



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
NÚCLEO DE PESQUISA EM ONCOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ONCOLOGIA  
E CIÊNCIAS MÉDICAS

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA TWIST EM  
AMOSTRAS DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE BUCAL E  
SUA CORRELAÇÃO COM ASPECTOS CLÍNICO-  
PATOLÓGICOS**

Michelle Carvalho De Abreu

BELÉM-PA

2014



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
NÚCLEO DE PESQUISA EM ONCOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ONCOLOGIA  
E CIÊNCIAS MÉDICAS

Autora: Michelle Carvalho De Abreu

Orientador: Prof. Dr. André Salim Khayat

Co-orientador: Prof. Dr. Hélder Antônio Rebelo Pontes

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA TWIST EM  
AMOSTRAS DE CARCINOMA EPIDERMÓIDE BUCAL E  
SUA CORRELAÇÃO COM ASPECTOS CLÍNICO-  
PATOLÓGICOS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Oncologia e Ciências Médicas, área de concentração: Medicina I, do Núcleo de Pesquisas em Oncologia da Universidade Federal do Pará como requisito para a obtenção do título de Mestre em Oncologia e Ciências Médicas.

BELÉM-PA

2014

**Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)**  
**Biblioteca do Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUIBB/UFPA)**

---

Abreu, Michelle Carvalho de, 1981-

Avaliação da expressão da proteína twist em amostras de carcinoma epidermóide bucal e sua correlação com aspectos clínico-patológicos / Michelle Carvalho de Abreu; Orientador; Prof. Dr.º André Salim Khayat. — 2014.

84 f. : il. ; color. : 30 cm.

Inclui bibliografias.

Dissertação (Mestrado) — Universidade Federal do Pará, Núcleo de Pesquisa em Oncologia, Programa de Pós Graduação em Oncologia e Ciências Médicas, Belém, 2014.

1. Carcinoma Epidermóide. 2. Fator de Transcrição Twist. 3. Neoplasias Bucais. I. Khayat, André Salim, *orient.* II. Título.

CDD - 23. ed. 616.994

---

## FOLHA DE APROVAÇÃO

Michelle Carvalho De Abreu

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação em Oncologia e Ciências Médicas, área de concentração: Medicina I, do Núcleo de Pesquisas em Oncologia da Universidade Federal do Pará para a obtenção do título de Mestre.

Aprovado em:

Banca examinadora

Prof. Dr. Rommel Mario Rodriguez Burbano

Instituição: UFPA

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dra. Flávia Sirotheau Corrêa Pontes

Instituição: UFPA

Assinatura: \_\_\_\_\_

Prof. Dra. Adriana Costa Guimarães

Instituição: UFPA

Assinatura: \_\_\_\_\_

## **INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES E FONTES FINANCIADORAS**

### **INSTITUIÇÕES PARTICIPANTES:**

- Universidade Federal do Pará (UFPA)
  - a) Hospital Universitário João de Barros Barreto
  - b) Núcleo de Pesquisa em Oncologia (NPO)/UNACON/HUJBB
  - c) Laboratório de Citogenética Humana-UFPA
  - d) Laboratório de Patologia Bucal-HUJBB

### **FONTES DE FINANCIAMENTO:**

- Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)
- Fundação Amazônia Paraense- Governo do Estado do Pará (FAPESPA)

## DEDICATÓRIA

Aos meus pais, Adonias (*in memorian*) e Maria Lacerda, que são e sempre serão os principais responsáveis por todas as realizações da minha vida. Pelo exemplo de amor, dedicação, honestidade e educação. Pelo apoio e zelo incondicionais em todas as minhas decisões e por tornar possível todos os meus sonhos, como o de estudar longe de casa. Vocês sempre fizeram com que o impossível fosse possível pra mim. Com vocês aprendi que querer é poder, desistir jamais. Difícil dizer em breves palavras a felicidade que sinto de ter pais maravilhosos como vocês, que sempre serão os pilares da minha vida. Devo-lhes tanto que dizer apenas obrigado, seria, de minha parte, uma incomensurável ingratidão. Que Deus a proteja sempre minha mãe e você meu pai, fique bem aí do outro lado do caminho, continue brilhando e nos guardando!

Aos meus irmãos Andréa e Júnior, sobrinha Anna Luiza e à toda minha família, tios e primos (não vou nomear porque são numerosos), pelo apoio incondicional e união num momento tão difícil de nossas vidas. Sem vocês, seria insuportável! Essas fases que passamos com mais dificuldades são importantes para crescermos espiritualmente, enquanto outra para sermos plenamente felizes, nos fazendo dar valor a tudo de maravilhoso que Deus nos oferece na vida e mais ainda, para nos fazer aprender o que realmente tem valor na vida: saúde, paz e amor... as demais coisas são supérfluas! Mas é nessa batalha diária que vamos nos formando e aproveitando ao máximo o milagre da vida em todos os momentos, (tanto os de ansiedade, quanto os de tristezas ou alegrias). Acredito sempre que o bem, a energia positiva e o agir de Deus vencem todas as batalhas de nossas vidas. Que Deus continue nos concedendo paciência e força nessa luta diária para superar a dor da perda e que ela se transforme numa prazerosa saudade!

## AGRADECIMENTOS

À DEUS, POR TUDO. Por me proteger, guiar e acompanhar em todos os momentos da minha vida.

Ao amigo e mestre Prof. Dr. André Salim Khayat, além da orientação, toda a convivência como pessoas que tivemos, desde o início, em que sem me conhecer me deu a chance de mostrar minhas capacidades. Por sua diplomacia, paciência, simplicidade, dedicação e inteligência, tornou-se um exemplo não só de pesquisador e professor para mim, mas de uma pessoa em que sempre irei me espelhar. Há passos em que por mais firme que sejam as pernas, não é possível dá-los sozinho e você como um mestre digno de ostentar tal nome, soube guiar-me, soube conduzir-me ao encontro do saber, em uma caminhada árdua, é bem verdade, mas prazerosa.

Ao amigo e mestre Prof. Dr. Hélder Antônio Rebelo Pontes, que me acolheu na Patologia Bucal, me apresentou um novo caminho dentro da odontologia e me iniciou no fascinante mundo da pesquisa. Pelos constantes ensinamentos de vida e de patologia, por acreditar e confiar, pelo estímulo e apoio que sempre prestou a mim. Por quem tenho profunda admiração e sempre constituiu-se referência às conquistas que ainda pretendo obter, e que virão certamente a materializar-se, a minha eterna gratidão.

À amiga e mestra Prof. Dra. Flávia Sirotheau Corrêa Pontes, ora uma irmã mais velha, generosa e companheira, ora uma mãe, exigente, mas compreensiva, ora uma colega, ética e sempre disponível, enfim, uma verdadeira amiga. Uma professora responsável, pesquisadora dedicada, mãe presente e amorosa. Meu exemplo de conciliação entre a vida profissional e a vida familiar. Muito obrigada por me conceder a oportunidade de estar sempre por perto aprendendo com a senhora, pelas palavras de carinho e incentivo.

Ao amigo e mestre Prof Dr Rommel Mario Rodríguez Burbano pelo grande pesquisador que és! Pelo desprendimento, conhecimento, energia e simplicidade. Por me acolher com muito carinho no Laboratório de Citogenética Humana da Universidade Federal do Pará. Por ser solícito, exemplo de saber e de ser, minha gratidão pelas lições e amizade!

À amiga e mestra Prof. Dra Adriana Costa Guimarães pelos grandes ensinamentos que obtive, pela ampliação de meus conhecimentos científicos, pelas críticas construtivas que recebi e principalmente por ter me acolhido como amiga, sempre preocupada com meu bem estar e de minha família, ajudando a levantar-me das quedas, estimulando-me nos momentos de dificuldade, e jamais deixou de prestar-me socorro, quando solicitada. Meu profundo agradecimento.

Ao Prof. Dr Paulo Pimentel de Assumpção, coordenador do programa de pós-graduação em oncologia e ciências médicas pela oportunidade, seriedade e pela forma com que me acolheu. Meus sinceros agradecimentos pelos conhecimentos transmitidos, incentivos e convivência agradável.

À todos os professores do INCA e demais professores do programa de pós-graduação em oncologia e ciências médicas. Os conhecimentos transmitidos por vocês foram de extrema valia não só para a execução deste estudo, mas para a minha formação.

Ao Igor Pessôa pelo apoio, companhia, cumplicidade e paciência diária, por compartilhar dos momentos de alegria e tristeza, estando sempre presente me incentivando em todos os momentos, sendo eles fáceis ou difíceis, comemorando cada pequena vitória deste percurso.

À Aline Seabra, alguém em quem reconheci uma irmã, com quem dividi meus sucessos e frustrações, cansaço, alegrias e tristezas. Agradeço a você por esses anos de companheirismo, pelo sorriso diário, sem mágoas nem rancores, por todo o auxílio prestado durante a execução desse trabalho. Muitas coisas bonitas não podem ser vistas ou tocadas, elas são sentidas dentro do coração. O que você fez por mim, é uma delas. E eu agradeço do fundo do meu coração. Dizer obrigada é pouco, perto da felicidade que sinto de ter como amiga uma pessoa maravilhosa como você.

À amiga Carolina Rosal pela amizade, carinho. Exemplo de zelo e dedicação constantes. Não esquecerei sua preocupação comigo e minha família durante o curso. Você é uma daquelas amigas que confirma a frase de Machado de Assis: “A amizade sente-se não se diz”. Obrigada por tudo!

À amiga Luciana Quintana, espontânea e autêntica. Desde que nos cruzamos no laboratório, muitas afinidades apareceram e me deram o prazer de ter a sua amizade. “Num mundo que se faz deserto, temos sede de encontrar um amigo”.

Ao técnico e amigo Antônio Conde, o amigo brincalhão, solícito a todo instante. Agradeço pelo convívio, respeito, troca de conhecimentos e amizade nesses últimos anos.

Aos meus queridos colegas de Pós-Graduação, com quem passamos a maior parte do tempo e dividimos nossas experiências, sucessos e dissabores, cujos nomes não listarei para não correr o risco de esquecer alguém, afinal todos, sem exceção, contribuíram de alguma forma durante essa jornada.

Aos pacientes e seus acompanhantes do Hospital Universitário João de Barros Barreto, que humildemente possibilitaram a realização deste trabalho.



À todos os funcionários do Núcleo de Pesquisa em Oncologia pelo convívio e pela prestação sempre que foi preciso.

Às residentes de oncologia do Serviço de Patologia Bucal do Hospital Universitário João de Barros Barreto por serem sempre solícitas e atenciosas.

Aos funcionários do Serviço Patologia Bucal, por toda a colaboração e atenção sempre que solicitados.

Ao Dr Alberto Kato, médico cirurgião de cabeça e pescoço, pela importante colaboração e gentileza em conceder amostras importantes para a elaboração deste projeto.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão de auxílio financeiro.

A todos aqueles que direta ou indiretamente contribuíram para o meu percurso no mestrado da UFPA.

## RESUMO

Entre as neoplasias malignas que ocorrem na boca, 95% são representadas pelo Carcinoma Epidermóide de Boca (CEB). No Brasil, as estimativas para o ano de 2014, segundo o INCA, apontam mais de 15.290 novos casos. Esses dados mostram que o CEB representa um problema de saúde pública em razão de a morbidade afastar, na maioria dos casos, grande número de cidadãos do mercado de trabalho, além de onerar os custos com a saúde no Estado, fruto dos dias de internação e do tratamento aplicado. A patogênese do CEB está relacionada a fatores genéticos além de agentes químicos, como o consumo de tabaco e álcool, físicos e biológicos, considerados carcinogênicos. O fator de transcrição twist foi recentemente apontado como um importante regulador da TEM durante a progressão tumoral e metástase e vem se tornando um importante marcador diagnóstico e prognóstico para pacientes devido ao fato de sua sobre-regulação positiva e metilação do gene estarem sendo implicados em vários tipos de câncer. Apesar de muitos estudos fornecerem importantes *insights* sobre a compreensão da biologia dos tumores malignos bem como dos genes envolvidos na TEM, os mecanismos de *TWIST* na tumorigênese e na transição epitelial-mesenquimal do carcinoma epidermóide bucal ainda precisam ser elucidados. Neste estudo nós investigamos o padrão de expressão da proteína twist através da técnica de imuno-histoquímica em 59 amostras Carcinoma Epidermóide Bucal (CEB) provenientes de pacientes usuários do Sistema Único de Saúde do Estado do Pará e avaliamos a existência de associação dos resultados com características clínico-patológicas dos tumores estudados e com a sobrevida dos pacientes. Os resultados mostraram uma associação estatisticamente significativa entre o consumo de álcool e os sítios mais afetados pelo CEB, sugerindo que o etanol pode desempenhar um papel potencializador dos agentes do tabaco nos sítios que recebem maior exposição dessas substâncias. A expressão da proteína twist também mostrou uma diminuição na média de sobrevida dos indivíduos. Apesar dessa diminuição não ter apresentado significância estatística em nossos estudos, acreditamos que ela deve ser mais amplamente estudada, visando o melhor entendimento do papel desta no carcinoma epidermóide bucal. A positividade de marcação da proteína demonstrou relação com o tabagismo, onde 87,8% dos pacientes fumantes, apresentaram marcação positiva para a proteína, corroborando o fato de que o fumo pode modular a expressão de marcadores TEM incluindo twist. Em síntese, os resultados deste estudo evidenciam algumas correlações intrigantes, que no nosso entender merecem especial atenção, no intuito de serem esclarecidas. Assim como a localização

intracelular da proteína observada neste estudo, que possivelmente está relacionada a algum processo oncogênico ainda não descrito.

Palavras-Chave: carcinoma epidermóide bucal, twist, prognóstico.

## ABSTRACT

Among the malignant neoplasms that occur in the mouth, 95% are represented by oral squamous cell carcinoma (OSCC). In Brazil, the estimates for the 2014, according to the INCA point more than 15,290 new cases. These data show that the OSCC represents a public health problem because of the morbidity away a large numbers of patients from de work, and weigh the cost of health care in the state, due the days of hospitalization and the treatment applied. The pathogenesis of the OSCC is related to genetic factors as well as chemical agents, such as tobacco and alcohol, physical and biological agents considered carcinogenic. The transcription factor twist was recently appointed as an important regulator of EMT during tumor progression and metastasis and has become an important diagnostic and prognostic marker for patients due to the fact its positive upregulation and methylation of the gene are being implicated in several cancers. Although many studies provide important insights into understanding the biology of malignant tumors as well as genes involved in EMT, TWIST mechanisms in tumorigenesis and epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma remain to be elucidated. In this study we investigated the pattern of expression of twist protein by immunohistochemical technique in 59 OSCC samples from patients from the National Health System of the State of Pará and evaluated the possible association of the results with clinical and pathologic features survival of patients. The results showed a statistically significant association between alcohol consumption and the most sites affected by the OSCC, suggesting that ethanol may play a potentiating role of tobacco agents in sites that receive greater exposure of these substances. The expression of twist protein also showed a decrease in average survival of individuals. Despite this decline have not shown statistical significance in our studies, we believe that it should be more widely studied, aiming at a better understanding of its role in oral squamous cell carcinoma. The positivity of protein labeling demonstrated relationship to smoking, where 87.8% of smoking patients showed positive staining for protein, corroborating the fact that smoking can modulate the expression of EMT markers including twist. In summary, the results of this study show some intriguing correlations, which in our opinion deserve special attention in order to be clarified. As the intracellular localization of the protein observed in this study, is probably related to some oncogenic process is not described.

Key-words: oral squamous cell carcinoma, twist, prognosis.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

	Páginas
Quadro 1- Classificação clínica TNM	24
Quadro 2- Estadiamento	25
Figura 1- Progressão do Carcinoma Epidermóide e critérios utilizados para identificação das displasias	29
Figura 2- Características adquiridas pelas células neoplásicas	33
Figura 3- Transição epitelial-mesenquimal	37
Figura 4- Tipos de transição epitelial-mesenquimal	39
Figura 5- Etapas da cascata metastática	41
Figura 6- Localização do gene <i>TWIST1</i> no cromossomo 7	44
Figura 7- Sinalização celular possivelmente envolvida na transição epitelial-mesenquimal	45
Figura 8- Distribuição do número de casos de acordo com o gênero e a faixa etária.	55
Figura 9- Distribuição do número de casos de acordo com o gênero e a localização tumoral.	56
Figura 10- Foto de imuno-histoquímica com marcação citoplasmática e nuclear de twist.	62
Figura 11- Foto de imuno-histoquímica com marcação predominantemente citoplasmática de twist.	62
Figura 12- Análise de sobrevivência de indivíduos negativos para a marcação de twist.	65
Figura 13- Análise de sobrevivência de indivíduos positivos para a marcação de twist.	65
Figura 14- Análise de sobrevivência de indivíduos com e sem marcação de twist.	67

**LISTA DE TABELAS**

	Páginas
Tabela 1- Frequência de pacientes com localização tumoral de soalho e língua, de acordo com o etilismo, em uma população do norte do Brasil.	57
Tabela 2 - Frequência de pacientes com estadiamento III e IV e sobrevida menor que 24 meses, de acordo com o tabagismo, em uma população do norte do Brasil.	58
Tabela 3- Frequência de pacientes com sobrevida (menor que 12 meses), de acordo com o tratamento cirúrgico, em uma população do norte do Brasil.	60
Tabela 4- Frequência de pacientes fumantes, de acordo com a marcação da proteína twist, em uma população do norte do Brasil.	64

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CEB	Carcinoma Epidermóide Bucal
CCEP	Carcinoma de Células Escamosas de Cabeça e Pescoço
TEM	Transição epitelial- mesenquimal
MET	Transição mesenquimal- epitelial
INCA	Instituto Nacional de Câncer
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação em Cadeia pela Polimerase
PI3K	Fosfatidilinositol-3-Quinase
INCA	Instituto Nacional do Câncer
NNN	N- nitrosonornicotina
NNK	4- metilnitrosamina -1-(3-piridil) -1- butanona
PDGF	fator de crescimento derivado de plaquetas
TNF- $\alpha$	fator de necrose tumoral $\alpha$
TGF- $\beta$	fator de crescimento transformante $\beta$
HPV	Papilomavírus humano ou vírus do papiloma humano
EGFR	receptor do factor de crescimento epidérmico
TNM	Classificação de tumores malignos ( do inglês Tumour, Node and Metastasis)
UICC	Union Internationale Contre le Câncer
AJCC	American Joint Committee on Cancer
HPV18)	papilomavirus humano tipo 18
LVP	leucoplasia verrucosa proliferativa
GSTs	genes supressores tumorais
CSC	célula-tronco cancerosa
TEM	transição epitelial-mesenquimal
MET	transição mesenquimal-epitelial
MEC	matriz extracelular
RTK	receptor tirosina quinase
MAPKs	proteínas quinases ativadas por mitógenos
ILK	integrinas ligada ao quinase
PI3K	fosfatidil-inositol-quinase
TGF	fator transformador de crescimento

SCS	síndrome Saethre-Chotzen
RT-PCR	Reação em cadeia da polimerase transcriptase reversa
HIF-1 $\alpha$	fator indutor de hipóxia
IHQ	imuno-histoquímica
UNACON	Unidade de Alta Complexidade em Oncologia
HUJBB	Hospital Universitário João de Barros Barreto
HE	Hematoxilina e eosina



## SUMÁRIO

	Páginas
1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Carcinoma Epidermóide Bucal	17
1.1.1 Considerações Gerais	17
1.1.2 Epidemiologia	18
1.1.3 Fatores Etiológicos	19
1.1.4 Tratamento	22
1.1.5 Sistema TNM e aspectos prognósticos do carcinoma epidermóide de boca	24
1.1.6 Desordens Potencialmente Malignas	26
1.1.6.1 Leucoplasia	27
1.1.6.2 Eritroplasia	30
1.2 Carcinogênese	31
1.3 Transição Epitelial-Mesenquimal e Metástase	35
1.4 TWIST: gene que parece atuar como um indutor de transição epitelial-mesenquimal e regulador-chave da metástase tumoral	43
2 JUSTIFICATIVA E APLICABILIDADE	48
3 OBJETIVOS	49
3.1 Objetivo geral	49
3.2 Objetivos específicos	49
4 MATERIAL E MÉTODOS	50
4.1 Descrição da Casuística	50
4.2 Critérios de Inclusão	51
4.3 Critérios de Exclusão	51
4.4 Análise de imunorreatividade de twist por imuno-histoquímica	51
4.5 Análise da imunomarcção	52
4.6 Análise Estatística	53
5 RESULTADOS E DISCUSSÃO	54
6 CONCLUSÃO	68
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69
APÊNDICE A: Termo de consentimento livre e esclarecido	82
ANEXO A: Termo de Aprovação no Comitê de Ética do Hospital Universitário João de Barros Barreto/ Plataforma Brasil	84

# 1 INTRODUÇÃO

## 1.1 Carcinoma Epidermóide Bucal

### 1.1.1 CONSIDERAÇÕES GERAIS

Os carcinomas epidermóides são neoplasias malignas que se originam das células do epitélio estratificado de revestimento da cavidade oral, do esôfago, orofaringe, trato respiratório, trato digestivo, colo de útero e pele, sendo encontrados também em regiões susceptíveis a metaplasia escamosa, como pulmões e mamas (MORAL e PARAMIO, 2008). Na cavidade oral, o carcinoma epidermóide de boca (CEB), também denominado de carcinoma espinocelular e carcinoma de células escamosas, é a neoplasia maligna mais frequente.

Além de seu aspecto clássico, a Organização Mundial de Saúde (OMS) ainda cita outras variantes que podem ser identificadas em boca e/ou orofaringe, bem menos frequentemente: verrucoso, basalóide, papilífero, acantolítico, adenoescamoso e cuniculatum (BARNES *et al.*, 2005).

Clinicamente, pode apresentar-se de diversas formas de acordo com o estágio da doença, variando desde placas brancas e/ou avermelhadas de superfície irregular até lesão exofítica (formação de massas, forma papilar ou verrucosa) à lesões crateriformes, invasivas e ulceradas, do tipo endofíticas, como ulcerações que não cicatrizam, com bordas elevadas e endurecidas, indolor em estágios iniciais. Seu crescimento e invasão são locais, mas pode atingir estruturas adjacentes (LEE *et al.*, 2006).

O CEB pode acometer qualquer sítio anatômico da cavidade oral, porém a língua, especialmente a borda lateral posterior e base, seguida do assoalho bucal, são os sítios mais comuns de origem do carcinoma epidermóide bucal (PONTES *et al.*, 2011; LAM *et al.*, 2006; BARNES *et al.*, 2005).

Histologicamente, caracteriza-se pela proliferação de ilhas de células poliédricas de citoplasma esinofílico. Individualmente as células neoplásicas exibem perda de isomorfismo celular com relação núcleo/citoplasma alterada, núcleos pleomórficos, nucléolos evidentes e cromatina dispersa. Algumas ilhas epiteliais neoplásicas exibem no centro metaplasia escamosa levando a formação de pérolas córneas (GREER, 2006; NEVILLE *et al.*, 2009).

Apesar de todos os avanços em pesquisas realizadas sobre aspectos biológicos, moleculares, tecnologias e tratamentos oncológicos, houve apenas uma modesta melhora na sobrevida de pacientes com câncer de cabeça e pescoço nas últimas três décadas, na maioria

das vezes, devido ao diagnóstico tardio (MEHROTRA *et al.*, 2006; SARGERAN *et al.*, 2008; PONTES *et al.*, 2011; FAN *et al.*, 2013).

A demora no diagnóstico muitas vezes está relacionada à falta de acesso do paciente aos serviços de saúde e a falta de informação por parte da população, fazendo com que os sintomas sejam negligenciados. Outro fator que contribui para este pequeno avanço, pode estar relacionado a alguns profissionais que falham na detecção e no diagnóstico de lesões de alto risco por não examinarem rotineiramente a mucosa bucal não percebendo pequenas lesões em exames de rotina.

É importante ressaltar que, o diagnóstico precoce das neoplasias não deveria apresentar grandes dificuldades, uma vez que os grupos de maior risco são bem conhecidos e a região anatômica é de fácil acesso ao exame clínico, dispensando qualquer tipo de equipamento especial, além do fato de lesões com potencial maligno poderem ser diagnosticadas e tratadas antes da aquisição do fenótipo maligno (SUBRAMANIAN *et al.*, 2009; MIGNOGNA *et al.*, 2004).

