

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
NÍVEL MESTRADO
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO PATOLOGIA BUCAL**

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO E DISTRIBUIÇÃO DE E-CADERINA,
VINCULINA E CINASE DE ADESÃO FOCAL EM BIÓPSIAS DE
CARCINOMA ESPINOCELULAR ORAL**

Bernardo Salim Silveira

Orientador: **Prof. Dr. Marcelo Lazzaron Lamers**

Porto Alegre, julho de 2013.

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO E DISTRIBUIÇÃO DE E-CADERINA,
VINCULINA E CINASE DE ADESÃO FOCAL EM BIÓPSIAS DE
CARCINOMA ESPINOCELULAR ORAL**

Bernardo Salim Silveira

**Dissertação de Mestrado
apresentado ao Programa de
Pós-Graduação em Odontologia,
Nível Mestrado da Universidade
Federal do Rio Grande do Sul,
como pré-requisito final para a
obtenção do título de Mestre em
Patologia Bucal.**

Linha de Pesquisa: Câncer Bucal

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Lazzaron Lamers

Porto Alegre, julho de 2013.

“Dedico este trabalho aos meus pais, que sempre me deram carinho e apoio durante toda minha vida. Serei eternamente grato às palavras e atitudes confortantes que sempre tiveram comigo...”

AGRADECIMENTOS

Ao meu irmão, **Vinícius Salim Silveira**, pela magnífica convivência que sempre tivemos e pela imensurável amizade que temos

Aos meus grandes amigos **Fábio Sá Carneiro Sczepanik, Guilherme Zanatta da Luz, Lucas da Silva Meirelles, Marcelo de Souza e Thiago Dinato** que, nos últimos anos, me proporcionaram momentos e situações marcantes além de se tornarem amizades verdadeiras.

Às doutorandas e amigas **Grasieli de Oliveira Ramos e Lisiane Bernardi** sem as quais esse trabalho não seria realizado.

Aos meus amigos 'laboratoriais' e colegas de mestrado e doutorado em Patologia Bucal: **Alessandra Dutra da Silva, Ana Carolina Pellicoli, Artur Vasconcelos, Bárbara Capitanio, Bruna Jalfim Maraschin, Caroline Dillenburg, Viviane Palmeira da Silva, Thaíse Nóbrega** que sempre deixaram o quinto andar mais animado e descontraído.

À aluna de iniciação científica **Bianca de Bem Prunes** pelo companheirismo nas horas boas e ruins, pelos conselhos e pela paciência que sempre teve comigo, tenho convicção de que nesse último ano eu ganhei uma amizade pra vida inteira.

Ao professor **João Batista Burzlaff** que acompanhou todo o meu caminhar "psicológico" durante essa caminhada.

Ao meu orientador **Marcelo Lazzaron Lamers**, o qual eu admiro como professor e pesquisador e com o qual aprendi coisas em âmbito pessoal e profissional. Agradeço a paciência interminável que tiveste comigo durante esses anos.

Ao professor **Manoel Sant'Anna Filho** por ter me proporcionado esta pós-graduação e pelos incontáveis ensinamentos durante os encontros, reuniões ou estudos de grupo realizados no laboratório.

Aos professores **Anna Christina Medeiros Fossati, Fernanda Visioli, Laura Campos Hildebrand, Vinicius Carrard, Márcia Gaiger de Oliveira, Manoela Martins e Marco Martins** pela acessibilidade, clareza e objetividade ao transmitir seus conhecimentos.

Às técnicas **Isabel da Silva Lauxen e Alessandra Magnusson** sem as quais esse trabalho não teria sido realizado.

Ao professor **Pantelis Varvaki Rados** pelo ensinamento de responsabilidade e, principalmente, pontualidade e também por todo conhecimento de patologia que me proporcionou

À **Adriana Aguiar**, agradeço a receptividade, disposição e competência além de todo o auxílio prestado

À **CAPES** e ao **CNPq** pelo financiamento do trabalho e a bolsa de pesquisa a mim concedida.

À todos que, de alguma forma, contribuíram ou torceram por esse trabalho.

RESUMO

O carcinoma espinocelular é uma neoplasia maligna que representa aproximadamente 94% de todas as ocorrências presentes em boca e uma das suas principais características celulares é a migração de suas células para formar metástases. A adesão celular é considerada um dos eventos determinantes da migração celular. Para as células formarem uma estrutura tecidual tridimensional as adesões entre células e entre células e matriz extracelular são de grande importância. As junções de adesão celulares surgem, caracteristicamente, pela interação entre receptores adesivos, vias de sinalização e elementos do citoesqueleto. A proteína E-caderina está presente em adesões entre células no tecido epitelial. A proteína FAK está envolvida na maioria dos eventos relacionados à adesão celular estimulada por integrinas. A Vinculina é uma proteína de adesão que se liga ao citoesqueleto de actinmiosina como uma proteína de adesão focal através das integrinas. Estudos recentes sugerem que há alteração na expressão e atividade de proteínas de adesão em tumores malignos. O objetivo deste trabalho foi descrever o padrão de expressão e de regulação da atividade de proteínas de adesão em amostras de tumores de carcinoma espinocelular. Foram realizadas reações de imunistoquímica para verificar o padrão de distribuição das proteínas E-caderina, Vimentina e FAK-y397 em amostras de tumores de carcinoma espinocelular oral. Verificou-se a diminuição da expressão de E-caderina e de Vinculina em regiões de adesão célula-célula e em contrapartida constatou-se aumento na marcação citoplasmática de Vinculina bem como na marcação de FAK-y397 em todas as amostras de tumores. Apesar dos avanços, ainda são necessários mais estudos observacionais que averiguem não apenas o grau de expressão dessas proteínas de adesão, mas também o seu nível de regulação. A partir dos resultados deste estudo, pode-se sugerir que o controle do nível de expressão e de atividade da adesão celular podem ser considerados como potenciais alvos para a aplicação de terapias

coadjuvantes que visam a diminuir ou impedir a progressão tumoral, bem como o desenvolvimento de metástases.

Palavras chaves: adesão celular, migração celular, actina,

ABSTRACT

Squamous cell carcinoma is a malignant neoplasm that accounts for approximately 94% of all occurrences present in mouth and one of its main characteristics is the cellular migration of its cells to form metastases. Cell adhesion is considered one of the defining events of cell migration. For a three-dimensional tissue structure, adhesions between cells and between cells and the extracellular matrix is of great importance. Cell adhesion junctions arise characteristically by interaction between adhesive receptors, signaling pathways and cytoskeletal elements. The protein E-cadherin is present in cells in the adhesion between epithelial tissue. The Focal Adhesion Kinase (FAK) protein is involved in most events related to cell adhesion stimulated by integrins. The vinculin is an adhesion protein that binds cytoskeletal protein through integrins activation. Recent studies suggest that there are alterations in the expression and activity of adhesion proteins in malignant tumors. The aim of this study was to describe the pattern of expression and regulation of the activity of adhesion proteins in tumor samples of squamous cell carcinoma. Immunohistochemical reactions were performed to check the distribution pattern of the protein E-cadherin, vimentin and FAK-y397 in tumor samples of oral squamous cell carcinoma. There was a decrease in the expression of E-cadherin and vinculin in regions of cell-cell adhesion but, on the other hand, it was found to increase in cytoplasmic as well as unscheduled vinculin FAK-y397 in all tumor samples. Despite progress, it is necessary more observational studies that examine not only the degree of expression of these adhesion proteins, but also its level of regulation. From the results of this study it is suggested that the control of the expression level and activity of cell adhesion may be considered as potential targets for application adjuvant therapies that aim to reduce or prevent tumor progression and the development metastases.

Keywords: cell adhesion, cell migration, actin

SUMÁRIO

AGRADECIMENTOS	4
RESUMO	6
SUMÁRIO	8
APRESENTAÇÃO	11
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA.....	12
1.1 Eventos celulares relacionados à migração celular.....	13
1.2 Adesão célula-célula.....	15
1.3 Adesão célula-matriz extracelular	16
1.4 Proteínas de Adesão Celular no Câncer.....	19
2. OBJETIVOS.....	22
2.1 Objetivo Geral	22
2.2 Objetivos Específicos	22
3. MATERIAIS E MÉTODOS.....	23
3.1 Considerações Éticas	23
3.2 Amostras.....	23
3.3 Análise das amostras	25
3.4 Manipulação e descarte das Amostras	26
4. RESULTADOS	27
4.1 Marcação de Actina	27
4.1.1 Zona Livre (Actina)	27
4.1.2 Centro do Tumor (Actina)	27
4.1.3 Zona de Invasão (Actina)	27
4.2. Marcação de E-caderina	28
4.2.1. Zona Livre (E-caderina)	28
4.2.2. Centro do Tumor (E-caderina).....	28
4.2.3. Zona de Invasão (E-caderina).....	28
4.3 Marcação de Vinculina	29
4.3.1. Zona Livre (Vinculina).....	29
4.3.2. Centro do Tumor (Vinculina).....	29
4.3.3. Zona de Invasão (Vinculina)	29

4.4 Marcação de FAK - y397	30
4.4.1. Zona Livre (FAK - y397)	30
4.4.2 Centro do Tumor (FAK - y397).....	30
4.4.3. Zona de Invasão (FAK - y397).....	30
5. DISCUSSÃO.....	34
6. CONCLUSÕES	43
REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	44
ANEXOS	50
ANEXO 1	50
ANEXO 2	53
ANEXO 3	55
ANEXO 4	56
ANEXO 5	60

APRESENTAÇÃO

A presente dissertação teve como foco de estudo a análise da presença de proteínas de adesão celular E-caderina, Vinculina e FAK Y-397 em carcinoma espinocelular. Para isso, foram coletadas amostras dessa lesão de pacientes do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA) com as quais foram feitas marcações imunohistoquímicas para análise da presença e distribuição dessas proteínas.

Esta dissertação de mestrado está estruturada da seguinte maneira:

Introdução e Revisão de literatura enfatizando os principais pontos de discussão;

Exposição dos resultados obtidos;

Discussão integrada dos resultados obtidos.

