maior consumo de álcool e tabaco: Estudos indicam que o hábito de fumar e de beber estabelece um sinergismo entre esses dois fatores, aumentando em 30 vezes o risco para o desenvolvimento desse carcinoma. Uma razão potencial para isto pode ser o fato do álcool agir como um solvente para os carcinógenos presentes no tabaco (FERREIRA; ROCHA, 2010). O tabaco sozinho é responsável por cerca de 42% dos óbitos e o risco de desenvolvimento de CECP é de cinco a nove vezes maior em tabagistas do que em não tabagistas, mantendo relação direta com a quantidade consumida. Já o etilismo pesado corresponde a aproximadamente 16% dos óbitos (INCA, 2014).

Acreditava-se que o tabaco processado continha, aproximadamente, 4700 substâncias tóxicas. Hoje, a estimativa é de mais de 7000 substâncias tóxicas e uma quantidade significativa dessas são carcinogênicas. No organismo, as substâncias carcinogênicas são convertidas em metabólitos reativos capazes de interagir com o DNA pela ação das enzimas oxidativas. Em relação ao álcool, este pode ocasionar deficiências nutricionais e supressão imunológica, além de agir como solvente e facilitar a penetração dos carcinógenos nos tecidos-alvos (SINGH et al., 2011).

Além do consumo do tabaco e do álcool, radiações, deficiências nutricionais, infecções virais e fatores ocupacionais também estão relacionados com a etiologia do CECP:

Estudos epidemiológicos relatam que o consumo de frutas e vegetais ricos em vitaminas A e C e beta caroteno estão inversamente relacionados ao risco de câncer oral, enquanto a carne salgada e a pimenta vermelha são consideradas fatores de risco (FERREIRA; ROCHA, 2010).

Entre os vírus, o Epstein-Barr (EBV) e o Papilomavírus Humano (HPV) têm sido relacionados ao desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço. O vírus EBV está associado com carcinoma de nasofaringe, especificamente dos tipos II (não queratinizado) e III (não diferenciado), os quais são prevalentes em áreas endêmicas do norte da Ásia e África. O vírus HPV também exerce um importante papel na patogênese do CECP e sua prevalência varia de acordo com o sítio tumoral, sendo mais comumente localizado na orofaringe e menos frequente em carcinoma epidermoide de cavidade oral, língua, hipofaringe e laringe (GILLISON et al., 2012; KUNDU, NESTOR, 2012; HO et al., 2013).

O CECP ocorre mais frequentemente entre a quinta e a sétima décadas de vida e no Brasil, a um risco estimado de 10 novos casos a cada 100 mil homens e 4 a cada 100 mil mulheres (INCA, 2014). Apesar dos avanços das técnicas cirúrgicas e de novas abordagens terapêuticas, a sobrevida média dos pacientes em estadios avançados da doença não tem aumentado substancialmente nas últimas décadas. Pacientes portadores de CECP geralmente apresentam um padrão clínico heterogêneo e um prognóstico ruim nos estadios mais avançados. Enquanto o

tratamento do tumor primário e da metástase regional permite um aumento da sobrevida, mais de 50% dos pacientes desenvolvem, em um período de cinco anos, recorrência da lesão primária ou metástases. Assim, o tamanho do tumor primário, a presença de metástase em linfonodos cervicais, margens positivas após excisão cirúrgica e invasão perineural têm sido indicadores confiáveis de uma pior evolução clínica em pacientes com CECP (FERREIRA; ROCHA, 2010).

A taxa de sobrevida referente ao carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço, em um período de 5 anos, é de 50% e o tratamento é baseado em radioterapia, em combinação com cirurgia e/ou fármacos citostáticos. No entanto, a resistência a esses tratamentos, bem como a recidiva, como já foi mencionado, são frequentes nesse carcinoma (FARNEBO et al., 2013; HSU et al., 2014).

Embora considerados como uma única entidade histopatológica, os carcinomas epidermoides de cabeça e pescoço são distintos quanto ao padrão de crescimento, comportamento clínico e prognóstico. Tumores de cavidade oral, geralmente, são mais diferenciados do que os carcinomas de orofaringe. Além disso, tumores de orofaringe têm maior tendência a gerar metástases, em contraste com os carcinomas de cavidade oral e da laringe. Em particular, os tumores de hipofaringe são geralmente mais agressivos do que os tumores localizados em outros sítios anatômicos de cabeça e pescoço (FERREIRA; ROCHA, 2010).

As seguintes localizações anatômicas estão incluídas na classificação de tumores de cabeça e pescoço: lábio, cavidade oral, orofaringe, nasofaringe, hipofaringe, laringe, seios maxilares, cavidade nasal, seios etmoidais, glândulas salivares e glândula tireoide (UICC, 2009). Em relação às partes que compõem a cavidade oral, elas são divididas em:

1 Mucosa oral:

- Mucosa do lábio superior e inferior;
- Mucosa da bochecha;
- Áreas retromolares;
- Sulcos buco-alveolares: superior e inferior;

2 Gengiva e alvéolos superiores;

- 3 Gengiva e alvéolos inferiores;
- 4 Palato duro;
- 5 Língua:
 - Superfície dorsal e bordas laterais anteriores às papilas valadas;
 - Superfície ventral;
- 6 Assoalho de boca (UICC, 2009).

O carcinoma epidermoide de cavidade oral (CEC oral) é o mais frequente tipo de câncer da área da cabeça e do pescoço e acomete, principalmente, as regiões do epitélio de revestimento dos tecidos. O CEC oral ocorre principalmente na língua e no assoalho de boca e estas áreas representam 90% das que são afetadas por esse carcinoma. Além disso, o CEC oral é conhecido por apresentar baixas taxas de sobrevida e prognósticos ruins (NOGUTI et al., 2012; DORSEY; AGULNIK, 2013).

1.2. Hipóxia e Tabagismo

A maioria das alterações genéticas importantes no desenvolvimento do câncer ocorre nos genes que controlam a proliferação celular, mas apesar disto, outros estão diferencialmente expressos entre tumores sólidos e tecidos normais como, por exemplo, os de hipóxia. A proteção contra hipóxia em tumores é um passo importante no desenvolvimento e na progressão tumoral, com ativação do complexo transcripcional hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1), que sob as condições de depleção de oxigênio promove a transcrição de mais de 100 genes que atuam em mecanismos específicos para evitar a morte celular (KOH et al., 2010).

O complexo HIF-1 é um fator de transcrição composto por uma subunidade - alpha e uma subunidade - beta, sob condições de hipóxia, a subunidade HIF1 α é estabilizada e translocada do citoplasma para o núcleo, onde dimeriza com a subunidade HIF1 β , formando o complexo HIF-1 transcricionalmente ativo, que se associa com coativadores transcripcionais e promove a expressão de genes envolvidos em processos do metabolismo celular, angiogênese, metástase,

apoptose, dentre outros protagonistas da adaptação à baixa oxigenação (STOLZE et al., 2006)

Sob condições de normóxia, a HIF1 α é constantemente sintetizada, mas é rapidamente degradada após sofrer modificação pós-traducional pelas prolin hidroxilases (PHDs). A hidroxilação da prolina na HIF1 α resulta na ligação da proteína von Hippel-Lindau (VHL) e consequente ubiquitinação e degradação proteossomal. Como a hidroxilação da prolina é dependente dos níveis de oxigênio, as cadeias α de HIF em condições de hipóxia deixam de ser hidroxiladas e se tornam estáveis e ativas para interagirem com as cadeias β , que apresentam expressão constitutiva. A atividade da HIF1 α é também controlada através da hidroxilação de um resíduo de asparagina pelo fator inibidor de HIF (FIH), que previne a interação de HIF1 α com seu coativador de transcrição p300/CBP. Tanto a PHD3 como a FIH requerem oxigênio e α -cetogluturato como substratos e ferro e ascorbato como cofatores das reações (Figura 1) (STOLZE et al., 2006; RANKIN; GIACCIA, 2008).

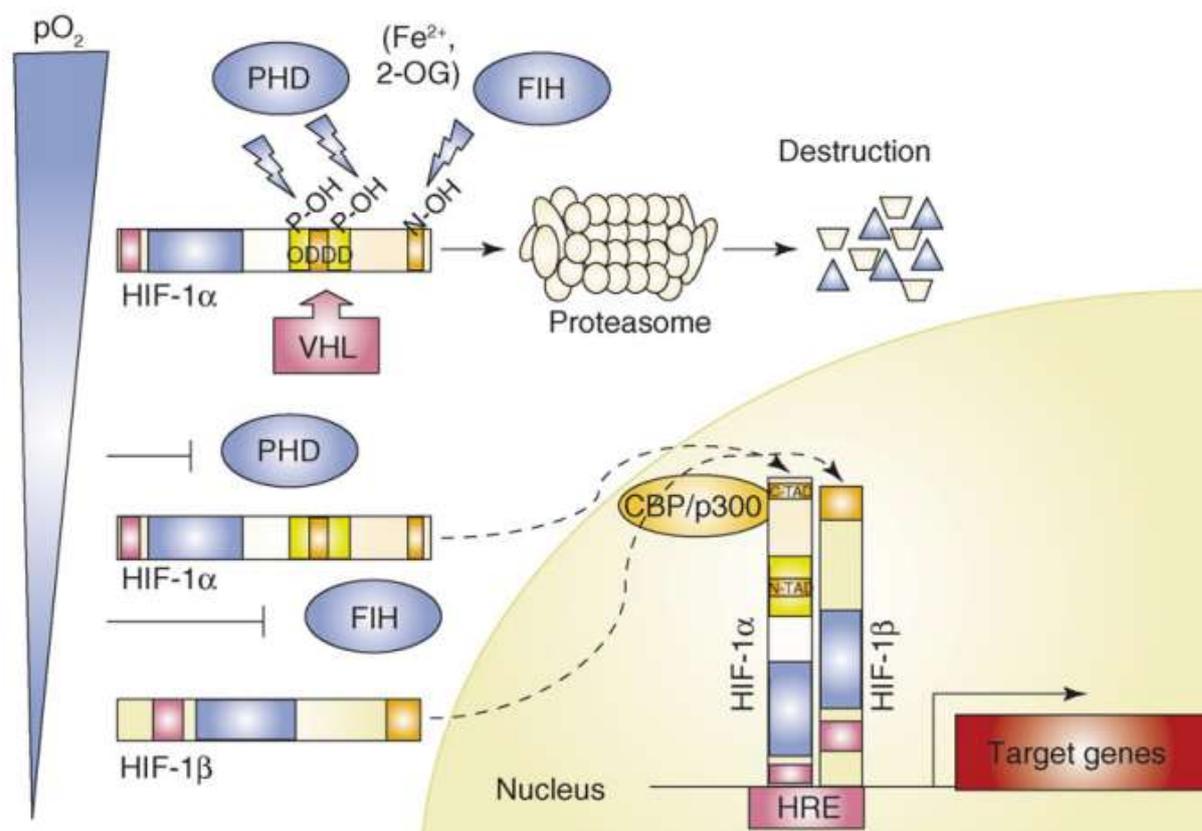


Figura 1. Mecanismo de Hipóxia: (HRE): Elemento responsivo de hipóxia; (2-OG): 2-oxoglutarato; (ODDD, amarelo): C-Terminal Domínio de Degradação Oxigênio-Dependente; (C-TAD, laranja): C-Terminal Domínio de Ativação da Transcrição. Fonte: BRAHIMI-HORN et al., 2007.

O nível intracelular de HIF1 α é regulado pela estabilidade da proteína, pela inativação de supressores tumorais, pela ativação de oncogenes, por alterações genéticas, incluindo mutações no gene VHL, por fatores de crescimento, hormônios, espécies reativas de oxigênio (ROS), citocinas produzidas pelas células tumorais e pelas células do estroma (STOLZE et al., 2006).

A hipóxia é encontrada em diferentes graus na maioria dos tumores sólidos, que contêm regiões hipóxicas devido a alterações estruturais ou quantitativas nos vasos. No carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço, hipóxia e densidade vascular reduzida estão relacionadas a um pior prognóstico e são responsáveis pela resistência à quimioterapia e radioterapia (SCHÖDER et al., 2009). Células hipóxicas requerem de 2,5-3 vezes a dose de radiação para produzirem o mesmo nível de apoptose do que as células óxicas. Além disso, células que sobrevivem ao severo estresse hipóxico adquirem resistência a diversas alterações fisiológicas e

não fisiológicas, incluindo radioterapia e quimioterapia (SALNIKOW; ZHITKOVICH, 2008).

A resposta das células à condição de hipóxia é caracterizada por alterações específicas na expressão de um grande número de genes, mas também pode ser induzida por metais, como o cobalto e o níquel. Estes mimetizam uma situação de hipóxia através da regulação da proteína HIF1 α , por inibição da PHD3 e do FIH (STIEHL et al., 2006), que fazem parte da família dioxigenases de Fe(II)-e-2-oxoglutarato-dependentes (SALNIKOW; ZHITKOVICH, 2008; CHEN; COSTA, 2009). Uma das mudanças mais importantes nas células após exposição ao cobalto e ao níquel é o acúmulo de HIF1 α , culminando na expressão dos mais de 100 genes envolvidos na via de hipóxia (SALNIKOW; ZHITKOVICH, 2008).

As dioxigenases de Fe(II)-e-2-oxoglutarato-dependentes têm sensibilidade semelhante à inibição por cobalto e níquel, por utilizarem um mecanismo semelhante para ligar o cofator ferro em seu núcleo catalítico (CHEN et al. 2006). Estima-se que a constante de afinidade do Co (II) e Ni (II) pelo núcleo catalítico das dioxigenases é pelo menos três vezes maior do que a do Fe (II) (DAVIDSON et al. 2006). Como nas células não há nenhum mecanismo conhecido para defesa contra íons desses metais, eles entram nas células e têm acesso irrestrito aos sítios de ligação de ferro das dioxigenases, causando inibição funcional dessa família de enzimas (CHEN; COSTA, 2009).

A exposição individual ao cobalto e ao níquel depende, principalmente, da ocupação profissional, como no caso dos trabalhadores da mineração desses metais, mas também pode ser decorrente do uso do tabaco, que contém mais de 7000 substâncias tóxicas e uma boa parte destas são carcinogênicas (SINGH et al., 2011). Além disso, a liberação do Co (II) e Ni (II) no meio ambiente representa um potencial de exposição não-ocupacional (DENKHAUS et al., 2002) e as rotas para a absorção incluem inalação, ingestão e penetração cutânea (SIVULKA et al., 2005).

Das mais de 7000 substâncias que compõem o tabaco, a nicotina possui a capacidade de penetrar em todos os tecidos do organismo e de se ligar ao Receptor Nicotínico Acetilcolínico (nAChR), presente tanto em tecidos tumorais como em não

tumorais. A ligação da nicotina ao seu receptor em tecidos tumorais leva a uma ampla ativação de vários oncogenes, resultando no aumento da proliferação celular, angiogênese, invasão dos tecidos adjacentes, metástase e diminuição da apoptose (SINGH et al., 2011). Em paralelo, a administração de nicotina *in vitro* mostrou uma diminuição dos efeitos citotóxicos da radioterapia e da quimioterapia nas células tumorais (XIN; DENG, 2005). Além disso, estudos também revelaram que a administração de nicotina aumenta os níveis intracelulares de HIF1 α de forma reversível e por consequência ocorre diminuição das respostas terapêuticas (BRAHIMI-HORN; POUYSSEGUR, 2009; WARREN et al., 2012).

As substâncias encontradas no tabaco pertencem, principalmente, a três grupos: hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, aminas aromáticas e nitrosaminas, sendo que as últimas estão estritamente relacionadas com a nicotina. Esta também ativa os macrófagos, que liberam a enzima aril-hidroxilase-hidrocarboneto e decompõem nitrosaminas, aminas aromáticas e hidrocarbonetos aromáticos policíclicos em metabólitos chamados epóxidos, que produzem adutos de DNA, com elevado potencial mutagênico e cancerígeno (ROSEMBERG, 2002).

1.3. Hipóxia, Angiogênese e Metástase

Em essência, o processo de angiogênese pode ser definido como uma resposta do organismo à falta de oxigênio nos tecidos, podendo ocorrer em diversas situações, fisiológicas ou patológicas, do desenvolvimento embrionário ao crescimento tumoral (FERREIRA; ROCHA, 2010).

Em condições de hipóxia, as células respondem produzindo fatores de crescimento (VEGF – fator de crescimento endotelial vascular) e citocinas (IL-8) que sinalizam às células endoteliais para saírem de seu estado basal, se desprenderem da parede do vaso e iniciarem um processo de migração para a produção de novos vasos sanguíneos. Este é um processo coordenado, em que apenas algumas células endoteliais respondem ao estímulo de VEGF; se todas as células respondessem simultaneamente, haveria um colapso local do vaso sanguíneo com possíveis danos

ao tecido. Dois subtipos de células endoteliais respondem ao estímulo por VEGF e coordenam o processo migratório: as células endoteliais de ponta (*tip cells*), responsáveis pela organização do processo angiogênico, e as células endoteliais que seguem as células de ponta (*stalk cells*). O processo de migração das células endoteliais termina quando ramificações migrando de lados opostos encontram-se, através das células *tip*, reestabelecendo o fluxo sanguíneo, a homeostase no tecido e o estado quiescente das células endoteliais (HSU et al., 2014).

O fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) é considerada a molécula mais importante na formação de novos vasos sanguíneos, dando início e modulando todas as etapas desse processo. Também conhecido como fator de permeabilidade vascular (VPF) ou VEGF-A, este fator pertence a uma família multigênica composta por outros quatro membros: VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, P1GF (fator de crescimento placentário). Essa proteína é essencial para o crescimento, migração e sobrevivência de células endoteliais, assim como para a morfogênese de vasos sanguíneos, seja por vasculogênese ou por angiogênese (CARMELIET; JAIN, 2011).

O VEGF e os membros de sua família se ligam, de forma diferenciada e seletiva, a três receptores tirosina-quinase (VEGFR-1, -2 e -3) e as neuropilinas (NRP-1 e NRP-2), sendo que a atividade da proteína VEGF é mediada, principalmente, pela ligação ao receptor VEGFR-2, o que promove a autofosforilação do domínio tirosina-quinase do receptor e a consequente ativação de diversas cascatas de sinalizações intracelulares, que estão envolvidas na proliferação e diferenciação das células endoteliais (CARMELIET; JAIN, 2011).

A angiogênese é também um fator importante na formação de metástases, pois sem o devido suprimento de oxigênio e nutrientes, as células tumorais não podem colonizar o tecido invadido, morrendo antes de formar um novo tumor. Curiosamente, a mesma matriz extracelular que provê às células tumorais proteínas necessárias para a sustentação, sobrevivência e crescimento tumoral, contém diversas proteínas e fragmentos proteicos com propriedades antiangiogênicas, como angiostatina e endostatina, constituindo-se também numa barreira importante para a formação de novos tumores. As células tumorais que sobrevivem às etapas

anteriores e atingem novos sítios metastáticos, são outra vez selecionadas, de acordo com seu potencial angiogênico. E novamente o VEGF é um fator essencial nesse processo, estimulando não apenas o crescimento de novos vasos, mas também de células tumorais, que frequentemente expressam receptor para esse fator (KISHIMOTO et al., 2012).

O processo metastático é complexo. Para colonizar com sucesso outros órgãos e tecidos, as células tumorais devem passar por uma série de transformações que tipicamente incluem a separação do tumor primário, a invasão do tecido adjacente (incluindo a membrana basal e a matriz extracelular), a entrada e sobrevivência no sistema circulatório, linfático ou cavidade peritoneal, até a chegada ao sítio de colonização. Todas estas etapas devem ser superadas ao mesmo tempo em que as células tumorais se adaptam ao novo ambiente do tecido alvo, induzem a formação de novos vasos sanguíneos, proliferam e escapam da morte por apoptose ou pelo ataque do sistema imunológico (SCHOOTBRUGGE et al., 2013).

Compreender as etapas do processo metastático é fundamental para a intervenção clínica e o controle do câncer. Pacientes que apresentam tumor localizado têm melhor prognóstico comparado aos pacientes que apresentam tumores em processos metastáticos. Infelizmente, estima-se que entre 60% e 70% dos pacientes já iniciaram o processo metastático no momento do diagnóstico da presença de algum tipo de tumor. E, numa outra linha de pensamento, propõe-se que o crescimento do tumor principal ocorre em paralelo com o surgimento e crescimento das metástases (FERREIRA; ROCHA, 2010). Portanto, é imperativo compreender as etapas e os elementos do processo metastático, com o intuito de diagnosticar e prevenir a origem de tal evento, o que traz consequências positivas para a sobrevivência dos pacientes.