O diagnóstico precoce favorece não apenas o prognóstico do paciente como também reduz a morbidade e a necessidade de tratamentos mais agressivos. A prevenção e o diagnóstico precoce são medidas realmente eficazes para melhorar o prognóstico do carcinoma de boca.

### 1.1.2. EPIDEMIOLOGIA

Segundo a OMS, o número de novos casos de câncer por ano no mundo foi estimado em 14,1 milhões em 2012, e tende a aumentar para 21,4 milhões até 2030, sendo que dois terços deles ocorrerão nas nações em desenvolvimento (OMS, 2014).

Mundialmente, o câncer de boca é considerado o sexto mais freqüente, sendo o carcinoma epidermóide responsável por aproximadamente 90% das neoplasias que acometem a cavidade oral, com incidência anual estimada em cerca em 275.000 casos (OU *et al.*, 2008; WARNAKULASURIYA, 2009; SCULLY, 2011).

A alta incidência de câncer oral em alguns grupos populacionais está relacionada a hábitos culturais, como o de mascar tabaco no Sul da Ásia e o uso de álcool em partes da Europa ocidental (KHAN *et al.*, 2000), mostrando uma grande variação geográfica na incidência deste tipo de câncer. O CEB é o tipo de câncer oral mais comum em regiões da Índia (CAPILLA *et al.*, 2007), porém, é responsável por apenas por 16,5% de todos os

cânceres incidentes no Sri Lanka (SIRIWARDENA *et al.*, 2006), enquanto que apenas 5,6% dos pacientes são diagnosticados com CEB na Arábia Saudita (EL-HUSSEINY *et al.*, 2000). No Ocidente, os hábitos mais associados com câncer oral são o tabagismo e o consumo de álcool, que levam a uma maior incidência de CEB de língua e assoalho de boca (PONTES *et al.*, 2011).

No Brasil, conforme dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA - Ministério da Saúde), estima-se para 2014 a ocorrência de mais de 15.290 novos casos, figurando como a 5ª neoplasia maligna mais comum entre os homens e a 12ª entre as mulheres. No Estado do Pará, são esperados 410 casos novos de CEB em 2014 (INCA, 2014), sendo que dois terços destes, provavelmente serão diagnosticados numa fase tardia, pois a região Amazônica é diferente, em muitos aspectos, de outras regiões do Brasil e do mundo, devido ao grande número de rios que são utilizados como as principais vias de transporte, tornando mais difícil o acesso aos serviços de saúde por parte da população local (PONTES *et al.*, 2011).

Esta neoplasia acomete, geralmente, pacientes a partir da sexta década de vida, sendo que 6% ocorre em pacientes com menos de 45 anos, considerados jovens. (LAM *et al.*, 2006). Os homens são mais acometidos que as mulheres em uma proporção de 2 a 1,5:1, taxa esta que vem diminuindo ao longo das décadas, em função do aumento do consumo de tabaco e álcool entre as mulheres (DURAZZO *et al.*, 2005; GILLISON, 2007; HOOGSTEEEN *et al.*, 2007; WARNAKULASURIYA, 2009).

### 1.1.3 FATORES ETIOLÓGICOS

A patogênese do CEB está relacionada a fatores genéticos, como alterações em oncogenes e genes supressores de tumor, além de agentes químicos, como o consumo de tabaco e álcool, físicos e biológicos, considerados carcinogênicos. É sabido que o organismo expõe-se a múltiplos agentes carcinogênicos, com efeitos aditivos ou multiplicativos e que a predisposição individual tem um papel decisivo na resposta final. No entanto, não é possível definir em que grau ela influencia na relação entre a quantidade/tempo de exposição ao carcinógeno e a resposta individual à exposição (SCULLY *et al.*, 2011; MARKOPOULOS, 2012).

Entretanto, independentemente da exposição à carcinógenos, as células sofrem processos de mutação espontânea, que não alteram o desenvolvimento normal de toda a população celular. Estes fenômenos incluem danos oxidativos, erros de ação das polimerases

e das recombinases e redução e reordenamento cromossômico. Há também que se considerar a vigilância imunológica como mecanismo de correção ou exclusão das células mutantes. Assim sendo, a carcinogênese pode iniciar-se de forma espontânea ou ser provocada pela ação de agentes carcinógenos (RICHIE *et al.*, 2008).

No carcinoma epidermóide bucal, não é diferente, pois não há um agente causador isoladamente aceito. Na sua etiologia, além dos fatores intrínsecos, como as alterações genéticas e imunossupressão, são implicados os fatores extrínsecos como tabagismo freqüente, o hábito cultural em alguns países asiáticos de mascar tabaco com folhas de betel, etilismo, exposição prolongada à radiação solar (SCULLY e BAGAN, 2009; SCULLY, 2011; MARKOPOULOS, 2012; WARNAKULASURIYA, 2011).

A forte associação entre carcinomas epidermóides bucais e o tabaco já é bem estabelecida, com cerca de 90% dos casos do trato aerodigestivo correlacionados com o tabaco, pela exposição direta das células epiteliais às substâncias carcinogênicas liberadas pela fumaça. Pacientes fumantes apresentam um risco de quatro a dez vezes maior de desenvolver a doença em comparação aos não fumantes (MOORE *et al.*, 2001; IDE e MIZOUE, 2008; SCULLY, 2011).

O tabaco é considerado um carcinógeno químico completo de maior significância no desenvolvimento do CEB, pois possui mais de três mil substâncias químicas, sendo cerca de 40 delas consideradas pró-carcinógenas e atuantes nas três fases da tumorigênese: a iniciação, promoção e progressão tumoral. Dentre elas, podemos citar as N-nitrosamidas, que encontram-se na fumaça proveniente da queima do fumo, os benzopirenos, encontrados sob a forma de partículas e aminas aromáticas derivadas da nicotina (PRADO *et al.*, 2003; WARNAKULASURIYA *et al.*, 2005; SCULLY e BAGAN, 2009; KANG *et al.*, 2011; SCULLY 2011).

A nicotina é o maior constituinte do tabaco, sendo responsável por causar sua dependência. Especula-se que as nitrosaminas derivadas da nicotina, especialmente a nitrosamina N- nitrosonornicotina (NNN) e a 4- (metilnitrosamina -1-(3-piridil) -1- butanona (NNK) participam da carcinogênese do tabaco). A nicotina atua inibindo a apoptose ao controlar a ação de enzimas proteína kinase C e a proteína nitrogênica ativadora de kinase. Ao lado desses efeitos, a nicotina modula os fatores de crescimento TNF- $\alpha$  (fator de necrose tumoral  $\alpha$ ), PDGF (fator de crescimento derivado de plaquetas) e TGF- $\beta$  (fator de crescimento transformante  $\beta$ ) que, em conjunto, estimulam a proliferação celular. Os componentes químicos carcinogênicos presentes no tabaco apresentam-se como pró-carcinógenos, necessitando de enzimas, como oxigenases do citocromo p450 presentes no retículo

endoplasmático e das peroxidases, que os convertam em um reagente eletrofílico, com deficiência de elétrons em determinadas regiões da molécula, com força para estabelecer ligação mais estável, covalente, com as macromoléculas intranucleares do DNA. Além deste processo de oxidação gerar os agentes carcinógenos, geram também radicais livres, capazes de promover mutações por mecanismos ainda mais complexos e induzir lesões genéticas diversas (CANTO e DEVESSA, 2002; Prado e Taveira, 2003; IARC 2007; ZYGOGIANNI *et al.*, 2011; SCULLY 2011).

Quanto ao etilismo, não existem ainda estudos que comprovem que o álcool isoladamente seja um agente promotor da carcinogênese bucal. O atual mecanismo pelo qual o álcool eleva o risco do desenvolvimento do câncer bucal, ainda permanece obscuro. Muitos mecanismos têm sido sugeridos, como o de que o etanol parece atuar como solvente e agente potencializador das substâncias químicas encontradas no tabaco, por promover um efeito sinérgico, aumentando permeabilidade mucosa e facilitando a passagem de carcinógenos através da membrana celular para o interior da célula causando danos ao DNA (ZYGOGIANNI *et al.*, 2011; PETTI *et al.*, 2012).

O etanol ou álcool etílico é o álcool presente em destilados, cervejas e outras bebidas alcoólicas. É uma molécula hidrofílica pequena que entra no sistema circulatório distribuindo-se por todos os tecidos que contenham água, como coração, músculos e cérebro, penetra nas membranas celulares e, eventualmente, causa injúria à célula. Logo após sua ingestão, o etanol é absorvido principalmente pela mucosa do sistema digestório, estômago e intestino, embora uma pequena parte seja absorvida pela mucosa oral (CRABB *et al.*, 2004). Sabe-se ainda que ação sinérgica do álcool com o tabaco pode aumentar em até 38 vezes o risco de desenvolver a malignidade (ZNAOR *et al.*, 2003; HENDRIKS, 2005; SCULLY, 2011; ZYGOGIANNI *et al.*, 2011).

Nas últimas décadas, tem sido observada uma tendência para o fato de que 15 a 20% dos pacientes, principalmente os jovens, desenvolvem essa doença sem terem sido expostos a estes agentes, sugerindo fortemente a possibilidade da existência de outros fatores de risco para a carcinogênese oral, como por exemplo, agentes biológicos, especialmente o *Papilomavírus humano* (HPV), despertando para a possibilidade de um possível envolvimento sinérgico potencializando o desenvolvimento da neoplasia maligna (GILLISON *et al.*, 2008; BENSON *et al.*, 2013). A ingestão de frutas e vegetais tem sido associada com redução do risco de desenvolvimento de câncer, incluindo o carcinoma epidermóide de boca. Um estudo realizado nos EUA mostrou uma associação inversa entre o consumo de frutas vegetais e a incidência de câncer de cabeça e pescoço em cinco anos (FREEDMAN *et al.*,

2008). A chamada dieta mediterrânea demonstrou ser particularmente associada com essa redução. Um estudo na Itália mostrou que durante um período de 8 anos, o consumo diário de seis ou mais alimentos vegetais, frutas, cereais, azeite, vinho e baixa ingestão de carne e produtos lácteos, favoreceu a proteção contra o câncer de boca e faringe quando em comparação com aqueles cuja ingestão diária desses itens na dieta foi menor (BOSETTI *et al.*, 2003). Isto sugere que uma dieta deficiente em antioxidantes é mais um fator que predispõe para o desenvolvimento de lesões pré-neoplásicas e câncer de boca (WARNAKULASURIYA, 2009; SCULLY, 2011).

#### 1.1.4 TRATAMENTO

O tratamento do carcinoma epidermóide de boca consiste basicamente em excisão cirúrgica ou radioterapia, como tratamento curativo de escolha, ou de forma combinada para casos em estágios avançados da doença. Quimioterapia suplementar adjuvante é ocasionalmente utilizada para obter um melhor controle loco-regional ou à distância, bem como em casos de recidiva (WOLFF *et al.*, 2012; BROWN *et al.*, 2012; CONTALDO *et al.*, 2013).

A revolução no tratamento cirúrgico foi a introdução de técnicas reconstrutivas com retalhos loco-regionais pedunculados e transferência de tecido livre que permitem ressecções mais seguras e mais amplas, com margens livres adequadas doença e reconstrução funcional dos defeitos criados durante o procedimento cirúrgico, além da introdução de técnicas cirúrgicas menos invasivas, por exemplo, a cirurgia a laser (HADDAD *et al.*, 2008; RAPIDIS *et al.*, 2009; COUSINS *et al.*, 2013).

O tratamento radioterapêutico contemporâneo engloba novas formas de radiação e a aplicação de métodos sofisticados computadorizados para aumentar a eficácia terapêutica, com uma redução importante na irradiação de tecidos normais circundantes. Isto levou a um aumento da dose terapêutica para o local do tumor e uma redução da gravidade dos danos induzidos pela radiação (RAPIDIS *et al.*, 2009).

Na quimioterapia, o metotrexato foi substituído por agentes à base de platina, com ou sem 5-fluorouracil. Esquemas neo-adjuvantes e adjuvantes, juntamente com a radioterapia pré ou pós-operatória tem mostrado um benefício de sobrevivência distinta quando comparado ao tratamento isolado com radioterapia. Ademais, a utilização de quimioterapia antes da cirurgia aumenta os índices de sobrevida e diminui consideravelmente a taxa de metástases à

distância, quando comparado com seu uso após a cirurgia, e tem, como principal vantagem, a possibilidade de controle subclínico das metástases à distância. Os autores afirmam, ainda, que o uso de quimioterapia sistêmica adjuvante deve ser amplamente considerado em pacientes com envolvimento dos linfonodos (SHINGAKI *et al.*, 2003; RAPIDIS *et al.*, 2009).

Este grande avanço foi seguido pela introdução de taxanos e o desenvolvimento de terapias moleculares específicas que, durante os últimos cinco anos, revolucionaram o conceito de quimio-radiação. Quimioterapia de indução e quimio-radiação combinados com antagonistas do receptor do factor de crescimento epidérmico (EGFR) provaram oferecer uma melhor sobrevida aos pacientes com carcinoma epidermóide localmente avançado ou recorrente (RAPIDIS *et al.*, 2009).

Apesar destes avanços, a sobrevida global da doença em cinco anos avançou pouco, e o paciente ainda tem que conviver a longo prazo com o ônus dos efeitos colaterais relacionados ao tratamento (COUSINS *et al.*, 2013). Tais prejuízos incluem o comprometimento de funções vitais, como disfagia (dificuldades em engolir), disgeusia (dor à deglutição), trismo (limitação de abertura bucal), xerostomia (boca seca) e alteração da percepção gustativa. Vários estudos têm mostrado que tais deficiências e dificuldades têm importantes consequências negativas, tanto em termos de saúde física (pelo risco de desnutrição aumentado, perda de peso), e bem-estar psicossocial (por meio de uma redução no prazer de comer, interação social e qualidade de vida como um todo) (MANIKANTAN *et al.*, 2008; EADES *et al.*, 2009; COUSINS *et al.*, 2013).

Sabe-se que o comportamento biológico do tumor sofre primeiramente interferência de alterações genéticas nas células tumorais. Para se aperfeiçoar as estratégias de tratamento e diminuir os índices de morbi-mortalidade dos pacientes, é necessário esclarecer os padrões genéticos e moleculares básicos das neoplasias malignas de cabeça e pescoço. Além disso, a identificação de biomarcadores moleculares que possibilitem o diagnóstico precoce da doença, bem como que contribuam para o estabelecimento dos riscos de recorrência e para o planejamento terapêutico, culminaria, então, em melhores perspectivas prognósticas (GINOS *et al.*, 2004; SOMOZA-MARTÍN *et al.*, 2005; COUSINS *et al.*, 2013).



### 1.1.5 SISTEMA TNM E ASPECTOS PROGNÓSTICOS DO CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE BOCA

O carcinoma epidermóide bucal mostra diversos aspectos microscópicos, que associados aos critérios anatômicos e achados clínicos e de imagem, podem ser utilizados para traçar o comportamento biológico do tumor, sua gradação histológica e o estadiamento clínico TNM (tamanho do tumor em seu maior diâmetro, envolvimento linfonodal e metástases à distância para outros órgãos).

O sistema TNM (T= tumor; N= linfonodos e M= metástases à distância) para classificação de tumores malignos foi desenvolvido por Pierre Denoix na França entre os anos de 1943 e 1952 (DENOIX, 1944). A Union Internationale Contre le Câncer (UICC) e a American Joint Committee on Cancer (AJCC) adaptaram no ano de 2002 o sistema TNM (Quadro 1) e classificaram o estadiamento clínico do câncer de cabeça e pescoço que se origina em mucosa em sete estádios diferentes (0, I, II, III, IVa, IVb, IVc), considerando-se a disseminação local do tumor (T1-4), o envolvimento de linfonodos regionais (N0-3) e a presença de metástases a distância (M0-1) (Quadro 2) (GREENE *et al.*, 2002; SOBIN e WITTEKIND, 2002).

<b>Tumor Primário (T)</b>	<b>Envolvimento nodal (N)</b>	<b>Metástase a distância (M)</b>
<b>Tx</b> Tumor primário não pode ser avaliado.	<b>Nx</b> Linfonodos regionais não podem ser avaliados.	<b>Mx</b> Metástase a distância não pode ser avaliada
<b>T0</b> Não há evidência de tumor primário	<b>N0</b> Ausência de metástases regionais.	<b>M0</b> Ausência de metástase a distância.
<b>Tis</b> Carcinoma <i>in situ</i>	<b>N1</b> Metástase em linfonodo ipsilateral único, menor ou igual a 3 cm, em seu maior diâmetro	<b>M1</b> Presença de metástase a distância.
<b>T1</b> Tumor de até 2 cm, em seu maior diâmetro	<b>N2a</b> Metástase em linfonodo ipsilateral único, maior que 3 cm, mas menor que 6 cm, em seu maior diâmetro.	
<b>T2</b> Tumor maior que 2 cm, mas menor que 4 cm, em seu maior diâmetro	<b>N2b</b> Metástase em linfonodos ipsilaterais múltiplos, nenhum maior que 6, em seu maior diâmetro.	
<b>T3</b> Tumor maior que 4 cm, em seu maior diâmetro	<b>N2c</b> Metástase em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum maior que 6 cm, em seu maior diâmetro.	
<b>T4</b> Tumor maior que 4 cm, com invasão de estruturas adjacentes	<b>N3</b> Metástase em linfonodos maior que 6 cm, em seu maior diâmetro.	

Quadro 1 – Classificação clínica TNM

ESTADIAMENTO TNM			
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T3	N0	M0
	T1	N1	M0
	T2	N1	M0
	T3	N1	M0
IV A	T4	N0	M0
	qualquer T	N2	M0
IV B	qualquer T	N3	M0
IV C	qualquer T	qualquer N	M1

Quadro 2 – Estadiamento TNM

É um sistema universalmente aplicável que facilita a comunicação inter-profissional, sendo o planejamento do tratamento, oferecendo ao paciente uma estimativa do seu prognóstico, e ainda a avaliação da uniformidade de dados e dos resultados do tratamento entre diferentes instituições, os principais objetivos do sistema.

Segundo estudos, ainda existem diversos indícios de que o sítio do tumor primário, em particular a profundidade da invasão, apresente implicações prognósticas, uma vez que os tumores se comportam diferentemente a depender da localização anatômica e esta deve ser considerada como uma indicadora de prognóstico, já que os tumores apresentam comportamentos diferentes dependendo da localização anatômica. Para os autores, a língua e assoalho bucal conduzem a um pior prognóstico, em função da maioria dos casos que acomete tais localizações se apresentarem com grandes dimensões além de apresentarem metástases linfáticas mais precocemente do que em mucosa jugal e palato devido à proximidade com a rica rede linfática e vascular (COSTA *et al.*, 2005; LAM *et al.*, 2006; DE ARAÚJO *et al.*, 2008)

De acordo com Gooris e colaboradores em 2001, a presença e a extensão do envolvimento de linfonodos regionais é considerado o fator prognóstico mais importante para determinar a sobrevida do paciente. A invasão neural, especialmente do nervo alveolar inferior e nervo lingual, podem causar parestesia na cavidade oral e face em estágios avançados da doença. A disseminação do carcinoma epidermoide de boca pode ocorrer por meio de continuidade ou contiguidade, invadindo orofaringe e atingindo estruturas ósseas e

musculatura profunda, ou ainda por meio de vasos linfáticos atingindo inicialmente linfonodos cervicais, e em estágios mais avançados via hematogênica, atingindo frequentemente, neste caso, os pulmões (GOORIS *et al.*, 2001; CROZIER e SUMER, 2010; OKUYEMI *et al.*, 2013).

Uma provável explicação para os resultados sombrios obtidos pelo tratamento, levando à ineficiência terapêutica quando se emprega uma modalidade de tratamento restrito à lesão, ocorre devido ao desenvolvimento de novas alterações malignas dentro do campo de pré-cancerização (RAPIDIS *et al.*, 2009; FELLER *et al.*, 2013).

Como limitações do sistema TNM vale ressaltar que a avaliação do tumor em diferentes instituições é subjetiva em decorrência das diferenças nas ferramentas diagnósticas, da disponibilidade das mesmas no momento do diagnóstico e da discrepância da análise inter- e intra-observador, além desse sistema definir o tumor primário em apenas duas dimensões, sugerindo que uma terceira dimensão, espessura tumoral ou a profundidade de invasão sejam consideradas como fatores de risco para metástases cervicais. A classificação atual baseia-se apenas na morfologia tumoral e não considera fatores prognósticos relacionados ao paciente como localização da lesão, idade, sexo e co-morbidades, nem mesmo fatores como marcadores biológicos e moleculares. Portanto, o sistema atual de estadiamento TNM não é totalmente preciso para fornecer um prognóstico individualizado (VAN DER SCHROEFF e DE JONG, 2009).

No entanto, até os dias atuais é aceito como um sistema muito importante para a avaliação prognóstica do tumor, sobrevida livre da doença e sobrevida global, além de auxiliar na determinação da melhor terapêutica para o paciente (LAM *et al.*, 2006; VAN DER SCHROEFF e DE JONG, 2009).

#### 1.1.6 DESORDENS POTENCIALMENTE MALIGNAS

Grande parte dos carcinomas epidermóides orais são precedidos por alterações visíveis da mucosa oral. Essas alterações podem variar desde lesões de coloração branca a avermelhada, podendo ser planas ou rugosas. Tais lesões podem ser consideradas potencialmente malignas por apresentarem alterações que são relacionadas a uma maior probabilidade de desenvolvimento de uma neoplasia maligna em comparação aos tecidos normais (PITYYAGE *et al.*, 2009; MISHRA, 2012).

Em um workshop realizado em 2005, a OMS recomendou abandonar a distinção entre lesões potencialmente malignas e condições potencialmente malignas e usar o termo de desordens potencialmente malignas. Desses distúrbios, leucoplasia e eritroplasia são os mais comuns. O diagnóstico destas desordens ainda é definido por exclusão de outras lesões que apresentam causas conhecidas. Apesar de um grande progresso no campo da biologia molecular não há ainda um único marcador que permita prever a transformação maligna em um paciente individual. A orientação geral é para excisar ou tratar a laser qualquer leucoplasia/eritroplasia oral ou de orofaringe, se possível, independentemente da presença ou ausência de displasia. No entanto, não se sabe se essa remoção impede verdadeiramente o possível desenvolvimento de um carcinoma epidermóide (VAN DER WAAL, 2009).

Embora estas lesões variem amplamente com o grau histológico, apenas um subconjunto irá avançar para câncer. Algumas lesões progridem rapidamente e tornam-se câncer invasivo, enquanto outros crescem lentamente ou permanecem latentes por longos períodos de tempo e apesar da maioria dos casos de carcinoma epidermóide bucal serem precedidos por várias desordens pré-malignas na mucosa bucal, muitos deles surgem de epitélio oral histologicamente normal (WARNAKULASURIYA *et al.*, 2008; MISHRA, 2012;).

#### 1.1.6.1 Leucoplasia

A leucoplasia é uma lesão relativamente comum em mucosa oral, e pode ser definida como uma lesão predominantemente branca ao exame clínico, de risco questionável, que não pode ser diagnosticada como nenhuma outra doença da mucosa oral. Leucoplasia é um termo de diagnóstico clínico, provisional e de exclusão (LEE *et al.*, 2006; VAN DER WAAL, 2009).

A prevalência estimada da leucoplasia oral relatada em todo o mundo é de aproximadamente 2%. No entanto, quando visto em relação a uma taxa de transformação maligna anual de 1%, este valor iria resultar no desenvolvimento de carcinoma epidermóide bucal em 20 para cada 100.000 pessoas/ano (VAN DER WAAL, 2009). Tem sido identificada com maior frequência em homens de meia-idade e idosos, com prevalência crescente com a idade. É prevalente em 8% dos homens e 2% de mulheres acima dos 70 anos de idade. Lesões no assoalho bucal, borda lateral de língua e lábio inferior são os mais propensos a mostrar alterações displásicas ou malignas e são considerados locais de alto risco (REDDI e SHAFER, 2006).

A incidência de câncer, com base em transformação maligna de leucoplasia oral é, por si só, muito elevada. A leucoplasia é seis vezes mais comum entre os fumantes do que entre os não-fumantes. A infecção pelo papilomavirus humano tipo 18 (HPV18) também seria um fator de risco independente para o desenvolvimento da leucoplasia oral, porém os resultados são conflitantes (BAGAN *et al.*, 2007; VAN DER WAAL, 2009). Essa associação a fatores de risco semelhantes àqueles para o desenvolvimento de carcinoma epidermóide bucal também corroboram para provar a relação entre as duas lesões.