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

Célula neoplásica é o nome dado a um conjunto de alterações celulares que resultam em crescimento desordenado originando um tumor, o qual pode migrar e resultar em invasão de tecidos e órgãos. Quando as células neoplásicas ficam restritas ao seu ambiente, esse tumor é considerado benigno; já quando as células adquirem a habilidade de invadir os tecidos circundantes, o tumor é uma neoplasia maligna a qual é denominada câncer.

No início de 2012, a Organização Mundial de Saúde (OMS) afirmou que naquele ano o câncer superaria as doenças cardiovasculares como primeira causa de mortalidade. Entre 1975 e 2000, ocorreu um aumento superior a 100% na incidência de câncer na população e existem previsões de que, em 2030, o câncer levará a óbito 17 milhões de pessoas (RIES, L.A.G. et al, 2003). Aproximadamente um a cada cinco indivíduos desenvolverá tumor maligno em algum ponto do organismo e, segundo dados do Ministério da Saúde, registra-se anualmente cerca de 10 mil casos de câncer bucal no Brasil.

Os tumores malignos são classificados de acordo com o tecido e o tipo celular que lhes dão origem, sendo aqueles de células epiteliais os mais comuns em humanos. O carcinoma espinocelular é uma neoplasia maligna que representa aproximadamente 94% de todas as ocorrências presentes em boca. A disseminação do tumor para outros órgãos (metástase) ocorre principalmente através dos vasos linfáticos, sendo que 21% dos pacientes apresentam metástases devido ao atraso no diagnóstico. A agressividade dos carcinomas espinocelulares pode ser classificada conforme seu grau de invasividade, percentagem de células indiferenciadas, proliferação celular, entre outros fatores, em carcinoma de grau I a III ou I a IV, onde os tumores menos

diferenciados recebem os numerais mais altos. O sistema de graduação histopatológica multifatorial descrito por Magne Bryne está apresentado na Figura 1. Entre as alterações descritas, sabe-se que a metástase do tumor para outros órgãos está diretamente relacionada à migração celular individual e coletiva (BRYNE, M. et al,1992; FRIEDL, P., GILMOUR, D., 2009).

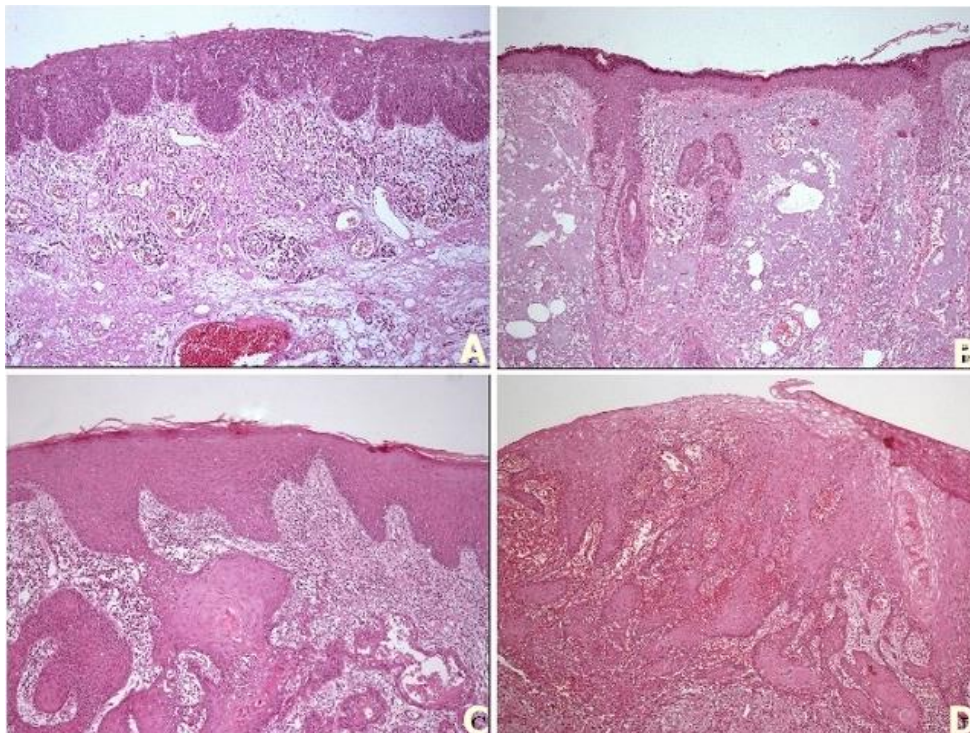


Figura 1: Graduação Histopatológica de Bryne: **A) Grau I:** alto grau de ceratinização, pequeno pleomorfismo nuclear, número de mitoses baixo (0-1), bordas infiltrativas bem delimitadas, infiltrado linfoplasmocitário abundante. **B) Grau II:** grau de ceratinização moderado, pleomorfismo nuclear moderado, número de mitoses médio (2-3), invasão em bandas, fios ou cordões sólidos, infiltrado linfoplasmocitário moderado. **C) Grau III:** Mínimo grau de ceratinização, pleomorfismo nuclear elevado, número de mitoses alto (4-5), invasão em pequenos grupos ou cordões de células infiltrativas, infiltrado linfoplasmocitário escasso. **D) Grau IV:** Ausência de ceratinização, extremo pleomorfismo nuclear, número de mitoses altíssimo (>5), invasão com dissociação celular acentuada e generalizada em pequenos grupos de células ou individualmente, ausência de infiltrado linfoplasmocitário. Segundo Bryne, a característica com maior gravidade determina a graduação do tumor.

Formatado: À esquerda, Recuo: Deslocamento: 2 cm, Espaçamento entre linhas: simples

1.1 Eventos celulares relacionados à migração celular

A atividade migratória é um fenômeno cíclico que requer a ativação coordenada de moléculas estruturais e de sinalização, as quais vão determinar uma assimetria espacial, gerando uma morfologia polarizada. Quando a migração é iniciada, ocorre polimerização de Actina na porção frontal da célula (*leadingedge*), promovendo a formação de grandes projeções de membrana (lamelipódios) e o estabelecimento de novas adesões ao substrato. A adesão celular é um processo extremamente dinâmico e ocorre a partir da interação de proteínas transmembrana (integrinas) com proteínas da matriz extracelular resultando na liberação de moléculas sinalizadoras intracelulares bem como no recrutamento de proteínas moduladoras da ligação entre integrinas e proteínas do citoesqueleto. As vias de sinalização celular e o recrutamento de moléculas moduladoras da adesão variam de acordo com o tipo e o número de moléculas de integrina recrutadas na ligação com a matriz extracelular, e podem envolver mais de 100 diferentes moléculas. Algumas destas adesões nascentes amadurecem através da troca hierárquica e temporalmente definida de moléculas de adesão (*turnover*), as quais se ancoram em feixes de Actina-miosina II (fibras de estresse) e geram forças contráteis que facilitam o movimento do corpo celular na direção determinada. O ciclo se encerra com a liberação das adesões na porção posterior da célula (LAUFFENBURGER, D.A., HORWITZ, A.F., 1996; WEBB, D.J., PARSONS, J.T., HORWITZ, A.F., 2002; WEBB, D.J.; HORWITZ, A.F., 2003; ZONG, H.et al, 2007; CHOI, C.K. et al, 2008; SANDQUIST, J.C., BEMENT, W.M., 2010; GARDEL et al, 2010; PARSONS, J.T., HORWITZ, A.R., SCHWARTZ, M.A., 2010).

Para as células formarem uma estrutura tecidual tridimensional as adesões entre células e entre células e matriz extracelular possuem

importância vital (MAGIE, C.R.; MARTINDALE, M.Q., 2008). As junções de adesão celulares surgem, caracteristicamente, pela interação entre receptores adesivos, vias de sinalização e elementos do citoesqueleto. A adesão celular é considerado um dos eventos determinantes da migração celular.

1.2 Adesão célula-célula

Existem diferentes tipos de ligação célula-célula, sendo mais estudadas as adesões mediadas por caderinas. As caderinas constituem uma família de glicoproteínas cuja atividade é dependente de cálcio e que apresentam ligações homofílicas entre elas e estão presentes em ligações célula-célula de diferentes tecidos tais como o tecido epitelial e o tecido nervoso. As proteínas E-caderina pertencem a essa família, estão presentes em adesões entre células no tecido epitelial e são consideradas “estabilizadoras morfológicas epiteliais” além de desempenhar funções complexas como receptores, fornecedores de integridade estrutural tecidual e celular e também mediadores em funções interativas entre os meios extra e intracelulares (FEDOR-CHAIKEN, M., 2003; NELSON, W.J, 2008; POPESCU, C.I. et al 2013).

Após a ligação das caderinas no meio extracelular, ocorre recrutamento de proteínas sinalizadoras e ligadoras do citoesqueleto de Actina, como as cateninas. As cateninas são proteínas que estão associadas formando um complexo juncional no qual a porção citoplasmática das E-caderinas se ligam a β ou γ -catenina que, em seguida, através da α -catenina, se unem aos filamentos de Actina. Este complexo juncional que se forma com o envolvimento de E-caderina, β e γ -catenina e α -catenina, confere as E-caderinas a função de mecanoreceptores e mecanotransdutores uma vez que,

após estimuladas elas podem gerar a ativação dos filamentos de Actina (LEWIS, J.E., 1995; MOHAMED, F., ALTINI, M., MEER, S., 2007; POPESCU, C.I., 2013). Essa integração implica importante papel em moléculas que podem estar na interface entre a zona de aderência, as vias de sinalização e o citoesqueleto.

1.3 Adesão célula-matriz extracelular

A adesão entre célula e matriz é iniciada a partir da ativação das integrinas, as quais são glicoproteínas compostas por heterodímeros transmembrana (cadeias α e β) que medeiam a ligação da matriz extracelular com o citoesqueleto celular, constituindo assim, a principal família de proteínas receptoras de matriz. As adesões relacionadas às integrinas são capazes de nuclear pontos de sinalização da matriz para a célula (*outside in*) bem como da célula para matriz (*inside out*) podendo gerar alterações tanto no comportamento celular como na organização da matriz extracelular. Estas comunicações ocorrem devido à presença de um domínio c-terminal extracelular que se liga a sequências específicas de aminoácidos da matriz, e a um domínio n-terminal intracelular que se liga a proteínas de ancoragem e proteínas sinalizadoras.