Uma das etapas primordiais no processo de metástase é a fibrinólise, que é definida como a degradação da fibrina mediada pela plasmina. O sistema fibrinolítico, representado pelo receptor celular da uroquinase (uPAR), pela uroquinase (uPA) e pelo inibidor do plasminogênio ativador (PAI-1), apresenta clara relação com a tumorigênese, por atuar na degradação da matriz extracelular e por influenciar na proliferação, na migração, invasão e adesão das células tumorais, além de estar

envolvido nos processos de angiogênese e apoptose. No sangue, este sistema é responsável pela degradação da fibrina e por manter a integridade vascular (GIACOIA et al., 2014).

Na figura 2 é apresentado o mecanismo de ação do sistema fibrinolítico: A uPA se liga ao seu receptor e após esta ligação, o zimogênio é convertido em uma protease ativa (plasmina). A plasmina, por sua vez, pode degradar a matriz extracelular ou ativar outras proteínas, por exemplo, metaloproteases, fatores de crescimento, fatores angiogênicos. Após a ligação do PAI-1 ao complexo uPA/uPAR, este é inativado e se liga a proteína LRP-1 (Proteína-1 relacionada ao Receptor de Lipoproteína de Baixa Densidade). Em seguida, ocorre a internalização das proteínas, seguida pela degradação lisossomal da uPA e do PAI-1 e pela reciclagem da uPAR e da LRP-1, que voltam à membrana citoplasmática (BINDER; MIHALY, 2008; DASS et al., 2008).

O PAI-1 é uma proteína que pertence à superfamília das Serpinas e é encontrado no núcleo, no citoplasma e membrana externa de células tumorais e endoteliais, predominantemente. As serpinas são conhecidas por sofrerem um rearranjo conformacional após a clivagem da ligação peptídica central reativa (P_1-P_1') e é esta diferença conformacional, entre as formas ativas e clivadas, que determina a reatividade das proteínas (BINDER; MIHALY, 2008).

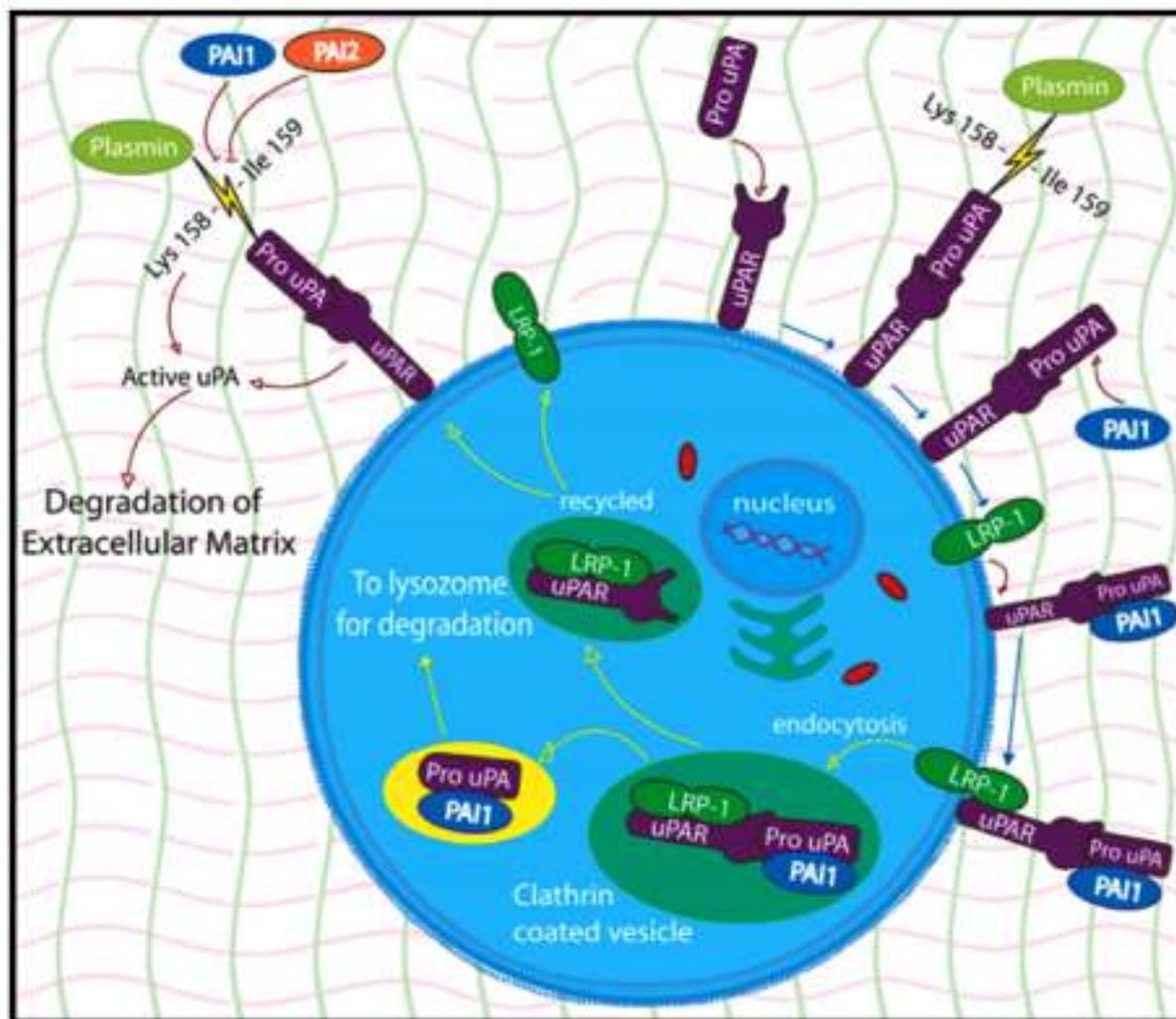


Figura 2. Atuação do Sistema Fibrinolítico. Fonte: DASS et al., 2008.

1.4. Hipóxia e Regulação do pH

As anidrases carbônicas (CAs) são metaloenzimas presentes tanto em procaríotos como eucaríotos. Em mamíferos, 16 isoenzimas α -CAs foram descritas e estas possuem atividades catalíticas, localizações celulares e distribuições teciduais diferenciadas. Além disso, as α -CAs apresentam íon de zinco (Zn^{2+}) em seus sítios ativos e esse metal é essencial para o bom funcionamento dessas proteínas (AGGARWAL et al., 2013).

O dióxido de carbono (CO_2) é encontrado em todos os organismos vivos em equilíbrio com o bicarbonato (HCO_3^-). Este é insolúvel nas membranas lipídicas e

precisa ser transportado, enquanto o CO_2 transita livremente do meio intracelular para o extracelular, e vice-versa. Para catalisar as reações reversíveis de hidratação do CO_2 e desidratação do bicarbonato, as anidrases carbônicas são expressas pelas células e desempenham um papel primordial na regulação do pH intra e extracelular, sendo que os tecidos normais apresentam valores de pH que giram em torno de 7,4 e nos tecidos tumorais esse valor cai para, aproximadamente, 6 (HASSAN et al., 2013).

Como já foi mencionado, o mecanismo de hipóxia regula a expressão de diversos genes e um destes é a CA-IX, que é encontrada em níveis elevados nos tecidos tumorais e apresenta, principalmente, localização membranar, com um domínio catalítico, com um grande domínio extracelular na porção N-terminal e com uma pequena cauda intracelular, decorrente da extensão da porção C-terminal. O domínio catalítico da proteína exibe elevada atividade nas reações de hidratação do CO_2 , o extracelular está relacionado com a adesão das células tumorais e a pequena extensão intracelular ainda não teve suas funções totalmente elucidadas, mas estudos apontam para a participação em processos de fosforilação (HULIKOVA et al., 2009; AGGARWAL et al., 2013).

Uma das consequências do processo de hipóxia é o desequilíbrio do pH: As células tumorais diminuem seu pH por meio da produção do ácido láctico ou pela hidratação do CO_2 , reação catalisada pela CA-IX, que culmina na geração do íon bicarbonato e na liberação de H^+ para o meio (Figura 3). A diminuição do pH está relacionada com a tumorigênese, com rearranjos cromossômicos, desagregação da matriz extracelular, migração e invasão, com a expressão de fatores de crescimento e com a ativação de proteases. Já o bicarbonato é usado como substrato no crescimento celular e na síntese de pirimidinas (SUPURAN, 2008).

Por fim, a CA-IX também atua na adesão, proliferação e na diferenciação celular, no transporte de íons e como já foi mencionado, na regulação do pH: estudos mostram que a expressão constitutiva da CA-IX está relacionada com a manutenção de um menor pH extracelular (HASSAN et al., 2013).

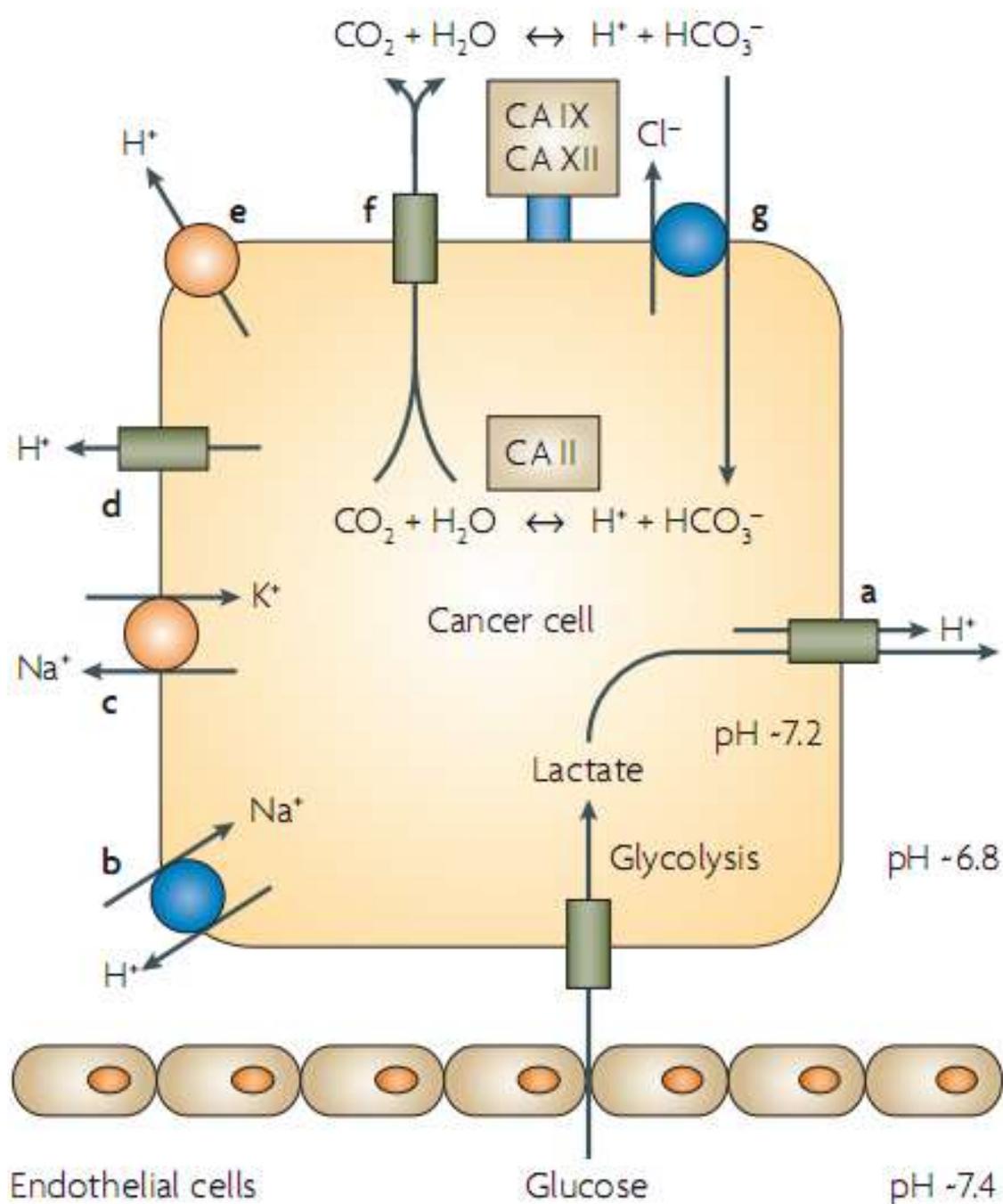


Figura 3. Proteínas e processos envolvidos na regulação do pH em células tumorais: a conversão do CO_2 em bicarbonato é catalisada nas células tumorais pelas Anidrases Carbônicas IX e/ou XII, que são isoenzimas transmembranares e possuem um sítio extracelular ativo. Outras proteínas e processos envolvidos na regulação do pH são: (a) Transportador Monocarboxilato, (b) Canais de $\text{Na}^+ - \text{H}^+$, (c) Canais ATP-dependentes $\text{Na}^+ - \text{K}^+$, (d) Canais de H^+ , (e) Bombas de Prótons, (f) Aquaporinas e (g) Canais Trocadores de Ânions. Fonte: SUPURAN, 2008.

Convencionalmente, tanto a análise como a classificação histopatológica dos tumores são feitas através de técnicas de microscopia óptica e imuno-histoquímica. Diferentes ensaios são necessários para tal classificação e o conhecimento sobre a perda da expressão ou superexpressão de uma determinada proteína pode ser decisivo para se avaliar a evolução clínica de um paciente, ou mesmo a conduta terapêutica a ser tomada. Entretanto, existem muitos casos nos quais os marcadores tumorais disponíveis são insuficientes para distinguir tumores histopatologicamente semelhantes e que possuem evolução clínica e resposta ao tratamento diferentes e poucos marcadores preditivos foram identificados em CEC oral. Em vista do que foi exposto, a busca de biomarcadores para esse carcinoma é um desafio que deve ser assumido por grupos de pesquisas que trabalham com a doença, com o intuito de melhorar a qualidade de vida dos pacientes e elucidar mecanismos da gênese tumoral que ainda não foram compreendidos.

2. OBJETIVOS

2.1. Objetivo Geral

Analisar as expressões das proteínas VEGF, PAI-1 e CA-IX em pacientes com carcinoma epidermoide de cavidade oral, por meio de imuno-histoquímica e estabelecer as relações existentes com o hábito tabagista, com as características clinicopatológicas e com o prognóstico.

2.2. Objetivos Específicos

- Analisar as expressões das proteínas VEGF, PAI-1 e CA-IX em amostras parafinizadas de CEC oral;
- Determinar as relações existentes entre o hábito tabagista e as expressões das proteínas VEGF, PAI-1 e CA-IX em CEC oral;
- Analisar as correlações entre as expressões citoplasmáticas e membranares das proteínas PAI-1 e CA-IX em CEC oral;
- Analisar as correlações entre as expressões das proteínas VEGF, PAI-1 e CA-IX com algumas características clinicopatológicas e com o prognóstico de pacientes diagnosticados com CEC oral;
- Estabelecer curvas de Sobrevida Livre de Doença (LD), Sobrevida Livre de Doença Local (LDL) e Sobrevida Doença Específica (DE) para as variáveis categóricas estudadas.

3. METODOLOGIA

3.1. Ética

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Heliópolis, São Paulo, sob o registro 818, referente ao projeto “Análise da expressão gênica em indivíduos com carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço e células em cultura: relação com o tabagismo” (Apêndice A).

3.2. Seleção da Casuística

Obtiveram-se as amostras do Head and Neck Genome Project (GENCAPO), um grupo multi-institucional e multidisciplinar, que desde 2001 coleta rotineiramente dados clínicos e epidemiológicos, além de amostras tumorais e de sangue de pacientes diagnosticados com CECP, provenientes de cinco instituições: Instituto Arnaldo Vieira de Carvalho de São Paulo, Hospital Heliópolis de São Paulo, Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo, Universidade do Vale do Paraíba de São José dos Campos e Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo/Ribeirão Preto.

A partir do banco de dados do GENCAPO, 52 pacientes com carcinoma epidermoide de cavidade oral, tabagistas e não tabagistas, foram selecionados para o estudo, sendo excluídos os submetidos à quimioterapia, os que apresentaram metástases à distância, os que não tiveram linfonodos cervicais removidos, os positivos para margens cirúrgicas e os que apresentaram carcinoma de lábio. Todos os pacientes selecionados foram operados e o acompanhamento clínico seguiu-se por 48 meses após a cirurgia.

Obtiveram-se as características clínicas e histopatológicas por meio do exame anatomopatológico. Para tanto, os tumores foram avaliados por patologistas das

instituições pertencentes ao GENCAPO e classificados de acordo com os critérios de Estadiamento de Tumores Malignos (TNM) (UICC, 2009).

A casuística deste trabalho é composta por 52 pacientes, sendo 16 (30,8%) do sexo masculino e 36 (69,2%) do sexo feminino. Destes, 21(40,4%) são tabagistas e 31(59,6%) não fumam a um ano completo. Além disso, nesta casuística 19 (36,5%) são etilistas e 33 (63,5%) não; 17 (32,7%) apresentam sessenta anos ou menos e 35 (67,3%) têm mais de sessenta anos. A média da faixa etária é de 64,23 anos, com um desvio padrão de $\pm 13,93$ (Tabela 1).

Tabela 1. Características epidemiológicas dos pacientes diagnosticados com CEC oral.

Características epidemiológicas	Casos	
	No.	(%)
Gênero		
Feminino	36	69,2
Masculino	16	30,8
Faixa etária, anos		
média 64,23 / desvio padrão $\pm 13,93$		
≤ 60 anos	17	32,7
> 60 anos	35	67,3
Hábito tabagista		
Não	31	59,6
Sim	21	40,4
Hábito etilista		
Não	33	63,5
Sim	19	36,5
Total	52	100,0

As características clínicas dos pacientes diagnosticados com CEC oral e que compõem esta casuística estão descritas na Tabela 2. Há quatro classificações para o estadiamento dos tumores e neste trabalho, 16 (30,8%) pacientes se enquadram no estágio I, 13 (25%) no estágio II, 6 (11,5%) no estágio III e 17 (32,7%) no estágio IV. A classificação histopatológica pós-cirúrgica, designada pTNM, diferencia quatro classes para o tamanho do tumor (pT1, pT2, pT3, pT4). Neste trabalho, 29 (55,8%) pacientes foram classificados como pT1+pT2, 6 (11,5%) como pT3 e 17 (32,7%) como pT4. Além disso, 19 (36,5%) pacientes apresentaram linfonodos acometidos.

Tabela 2. Características clínicas dos pacientes diagnosticados com CEC oral.

Características clínicas	Casos	
	No.	(%)
Sítio		
Cavidade oral	52	100,0
Estadiamento[‡]		
Estádio I	16	30,8
Estádio II	13	25,0
Estádio III	6	11,5
Estádio IV	17	32,7
Tamanho do tumor (pT)[‡]		
pT1, pT2	29	55,8
pT3	6	11,5
pT4	17	32,7
Linfonodos (pN)[‡]		
Negativo	33	63,5
Positivo	19	36,5
Metástase à distância (pM)		
Negativo	52	100,0
Total	52	100,0

[‡]: TNM 7ª edição.

Em relação às características histopatológicas, 25 (48,1%) pacientes apresentaram tumores bem diferenciados e 26 (50%) moderadamente. Para a invasão linfática, 10 (19,2%) apresentaram e 35 (67,3%) não. Já para a invasão perineural, 20 (38,5%) casos mostraram positividade e 29 (55,8%) não. Por fim, o infiltrado inflamatório foi escasso em 17 (32,7%) casos, moderado em 21 (40,4%) e intenso em 5 (9,6%) (Tabela 3).

Tabela 3. Características histopatológicas dos pacientes diagnosticados com CEC oral.