Clinicamente, a leucoplasia pode ser subdividida em dois tipos: o homogêneo (plana, fina, uniforme) e o não homogêneo. Esta distinção é estritamente clínica, baseada em algumas características como, a espessura da placa e a coloração da superfície da lesão. A leucoplasia homogênea é uniforme, lisa e fina e está relacionada com um baixo risco de transformação maligna. O tipo não homogêneo, considerado de maior risco (WARNAKULASURIYA *et al.*, 2008) tem sido definido como aspecto misto composto por placas brancas e áreas avermelhadas, denominada eritroleucoplasia, que pode ser irregularmente plana (salpicada) ou nodular. A leucoplasia verrucosa é outro tipo de leucoplasia não homogênea. Embora geralmente tenha aparência branca e uniforme, sua textura verrucosa é a principal característica, sendo clinicamente indistinguível do carcinoma verrucoso. A leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP) é um subtipo de leucoplasia verrucosa, caracterizada pela apresentação multifocal, resistência ao tratamento e elevada taxa de transformação maligna (CABAY *et al.*, 2007; WOOLGAR e TRIANTAFYLLOU, 2011).

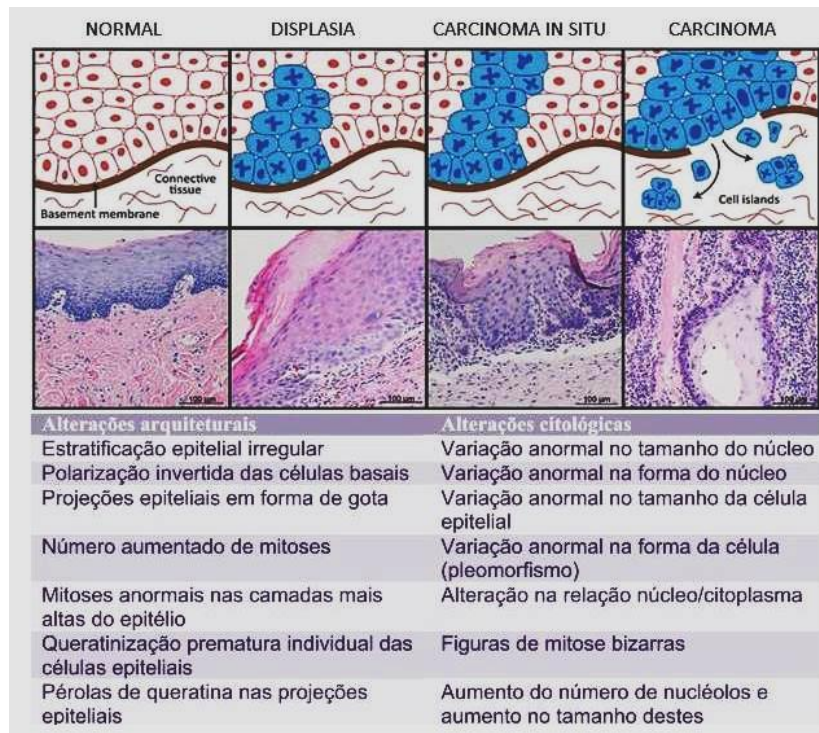
Histopatologicamente, uma distinção pode ser feita entre leucoplasia com presença ou ausência de displasia. Um maior potencial maligno é observado em lesões que apresentam displasia epitelial (LEE *et al.*, 2006). A avaliação da gravidade da displasia no que tange às alterações celulares e teciduais presentes estão correlacionados com a eritroleucoplasia, tipo não homogêneo e baseia-se na perturbação arquitetônica (alterações morfológicas e estruturais) acompanhada por atipia celular perda da maturação normal do epitélio (PITYAGE *et al.*, 2009). Deve-se ressaltar que a displasia é um espectro e que não existem critérios para dividir precisamente este espectro em categorias leve, moderada e intensa, portanto seu valor prognóstico não é preciso. Além disso, pode haver uma variação substancial inter e intra-observador na avaliação histopatológica quanto à presença e gravidade de displasia epitelial (KUJAN *et al.*, 2007; VAN DER WAAL, 2009).

Casos que a apresentem de forma discreta ou até que não a apresentem estão sob risco de progressão para posteriores estágios em que graus maiores de displasia serão observados e,

portanto, devem ser removidas cirurgicamente e o paciente, acompanhado cuidadosamente (BARNES *et al.*, 2005; VAN DER WAAL, 2009; VILLA *et al.*, 2011)

Os fatores geralmente reconhecidos que, estatisticamente, carregam um risco aumentado de transformação maligna em carcinoma epidermóide são: gênero feminino, tempo prolongado de seu curso clínico, leucoplasia em não-fumantes, localização na língua e/ou assoalho da boca, tamanho > 2 cm, tipo não homogêneo, e presença de displasia epitelial. Desses fatores de risco, a presença de displasia epitelial - muitas vezes correlacionado com o subtipo clínico não homogêneo - eritroleucoplasia- é, em geral, considerado o mais importante indicador do potencial maligno. No entanto, deve reconhecer-se que algumas lesões displásicas podem permanecer clinicamente inalteradas ou podem mesmo mostrar regressão completa. Além disso, a transformação carcinomatosa pode também ocorrer em leucoplasia não-displásica (VAN DER WAAL, 2009).

Os critérios utilizados para o diagnóstico de displasia bem como as alterações fenotípicas do epitélio são mostrados na figura 1.



**Figura 1-** Progressão do Carcinoma Epidermóide e critérios utilizados para identificação das displasias. Epitélio normal consiste de células com baixa atividade mitótica e uma membrana basal intacta. Na displasia, células anormais aparecem perto da membrana basal, e no carcinoma in situ (de espessura completa displasia), as células anormais estão presentes ao longo de toda a espessura do epitélio. No carcinoma, a membrana basal é interrompida, e as células tumorais invadem o tecido conjuntivo. (Fonte: Adaptado de Scanlon *et al.*, 2013).

### 1.1.6.2 Eritroplasia

Outra lesão considerada potencialmente maligna é a eritroplasia, que consiste em uma placa vermelho-fogo que não pode ser caracterizada clínica ou patologicamente como qualquer outra doença conhecida. A aparência clínica pode ser plana ou mesmo deprimida com uma superfície lisa ou granulada. O epitélio frequentemente atrófico, mostra ausência de queratina. Às vezes, observa-se alguma hiperplasia. A cor vermelha é devido à fina espessura epitelial que permite a visualização da microvasculatura subjacente (WARNAKULASURIYA *et al.*, 2008; CARNELIO *et al.*, 2011).

As eritroplasias isoladas são relativamente incomuns, sendo as eritroleucoplasias as manifestações mais comuns (WARNAKULASURIYA *et al.*, 2008). Tabaco e álcool também são considerados importantes fatores etiológicos. Ocorre principalmente em indivíduos de meia idade e idosos. Não há predileção por gênero. Qualquer sítio da cavidade oral e orofaringe podem estar envolvidos, mas ocorre predominantemente no assoalho da boca, palato mole, ventre lingual e tonsilas, geralmente de forma solitária. Esta apresentação solitária é frequentemente útil na distinção clínica entre eritroplasia, líquen plano erosivo, lúpus eritematoso e candidíase eritematosa, uma vez que estas lesões ocorrem quase sempre bilaterais com padrão mais ou menos simétrico (VAN DER WAAL, 2009).

Em geral, a maioria das eritroplasias são sintomáticas e precisam ser tratadas por causa do seu grande risco de transformação maligna. A cirurgia por bisturi ou laser, é a modalidade de tratamento recomendada (VAN DER WAAL, 2009).

Os critérios histológicos que avaliam as alterações celulares e teciduais presentes nestas lesões são baseadas em anormalidades relacionadas a atipia celular e a perda da maturação normal do epitélio, ocasionando alterações morfológicas e estruturais que denotam um potencial de malignidade. Tais alterações são denominadas displasias epiteliais e representam a primeira etapa para o desenvolvimento do carcinoma epidermóide bucal (OMS, 2005; PITYAGE *et al.*, 2009; CARVALHO *et al.*, 2013).

De acordo com as alterações presentes no tecido epitelial, as displasias são categorizadas em leve, quando a perda de estratificação epitelial está limitada ao terço inferior do epitélio, acompanhadas de mínima atipia citológica; moderada quando a perda de estratificação epitelial e alterações citológicas moderadas se estendem do terço inferior ao médio do epitélio e intensa quando apresenta perda de estratificação epitelial nas três camadas do epitélio, associada à atipia celular. Entretanto, a presença de alterações arquiteturais apenas

nos terços médio e inferior do epitélio associadas à considerável atipia celular, também devem ser denominadas de displasia intensa (WARNAKULASURIYA *et al.*, 2008).

As taxas de transformação maligna para carcinoma *in situ* ou displasia epitelial intensa (incluindo máculas brancas, vermelhas ou combinadas) mostraram uma taxa de 26,3% da média que varia de 14,3% para 50,0%. Relatórios histopatológicos concluíram que entre as eritroplasias, 51% apresentaram carcinoma invasivo, 40% carcinoma *in situ* e 9% displasia leve ou moderada (REDDI e SHAFER, 2006). Outros estudos mostraram que a transformação maligna varia bastante em lesões que apresentam displasias, com um índice variando em torno de 6 a 36% (SMITH *et al.*, 2009). No entanto, não há séries suficientemente documentadas que permitam calcular uma taxa de transformação maligna anual fiel (VAN DER WAAL, 2009; Carnelio *et al.*, 2011, Villa *et al.*, 2011).

Embora o diagnóstico das displasias seja feita com base na análise morfológica, o conhecimento sobre a fisiopatologia dessas lesões e os acúmulos de alterações genéticas responsáveis pela transformação maligna são de fundamental importância para elucidar o comportamento dessas desordens. A este respeito, os biomarcadores podem ajudar a entender os acontecimentos envolvidos na progressão de uma forma não invasiva a uma lesão invasiva. Além disso, o passo inicial de transformação de tecido normal para a displasia é um bom indicador de prognóstico destas lesões (CARVALHO *et al.*, 2013). Assim, mais estudos em longo prazo, com resultados de acompanhamento de dados e um grande número de casos com colaboração multicêntrica, são necessários para determinar os mecanismos específicos que regem este evento.

## 1.2 Carcinogênese

Os cânceres são doenças genéticas, resultantes de mutações acumuladas no genoma. Estas mutações estão associadas ao descontrole de programas essenciais como proliferação, morte e diferenciação celular. Acredita-se que a progressão gradual da tumorigênese está associada a três princípios básicos: (I) o câncer pode resultar da mutação de genes supressores tumorais (GSTs), proto-oncogenes e genes de reparo do DNA; (II) há uma ordem de eventos genéticos que leva à carcinogênese; e (III) a variação na ordem dos eventos genéticos é possível, embora o acúmulo de mutações genéticas invariavelmente resulte no desenvolvimento tumoral (VOGELSTEIN e KINZLER, 2004; HANAHAN e WEINBERG, 2011;).

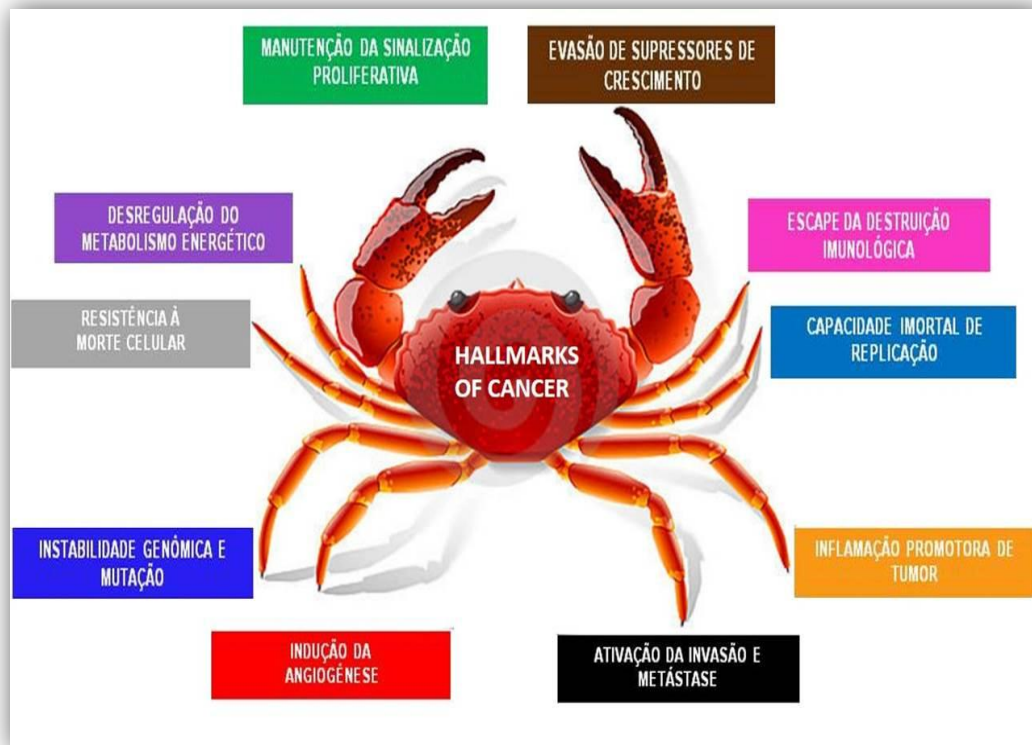


Portanto, o câncer é resultado do acúmulo dessas mutações, as quais são transmitidas às gerações celulares subsequentes, até o momento em que uma célula mutada torna-se funcionalmente independente do meio ao seu redor, ou seja, apresenta alterações fenotípicas e proliferativas que a caracteriza como sendo uma célula maligna.

Em continuidade a esse evento, ocorre a expansão clonal caracterizada pela proliferação dessas células mutadas e devido à desregulação dos mecanismos de proliferação e diferenciação celulares, inúmeras outras mutações ocorrem. Essas mutações adicionais são responsáveis pela heterogeneidade e progressão tumoral. Dessa forma, a massa neoplásica torna-se heterogênea e individual (HANAHAN e WEINBERG, 2011).

Como consequência desses processos, as células neoplásicas adquirem características aberrantes tais como, intenso potencial de proliferação, invasão e metástase (Figura 2).

Hanahan e Weinberg em 2000 agruparam as características adquiridas por uma célula cancerosa em seis classes de alterações que interferem com a fisiologia normal de células e tecidos: (1) auto-suficiência quanto a fatores de crescimento; (2) insensibilidade a fatores inibitórios de proliferação; (3) evasão da apoptose ou morte celular programada; (4) potencial replicativo infinito; (5) angiogênese sustentada; e, (6) invasão tecidual e metástase. Em 2011, estes mesmos autores definiram outras quatro capacidades funcionais e habilitantes adquiridas em diferentes tipos de tumores através de mecanismos distintos e em vários momentos durante o curso de desenvolvimento de várias neoplasias, que permitem às células cancerosas a sobreviver, proliferar e disseminar, são elas: (7) a instabilidade genômica em células cancerosas, o que gera mutações aleatórias, incluindo rearranjos cromossômicos, entre eles estão as mudanças genéticas raras que podem orquestrar características marcantes; (8) o estado inflamatório de lesões pré-malignas e malignas que é movido por células do sistema imunitário, alguns dos quais servem para promover a progressão do tumor através;(9) a reprogramação do metabolismo de energia celular, a fim de suportar o crescimento celular contínuo e proliferação, substituindo o programa metabólico que opera na maioria dos tecidos normais e alimenta as operações fisiológicas das células associadas e (10) a evasão ativa das células de câncer do ataque e eliminação por células do sistema imunológico; destacando os papéis dicotômicos de um sistema imunológico que tanto antagoniza, quanto promove o desenvolvimento e progressão tumoral (HANAHAN e WEINBERG, 2011).



**Figura 2-** Características adquiridas pelas células neoplásicas. (Adaptado de Hanahan & Weinberg, 2011).

A progressão a partir de células normais para pré-tumorais, câncer, invasão local e finalmente metástases, é o resultado da expansão clonal destas células que adquiriram uma vantagem seletiva de crescimento, que lhes permitem superar as células circunjacentes.

No processo de carcinogênese, é frequentemente ao longo da fase de progressão tumoral, que algumas células adquirem um fenótipo mais agressivo, invadindo tecidos adjacentes e formando metástases à distância. As células metastáticas frequentemente apresentam moléculas diferentemente expressas qualitativa e/ou quantitativamente. Estas moléculas têm sido identificadas como possíveis marcadores de progressão tumoral, e são utilizadas para exploração da fisiopatologia da disseminação metastática dos tumores. Algumas moléculas têm sua expressão diminuída ou mesmo abolida nas células metastáticas enquanto outras estão superexpressas.

O grande problema para os pacientes com câncer é a metástase a partir do tumor primário para sítios secundários. A metástase é o processo pelo qual as células tumorais difundem-se a partir do tumor primário, migram através da membrana basal, sobrevivem no sistema circulatório, invadem um local secundário e começam a se proliferar. No passado, a investigação concentrou-se sobre a biologia, tendo mais de uma vista global, em vez de vista molecular. Mais recentemente, o foco tem sido a determinação das bases moleculares,

olhando para genes que induzem ou inibem metástases (STAFFORD *et al.*, 2008; KALLURI e WEINBERG, 2009; HANAHAN e WEINBERG, 2011).

No que concerne ao CEB, embora o fumo e o álcool sejam fatores extrínsecos com influência comprovada na sua patogênese, a exposição celular à carcinógenos desencadeia uma série de mutações genéticas consecutivas, capacitando as células a adquirirem essas características aberrantes, principalmente, em pacientes com predisposição genética, promovendo a ativação de protooncogenes e a inativação de genes supressores tumorais, levando à produção de células mutadas e com potencial neoplásico (HANAHAN e WEINBERG, 2000).

A progressão genética do câncer também inclui a desregulação transcricional, como consequência do acúmulo de alterações genéticas. O modelo de progressão transcricional, semelhante ao de progressão genética, propõe que a maioria das alterações ocorra antes da malignidade e que a desregulação transcricional ocorra durante a progressão de um estado normal para pré-maligno, e então para um estado maligno. Ha e colaboradores em 2006 mostraram que o maior número de alterações transcricionais (RNAm) ocorrem durante a transição da mucosa normal à pré-maligna, quando comparados com os eventos de alteração na expressão gênica que ocorrem na transição de tecidos pré-malignos a tumores malignos. Esses resultados sugerem que muitas das alterações genéticas que se acumulam durante a progressão do câncer oral ocorrem preferencialmente nos estágios iniciais da doença. Neste aspecto, os tecidos pré-malignos já possuiriam muitas das alterações transcricionais, mutações e perdas de material genético identificadas no CEB (HA *et al.*, 2006).

Estima-se que para o CEB, as células sofram de 6-10 mutações antes de tornarem-se malignas, podendo ser necessários anos de exposição aos carcinógenos para ocorrer uma combinação de mutações apropriada que culminará na transformação maligna. Desta forma, a evolução de uma célula normal para uma célula maligna define um período de tempo caracterizado como estágio pré-maligno, uma fase precoce do processo de carcinogênese, em que pode ter ocorrido qualquer mudança fenotípica decorrente das alterações moleculares (WRIGHT, 1998).

Em contrapartida, outros autores defendem a hipótese de que as células normais diferenciadas não sobreviveriam tempo suficiente para acumular as mudanças genéticas necessárias para o desenvolvimento tumoral. Isto é, a heterogeneidade morfológica dos tumores neoplásicos humanos, desmente o conceito tradicional de progressão do tumor por meio de cascata de alterações em várias vias moleculares e celulares. Acumulando assim, evidências que suportam a existência de sub-populações de células dentro dos tumores sólidos

que exibem comportamentos biológicos exclusivos, como potencial metastático. A hipótese de célula-tronco cancerosa (CSC) afirma que uma subpopulação de células intratumoral, são as únicas capazes de propagar o tumor, e baseia-se no modelo hierárquico para explicar a heterogeneidade e comportamento tumoral (BHAIJEE *et al.*, 2012).

Dessa forma, mutações capazes de gerar uma neoplasia maligna ocorreriam em células específicas, com características semelhantes às células-tronco (REYA *et al.*, 2001). As células mutadas (células-tronco neoplásicas) dariam origem a dois tipos diferentes de células-filhas, as idênticas (imortalizadas, indiferenciadas) e as não idênticas (não-imortalizadas e com grande potencial proliferativo para que ocorra a expansão clonal e progressão tumoral). Essas células-tronco neoplásicas idênticas permaneceriam em um estado predominantemente quiescente na massa tumoral, porém teriam um importante papel na heterogeneidade do tumor e na sua recorrência após o tratamento, pois se acredita que possam apresentar a característica de quimioresistência (LI e XIE, 2005; HOUGHTON *et al.*, 2007; BHAIJEE *et al.*, 2012;).

Desta forma, estratégias terapêuticas que exploram a interdependência funcional das CSC pode reduzir a taxa de recorrência e metástase CEB, bem como de vários outros tumores. Avanços na imagiologia multimodal e nanotecnologia, em conjunto com os modelos de CSC, poderão elucidar os mecanismos regulamentares que regem a biologia CSC *in vivo* e desenvolver novas estratégias terapêuticas que possam mitigar a morbidade e mortalidade desta doença generalizada (BHAIJEE *et al.*, 2012).

### **1.3 Transição Epitelial-Mesenquimal e Metástase**

Historicamente as células epiteliais e mesenquimais foram identificadas com base na sua aparência visual e na morfologia das estruturas multicelulares que elas formam (SHOOK e KELLER, 2003). Um típico epitélio é uma camada de células, frequentemente com espessura de apenas uma célula, onde cada uma se dispõe individualmente em relação à célula vizinha de uma maneira uniforme.

Junções celulares regularmente espaçadas e adesões entre as células epiteliais vizinhas às mantém firmemente unidas e inibem o movimento de células individuais além da monocamada epitelial. Uma adesividade interna permite à camada epitelial apresentar um espaço tridimensional e mantê-lo com definição estrutural e rigidez mecânica. A camada epitelial é polarizada, isso significa que as superfícies apical e basal são claramente diferentes,

aderindo a diferentes substratos ou apresentando diferentes funções (ACLOQUE *et al.*, 2009; KALLURI e WEINBERG, 2009)

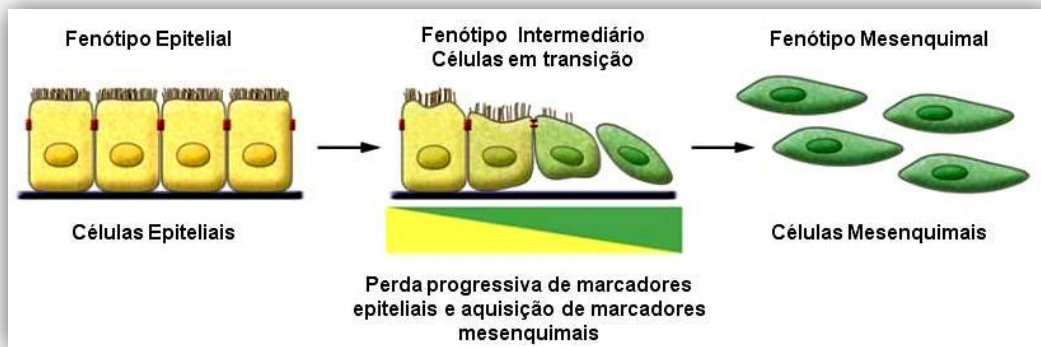
Por outro lado, as células do estroma ou mesenquimais não possuem uma compacta adesão intracelular, são frouxamente organizadas numa matriz extracelular tridimensional e compreendem tecidos conjuntivos adjacentes ao epitélio. Elas dão origem às estruturas com forma irregular e não uniformes em composição e densidade (KALLURI e WEINBERG, 2009).

As células mesenquimais possuem uma forma mais alongada em relação às células epiteliais e a adesão entre as células é muito menor, o que fornece a elas uma importante capacidade migratória. Além disso, a migração mesenquimal é mecanicamente diferente do movimento epitelial. Células epiteliais se movem como uma camada em bloco. Por outro lado, a migração mesenquimal é muito mais dinâmica e pode acontecer célula a célula, individualmente (LEE *et al.*, 2006).