A ativação das integrinas varia de acordo com a presença ou não de ligantes intra ou extracelularmente. Por exemplo, quando há ligantes na matriz (*outside in*) o domínio extracelular sai da forma inativa (extremidades α e β dobradas e ligadas), para a forma ativa (extremidades separadas e alongadas). Isto expõe o sítio de ligação intracelular da cadeia β para a ligação sucessiva

de proteínas adaptadoras que se ligam ao citoesqueleto (ex.: Talina, Vinculina, alfa-actinina, CAS-130). Ao mesmo tempo, ocorre o recrutamento de proteínas sinalizadoras (ex.: *Focal Adhesion Kinase* – FAK, Paxilina) as quais, de acordo com o sítio de fosforilação, são responsáveis por controlar os demais eventos da migração celular (ex.: contratilidade). Adicionalmente, as vias de sinalização ativadas por estas proteínas regulatórias podem desempenhar papel no controle de outros eventos celulares como, por exemplo, a divisão celular (GALBRAITH, C.G., YAMADA, K.M., SHEETZ, M.P., 2002; LUO, B.H.; SPRINGE, T.R.A., 2006; NAYA, A.L.; WEBB, D.J.; HORWITZ, A.F., 2004).

A proteína FAK está envolvida na maioria dos eventos relacionados à adesão celular estimulada por integrinas. FAK é uma tirosina-cinase que pode ser fosforilada em alguns sítios de fosforilação presentes em sua estrutura. Diferentes vias de sinalização celular dependem da ativação de FAK incluindo migração celular, sinalização de fator de crescimento, progressão do ciclo celular e sobrevivência da célula. Ela é atraída para regiões de adesões focais após à ligação de Talina, Vinculina e de Paxilina à molécula de integrina (cadeias beta e alfa, respectivamente). Após esta ligação, ocorre uma fosforilação cruzada entre resíduos tirosinas específicos (Tyr 397) gerando, dessa maneira, sítios de ligação para tirosina-cinases citoplasmáticas (família Src) que, ao se unirem às FAK, fosforilam-nas (Tyr576 e Tyr925) e criam sítios de encaixe para outras proteínas sinalizadoras intracelulares.

Fibroblastos deficientes de FAK apresentam muitas adesões focais o que os torna mais lentos e com menor espalhamento celular. Portanto, as FAK participam da dissociação de adesões focais o que leva a crer que a perda de adesão é necessária para a migração celular normal. Células deficientes em

FAK apresentam, além de lentidão, dificuldade para manter orientação de migração. Além disso, em alguns trabalhos, verifica-se que o crescimento da expressão de FAK aumentou a migração celular e a reconstituição de células deficientes dessa proteína possibilitou a restauração da migração celular das mesmas. No entanto, quando utilizam-se proteínas FAK mutantes, que não possuem habilidade de se ligar a família Src ou atividade quinase, para a reconstituição de células deficientes de FAK observa-se que essas células não conseguem restaurar sua atividade migratória, o que demonstra que é necessária a presença da forma fosforilada de FAK para que haja deslocamento celular. A interação de FAK com outras proteínas como Paxilina ou as quinases da família Src é crítica para a ocorrência do *turnover* na migração celular visto que as células que apresentam deficiências nas duas últimas sofrem deficiências nesse processo (KLINGHOFER, R.A. et al, 1999; NAYA, A.L., WEBB, D.J., HORWITZ, A.F., 2004; PARSONS, J.T., 2003; SIEG, D.J., HAUCK, C.R., SCHLAEPFER, D.D., 1999; WEBB, D.J., PARSONS, J.T., HORWITZ, A.F., 2002).

Várias moléculas de adesão podem ser recrutadas para pontos de adesão célula-célula ou célula-matriz como, por exemplo, a Vinculina (LEERBERG, J.M., YAP, A.S., 2012). Esta proteína foi assim denominada por GEIGER, B. et al, 1980 devido ao fato de ela estar presente em adesões focais e sugerir envolvimento na ligação entre os terminais de feixes de filamentos para a membrana. A Vinculina é considerada uma proteína-chave que regula a transmissão de forças contráteis sendo uma mecanosensora e desempenhando um papel importante na mecanotransdução das caderinas. Ela se liga ao citoesqueleto de actinmiosina como uma proteína de adesão

focal através das integrinas, ou seja, a Vinculina está relacionada, juntamente com a caderina, à transmissão de forças contráteis ao citoesqueleto. Últimos estudos asseguram que a Vinculina possa ser um inibidor de mobilidade celular em substratos planos (2D) enquanto que em substratos tridimensionais (3D) maiores investigações devem ser realizadas. (HUVENEERS, S. et al, 2012; LADOUX, B. et al, 2010; LEERBERG, J.M., YAP, A.S., 2012; MIERKE, C.T., 2009)

1.4 Proteínas de Adesão Celular no Câncer

Para que os tumores iniciem o processo de invasão tecidual (em células isoladas ou em pequenos grupos celulares) e posterior estabelecimento de metástases é necessário que ocorra o destacamento celular do tecido de origem, ou seja, a perda da coesão celular. No tecido epitelial, a perda de coesão celular está relacionada à disfunção de E-caderina bem como à supressão ou desativação das proteínas que estão diretamente associadas a ela, as cateninas, fornecendo ao tumor maligno epitelial o padrão infiltrativo que lhe é característico. FRIXEN, U.H., BEHRENS, J., SACHS, M., (1991) afirmam que a presença de E-caderina pode ser um fator supressor de tumor ou de metástase tumoral uma vez que, em seu estudo, constatou-se que linhagens de células de carcinoma com fenótipo epitelíóide (expressando E-caderina) tem comportamento não-invasivo, já as linhagens com fenótipo fibroblástico (perda de E-caderina) apresentam comportamento invasivo característico de tumores malignos.

No entanto, MOHAMED, F., ALTINI, M., MEER, S., (2007), afirmam que E-caderina e β -catenina não servem como marcadores prognósticos para metástase tumoral, mas estão relacionadas com o aumento da progressão do

tumor bem como com a redução da diferenciação tumoral. Outro estudo garante ter comprovado, *in vitro*, o envolvimento de E-caderina e β -catenina na regulação e crescimento do fenótipo displásico e maligno de células epiteliais (KYRODIMOU, M., 2013).

Já POPESCU, C.I. et al, 2013 discute o valor de E-caderina devido sua significância biológica na qual afirma haver potencial em E-caderina para gerar diferenciação suplementar em alguns subtipos moleculares, alterando estrutura e comportamento de algumas moléculas relacionadas à ela, entre elas a Vinculina.

Estudos recentes sugerem que há alteração na expressão e atividade de proteínas de adesão em tumores malignos. Diversos tipos de integrinas apresentam variação de expressão em cânceres metastáticos além de estarem envolvidos com a degradação de membrana basal através da interação com enzimas proteolíticas. FRIEDL, P., GILMOUR, D., 2009, afirmam que alterações na atividade da integrina $\beta 1$ em culturas de melanoma primário, causam o destacamento celular individual e consequente migração amebóide, o que ajudaria a explicar o alto índice metastático de melanomas. FONSECA, F.L., 2011, após submeter linhagens de células de tumores de pulmão a tratamento com EGF (fator de crescimento epidérmico), relatam que adenocarcinomas não metastáticos apresentam de-fosforilação de FAK, enquanto que carcinomas metastáticos apresentam aumento de FAK e diminuição da expressão de Paxilina, Vinculina e Talina. LAI, M.T., 2011 demonstraram que, em lesões de carcinoma oral de células escamosas, existe uma correlação entre a agressividade/metástase do tumor e a concentração da isoforma1 de talina (TLN-1). MACKINNON, A.C., 2011mostraram que em

tumores malignos de pulmão ocorre um aumento da expressão de paxilina e, em torno de 9% dos casos, ocorrem mutações na sua estrutura. Um possível mecanismo de alteração do comportamento metastático via adesões seria a ativação do complexo dual de quinases FAK-Src, visto que esse complexo está diretamente envolvido com a mobilidade celular e é encontrado em altos níveis de cânceres mamários com metástases. FAK tem sido descrita como indutora de atividade de metaloproteinases, tais como MMP-2 e MMP-9, propiciando a ativação de tumores invasivos. (MIERKE, C.T., 2010; MITRA, S.K., SCHLAEPFER, D.D., 2006; MON, N.N., 2006; RATHINAM, R., ALAHARI, S.K., 2010).

A relação das proteínas de adesão com o desenvolvimento do carcinoma de origem oral, bem como as alterações sofridas por elas em casos em que ocorram metástases, ainda é pouco entendida. Pelo fato de serem moléculas fundamentais para a migração celular, é provável que a partir da compreensão dos seus eventos reguladores (ex.: fosforilação da proteína FAK) seja possível desenvolver novas ferramentas que auxiliem na determinação do prognóstico destas lesões, especialmente daquelas pré-cancerizáveis. Adicionalmente, o controle da adesão celular é um candidato em potencial para a realização de terapias celulares para o desenvolvimento de metodologias alternativas para prevenção de metástases tumorais.

2. OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

O objetivo deste trabalho foi descrever o padrão de expressão e de regulação da atividade de proteínas de adesão em amostras de tumores de carcinoma espinocelular.

2.2 Objetivos Específicos

- determinar o padrão de expressão de proteínas de adesão em adesões célula-célula.
- determinar o padrão de expressão de proteínas de adesão em adesões célula-matriz.
- determinar o padrão de expressão de proteínas de adesão ligadas a filamentos do citoesqueleto de Actina.
- determinar o padrão de expressão de distribuição dos filamentos do citoesqueleto de Actina.

3.MATERIAIS E MÉTODOS

3.1 Considerações Éticas

Neste estudo seguiram-se as regras da resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP) para a realização de pesquisa envolvendo seres humanos.