Características histopatológicas	Casos	
	No.	(%)
Grau de diferenciação		
Bem	25	48,1
Moderadamente	26	50,0
Pouco	0	0,0
Não avaliado	1	1,9
Invasão linfática		
Ausente	35	67,3
Presente	10	19,2
Não avaliado	7	13,5
Invasão perineural		
Ausente	29	55,8
Presente	20	38,5
Não avaliado	3	5,8
Infiltrado inflamatório		
Escasso	17	32,7
Moderado	21	40,4
Intenso	5	9,6
Não avaliado	9	17,3
Total	52	100,0

Por fim, em relação ao prognóstico e ao tratamento, 21 (40,4%) foram submetidos à radioterapia e 31 (59,6%) não. Para a recidiva geral, 23 (44,2%) não apresentaram e 27 (51,9%) foram positivos para esta variável. Ainda em relação à recidiva, 15 (28,8%) apresentaram recidiva local e 26 (50%) não. Dos pacientes selecionados nesta casuística, 21 (40,4%) vieram a óbito em decorrência do câncer e 29 (55,8%) não (Tabela 4).

Tabela 4. Características do tratamento e do prognóstico para os pacientes diagnosticados com CEC Oral.

Características do tratamento e prognóstico	Casos	
	No.	(%)
Cirurgia		
Sim	52	100,0
Radioterapia		
Não	31	59,6
Sim	21	40,4
Quimioterapia		
Não	52	100,0
Recidiva geral		
Não	23	44,2
Sim	27	51,9
Não avaliado	2	3,8
Recidiva local		
Não	26	50,0
Sim	15	28,8
Não avaliado	11	21,2
Óbito		
Não	29	55,8
Sim	21	40,4
Não avaliado	2	3,8
Total	52	100,0

3.3. Imuno-Histoquímica

Os serviços de patologia das instituições participantes do GENCAPO padronizaram seus métodos rotineiros de fixação em formalina tamponada e embebição em parafina de amostras teciduais, a fim de evitar que diferenças metodológicas influenciassem as análises futuras das amostras biológicas. Para a padronização das reações de imuno-histoquímica, foram utilizados controles externos positivos onde as proteínas de interesse são constitutivamente expressas e os controles externos negativos foram submetidos a todos os passos dos processos, exceto à exposição aos anticorpos primários.

3.3.1. Confeção das Lâminas

Realizou-se a confecção das lâminas contendo amostras de CEC oral no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto. Já para a confecção das lâminas controles positivo e negativo, os cortes histológicos foram realizados no Laboratório de Patologia Cirúrgica da Faculdade de Odontologia/USP. Para ambas, a partir dos blocos previamente selecionados, cortes de 3 µm de espessura foram fixados em lâminas previamente silanizadas, por meio da utilização de organosilano 20% e etanol. As lâminas contendo os cortes secaram em estufa a 60 °C, por no mínimo 24 horas.

De acordo com as indicações presentes nas bulas dos anticorpos, os seguintes tecidos foram utilizados como controles externos positivos das reações de imunohistoquímica:

- **Placenta humana** – controle positivo para a proteína VEGF;
- **Carcinoma hepatocelular humano** – controle positivo para a proteína PAI-1.
- **Carcinoma de células renais humano** – controle positivo para a proteína CA-IX;

3.3.2. Reação de Imuno-Histoquímica para VEGF

A reação foi realizada no Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto. Inicialmente, ocorreu a desparafinização dos cortes histológicos por imersão em xilol por 5 minutos, duas vezes. Depois, o tecido foi hidratado em sequência de banhos rápidos com álcool absoluto, álcool 96% e novamente, álcool 96%. As lâminas foram lavadas em água corrente. Em seguida, a recuperação antigênica foi realizada em panela de pressão através da utilização do tampão TRIS EDTA – pH 9,0, previamente aquecido por 3 minutos, após o estabelecimento da pressão.

As lâminas foram então retiradas da panela de pressão e deixadas para resfriarem por 20 minutos, até temperatura ambiente. Seguiu-se a lavagem em tampão fosfato de sódio (PBS), com dois banhos de 3 minutos cada. Depois, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com lavagem das lâminas em metanol P.A. (47,4 mL), PBS (47,5 mL) e peróxido de hidrogênio 6% (5 mL), por 20 minutos. Seguiram-se dois banhos em PBS, de 3 minutos cada.

Realizou-se o bloqueio dos sítios inespecíficos através da cobertura da lâmina com uma gota de *Background Sniper* do Kit *Starr Trek Detection* (Biocare[®], Califórnia, EUA) por 10 minutos.

O anticorpo primário VEGF [Ncl- L- VEGF Clone KLT9 – mouse monoclonal (Novocastra[®]/Leica[®] - Wetzlar, Germany)] foi padronizado em cortes histológicos de placenta humana, onde a expressão da proteína é sabidamente positiva e a melhor diluição para o mesmo foi de 1/100. A diluição foi realizada de acordo com as orientações do fabricante, o anticorpo foi gotejado nas lâminas e permaneceu nas mesmas por 1 hora, em câmara úmida/temperatura ambiente.

As lâminas foram novamente lavadas em PBS por 3 minutos, duas vezes e, a seguir, foi gotejado o anticorpo secundário do Kit *Starr Trek Detection* (Biocare[®], Califórnia, EUA), em duas etapas:

1. *Trekkie Universal Link*: uma gota sobre cada lâmina por 30 minutos;
2. *Trekavidin* – HRP Label: uma gota sobre cada lâmina por 30 minutos.

Procedeu-se então à revelação com cromógeno *Betazoid DAB Substrate Buffer + Betazoid DAB Chromogen* do Kit *Starr Trek Detection* (Biocare[®], Califórnia, EUA), gotejando-se o DAB (diaminobenzidina) preparado de acordo com as recomendações do fabricante, aguardando em média 3 minutos para a revelação.

Mais dois banhos em PBS de 3 minutos cada foram realizados e as lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina por 10 segundos. Foram então lavadas em água corrente e sucedeu-se uma bateria de hidratação e clareamento pré-montagem das lâminas:

- Álcool 96% - 5 banhos rápidos;
- Álcool 96% - 5 banhos rápidos;
- Álcool 96% - 5 banhos rápidos;
- Álcool absoluto - 5 banhos rápidos;
- Xilol II - 5 banhos rápidos;
- Xilol I - até a montagem das lâminas.

Por fim, as lâminas foram montadas com resina para microscopia Entellan (Merck, Darmstadt, Alemanha).

3.3.3. Reações de Imuno-Histoquímica para PAI-1 e CA-IX

As reações foram realizadas no Laboratório de Patologia Cirúrgica da Faculdade de Odontologia/USP. Inicialmente as lâminas foram submetidas à Solução de Recuperação Antigênica 3x1 *PMB1-250* [Tampão Citrato, pH 6,0 (Spring Bioscience, Califórnia, EUA)] previamente aquecida, que faz a desparafinização e a recuperação antigênica simultaneamente, em banho-maria, a 98°C, por 47 minutos.

As lâminas foram então retiradas do banho-maria e deixadas para resfriarem por 10 minutos em temperatura ambiente. Seguiu-se a lavagem em tampão de lavagem tris-(hidroximetil)-aminometano (TRIS), pH 7,6, por 5 minutos. Em seguida, foram incubadas em Solução de Peróxido de Hidrogênio, reagente do Kit *SPD-125* (Spring Bioscience, Califórnia, EUA), para o bloqueio da peroxidase endógena, por 15 minutos. Após, foram lavadas com 3 banhos em tampão de lavagem e o excesso ao redor dos cortes foi secado com papel filtro e o mesmo foram circulados com caneta hidrofóbica Super PAP Pen (Kiyota, Japão, JP).

Depois, foi aplicado o Bloqueio de Proteínas Ultra V, reagente do Kit *SPD-125* (Spring Bioscience, Califórnia, EUA) e as lâminas foram incubadas por 10 minutos, em câmara úmida, temperatura ambiente. O excesso do reagente foi escorrido e em seguida o anticorpo primário diluído foi aplicado em quantidade suficiente para cobrir

os cortes e as lâminas foram incubadas no escuro, em câmara úmida, temperatura ambiente, por 90 minutos.

Os anticorpos primários foram padronizados em cortes histológicos de carcinoma hepatocelular (PAI-1) e carcinoma de células renais humano (CA-IX), tecidos nos quais as expressões das proteínas são sabidamente positivas e a melhor diluição para ambos foi 1/100. As diluições foram realizadas de acordo com as orientações do fabricante, utilizando o Diluente de Anticorpo *ADS-125* (Spring Bioscience, Califórnia, EUA).

Os anticorpos utilizados para cada proteína foram:

- PAI-1: Anti-PAI1 antibody – mouse monoclonal [1D5] (ab125687)/Abcam[®], Cambridge, EUA.
- CA-IX: Anti-Carbonic Anhydrase IX antibody – rabbit monoclonal [EPR4151(2)] (ab108351)/Abcam[®], Cambridge, EUA;

Após os 90 minutos, as lâminas foram submetidas a 3 lavagens de 5 minutos cada em TRIS pH 7,6 e novamente foi secado ao redor dos cortes. Depois, foi aplicado o Complemento, reagente do Kit *SPD-125* (Spring Bioscience, Califórnia, EUA), em quantidade suficiente para cobrir os cortes e as lâminas foram incubadas por 10 minutos, em câmara úmida, temperatura ambiente. O excesso do reagente foi escorrido e em seguida foi aplicado o Conjugado HRP, que também é reagente do Kit *SPD-125* (Spring Bioscience, Califórnia, EUA) e as lâminas foram incubadas por 15 minutos, em câmara úmida, temperatura ambiente.

Depois, as lâminas foram lavadas em TRIS pH 7,6 por quatro vezes, permanecendo no tampão 5 minutos em cada lavagem. Foi secado ao redor dos cortes e foi aplicado o Substrato Cromógeno DAB Plus diluído 1/50 em Tampão Diluente de DAB, reagentes do Kit *SPD-125* (Spring Bioscience, Califórnia, EUA). As lâminas foram incubadas em câmara úmida, temperatura ambiente, por 10 minutos.

Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada por 5 minutos e a operação foi repetida por 3 vezes. Como contra-corante foi utilizado Hematoxilina de

Harris e as lâminas permaneceram na mesma por 5 minutos e após este processo, foram lavadas em água corrente por também, 5 minutos.

Por fim, sucedeu-se uma bateria de hidratação e clareamento pré-montagem das lâminas:

- Álcool 70% - só passagem;
- Álcool 75% - só passagem;
- Álcool 80% - só passagem;
- Álcool 85% - 3 minutos;
- Álcool 90% - 3 minutos;
- Álcool 95% - 3 minutos;
- Álcool 100% I - 3 minutos;
- Álcool 100% II - 3 minutos;
- Álcool 100% III - 3 minutos;
- Álcool + Xilol - só passagem;
- Xilol 1- 3 minutos;
- Xilol 2 – até a montagem das lâminas.

As lâminas foram montadas em meio de montagem não aquoso: DPX [*p*-xylene-bis (N-pyridinium bromide)] (Sigma-Aldrich, Saint-Louis, EUA).

3.4. Análise Semi-Quantitativa

A leitura das lâminas foi realizada em microscópio óptico (Zeiss, Alemanha), sob os aumentos de 100, 200 e 400x, por dois examinadores, em campos consecutivos, com cuidado de não sobreposição. As análises foram realizadas de forma semi-quantitativa, na medida em que a literatura não tem padrão estabelecido para a quantificação das proteínas estudadas. Foram analisados 10 campos por lâmina, no aumento de 400x, e em cada campo foram observados o percentual de células marcadas e a intensidade predominante de marcação. No final, para cada lâmina foi

tirada uma média de cada categoria analisada e esta média foi confirmada através da visualização de um único campo/lâmina, nos aumentos de 100x e de 200x.

Considerando o percentual de células marcadas, os seguintes scores foram atribuídos aos campos analisados:

- 0 = atribuído aos campos onde não haviam células tumorais positivas às marcações;
- 1 = 1-25% de células tumorais marcadas;
- 2 = 25-50% de células tumorais marcadas;
- 3 = >50% de células tumorais marcadas.

Em relação à intensidade das marcações, os scores foram divididos da seguinte forma:

- 0 = marcação nula;
- 1 = marcação fraca dentre as células tumorais;
- 2 = marcação moderada dentre as células tumorais;
- 3 = marcação forte dentre as células tumorais.

Segundo a metodologia de análise de Soini et al. (2000), modificada por Campos et al. (2009), ambos os scores foram multiplicados para cada campo analisado e o resultado da multiplicação foi utilizado para categorizar as expressões citoplasmáticas e membranares das proteínas estudadas em:

- Marcação negativa = 0 e 1;
- Marcação positiva fraca = 2-4;
- Marcação positiva forte = >4.

As fotos das marcações de cada proteína foram tiradas através do Microscópio Olympus AX70 (Olympus, Japão, JP).

3.5. Análise Estatística

Com o intuito de estabelecer associações entre as variáveis estudadas, o teste do Qui-Quadrado e o Exato de Fisher foram utilizados e a confirmação dos valores foi realizada através do Teste de Lilliefors (a significância considerada foi de: $p < 0,05$). Utilizou-se a Regressão Logística Multivariada para ajustar os valores de Odds Ratio (OR) e do Intervalo de Confiança (IC 95%). Para o cálculo da sobrevida, foi considerado como ponto de partida o dia da cirurgia e como ponto final, o dia em que o desfecho ocorreu (recidiva geral, recidiva local ou óbito). Em casos nos quais o desfecho não ocorreu, a data do último retorno foi utilizada como ponto final. Obtiveram-se os desenhos das curvas de Sobrevida Livre de Doença (LD), Sobrevida Livre de Doença Local (LDL) e Sobrevida Doença Específica (DE) através da utilização do modelo de Kaplan-Meier e adotando os valores de p de Wilcoxon, sendo que os valores de Hazard Ratio (HR) e IC 95% foram ajustados por meio do modelo multivariado Cox Proportional Hazards. Os cálculos e gráficos estatísticos foram feitos no software Epi Info[®] v3.4.3, 2007.

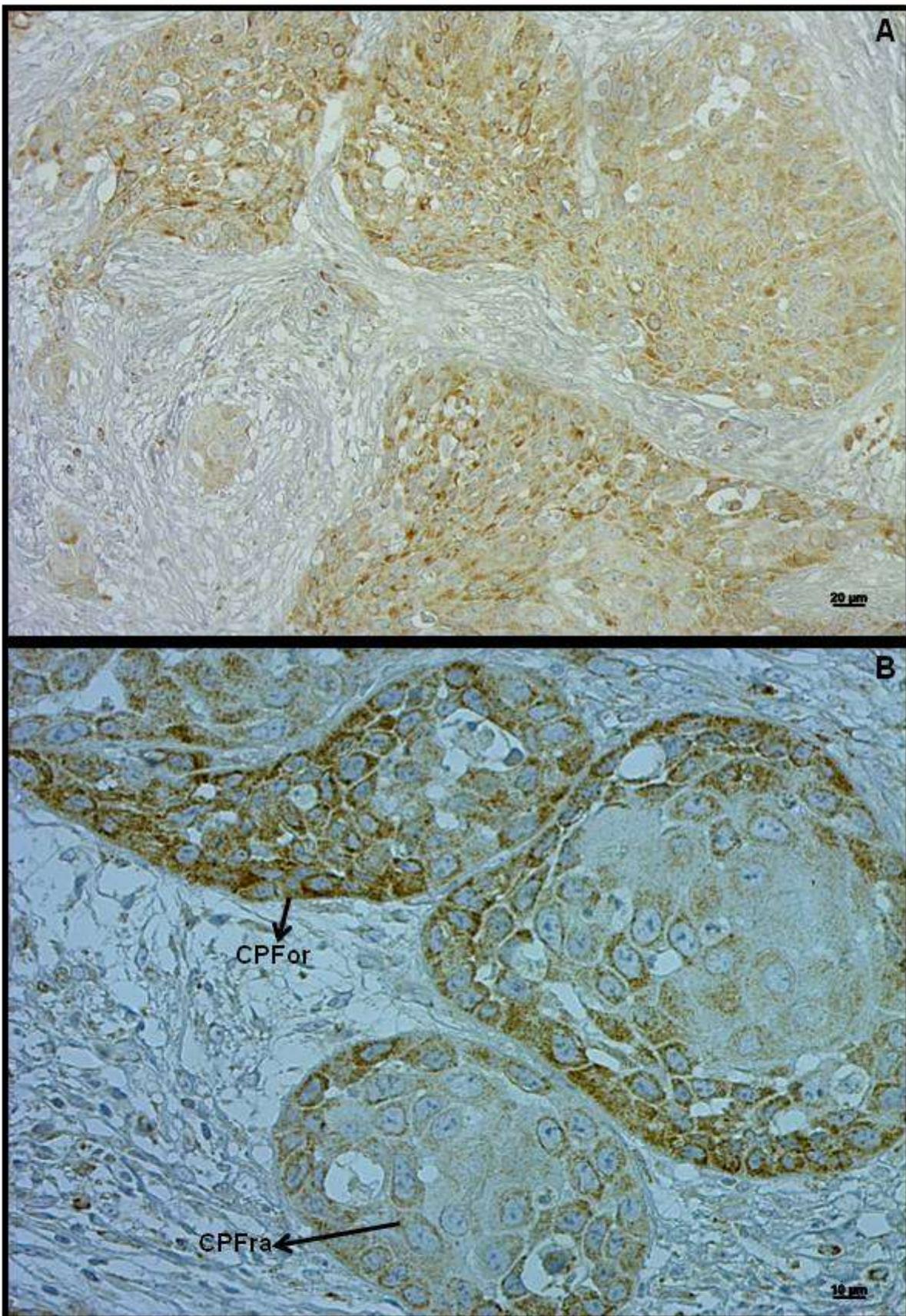
4. RESULTADOS

4.1. Expressão de VEGF, PAI-1 e CA-IX em CEC Oral

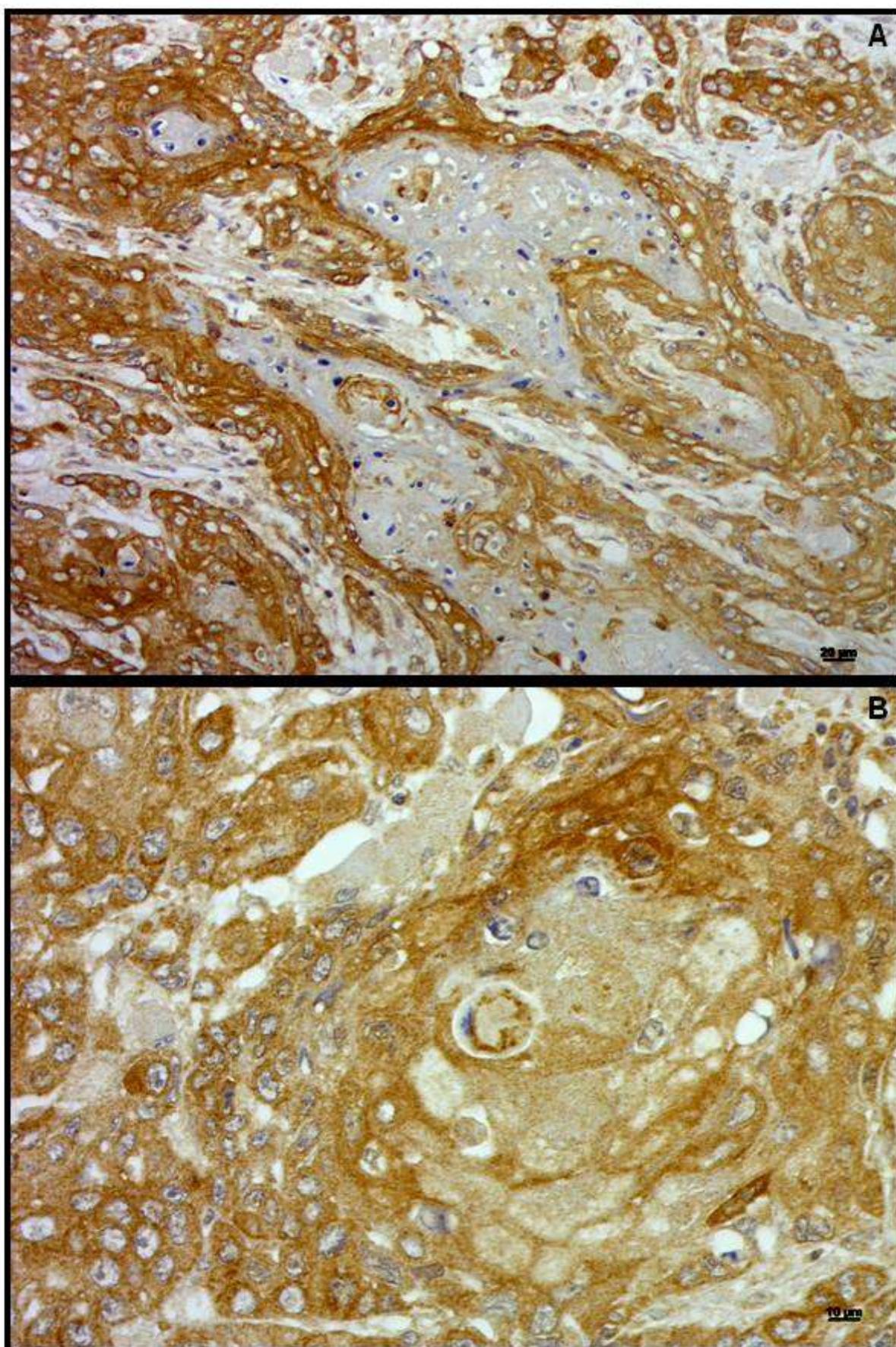
As expressões citoplasmáticas das proteínas VEGF, PAI-1 e CA-IX e as expressões membranares de PAI-1 e CA-IX foram analisadas em 52 amostras de carcinoma epidermoide de cavidade oral. Em relação à caracterização das expressões, estas foram classificadas em: negativas, positivas fraca e forte (Tabela 5; Figuras: 4A, 4B, 5A, 5B, 5C, 5D, 6A, 6B, 6C e 6D).