A maior parte dos tecidos e órgãos adultos surge a partir de uma série de conversões de células epiteliais para as células mesenquimais, através do programa de transição epitelial-mesenquimal (TEM) e do processo inverso (transição mesenquimal-epitelial (MET)) (KALLURI e WEINBERG, 2009)

A transição epitelial-mesenquimal é um processo que ocorre fisiologicamente durante algumas fases do desenvolvimento embrionário em algumas espécies de animais, que desempenha um papel crucial em muitos processos histogênicos, particularmente nos vertebrados, onde o coração, o sistema músculo-esquelético, a maioria das estruturas craniofaciais e os nervos periféricos são formados por esse mecanismo (ACLOQUE *et al.*, 2009).

Adversamente, a TEM pode causar fibrose num órgão e promover a progressão para carcinoma através de uma variedade de mecanismos que permite a uma célula epitelial polarizada, que normalmente interage com membrana basal por meio de sua superfície basal, submeter-se a várias alterações bioquímicas que lhe permitam assumir um fenótipo de células mesenquimais, que inclui a capacidade migratória melhorada, capacidade de invasão, elevada resistência à apoptose e produção aumentada de componentes de degradação da matriz extracelular (MEC) (figura 3), (KALLURI e WEINBERG, 2009; KALLURI e NEILSON, 2003). A conclusão da TEM é sinalizada pela degradação da membrana basal subjacente e a formação de uma célula fenotipicamente mesenquimal, que pode migrar para longe da camada epitelial na qual se originou.



**Figura 3-** Transição epitelial-mesenquimal (TEM): O programa de TEM envolve a transição funcional das células epiteliais polarizadas em células mesenquimais com mobilidade e secretoras de componentes da MEC. Fonte: Adaptado de Kalluri & Weinberg, 2009.

A Transição epitelial-mesenquimal e seu oposto, a transição mesenquimal-epitelial, são conceitos que foram definidos pela primeira vez por Elizabeth Hay há mais 40 anos. Usando uma galinha primitiva como modelo (observando uma estrutura que se forma no início do desenvolvimento de aves, répteis e mamíferos e que é um dos primeiros sinais de gastrulação), Hay propôs que as células epiteliais poderiam sofrer drásticas mudanças fenotípicas que refletiriam a sua "transformação" para as células do mesênquima. No entanto, uma vez que esta "transformação" é reversível e células mesenquimais podem reverter para células epiteliais através de MET, o termo transição é preferencialmente utilizado (ACLOQUE *et al.*, 2009).

Após a conclusão do desenvolvimento de tecidos epiteliais, as células epiteliais normalmente exercem função específica de tecido, enquanto que as células mesenquimais do tecido desempenham um papel de suporte. Implícita nessa noção foi a idéia de que um estado de diferenciação terminal é necessário para realizar essas funções especializadas e que as células são mantidas em permanente estado de diferenciação quando o desenvolvimento é o completo. Esse conceito tem sido desafiado por numerosas observações que as células dentro de um epitélio terminalmente diferenciadas podem de fato mudar seu fenótipo através da ativação de um programa de TEM, que permite que a transdiferenciação resulte na conversão de células epiteliais para mesenquimais durante o desenvolvimento e na vida adulta (ACLOQUE *et al.*, 2009; ZEISBERG e NEILSON, 2009; KALLURI e WEINBERG, 2009; SCANLON *et al.*, 2013).

Estes programas também podem ser ativados em associação com a reparação tecidual e estresses patológicos, incluindo vários tipos de inflamação e carcinomas de alto grau.

Assim, TEM constitui um mecanismo reconhecido para dispersar as células em embriões, formar células mesenquimais nos tecidos lesados, e iniciar o comportamento invasivo e metastático de cânceres de origem epitelial.

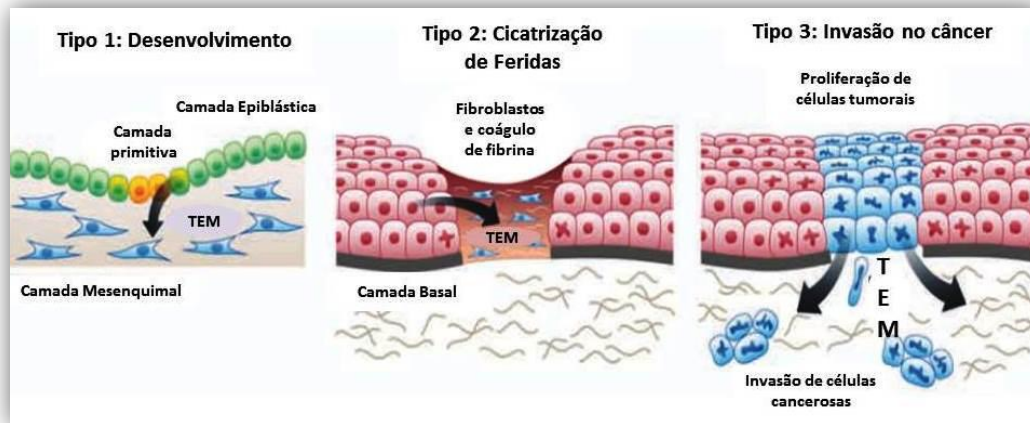
A classificação de TEM em subtipos diferentes é encontrada em três diferentes configurações biológicas que levam a consequências funcionais muito distintas (Figura 4). Por enquanto, os sinais específicos que delineiam a TEM nas três configurações ainda não são claros, no entanto, é bem aceito que as distinções funcionais são aparentes (KALLURI e WEINBERG, 2009; ZEISBERG e NEILSON, 2009; SCANLON *et al.*, 2013).

A TEM tipo 1 está associada com a implantação, a formação do embrião e o desenvolvimento de órgãos são organizados para gerar diversos tipos de células que partilham fenótipos mesenquimais comuns. Pode gerar células mesenquimais (mesênquima primário) que têm o potencial para subsequentemente ser submetido a uma MET para gerar epitélios secundários. Esta TEM tipo 1, não causa fibrose nem induz disseminação sistêmica através da circulação resultando em um fenótipo invasivo e ocorre na região orofacial durante palatogenesis (KALLURI e WEINBERG, 2009; ZEISBERG e NEILSON, 2009; SCANLON *et al.*, 2013).

O programa de TEM tipo 2 começa como parte de um evento de reparação que normalmente gera fibroblastos e outras células relacionadas, a fim de reconstruir tecidos após traumas e lesões inflamatórias. Na configuração de fibrose do órgão, a TEM tipo 2 pode continuar a responder à inflamação persistente, levando eventualmente à destruição de órgãos. A fibrose tecidual é em essência uma forma inabalável de cicatrização de feridas devido à inflamação persistente (KALLURI e WEINBERG, 2009; ZEISBERG e NEILSON, 2009; SCANLON *et al.*, 2013).

O terceiro tipo de transição epitelial-mesenquimal ocorre em células neoplásicas que anteriormente sofreram alterações genéticas e epigenéticas, especificamente nos genes que favorecem o crescimento clonal e para o desenvolvimento de tumores localizados. Essas mudanças, que afetam principalmente oncogenes e genes supressores tumorais, conspiram com o circuito de regulação de TEM para produzir resultados muito diferentes daqueles observados nos outros dois tipos de TEM. É importante salientar que, as células cancerosas podem passar por TEM em graus diferentes, com algumas células mantendo muitas características epiteliais e outras células perdendo todos os vestígios de sua origem epitelial e tornando-se totalmente mesenquimal. Embora muito se saiba sobre as vias de sinalização envolvidos na TEM tipo 1 e 2, ainda não está claro o que induz especificamente sinais de

TEM tipo 3 em células de carcinoma (KALLURI e WEINBERG, 2009; ZEISBERG e NEILSON, 2009; SCANLON *et al.*, 2013).



**Figura 4-** Tipos de transição epitelial-mesenquimal (TEM). Tipo 1: ocorre no desenvolvimento, por exemplo, quando ocorre a transição das células epiteliais da gastrulação para células mesenquimais com motilidade. Tipo 2: ocorre quando as células epiteliais ou endoteliais secundárias movem-se para espaços intersticiais na cicatrização de feridas ou inflamação crônica, resultando em fibrose. Tipo 3: ocorre quando células tumorais epiteliais migram para além do tumor primário e formam metástases. Fonte: Scanlon *et al.*, 2013.

Um número de diferentes processos moleculares está envolvido a fim de iniciar a TEM e habilitá-lo para chegar a conclusão. Estes incluem: ativação de fatores de transcrição, expressão específica de proteínas de superfície, reorganização do citoesqueleto, a produção de enzimas de degradação da matriz extra-celular (MEC) e alterações na expressão de microRNAs específicos (VESUNA *et al.*, 2008; SCANLON *et al.*, 2013).

Deste modo, tem sido demonstrado por um grande número de estudos que o processo de TEM está ligado com a metástase de células cancerosas e os fatores envolvidos são também utilizados como biomarcadores para demonstrar a passagem de uma célula através de um programa de TEM correlacionando-se diretamente com biomarcadores de pobre prognóstico.

Estes biomarcadores incluem um risco aumentado de recorrência do câncer e uma diminuição da taxa de sobrevivência em vários tipos de cânceres, tais como, câncer da mama, câncer colorretal, câncer gástrico, câncer da bexiga e câncer de pulmão. No entanto, no tumor, a natureza transitória, onde apenas algumas células cancerosas participam dos eventos de TEM, enquanto outras células mantêm suas características epiteliais, faz a investigação



científica deste fenômeno *in vivo* difícil. Portanto, muito do que se sabe sobre a TEM é derivada de estudos *in vitro* que foram correlacionados com observações clínicas em amostras de tumor (KRISANAPRAKORNKIT e IAMAROON, 2012).

O Programa de TEM também é acompanhado por perda de contatos célula-célula, caracterizados por uma regulação negativa da expressão de E-caderina, uma glicoproteína transmembrana dependente de cálcio presente na maioria das células epiteliais, que desempenha um papel importante na adesão intercelular, manutenção da polaridade celular e arquitetura dos tecidos (HIRSHBERG *et al.*, 2007).

O aumento da expressão de E-caderina está bem estabelecido como antagonista de invasão e metástases, enquanto que a redução da sua expressão é conhecida por potencializar o fenótipo invasivo, ficando cada vez mais evidente que a expressão reduzida de genes envolvidos na adesão e comunicação célula-célula, está relacionada à promoção do processo de invasão e fundamental para a sobrevivência das células cancerosas e nova adesão do tumor metastático (HIRSHBERG *et al.*, 2007; COWIN *et al.*, 2005).

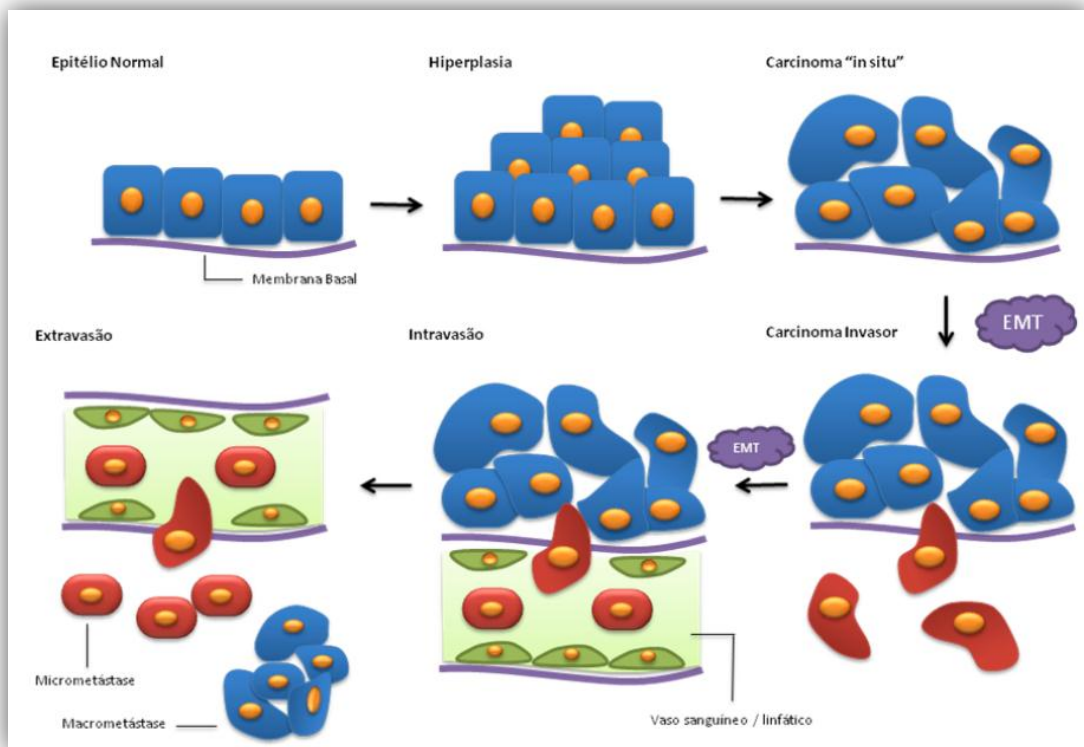
A TEM regula amplamente a invasão e metástase, já que a ocorrência de TEM durante a progressão do tumor permite às células do tumor ainda não invasivo, adquirir a capacidade de infiltrar os tecidos vizinhos e conseqüentemente enviar metástases para locais distantes. A evidência mais convincente para o envolvimento de TEM na oncogênese é a capacidade dos reguladores TEM de induzir uma agressividade tumoral (ZHOU *et al.*, 2012).

A morte decorrente da progressão do câncer é muitas vezes secundária ao desenvolvimento da doença metastática, e a capacidade que um carcinoma tem de desenvolver metástase à distância, acaba sendo um importante fator prognóstico da doença.

Nos carcinomas, o processo de formação metastática é complexo, e se dá através de uma sequência de passos distintos, que resulta das interações entre as células tumorais e o microambiente tecidual onde estas células se encontram. Em cada um desses passos, as células malignas têm de superar os sistemas de controle do organismo, modificar seu comportamento e suas características fenotípicas principais, e se adaptar a novos ambientes para desenvolver tumores em sítios distantes da neoplasia original (ACLOQUE *et al.*, 2009).

O primeiro passo da cascata metastática é a invasão, a qual requer um comportamento neoplásico das células epiteliais tumorais, que se tornam capazes de enfraquecer ou perder a adesão célula-célula e ganhar motilidade. Moléculas de adesão celular, pertencentes à classe de caderinas e cateninas têm um papel fundamental tanto na adesão célula-célula quanto nas junções de células-matriz extracelular (FIDLER, 2003; STAFFORD *et al.*, 2008; HANAHAN e WEINBERG, 2011).

No segundo passo, chamado intravasão, as células tumorais penetram através do endotélio vascular sanguíneo ou linfático e ganham a circulação sistêmica, das quais apenas algumas células tumorais presentes na circulação parecem ser capazes de sobreviver neste ambiente. Destas células sobreviventes, algumas completam o terceiro passo, a extravasão, no qual as células escapam do lúmen dos vasos e atingem sítios distantes. Neste novo ambiente hospedeiro, um conjunto ainda menor dessas células metastáticas consegue proliferar formando um pequeno conjunto de células malignas (micrometástases) que irá se transformar em tumores metastáticos secundários formação de pequenos nódulos de células cancerosas (micrometástases), e finalmente o crescimento de lesões micrometastáticas em tumores macroscópicos, sendo este último passo denominado colonização (figura 5) (FIDLER, 2003; STAFFORD *et al.*, 2008; HANAHAN e WEINBERG, 2011).



**Figura 5** - Etapas da cascata metastática.

A investigação sobre a capacidade de invasão e metástase tem acelerado dramaticamente na última década com o surgimento de novas ferramentas de pesquisa e refinados modelos experimentais a fim de identificar genes reguladores críticos envolvidos nesses processos.

Uma observação cada vez mais evidente é a de que a expressão reduzida de genes envolvidos na adesão e comunicação célula-célula provavelmente está relacionada à promoção do processo de invasão e adesão do tumor metastático (COWIN *et al.*, 2005). Assim, o processo de formação metastática é possivelmente determinado por vias de sinalização que controlam a repressão de genes relacionados à adesão e comunicação célula-célula (SHERIDAN *et al.*, 2006).

A interrupção da ação da E-caderina é indispensável durante os eventos que a transição epitelial-mesenquimal durante a gastrulação e organogênese em que as células epiteliais são convertidas em células mesenquimais (VESUNA *et al.*, 2008). Ao deixar de expressar E-caderina, as células tumorais passam a expressar altos níveis de N-caderina, potencializando as interações com fibroblastos e células endoteliais que também expressam N-caderina. A expressão de N-caderina em células de carcinoma de mama está correlacionada com aumento da motilidade e invasão, sugerindo que a N-caderina potencialize a interação entre as células tumorais e as células do estroma. Assim, a N-caderina pode conferir um fenótipo celular "dominante", aumentando a motilidade, invasão e progressão do tumor, mesmo na presença de E-caderina, a sobre-expressão de N-caderina tem sido correlacionada com o aumento da migração, invasão e progressão tumoral (BAUM *et al.*, 2008).

Assim, a perda ou a supressão da expressão de E-caderina torna-se um evento crítico de sinalização da perda do fenótipo epitelial e início do programa invasivo. Há evidências que indicam que os defeitos de E-caderina levam ao desenvolvimento e progressão do câncer (VESUNA *et al.*, 2008; SCANLON *et al.*, 2013). A maioria dos defeitos de expressão de E-caderina tem sido associados com origens epigenéticas como a metilação ou silenciamento transcricional. A repressão por hipermetilação do promotor, repressão da transcrição e mutações estão implicados com E-caderina como mediadora da progressão do câncer.

Um conjunto de fatores de transcrição primariamente descritos como importantes no controle da embriogênese, incluindo Snail, Slug e SIP1, bem como dois membros da família ZEB, ZEB1 e ZEB2 têm sido mostrados com capacidade de reprimir a E-caderina e desempenhar papel importante na indução do programa de TEM (LIU *et al.*, 2005; VESUNA *et al.*, 2008; SCANLON *et al.*, 2013).

No entanto, as moléculas que participam na supressão da E-caderina podem diferir de acordo com o órgão em cada malignidade e diferentes reguladores de TEM podem desempenhar um papel diferencial para induzir TEM e metástase (LIANG *et al.*, 2010; YANG e WEINBERG, 2008).

Várias vias de sinalização molecular podem provocar a TEM, como as relacionadas a receptor tirosina quinase (RTK), proteínas quinases ativadas por mitógenos (MAPKs), integrinas ligada ao quinase (ILK), fosfatidil-inositol-quinase (PI3K), Src-STAT, GTPases, Wnt e Notch, e fator transformador de crescimento (TGF). No entanto, as vias de sinalização que envolvem RTKs não são suficientes para promover a TEM sozinhos. Estudos destacam que a interferência entre estas vias permanece em grande parte desconhecidas (WALLERAND *et al.*, 2010).

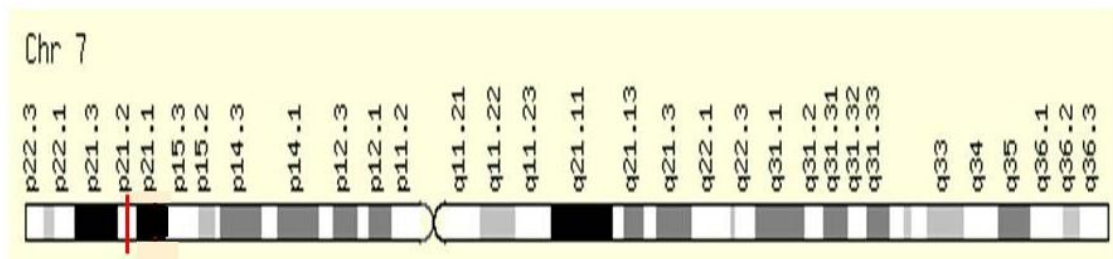
O fator de transcrição twist foi recentemente apontado como um importante regulador da TEM durante a progressão tumoral e metástase e vem se tornando um importante marcador diagnóstico e prognóstico para pacientes devido ao fato de sua sobre-regulação positiva e metilação do gene estarem sendo implicados em vários tipos de câncer (WALLERAND *et al.*, 2010; KHAN *et al.*, 2013).

#### **1.4 Twist: Gene que parece atuar como um indutor de transição epitelial-mesenquimal e regulador-chave da metástase tumoral**

TWIST foi inicialmente identificado em *Drosophila*, a proteína DTWIST (homóloga ao Twist em *Drosophila*) é crucial para adequada gastrulação e formação do mesoderma (SIMPSON, 1983; THISSE *et al.*, 1987). O nome "Twist" (em português "torção") foi dado a este gene com base em observações nos embriões de *Drosophila*, os quais não sofreram a gastrulação normal, não produziram mesoderma e morreram no final da embriogênese com uma aparência "torcida", devido à ausência deste gene (QIN *et al.*, 2012).

Existem dois genes *TWIST*, o *TWIST1* (ou *TWIST*) e o *TWIST2* (ou *DERMO-1*) que são bem-conservados em vertebrados. Em mamíferos o *TWIST1* e o *TWIST2* compartilham muitas semelhanças estruturais e funcionais, tanto no domínio C-terminal quanto no domínio N-terminal de suas proteínas (ANSIEAU *et al.*, 2008). Porém, neste estudo, daremos maior enfoque ao *TWIST1*.

O gene *TWIST* está localizado no braço curto do cromossomo 7 (7p21.2) (Figura 6), consiste de 2 éxons e codifica um fator de transcrição hélice-alça-hélice básico (bHLH) altamente conservado, que exerce importantes funções regulatórias durante a embriogênese (WALLERAND *et al.*, 2010). É ativado em todos os três tipos de TEM, está hiper-regulado em metástases de câncer e é importante na diferenciação do mesoderma (ZEISBERG e NEILSON, 2009).



**Figura 6-** Localização do gene *TWIST1* no cromossomo 7(p21. 2). Fonte: GeneCards, 2014.

O *TWIST* tem papel crítico no desenvolvimento do mesoderma e em células humanas foi identificado pela primeira vez na síndrome Saethre-Chotzen (SCS), uma síndrome autossômica dominante, na qual mutações neste gene são responsáveis pela inativação da proteína nos osteoblastos levando a um amplo espectro de malformações, incluindo baixa estatura, craniossinostose, testa alta, ptose, orelhas pequenas e hipoplasia maxilar (ZHANG *et al.*, 2007; QIN *et al.*, 2012).

A proteína twist modula muitos genes alvos através de elementos-E-box responsivos (domínio ligante), apresenta elevada expressão em metástases e está relacionada a muitos tipos de tumores agressivos, incluindo câncer de mama (YANG *et al.*, 2004), o carcinoma hepatocelular (LEE *et al.*, 2006), o câncer de próstata (KWOK *et al.*, 2005, YUEN *et al.*, 2007), o câncer gástrico (LUO *et al.*, 2008; FENG *et al.*, 2009) e o carcinoma de células escamosas esofágico (YUEN *et al.*, 2007; SASAKI *et al.*, 2009).

O papel de twist na progressão tumoral foi convincentemente associado com o processo metastático (YANG *et al.*, 2004). Hiper-expressão ectópica de twist aumenta a capacidade invasiva e metastática de células cancerosas humanas, promovendo a baixa regulação de E-caderina e a indução de uma transição epitelial-mesenquimal (YANG *et al.*, 2004, KWOK *et al.*, 2005; MIRONCHIK *et al.*, 2005).

Além disso, twist pode homodimerizar ou heterodimerizar com outras proteínas hélice-alça-hélice básicas, podendo ativar ou suprimir diversos alvos downstream, incluindo genes da apoptose. Por exemplo, a perda de adesão célula-célula por células epiteliais, normalmente resulta em apoptose. Durante a TEM, *TWIST* pode ser necessário para ativar programas anti-apoptóticos, a fim de permitir que as células epiteliais convertam-se para um fenótipo mesenquimal, evitando a morte das células (YANG *et al.*, 2006; XIE *et al.*, 2009).