O protocolo de pesquisa foi encaminhado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS e pelo Comitê de Ética em Saúde do Hospital de Clínicas de Porto Alegre e aprovado sob o número 214549 (Anexo 1)

3.2 Amostras

O estudo apresentou um delineamento observacional e analítico. A amostra foi de conveniência. Foram coletadas amostras de 04 (quatro) pacientes com diagnóstico de carcinoma espinocelular de origem bucal que procuraram o Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Os pacientes foram consultados após avaliação com a equipe da Cirurgia de Cabeça e Pescoço do HCPA e recebimento do diagnóstico de carcinoma. Neste primeiro contato, foram dados esclarecimentos e respondidas possíveis dúvidas sobre o estudo para o paciente e acompanhante. Quando o paciente demonstrou vontade de participar da pesquisa, assinou um termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Anexo 2) e um Termo de Confidencialidade (Anexo 3) e respondeu a uma entrevista com informações pertinentes a pesquisa (Anexo 4). Os dados referentes ao tumor e cirurgia foram registrados em uma ficha da pesquisa (Anexo 5). Foi criado um código para os dados

peçoais dos pacientes os quais ficaram em posse do pesquisador responsável e as demais informações estão disponíveis apenas às pessoas envolvidas no estudo. Foram utilizados fragmentos de tecido coletados a partir da peça cirúrgica, os quais não interferiam no diagnóstico final e avaliação das margens da lesão a fim de não gerar dano para o prognóstico e tratamento do paciente. A coleta foi realizada no Setor de Patologia junto ao bloco cirúrgico do HCPA e sob orientação da Equipe de Patologia do mesmo hospital, cujos membros não fazem parte deste grupo de pesquisa. Foram coletados dois fragmentos de tecido, quando possível, de três regiões distintas: centro do tumor, evitando área de necrose; zona de invasão (limite entre tecido tumoral e tecido sadio); zona livre de tumor (Figura 2). De acordo com a rotina do hospital, todo o restante da peça cirúrgica foi fixada, processada para inclusão em parafina, corte e confecção de lâminas histológicas para diagnóstico e avaliação das margens de segurança no setor de Patologia do HCPA. O estadiamento dos tumores foi realizado pela Equipe da CAP no transoperatório. Não houve envolvimento dos pesquisadores durante o procedimento cirúrgico e/ou diagnóstico.

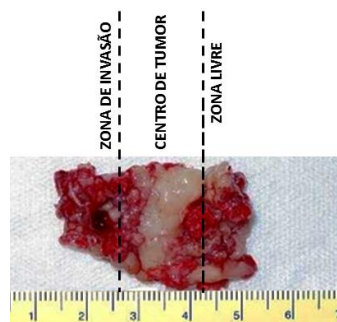


Figura 2 - Peça biopsiada de um paciente com carcinoma espinocelular oral. A amostra foi submetida à macrodissecção e então foram destinadas à análise morfológica três distintas regiões do tumor: zona livre, centro e zona de invasão.

3.3 Análise das amostras

O material para análise morfológica foi fixado em formaldeído 4% tamponado em tampão fosfato de sódio (PBS) 0,1M, pH 7,4, por um período de 12h. Após, foi realizada a crioproteção da peça com concentrações crescentes de sacarose (10, 20 e 30% em PBS) a 4°C por um período mínimo de 12h. O material foi incluído em O.C.T. (Sakura Finetechnical Co., Tokyo), congelado a -20°C e cortado em espessuras de 7 µm com o auxílio de um criostato (Jung). Os cortes foram colocados em lâminas revestidas de gelatina (Sigma Chem. Co., St Louis, EUA), armazenadas a -20°C e submetidas à técnica de imunohistoquímica ou para coloração por Hematoxilina e Eosina.

Após a rehidratação dos cortes, os sítios de ligação inespecíficos foram bloqueados por 1 hora com PBS contendo albumina 1% e o detergente Triton-X 100 (0,2%). Os anticorpos primários E-caderina, Vinculina e FAK-Tyr397 (Cell Signaling Technology, 6 mg/ml) foram diluídos em PBS contendo 0,2% de Triton X-100 e os cortes incubados overnight a 4°C. Após, os cortes foram lavados com PBS e incubados com o anticorpo secundário apropriado, associado ao fluoróforo Alexa 488 (Molecular Probes, Eugene, Oregon), diluído em PBS contendo 0,2% de Triton X-100 por 2 horas. O controle para os experimentos consistiram da omissão dos anticorpos primário. Após a lavagem, o material foi incubado com a toxina ligadora do citoesqueleto filamentososo de actina (faloidina) associada ao fluoróforo Rhodamina (Molecular Probes, Eugene, Oregon) por 2 horas a TA. Após as lavagens finais com PBS, o tecido foi montado com o uso de glicerol carbonato e lamínulas, sendo após analisada em microscópio confocal (Olympus). Foram realizados 14 cortes de 0,5 µm na região correspondente à borda de invasão. Os controles negativos dos

experimentos consistirão da omissão do anticorpo primário.

As reações imunohistoquímicas foram realizadas duas vezes para cada indivíduo, com duplicatas. Durante a análise confocal, apenas as fotos que mostraram os campos representativos foram tomadas (5-6 fotos/slide). Todas as análises morfológicas (análise qualitativa) foram realizadas por um examinador cego devidamente calibrado antes e durante os experimentos. Foi feita sistematicamente uma análise da quantidade e da distribuição espacial das proteínas estudadas (E-caderina, Vinculina e FAK Y-397) dentro das amostras teciduais, conforme repartição anatômica estipulada. As figuras foram montadas com o software Adobe Photoshop CS2 (Deneba) e processadas utilizando o software livre *ImageJ* (*National Institute of Health*, EUA)

3.4 Manipulação e descarte das Amostras

Todos os procedimentos envolvendo material biológico foram realizados com o uso de equipamentos de proteção individual (avental, máscara, luvas). Materiais tóxicos foram manipulados em capela de exaustão e encaminhados para o Centro de Gestão e Tratamento de Resíduos Químicos da UFRGS para a sua correta eliminação. Durante o transcorrer, bem como ao final dos experimentos, os materiais biológicos utilizados ou não para esta pesquisa foram descartados de maneira apropriada pela Faculdade de Odontologia da UFRGS.

4. RESULTADOS

Neste estudo, foi realizada a análise morfológica de 4 biópsias de pacientes com carcinoma espinocelular oral graus III e IV de regiões de lábio e língua para as proteínas Actina, E-caderina, Vinculina e Cinase de Adesão Focal (FAK) fosforilada no sítio y-397. Todas as figuras apresentadas estão sob a forma de imagem em pequeno aumento (coluna da esquerda) com região ampliada digitalmente, para identificação da sublocalização celular.

4.1 Marcação de Actina

4.1.1 Zona Livre (Actina)

Na figura XA, observa-se a distribuição de Actina em todas as células epiteliais. Na sublocalização (Figura 3B), observa-se uma predominância de marcação na região de córtex celular, principalmente na região de contato célula-célula.

4.1.2 Centro do Tumor (Actina)

Na Figura 3E, Actina filamentosa foi observada em todas as células da ilha tumoral, apresentando uma marcação citoplasmática difusa (Figura 3F). Observa-se uma diminuição da intensidade de marcação no contato célula-célula.

4.1.3 Zona de Invasão (Actina)

Na figura 3I, Actina foi observada com menor intensidade nas células tumorais, embora a sublocalização (Figura 3J) tenha apresentado uma tendência de formação de fibras de estresse, sugerindo uma maior atividade contrátil.

4.2. Marcação de E-caderina

4.2.1. Zona Livre (E-caderina)

A proteína E-caderina apresentou uma forte marcação no contato célula-célula (Figura 3C), principalmente nas células da camada basal e do estrato intermediário e uma sutil marcação na região da membrana basal. Observa-se uma forte co-localização desta proteína com os filamentos de Actina (Figura 3D, representada em branco).

4.2.2. Centro do Tumor (E-caderina)

A proteína E-caderina apresentou uma forte diminuição na marcação nas ilhas tumorais, deixando de se localizar no contato célula-célula e apresentando marcação citoplasmática (Figura 3G), praticamente sem co-localização com o citoesqueleto de Actina (Figura 3H), o que sugere um perfil de degradação desta proteína.

4.2.3. Zona de Invasão (E-caderina)

As células isoladas da região de invasão do tumor praticamente não apresentam marcação para E-caderina (figura 3K e 3L).

4.3 Marcação de Vinculina

4.3.1. Zona Livre (Vinculina)

As células do tecido epitelial peritumoral, apresentaram uma leve marcação para a proteína Vinculina no contato célula-célula (Figura 4C), a qual foi observada em maior intensidade na região da membrana basal, a qual apresentou colocalização com o citoesqueleto de Actina (Figura 4D).

4.3.2. Centro do Tumor (Vinculina)

As células da região central do tumor apresentaram uma diminuição da marcação para Vinculina (Figura 4G), a qual não praticamente não apresentou colocalização com o citoesqueleto de Actina (Figura 4H).

4.3.3. Zona de Invasão (Vinculina)

Algumas células da zona de invasão apresentaram leve marcação para Vinculina, a qual estava difusa na região do córtex celular (Figura 4K), porém sem co-localização com o citoesqueleto de Actina (Figura 4L).

4.4 Marcação de FAK - γ 397

4.4.1. Zona Livre (FAK - γ 397)

A marcação para a forma fosforilada de FAK no epitélio adjacente ao tumor apresentou-se difusa pelo citoplasma, com intensidade de marcação moderada, presente principalmente no estrato intermediário (Figura 5C), com leve co-localização com o citoesqueleto de Actina (Figura 5D).

4.4.2 Centro do Tumor (FAK - γ 397)

Observa-se nas ilhas tumorais um aumento da marcação para a forma fosforilada de FAK, a qual manteve-se difusa pelo citoplasma (Figura 5G), com um aumento da co-localização com Actina (Figura 5H).

4.4.3. Zona de Invasão (FAK - γ 397)

Nas células isoladas do tumor, observa-se uma diminuição na marcação de FAK- γ 397 (Figura 5K), com diminuição da co-localização com o citoesqueleto de Actina (Figura 5L).