Tabela 5. Expressão de VEGF, PAI-1 e CA-IX em CEC oral.

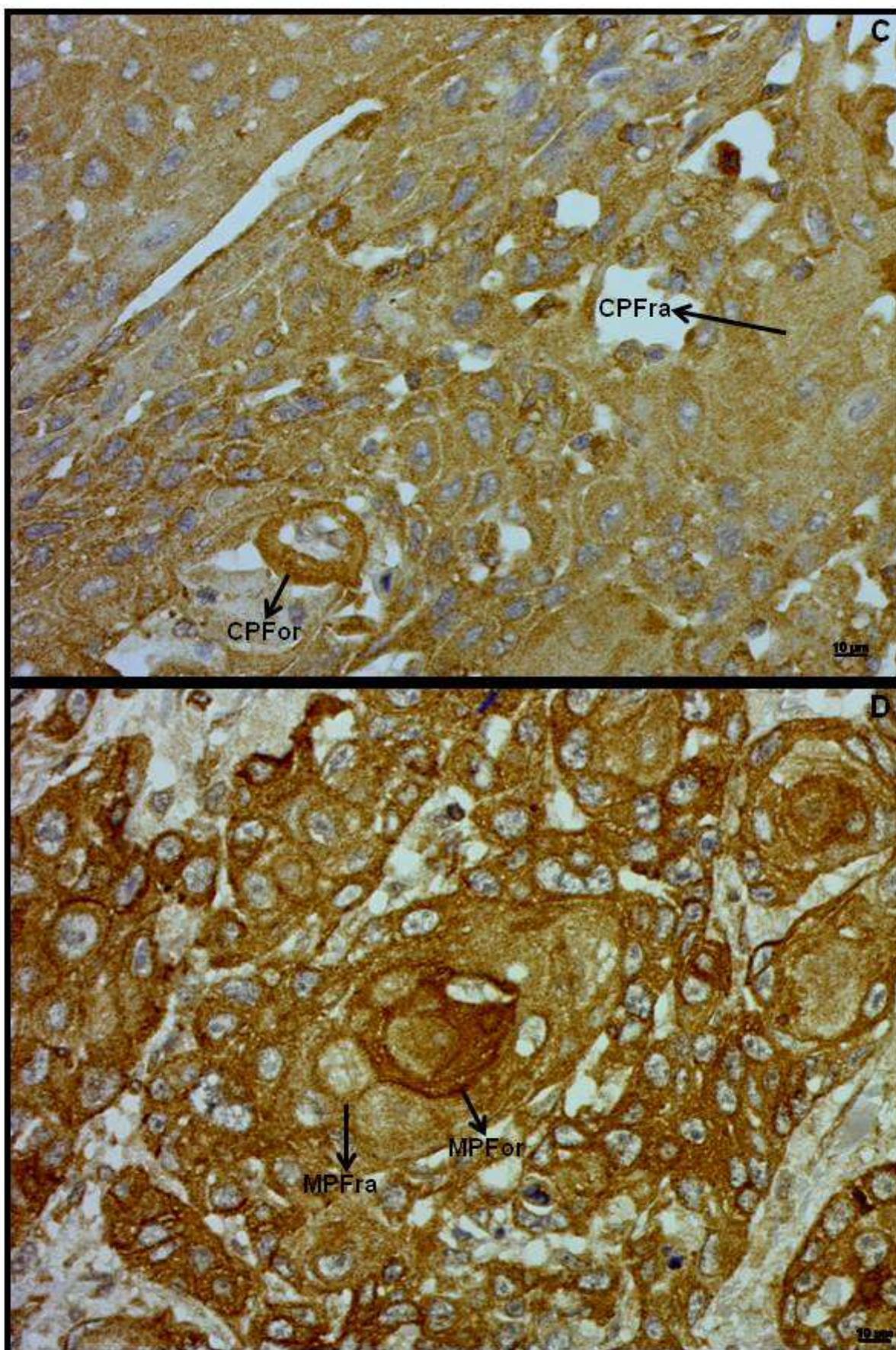
Expressão	No.
CA-IX Citoplasma	
Negativo	37
Positiva fraca	13
Positiva forte	2
CA-IX Membrana	
Negativo	26
Positiva fraca	19
Positiva forte	7
PAI-1 Citoplasma	
Negativo	8
Positiva fraca	18
Positiva forte	26
PAI-1 Membrana	
Negativo	14
Positiva fraca	21
Positiva forte	17
VEGF Citoplasma	
Negativo	24
Positiva fraca	9
Positiva forte	19
Total	52



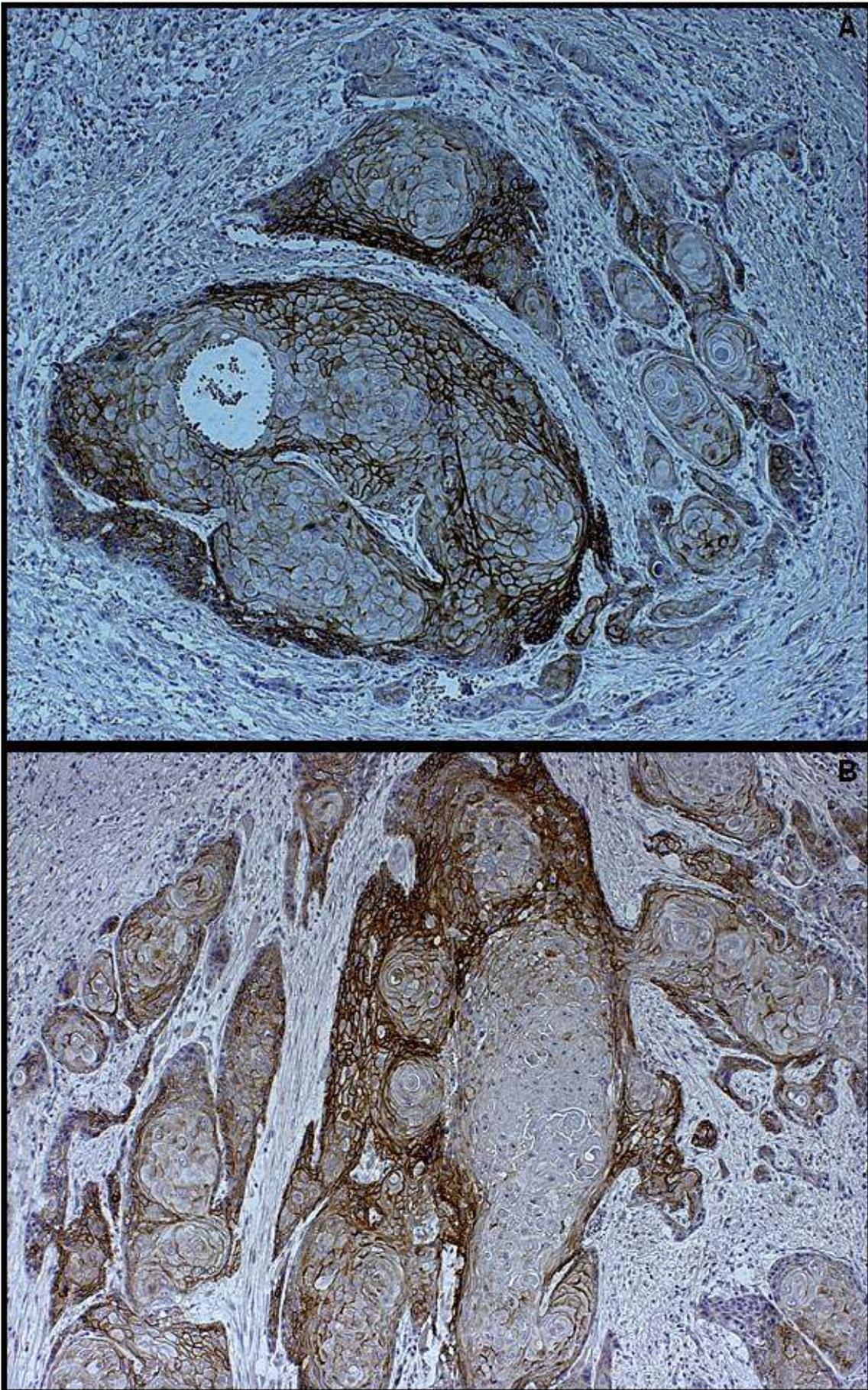
Figuras 4 A-B. Imuno-histoquímica: Marcações citoplasmáticas de VEGF em CEC oral. (A): Marcações citoplasmáticas. Aumento: 200x. (B): (CPFra): Citoplasmática positiva fraca, (CPFOr): Citoplasmática positiva forte. Aumento: 400x.



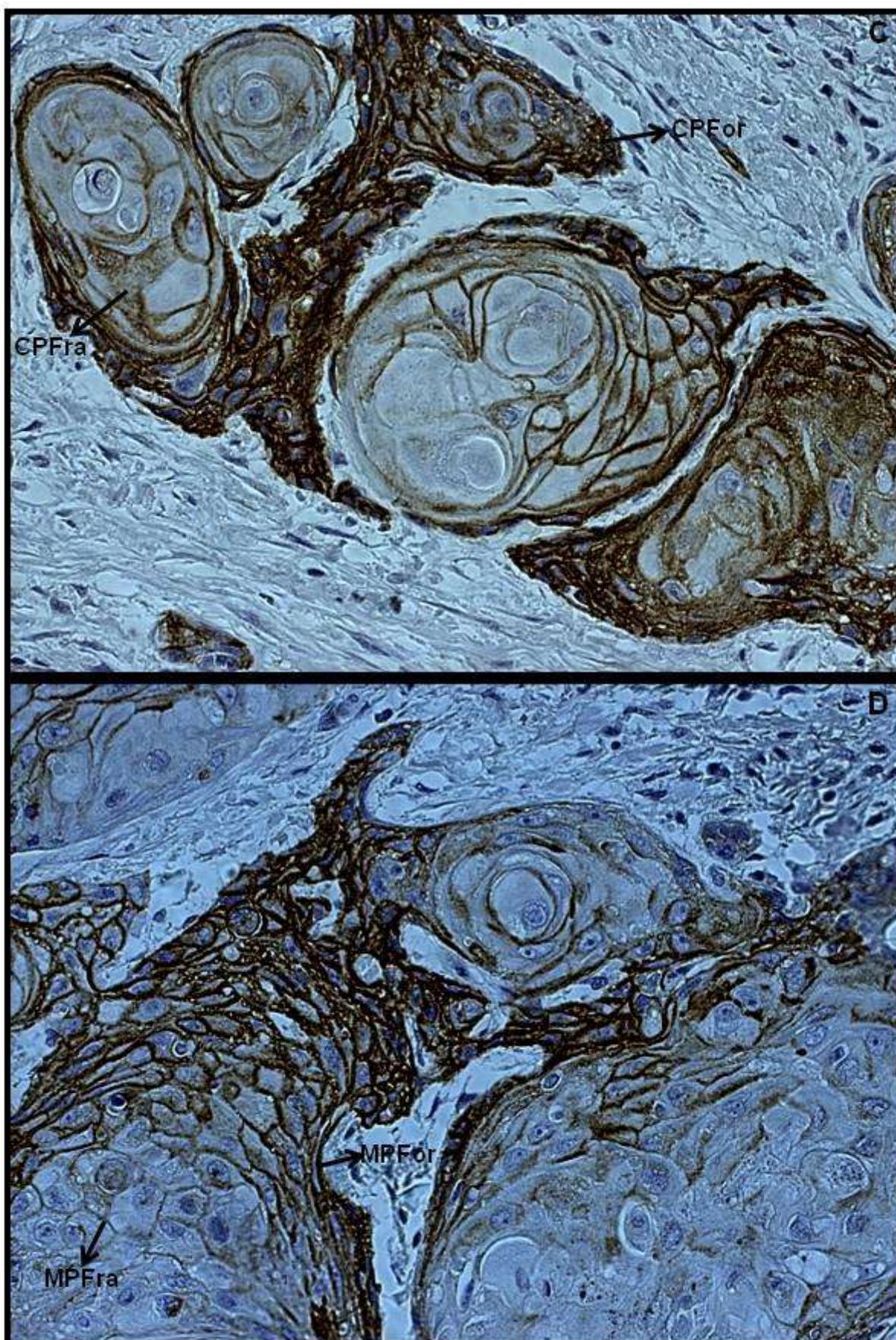
Figuras 5 A-B. Imuno-histoquímica: Marcações citoplasmáticas e membranares de PAI-1 em CEC oral. (A): Aumento: 200x. (B): Aumento: 400x.



Figuras 5 C-D. Imuno-histoquímica: Marcações citoplasmáticas e membranares de PAI-1 em CEC oral. (C): Marcações citoplasmáticas: (CPFra): Citoplasmática positiva fraca, (CPFOr): Citoplasmática positiva forte. (D): Marcações membranares: (MPFra): Membranar positiva fraca, (MPFor): Membranar positiva forte. Aumento: 400x.



Figuras 6 A-B. Imuno-histoquímica: Marcações citoplasmáticas e membranares de CA-IX em CEC oral. Aumento: 100x.



Figuras 6 C-D. Imuno-histoquímica: Marcações citoplasmáticas e membranares de CA-IX em CEC oral. (C): Marcações citoplasmáticas: (CPFra): Citoplasmática positiva fraca, (CPFoF): Citoplasmática positiva forte. (D): Marcações membranares: (MPFra): Membranar positiva fraca, (MPFoF): Membranar positiva forte. Aumento: 400x.

4.2. Expressão de VEGF, PAI-1 e CA-IX e a Relação com o Tabagismo

As expressões citoplasmáticas de VEGF, PAI-1 e CA-IX e as expressões membranares das duas últimas proteínas não mostraram significância estatística para o hábito tabagista (Tabelas 6 e 7).

Tabela 6. Expressões negativa, positiva fraca e positiva forte das proteínas CA-IX, PAI-1 e VEGF em amostras tumorais de CEC oral e a relação com o hábito tabagista.

Expressão	Tabagismo				p
	Não		Sim		
	No.	(%)	No.	(%)	
CA-IX Citoplasma					
Negativo	24	77,4	13	61,9	0,169
Positiva fraca	7	22,6	6	28,6	
Positiva forte	0	0,0	2	9,5	
CA-IX Membrana					
Negativo	18	58,1	8	38,1	0,333
Positiva fraca	10	32,3	9	42,9	
Positiva forte	3	9,7	4	19,0	
PAI-1 Citoplasma					
Negativo	5	16,1	3	14,3	0,684
Positiva fraca	12	38,7	6	28,6	
Positiva forte	14	45,2	12	57,1	
PAI-1 Membrana					
Negativo	10	32,3	4	19,0	0,529
Positiva fraca	11	35,5	10	47,6	
Positiva forte	10	32,3	7	33,3	
VEGF Citoplasma					
Negativo	16	51,6	8	38,1	0,624
Positiva fraca	5	16,1	4	19,0	
Positiva forte	10	32,3	9	42,9	
Total	31	59,6	21	40,4	

p: valor de significância, $p < 0,05$.

Tabela 7. Expressões negativa e positiva, fraca e forte das proteínas CA-IX, PAI-1 e VEGF em amostras tumorais de CEC oral e a relação com o hábito tabagista.

Expressão	Tabagismo				p
	Não		Sim		
	No.	(%)	No.	(%)	
CA-IX Citoplasma					
Negativo	24	77,4	13	61,9	0,226
Positivo	7	22,6	8	38,1	
Fraca	7	22,6	6	28,6	0,155
Forte	0	0,0	2	9,5	
CA-IX Membrana					
Negativo	18	58,1	8	38,1	0,158
Positivo	13	41,9	13	61,9	
Fraca	10	32,3	9	42,9	0,658
Forte	3	9,7	4	19,0	
PAI-1 Citoplasma					
Negativo	5	16,1	3	14,3	0,432
Positivo	16	51,6	18	85,7	
Fraca	12	38,7	6	28,6	0,395
Forte	14	45,2	12	57,1	
PAI-1 Membrana					
Negativo	10	32,3	4	19,0	0,292
Positivo	21	67,7	17	81,0	
Fraca	11	35,5	10	47,6	0,691
Forte	10	32,3	7	33,3	
VEGF Citoplasma					
Negativo	16	51,6	8	38,1	0,337
Positivo	15	48,4	13	61,9	
Fraca	5	16,1	4	19,0	0,885
Forte	10	32,3	9	42,9	
Total	31	59,6	21	40,4	

p: valor de significância, $p < 0,05$.

4.3. Expressões Citoplasmáticas e Membranares de CA-IX e PAI-1

As correlações entre as expressões citoplasmáticas e membranares de CA-IX e PAI-1 estão representadas nas tabelas 8 e 9:

Na tabela 8, a correlação entre as expressões negativa, positiva fraca e positiva forte, presentes tanto no citoplasma como na membrana externa em CEC oral, apresentou um valor de $p=0,054$ para a CA-IX. Os dados ainda mostraram a maior prevalência da expressão citoplasmática negativa para a proteína (71,2%). Em relação à expressão membranar, 50% dos casos apresentaram expressão negativa e 50% expressão positiva. Na tabela 9, a frequência de positividade da expressão CA-IX ($p=0,027$) confirmou a existência de diferenças biológicas entre as expressões negativa e positiva da proteína.

Tabela 8. Correlações entre as expressões citoplasmática e membranar, negativa, positiva fraca e positiva forte das proteínas CA-IX e PAI-1 em amostras tumorais de CEC oral.

Expressão	Localização				p
	Citoplasma		Membrana		
	No.	(%)	No.	(%)	
CA-IX					
Negativo	37	71,2	26	50,0	0,054
Positiva fraca	13	25,0	19	36,5	
Positiva forte	2	3,8	7	13,5	
PAI-1					
Negativo	8	15,4	14	26,9	0,153
Positiva fraca	18	34,6	21	40,4	
Positiva forte	26	50,0	17	32,7	
Total	52	100,0	52	100,0	

p: valor de significância, $p<0,05$.

Tabela 9. Correlações entre as expressões citoplasmática e membranar, negativa e positiva, fraca e forte das proteínas CA-IX e PAI-1 em amostras tumorais de CEC oral.

Expressão	Localização				p
	Citoplasma		Membrana		
	No.	(%)	No.	(%)	
CA-IX					
Negativo	37	71,2	26	50,0	<u>0,027</u>
Positivo	15	28,8	26	50,0	
Fraca	13	25,0	19	36,5	0,311
Forte	2	3,8	7	13,5	
PAI-1					
Negativo	8	15,4	14	26,9	0,150
Positivo	44	84,6	38	73,1	
Fraca	18	34,6	21	40,4	0,194
Forte	26	50,0	17	32,7	
Total	52	100,0	52	100,0	

p: valor de significância, $p < 0,05$.

4.4. Características Clínicas e Patológicas

As frequências das expressões citoplasmáticas de VEGF, PAI-1 e CA-IX e das expressões membranares de PAI-1 e CA-IX foram relacionadas com as características clínicas e patológicas apresentadas por CEC oral (Tabelas: 10, 11, 12, 13, 14 e 15).