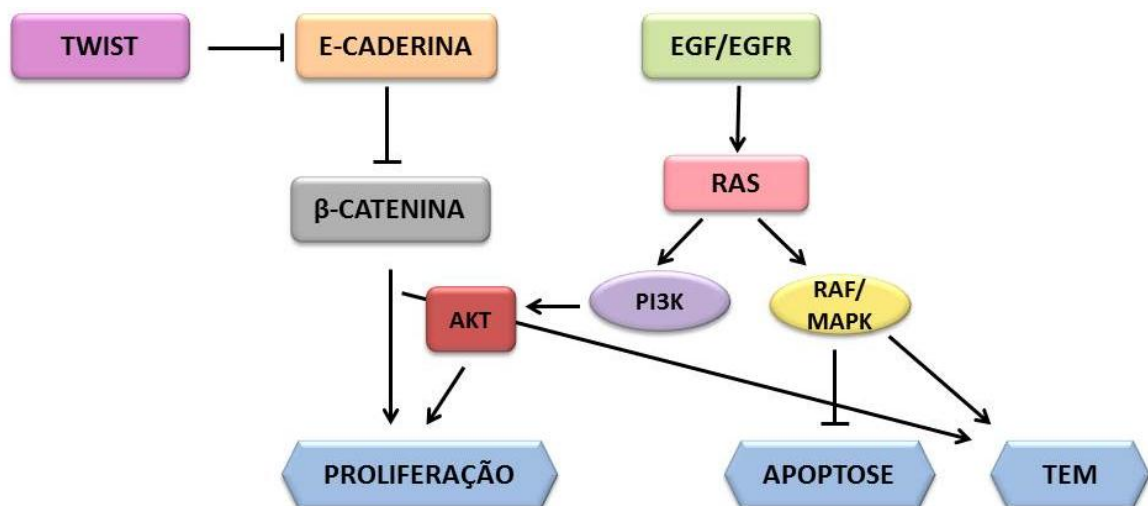
A superexpressão de twist no câncer parece estar relacionada com a inibição da diferenciação celular, promovendo assim, a progressão tumoral. Alguns estudos apontam que isto provavelmente ocorra por meio da via de sinalização celular Wnt (ZHANG *et al.*, 2007,

HOWE *et al.*, 2003; URAKAMI *et al.*, 2006), onde a sinalização de twist pode de alguma forma influenciar a inativação de antagonistas de Wnt (URAKAMI *et al.*, 2006).

Wnt faz parte de uma ampla família de proteínas ligantes altamente conservadas importantes para o desenvolvimento normal das células. Wnt liga-se a receptores de membrana plasmática e inicia sua participação nas cascatas de sinalização intracelular. Esta sinalização é responsável pelo controle de uma grande variedade de processos no desenvolvimento embrionário e a homeostase durante a vida adulta, incluindo o controle da proliferação celular (NAJDI *et al.*, 2011).

A via do Wnt também participa da estabilização da proteína  $\beta$ -catenina relacionada à adesão celular. A expressão aberrante de  $\beta$ -catenina associa-se à perda do processo normal de diferenciação das células epiteliais, ocasionando um descontrole do complexo E-caderina/ $\beta$ -catenina, aquisição de um fenótipo invasivo e um pior prognóstico em diversas neoplasias (KARIM *et al.*, 2004; SCHÜSSEL *et al.*, 2010).

Um estudo em 2010 sugeriu que a transição epitelial-mesenquimal pode ser sinalizada pela indução de receptores tirosino-quinases via RAS/PI3K. Assim, twist influenciaria  $\beta$ -catenina via E-caderina estimulando a proliferação e/ou a transição epitelial-mesenquimal. EGF via RAS estimularia a via PI3K induzindo a proliferação influenciando a  $\beta$ -catenina. RAS também influenciaria a transição epitélio-mesenquimal via Raf/MAPK (Figura 7) (WALLERAND *et al.*, 2010).



**Figura 7-** Sinalização celular possivelmente envolvida na transição epitelial- mesenquimal. A TEM pode ser induzida pelos receptores da tirosina-quinase (RTK) por meio da ativação da via de sinalização Ras/PI3K. A fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K) inibe a apoptose. Através da baixa regulação A baixa expressão da E-caderina por TWIST promove a proliferação de células tumorais e TEM, promovendo a metástase às células cancerosas. Fonte: Adaptado de Wallerand *et al.* (2010).

Yang e colaboradores 2006 demonstraram que a supressão da expressão de twist em uma linhagem de células provenientes de carcinomas mamários altamente agressivos, inibiu a sua capacidade de formar metástases a partir da glândula mamária para o pulmão. Em contrapartida, a capacidade destas células para formar tumores mamários primários não foi afetada. Estes resultados mostraram que twist desempenha um papel essencial na execução de vários passos da cascata da invasão por metástases de tais células tumorais.

Em linhagens celulares de câncer de mama, segundo Vesuna *et al.* (2008), a elevada expressão de twist demonstra um papel direto no mecanismo de TEM por baixa-regulação da expressão de E-caderina e promove um fenótipo invasivo metastático. Isto põe em foco os múltiplos papéis de *TWIST* em induzir a transformação neoplásica, bem como fornece uma via alternativa contra a qual novas drogas quimioterápicas podem ser alvo.

Uma análise imuno-histoquímica realizada em 166 espécimes de carcinoma primário esofágico revelaram que a expressão de twist e E-caderina foram significativamente associadas com os parâmetros clínico-patológicos de profundidade de invasão do tumor, metástase linfonodal, metástase nodal distante, estadiamento e invasão (SASAKI *et al.*, 2009).

Análises imuno-histoquímicas e de RT-PCR mostram que há uma regulação positiva de *TWIST* em carcinoma esofágico primário de células escamosas. Essa alta expressão de *TWIST* está significativamente associada com maior risco de metástase em pacientes com esofagectomia, sugerindo um papel de regulação positiva de *TWIST* no desenvolvimento de metástases à distância de carcinoma esofágico primário de células escamosas (ZHANG *et al.*, 2007; XIE *et al.*, 2009).

Outro estudo envolvendo amostras de tumores de bexiga mostrou uma correlação entre a alta expressão de twist e a baixa expressão da E-caderina. No grupo com expressão de E-caderina preservada, a taxa de sobrevida em 5 anos foi melhor para pacientes com baixa expressão de twist do que para aqueles com alta expressão desta proteína. Entre os tecidos tumorais, a expressão twistera mais alta nas lesões metastáticas do que nos tumores primários. Além disso, os cânceres de bexiga também exibiram uma correlação significativa entre o aumento de twist e redução da E-caderina (QIN *et al.*, 2012).

Elias e colaboradores em 2005 analisaram a expressão de *TWIST* em gliomas humanos e cérebros normais utilizando RT-PCR, Northern blot, hibridização in situ e imuno-histoquímica e encontraram expressão de *TWIST* na maioria das linhagens derivadas de células humanas de glioma e gliomas humanos. A expressão de *TWIST* também foi observada nos neurônios do cérebro humano embrionário e fetal, mas não nas células gliais do cérebro maduro. O aumento da expressão de *TWIST* acompanhou a transição de baixo grau para de

alto grau de gliomas e a superexpressão de *TWIST* foi correlacionada significativamente com uma maior invasividade. Portanto, o *TWIST* possui função tanto no início da tumorigênese glial quanto na posterior progressão maligna.

Ou e colaboradores em 2008 analisaram a marcação de twist por imuno-histoquímica em tecidos de câncer de cabeça e pescoço, mostrando que a expressão de twist foi positivamente associada com a progressão do câncer e metástases ganglionares. Uma análise mais aprofundada neste estudo revelou uma correlação positiva entre a expressão de twist e a expressão de *cxcr4* e *ccr7*, sugerindo que twist pode regular a expressão *cxcr4* e *ccr7* nestas células cancerosas, que por sua vez promoverão a metástase ganglionar.

Em carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço (CECP), a expressão twist é positivamente correlacionada com metástase linfonodal e estadiamento clínico. O fator indutor de hipóxia (HIF-1 $\alpha$ ) promove a TEM e fenótipos metastáticos em CECP através da hiper-regulação da expressão de twist. Já a inibição da expressão de twist reverte a TEM e os fenótipos metastáticos (OU *et al.*, 2008).

Outro estudo imuno-histoquímico realizado por Fan e colaboradores em 2013 em amostras de carcinoma epidermóide bucal, mostrou que houve uma forte marcação de twist em 64.3% das amostras tumorais e redução na expressão da E-caderina. Embora a expressão de twist não tenha se correlacionado com nenhuma das variáveis clínico-patológicas avaliadas, houve uma forte tendência para uma correlação entre a elevada expressão de twist e metástases linfonodais.

Apesar de muitos estudos fornecerem importantes *insights* sobre a compreensão da biologia dos tumores malignos bem como dos genes envolvidos na TEM, os mecanismos de *TWIST* na tumorigênese e na transição epitelial-mesenquimal do carcinoma epidermóide bucal, ainda permanecem obscuros (OU *et al.*, 2008; LIANG *et al.*, 2011).



## 2 JUSTIFICATIVA E APLICABILIDADE

A maioria das mortes relacionadas ao câncer não é causada, pelo tumor primário, mas por metástases subsequentes. Enquanto a metástase tem sido objeto de intensa pesquisa por mais de um século, os mecanismos moleculares que regulam a progressão de uma célula de tumor primário a uma célula maligna invasiva permanecem mal definidos. O que é claro, é que a progressão da metástase se dá através de uma série de passos inter-relacionados e a transição epitelial-mesenquimal é um evento chave para os mecanismos de invasão e progressão. Neste contexto, a TEM, está atraindo cada vez mais atenção dos oncologistas e pesquisadores.

A incidência do carcinoma epidermóide de boca no nosso Estado supera a estimativa nacional. Cerca de dois terços dos pacientes, diagnosticados no Pará, apresentam-se em estágios avançados (III e IV), conduzindo a uma taxa de sobrevida de menos de 30% em cinco anos e a um elevado número de dias de internação. Ao lado disso, os índices de pacientes jovens, com até 45 anos de idade, acometidos com CEB, no Pará, é três vezes maior do que os obtidos na maior parte dos estudos conduzidos no Reino Unido e nos Estados Unidos (PONTES *et al.*, 2011).

Diante desta realidade, as linhas de pesquisa científicas se direcionam na busca por marcadores moleculares diagnósticos ou prognósticos para essa neoplasia, no intuito de contribuir diretamente no refinamento e na individualização terapêutica, pois apesar do progresso nas técnicas cirúrgicas e de radioterapia, o CEB ainda apresenta inaceitáveis índices de sobrevida.

Em últimas palavras, os dados obtidos pela realização deste trabalho poderão auxiliar na compreensão do significado de resultados comumente adquiridos na pesquisa oncológica, permitindo um melhor entendimento das alterações envolvidas na carcinogênese oral, e num futuro auxiliar na definição de biomarcadores moleculares – genes, proteínas – para que possam ser utilizados como marcadores de prognóstico, adjuvantes no direcionamento de terapias atuais e futuras, que auxiliem na estratificação de pacientes em grupos de risco, com maior risco de desenvolver metástases decorrentes da doença.

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 Geral**

Investigar o padrão de expressão da proteína twist em amostras Carcinoma Epidermóide Bucal (CEB) provenientes de pacientes usuários do Sistema Único de Saúde do Estado do Pará.

#### **3.2 Específicos**

- Analisar o padrão de imunorreatividade da proteína twist quando presentes em amostras de carcinoma epidermóide bucal
- Verificar se há relação entre o estadió dos tumores e a expressão da proteína twist inferindo o seu possível papel na transição epitelial-mesenquimal e avaliar seu valor como biomarcador de malignidade;
- Correlacionar os resultados encontrados nestas análises e avaliar a existência de associação dos mesmos, com características clínico-patológicas dos tumores estudados e com a sobrevida dos pacientes.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

### **4.1. Descrição da Casuística**

Será realizada uma análise retrospectiva dos prontuários de 70 pacientes, com carcinoma epidermóide de boca, através da consulta aos arquivos do Hospital Universitário João de Barros Barreto, situado na região metropolitana de Belém no Estado do Pará. O hospital é considerado como Unidade de Alta Complexidade em Oncologia (UNACON), pelo Instituto Nacional do Câncer – INCA.

Foram incluídos no estudo pacientes com diagnóstico de carcinoma epidermóide de boca, confirmados através de revisão dos laudos histopatológico, no período compreendido entre janeiro de 2007 a dezembro de 2013. Os pacientes foram acompanhados por período máximo de 60 meses após o tratamento inicial.

Os procedimentos foram realizados no Serviço de Diagnóstico e Cirurgia das Patologias Bucais do Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUJBB), localizado na cidade de Belém, Estado do Pará. Todos os espécimes foram obtidos antes da administração de tratamentos quimio e/ou radioterápicos.

Com relação ao fragmento tumoral reservado para o diagnóstico histopatológico e para IHQ, será previamente fixado em formalina e subsequentemente incluído em bloco de parafina e a partir de então, foram obtidas lâminas com cortes histológicos dos espécimes clínicos, seguindo as padronizações para os procedimentos de rotina anátomo-patológica bem como para realização da técnica de imuno-histoquímica.

O diagnóstico clínico e a análise histológica dos fragmentos tumorais e tecidos sadios foram realizados por dois patologistas do Serviço de Diagnóstico e Cirurgia das Patologias Bucais do Hospital Universitário João de Barros Barreto (HUJBB) da Universidade Federal do Pará.

Após esclarecimento da natureza e objetivos do projeto, os indivíduos sujeitos da pesquisa e/ ou responsáveis foram convidados a assinarem o termo de consentimento esclarecido (Apêndice A).

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa do HUJBB, tendo parecer favorável (nº 397.929 - Anexo A).

#### **4.2 Critérios de Inclusão:**

- Tumores primários não tratados, cujas amostras teciduais fixadas em formaldeído a 10% e emblocadas em parafina exibam diagnóstico de CEB confirmado em coloração de rotina HE (hematoxilina e eosina).
- Tumores primários que possuam disponibilidade de fragmentos representativos da neoplasia em adequado estado de conservação.
- Tumores cujos pacientes possam ser acompanhados por um período de até 60 meses.

#### **4.3 Critérios de Exclusão:**

- Presença de metástase à distância M (+) no momento do diagnóstico.
- Presença de tumores primários simultâneos.
- Pacientes com fichas clínicas (prontuários) incompletamente preenchidos.
- Pacientes com impossibilidade de acompanhamento.
- Casos no qual houve alteração do estadiamento clínico TNM entre o diagnóstico inicial e a execução do tratamento.

#### **4.4 Análise da imunorreatividade de Twist por imuno-histoquímica**

As reações foram realizadas no laboratório de imuno-histoquímica do referido serviço e a padronização para os anticorpos utilizados foram determinadas no próprio laboratório, seguindo instruções do fabricante.

As reações foram desenvolvidas em cortes histológicos de 3µm de espessura, estendidos em lâminas de vidro, previamente lavadas em etanol absoluto, secas e mergulhadas por cinco minutos em solução de 3-aminopropyltriethoxy-silano a 10% diluída em etanol absoluto. Os cortes foram desparafinizados em dois banhos de xilol, o primeiro em estufa a 60°C e o segundo em temperatura ambiente. Em seguida os cortes foram reidratados em banhos descendentes de etanol (absoluto, 95% e 85%).

Posteriormente, para remoção do pigmento formólico, os cortes foram imersos em solução de hidróxido de amônio a 10% e etanol a 95%. Após lavagem em água destilada, as

lâminas receberão tratamento para recuperação antigênica. Para a recuperação antigênica, as lâminas que receberão o anticorpo twist, foram mergulhadas em solução de ácido cítrico e levadas por 15 minutos em microondas na potência máxima e em seguida lavadas em água destilada. Para a inibição da peroxidase endógena, os cortes passarão por dois banhos de 15 minutos em peróxido de hidrogênio 6% em metanol (1:1, v/v). Novamente, os cortes foram lavados em água destilada e imersos em três banhos de solução de Tris.

As lâminas, contendo os cortes, foram submetidas à incubação, com os anticorpos primários diluídos em solução específica e foram incubados com o anticorpo primário por 16 a 18 horas (overnight) à 4°C em câmara úmida escura.

Em seguida, as lâminas foram lavadas em água destilada e em solução tampão de Tris. O kit Universal LSAB/HRP (DAKO Corporation) será utilizado como soro secundário e complexo terciário por 30 minutos cada. Posteriormente as lâminas foram lavadas em TRIS. A revelação da reação será feita através da imersão das lâminas em solução do cromógeno diaminobenzidina – DAB (DAB, 3,3 –diaminobenzidina; DAKO Corporation). Os cortes foram, então, lavados em água destilada e contracolorados com hematoxilina de Mayer e lavados em água destilada. As lâminas sofrerão, finalmente, as etapas de desidratação em cadeia ascendente de etanóis e diafanização em dois banhos de xilol e foram montadas em Permunt (Fisher Scientific, Fair Law, NJ/USA) para exame ao microscópio de luz.

#### **4.5 Análise da imunomarcação**

A reação será considerada positiva quando houver a presença da coloração castanha, condição caracterizadora da presença do cromógeno DAB, na reação imuno-histoquímica, e negativa para as células que não apresentarem esta coloração castanha.

As lâminas foram observadas em microscópio de luz, modelo Nikon H550S, sob um foco fixo e com clareza de campo. O sistema de contagem que será utilizado nesse estudo, já foi empregado anteriormente na literatura (Tsurutani *et al.*, 2006). A análise da marcação será baseada na intensidade e na distribuição da marcação. A distribuição de células marcadas será analisada da seguinte forma: 0 (0%), 1 (1% a 50%), 2 (51% a 100%). A intensidade da marcação será avaliada da seguinte maneira: 0 (sem marcação), 1 (leve marcação), 2 (moderada marcação) e 3 (forte marcação). As lâminas foram analisadas por dois observadores independentes e que não terão conhecimento dos dados clínicos dos pacientes.

Um consenso será obtido para cada lâmina investigada. O padrão de marcação dos espécimes será definido com a somatória dos valores encontrados na distribuição da imunomarcação com os índices encontrados na intensidade, ficando o registro final (RF) da seguinte forma: RF0, RF2, RF3, RF4 e RF5. Nesse método, os RF0 e RF2 foram considerados como marcação negativa, enquanto os RF3, RF4 e RF5 foram considerados como marcação positiva.

#### **4.6 Análise Estatística**

A análise estatística tem o objetivo de avaliar o efeito da presença da proteína Twist sobre as características clínicas e histológicas de 70 pacientes portadores de carcinomas epidermóides de boca. Foram aplicados métodos estatísticos descritivos e inferenciais. Para os testes de hipóteses será prefixado o nível de significância  $\alpha = 0.05$  para rejeição da hipótese de nulidade.

Todo o processamento estatístico será realizado através de um pacote comercial PASW Statistics (versão 18) e Bioestat (versão 5.3).

## 5. RESULTADOS E DISCUSSÃO

A alta incidência do carcinoma epidermóide, somada ao seu curso clínico frequentemente desfavorável, motivam inúmeras pesquisas relacionadas à sua patogênese. A heterogeneidade de eventos celulares e moleculares constitui grande desafio ao estabelecimento de terapias efetivas. Desta maneira, uma associação mais precisa entre dados clínicos, celulares e moleculares pode levar a uma maior compreensão sobre o surgimento e progressão desta neoplasia.

Os experimentos deste estudo foram conduzidos com a finalidade de verificar o padrão de imunomarcagem da proteína twist em espécimes de carcinoma epidermóide bucal e correlacionar a presença ou ausência da proteína com alguns dados clínicos, como também correlacionar os dados clínicos entre si (gênero, idade, localização anatômica, tamanho do tumor, estadiamento, hábitos de tabagismo e etilismo, tratamento cirúrgico) e sobrevida em 70 pacientes com carcinoma epidermóide bucal. Sendo que destes 70 casos, apenas 59 puderam ser avaliados quanto às variáveis clínicas, sendo alguns censurados em determinados testes estatísticos de sobrevivência.

Como abordado previamente, com aproximadamente 500.000 novos casos/ano, o CEB representa 95% de todas as neoplasias malignas que afetam a região de cabeça e pescoço e o número de casos vem crescendo no Brasil e no mundo, especialmente entre as mulheres (SOUZA *et al.*, 2008; WARNAKULASURIYA, 2009; OU *et al.*, 2008; SCULLY, 2011).

O aumento da incidência de câncer bucal pode estar relacionado à maior exposição da população mundial a fatores de risco como tabagismo, consumo excessivo de álcool e exposição solar e também a maior procura por atendimento médico-odontológico especializado, favorecendo o diagnóstico da doença (HIROTA *et al.*, 2008; TARVAINEN *et al.*, 2004; CONWAY *et al.*, 2006).

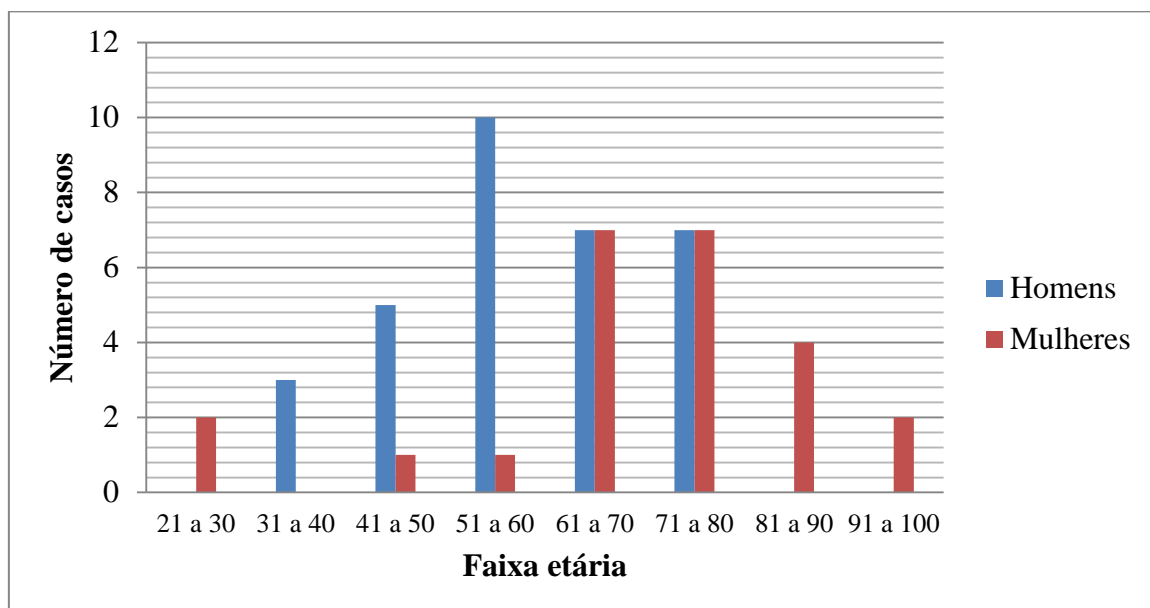
Nas amostras estudadas, observou-se que a maioria dos pacientes era do gênero masculino (59,3%), com faixa etária entre 37 e 80 anos e média de idade de aproximadamente 58,5 anos enquanto que, os pacientes do gênero feminino correspondiam a 40,7% (N=24) com média de idade de aproximadamente 70,4 anos.

Estes achados são semelhantes aos encontrados na literatura mundial, haja vista que inúmeros estudos relatam que os homens são mais acometidos pelo CEB do que as mulheres, numa razão média de 1,85:1, sendo a maioria dos casos de câncer bucal diagnosticados em indivíduos com mais de 50 anos (DURAZZO *et al.*, 2005; PONTES *et al.*, 2011).

A Figura 8 demonstra a distribuição dos casos diagnosticados, de acordo com o gênero, na faixa etária da população estudada. A maioria dos pacientes do estudo foram diagnosticados na faixa de idade entre 61 e 80 anos.

A relação do aumento do carcinoma epidermóide bucal com a idade ocorre tanto pelo fato do simples aumento do tempo de exposição do indivíduo ao carcinógeno, quanto pela alteração no equilíbrio metabólico e hormonal do indivíduo que propicia falha na defesa contra os processos de iniciação e promoção (CANTO e DEVESSA, 2002; VORA *et al.*, 2003).

Apesar da idade avançada, ainda assim, os homens são acometidos mais precocemente que as mulheres (LAM *et al.*, 2006; SOUSA *et al.*, 2008). Isto, provavelmente, porque no gênero masculino o consumo de tabaco e/ou álcool inicia mais cedo (SOUSA *et al.*, 2008). Todavia a razão entre homens e mulheres pode variar de acordo com o país, os hábitos e a faixa etária analisada e esta razão vem diminuindo nos últimos anos em função do aumento no consumo de tabaco e álcool entre as mulheres (BRANDIZZI *et al.*, 2005; CONWAY *et al.*, 2006; SOUSA *et al.*, 2008).