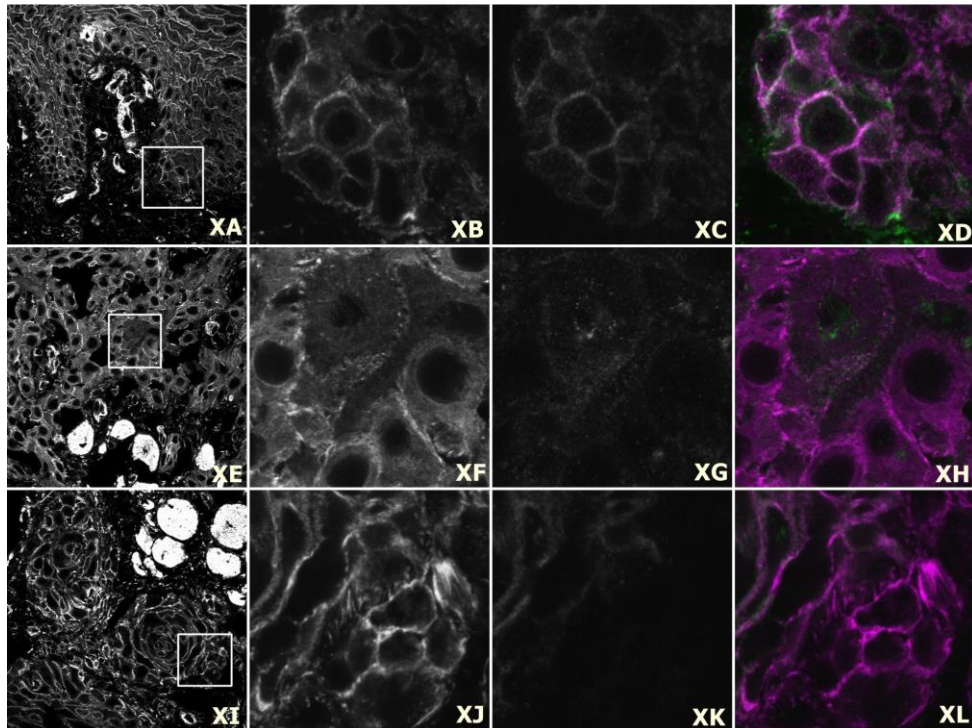


Figura 3 – Análise da distribuição da proteína E-caderina. Biópsias da zona livre (primeira linha), centro (segunda linha) e zona de invasão (terceira linha) de carcinomas espinocelulares orais, foram submetidas à reação de histoquímica para Actina (A, B, E, F, I, J) e imunohistoquímica para E-caderina (C, G, K), sendo analisadas quanto à sua co-localização (D, H, L). A primeira coluna refere-se ao menor aumento (zoom óptico) e as demais colunas representam aumento digital (zoom digital).

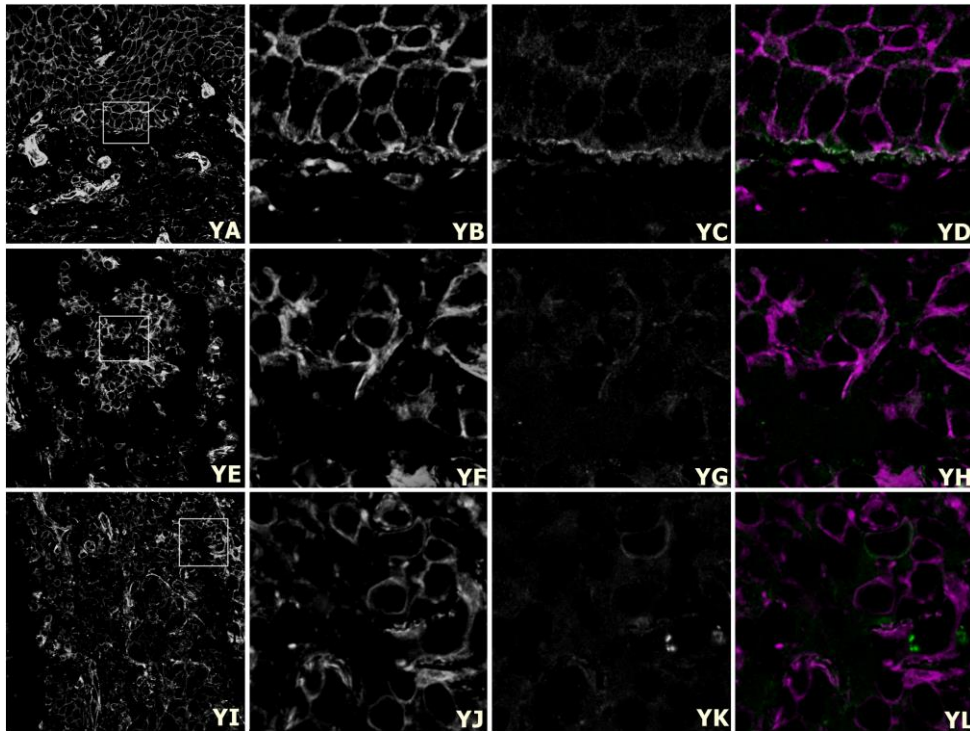


Figura 4 – Análise da distribuição da proteína Vinculina. Biópsias da zona livre (primeira linha), centro (segunda linha) e zona de invasão (terceira linha) de carcinomas espinocelulares orais, foram submetidas à reação de histoquímica para Actina (A, B, E, F, I, J) e imunoistoquímica para Vinculina (C, G, K), sendo analisadas quanto à sua co-localização (D, H, L). A primeira coluna refere-se ao menor aumento (zoom óptico) e as demais colunas representam aumento digital (zoom digital).

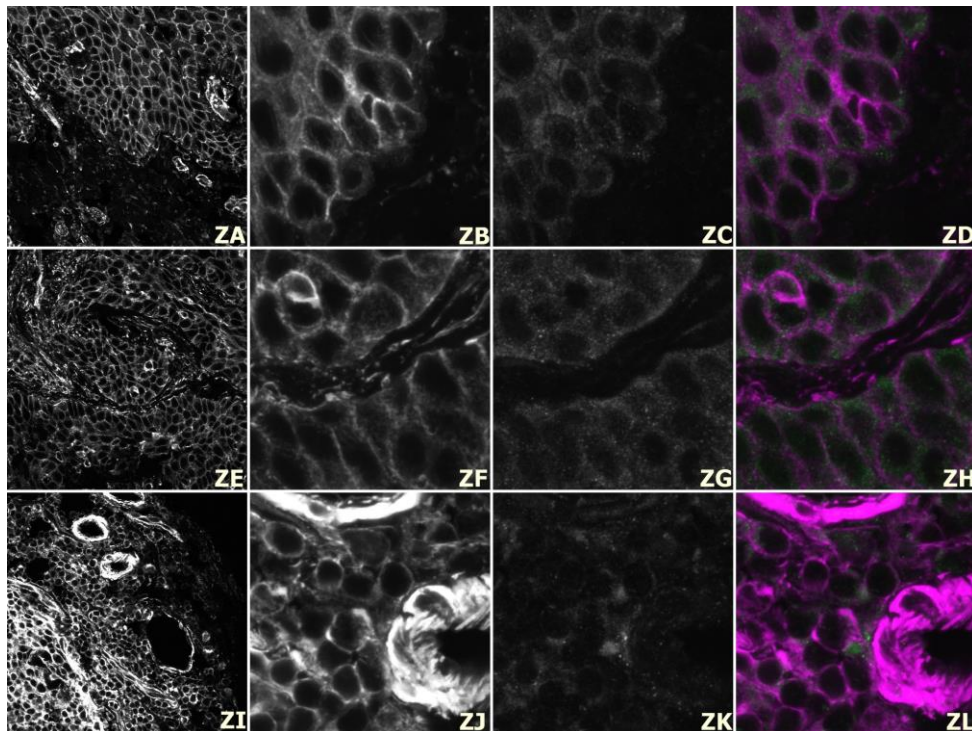


Figura 5 – Análise da distribuição da proteína FAK - γ 397. Biópsias da zona livre (primeira linha), centro (segunda linha) e zona de invasão (terceira linha) de carcinomas espinocelulares orais, foram submetidas à reação de histoquímica para Actina (A, B, E, F, I, J) e imunoistoquímica para FAK - γ 397 (C, G, K), sendo analisadas quanto à sua co-localização (D, H, L). A primeira coluna refere-se ao menor aumento (zoom óptico) e as demais colunas representam aumento digital (zoom digital).

5. DISCUSSÃO

Os tumores podem apresentar aspectos comportamentais distintos de acordo com a evolução da doença. Vários processos biológicos estão envolvidos no desenvolvimento do carcinoma espinocelular (CEC), os quais levam à proliferação e migração das células neoplásicas, invasão de tecidos vizinhos e vasos sanguíneos e linfáticos, e, conseqüentemente, metástases regionais e à distância (TSANTOULIS, P.K. et al, 2007). Pacientes com CEC em cabeça e pescoço, após receber o tratamento padrão, apresentam uma elevada taxa de recorrência do tumor. Esta taxa de recorrência é proporcional ao estágio de agressão da doença, sendo 30% para grau II, 50% para grau III e mais de 70% para grau IV (MEYER, J. et al, 2010). Adicionalmente, estes pacientes apresentam um elevado desenvolvimento de metástases locais e distantes à origem do tumor, sendo este um indicativo do fenótipo migratório que as células tumorais adquirem. Terapias para o câncer, como o uso de vacinas, muitas vezes não apresentam o resultado esperado devido a alterações no microambiente tumoral (GAJEWSKI, T.F., et al, 2013). O progresso no desenvolvimento de tratamentos efetivos e de estratégias preventivas para o CEC tem apresentado avanços modestos principalmente devido ao limitado conhecimento sobre os mecanismos celulares envolvidos no desenvolvimento, progressão e metástase da doença.

A invasão tecidual e o desenvolvimento de potencial metastático de tumores malignos é a maior causa de insucessos clínicos em termos de terapia e prognóstico. As invasões celulares, que podem ser coletivas ou individuais, são caracterizadas por alterações moleculares importantes, tais como

modificação da adesão entre as células e da adesão à matriz extracelular, facilitando o processo de invasão (PAINTER, K.J., ARMSTRONG, N.J., SHERRATT, J.A., 2010; FRIEDL, P., 2004). É provável que muitos dos mecanismos que dirigem a migração e a manutenção de células normais estejam alterados tanto em relação à expressão, quanto à regulação da ação destas proteínas durante a metástase de células tumorais. Portanto, o entendimento sobre o grau de expressão e de regulação de moléculas protagonistas da migração, contribui para o surgimento de novos candidatos a biomarcadores tumorais, bem como alvos potenciais de novas terapias co-adjuvantes à remoção cirúrgica do tumor.