Na tabela 10, a expressão citoplasmática positiva de CA-IX mostrou relação significativa com a ocorrência de linfonodos acometidos (60%); já a ausência da expressão é um fator predominante para a não ocorrência (73%) e o valor para essa variável é de $p=0,025$. A análise multivariada não confirmou essa relação, no entanto, os valores apontam para um aumento de risco em torno de 3x, referente à ocorrência de linfonodos cervicais acometidos e à expressão citoplasmática positiva de CA-IX (OR=3,62; IC= 0,99-13,20) (Tabela 11).

Na tabela 10 também há uma tendência à significância quando analisado o valor de p referente à invasão perineural ($p=0,069$), o que sugere uma associação entre a ausência da expressão citoplasmática de CA-IX e a não ocorrência (62,2%) e entre a expressão positiva da proteína e a ocorrência de invasão perineural (60%).

Tabela 10. Análise das expressões negativa e positiva, fraca e forte de CA-IX citoplasmática e as correlações com as características clinicopatológicas em pacientes com CEC oral.

Características clinicopatológicas	Expressão CA-IX Citoplasmática									
	Negativo		Positivo		p	Fraca		Forte		p
	No.	(%)	No.	(%)		No.	(%)	No.	(%)	
Tamanho do tumor (pT) ‡										
pT1, pT2	23	62,2	6	40,0	0,273	5	38,5	1	50,0	*
pT3	3	8,1	3	20,0		3	23,1	0	0,0	
pT4	11	29,7	6	40,0		5	38,5	1	50,0	
Linfonodos (pN) ‡										
Negativo	27	73,0	6	40,0	<u>0,025</u>	6	46,2	0	0,0	*
Positivo	10	27,0	9	60,0		7	53,8	2	100,0	
Grau de diferenciação										
Bem	16	43,2	9	60,0	0,311	9	69,2	0	0,0	*
Moderadamente	20	54,1	6	40,0		4	30,8	2	100,0	
Não avaliado	1	2,7	0	0,0		0	0,0	0	0,0	
Invasão linfática										
Ausente	25	67,6	10	66,7	0,372	9	69,2	1	50,0	*
Presente	6	16,2	4	26,7		4	30,8	0	0,0	
Não avaliado	6	16,2	1	6,7		0	0,0	1	50,0	
Invasão perineural										
Ausente	23	62,2	6	40,0	0,069	5	38,5	1	50,0	*
Presente	11	29,7	9	60,0		8	61,5	1	50,0	
Não avaliado	3	8,1	0	0,0		0	0,0	0	0,0	
Infiltrado inflamatório										
Escasso	11	29,7	6	40,0	0,291	5	38,5	1	50,0	*
Moderado	14	37,8	7	46,7		6	46,2	1	50,0	
Intenso	5	13,5	0	0,0		0	0,0	0	0,0	
Não avaliado	7	18,9	2	13,3		2	15,4	0	0,0	
Total	37	71,2	15	28,8		13	86,7	2	13,3	

p: valor de significância, $p < 0,05$; *: valor indefinido - número pequeno de indivíduos com expressão positiva forte; ‡: TNM 7ª edição;

Não avaliado: valores não incluídos nos cálculos estatísticos.

Tabela 11. Análise multivariada das expressões negativa e positiva de CA-IX citoplasmática, do tamanho do tumor e do risco para a ocorrência de linfonodos acometidos.

Variáveis	Linfonodos	
	OR (IC 95%)	p
Expressão CAIX Citoplasmática		
Negativo	1	
Positivo	3,62 (0,99-13,20)	0,051
Tamanho do tumor (pT) *		
pT1, pT2	1	
pT3	1,90 (0,28-12,73)	0,511
pT4	2,04 (0,55-7,54)	0,287

p: valor de significância, $p < 0,05$;

*: TNM 7^a edição;

OR: Odds Ratio;

IC: Intervalo de Confiança.

Na tabela 12 são mostradas as correlações entre as características clínicas e patológicas e as expressões membranares de CA-IX:

Em relação ao grau de diferenciação, as expressões membranares negativa e positiva de CA-IX, apesar de não significantes ($p=0,206$), apresentaram valores inversamente proporcionais. Os valores sugerem que a expressão membranar negativa de CA-IX tem maior relação com tumores moderadamente diferenciados (57,7%), enquanto que a expressão membranar positiva de CA-IX apresenta maior relação com tumores bem diferenciados (57,7%).

Na tabela 12 também é observada uma associação significativa entre a expressão membranar de CA-IX e o infiltrado inflamatório ($p=0,044$): foi verificada a predominância de casos com expressão membranar negativa de CA-IX (19,2%) e a ocorrência do infiltrado inflamatório intenso. Em compensação, nos casos com infiltrados inflamatórios escassos e moderados, houve uma maior frequência da expressão membranar positiva da proteína.

Tabela 12. Análise das expressões negativa e positiva, fraca e forte de CA-IX membranar e as correlações com as características clinicopatológicas em pacientes com CEC oral.

Características clinicopatológicas	Expressão CA-IX Membranar									
	Negativo		Positivo		p	Fraca		Forte		p
	No.	(%)	No.	(%)		No.	(%)	No.	(%)	
Tamanho do tumor (pT) †										
pT1, pT2	17	65,4	12	46,2	0,375	8	42,1	4	57,1	0,778
pT3	2	7,7	4	15,4		3	15,8	1	14,3	
pT4	7	26,9	10	38,5		8	42,1	2	28,6	
Linfonodos (pN) †										
Negativo	17	65,4	16	61,5	0,773	12	63,2	4	57,1	0,562
Positivo	9	34,6	10	38,5		7	36,8	3	42,9	
Grau de diferenciação										
Bem	10	38,5	15	57,7	0,206	11	57,9	4	57,1	0,655
Moderadamente	15	57,7	11	42,3		8	42,1	3	42,9	
Não avaliado	1	3,8	0	0,0		0	0,0	0	0,0	
Invasão linfática										
Ausente	17	65,4	18	69,2	0,391	14	73,7	4	57,1	0,904
Presente	6	23,1	4	15,4		3	15,8	1	14,3	
Não avaliado	3	11,5	4	15,4		2	10,5	2	28,6	
Invasão perineural										
Ausente	15	57,7	14	53,8	0,643	9	47,4	5	71,4	0,332
Presente	9	34,6	11	42,3		9	47,4	2	28,6	
Não avaliado	2	7,7	1	3,8		1	5,3	0	0,0	
Infiltrado inflamatório										
Escasso	8	30,8	9	34,6	<u>0,044</u>	7	36,8	2	28,6	0,962
Moderado	8	30,8	13	50,0		10	52,6	3	42,9	
Intenso	5	19,2	0	0,0		0	0,0	0	0,0	
Não avaliado	5	19,2	4	15,4		2	10,5	2	28,6	
Total	26	50,0	26	50,0		19	73,1	7	26,9	

p: valor de significância, $p < 0,05$; †: TNM 7ª edição; **Não avaliado**: valores não incluídos nos cálculos estatísticos.

Na tabela 13 são mostradas as correlações entre as características clínicas e patológicas e as expressões citoplasmáticas de PAI-1: o nível da expressão citoplasmática de PAI-1 mostrou relação significativa com o grau de diferenciação tumoral em CEC oral ($p=0,027$). A expressão citoplasmática forte da proteína foi mais frequente nos tumores classificados como moderadamente diferenciados (61,5%), enquanto que a expressão fraca foi predominante em tumores bem diferenciados (72,2%).

Além disso, a tabela 13 também mostra uma associação entre a expressão citoplasmática de PAI-1 e o infiltrado inflamatório ($p=0,013$): a ausência da expressão da proteína apresentou maior relação com a presença do infiltrado inflamatório escasso (50%); já a expressão positiva de PAI-1 esteve relacionada com o infiltrado inflamatório moderado (45,5%).

Além disso, foi observada uma tendência à significância referente às expressões citoplasmáticas fraca e forte de PAI-1 e a ocorrência de linfonodos acometidos ($p=0,095$) e invasão perineural ($p=0,063$): os resultados mostraram uma maior convergência da expressão citoplasmática fraca para a não ocorrência de linfonodos acometidos (77,8%), bem como uma relação entre essa expressão e a não ocorrência de invasão perineural (66,7%).

Tabela 13. Análise das expressões negativa e positiva, fraca e forte de PAI-1 citoplasmática e as correlações com as características clinicopatológicas em pacientes com CEC oral.

Características clinicopatológicas	Expressão PAI-1 Citoplasmática									
	Negativo		Positivo		p	Fraca		Forte		p
	No.	(%)	No.	(%)		No.	(%)	No.	(%)	
Tamanho do tumor (pT) †										
pT1, pT2	6	75,0	23	52,3	0,403	13	72,2	10	38,5	0,061
pT3	1	12,5	5	11,4		2	11,1	3	11,5	
pT4	1	12,5	16	36,4		3	16,7	13	50,0	
Linfonodos (pN) †										
Negativo	5	62,5	28	63,6	0,622	14	77,8	14	53,8	0,095
Positivo	3	37,5	16	36,4		4	22,2	12	46,2	
Grau de diferenciação										
Bem	2	25,0	23	52,3	0,225	13	72,2	10	38,5	<u>0,027</u>
Moderadamente	5	62,5	21	47,7		5	27,8	16	61,5	
Não avaliado	1	12,5	0	0,0		0	0,0	0	0,0	
Invasão linfática										
Ausente	6	75,0	29	65,9	0,505	12	66,7	17	65,4	0,264
Presente	1	12,5	9	20,5		2	11,1	7	26,9	
Não avaliado	1	12,5	6	13,6		4	22,2	2	7,7	
Invasão perineural										
Ausente	5	62,5	24	54,5	0,391	12	66,7	12	46,2	0,063
Presente	2	25,0	18	40,9		4	22,2	14	53,8	
Não avaliado	1	12,5	2	4,5		2	11,1	0	0,0	
Infiltrado inflamatório										
Escasso	4	50,0	13	29,5	<u>0,013</u>	4	22,2	9	34,6	0,843
Moderado	1	12,5	20	45,5		6	33,3	14	53,8	
Intenso	3	37,5	2	4,5		1	5,6	1	3,8	
Não avaliado	0	0,0	9	20,5		7	38,9	2	7,7	
Total	8	15,4	44	84,6		18	40,9	26	59,1	

p: valor de significância, $p < 0,05$; †: TNM 7ª edição; Não avaliado: valores não incluídos nos cálculos estatísticos.

Na tabela 14 são apresentadas as correlações entre as características clínicas e patológicas e as expressões membranares de PAI-1:

Observa-se uma tendência à significância entre as expressões membranares fraca e forte de PAI-1 e o tamanho do tumor ($p=0,061$): o resultado indicou que quanto maior o nível de expressão membranar de PAI-1, maior o tumor. Da mesma forma, quanto menor o nível de expressão membranar da proteína, menores são as dimensões tumorais.

Observa-se também na tabela 14, um valor de p próximo à significância referente ao grau de diferenciação tumoral e as expressões positivas fraca e forte ($p=0,071$): houve maior relação entre a expressão membranar fraca de PAI-1 (61,9%) e tumores bem diferenciados e entre a expressão membranar forte da proteína (64,7%) e o grau de diferenciação moderado.

Por fim, nesta tabela o valor de p foi significativo para a presença do infiltrado inflamatório ($p=0,033$). Assim, a ausência da expressão da proteína esteve relacionada com a presença do infiltrado inflamatório escasso (42,9%); já a expressão membranar positiva de PAI-1 foi predominante nos casos com infiltrado inflamatório moderado (50%).

Tabela 14. Análise das expressões negativa e positiva, fraca e forte de PAI-1 membranar e as correlações com as características clinicopatológicas em pacientes com CEC oral.

Características clinicopatológicas	Expressão PAI-1 Membranar									
	Negativo		Positivo		p	Fraca		Forte		p
	No.	(%)	No.	(%)		No.	(%)	No.	(%)	
Tamanho do tumor (pT) [‡]										
pT1, pT2	10	71,4	19	50,0	0,228	14	66,7	5	29,4	0,061
pT3	2	14,3	4	10,5		2	9,5	2	11,8	
pT4	2	14,3	15	39,5		5	23,8	10	58,8	
Linfonodos (pN) [‡]										
Negativo	10	71,4	23	60,5	0,349	13	61,9	10	58,8	0,846
Positivo	4	28,6	15	39,5		8	38,1	7	41,2	
Grau de diferenciação										
Bem	6	42,9	19	50,0	0,588	13	61,9	6	35,3	0,071
Moderadamente	8	57,1	18	47,4		7	33,3	11	64,7	
Não avaliado	0	0,0	1	2,6		1	4,8	0	0,0	
Invasão linfática										
Ausente	8	57,1	27	71,1	0,610	17	81,0	10	58,8	0,191
Presente	2	14,3	8	21,1		3	14,3	5	29,4	
Não avaliado	4	28,6	3	7,9		1	4,8	2	11,8	
Invasão perineural										
Ausente	8	57,1	21	55,3	0,248	14	66,7	7	41,2	0,116
Presente	3	21,4	17	44,7		7	33,3	10	58,8	
Não avaliado	3	21,4	0	0,0		0	0,0	0	0,0	
Infiltrado inflamatório										
Escasso	6	42,9	11	28,9	<u>0,033</u>	4	19,0	7	41,2	0,524
Moderado	2	14,3	19	50,0		11	52,4	8	47,1	
Intenso	3	21,4	2	5,3		1	4,8	1	5,9	
Não avaliado	3	21,4	6	15,8		5	23,8	1	5,9	
Total	14	26,9	38	73,1		21	55,3	17	44,7	

p: valor de significância, p<0,05; ‡: TNM 7ª edição; Não avaliado: valores não incluídos nos cálculos estatísticos.

Na tabela 15 são apresentadas as correlações entre as características clínicas e patológicas e as expressões citoplasmáticas de VEGF: foi observada uma associação significativa entre o grau de diferenciação tumoral e às expressões negativa e positiva de VEGF ($p=0,035$). Para os casos nos quais foram encontradas as expressões citoplasmáticas positivas da proteína, foi observada uma maior prevalência do grau de diferenciação moderado (64,3%); já nos casos que apresentaram a expressão negativa de VEGF, houve uma predominância de tumores bem diferenciados (62,5%).

Além disso, nesta tabela também é exibida uma relação entre a presença do infiltrado inflamatório e as expressões positivas fraca e forte de VEGF ($p=0,038$): os valores apontam para uma maior relação entre a expressão citoplasmática forte da proteína e o infiltrado inflamatório escasso (52,6%); já a expressão citoplasmática fraca de VEGF mostra maior relação com a presença do infiltrado inflamatório moderado (66,7%).

Tabela 15. Análise das expressões negativa e positiva, fraca e forte de VEGF citoplasmática e as correlações com as características clinicopatológicas em pacientes com CEC oral.

Características clinicopatológicas	Expressão VEGF Citoplasmática									
	Negativo		Positivo		<i>p</i>	Fraca		Forte		<i>p</i>
	No.	(%)	No.	(%)		No.	(%)	No.	(%)	
Tamanho do tumor (pT) *										
pT1, pT2	13	54,2	16	57,1	0,124	3	33,3	13	68,4	0,115
pT3	5	20,8	1	3,6		1	11,1	0	0,0	
pT4	6	25,0	11	39,3		5	55,6	6	31,6	
Linfonodos (pN) *										
Negativo	13	54,2	20	71,4	0,197	7	77,8	13	68,4	0,484
Positivo	11	45,8	8	28,6		2	22,2	6	31,6	
Grau de diferenciação										
Bem	15	62,5	10	35,7	<u>0,035</u>	3	33,3	7	36,8	0,600
Moderadamente	8	33,3	18	64,3		6	66,7	12	63,2	
Não avaliado	1	4,2	0	0,0		0	0,0	0	0,0	
Invasão linfática										
Ausente	15	62,5	20	71,4	0,464	6	66,7	14	73,7	0,428
Presente	3	12,5	7	25,0		3	33,3	4	21,1	
Não avaliado	6	25,0	1	3,6		0	0,0	1	5,3	
Invasão perineural										
Ausente	14	58,3	15	53,6	0,356	4	44,4	11	57,9	0,396
Presente	7	29,2	13	46,4		5	55,6	8	42,1	
Não avaliado	3	12,5	0	0,0		0	0,0	0	0,0	
Infiltrado inflamatório										
Escasso	6	25,0	11	39,3	0,742	1	11,1	10	52,6	<u>0,038</u>
Moderado	10	41,7	11	39,3		6	66,7	5	26,3	
Intenso	2	8,3	3	10,7		0	0,0	3	15,8	
Não avaliado	6	25,0	3	10,7		2	22,2	1	5,3	
Total	24	46,2	28	53,8		9	32,1	19	67,9	

p: valor de significância, *p*<0,05; *: TNM 7ª edição; **Não avaliado**: valores não incluídos nos cálculos estatísticos.

4.5. Prognóstico

As frequências das expressões citoplasmáticas de VEGF, PAI-1 e CA-IX e das expressões membranares de PAI-1 e CA-IX foram relacionadas com o prognóstico apresentado por pacientes com CEC oral (Tabelas: 16, 17, 18, 19, 20 e 21).

Na tabela 16 é encontrado um valor de p próximo à significância referente às expressões negativa e positiva de CA-IX citoplasmática e ao óbito ($p=0,091$): os resultados mostraram que 62,2% dos indivíduos com expressão citoplasmática negativa de CA-IX não apresentaram óbito pela doença. Já para a expressão positiva da proteína, 60% dos casos que a apresentaram vieram a óbito.

Tabela 16. Análise das expressões negativa e positiva, fraca e forte de CA-IX citoplasmática em pacientes com CEC oral e as correlações com o prognóstico.

Prognóstico	Expressão CA-IX Citoplasmática									
	Negativo		Positivo		<i>p</i>	Fraca		Forte		<i>p</i>
	No.	(%)	No.	(%)		No.	(%)	No.	(%)	
Recidiva geral										
Não	17	45,9	6	40,0	0,577	5	38,5	1	50,0	*
Sim	18	48,6	9	60,0		8	61,5	1	50,0	
Não avaliado	2	5,4	0	0,0		0	0,0	0	0,0	
Recidiva local										
Não	19	51,4	7	46,7	0,640	5	38,5	1	50,0	*
Sim	11	29,7	4	26,7		8	61,5	1	50,0	
Não avaliado	7	18,9	4	26,7		0	0,0	0	0,0	
Óbito										
Não	23	62,2	6	40,0	0,091	5	38,5	1	50,0	*
Sim	12	32,4	9	60,0		8	61,5	1	50,0	
Não avaliado	2	5,4	0	0,0		0	0,0	0	0,0	
Total	37	71,2	15	28,8		13	86,7	2	13,3	

p: valor de significância, $p < 0,05$;

*: valor indefinido - número pequeno de indivíduos com expressão positiva forte;

Não avaliado: valores não incluídos nos cálculos estatísticos.

Na tabela 17 são apresentadas as correlações entre o prognóstico e as expressões membranares de CA-IX: foi observado um valor de p próximo à significância referente às expressões negativa e positiva de CA-IX membranas e à recidiva local ($p=0,054$). Apesar de não ser significativo, o resultado sugere que a expressão membranares positiva de CA-IX apresenta uma relação com a não ocorrência de recidiva local (57,7%).

Na tabela 18 são apresentadas as correlações entre o prognóstico e as expressões citoplasmáticas de PAI-1. Porém, não são observados valores de p significantes para a expressão citoplasmática da proteína.

Tabela 17. Análise das expressões negativa e positiva, fraca e forte de CA-IX membranar em pacientes com CEC oral e as correlações com o prognóstico.

Prognóstico	Expressão CA-IX Membranar									
	Negativo		Positivo		<i>p</i>	Fraca		Forte		<i>p</i>
	No.	(%)	No.	(%)		No.	(%)	No.	(%)	
Recidiva geral										
Não	11	42,3	12	46,2	0,776	9	47,4	3	42,9	0,550
Sim	14	53,8	13	50,0		9	47,4	4	57,1	
Não avaliado	1	3,8	1	3,8		1	5,3	0	0,0	
Recidiva local										
Não	11	42,3	15	57,7	0,054	12	63,2	3	42,9	0,070
Sim	11	42,3	4	15,4		1	5,3	3	42,9	
Não avaliado	4	15,4	7	26,9		6	31,6	1	14,3	
Óbito										
Não	16	61,5	13	50,0	0,390	10	52,6	3	42,9	0,449
Sim	9	34,6	12	46,2		8	42,1	4	57,1	
Não avaliado	1	3,8	1	3,8		1	5,3	0	0,0	
Total	26	50,0	26	50,0		19	73,1	7	26,9	

p: valor de significância, $p < 0,05$;

Não avaliado: valores não incluídos nos cálculos estatísticos.