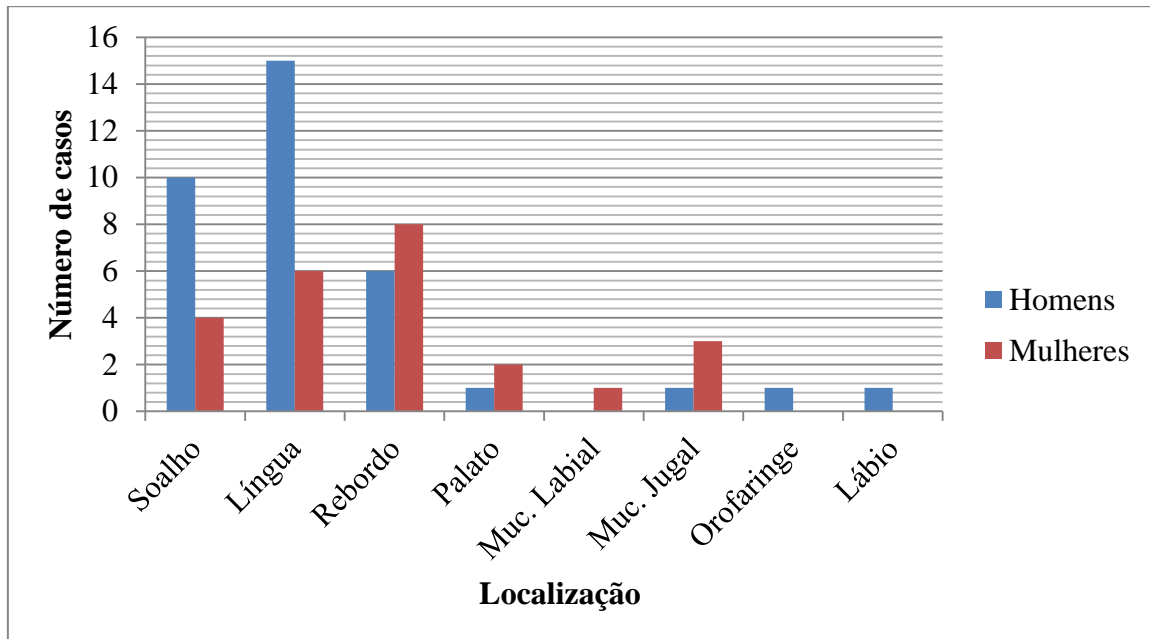


**Figura 8-** Distribuição do número de casos de acordo com o gênero e a faixa etária.

Em relação a localização, os dados epidemiológicos dos CEBs estudados tiveram uma maior frequência na língua (35,6%), seguida do soalho (23,7%) e rebordo (23,7%) (Figura 9), corroborando com a literatura (CANTO e DEVESA, 2002; DURAZZO *et al.*, 2005; BACHAR *et al.*, 2011). Isto possivelmente justifica-se, por causa da conformação anatômica



da cavidade bucal, que aumenta o tempo de contato entre estas estruturas e substâncias carcinógenas diluídas na saliva, especialmente, em indivíduos fumantes (LAM *et al.*, 2006), sendo o principal local, também, nos pacientes que não apresentam o hábito de fumar e naqueles pacientes considerados jovens (CANTO e DEVESA, 2002; VORA *et al.*, 2003; LAM *et al.*, 2006).



**Figura 9-** Distribuição do número de casos de acordo com o gênero e a localização tumoral.

Em nossa investigação, ao associarmos o consumo de álcool, dentre os pacientes, com a localização tumoral em soalho e língua (Tabela 1) obtivemos um resultado estatisticamente significativo ( $p = 0,046$ ), indicando que os pacientes etilistas possuíam uma associação três vezes maior de ser acometido pelo CEB na região de língua e soalho do que os pacientes não etilistas. Esta associação pode ser justificada através das formas de eliminação do etanol, que podem ser: uma pequena parte pode ser eliminada sem qualquer oxidação diretamente pelo suor e urina; ou secretado junto à saliva retornando à cavidade oral (cerca de 5 a 15%) (HENDRIKS, 2005). A quantidade de carcinógenos na saliva, em certas regiões da boca, tem sido proposta como uma das explicações para a gravidade e para a maior frequência da localização do carcinoma epidermóide ao longo da superfície lateral e ventral da língua. As localizações podem ser consideradas de risco por também receberem a maior concentração dos agentes carcinógenos do fumo e ter a ausência de queratina nessas regiões, podendo contribuir para a vulnerabilidade dos tecidos aos carcinógenos. Em contraste, a presença de

queratina tem sido sugerida como protetora da gengiva para os efeitos carcinógenos do fumo de tabaco (SCULLY *et al.*, 2000; REIDY *et al.*, 2011).

**Tabela 1-** Frequência de pacientes com localização tumoral de soalho e língua, de acordo com o etilismo, em uma população do norte do Brasil.

	<b>Etilista</b> N=32(%)	<b>Não etilista</b> N=26(%)	<b>P</b>	<b>Univariada</b> <b>OR (IC95%)</b>
<b>Soalho e língua</b>	23(71,9)	12(46,2)	0,046	2,981(1,002-8,869)

IC: Intervalo de Confiança; OR: Odds Ratio

Em relação à ação tumorigênica do álcool, um grande número de estudos epidemiológicos tem mostrado uma correlação entre o consumo de álcool e o câncer (FRONIE *et al.*, 2013; MENEZES *et al.*, 2013; LI *et al.*, 2014). Schütze e colaboradores, 2011 mostraram que na Europa Ocidental (Dinamarca, França, Alemanha, Grécia, Itália, Holanda, Espanha, Reino Unido), um número significativo de casos de câncer de cavidade oral, faringe, laringe e esôfago são atribuídos ao consumo de álcool, atribuem ao álcool um papel sinérgico e potencializador dos efeitos ocasionados pelos carcinógenos do tabaco na mucosa bucal. Porém, não existem comprovações de que o álcool isoladamente seja um agente promotor da carcinogênese oral, sendo assim, considerado como um agente etiológico de ação sinérgica com a do tabaco (MCDOWELL, 2006, ZYGOGIANNI *et al.*, 2011).

Os mecanismos pelos quais o consumo de álcool exerce seu efeito carcinogênico não foram totalmente definidos, apesar de eventos plausíveis incluírem: um efeito genotóxico do acetaldeído, deficiências nutricionais, mudanças no processo de metilação e o colapso do sistema imunológico (FRONIE *et al.*, 2013). As bebidas alcoólicas também exercem ação solvente, capaz de penetrar nas membranas celulares e, eventualmente, podem causar injúria à célula (CRABB *et al.*, 2004), favorecendo a absorção intracelular de substâncias carcinogênicas do tabaco pelos tecidos do epitélio bucal (RAO *et al.*, 1994; MCDOWELL, 2006).

O álcool pode ser um fator importante na iniciação da malignidade, quer através do aumento da expressão de certos oncogenes, ou reduzindo a capacidade de células para reparar o DNA, aumentando assim a probabilidade de mutações oncogênicas. A metilação do DNA é um importante regulador da expressão gênica e a redução de metilação do gene promotor de

tumor tem sido proposta como um possível mecanismo para o desenvolvimento do câncer (MARTEL *et al.*, 2011; FRONIE *et al.*, 2013).

Como já mencionado, o tabaco é fator causal de dezenas de doenças, dentre elas diversas neoplasias. Sua ação insalubre se dá por meio de mais de 4.000 substâncias tóxicas que o usuário do produto absorve no organismo (MACKAY e ERIKSEN, 2002). A interação dos metabólitos provenientes dos agentes carcinogênicos com o DNA das células pode provocar severas alterações genótípicas, evento crítico para o desenvolvimento de neoplasias (KNOWLES e SELBY, 2005). Configurando um efeito dose-dependente, há maior risco entre aqueles que apresentam padrão de mais longo período de consumo de tabaco (RAO *et al.*, 1994; MACFARLANE *et al.*, 1995; GARROTE *et al.*, 2001). Também há uma relação inversa quanto ao risco de câncer e o tempo de término do tabagismo. A chance de desenvolver câncer de boca é menor conforme aumenta o tempo desde a interrupção do consumo (BAGAN e SCULLY, 2008; BOING *et al.*, 2010).

Pelo menos 80% dos CEB diagnosticados nos países desenvolvidos são atribuíveis ao tabagismo e consumo de álcool, por si só ou em combinação. Embora a associação entre tabagismo e o risco de desenvolver o CEB seja bem estabelecido, a associação entre tabagismo e os resultados clínicos ainda não está claro. Vários estudos avaliaram a associação entre tabagismo e os resultados clínicos em pacientes com câncer de cabeça e pescoço, mas poucos relatam sobre esta associação com resultados estatisticamente significativos (KAWAKITA *et al.*, 2012).

Nossas análises utilizando o teste qui-quadrado mostraram que o hábito de fumar não esteve relacionado ao estadiamento mais avançado do tumor (III e IV) ( $p=0,074$ ) e com a menor sobrevida medida em 24 meses ( $p=0,086$ ) nas amostras estudadas (Tabela 2).

**Tabela 2** - Frequência de pacientes com estadiamento III e IV e sobrevida menor que 24 meses, de acordo com o tabagismo, em uma população do norte do Brasil.

	<b>Fumante</b>	<b>Não fumante</b>	<b>Univariada</b>	
	<b>N=45(%)</b>	<b>N=10(%)</b>	<b>P</b>	<b>OR (IC95%)</b>
<b>Estadiamento III e IV</b>	30(66,7)	3(30,0)	0,074	4,667(1,054-20,660)
<b>Sobrevida &lt; 24 meses</b>	34(89,5)	4(10,5)	0,086	4,722(1,047-21,294)
<b>Tamanho do tumor 3 e 4</b>	27(60)	2(20)	0,052	6,000(1,140-31,565)
<b>Óbito</b>	24(57,1)	1(12,5)	0,054	9,333(1,052-82,780)

IC: Intervalo de Confiança; OR: Odds Ratio

Nossos resultados foram inconclusivos quando comparados o hábito de fumar em relação ao tamanho do tumor, já que o valor de  $p$  aproximou-se do considerado significativo ( $p=0,052$ ), porém não podemos inferir ou afirmar se o tabagismo realmente induziu ou não um aumento das dimensões das lesões tumorais.

O tabagismo e o consumo de álcool são os principais fatores de risco mais conhecidos para a carcinogênese oral em países do ocidente (LO *et al.*, 2003; IDE e MIZOUE, 2008). No entanto, apesar de o tabagismo e o consumo de álcool serem altamente correlacionados, torna-se difícil quantificar o efeito combinado das duas substâncias no CEB (IDE e MIZOUE, 2008).

Tem sido relatado que o tabaco aumenta o risco de CEB até 10 vezes quando comparado com a população de não fumantes, e em combinação com álcool, o risco aumenta em 15 a 38 vezes sugerindo que uma combinação de ambos os fatores podem ter um efeito sinérgico no que diz respeito à ocorrência do câncer oral (IDE e MIZOUE, 2008; SCULLY, 2011).

Embora alguns estudiosos indiquem que o risco relativo de câncer oral aumente substancialmente com o número de cigarros fumados (PONTES *et al.*, 2011), neste estudo, não foi possível quantificar o número de cigarros requeridos para influenciar a taxa de sobrevida devido à falta de dados detalhados nos registros dos pacientes. Isso mostra, no entanto, que o álcool, o tabaco, e a combinação de ambos não foram associados com uma taxa de sobrevida significativamente menor que 2 anos em pacientes com câncer bucal, em contraste com relatos anteriores (EL-HUSSEINY *et al.*, 2000; CHOI *et al.*, 2006). Isso pode ser devido ao desequilíbrio entre os tamanhos das amostras dos fumantes e não fumantes, bem como sendo o fato de nossa amostra ter sido dividida apenas em fumantes e não fumantes, o que pode ter ocasionado um viés de resultado, assim como nos estudos de Kerdpon (2001) e Scott (2005), os quais agruparam não fumantes e raramente fumantes em um mesmo grupo, considerando ambos como “não fumantes”, o que significava que não foi possível extrair conclusões precisas em relação ao papel desempenhado pelo tabaco.

De acordo com o resultado do qui-quadrado em relação a sobrevida dos pacientes (<12 meses) e à cirurgia como tratamento de primeira escolha observamos uma associação entre essas variáveis ( $p=0,008$ ) na qual, a cirurgia apresentou-se como um fator protetor para os pacientes aumentando em 86,2% a chance do paciente ter sobrevida maior que um ano após o tratamento (Tabela 3).

**Tabela 3-** Frequência de pacientes com sobrevida (menor que 12 meses), de acordo com o tratamento cirúrgico, em uma população do norte do Brasil.

	Sem tratamento N=19(%)	Com tratamento N=33(%)	P	Univariada OR (IC95%)
<b>Sobrevida &lt; 12 meses</b>	16(84,2)	14(42,4)	0,008	0,138(0,034-0,568)

IC: Intervalo de Confiança; OR: Odds Ratio

A melhor opção de tratamento para os tumores iniciais e avançados ainda é a cirurgia, podendo ser substituída pela radioterapia nos estádios I e II e complementada pela radioterapia e/ou quimioterapia nos estádios III e IV (BETTENDORF *et al.*, 2004). Para o CEB de estágio inicial, a cirurgia constitui o melhor e talvez o único tratamento a ser instituído. Mas alguns autores relatam taxa de recorrência de 11,5%, mesmo para CEBs iniciais com margens cirúrgicas livres ao exame anatomopatológico e sem complementação com radioterapia ou quimioterapia (HUANG *et al.*, 2010).

Ademais, o tratamento cirúrgico local pode produzir comprometimentos funcionais significativos para a fala, a deglutição, a mastigação, a saúde dentária e a reintegração social, pois a cirurgia mutila a anatomia dos tecidos; a radioterapia leva à diminuição da salivação por lesão irreversível das glândulas salivares, mucosite e retração cicatricial tecidual; a quimioterapia afeta fatores defensores locais e sistêmicos, podendo promover infecções (MEURMAN e GRONROOS, 2010). Contudo, apesar do tratamento cirúrgico conduzir a melhores taxas de sobrevida, ocasiona paralelamente, uma diminuição da qualidade de vida pelos danos funcionais e problemas psicossociais quanto ao convívio familiar e ao mercado de trabalho, devido ser considerado como um dos tratamentos mais desfigurantes e debilitantes entre todos aqueles envolvendo o câncer (BARNES *et al.*, 2005; SCULLY e BAGAN, 2007; BAGAN e SCULLY, 2008; IARC/WHO, 2008; MIGNOGNA *et al.*, 2001).

Estima-se que a sobrevida global seja de 40% no primeiro ano, reduzindo para 10% no quinto ano (BARNES *et al.*, 2005; BAGAN e SCULLY, 2008). Diversas teorias têm sido postuladas para explicar as diferenças de sobrevida entre os indivíduos. Dentre elas incluem-se diferentes exposições aos fatores de risco, a diferença no tratamento oferecido e aceito pelo paciente, acesso aos serviços de saúde, a condição socioeconômica, a apresentação e comportamento da lesão no momento do diagnóstico e as diferenças na predisposição genética (PULTE e BRENNER, 2010).

A associação de agentes quimioterápicos com radioterapia de forma concomitante pode aumentar a sobrevida, porém à custa de elevada toxicidade (MURPHY e CMELAK, 2006; BHIDE e NUTTING, 2010). Por este motivo, a indústria farmacêutica tem focado no desenvolvimento de drogas que atuem em componentes moleculares das células, codificados ou regulados por oncogenes ou genes supressores de tumor.

Apesar dos avanços tecnológicos com as descobertas e aperfeiçoamentos de terapias alternativas, como a radioterapia, quimioterapia, imunoterapia e a terapia fotodinâmica para o tratamento do câncer nos últimos 50 anos, o prognóstico para o carcinoma epidermóide bucal continua sombrio (SCULLY e BAGAN, 2007).

Recentemente, vários novos fatores prognósticos moleculares têm sido avaliados para prever a metástase, na esperança de que os resultados possam contribuir para uma melhor avaliação da sobrevida e, conseqüentemente, a adaptação do tratamento para cada indivíduo.

Uma dessas moléculas avaliadas, é a proteína twist, um fator chave responsável pela metástase, promovendo a transição epitelial-mesenquimal (TEM), implicada como um evento chave nos processos de invasão e metástases tumorais, etapas indispensáveis na progressão neoplásica. Contudo, a sua regulação negativa pode suprimir a capacidade metastática induzindo a transição mesenquimal-epitelial (MET) (YUEN *et al.*, 2007; OU *et al.*, 2008).

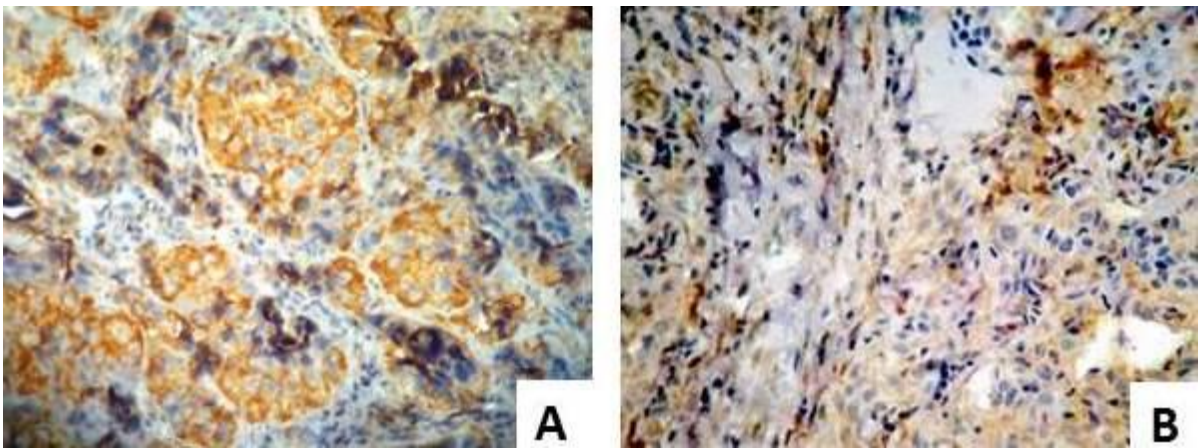
Além disso, Hosono *et al* (2007) também relataram que a expressão aumentada twist tem sido correlacionada com pior prognóstico e menor sobrevida em pacientes com carcinoma de células epiteliais de ovário. Portanto, *TWIST* aparece como sendo um novo oncogene que induz tumorigênese em células não malignas e promove a progressão do tumor nas células malignas (OU *et al.*, 2008; XIE *et al.*, 2009).

Em nosso estudo, a expressão da proteína twist, avaliada por imuno-histoquímica, apresentou marcação nuclear e citoplasmática em 18,6% das amostras e predominantemente citoplasmática em 81,4%, nenhuma amostra apresentou marcação predominantemente nuclear (Figura 10 e 11). Silva (2011) avaliando a expressão desta proteína em amostras de CEB também encontrou marcação predominantemente citoplasmática, apesar de alguns poucos casos terem demonstrado marcação nuclear. Em contraste, Wushou *et al.*, (2012) em amostras do mesmo tipo tumoral encontrou a maioria da expressão proteica localizada no núcleo.

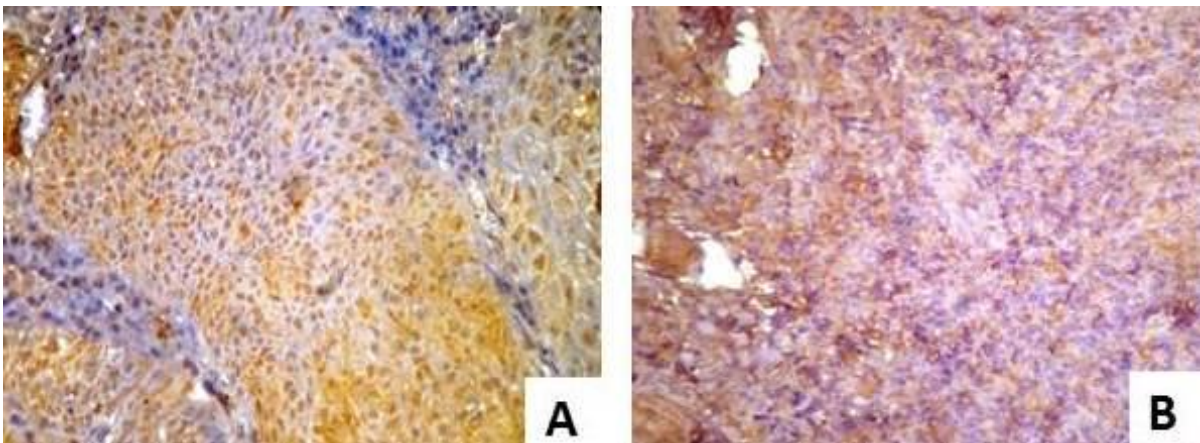
Segundo Yuen *et al.* (2007), em uma análise de pacientes com câncer de próstata, observou que o aumento da imunorreatividade citoplasmática de twist está positivamente associada à transformação neoplásica e o alto nível de expressão nuclear pode estar associado a um risco relativo três vezes maior de desenvolver metástase a distância. Hui *et al.* (2009)

também associou a localização nuclear da twist com a diferenciação em amostras de câncer de pulmão de células não-pequenas. No entanto, o mecanismo pelo qual acontece essa diferenciação não está esclarecido.

Wang *et al.*(2004) sugeriram que em células de carcinoma nasofaríngeo e em alguns tumores sólidos, a expressão ectópica da proteína twist, confere resistência aos agentes estabilizadores de microtúbulos, como é o caso de alguns agentes quimioterápicos, como o paclitaxel. O mesmo pode ocorrer com o tipo tumoral do presente estudo, visto que as características teciduais do tecido oral e nasofaríngeo são semelhantes. No entanto, são necessários mais estudos para a avaliação da quimioterapia em relação à expressão da proteína.



**Figura 10-** Seções histológicas de carcinoma epidermóide bucal revelando a imunoposição da proteína twist (estreptavidina-biotina- 40x). (A) Marcação intensa predominantemente citoplasmática em mais de 50% das células. (B) Marcação moderada predominantemente citoplasmática em mais de 50% das células.



**Figura 11-** Seções histológicas de carcinoma epidermóide bucal revelando a imunoposição da proteína twist (estreptavidina-biotina- 40x). (A) Marcação intensa predominantemente nuclear e citoplasmática em

mais de 50% das células. (B) Marcação moderada predominantemente citoplasmática com marcações nucleares focais em mais de 50% das células.

A marcação (se positiva ou negativa) e a localização da proteína (se predominantemente citoplasmática, predominantemente nuclear ou ambas) foram analisadas para verificação de dependência (através do teste do qui-quadrado) com todos os dados clínicos-patológicos e epidemiológicos dos pacientes, entretanto, a estatística só mostrou significância quando comparada a marcação da proteína com a influência do tabagismo. No qual apresentou uma dependência significativamente estatística com  $p=0,041$  e o Odds ratio de 3,927 (Tabela 4), o que significa dizer que pessoas com CEB que fazem uso do cigarro apresentam um risco quatro vezes maior de ter a superexpressão proteica.

Assim como no carcinoma epidermóide bucal, o tabagismo também é relatado por ser um dos principais fatores de risco para o câncer de bexiga. Diante disso, um grupo de pesquisadores em 2007 buscou delinear o papel oncogênico de Twist por imuno-histoquímica em 70 amostras de câncer de bexiga. Além disso, procuraram correlacionar a expressão desta proteína com o status de tabagismo dos pacientes.

Quando classificados em expressão positiva e negativa, twist foi associado com o estadio ( $P= 0,001$ ), a gradação ( $P= 0,001$ ), e progressão da doença ( $P= 0,02$ ). Além disso, a expressão positiva de twist previu claramente progressão livre de doença mais pobres ( $P= 0,02$ ). Também demonstrou que quase 60% (16/28) dos pacientes com expressão Twist-positivo eram fumantes no momento do diagnóstico, corroborando o fato de que fumar modula a expressão de marcadores de TEM, incluindo Twist (FONDREVELLE *et al.*, 2007).

Em um estudo realizado em 2007, células de carcinoma de pulmão foram expostas ao benzopireno por um período de 24 semanas e demonstraram que expressão de genes envolvidos na TEM, dentre eles o *TWIST*, manteve-se elevada nas linhagens, bem como houve perda ou diminuição da expressão de *E-CADERINA*. Os resultados indicaram que a exposição ao benzopireno modulou a expressão de um grande número de genes envolvidos na TEM, além de modular as características biológicas de células cancerosas, contribuindo para a progressão do câncer de pulmão (YOSHINO *et al.*, 2007).



**Tabela 4-** Frequência de pacientes fumantes, de acordo com a marcação da proteína TWIST, em uma população do norte do Brasil.