Entre as diferentes proteínas envolvidas no controle da migração, destacam-se as proteínas de adesão celular. A formação da adesão começa a partir da ligação de receptores de membrana (integrinas e/ou caderinas) a proteínas do meio extracelular, com consequente recrutamento de complexos protéicos no meio intracelular, o qual é extremamente dinâmico. Este recrutamento ocorre de maneira hierárquica e temporalmente definida, podendo envolver mais de cem diferentes proteínas, as quais variam entre proteínas adaptadoras, ligadoras do citoesqueleto de Actina (por exemplo, Vinculina) ou proteínas sinalizadoras, como a cinase de adesão focal (FAK). De acordo com o tipo de adesão e sua intensidade, ocorrem repercussões na organização do citoesqueleto e na contratilidade celular (DESTAING et al, 2011; HARBURGER, D.S., CALDERWOOD, D.D., 2009; HUTTENLOCHER, A., HORWITZ, A.R., 2011; WEHRLE-HALLER, B., 2012).

No presente estudo, foram analisadas a organização do citoesqueleto de Actina e a distribuição das proteínas adesão E-caderina, Vinculina e cinase de adesão focal (FAK). Estas proteínas apresentaram perfil de distribuição e de expressão diferentes quando comparada a zona livre de tumor com as zonas centrais e de borda de invasão. As principais alterações foram relacionadas a uma organização diferenciada de Actina, com o aumento da presença de fibras de estresse nas células tumorais, uma diminuição da expressão de E-caderina e de Vinculina, e um aumento da expressão da forma fosforilada de FAK y397.

A organização do citoesqueleto de Actina pode refletir o estado migratório da célula (LE CLAINCHE, C., CARLIER, M.F., 2008). A organização de Actina sob a forma de rede está associada a uma maior formação de projeções de membrana, enquanto que a forma de linhas alongadas (fibras de estresse) indica uma maior tensão mecânica (VALLENIUS, T., 2013). Neste estudo, demonstramos que as células tumorais apresentam um aumento na presença de fibras de estresse, sugerindo um aumento da atividade contrátil (KATOH, K., KANO, Y., NODA, Y., 2011; PELLEGRIN, S., MELLOR, H., 2007). Estas alterações podem estar associadas à alteração da adesão pelas células tumorais, bem como a presença de barreiras mecânicas no microambiente tumoral que desafiam a passagem das células e induzem uma maior contração celular.

A proteína E-caderina é expressa em células epiteliais e participa da união célula-célula, fazendo a sua ligação ao citoesqueleto de Actina através da proteína β -catenina e outras proteínas ligadoras de Actina (GUILLOT, C.,

LECUIT, T., 2013). A diminuição da expressão de E-caderina em carcinomas já foi bastante explorada na literatura e está relacionada a uma maior dissociação das células tumorais, favorecendo a transição de uma migração coletiva para individual (LYONS, A.J., JONES, J., 2007; NOGUTI, J. et al, 2012; WHEELLOCK, M.J. et al, 2008; VERED, M. et al, 2012). A diminuição da expressão de E-caderina também ocasiona alterações na expressão gênica, através da liberação da molécula β -catenina, que passa a atuar como fator de transcrição gênica diretamente no núcleo (DE FREITAS SILVA, B.S. et al, 2013; DIAMOND, M.E. et al, 2008; KYRODIMOU, M., 2013; MAHOMED, F., ALTINI, M., MEER, S., 2007), levando a um processo de transição epitélio-mesênquima. Neste trabalho demonstramos que, embora agregados de células tumorais ainda apresentem uma marcação no contato célula-célula, ocorre a diminuição da expressão de E-caderina na periferia celular, com fraca marcação citoplasmática, com consequente perda de co-localização com o citoesqueleto de Actina.

A Vinculina é uma proteína ligadora ao citoesqueleto de Actina, sendo que pode ser recrutada tanto por adesões mediadas por E-caderina (célula-célula) quanto em adesões mediadas por integrinas (célula-matriz) (GOMEZ, G.A., McLACHLAN, R.W., YAP, A.S., 2011; PENG, X. et al, 2011). *In vitro*, já foi relatado que seu recrutamento às adesões célula-célula pode estar vinculada a alterações mecanosensoras onde, quanto maior for a tensão exercida sobre o contato, maior será o seu recrutamento para a adesão (HUVENEERS, S. et al, 2012). Neste estudo mostramos que a célula tumoral, principalmente na zona de invasão, apresenta uma diminuição da expressão

de Vinculina, a qual está relacionada a um deslocamento da sua marcação do contato célula-célula para uma marcação citoplasmática. Estes dados sugerem que a perda da expressão de E-caderina nas células tumorais leva um deslocamento de Vinculina e o seu aproveitamento em adesões mediadas por integrinas. Até o momento, este é o primeiro relato de alterações na expressão e na sublocalização desta proteína em biópsias de CECs.

A proteína FAK é encontrada em adesões focais e está envolvida não apenas com a ligação ao citoesqueleto de Actina, mas também na regulação de vias de sinalização celular, através da fosforilação de sítios específicos como a tirosina 397 (FAK-y397) (PARSONS, J.T., HORWITZ, A.R., SCHWARTZ, M.A., 2010; TILGHMAN, R.W., PARSONS, J.T., 2008). Já foi relatado que em CECs, o aumento de FAK está correlacionado à diminuição de P53 (ROSADO, P. et al, 2012) e ao aumento de marcadores de proliferação celular (XIA, J. et al, 2009), podendo o aumento de FAK ser considerada como um fator de predisposição para lesões potencialmente malignas (DE VICENTE, J.C. et al, 2012). Em nosso estudo, demonstramos que este aumento de expressão está associado a uma maior fosforilação desta proteína, sugerindo que a adesão celular pode influenciar o comportamento da célula tumoral. Adicionalmente, o aumento dos níveis de FAK-y397 correlaciona com um perfil mais contrátil da célula e a presença de fibras de estresse (MIN, J. et al, 2012; SAMUEL, M.S. et al, 2011), conforme observado neste estudo.

Estes resultados, em concordância com FRIEDL, P., ALEXANDER, S., 2011, sugerem que, de acordo com o microambiente em que se encontra, a

célula tumoral é capaz de modular o seu maquinário protéico relacionado à migração celular, o que geraria um perfil migratório mais adequado às barreiras que o tecido peritumoral impõe à célula tumoral. Esta plasticidade morfológica contribui para a criação de diversas rotas e programas de invasão tumoral, aumentando a heterogeneidade do tumor e sustentando a disseminação metastática.

A dinâmica de proteínas de adesão celular pode ser regulada por fatores extracelulares, como a organização da matriz extracelular (MEC) do microambiente tumoral que leva à ativação diferenciada de integrinas. A MEC é formada por um complexo de proteínas e glicoproteínas que são secretados e formam uma rede organizada que envolve as células, porém essa composição pode variar de tecido para tecido (BANERJEE, A.G. et al, 2003). Além de propiciar a sustentação dos tecidos, a MEC desempenha um papel essencial no desenvolvimento de processos biológicos de reparo tecidual e metástase através da regulação da proliferação, diferenciação, adesão, migração e expressão gênica celular (MORRISON, C.J. et al, 2009; RODRIGUEZ, D.; MORRISON, C.J., OVERALL, C.M., 2009; WESTERMARCK, J.; KAHARI, V.M., FASEB, J., 1999; WOLF, K., FRIEDL, P., 2011). Quando observadas em matriz tridimensional, as células tumorais utilizam diferentes modos de migração em que se incluem a: 1- migração mesenquimal integrina-dependente, relacionada à adesão celular à matriz remodelada por metaloproteases (MMPs) e; 2- migração ameboide baseada na contração de células mais arredondadas com fracas adesões (POINCLOUXA, R. et al, 2011). Adicionalmente, sabe-se que nos tumores ocorrem alterações nos níveis de expressão de MMPs, os quais

resultam em modificações na topografia da matriz, com consequente ação sobre o tipo de adesão entre as células tumorais e a MEC.

Além da topografia da MEC, o perfil inflamatório local também pode influenciar a distribuição de proteínas de adesão. Células tumorais de adenocarcinoma de pulmão, após serem estimulados por interleucina1 β (IL-1 β) e fator de crescimento transformador β 3 (TGF- β 3) reduziram significativamente a expressão de E-caderina e aumentaram a capacidade de migração e invasão em diferentes matrizes (PETRELLA, B.L.; ARMSTRONG, D.A., VINCENTI, M.P., 2012). IL-6 também é capaz de induzir EMT em linhagens tumorais da região de cabeça e pescoço, também levando ao aumento da expressão de vimentina e diminuição da expressão de E-caderina (YADAV, A., et al, 2011). Em outro estudo *in vitro* realizado por (LIN, C.Y., 2006), foi demonstrado que MECs produzidas a partir de macrófagos estimulados com acetato de forbolmiristol (PMA) ou lipopolissacarídeos (LPS) foram capazes de alterar a morfologia de células tumorais de hepatocarcinoma, passando de um formato epitelíóide para um arranjo mesenquimal. Também foi observado que essas células cultivadas nesses meios condicionados tiveram um aumento significativo na sua capacidade de migração e invasão e uma diminuição na expressão de E-caderina e β -catenina, proteínas associadas à adesão celular (LIN, C.Y. et al, 2006).

Outra possibilidade para a expressão diferenciada de E-caderina, Vinculina e FAK, pode ser a modificação na sinalização intracelular desencadeada por proteínas regulatórias como, por exemplo, as GTPases

RhO. Cada etapa da migração celular é regulada por GTPases de baixo peso molecular pertencentes à família Rho (de Ras-homology), que desempenham um papel fundamental nesse processo. Estas proteínas ciclam entre um estado inativo (ligadas a GDP) e um estado ativo (ligadas a GTP). Quando ativadas, exercem seus efeitos por meio de uma vasta quantidade de proteínas efetoras. Entre as GTPases mais expressas encontra-se a proteína Rac1, que está principalmente envolvida na formação de lamelipódios e complexos focais (adesões imaturas), enquanto RhoA está envolvida principalmente na maturação de adesões através do aumento da contratilidade celular (RIDLEY, A.J. et al, 1992; RIDLEY A.J., HALL, A., 1992). O balanço recíproco entre estas duas GTPases determinaria a morfologia celular e o comportamento migratório (CRAMER, L.P., 2010; HERBRAND, U., AHMADIAN, M.R., 2006). A presença de uma maior quantidade de fibras de estresse e o aumento da fosforilação de FAK, sugerem que as células tumorais apresentam um aumento na atividade de RhoA.