Tabela 18. Análise das expressões negativa e positiva, fraca e forte de PAI-1 citoplasmática em pacientes com CEC oral e as correlações com o prognóstico.

Prognóstico	Expressão PAI-1 Citoplasmática									
	Negativo		Positivo		<i>p</i>	Fraca		Forte		<i>p</i>
	No.	(%)	No.	(%)		No.	(%)	No.	(%)	
Recidiva geral										
Não	4	50,0	19	43,2	0,552	6	33,3	13	50,0	0,429
Sim	4	50,0	23	52,3		10	55,6	13	50,0	
Não avaliado	0	0,0	2	4,5		2	11,1	0	0,0	
Recidiva local										
Não	5	62,5	21	47,7	0,490	6	33,3	15	57,7	0,549
Sim	2	25,0	13	29,5		5	27,8	8	30,8	
Não avaliado	1	12,5	10	22,7		7	38,9	3	11,5	
Óbito										
Não	6	75,0	23	52,3	0,254	8	44,4	15	57,7	0,626
Sim	2	25,0	19	43,2		8	44,4	11	42,3	
Não avaliado	0	0,0	2	4,5		2	11,1	0	0,0	
Total	8	15,4	44	84,6		18	40,9	26	59,1	

p: valor de significância, $p < 0,05$;

Não avaliado: valores não incluídos nos cálculos estatísticos.

Na tabela 19 são apresentadas as correlações entre o prognóstico e as expressões membranares de PAI-1: foi observada uma relação significativa entre a recidiva local e as expressões negativa e positiva da proteína ($p=0,027$), o que aponta para uma forte relação entre a expressão membranares negativa de PAI-1 (71,4%) e a não ocorrência de recidiva local. A análise multivariada confirmou essa relação e mostrou que a expressão membranares positiva de PAI-1, em CEC oral, aumenta o risco para a ocorrência de recidiva local em aproximadamente 14x (OR=14,49; IC=1,40-150,01) (Tabela 20).

Como a análise bivariada mostrou uma tendência à significância referente às expressões negativa e positiva de CA-IX membranares e a ocorrência de recidiva local (Tabela 17), na tabela 20 também foi realizada uma análise multivariada referente a esse evento. A regressão logística multivariada não confirmou a relação de significância ($p=0,055$). Contudo, os resultados sugerem que a expressão membranares positiva de CA-IX age como um fator de proteção para a ocorrência de recidiva local e protege em até 4x (OR=0,22; IC=0,05-1,04).

Na tabela 21 são apresentadas as correlações entre o prognóstico e as expressões citoplasmáticas de VEGF. Porém, não foram observados valores de p significantes para a expressão citoplasmática da proteína.

Tabela 19. Análise das expressões negativa e positiva, fraca e forte de PAI-1 membranar em pacientes com CEC oral e as correlações com o prognóstico.

Prognóstico	Expressão PAI-1 Membranar									
	Negativo		Positivo		<i>p</i>	Fraca		Forte		<i>p</i>
	No.	(%)	No.	(%)		No.	(%)	No.	(%)	
Recidiva geral										
Não	9	64,3	14	36,8	0,105	10	47,6	9	52,9	0,789
Sim	5	35,7	22	57,9		9	42,9	8	47,1	
Não avaliado	0	0,0	2	5,3		2	9,5	0	0,0	
Recidiva local										
Não	10	71,4	16	42,1	<u>0,027</u>	8	38,1	8	47,1	0,695
Sim	1	7,1	14	36,8		8	38,1	6	35,3	
Não avaliado	3	21,4	8	21,1		5	23,8	3	17,6	
Óbito										
Não	10	71,4	19	50,0	0,190	10	47,6	9	52,9	0,985
Sim	4	28,6	17	44,7		9	42,9	8	47,1	
Não avaliado	0	0,0	2	5,3		2	9,5	0	0,0	
Total	14	26,9	38	73,1		21	55,3	17	44,7	

p: valor de significância, *p*<0,05;

Não avaliado: valores não incluídos nos cálculos estatísticos.

Tabela 20. Análise multivariada das expressões negativa e positiva de CA-IX membranar, PAI-1 membranar, do tratamento radioterápico e do risco para ocorrência de recidiva local.

Variáveis	Recidiva local	
	OR (IC 95%)	<i>p</i>
Expressão CA-IX Membranar		
Negativa	1	
Positiva	0,22 (0,05-1,04)	0,055
Expressão PAI-1 Membranar		
Negativa	1	
Positiva	<u>14,49 (1,40-150,01)</u>	<u>0,025</u>
Radioterapia		
Não	1	
Sim	0,32 (0,07-1,51)	0,152

p: valor de significância, $p < 0,05$;

OR: Odds Ratio;

IC: Intervalo de Confiança.

Tabela 21. Análise das expressões negativa e positiva, fraca e forte de VEGF citoplasmática em pacientes com CEC oral e as correlações com o prognóstico.

Prognóstico	Expressão VEGF Citoplasmática									
	Negativo		Positivo		<i>p</i>	Fraca		Forte		<i>p</i>
	No.	(%)	No.	(%)		No.	(%)	No.	(%)	
Recidiva geral										
Não	12	50,0	11	39,3	0,585	4	44,4	7	36,8	0,457
Sim	12	50,0	15	53,6		4	44,4	11	57,9	
Não avaliado	0	0,0	2	7,1		1	11,1	1	5,3	
Recidiva local										
Não	12	50,0	14	50,0	0,657	5	55,6	9	47,4	0,571
Sim	8	33,3	7	25,0		2	22,2	5	26,3	
Não avaliado	4	16,7	7	25,0		2	22,2	5	26,3	
Óbito										
Não	14	58,3	15	53,6	0,963	5	55,6	10	52,6	0,542
Sim	10	41,7	11	39,3		3	33,3	8	42,1	
Não avaliado	0	0,0	2	7,1		1	11,1	1	5,3	
Total	24	46,2	28	53,8		9	32,1	19	67,9	

p: valor de significância, $p < 0,05$;

Não avaliado: valores não incluídos nos cálculos estatísticos.

4.6. Sobrevidas

As curvas de sobrevida de Kaplan-Meier para as variáveis categóricas estudadas que apresentaram diferenças significativas estão representadas nas figuras 7 a 10:

Na figura 7 foi observada uma tendência à significância referente às expressões negativa e positiva de CA-IX citoplasmática e à Sobrevida Livre de Doença (LD) ($p=0,082$). Apesar de não ser significativa, em um período de 24 meses após a cirurgia, aproximadamente 56% dos pacientes com expressão citoplasmática positiva de CA-IX apresentaram algum tipo de recidiva. Em contrapartida, no mesmo período, aproximadamente 40% dos pacientes com expressão citoplasmática negativa de CA-IX recidivaram.

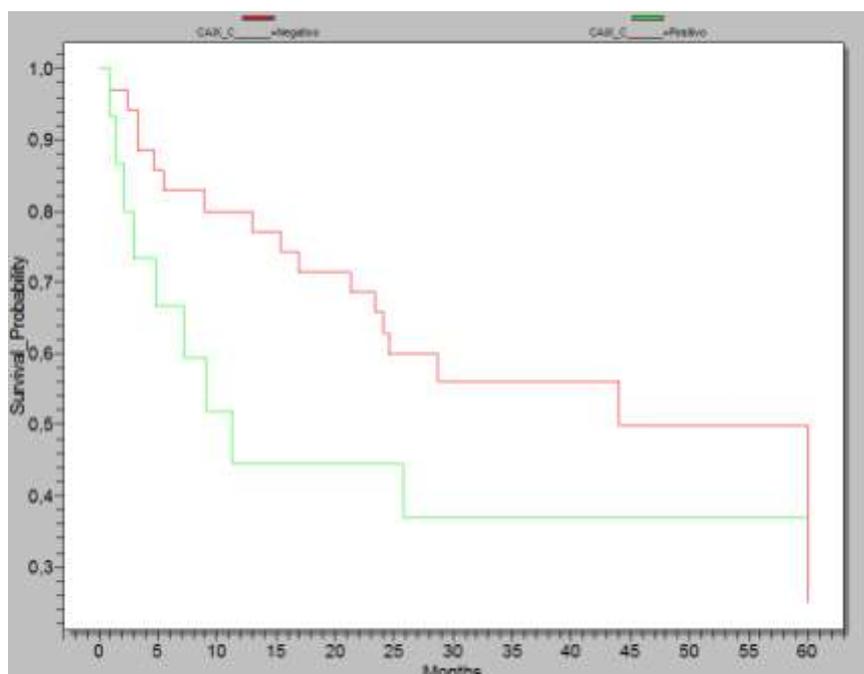


Figura 7. Sobrevida Livre de Doença (LD) para as expressões negativa e positiva de CA-IX citoplasmática em CEC oral. $p=0,082$.

As expressões positivas fraca e forte de CA-IX membranar mostraram significância com a Sobrevida Livre de Doença Local (LDL) ($p=0,038$). Em um período de 24

meses após a cirurgia, aproximadamente 55% dos pacientes com expressão positiva forte de CA-IX membranar apresentaram recidiva local. Em compensação, no mesmo período, apenas 7% dos pacientes com expressão positiva fraca de CA-IX recidivaram (Figura 8). A análise multivariada não confirmou essa relação (HR=7,58; IC=0,76-75,33) (Tabela 22).

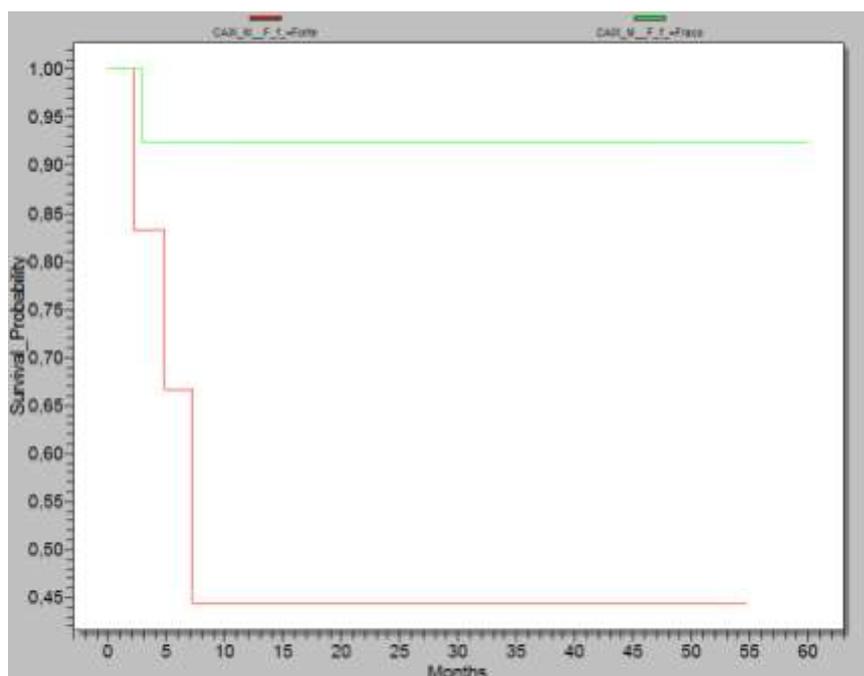


Figura 8. Sobrevida Livre de Doença Local (LDL) para as expressões positiva fraca e positiva forte de CA-IX membranar em CEC oral. $p=0,038$.

Na figura 9 foi observada uma tendência à significância referente às expressões negativa e positiva de PAI-1 membranar e à Sobrevida Livre de Doença Local ($p=0,072$). Embora não significativa, em um período de 24 meses após a cirurgia, aproximadamente 43% dos pacientes com expressão membranar positiva de PAI-1 apresentaram recidiva local. Já para a expressão membranar negativa de PAI-1, no mesmo período, aproximadamente 9% recidivaram.

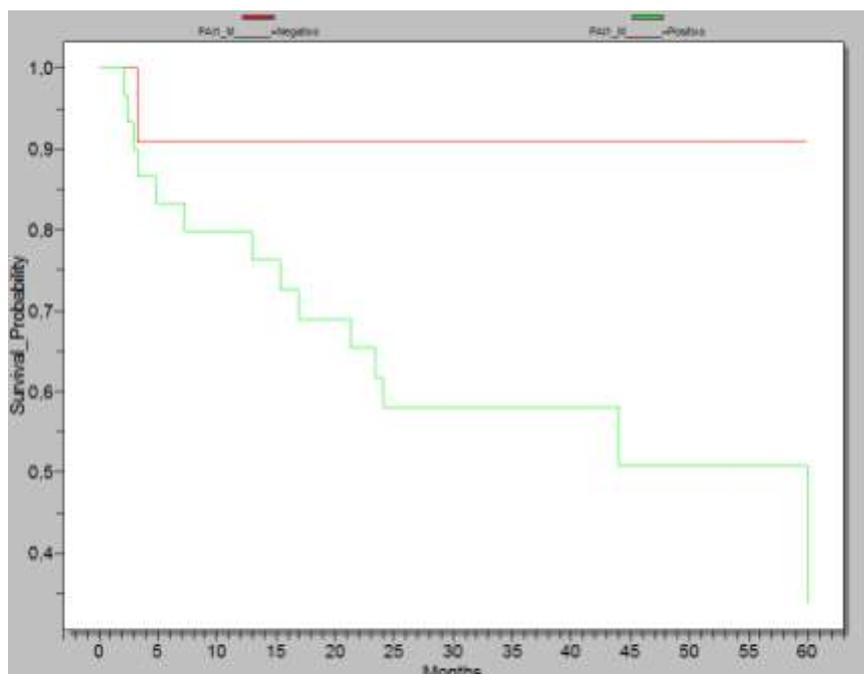


Figura 9. Sobrevida Livre de Doença Local (LDL) para as expressões negativa e positiva de PAI-1 membranar em CEC oral. $p=0,072$.

As expressões citoplasmáticas negativa e positiva de CA-IX apresentaram significância com a Sobrevida Doença Específica (DE) ($p=0,022$). Em um período de 36 meses após a cirurgia, aproximadamente 64% dos pacientes com expressão positiva de CA-IX citoplasmática vieram a óbito pelo câncer. Em relação à expressão negativa da proteína, no mesmo período, 37% dos pacientes apresentaram óbito decorrente da doença (Figura 10). A análise multivariada confirmou a expressão citoplasmática de CA-IX como um fator de risco para a ocorrência de óbito doença específica, aumentando esse risco em aproximadamente 3x (HR=2,84; IC=1,02-7,87) (Tabela 22).

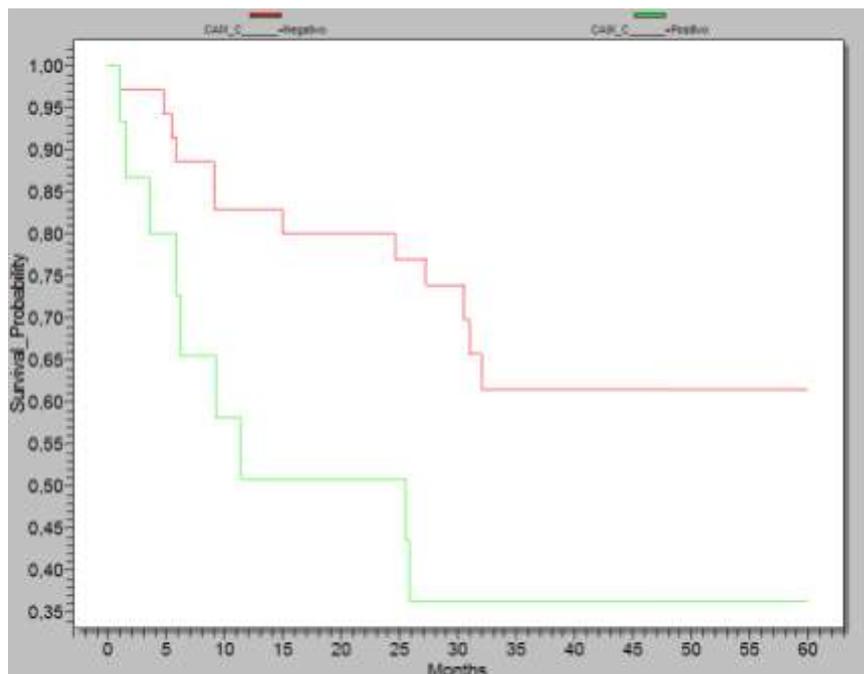


Figura 10. Sobrevida Doença Específica (DE) para as expressões negativa e positiva de CA-IX citoplasmática em CEC oral. $p=0,022$.

A análise multivariada também confirmou o tamanho do tumor como uma variável significativa para a Sobrevida Doença Específica (DE) ($p=0,040$). Os resultados mostraram que o tamanho pT3 representa um fator de risco para a ocorrência de óbito pelo câncer e aumenta esse risco em aproximadamente 3x (HR=3,39; IC=1,06-10,89) (Tabela 22).

Tabela 22. Análise multivariada das expressões citoplasmáticas e membranares de CA-IX, do tamanho do tumor, do tratamento radioterápico e das sobrevidas livre de doença local e doença específica.

Variáveis	Cox Proportional Survival			
	Livre de doença local		Doença específica	
	HR (IC 95%)	<i>p</i>	HR (IC 95%)	<i>p</i>
Expressão CA-IX Membranar				
Fraco	1		-	-
Forte	7,58 (0,76-75,33)	0,084	-	-
Expressão CA-IX Citoplasmática				
Negativa	-	-	1	
Positiva	-	-	<u>2,84 (1,02-7,87)</u>	<u>0,045</u>
Tamanho do tumor[‡]				
pT1, pT2	-	-	1	
pT3	-	-	<u>3,39 (1,06-10,89)</u>	<u>0,040</u>
pT4	-	-	1,71 (0,62-4,70)	0,297
Radioterapia				
Não	1		1	
Sim	0,36 (0,04-3,57)	0,380	0,54 (0,19-1,52)	0,246

p: valor de significância, *p*<0,05;

[‡]: TNM 7^a edição;

HR: Hazard ratio;

IC: Intervalo de Confiança.

5. DISCUSSÃO

O carcinoma epidermoide de cavidade oral é uma causa significativa de morbidade e mortalidade e um dos principais fatores relacionados com a gênese da doença é o tabagismo. Este é responsável pelo aumento de alterações moleculares nas células do epitélio bucal e estas apresentam maior probabilidade de sofrerem transformações malignas. Além disso, o cigarro contém substâncias cancerígenas que estão associadas com o declínio da expressão de supressores tumorais, de genes envolvidos com o reparo do DNA e com o aumento das concentrações intracelulares de HIF1 α (SCHEIDT et al., 2013).

A resposta das células à condição de hipóxia é caracterizada por alterações específicas na expressão de um grande número de genes, mas também pode ser induzida por metais, como o cobalto e o níquel, e pela nicotina (SALNIKOW; ZHITKOVICH, 2008; CHEN; COSTA, 2009; WARREN et al., 2012). Assim, uma das mudanças mais importantes nas células após exposição aos componentes do tabaco é o acúmulo de HIF1 α , culminando na expressão dos mais de 100 genes envolvidos na via de hipóxia, dentre esses: VEGF, PAI-1 e CA-IX (SALNIKOW; ZHITKOVICH, 2008).

No CEC oral, hipóxia e densidade vascular reduzida estão relacionadas a um pior prognóstico e são responsáveis pela resistência à quimioterapia e radioterapia, uma vez que esses tratamentos contam com a geração de espécies reativas de oxigênio (ROS) para induzirem danos letais às células tumorais (TOMIDA; TSURUO, 1999). Estudos anteriores de nosso grupo mostraram que a elevada expressão de HIF1 α apresenta relação com a maior sobrevida dos pacientes submetidos à radioterapia ($p=0,015$) e com a menor recidiva local ($p=0,002$) (SANTOS et al., 2012), eventos decorrentes da maior expressão de VEGF, em virtude da ativação do complexo HIF-1 (ARTMAN et al., 2009; BAYER et al., 2012). No entanto, apesar de favorecer a angiogênese e aumentar a oxigenação tumoral, o que gera melhores respostas terapêuticas, a expressão de VEGF também está relacionada com eventos metastáticos e com o crescimento tumoral (SCHEIDT et al., 2013).