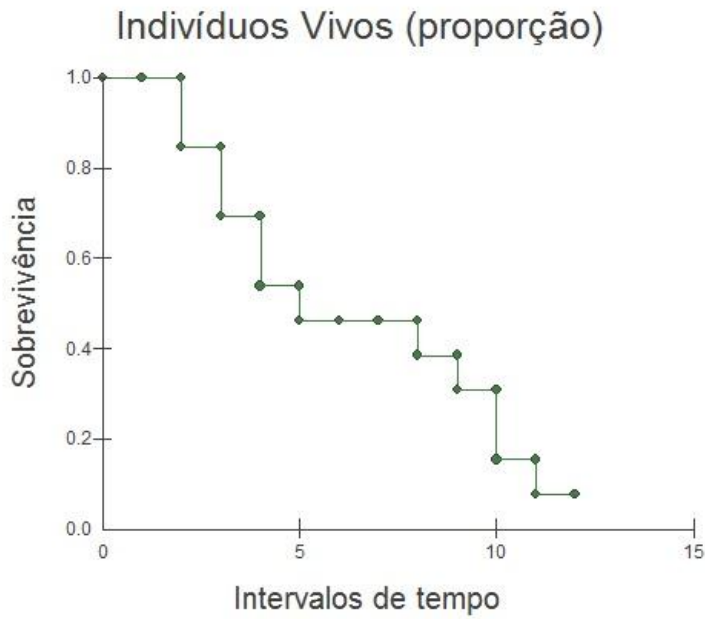
	<b>Marcação Positiva</b>	<b>Marcação Negativa</b>	<b>Univariada</b>	
	<b>N=41(%)</b>	<b>N=17(%)</b>	<b>P</b>	<b>OR (IC95%)</b>
<b>Tabagismo</b>	36(87,8)	11(64,7)	0,041	3,927(1,002-15,385)

IC: Intervalo de Confiança; OR: Odds Ratio

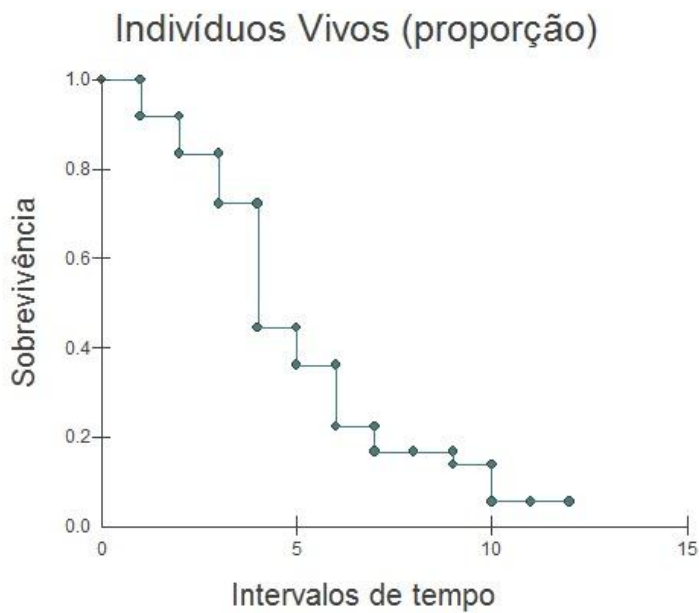
Um outro estudo realizado recentemente em 2014, submetendo linhagens celulares de câncer de pulmão de não pequenas células à ensaios de toxicidade com benzopireno e ensaio de expressão gênica e proteica, demonstrou níveis de expressão de *twist* elevados e um aumento da capacidade de invasão com o tratamento com benzopireno em comparação com o grupo controle, isento da substância. Em contrapartida, quando *TWIST* foi silenciado pôde-se observar o bloqueio da migração e invasão de células induzidas por tratamento com benzopireno (WANG *et al.*, 2014).

Além disso, os níveis de expressão de *twist* foram mais elevados em amostras de tecidos metastáticos do que em amostras de tumores primários e correlacionados com menor sobrevida global. Com base nos resultados obtidos, os pesquisadores inferiram que *TWIST* pode representar um importante papel na invasão e metástase de células *in vitro* de câncer de pulmão estimuladas pelo tratamento com benzopireno e que mais estudos precisam se realizados a fim de explorar a associação de fumaça do cigarro com a expressão *TWIST* em amostras de tecido de câncer de pulmão de não pequenas células (WANG *et al.*, 2014).

A representação gráfica da sobrevida dos pacientes com expressão negativa e positiva de *twist* de acordo com o tempo em trimestres foi realizada através da análise atuarial (Figura 12 e 13), a qual apresentou um média de sobrevida de 6,5 trimestres para pacientes com marcação positiva e 8,49 para paciente com ausência de marcação para a proteína. Deste modo, observamos que há uma redução de aproximadamente 25% na taxa de sobrevida do grupo com expressão proteica em comparação ao grupo com ausência desta expressão.



**Figura 12-** Análise de sobrevivência de indivíduos negativos para a marcação de twist (em trimestres).



**Figura 13-** Análise de sobrevivência de indivíduos positivos para a marcação de twist (em trimestres).

Os dados de sobrevida e marcação da proteína foram também analisados pelo teste do log-rank (Figura 14), o qual demonstrou que as diferenças observadas não eram estatisticamente significativas ( $p=0,4331$ ) entre a sobrevida dos pacientes que apresentaram imunorreatividade daqueles que não apresentaram. Assim podemos inferir que a marcação da proteína twist (se positiva ou se negativa) não apresentou influência sobre a taxa de sobrevida

dos pacientes com CEB estudados. Silva *et al.* (2013) também avaliando pacientes com CEB observaram uma probabilidade de sobrevida significativamente menor em pacientes com superexpressão da proteína twist.

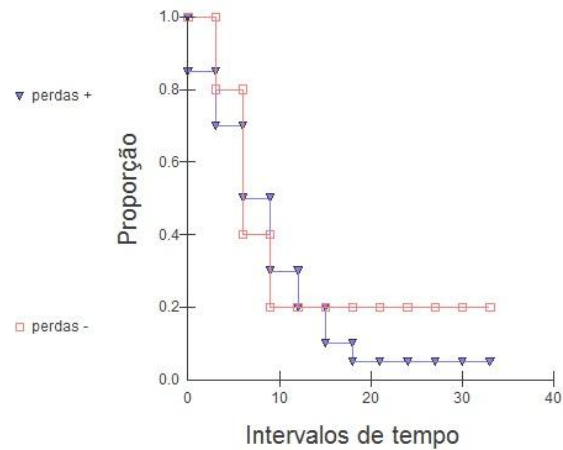
Wushou *et al.* (2012) analisou total de 60 amostras de CEB com linfonodos positivos associando a expressão da proteína e os parâmetros clínico-patológicas também por meio do teste qui-quadrado. A análise imuno-histoquímica mostrou que a expressão positiva de twist foi observada em 70%, a expressão da proteína foi positivamente associada com metástase linfática, grau patológico, e estadió do tumor ( $P = 0,012$ ). Todos os pacientes foram acompanhados por 6 a 59 meses (média de 37).

Contudo em nosso estudo não tivemos acesso a dados pós cirúrgicos que confirmassem a presença de metástase regional em muitos pacientes, bem como o período de acompanhamento de alguns deles foi dificultoso, pois o Estado do Pará é diferente em muitos aspectos de outras regiões do Brasil, já que além de ter um grande território geográfico, os inúmeros rios existentes na região são utilizados como as principais vias de transporte, o que torna mais difícil para a população local para acessar serviços de saúde e manterem-se sob acompanhamentos periódicos. Além disso, devido à grande demanda, muitos desses pacientes são operados em um outro hospital de referência em oncologia, o que contribui para o afastamento do paciente do hospital de origem, aumentando significativamente os dados de perda de seguimento.

Adicionalmente, Xie *et al.* (2009) e Sasaki *et al.* (2009) observaram uma proporção inversa entre o tempo de sobrevida e o nível da expressão da proteína twist em pacientes com carcinoma de células escamosas de esôfago. Essa relação já está descrita em vários estudos de outros tipos celulares como carcinoma hepatocelular, carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, câncer cervical e câncer endometrial (KYO *et al.*, 2006; SHIBATA *et al.* 2008; GASPAROTTO *et al.* 2011; ZHANG *et al.* 2012).

## Análise de sobrevivência

	Resultados
Observado =	20
Esperado =	17.8427
Variância =	4.4701
Qui-Quadrado =	0.6145
Graus de liberdade =	1
(p) =	0.4331



**Figura 14-** Análise de sobrevivência de indivíduos com e sem marcação de twist. Linha azul representa os pacientes twist positivo, linha rosa representa os pacientes twist negativo.

Possivelmente o aumento do n amostral e a confirmação pela biologia molecular do diagnóstico histopatológico elevaria a qualidade da abordagem terapêutica após o tratamento cirúrgico. A determinação dos níveis de proteína twist nos espécimes provenientes de espécimes cirúrgicos poderia aumentar a acurácia do diagnóstico para pacientes em quadros limítrofes da doença, assim como facilitaria o acompanhamento clínico. Então, quais são os mecanismos de desregulação de twist? Como a expressão dessa proteína afeta a heterogeneidade e o prognóstico dos pacientes com CEB? De que maneira o tabagismo e etilismo afetam a sobrevida do paciente e o comportamento biológico do tumor? Certamente, ainda são necessários aprimoramentos no entendimento da atividade desta proteína.

## 6 CONCLUSÕES

- Houve correlação estatisticamente significativa entre o consumo de álcool e os sítios mais afetados pelo CEB, sugerindo que o etanol pode desempenhar um papel potencializador dos agentes do tabaco nos sítios que recebem maior exposição dessas substâncias.
- A expressão da proteína twist também mostrou uma diminuição na média de sobrevida dos indivíduos. Apesar dessa diminuição não ter apresentado significância estatística em nossos estudos, acreditamos que ela deve ser mais amplamente estudada, visando o melhor entendimento do papel desta no carcinoma epidermóide bucal.
- A positividade de marcação da proteína demonstrou relação com o tabagismo, onde 87,8% dos pacientes fumantes apresentaram marcação positiva para a proteína, corroborando o fato de que o fumo pode modular a expressão de marcadores TEM incluindo twist. Em síntese, os resultados deste estudo evidenciam algumas correlações intrigantes, que no nosso entender merecem especial atenção, no intuito de serem esclarecidas. Assim como a localização citoplasmática da proteína observada neste estudo, que possivelmente está relacionada a algum processo oncogênico ainda não descrito.

**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

- ACLOQUE, H. et al. Epithelial-mesenchymal transitions: the importance of changing cell state in development and disease. *J. Clin Invest* 2009; 119:1438–1449.
- AKRAM, S. et al. Emerging patterns in clinico-pathological spectrum of Oral Cancers. *Pak J Med Sci* 2013; 29(3): 783-787.
- ANSIEAU, S. et al. Induction of EMT by Twist Proteins as a Collateral Effect of Tumor-Promoting Inactivation of Premature Senescence. *Cancer Cell* 2008; 14: 79–89.
- BACHAR, G. et al. Outcome of oral tongue squamous cell carcinoma in patients with and without known risk factors. *Oral Oncology* 2011; 47: 45–50.
- BAGAN, J.V. et al. Lack of association between proliferative verrucous leukoplakia and human papillomavirus infection. *J Oral Maxillofac Surg* 2007; 65(1): 46-9.
- BAGAN, J.V.; SCULLY C. Recent advances in Oral Oncology 2007: epidemiology, aetiopathogenesis, diagnosis and prognostication. *Oral Oncol* 2008; 44(2): 103-8.
- \_\_\_\_\_. Recent advances in Oral Oncology 2008; squamous cell carcinoma aetiopathogenesis and experimental studies. *Oral Oncology* 2009; 45: e45–e48.
- BARNES, L. et al. World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of head and neck tumours. Lion: IARC Press; 2005.
- BENSON, E. et al. The clinical impact of HPV tumor status upon head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Oncol.* 2013.
- BHAJEE, F. et al. Cancer Stem Cells in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: A Review of Current Knowledge and Future Applications. *Head Neck* 2012; 34: 894–899.
- BOING, A.F. et al. How much do smoking and alcohol consumption explain socioeconomic inequalities in head and neck cancer risk? *J Epidemiol Community Health [S.I.]* 2010.
- BOSETTI, C. et al. Influence of the Mediterranean diet on the risk of cancers of the upper aerodigestive tract. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2003; 12: 1091-4.
- BRANDIZZI, D. et al. Analysis of the epidemiological features of oral cancer in the city of Buenos Aires. *Acta Odontol latinoam* 2005; 18(1): 31-5.
- BROWN, J.S. et al. Review Systematic review of the current evidence in the use of postoperative radiotherapy for oral squamous cell carcinoma. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery* 2012; 50: 481- 489.

BAUM, B.; SETTLEMAN, J.; QUINLAN, M.P. Transitions between epithelial and mesenchymal states in development and disease. *Seminars in Cell & Developmental Biology* 2008; 19: 294–308.

CABAY, R.J.; MORTON, T.H.; EPSTEIN, J.B. Proliferative verrucous leukoplakia and its progression to oral carcinoma: a review of the literature. *J Oral Pathol Med* 2007; 36: 255–261.

CANTO, M.T.; DEVESA, S.S. Oral cavity and pharynx cancer incidence rates in the United States, 1975-1998. *Oral Oncol* 2002; 38(6): 610-7.

CARNELIO, S. et al. A Brief Review of Common Oral Premalignant Lesions with Emphasis on Their Management and Cancer Prevention. *Indian J Surg* 2011; 73(4): 256 – 261.

CHIDZONGA, M.M.; MAHOMVA, L. Squamous cell carcinoma of the oral cavity, maxillary antrum and lip in a Zimbabwean population: a descriptive epidemiological study. *Oral Oncol* 2006; 42(2): 184-9.

CONTALDO, M. et al. Prognostic implications of node metastatic features in OSCC: a retrospective study on 121 neck dissections. *Oncol Rep* 2013; 30(6): 2697-704.

CONWAY, D.I. et al. Incidence of oral and oropharyngeal cancer in United Kingdom (1990-1999) - recent trends and regional variation. *Oral Oncol* 2006; 42(6): 586-92.

COSTA, A.L.L.; ARAÚJO JÚNIOR, R.F.; RAMOS, C.C.F. Correlation between TNM classification and malignancy histological feature of oral squamous cell carcinoma. *Braz J Otorhinolaryngol* 2005; 71(2): 181-87.

COSTA, P. et al. Clinical and epidemiological features of oral cancer in a medical school teaching hospital from 1994 to 2002: increasing incidence in women, predominance of advanced local disease, and low incidence of neck metastases. *Clinics* 2005; 60(4): 293-8.

COUSINS, N. et al. A systematic review of interventions for eating and drinking problems following treatment for head and neck cancer suggests a need to look beyond swallowing and trismus. *Oral Oncology* 2013; 49: 387–400.

COWIN, P.; ROWLANDS, T.M.; HATSELL, S.J. Cadherins and catenins in breast cancer. *Curr Opin Cell Biol* 2005; 17(5): 499-508.

CRABB, D.W. et al. Overview of the role of alcohol dehydrogenase and aldehyde dehydrogenase and their variants in the genesis of alcohol-related pathology. *Proceedings of the Nutrition Society* 2004; 63: 49-63.

CROZIER, E.; SUMER, B.D. Head and neck cancer. *Med Clin North Am* 2010; 94: 1031-46.

DANAËI, G. et al. Comparative Risk Assessment collaborating group (Cancers). Causes of cancer in the world: comparative risk assessment of nine behavioural and environmental risk factors. *Lancet [S.I.]* 2005; 366(9499): 1784-93.

DE ARAÚJO, R.F.JR. et al. Prognostic significance of the anatomical location and TNM clinical classification in oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2008; 13(6): E344-47.

DE VISSCHER, J.G. et al. Epidemiology of cancer of the lip in The Netherlands. *Oral Oncol* 1998; 34(5): 421-6.

DURAZZO, M.D. et al. Nomenclature des Cancer. *Bull Inst Nat Hyg* 1944; 69-73.

DURAZZO, M.D. et al. Clinical and epidemiological features of oral cancer in a medical school teaching hospital from 1994 o 2002: increasing incidence in women, predominance of advanced local disease, and low incidence of neck metastase. *Clinics* 2005; 60(4): 293-8.

DURR, M.L. et al. Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma in Never-Smokers: Analysis of Clinicopathologic Characteristics and Survival. *Otolaryngology-Head and Neck Surgery* 2013; 149: 89.

EADES, M.; CHASEN, M.; BHARGAVA, R. Rehabilitation: long term physical and functional changes following treatment. *Semin Oncol Nurs* 2009; 25(3): 222–30.

ELIAS, M.C. et al. TWIST is expressed in human gliomas and promotes invasion. *Neoplasia* 2005; 7: 824-837.

FAN, C.C. et al. Expression of E-cadherin, Twist, and p53 and their prognostic value in patients with oral squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol* 2013; 139: 1735–1744.

FELLER, L.L. et al. Oral squamous cell carcinoma in relation to field precancerisation: pathobiology. *Cancer Cell International* 2013; 13: 31.

FELLER, L.L. et al. Human papillomavirus-mediated carcinogenesis and HPV-associated oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. Part 2: Human papillomavirus associated oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Head Face Med* 2010; 6: 15.

FENG, M.Y. et al. Metastasis-induction and apoptosis-protection by TWIST in gastric cancer cells. *Clin Exp Metastasis* 2009; 26: 1013-1023.

FIDLER, I.J. The pathogenesis of cancer metastasis: the 'seed and soil' hypothesis revisited. *Nat Rev Cancer* 2003; 3: 453-8.

FONDREVELLE, M.E. et al. The expression of Twist has an impact on survival in human bladder cancer and is influenced by the smoking status. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* 2009; 27: 268–276.



FREEDMAN, N.D. et al. Fruit and vegetable intake and head and neck cancer risk in a large United States prospective cohort study. *Int J Cancer* 2008; 122: 2330-6.

FRONIE A. et al. Squamous cell carcinoma of the oral cavity: clinical and pathological aspects. *Rom J Morphol Embryol* 2013, 54(2):343–348.

GARROTE, L.F. et al. Risk factors for cancer of the oral cavity and oropharynx in Cuba. *Br J Cancer [S.I.]* 2001; 85(1): 46-54.

GASPAROTTO, D. et al. Overexpression of TWIST2 correlates with poor prognosis in head and neck squamous cell carcinomas. *Oncotarget* 2011; 2: 1165–1175.

GILLISON, M.L. et al. Distinct risk factor profiles for human papillomavirus type 16-positive and human papillomavirus type 16-negative head and neck cancers. *J Natl Cancer Inst.* 2008; 100(6): 407-20.

GILLISON, M.L. Current topics in the epidemiology of oral cavity and oropharyngeal cancers. *Head Neck* 2007; 29: 779–792.

GINOS, M.A. et al. Identification of a gene expression signature associated with recurrent disease in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res* 2004; 64(1): 55-63.

GOORIS, P.J. et al. Regional guideline for diagnosis and treatment of squamous cell carcinoma of the lip: what is the level of compliance? *Int J Qual Health Care* 2001; 13: 143-50.

GREENE, F.L. et al. *AJCC cancer staging manual*. 6th ed. New York: Springer-Verlag, 2002.

GREER, R.O. Pathology of Malignant and Premalignant Oral Epithelial Lesions. *Otolaryngol Clin N Am* 2006; 39: 249–275.

GROOME, P.A. et al. A population-based study of factors associated with early versus late stage oral cavity cancer diagnoses. *Oral oncol* 2011; 47(7): 642-7.

HA, P.K. et al. A transcriptional progression model for head and neck cancer. *Clin Cancer Res* 2003; 9(8): 3058-64.

HADDAD, R.I.; DONG, M. Recent advances in head and neck cancer. *N Engl J Med* 2008; 359: 1143–54.

HANAHAHAN D, WEINBERG RA. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell* 2011 144(5):646-74.

\_\_\_\_\_. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000; 57–70.

\_\_\_\_\_. Squamous cell carcinoma and precursor lesions: prevention. *Periodontology* 2000 2011; 57: 38–50.

HAY, E.D. Organization and fine structure of epithelium and mesenchyme in the developing chick embryo. In *Epithelial-mesenchymal interactions*. R. Fleischmajer and RE. Billingham, editors. Williams & Wilkins. Baltimore 1968; 31–55.

HENDRIKS, H. Handbook of experimental pharmacology. Alcohol 2005; 170: 339-361.

HIROTA, S.K.; BRAGA, F.P.F.; PENHA, S.S. Risk factors for oral squamous cell carcinoma in young and older Brazilian patients: a comparative analysis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2008; 13: E227-E231.

HIRSHBERG, A. et al. Metastatic tumours to the oral cavity- Pathogenesis and analysis of 673 cases. *Oral Oncology* 2008; 44: 743– 752.

HOOGSTEEEN, I.J. et al. Tumor microenvironment in head and neck squamous cell carcinomas: predictive value and clinical relevance of hypoxic markers. *Head Neck* 2007; 29 (6): 591-604.

HOUGHTON, J. et al. Stem cells and cancer. *Semin Cancer Biol* 2007; 17(3): 191-203.

HUANG, T. et al. Predictors of locoregional recurrence in early stage oral cavity cancer with free surgical margins. *Oral Oncol* 2010; 46(1): 49-55.

HUI, L. et al. High expression of twist is positively correlated with the differentiation of lung cancer. *Chinese Journal of Lung Cancer* 2009, 12(4): 294-299.

IARC/WHO. World Cancer Report 2008. Lyon: International agency for research on Cancer, 2008. (World Cancer Report).

IDE, R.; MIZOUE, T. Cigarette smoking, alcohol drinking, and oral and pharyngeal cancer mortality in Japan. *Oral Dis* 2008; 14: 314-319.

INCA. Estatísticas do Câncer. <http://www1incagovbr/vigilancia/> 2014.

INTERNATIONAL AGENCY ON RESEARCH FOR CANCER. Smokeless Tobacco and Some Tobacco-specific N-Nitrosamines. Monographs Lyon: IARC 2007; 89.

KALLURI, R.; NEILSON, E.G. Epithelial-mesenchymal transition and its implications for fibrosis. *J Clin Invest* 2003; 112: 1776–1784.

KALLURI, R.; WEINBERG, R.A. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009; 119: 1420–1428.

KANG, S.W. et al. Effects of nicotine on apoptosis in human gingival fibroblasts. *Archives of oral biology* 2011; 56: 1091-97.

KAWAKITA, D. et al. Impact of smoking status on clinical outcome in oral cavity cancer patients. *Oral Oncology* 2012; 48: 186–191.

KERDPON, D.; SRIPLUNG, H. Factors related to advanced stage oral squamous cell carcinoma in southern thailand. *Oral oncol* 2001; 37(3): 216-21.

KHAN, F.A. et al. Predictors of tobacco and alcohol consumption and their relevance to oral cancer control amongst people from minority ethnic communities in the South Thames health region, England. *J Oral Pathol Med* 2000; 29: 214-219.

KHAN, M.A. et al. Twist: a molecular target in cancer therapeutics. *Tumor Biol* 2013; 34: 2497–2506.

KNOWLES, M.; SELBY, P. Introduction to the cellular and molecular biology of cancer. 4. ed. New York: Oxford University Press 2005.

KRISANAPRAKORNKIT, S.; IAMAROON, A. Epithelial-Mesenchymal Transition in Oral Squamous Cell Carcinoma. *International Scholarly Research Network Oncology* 2012; 1-12.

KWOK, W.K. et al. Up-regulation of TWIST in prostate cancer and its implication as a therapeutic target. *Cancer Res* 2005; 65: 5153-5162.

KYO, S. et al. High Twist expression is involved in infiltrative endometrial cancer and affects patient survival. *Human Pathology* 2006; 37: 431– 438.

LAM, L.; LOGAN, R.M.; LUKE, C. Epidemiological analysis of tongue cancer in South Australia for the 24-year period, 1977–2001. *Australian Dental Journal* 2006; 51(1): 16-22.

LEE, J. et al. Carcinoma and dysplasia in oral leukoplakias in Taiwan: prevalence and risk factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006; 101(4): 472-80.

LEE, J.M. et al. The epithelial-mesenchymal transition: new insights in signaling, development, and disease. *J Cell Biol* 2006; 172(7): 973-81.

LEE, T.K. et al. Twist overexpression correlates with hepatocellular carcinoma metastasis through induction of epithelial-mesenchymal transition. *Clin Cancer Res* 2006; 12: 5369-5376.

LI, L.; XIE, T. Stem cell niche: structure and function. *Annu Rev Cell Dev Biol* 2005; 21: 605-31.