A ativação das RhoGTPases, principalmente RhoA e Rac1, estão associados a uma maior capacidade de invasão e migração de diferentes tumores, e a expressão elevada dessas proteínas tem sido associada a um pior prognóstico dos pacientes (GEST, C. et al, 2013; ZHU, Y. et al, 2013). Em linhagens de tumor maligno de mama, após a ativação da via de sinalização Wnt por Wnt5a, aumentou a expressão de RhoA e Rac1, levando a uma maior capacidade de migração dessas linhagens celulares (ZHU, Y. et al, 2013). Estudos utilizando linhagens de tumores de cabeça e pescoço também tem demonstrado que a ativação de RhoA e Rac1 levam ao aumento da

capacidade invasiva e migratória desse tipo de tumor, e tumores que apresentam expressão aumentada dessas duas proteínas estão associadas a aumento de metástases e pior prognóstico (CHANG, K.W. et al, 2013; LAI, S.Y., 2008; LIU, S.Y. et al, 2004; PATEL, V. et al, 2007).

6. CONCLUSÕES

A análise das amostras de lesões de carcinoma espinocelular oral de pacientes demonstrou que, de acordo com a região, ocorrem modificações nas adesões célula-célula, adesão célula-matriz e organização do citoesqueleto.

Foram observadas as seguintes alterações:

- as células tumorais apresentam uma reorganização do citoesqueleto de Actina, com o aumento da presença de fibras de estresse;

- no centro do tumor e na zona de invasão ocorre uma diminuição da expressão de E-caderina no contato célula-célula e perda de co-localização com Actina

- a proteína Vinculina apresenta expressão diminuída no centro do tumor e na zona de invasão

- observa-se um aumento da fosforilação da proteína FAK no resíduo y397 nas zonas de invasão e no centro do tumor

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

BANERJEE, A.G. et al. *Aberrant expression and localization of decorin in human oral dysplasia and squamous cell carcinoma*. *Cancer Res.* 2003 Nov 15; 63(22): 7769-76.

BRASIL. Ministério da Saúde. INCA: Instituto Nacional do Câncer. Site: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/cancer>. Acessado em jul/2011.

BRYNE, M. et al. *Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value*. *J Pathol.* 1992; (166): 375-81.

CHANG, K.W. *Passenger strand miRNA miR-31* regulates the phenotypes of oral cancer cells by targeting RhoA*. *Oral Oncol.* 2013 Jan; 49(1): 27-33.

CHOI C.K. et al. *Actin and alpha-actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner*. *Nat Cell Biol.* 2008; (10): 1039-50.

CRAMER, L.P. *Forming the cell rear first: breaking cell symmetry to trigger directed cell migration*. *Nat Cell Biol.* 2010 Jul; 12(7): 628-32.

DE FREITAS SILVA B.S. et al. *E-cadherin downregulation and Twist overexpression since early stages of oral carcinogenesis*. *J Oral Pathol Med.* 2013 Jun; (15).

DESTAING O. et al. *Invadosome regulation by adhesion signaling*. *Curr Opin Cell Biol.* 2011 Oct; 23(5): 597-606.

DE VICENTE, J.C. et al. *Cortactin and focal adhesion kinase as predictors of cancer risk in patients with premalignant oral epithelial lesions*. *Oral Oncol.* 2012 Jul; 48(7): 641-6.

DIAMOND, M.E. et al. *Differential growth factor regulation of N-cadherin expression and motility in normal and malignant oral epithelium*. *J Cell Sci.* 2008 Jul; 121(13): 2197-207.

FEDOR-CHAIKEN, M. et al. *E-cadherin binding modulates EGF receptor activation*. *Cell Commun Adhes.* 2003 Out; 10(2): 105-118.

FRIEDL, P.; GILMOUR, D. *Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer*. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2009 Jul; 10(7): 445-57.

FONSECA, F.L. et al. *Adhesion Molecules Affected by Treatment of Lung Cancer Cells with Epidermal Growth Factor*. *Lung.* 2011 Jun; (9).

FRIEDL, P. *Prespecification and plasticity: shifting mechanisms of cell migration*. *Curr Opin Cell Biol.* 2004 Feb; 16(1): 14-23.

FRIEDL, P.; ALEXANDER, S. *Cancer Invasion and the Microenvironment: Plasticity and Reciprocity*. Cell. 2011; (23): 992-1009.

FRIXEN, U.H.; BEHRENS, J.; SACHS, M. *E-cadherin-mediated cell-cell adhesion prevents invasiveness of human carcinoma cells*. J Cell Biol. 1991; (113): 173–185.

GALBRAITH, C.G.; YAMADA, K.M.; SHEETZ, M.P. *The relationship between force and focal complex development*. J Cell Biol. 2002 Nov; 159(4): 695-705.

GARDEL, M.L. et al. *Mechanical integration of actin and adhesion dynamics in cell migration*. Annu Rev Cell Dev Biol. 2010 Nov; 10(26): 315-33.

GEIGER, B. *Vinculin an intracellular protein localized at specialized sites where microfilament bundles terminate at cell membranes*. Proc Natl Acad Sci. 1980 Us; (77): 4127–4131.

GAJEWSKI, T.F. et al. *Cancer immunotherapy strategies based on overcoming barriers within the tumor microenvironment*. Curr Opin Immunol. 2013 Apr; 25(2): 268-76.

GEST, C. et al. *Rac3 induces a molecular pathway triggering breast cancer cell aggressiveness: differences in MDA-MB-231 and MCF-7 breast cancer cell lines*. BMC Cancer. 2013; (13): 63.

GOMEZ, G.A.; McLACHLAN, R.W.; YAP, A.S. *Productive tension: force-sensing and homeostasis of cell-cell junctions*. Trends Cell Biol. 2011 Sep; 21(9): 499-505.

GUILLOT, C.; LECUIT, T. *Mechanics of epithelial tissue homeostasis and morphogenesis*. Science. 2013 Jun; 340(6137): 1185-9.

HARBURGER, D.S.; CALDERWOOD, D.A. *Integrin signalling at a glance*. J Cell Sci. 2009 Jan; 122(2): 159-63. Review. Erratum in: J Cell Sci. 2009 May 122(9):1472.

HERBRAND, U.; AHMADIAN, M.R. *p190-RhoGAP as an integral component of the Tiam1/Rac1-induced downregulation of Rho*. Biol Chem. 2006 Mar; 387(3): 311-7.

HUTTENLOCHER, A., HORWITZ, A.R. *Integrins in cell migration*. Cold Spring Harb Perspect Biol. 2011 Sep; 3(9): 50-74.

HUVENEERS, S. et al. *Vinculin associates with endothelial VE-cadherin junctions to control force-dependent remodeling*. J Cell Biol. 2012 Mar; 196(5): 641-52.

KATOH, K.; KANO, Y.; NODA, Y. *Rho-associated kinase-dependent contraction of stress fibres and the organization of focal adhesions*. J R Soc Interface. 2011 Mar; 8(56): 305-11.

KLINGHOFER, R.A. et al. *Src family kinases are required for integrin but not PDGFR signal transduction*. EMBO J. 1999; (18): 2459-2471.

KYRODIMOU, M. et al. *Desmoglein-3/ γ -catenin and E-cadherin/ β -catenin differential expression in oral leukoplakia and squamous cell carcinoma*. Clin Oral Investig. 2013 Feb; (22).

LADOUX, B. et al. *Strength dependence of cadherin-mediated adhesions*. Biophys J. 2010; (98):534–542.

LAI, M.T. et al. *Talin-1 overexpression defines high risk for aggressive oral squamous cell carcinoma and promotes cancer metastasis*. J Pathol. 2011 Jul; 224(3): 367-76.

LAI, S.Y. et al. *Activated Vav2 modulates cellular invasion through Rac1 and Cdc42 in oral squamous cell carcinoma*. Oral Oncol. 2008 Jul; 44(7): 683-8.

LAUFFENBURGER, D.A.; HORWITZ, A.F. *Cell migration: a physically integrated molecular process*. Cell. 1996 Feb; 84(3): 359-69..

LE CLAINCHE, C.; CARLIER, M.F. *Regulation of actin assembly associated with protrusion and adhesion in cell migration*. Physiol Rev. 2008 Apr; 88(2): 489-513.

LEERBERG, J.M.; YAP, A.S. *Vinculin, cadherin mechanotransduction and homeostasis of cell-cell junctions*. Protoplasma. 2012 Dec; (29).

LEWIS, J.E. et al. *Ecadherin mediates adherens junction organization through protein kinase*. J Cell Sci. 1995; (108): 3615–3621.

LIN C.Y. et al. *Macrophage activation increases the invasive properties of hepatoma cells by destabilization of the adherens junction*. FEBS Lett. 2006 May; 580(13): 3042-50.

LIU, S.Y. et al. *Overexpression of Rac-1 small GTPase binding protein in oral squamous cell carcinoma*. J Oral Maxillofac Surg. 2004 Jun; 62(6): 702-7.

LUO, B.H.; SPRINGE, T.A. *Integrins structures and conformational Signaling*. Curr Opin Cell Biol. 2006; (18): 579-586.

LYONS, A.J.; JONES, J. *Cell adhesion molecules, the extracellular matrix and oral squamous carcinoma*. Int J Oral Maxillofac Surg. 2007 Aug; 36(8): 671-9. Epub 2007 Jul; 23.

MACKINONN, A.C. et al. *Paxillin expression and amplification in early lung lesions of high-risk patients, lung adenocarcinoma and metastatic disease*. J

ClinPathol. 2011 Jan; 64(1): 16-24.

MAGIE, C.R.; MARTINDALE, M.Q. *Cell-cell adhesion in the cnidaria: insights into the evolution of tissue morphogenesis*. Biol Bull. 2008 Jun; 214(3): 218-32.