Com o intuito de compreender o papel do tabaco na expressão dos genes de hipóxia, neste estudo foi observada a relação entre o hábito tabagista e as expressões tumorais de VEGF, PAI-1 e CA-IX, cujas transcrições são influenciadas pelos níveis citoplasmáticos de HIF1 α . Apesar das correlações entre o tabagismo e as expressões das proteínas não terem apresentado resultados estatisticamente significantes, acredita-se que este evento foi decorrente da casuística do trabalho, que é composta por 16 (30,8%) pacientes do sexo masculino e por 36 (69,2%) do sexo feminino e destes 52 indivíduos, 21(40,4%) são tabagistas e 31(59,6%) não fumam a um ano completo. Sabe-se que o consumo de tabaco entre homens é maior do que entre mulheres (INCA, 2014). Além disso, o maior número de não fumantes também pode ter influenciado à não significância dos resultados.

Em relação às características clínicas e patológicas, foi observada uma associação entre o grau de diferenciação tumoral e as expressões negativa e positiva de VEGF: tumores moderadamente diferenciados foram associados com a expressão positiva da proteína e tumores bem diferenciados com a ausência da expressão. Este resultado corrobora com Bowden et al. (2002) e Sun et al. (2013), que observaram uma relação positiva entre a expressão de VEGF e o baixo grau de diferenciação celular em CECP e em carcinoma de células transicionais da bexiga, respectivamente. Sabe-se que células tumorais bem diferenciadas compõem tumores menos agressivos, pois apresentam características semelhantes às células constituintes do tecido normal (FERREIRA; ROCHA, 2010). Desta forma, a expressão positiva de VEGF é um marcador biológico para a agressividade tumoral em CEC oral.

Além das células residentes, no tecido conjuntivo também são encontradas células transientes, que saem dos vasos sanguíneos e vão ao encontro dos locais de inflamação. Os sinais químicos emitidos por essas células, principalmente pelos macrófagos, atraem mais leucócitos e o acúmulo destes no local da resposta inflamatória recebe o nome de infiltrado inflamatório (ABBAS; LICHTMAN, 2007).

Neste contexto, várias pesquisas foram realizadas buscando detalhes a cerca da participação do infiltrado inflamatório, presente tanto no sangue periférico, como nas adjacências da neoplasia: em 1983, Bier chamou a atenção para o fato de que a

quantidade de linfócitos presente no sangue de pacientes com CECP era menor, quando comparado com pessoas saudáveis, o que levanta o questionamento a cerca da ocorrência de uma supressão imune pré-existente exercendo influências sobre o processo de tumorigênese. Esta situação também foi reportada por Balaram e Vasudevan no mesmo ano, os quais relataram que o sangue de pacientes com carcinoma de cavidade oral apresenta desequilíbrios na contagem de linfócitos.

Desta forma, ao serem analisadas as expressões citoplasmáticas de VEGF e a presença do infiltrado inflamatório em CEC oral, se evidencia uma relação positiva entre a expressão citoplasmática forte de VEGF e o infiltrado inflamatório escasso; e entre a expressão citoplasmática fraca da proteína e a presença do infiltrado inflamatório moderado. O infiltrado inflamatório escasso está relacionado com tumores mais agressivos. No entanto, as células inflamatórias presentes tanto em sítios tumorais como no sangue periférico de pacientes com CECP, nem sempre atuam na defesa anti-neoplásica e as evidências demonstram que a resposta inflamatória pode estar fortemente relacionada com a iniciação, promoção e progressão dos carcinomas, a depender de características específicas, como por exemplo, do tipo do infiltrado celular e de determinadas citocinas produzidas (BRYNE, 1998; COSTA et al., 2005). Por fim, Allon et al. (2013) também observaram uma positividade do VEGF referente ao infiltrado inflamatório em sialometaplasia necrosante.

A proteólise e mais especificamente, o sistema fibrinolítico uPA/uPAR/PAI-1, desempenha um papel fundamental na tumorigênese, na formação de metástases, na progressão e invasão tumoral. Paradoxalmente, estudos apontam para a correlação entre os elevados níveis de PAI-1 e piores prognósticos em CECP, em carcinoma invasivo da mama, carcinoma colorretal, em câncer do endométrio e de ovário, em carcinoma de células renais, em câncer gástrico, do trato urinário, do sistema nervoso, câncer de pulmão, melanoma, leucemia, dentre outros (ROMER et al., 2001; TECIMER et al., 2002; AREF et al., 2003; HJORTLAND et al., 2003; WERLE et al., 2004; OHBA et al., 2005; LUEBKE et al., 2006; INOUE et al., 2007; JANKUN et al., 2007; IACOVIELLO et al., 2013). É reconhecido, que certos inibidores de proteases endógenas, tais como o PAI-1, promovem a metástase tumoral ao invés de inibi-la e que este fenômeno não é um evento de causa única,

estando envolvido em diversos processos da gênese tumoral, como angiogênese e metástase. Assim, no que diz respeito ao PAI-1, em relação aos efeitos da proteína sobre as células tumorais, a maioria dos dados apontam para um mecanismo que envolve a ligação do complexo uPA/PAI-1 ao LRP-1 (Proteína-1 relacionada ao Receptor de Lipoproteína de Baixa Densidade). Deste modo, um sítio de ligação do PAI-1 ao LRP-1 seria revelado depois da formação do complexo uPA/uPAR e após a ligação do PAI-1 a este sítio, a modulação da sinalização iniciada por uPA ocorreria, com ativação das cascatas de sinalização, principalmente das vias MAP quinases (Proteínas quinases ativadas por mitógenos) e JAK/STAT [(Proteína Janus Kinase) / (Transdutores de sinais e ativadores de transcrição)], que induziriam mudanças na migração e na adesão celular. Após a ligação do PAI-1 ao LRP-1 não ocorreria a internalização do complexo uPA/uPAR/PAI-1 e não haveria degradação lisossomal das proteínas. Assim, o PAI-1 secretado pelas células tumorais estimularia a angiogênese de forma parácrina, o que garantiria um aporte de oxigênio e nutrientes suficientes para o crescimento tumoral e de uma maneira autócrina modularia a sinalização celular, o que apontaria para um aumento da migração e da adesão, refletido pelo aumento da formação de metástases (BINDER; MIHALY, 2008).

Neste estudo, não foram observadas diferenças estatísticas entre as expressões citoplasmáticas e membranares de PAI-1. Porém, níveis elevados dessas expressões foram significativamente associados com tumores moderadamente diferenciados, enquanto que as expressões citoplasmáticas e membranares fracas foram predominantes em tumores bem diferenciados. Este resultado é apoiado pelas frequências de linfonodos acometidos e da invasão perineural, que mostram uma maior tendência da expressão citoplasmática forte de PAI-1 para a ocorrência de tais eventos e estes resultados vão ao encontro da literatura (FOX et al., 2001; TECIMER et al., 2002; HUNDSDORFER et al., 2005; INOUE et al., 2007; JING et al., 2012).

As ausências das expressões citoplasmáticas e membranares de PAI-1 apresentaram maior relação com a presença do infiltrado inflamatório escasso; já as expressões positivas estiveram principalmente relacionadas com o infiltrado inflamatório moderado. Estes resultados sugerem que as alterações na matriz extracelular (degradação e remodelação) contribuem com a formação do infiltrado

inflamatório e que tais alterações são causadas, principalmente, pela maior expressão de PAI-1 nas células tumorais. Isto foi evidenciado por Eddy e Giachelli, em 1995, e como já foi mencionado, as células inflamatórias presentes tanto em sítios tumorais, como no sangue periférico de pacientes com CECP, nem sempre atuam na defesa anti-neoplásica e podem estar fortemente relacionadas com a iniciação, promoção e progressão dos carcinomas (BRYNE, 1998; COSTA et al., 2005).

Observou-se também uma associação positiva entre as expressões membranares fraca e forte de PAI-1 e o tamanho tumoral. O resultado indicou que quanto maior o nível de expressão membranar de PAI-1, maior o tumor. Da mesma forma, quanto menor o nível de expressão membranar da proteína, menores são as dimensões tumorais. Inoue et al. (2007) e Jing et al. (2012) também observaram um crescimento tumoral com elevados níveis de PAI-1.

Além disso, foi significativa a relação entre a expressão membranar negativa da proteína e a não ocorrência de recidiva local. A análise multivariada confirmou essa associação e mostrou que a expressão membranar positiva de PAI-1 aumenta o risco para a ocorrência de recidiva local em aproximadamente 14x. Da mesma forma, as curvas de sobrevida mostraram que a expressão membranar positiva de PAI-1 apresenta forte relação com a Sobrevida Livre de Doença Local (LDL) e aproximadamente 43% dos pacientes com expressão positiva da proteína apresentaram recidiva local. Tecimer et al. (2002), Ohba et al. (2005), Hundsdorfer et al. (2005) e Inoue et al. (2007) observaram que a expressão positiva de PAI-1 é um preditor de pior sobrevida em câncer do endométrio, em carcinoma de células renais e em carcinoma epidermoide de cavidade oral. Além do mais, pacientes que apresentam menores níveis de uPA/PAI-1 nos tumores primários exibem melhores taxas de sobrevida quando comparados aos que apresentam níveis mais elevados (HARBECK et al., 2004).

A CA-IX é encontrada com maior frequência na membrana externa, porém, estudos também indicam as localizações citoplasmática e nuclear para a proteína (DUNGWA et al., 2012). Neste trabalho, os dados confirmam a existência de diferenças biológicas entre as expressões citoplasmática e membranar de CA-IX. Contudo, não

foram analisadas as influências da união das expressões em células tumorais que as apresentam.

Assim, a expressão citoplasmática positiva de CA-IX mostrou relação significativa com a ocorrência de linfonodos acometidos. Embora a análise multivariada não tenha confirmado essa relação, em uma casuística maior, na qual os valores seguissem as proporções apresentadas, essa expressão apontaria para um aumento de risco, em torno de 3x, referente à ocorrência de linfonodos cervicais acometidos. Eynden et al. (2005), Birner et al. (2011) e Kajo et al. (2013) também relacionaram a expressão citoplasmática positiva de CA-IX com a ocorrência de tal evento.

Além disso, a expressão citoplasmática positiva de CA-IX apresentou associação com a ocorrência de invasão perineural. Para o grau de diferenciação, a expressão membranar negativa de CA-IX tem maior relação com tumores moderadamente diferenciados, enquanto que a expressão membranar positiva da proteína apresenta associação com tumores bem diferenciados. Não foram encontrados trabalhos relacionando a expressão de CA-IX e a invasão perineural. Para o grau de diferenciação tumoral, Kajo e colaboradores (2013) mostraram que em carcinoma invasivo da mama, a expressão CA-IX positiva apresenta relação com essa variável.

Neste trabalho, a expressão membranar negativa de CA-IX foi predominante nos casos com infiltrado inflamatório intenso. Em compensação, nos casos com infiltrados inflamatórios escassos e moderados, houve uma maior frequência da expressão membranar positiva da proteína. Estes resultados indicam que a expressão de CA-IX inibe a formação do infiltrado inflamatório, por alterar o pH tecidual, em virtude da homeostase tumoral. Assim, a diminuição do pH, ocasionada pela hidratação do CO₂, diminui o recrutamento das células de defesa, o que contribui com a evolução da tumorigênese (SUPURAN, 2008).

Da mesma forma como a expressão membranar positiva de CA-IX apresentou maior relação com tumores bem diferenciados, tal expressão também mostrou uma associação com a não ocorrência de recidiva local e estes resultados estão envolvidos com melhores prognósticos. Embora a regressão logística multivariada

não tenha confirmado a relação de significância, os valores sugerem que a expressão positiva de CA-IX membranar age como um fator de proteção para a ocorrência de recidiva local e protege em até 4x. Em relação à Sobrevida Livre de Doença Local (LDL), aproximadamente 55% dos pacientes com expressão positiva forte de CA-IX membranar apresentaram recidiva local. Em compensação, no mesmo período, apenas 7% dos pacientes com expressão positiva fraca de CA-IX recidivaram. Estes resultados corroboram com Perez-Sayans et al. (2012), que observaram uma sobrevida inferior para os pacientes com expressão forte de CA-IX e prognósticos melhores para os pacientes com expressão fraca ou negativa da proteína.

Além disso, foi observada uma tendência à significância referente à expressão citoplasmática positiva de CA-IX e à Sobrevida Livre de Doença (LD). Apesar de não ser significativa, aproximadamente 56% dos pacientes com expressão positiva apresentaram algum tipo de recidiva. Choi et al. (2008) e Birner et al. (2011) também relacionaram a expressão citoplasmática positiva de CA-IX com piores prognósticos referentes à recidiva geral.

Os resultados também mostraram que 60% dos indivíduos com expressão citoplasmática positiva de CA-IX vieram a óbito pela doença. Em relação às curvas de sobrevida, essa expressão de CA-IX apresentou significância referente à Sobrevida Doença Específica (DE). Assim, aproximadamente 64% dos pacientes com expressão positiva de CA-IX citoplasmática vieram a óbito decorrente da doença. A análise multivariada confirmou a expressão citoplasmática de CA-IX como um fator de risco para a ocorrência de óbito doença específica, aumentando esse risco em aproximadamente 3x. Kappler et al. (2008) e Eckert et al. (2010) também observaram uma relação de positividade entre a expressão citoplasmática de CA-IX e o óbito em carcinoma epidermoide de cavidade oral.

Por fim, a análise multivariada também confirmou o tamanho do tumor como uma variável significativa com a Sobrevida Doença Específica (DE) e os resultados mostraram que o tamanho pT3 representa um fator de risco para a ocorrência de óbito pelo câncer e aumenta esse risco em aproximadamente 3x. Sabe-se que há tumores com espectro bem diferenciado, localizados, com crescimento lento, pouco

agressivos e esses são de grau 1. Já os de grau 2 são um pouco mais agressivos, com uma taxa maior de invasão no tecido normal e costumam reincidir. Nos casos de grau 3 é necessário o tratamento complementar, além da cirurgia, pois há uma malignidade maior. Finalmente, o tumor de grau 4 se espalha rapidamente, invadindo outros tecidos. Entre os tumores de baixo grau (1 e 2), o índice de recidiva é entre 30% e 50%, mesmo com o tratamento adequado. Já em casos de alto grau (3 e 4), a probabilidade de recidiva é maior, chegando a quase 100%, e a taxa de óbito decorrente da doença é elevada (FERREIRA; ROCHA, 2010).

6. CONCLUSÕES

Neste estudo, as análises de VEGF, CA-IX e PAI-1 foram efetuadas por meio de imuno-histoquímica, com o intuito de observar as influências dessas proteínas nas características clinicopatológicas e no prognóstico de pacientes com CEC oral, bem como observar a atuação dos constituintes do tabaco na gênese tumoral. Diante dos resultados, conclui-se que:

- Não foram encontradas significâncias estatísticas entre o hábito tabagista e as expressões de VEGF, PAI-1 e CA-IX, no entanto, acredita-se que este resultado foi decorrente da composição da casuística do trabalho;
- A frequência de positividade da expressão CA-IX confirmou a existência de diferenças biológicas entre as expressões negativa e positiva da proteína ($p=0,027$);
- Em relação às características clinicopatológicas, o grau de diferenciação tumoral apresentou uma associação significativa com as expressões citoplasmáticas negativa e positiva de VEGF ($p=0,035$) e também foi observada uma relação significativa entre a presença do infiltrado inflamatório e as expressões positivas fraca e forte da proteína ($p=0,038$);
- O nível da expressão citoplasmática de PAI-1 mostrou relação significativa com o grau de diferenciação tumoral ($p=0,027$) e as expressões citoplasmática e membranar da proteína apresentaram positividade referente ao infiltrado inflamatório ($p=0,013$; $p=0,033$, respectivamente);
- A expressão citoplasmática positiva de CA-IX mostrou uma associação com a ocorrência de linfonodos acometidos ($p=0,025$) e a análise multivariada não confirmou essa associação (OR=3,62; IC= 0,99-13,20). Além disso, a expressão membranar da proteína foi significativamente relacionada com a presença do infiltrado inflamatório ($p=0,044$);

- Em relação ao prognóstico, a recidiva local apresentou uma associação com as expressões membranares negativa e positiva de PAI-1 ($p=0,027$). A análise multivariada confirmou essa relação e mostrou que a expressão membranares positiva da proteína aumenta o risco para a ocorrência de recidiva local em aproximadamente 14x (OR=14,49; IC=1,40-150,01);
- Em relação às curvas de sobrevida, as expressões positivas fraca e forte de CA-IX membranares apresentaram significância referente à Sobrevida Livre de Doença Local (LDL) ($p=0,038$). No entanto, a análise multivariada não confirmou essa relação (HR=7,58; IC=0,76-75,33);
- As expressões citoplasmáticas negativa e positiva de CA-IX foram significativamente associadas à Sobrevida Doença Específica (DE) ($p=0,022$) e a análise multivariada confirmou a expressão citoplasmática de CA-IX como um fator de risco para a ocorrência de óbito doença específica, aumentando esse risco em aproximadamente 3x (HR=2,84; IC=1,02-7,87).

7. REFERÊNCIAS

ABBAS, A.K.; LICHTMAN, A.H. **Imunologia Básica: funções e distúrbios do sistema imunológico**. Elsevier. 2007. 323p.

AGGARWAL, M.; BOONE, C.D.; KONDETI, B.; MCKENNA, R. Structural annotation of human carbonic anhydrases. **Journal of Enzyme Inhibition and Medicinal Chemistry**, v.28, p.267–277, 2013.

ALLON, I.; KAPLAN, I.; ALLON, D.M.; VERED, H.; SHLOMI, B.; HIRSHBERG, A. HIF-1a, VEGF, and EGFR: contributing factors in the pathogenesis of necrotizing sialometaplasia. **Oral diseases**, 2013.

AREF, S.; EL-SHERBINY, M.; MABED, M.; MENESSY, A.; EL-REFAEI, M. Urokinase plasminogen activator receptor and soluble matrix metalloproteinase-9 in acute myeloid leukemia patients: a possible relation to disease invasion. **Hematology**, v.8, p.385–91, 2003.

ARTMAN, T.; SCHILLING, D.; GNANN, J.; MOLLS, M.; MULTHOFF, G.; BAYER, C. Irradiation-induced regulation of plasminogen activator inhibitor type-1 and vascular endothelial growth factor in six human squamous cell carcinoma lines of the head and neck. **Int. J. Radiation Oncology Biol. Phys.**, v.76, p. 574–582, 2010.

BALARAM, P.; VASUDEVAN, M. Quantification of Fc receptor-bearing T-lymphocytes (Tg and Tm) in oral cancer. **Cancer**, v.52, p.1873-1840, 1983.

BAYER, C.; KIELOW, A.; SCHILLING, D.; MAFTEI, C.A.; ZIPS, D.; YAROMINA, A.; BAUMANN, M.; MOLLS, M.; MULTHOFF, G. Monitoring PAI-1 and VEGF Levels in 6 Human Squamous Cell Carcinoma Xenografts During Fractionated Irradiation. **Int. J. Radiation Oncol. Biol. Phys.**, v.84, p.409-417, 2012.

BIER, J. The doubtful relevance of nonspecific immune reactive in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck region. **Cancer**, v.52, p.1165-1172, 1983.

BINDER, B.R.; MIHALY, J. The plasminogen activator inhibitor “paradox” in cancer. **Immunology Letters**, v.118, p.116–124, 2008.

BIRNER, P.; JESCH, B.; FRIEDRICH, J.; RIEGLER, M.; ZACHERL, J.; HEJNA, M.; WRBA, F.; SCHULTHEIS, A.; SCHOPPMANN, S. Carbonic Anhydrase IX Overexpression is Associated with Diminished Prognosis in Esophageal Cancer and Correlates with Her-2 Expression. **Ann. Surg. Oncol.**, v.18, p.3330–3337, 2011.

BOWDEN, J.; BRENNAN, P.A.; UMAR, T.; CRONIN, A. Expression of vascular endothelial growth factor in basal cell carcinoma and cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck. **Journal of Cutaneous Pathology**, v.29, p.585-589, 2002.

BRAHIMI-HORN, M.C.; CHICHE, J.; POUYSSÉGUR, J. Hypoxia signaling controls metabolic demand. **Current Opinion in Cell Biology**, v.19, p.223–229, 2007.