LI, Y. et al. Correlation of TWIST2 up-regulation and epithelial–mesenchymal transition during tumorigenesis and progression of cervical carcinoma. *Gynecologic Oncology* 2012; 124: 112–118.

Li, Y.J. et al. Alcohol drinking and upper aerodigestive tract cancer mortality: A systematic review and meta-analysis. *Oral Oncology* 2014; 50: 269–275.

LIANG, X. et al. Hypoxia-inducible factor-1 alpha, in association with TWIST2 and SNIP1, is a critical prognostic factor in patients with tongue squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* 2011; e1-e6.

- LIU, Y.N. et al. Regulatory mechanisms controlling human E-cadherin gene expression, *Oncogene* 2005; 24: 8277–8290.
- LO, W.L. et al. Outcomes of oral squamous cell carcinoma in Taiwan after surgical therapy: factors affecting survival. *J Oral Maxillofac Surg* 2003; 61: 751-758.
- LUO, G.Q. et al. Effect and mechanism of the Twist gene on invasion and metastasis of gastric carcinoma cells. *World J Gastroenterol* 2008; 14: 2487-2493.
- MACFARLANE, G. J. et al. Alcohol, tobacco, diet and the risk of oral cancer: a pooled analysis of three case-control studies. *Eur J Cancer B Oral Oncol [S.I.]* 1995; 31(3): 181-7.
- MACKAY, J.; ERIKSEN, M. The tobacco atlas. Geneva: World Health Organization 2002; 128.
- MANIKANTAN, K. et al. Nutting CM, Rhys-Evans P, et al. Dysphagia in head and neck cancer. *Cancer Treat Rev* 2009; 35: 724–32.
- MARKOPOULOS, A.K. Current Aspects on Oral Squamous Cell Carcinoma. *The Open Dentistry Journal* 2012; 6: 126-130.
- MARTEL, P.L. et al. Alcohol consumption and cancer risk: revisiting guidelines for sensible drinking. *CMAJ* 2011; 183(16).
- MASEREJIAN, N.N. et al. Prospective study of alcohol consumption and risk of oral premalignant lesions in men. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev* 2006; 15(4): 774-81.
- MCDOWELL, J.D. An overview of epidemiology and common risk factors for oral squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Clin North Am [S.I.]* 2006; 39(2): 277-94.
- MEHROTRA, R. et al. Application of cytology and molecular biology in diagnosing premalignant or malignant oral lesions. *Mol Cancer* 2006; 5: 11.
- MEHROTRA, R.; YADAV, S. Oral squamous cell carcinoma: Etiology, pathogenesis and prognostic value of genomic alterations. *Indian J Cancer* 2006; 43(2): 60-6.
- MENEZES, R.F.; BERGMANN, A.; THULER, L.C.S. Alcohol Consumption and Risk of Cancer: a Systematic Literature Review. *Asian Pac J Cancer Prev* 2013; 14(9); 4965-4972.
- MEURMAN, J.H.; GRONROOS, L. Oral and dental health care of oral cancer patients: hyposalivation, caries and infections. *Oral Oncol* 2010; 46(6): 464-7.
- MIGNOGNA, M.D.; FEDELE, S.; LO RUSSO, L. The World Cancer Report and the burden of oral cancer. *Eur J Cancer Prev* 2004; 13: 139-42.
- MIGNOGNA, M. D. et al. Oral and pharyngeal cancer: lack of prevention and early detection by health care providers. *Eur J Cancer Prev* 2001; 10(4): 381-3.

MISHRA R. Biomarkers of oral premalignant epithelial lesions for clinical application *Oral Oncology* 2012; 48: 578–584.

MOORE, T.O. et al. Human papillomavirus, smoking, and cancer. *J Cutan Med Surg* 2001; 5(4): 323-8.

MORAL, M.; PARAMIO, J.M. Akt pathway as a target for therapeutic intervention in HNSCC. *Histol Histopathol* 2008; 23(10): 1269-78.

NAGAO, T. et al. Serum antioxidant micronutrients and the risk of oral leukoplakia among Japanese. *Oral Oncol* 2000; 36: 466-70.

NEVILLE, B.W. et al. *Patologia Oral e Maxilofacial*. Trad.3a Ed., Rio de Janeiro: Elsevier, 2009.

OKUYEMI, O.T.; PICCIRILLO, J.F.; SPITZNAGEL, E. TNM staging compared with a new clinicopathological model in predicting oral tongue squamous cell carcinoma survival. *Head & Neck* 2013- Published online.

OLIVEIRA, M.C. et al. HPV e carcinogênese oral: revisão bibliográfica. *Rev Bras Otorrinolaringol* 2003; 69(4): 153-9.

OMS - Organização Mundial de Saúde. Disponível em: URL: <https://www.who.int> [Data de acesso: 15/12/2013].

OU, D.L. et al. Role of Twist in head and neck carcinoma with lymph node metastasis. *Anticancer Res* 2008; 28(2B): 1355-9.

PETTI, S.; MOHD, M.; SCULLY, C. Revisiting the association Between alcohol drinking and oral cancer in nonsmoking and betel quid non-chewing individuals. *Cancer Epidemiology* 2012; 36: e1–e6.

PITIYAGE, G. et al. Molecular markers in oral epithelial dysplasia: review. *J Oral Pathol Med* 2009; 38(10): 737–52.

PONTES, F.S.C. et al. Squamous Cell Carcinoma of the Tongue and Floor of the Mouth: Analysis of Survival Rate and Independent Prognostic Factors in the Amazon Region. *J Craniofac Surg* 2011; 22: 925-930.

POPOVIĆ, B. et al. Cancer genes alterations and HPV infection in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2010; 39: 909-15.

PRADO, R.F.; TAVEIRA, L.A.A. Nicotina na carcinogênese química bucal. *Rev Bras Patol Oral* 2003; 2(4): 24-7.

PULTE, D.; BRENNER, H. Changes in Survival in Head and Neck Cancers in the Late 20th and Early 21st Century: A Period Analysis. *Oncologist* [S.I.] 2010.

QIN, Q. et al. Normal and disease-related biological functions of Twist1 and underlying molecular mechanisms *Cell Research* 2012; 22: 90-106.

RAO, D.N. et al. Risk assessment of tobacco, alcohol and diet in oral cancer--a case-control study. *Int J Cancer* [S.I.] 1994; 58(4): 469-73.

RAPIDIS, A.D. et al. Major advances in the knowledge and understanding of the epidemiology, aetiopathogenesis, diagnosis, management and prognosis of oral cancer. Editorial / *Oral Oncology* 2009; 45: 299–300.

REIDY, J. et al. A review of the relationship between alcohol and oral cancer. *The surgeon* 2011; 278- 283.

REYA, T. et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. *Nature* 2001; 414(6859): 105-11.

RICHIE, J.P.JR. et al. Blood iron, glutathione, and micronutrient levels and the risk of oral cancer. *Nutr Cancer* 2008, 60: 474–482.

SARGERAN, K. et al. Survival after diagnosis of cancer of the oral cavity. *Br J Oral Maxillofac Surg* 2008; 46: 187-191.

SASAKI, K. et al. Significance of Twist expression and its association with E-cadherin in esophageal squamous cell carcinoma. *J Exp Clin Cancer Res* 2009; 28:158.

SATOH, K. et al. Up-regulation of MSX2 enhances the malignant phenotype and is associated with twist 1 expression in human pancreatic cancer cells. *Am J Pathol* 2008; 172: 926-939.

SCANLON, C.S. et al. Biomarkers of Epithelial-Mesenchymal Transition in Squamous Cell Carcinoma. *J Dent Res* 2013; 92(2): 114-121.

SCHEEL, C. et al. Adaptation versus selection: the origins of metastatic behavior. *Cancer Res* 2007; 67: 11476–11479.

SCHÜTZE, M. et al. Alcohol attributable burden of incidence of cancer in eight European countries based on results from prospective cohort study. *BMJ* 2011; 342: d1584.

SCIUBBA, J.J. Oral cancer and its detection. History-taking and the diagnostic phase of management. *J Am Dent Assoc* [S.I.] 2001; 132: 12S-18S.

SCOTT, S.E.; GRUNFELD, E.A.; MCGURK, M. The idiosyncratic relationship between diagnostic delay and stage of oral squamous cell carcinoma. *Oral oncology* 2005; 41: 396–403.

SCULLY, C. BAGAN, J. Oral squamous cell carcinoma overview. *Oral Oncology* 2009, 45: 301–308.

SCULLY, C.; FIELD, J.; TANZAWA, H. Genetic aberrations in oral or head neck squamous cell carcinoma: carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. *Oral Oncol* 2000; 36: 256-63.

SCULLY C. Oral cancer aetiopathogenesis; past, present and future aspects. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2011; 16(3): e306-11.

SHERIDAN, C. et al. CD44+/CD24- breast cancer cells exhibit enhanced invasive properties: an early step necessary for metastasis. *Breast Cancer Res* 2006; 8(5): R59.

SHIBATA, K. et al. Twist expression in patients with cervical cancer is associated with poor disease outcome. *Annals of Oncology* 2008; 19: 81–85.

SHINGAKI, S. et al. Impact of lymph node metastasis on the pattern of failure and survival in oral carcinomas. *Am J Surg* 2003; 185: 278-84.

SHOOK, D.; KELLER, R. Mechanisms, mechanics and function of epithelial-mesenchymal transitions in early development. *Mechanisms of Development* 2003; 120(11): 1351-83.

SILVA, B.S.F. TWIST and p-Akt immunoexpression in normal oral epithelium, oral dysplasia and in oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2012; 17(1): e29-34.

\_\_\_\_\_. Avaliação da expressão das proteínas Twist, Caderina-E, e p-AKT nos eventos que regem a progressão do carcinoma epidermóide oral [versão original]/Brunno Santos de Freitas Silva; orientador Décio dos Santos Pinto Júnior. São Paulo, 2011. 77p.

SILVA, S.D. et al. TWIST1 Is a Molecular Marker for a Poor Prognosis in Oral. Cancer and Represents a Potential Therapeutic Target. *Cancer* 2013.

SIMPSON, P. Maternal-zygotic gene interactions during formation of the dorsoventral pattern in *Drosophila* embryos. *Genetics* 1983; 105: 615-632.

SMITH, J. et al. Biomarkers in dysplasia of the oral cavity: a systematic review. *Oral Oncol* 2009; 45: 647 – 53.

SOBIN, L.H.; WITTEKIND, C. UICC, International Union Against Cancer, TNM classification of malignant tumours. 6th ed. New York: Wiley-Liss; 2002.

SOMOZA-MARTÍN, J.M. et al. Gene expression profile in oral squamous cell carcinoma: a pilot study. *J Oral Maxillofac Surg* 2005; 63: 786-92.

SOUSA, F.A.C.G. et al. Estudo epidemiológico descritivo do carcinoma epidermóide bucal em uma população brasileira. *Cienc Odontol Bras* 2008; 11(4): 24-29.

STAFFORD, L.J.; VAIDYA, K.S.; WELCH, D.R. Metastasis suppressors genes in cancer. *The International Journal of Biochemistry & Cell Biology* 2008; 40: 874–891.

SUBRAMANIAN, S. et al. Cost-effectiveness of oral cancer screening: results from a cluster randomized controlled trial in India. *Bull World Health Organ* 2009; 87: 200-6.

SYRJANEN, S. et al. Oral HPV infection: current strategies for prevention and therapy. *Curr Pharm Des* 2012; 18(34): 5452-69.

TARVAINEN, L. et al. Is the incidence of oral and pharyngeal cancer increasing in Finland? An epidemiological study of 17,383 cases in 1953-1999. *Oral Dis* 2004; 10(3): 167-72.

THISSE, B.; EL MESSAL, M.; PERRIN-SCHMITT, F. The twist gene: isolation of a *Drosophila* zygotic gene necessary for the establishment of dorsoventral pattern. *Nucleic Acids Res* 1987; 15: 3439-3453.

TRAMACERE, I. et al. A meta-analysis of alcohol drinking and oral and pharyngeal cancers. Part 1: overall results and dose-risk relation. *Oral Oncol* 2010; 46: 497-503.

TROMP, D.M. et al. Patient and tumour factors associated with advanced carcinomas of the head and neck. *Oral Oncol* 2005; 41(3): 313-9.

TSUJI, T. et al. Predictive assay of neoadjuvant chemotherapy in management of oral cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg [S.I.]* 2007; 36(1): 15-9.

TSURUTANI, J. et al. Evaluation of two phosphorylation sites improves the prognostic significance of Akt activation in non-small-cell lung cancer tumors. *Clin Oncol* 2006; 24(2): 306-14.

TURATI, F. et al. A meta-analysis of alcohol drinking and oral and pharyngeal cancers. Part: 2 Results by subsites. *Oral Oncol* 2010; 46: 720-6.

VAN DER SCHROEFF, M.P.; DE JONG, R.J.B. Staging and prognosis in head and neck cancer. *Oral Oncol* 2009; 45: 356-60.

VAN DER WAAL, I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncology* 2009; 45: 317-323.

VESUNA, F. et al. Twist is a transcriptional repressor of E-Cadherin gene expression in breast cancer. *Biochem Biophys Res Commun* 2008; 367(2): 235-41.

VILLA, A.; VILLA, C.; ABATI, S. Oral cancer and oral erythroplakia: an update and implication for clinicians. *Australian Dental Journal* 2011; 56: 253-256.

VOGELSTEIN, B.; KINZLER, K.W. Cancer genes and the pathways they control. *Nat Med* 2004; 10(8): 789-99.

VORA, H.H. et al. Prognostic significance of biomarkers in squamous cell carcinoma of the tongue: multivariate analysis. *J Oncol* 2003; 82: 34-50.



WALLERAND, H. et al. The epithelial-mesenchymal transition-inducing factor TWIST is an attractive target in advanced and/or metastatic bladder and prostate cancers. *Urologic Oncology: Seminars and Original Investigations* 2010; 28: 473–479.

WANG, Y. et al. Benzo(a)pyrene promotes A549 cell migration and invasion through up-regulating Twist. *Arch Toxicol* 2014.

WANG, W. et al. A study of epidemiologic and recurrence factors of oral cancer. *J oral maxillofac surg* 2011.

WANG, X. et al. Identification of a novel function of TWIST, a bHLH protein, in the development of acquired taxol resistance in human cancer cells. *Oncogene* 2004; 23: 474-82.

WARNAKULASURIYA, S. et al. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. *J Oral Pathol Med* 2008; 37: 127–133.

WARNAKULASURIYA, S.; SUTHERLAND, G.; SCULLY, C. Tobacco, oral cancer and treatment of dependence. *Oral Oncol* 2005; 41: 244–60.

WARNAKULASURIYA S. Food, nutrition and oral cancer. In: *Food Constituents and Oral Health; Current Status and Future Prospects*. Ed. Wilson M. Woodhead Publishing 2009; 273-295.

\_\_\_\_\_. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncology* 2009; 45: 309–316.

WOLFF, K.D.; FOLLMANN, M.; NAST, A. The Diagnosis and Treatment of Oral Cavity Cancer. *Deutsches Ärzteblatt International* 2012; 109(48): 829–35.

WRIGHT, J.M. A review and update of oral precancerous lesions. *Texas Dent J* 1998; 115(6): 15-9.

WUNSCH-FILHO, V. The epidemiology of the oral and pharynx cancer in Brazil. *Oral Oncol* 2002; 38: 737-746.

WUSHOU, A. et al. Correlation of increased twist with lymph node metastasis in patients with oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg* 2012; 70(6): 1473-9.

XIE, F.; LI, K.; OUYANG, X. Twist, an independent prognostic marker for predicting distant metastasis and survival rates of esophageal squamous cell carcinoma patients. *Clin Exp Metastasis* 2009; 26: 1025–1032.

YANG, J. et al. Twist, a master regulator of morphogenesis, plays an essential role in tumor metastasis. *Cell* 2004; 117: 927-939.

YANG, J.; MANI, S.A.; WEINBERG, R.A. Exploring a New Twist on Tumor Metastasis. *Cancer Research* 2006; 66: 4549-4552.

YOSHINO, I. et al. Induction of Epithelial-Mesenchymal Transition-related Genes by Benzo[a]Pyrene in Lung Cancer Cells. *CANCER* 2007; 110: 369-374.

YUEN, H.F. et al. Upregulation of Twist in oesophageal squamous cell carcinoma is associated with neoplastic transformation and distant metastasis. *J Clin Pathol* 2007; 60: 510-514.

YUEN, H.F. et al. Significance of TWIST and E-cadherin expression in the metastatic progression of prostatic cancer. *Histopathology* 2007; 50: 648-658.

ZEISBERG, M.; NEILSON, E.G. Biomarkers for epithelial-mesenchymal transitions. *J Clin Invest* 2009; 119: 1429–1437.

ZHANG, C.H. et al. Activation of STAT3 Signal Pathway Correlates with Twist and E-Cadherin Expression in Hepatocellular Carcinoma and Their Clinical Significance. *Journal of Surgical Research* 2012; 174: 120–129.

ZHANG, Z. et al. Significance of TWIST expression and its association with E-cadherin in bladder cancer. *Human Pathology* 2007; 38: 598–606.

ZHANG, Z.Y. et al. Human papillomavirus type 16 and 18 DNA in oral squamous cell carcinoma and normal mucosa. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2004; 33(1): 71-4.

ZHOU, C. et al. Inflammation linking EMT and cancer stem cells. *Oral Oncology* 2012; 48: 1068–1075.

ZNAOR, A. et al. Independent and combined effects of tobacco smoking, chewing and alcohol drinking on the risk of oral, pharyngeal and esophageal cancers in Indian men. *Int J Cancer* 2003; 105: 681-686.

ZYGOGIANNI, A.G. et al. Oral squamous cell cancer: early detection and the role of alcohol and smoking. *Head & Neck Oncology* 2011; 3: 1-12.

## APÊNDICE A



UNIVERSIDADE FEDERAL DO PARÁ  
HOSPITAL UNIVERSITÁRIO JOÃO DE BARROS BARRETO  
NÚCLEO DE PESQUISA EM ONCOLOGIA  
PROGRAMA DE PÓS GRADUAÇÃO EM ONCOLOGIA  
E CIÊNCIAS MÉDICAS



Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

Pesquisa: “**Estudo do Papel dos Genes *TWIST1*, *TWIST2* e *AKT* na tumorigênese do Carcinoma Epidermóide Bucal**”

Você está sendo convidado a participar deste estudo experimental que tem como objetivo avaliar através de estudos moleculares e de imuno-histoquímica o papel dos genes *TWIST1*, *TWIST2* e *AKT* bem como de suas proteínas nas células de pacientes portadores de câncer de boca. Estas informações estão sendo fornecidas para sua participação voluntária neste estudo. Para tal será realizada biópsias incisional nas lesões já existentes, que consiste da retirada de um pedaço do tecido doente que será posteriormente dividido em dois fragmentos, um para ser congelado e outro para confecção de blocos de parafina, ambos os fragmentos ficarão devidamente conservados no Laboratório de Patologia Bucal.

Este estudo não apresenta benefícios diretos a você. Em qualquer etapa, você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. O principal investigador é a mestrandia Michelle Carvalho de Abreu, além dos pesquisadores: Prof. Dr. André Salim Khayat, Prof. Dr. Rommel Mario Rodriguez Burbano, Prof. Dr. Hélder Antônio Rebelo Pontes e a mestrandia Valdenira de Jesus Oliveira Kato, que podem ser encontrados no Hospital Universitário João de Barros Barreto— tanto no Serviço de Diagnóstico e Cirurgias das Patologias Bucais quanto no Núcleo de Pesquisa em Oncologia, situados dentro do Hospital Universitário João de Barros Barreto na Rua dos Mundurucus, 4487; ou pelos telefones 8142-1948; 8165-6596 ou 8847-1504. Em caso de dúvida sobre a ética da pesquisa pode-se entrar em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa (CEP), no mesmo endereço, Fone: (91) 3201-6754/E-mail:cephujbb@yahoo.com.br. É garantida a liberdade de retirada de consentimento a qualquer momento e deixar de participar do estudo, sem qualquer prejuízo à continuidade do seu tratamento na instituição. As informações obtidas serão analisadas em conjunto com as informações de outros pacientes, não sendo divulgada a identificação de nenhum paciente. Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da

pesquisa. Em caso de dano pessoal, diretamente causado pelos procedimentos ou tratamentos propostos neste estudo (nexo causal comprovado), você terá direito a tratamento médico na Instituição, bem como às indenizações legalmente estabelecidas. O pesquisador utilizará os dados e o material coletado somente para esta pesquisa.

Acredito ter sido suficientemente informado a respeito das informações que li ou que foram lidas para mim, descrevendo o estudo “Estudo do Papel dos Genes *TWIST1*, *TWIST2* e *AKT* na tumorigênese do Carcinoma Epidermóide Bucal.” Eu discuti com o pesquisador, sobre minha decisão em participar nesse estudo. Ficaram claros para mim quais são os propósitos do estudo, os procedimentos a serem realizados, seus desconfortos e riscos, as garantias de confidencialidade e de esclarecimentos permanentes. Ficou claro também que minha participação é isenta de despesas e que tenho garantia do acesso a tratamento hospitalar quando necessário. Concordo voluntariamente em participar deste estudo e poderei retirar o meu consentimento a qualquer momento, antes ou durante o mesmo, sem penalidades ou prejuízo ou perda de qualquer benefício que eu possa ter adquirido, ou no meu atendimento neste Serviço.

**Nota: Este documento será assinado em duas vias, ficando uma em poder do paciente.**

\_\_\_\_\_ Belém, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
Assinatura do sujeito/Representante responsável

\_\_\_\_\_ Belém, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
Assinatura da testemunha

**(Para caso de sujeitos menores de 18 anos, analfabetos, semi-analfabetos ou portadores de deficiência auditiva ou visual).**

\_\_\_\_\_ Belém, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_  
Assinatura do sujeito que colheu o TCLE

**(Somente para o responsável do projeto)**

Declaro que obtive de forma apropriada e voluntária o Consentimento Livre e Esclarecido deste paciente ou representante legal para a participação neste estudo.

\_\_\_\_\_  
ASSINATURA DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL

NOME:

ENDEREÇO:

FONE:

REGISTRO NO CONSELHO:

Belém, \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

## ANEXO A

HOSPITAL UNIVERSITÁRIO  
JOÃO DE BARROS BARRETO -  
UFPA



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Estudo do Papel dos Genes TWIST1, TWIST2 e AKT na tumorigênese do Carcinoma Epidermóide Bucal

**Pesquisador:** MICHELLE CARVALHO DE ABREU

**Área Temática:** Área 1. Genética Humana.  
(Trata-se de pesquisa envolvendo genética humana não contemplada acima.);

**Versão:** 2

**CAAE:** 18244613.5.0000.0017

**Instituição Proponente:** Hospital Universitário João de Barros Barreto - UFPA

**Patrocinador Principal:** CONS NAC DE DESENVOLVIMENTO CIENTIFICO E TECNOLÓGICO

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 397.929

**Data da Relatoria:** 17/09/2013

**Apresentação do Projeto:**

O projeto é pertinente, pois se preocupa com um tema relevante - Neoplasia maligna - Carcinoma Epidermóide Bucal-, que é problema de saúde pública frente as estimativas de incidência projetadas pelo INCA para 2013/2014 no país. Além de que a incidência do carcinoma epidermóide de boca no nosso Estado supera a estimativa nacional, onde cerca de dois terços dos pacientes, diagnosticados no Pará, apresentam-se em estágios avançados (III e IV), conduzindo a uma taxa de sobrevida de menos de 30% em cinco anos e a um elevado número de dias de internação. Ao lado disso, os índices de pacientes jovens, com até 45 anos de idade, acometidos com CEB, no Pará, é três vezes maior do que os obtidos na maior parte dos estudos conduzidos no Reino Unido e nos Estados Unidos.

**Objetivo da Pesquisa:**

Análise de expressão e mutacional dos Genes TWIST1, TWIST2 e AKT em espécimes de Carcinoma Epidermóide Bucal (CEB) de pacientes do Estado do Pará.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

O projeto apresenta riscos que estão ligados ao desconforto durante a retirada dos fragmentos que serão biopsiados, e em relação ao sigilo e confidencialidade dos dados que serão obtidos dos

**Endereço:** RUA DOS MUNDURUCUS 4487

**Bairro:** GUAMA

**CEP:** 66.073-000

**UF:** PA

**Município:** BELEM

**Telefone:** (91)3201-6754

**Fax:** (91)3201-6663

**E-mail:** cephujbb@yahoo.com.br