BRAHIMI-HORN, M.C.; POUYSSÉGUR, J. HIF at a glance. **J Cell Sci**, v.122, 2009.
BRYNE, M. Is the invasive front of oral carcinoma the most important area for prognostication? **Oral Dis.**, v.4, p.70-77, 1998.

CAMPOS, A.H.; ALDRED, V.L.; RIBEIRO, K.C.; VASSALLO, J.; SOARES, F.A. Role of immunoexpression of nitric oxide synthases by Hodgkin and Reed-Sternberg cells on apoptosis deregulation and on clinical outcome of classical Hodgkin lymphoma. **Mol Cell Biochem**, v.321, p.95-102, 2009.

CARMELIET, P.; JAIN, R. Molecular mechanisms and clinical applications of angiogenesis. **Nature**, v.473, 2011.

CHEN, H.; COSTA, M. Iron- and 2-oxoglutarate-dependent Dioxygenases: an emerging group of molecular targets for nickel toxicity and carcinogenicity. **Biomaterials**, v.22, p.191-196, 2009.

CHEN, H.; KE, Q.; KLUZ, T.; YAN, Y.; COSTA, M. Nickel ions increase histone H3 lysine 9 demethylation and induce transgene silencing. **Mol Cell Biol.**, v. 26, p.3728-37, 2006.

CHOI, S.; KIM, J.; PARK, J.; CHA, I.; KIM, J.; LEE, S. Expression of carbonic anhydrase IX is associated with postoperative recurrence and poor prognosis in surgically treated oral squamous cell carcinoma. **Human Pathology**, v.39, p.1317-1322, 2008.

COSTA, A.L.L.; ARAÚJO-JUNIOR, R.; RAMOS, C. Correlação entre a classificação clínica TNM e as características histopatológicas de malignidade do carcinoma epidermoide oral. **Rev. Bras. Otorrinolaringologia**, v.71, p.181-187, 2005.

DAVIDSON, T. L.; CHEN, H.; DI TORO, D. M.; D'ANGELO, G.; COSTA, M. Soluble nickel inhibits HIF-prolyl-hydroxylases creating persistent hypoxic signaling in A549 cells. **Mol. Carcinog.**, v. 45, p. 479-489, 2006.

DASS, K.; AHMAD, A.; AZMI, A.S.; SARKAR, S.H; SARKA, F.H. Evolving role of uPA/uPAR system in human cancers. **Cancer Treatment Reviews**, v.34, p.122–136, 2008.

DENKHAUS, E.; SALNIKOW, K. **Crit. Rev. Oncol. Hematol.**, v. 42, p. 35–36, 2002.

DORSEY, K.; AGULNIK, M. Promising New Molecular Targeted Therapies in Head and Neck Cancer. **Drugs**, v.73, p.315–325, 2013.

DUNGWA, J.V.; HUNT, L.P.; RAMANI, P. Carbonic anhydrase IX up-regulation is associated with adverse clinicopathologic and biologic factors in neuroblastomas. **Human Pathology**, v.43, p.1651–1660, 2012.

ECKERT, A.W.; LAUTNER, M.H.W., SCHUTZE, A.; BOLTE, K.; BACHE, M.; KAPPLER, M.; SCHUBERT, J.; TAUBERT, H.; BILKENROTH, U. Co-expression of Hif1a and CAIX is associated with poor prognosis in oral squamous cell carcinoma patients. **J. Oral Pathol. Med.**, v.39, p.313–317, 2010.

EDDY, A.A.; GIACHELLI, C.M. Renal expression of genes that promote interstitial inflammation and fibrosis in rats with protein-overload proteinuria. **Kidney Int.**, v.47, p.1546-57, 1995.

EYNDEN, G.G.; AUWERA, I.; LAERE, S.J.; COLPAERT, C.G.; TURLEY, H.; HARRIS, A.L.; DAM, P.; DIRIX, L.Y.; VERMEULEN, P.B.; MARCK, E.A. Angiogenesis and hypoxia in lymph node metastases is predicted by the angiogenesis and hypoxia in the primary tumour in patients with breast cancer. **British Journal of Cancer**, v.93, p.1128 – 1136, 2005.

FARNEBO, L.; TIEFENBOCK, K.; ANSELL, A.; THUNELL, L.K.; GARVIN, S.; ROBERG, K. Strong expression of survivin is associated with positive response to radiotherapy and improved overall survival in head and neck squamous cell carcinoma patients. **Int. J. Cancer**, v.133, p. 1994–2003, 2013.

FERREIRA, C.G.; ROCHA, J.C.C. **Oncologia Molecular**. São Paulo: Editora Atheneu. 2010. 664p.

FOX, S.B.; TAYLOR, M.; GRONDAHL-HANSEN, J.; KAKOLYRIS, S.; GATTER, K.; HARRIS, A.L. Plasminogen activator inhibitor-1 as a measure of vascular remodeling in breast cancer. **Journal of Pathology**, v.195, p.236-243, 2001.

GIACOIA, E.G.; MIYAKE, M.; LAWTON, A. PAI-1 Leads to G1-phase Cell Cycle Progression through Cyclin D3/CDK4/6 Up-regulation. **Molecular Cancer Research**, 2014.

GILLISON, M.; BROUTIAN, T.; PICKARD, R.; TONG, Z.; XIAO, W.; KAHLE, L. Prevalence of oral HPV infection in the United States, 2009–2010. **JAMA**, v.307, p.693–703, 2012.

HAN, S.; CHEN, Y.; GE, X.; ZHANG, M.; WANG, J.; ZHAO, Q.; HE, J.; WANG, Z. Epidemiology and cost analysis for patients with oral cancer in a university hospital in China. **BMC Public Health**, v. 10, p. 196, 2010.

HARBECK, N.; KATES, R.E.; GAUGER, K.; WILLEMS, A.; KIECHLE, M.; MAGDOLEN, V.; SCHMITT, M. Urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-1: novel tumor-derived factors with a high prognostic and predictive impact in breast cancer. **Thromb. Haemost.**, v.91, p.450–6, 2004.

HASSAN, M.I.; SHAJEE, B.; WAHEED, A.; AHMAD, F.; SLY, W.S. Structure, function and applications of carbonic anhydrase isozymes. **Bioorganic e Medicinal Chemistry**, v.21, p.1570–1582, 2013.

HJORTLAND, G.O.; BJORNLAND, K.; PETTERSEN, S.; GARMAN-VIK, S.S.; EMILSEN, E.; NESLAND, J.M. Modulation of glioma cell invasion and motility by adenoviral gene transfer of PAI-1. **Clin. Exp. Metastasis**, v.20, p.301–9, 2003.

HO, Y.; TSAO, S.W.; ZEN, G.M.; LUI, V.W.Y. STAT3 as a therapeutic target for Epstein-Barr virus (EBV) – associated nasopharyngeal carcinoma. **Cancer Lett**, v.330, p.141–9, 2013.

HSU, H.W.; WALL, N.R.; HSUEH, C.T.; KING, S.; FERRIS, R.L.; CHEN, C.S.; MIRSHAHIDI, S. Combination antiangiogenic therapy and radiation in head and neck cancers. **Oral Oncology**, v.50, p.19-26, 2014.

HULIKOVA, A.; ZATOVICOVA, M.; SVASTOVA, E.; DITTE, P.; BRASSEUR, R.; KETTMANN, R.; SUPURAN, C.T.; KOPACEK, J.; PASTOREK, J.; PASTOREKOVA, S. Intact intracellular tail is critical for proper functioning of the tumor-associated, hypoxia-regulated carbonic anhydrase IX. **FEBS Letters**, v.583, p.3563-3568, 2009.

HUNSDORFER, B.; ZEILHOFER, H.F.; BOCK, K.P.; DETTMAR, P.; SCHMITT, M.; KOLK, A.; PAUTKE, C.; HORCH, H.H. Tumors-associated urokinase-type plasminogen activator (uPA) and its inhibitor PAI-1 in normal and neoplastic tissues of patients with squamous cell cancer of the oral cavity – clinical relevance and prognostic value. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v.33, p.19-196, 2005.

IACOVIELLO, L.; AGNOLI, C.; CURTIS, A.; CASTELNUOVO, A.; GIURDANELLA, M.C.; KROGH, V.; MATTIELLO, A.; MATULLO, G.; SACERDOTE, C.; TUMINO, R.; VINEIS, P.; GAETANO, G.; PANICO, S.; DONATI, M.B. Type 1 plasminogen activator inhibitor as a common risk factor for cancer and ischaemic vascular disease: the EPICOR study. **BMJ Open**, 2013.

INCA. **Estimativa 2014: Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro: Ministério da Saúde, 2014.

INOUE, Y.; SUGIURA, T.; MATSUKI, R.; ISHII, K.; SEKI, K.; SHIRASUNA, K. Expression of Urokinase-type Plasminogen Activator (uPA), uPA Receptor and Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Oral Squamous Cell Carcinoma. **Oral Science International**, 2007.

JANKUN, J.; ALEEM, A.M.; SPECHT, Z.; KECK, R.W.; LYSIAK-SZYDLOWSKA, W.; SELMAN, S.H. PAI-1 induces cell detachment, downregulates nucleophosmin (B23) and fortilin (TCTP) in LnCAP prostate cancer cells. **Int. J. Mol. Med.**, 2007.

JING, Y.; KOVACS, K.; KURISSETTY, V.; JIANG, Z.; TSINOREMAS, N.; MERCHAN, J.R. Role of Plasminogen Activator Inhibitor-1 in Urokinase's Paradoxical In Vivo Tumor Suppressing or Promoting Effects. **Mol. Cancer Res.**, v.10, 2012.

KAJO, K.; TURČAN, I.; VALLOVÁ, M.; LABOŠ, T.; KAJO, M.; MACHÁLEKOVÁ, K.S.G.; ZUBOR, P. Expression of carbonic anhydrase IX in the breast carcinomas. **Ceska Gynekol.**, v78, p.263-8, 2013.

KAPPLER, M.; TAUBERT, H.; HOLZHAUSEN, H.; REDDEMANN, R.; ROT, S.; BECKER, A.; KUHN, T.; DELLAS, K.; DUNST, J.; VORDERMARK, D.; HÄNSGEN, G.; BACHE, M. Immunohistochemical Detection of HIF-1 α and CAIX in Advanced Head-and-Neck Cancer. **Strahlenther Onkol.**, v.184, p.393-399, 2008.

KISHIMOTO, K.; YOSHIDA, S.; IBARAGI, S.; YOSHIOKA, N.; OKUI, T.; HU, G.; SASAKI, A. Hypoxia-induced up-regulation of angiogenin, besides VEGF, is related to progression of oral cancer. **Oral Oncology**, v.48, p. 1120-1127, 2012.

KOH, M. Y.; SPIVAK-KROIZMAN, T. R.; POWIS, G. HIF-1 alpha and cancer therapy. **Recent Results Cancer Res.**, v.180, p.15-34, 2010.

KUNDU, S.K.; NESTOR, M. Targeted therapy in head and neck cancer. **Tumor Biol.**, v.33, p.707-721, 2012.

LUEBKE, T.; BALDUS, S.E.; SPIEKER, D.; GRASS, G.; BOLLSCHWEILER, E.; SCHNEIDER, P.M. Is the urokinase-type plasminogen activator system a reliable prognostic factor in gastric cancer? **Int. J. Biol. Markers**, v.21, p.162–9, 2006.

MONSJOU, H.S.; WREESMANN, V.B.; BREKEL, M.W.M.D.; BALM, A.J.M. Head and neck squamous cell carcinoma in young patients. **Oral Oncology**, v.49, p.1097-1102, 2013.

NOGUTI, J.; MOURA, C.F.G.; DE JESUS, G.P.P.; DA SILVA, V.H.P.; HOSSAKA, T.A.; OSHIMA, C.T.F.; RIBEIRO, D.A. Metastasis from Oral Cancer: an overview. **Cancer Genomics e Proteomics**, v.9, p.329-336, 2012.

OHBA, K.; MIYATA, Y.; KANDA, S.; KOGA, S.; HAYASHI, T.; KANETAKE, H. Expression of urokinase-type plasminogen activator, urokinase-type plasminogen activator receptor and plasminogen activator inhibitors in patients with renal cell carcinoma: correlation with tumor associated macrophage and prognosis. **American Urological Association**, v.174, p.461-465, 2005.

PEREZ-SAYANS, M.; SUAREZ-PENARANDA, J.M.; PILAR, G.; SUPURAN, C.; PASTOREKOVA, S.; BARROS-ANGUEIRA, F.; GANDARA-REY, J.M.; GARCIA-GARCIA, A. Expression of CA-IX is associated with advanced stage tumors and poor survival in oral squamous cell carcinoma patients. **J. Oral Pathol. Med.**, v.41, p.667-674, 2012.

RANKIN, E.B.; GIACCIA, A.J. The role of hypoxia-inducible factors in tumorigenesis. **Cell Death Differ.**, v.15, p.678-685, 2008.

ROMER, J.; PYKE, C.; LUND, L.R.; RALFKIAER, E.; DANO, K. Cancer cell expression of urokinase-type plasminogen activator receptor mRNA in squamous cell carcinomas of the skin. **J. Invest. Dermatol.**, v.116, p.353–8, 2001.

ROSEMBERG, J. Câncer de Pulmão. In **Pandemia do Tabagismo**. São Paulo: Secretaria de Saúde do Estado de S. Paulo, 2002.

SALNIKOW, K.; ZHITKOVICH, A. Genetic and epigenetic mechanisms in metal carcinogenesis and cocarcinogenesis nickel, arsenic and chromium. **Chem. Res. Toxicol.**, v.21, p.28-44, 2008.

SAMAN, D. A review of the epidemiology of oral and pharyngeal carcinoma: update. **Head Neck Oncol.**, v.4, p.1-7, 2012.

SANTOS, M.; MERCANTE, A. M. C.; LOURO, I. D.; GONÇALVES, A. J.; CARVALHO, M. B.; SILVA, E. H. T.; SILVA, A. M. A. HIF1-Alpha expression predicts survival of patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity. **Plos One**, v. 2, p. 1-7, 2012.

SCHEIDT, J.H.G.; YURGEL, L.S.; ROMANINI, J.; CHERUBINI, K.; FIGUEIREDO, M.A.Z.; SALUM, F.G. Oral Squamous Cell Carcinoma from users and nonusers of tobacco and alcohol: clinicopathologic features and immunoreactivity of VEGF, Caspase-3, and P53. **Appl. Immunohistochem Mol. Morphol.**, v.21, 2013.

SCHÖDER, H.; FURY, M.; LEE, N.; KRAUS, D. Monitoring of therapy response in head and neck squamous cell carcinoma. **J. Nucl. Med. Pet.**, v.1, p.74-88, 2009.

SCHOOTBRUGGE, C.; BUSSINK, J.; SPAN, P.; SWEEP, F.C.G.J.; GRÉNMAN, R.; STEGEMAN, H.; PRUIJN, G.J.M.; KAANDERS, J.H.A.M.; BOELEN, W. α B-crystallin stimulates VEGF secretion and tumor cell migration and correlates with enhanced distant metastasis in head and neck squamous cell carcinoma. **BMC Cancer**, v.13, 2013.

SINGH, S.; PILLAI, S.; CHELLAPPAN, S. Nicotinic acetylcholine receptor signaling in tumor growth and metastasis. **J Oncol.**, v.30, 2011.

SIVULKA, D. J. **Regul. Toxicol. Pharmacol.**, v. 43, p. 117–133, 2005.

SOINI, Y.; KAHLOS, K.; PUHAKKA, A.; LAKARI, E.; SAILY, M. Expression of inducible nitric oxide synthase in healthy pleura and in malignant mesothelioma. **Br J Cancer**, v.3, p.880-886, 2000.

STIEHL, D. P.; WIRTHNER, R.; Köditz, J. Increased prolyl 4-hydroxylase domain proteins compensate for decreased oxygen levels: evidence for an autoregulatory oxygen-sensing system. **J. Biol. Chem.**, v. 281, p. 23482-91, 2006.

STOLZE, I. P.; MOLE, D. R.; RATCLIFFE, P. J. Regulation of HIF: prolyl hydroxylases. **Novartis Found Symp.**, v.272, p.15–25, 2006.

SUN, Y.W.; XUAN, Q.; SHU, Q.A.; WU, S.S.; CHEN, H.; XIAO, J.; XIANG, P.; ZHU, Y.P.; WANG, F.L.; ZHAO, S.T. Correlation of tumor relapse and elevated expression of survivin and vascular endothelial growth factor in superficial bladder transitional cell carcinoma. **Genetics and Molecular Research**, v.12, p.1045-1053, 2013.

SUPURAN, C.T. Carbonic anhydrases: novel therapeutic applications for inhibitors and activators. **Nature**, 2008.

TECIMER, C.; DOERING, D.L.; GOLDSMITH, J.; MEYER, J.S.; ABDULHAY, G.; WITTLIFF, J.L. Clinical Relevance of Urokinase-Type Plasminogen Activator, Its Receptor, and Its Inhibitor Type 1 in Endometrial Cancer. **Gynecologic Oncology**, v.80, p.48–55, 2002.

TOMIDA, A.; TSURUO, T. Drug resistance mediated by cellular stress response to the microenvironment of solid tumors. **Anticancer Drug Des.**, v.14, p.169-177, 1999.

UICC. **TNM: Classification of Malignant Tumours**. USA: Wiley-Blackwell, 2009.

XIN, M.; DENG, X. Nicotine inactivation of the proapoptotic function of Bax through phosphorylation. **J. Biol. Chem.**, v.280, 2005.

WARREN, G.W.; ROMANO, M.A.; KUDRIMOTI, M.R.; RANDALL, M.E.; MCGARRY, R.C.; SINGH, A.K.; RANGNEKAR, V.M. Nicotinic modulation of therapeutic response in vitro and in vivo. **Int. J. Cancer**, v.131, p.2519–2527, 2012.

WERLE, B.; KOTZSCH, M.; LAH, T.T.; KOS, J.; GABRIJELCIC-GEIGER, D.; SPIESS, E. Cathepsin B, plasminogen activator-inhibitor (PAI-1) and plasminogen activator-receptor (uPAR) are prognostic factors for patients with non-small cell lung cancer. **Anticancer Res.**, v.24, p.4147–61, 2004.

8. APÊNDICES



UGA I – UNIDADE DE GESTÃO ASSISTENCIAL – HOSPITAL HELIÓPOLIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

São Paulo, 13 de Setembro de 2011.

Ao Prezado (a)
Dr. Marcos Brasilino de Carvalho
Dra. Adriana Madeira Alvares da Silva

APROVAÇÃO

Referente: **“Análise da expressão gênica em indivíduos com carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço e células em cultura: relação com o tabagismo”.**

Registro CEP: 818

Vimos por meio desta, declarar que o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Heliópolis **avaliou e aprovou** em reunião plenária ocorrida em 13/09/2011 o estudo supracitado, tendo como autores: Dr. Marcos Brasilino de Carvalho e Dra. Adriana Madeira Alvares da Silva e como relator o Dra. Viviane AP. Moreira Lessa.

OBS: O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Heliópolis segue a Resolução 196/96 CNS/MS e as demais normas e legislações pertinentes a Pesquisa Clínica em nosso país, bem como a Conferência Internacional de Harmonização de Boas Práticas Clínicas (ICH-GCP).

NOTA: O Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Heliópolis solicita a apresentação obrigatória dos relatórios Semestrais (13/03/2012); Anuais (13/09/2012) e Finais, bem como notificação de eventos adversos, eventuais Emendas ou modificações no protocolo para apreciação do CEP.

Estamos à disposição para quaisquer esclarecimentos.
Atenciosamente,



Dr. Odilon Victor Porto Denardin.
Coordenador do CEP Heliópolis

HOSPITAL HELIÓPOLIS
 Comitê de Ética em Pesquisa
 Coordenador CEP
 Dr. Odilon Victor Porto Denardin

Rua Cônego Xavier, 276 – 10º Andar - Sacomã – São Paulo – CEP 04231-030.
 Fone: 2215-1001 / 2274-7600 ramal 409 / Fax: 2062-6764
 E-mail: cep_heliopolis@yahoo.com.br

Apêndice A. Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Heliópolis referente ao trabalho “Análise da expressão gênica em indivíduos com carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço e células em cultura: relação com o tabagismo”.