MAHOMED, F.; ALTINI, M.; MEER, S. *Altered E-cadherin/beta-catenin expression in oral squamous carcinoma with and without nodal metastasis*. Oral Dis. 2007 Jul; 13(4): 386-92.

MEYERS, J. (ed.). *Oral Cancer Metastasis*. USA: Springer, 2010. 364 p.

MIERKE, C.T. *The role of vinculin in the regulation of the mechanical properties of cells*. Cell BiochemBiophys. 2009; 53(3): 115-26.

MIERKE, C.T. et al. *Vinculin facilitates cell invasion into three-dimensional collagen matrices*. J Biol Chem. 2010 Apr; 285(17): 21-30.

MIN, J. et al. *Src modulates contractile vascular smooth muscle function via regulation of focal adhesions*. J Cell Physiol. 2012 Nov; 227(11): 3585-92.

MITRA, S.K.; SCHLAEPFER, D.D. *Integrin-regulated FAK-Src signaling in normal and cancer cells*. Curr Opin Cell Biol. 2006 Oct; 18(5): 516-23.

MON, N.N. et al. *FAK signaling in neoplastic disorders: a linkage between inflammation and cancer*. Ann N Y Acad Sci. 2006 Nov; 10(86): 199-212.

MORRISON, C.J. et al. *Matrix metalloproteinase proteomics: substrates, targets, and therapy*. Curr Opin Cell Biol. 2009 Oct; 21(5): 645-53.

NAYA, A.I.; WEBB, D.J.; HORWITZ, A.F. *Talin: an emerging focal point of adhesion dynamics*. Curr Opin Cell Biol. 2004; (16): 94-98.

NELSON, W.J. *Regulation of cell-cell adhesion by the cadherin-catenin complex*. BiochemSoc Trans. 2008; 36(2): 149-155.

NOGUTI, J. et al. *Metastasis from oral cancer: an overview*. Can Gen Prot. 2012 Sep-Oct; 9(5): 329-35.

PAINTER, K.J.; ARMSTRONG, N.J.; SHERRATT, J.A. *The impact of adhesion on cellular invasion processes in cancer and development*. J Theor Biol. 2010 Jun; 264(3): 1057-67.

PARSONS, J.T. *Focal adhesion kinase: the first ten years*. J Cell Sci. 2003 Apr; 116(8): 1409-16.

PARSONS, J.T.; HORWITZ, A.R. SCHWARTZ, M.A. *Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension*. Nat Rev Mol Cell Biol. 2010 Sep; 11(9): 633-43.

PATEL, V. et al. *Persistent activation of Rac1 in squamous carcinomas of the head and neck: evidence for an EGFR/Vav2 signaling axis involved in cell*

- invasion*. Carcinogenesis. 2007 Jun; 28(6): 1145-52.
- PELLEGRIN, S.; MELLOR, H. *Actin stress fibres*. J Cell Sci. 2007 Oct; 120(20): 3491-9.
- PENG, X. et al. *New insights into vinculin function and regulation*. Int Rev Cell Mol Biol. 2011; (287): 191-231.
- PETRELLA, B.L.; ARMSTRONG, D.A.; VINCENTI, M.P. *Interleukin-1 beta and transforming growth factor-beta 3 cooperate to activate matrix metalloproteinase expression and invasiveness in A549 lung adenocarcinoma cells*. Cancer Lett. 2012; Dec; 325(2): 220-6.
- POINCLOUXA, R. et al. *Contractility of the cell rear drives invasion of breast tumor cells in 3D Matrigel*. PNAS. 2011; (108) : 1943–1948.
- POPESCU, C. I. et al. *E-cadherin expression in molecular types of breast carcinoma*. Rom J MorpholEmbryol. 2013 54(2): 267-73.
- RATHINAM, R.; ALAHARI, S.K. *Important role of integrins in the cancer biology*. Can Meta Rev. 2010 Mar; 29(1): 223-37.
- RIDLEY, A.J.; HALL, A. *The small GTP-binding protein rho regulates the assembly of focal adhesions and actin stress fibers in response to growth factors*. Cell. 1992 Aug; 70(3): 389-99.
- RIDLEY, A.J. et al. *The small GTP-binding protein rac regulates growth factor-induced membrane ruffling*. Cell. 1992 Aug; 70(3): 401-10.
- RIES, L.A.G. et al. *SEER Cancer Statistics Review, 1975-2000*. National Cancer Institute. Bethesda, MD, http://seer.cancer.gov/csr/1975_2000/, 2003
- RODRÍGUEZ, D.; MORRISON, C.J.; OVERALL, C.M. *Matrix metalloproteinases: what do they not do? New substrates and biological roles identified by murine models and proteomics*. BiochimBiophysActa. 2010 Jan; 1803(1): 39-54.
- ROSADO, P. et al. *In oral squamous cell carcinoma, high FAK expression is correlated with low P53 expression*. Virchows Arch. 2012 Aug; 461(2): 163-8.
- SAMUEL, M.S. et al. *Actomyosin-mediated cellular tension drives increased tissue stiffness and β -catenin activation to induce epidermal hyperplasia and tumor growth*. Can Cell. 2011 Jun; 19(6): 776-91.
- SANDQUIST, J.C.; BEMENT, W.M. *Hold on tightly, let go lightly: myosin functions at adherens junctions*. Nat Cell Biol. 2010 Jul; 12(7): 633-5.
- SIEG, D. J.; HAUCK, C. R.; SCHLAEPFER, D. D. *Required role of focal adhesion kinase (FAK) for integrin-stimulated cell migration*. J. Cell Sci. 1999; (112): 2677-2691.

- TILGHMAN, R.W.; PARSONS, J.T. *Focal adhesion kinase as a regulator of cell tension in the progression of cancer*. *Semin Cancer Biol.* 2008 Feb; 18(1): 45-52.
- TSANTOULIS, P.K. et al. *Advances in the biology of oral cancer*. *Oral Oncol.* 2007 Jul; 43(6): 523-34.
- VALLENIUS, T. *Actin stress fibre subtypes in mesenchymal-migrating cells*. *Open Biol.* 2013 Jun; 3(6): 130001.
- VERED, M. et al. *E-cadherin in oral SCC: an analysis of the confusing literature and new insights related to its immunohistochemical expression*. *HistolHistopathol.* 2012 Feb; 27(2): 141-50.
- WEBB, D.J.; HORWITZ, A.F. *New dimensions in cell migration*. *Nat Cell Biol.* 2003; (5): 690-2. and *Nat Cell Biol.*; (4): 97-100.
- WEBB, D.J.; PARSONS, J.T.; HORWITZ, A.F. *Adhesion assembly, disassembly and turnover in migrating cells -- over and over and over again*. *Nat Cell Biol.* 2002 Apr; 4(4): 97-100.
- WEHRLE-HALLER, B. *Assembly and disassembly of cell matrix adhesions*. *Curr Opin Cell Biol.* 2012 Oct; 24(5): 569-81.
- WESTERMARCK, J.; KÄHÄRI, V.M. *Regulation of matrix metalloproteinase expression in tumor invasion*. *Faseb J.* 1999 May; 13(8): 781-92.
- WHEELOCK, M.J. et al. *Cadherin switching*. *J Cell Sci.* 2008 Mar; 121(6): 727-35.
- WOLF, K.; FRIEDL, P. *Extracellular matrix determinants of proteolytic and non-proteolytic cell migration*. *Trends Cell Biol.* 2011 Dec; 21(12): 736-44.
- XIA, J. et al. *Increased expression of focal adhesion kinase correlates with cellular proliferation and apoptosis during 4-nitroquinoline-1-oxide-induced rat tongue carcinogenesis*. *J Oral Pathol Med.* 2009 Jul; 38(6): 524-9.
- YADAV, A. et al. *IL-6 promotes head and neck tumor metastasis by inducing epithelial-mesenchymal transition via the JAK-STAT3-SNAIL signaling pathway*. *Mol Cancer Res.* 2011 Dec; 9(12): 1658-67.
- ZHU, Y. et al. *Rab35 is required for Wnt5a/Dvl2-induced Rac1 activation and cell migration in MCF-7 breast cancer cells*. *Cell Signal* 2013 May; 25(5): 1075-85.
- ZONG, H. et al. *Cyclin D3/CDK11p58 complex is involved in the repression of androgen receptor*. *Mol Cell Biol.* 2007 Oct; 27(20): 7125-42.

ANEXOS**ANEXO 1**

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL / PROREITORIA DE PESQUISA -

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: ANALISE DA CORRELAÇÃO ENTRE O GRAU DE DIFERENCIAÇÃO DE LESÕES BUCAIS E A REGULÇÃO DE PROTEÍNAS DE ADESAO CELULAR

Pesquisador: MARCELO LAZZARON LAMERS

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 06397313.7.0000.5347

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL/COMITÊ DE ÉTICA EM

Patrocinador Principal: Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior ((CAPES))
Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico ((CNPq))

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 214.549

Data da Relatoria: 07/02/2013

Apresentação do Projeto:

O carcinoma de células escamosas é o tumor maligno mais frequentemente encontrado na cavidade bucal representando cerca de 94% de todas as ocorrências presentes em boca. A característica mais agressiva dessas lesões é a ocorrência de metástases. A migração é um evento celular que ocorre em diversos tipos de células dentre as quais estão as células epiteliais. O processo de migração celular é um acontecimento dinâmico e complexo que envolve interações entre as células e a matriz extracelular. Esse processo depende de variações de concentração de proteínas de adesão bem como de suas formas ativas e/ou inativas. Algumas proteínas podem aumentar ou diminuir sua expressão quando mutadas como forma de adaptação para novos ambientes nos quais podem vir a se instalar como, por exemplo, em casos em que ocorram metástases à distância.

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo do presente trabalho é descrever o padrão de expressão e de regulação da atividade das proteínas de adesão em amostras de tumores com diferentes níveis de invasividade e diferenciação e analisar o perfil de ativação dessas proteínas de adesão.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O projeto aponta riscos e benefícios de forma adequada.

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - 2º andar do Prédio da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farroupilha **CEP:** 90.040-060
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 **Fax:** (51)3308-4085 **E-mail:** etica@propeq.ufrgs.br



UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL / PRO
REITORIA DE PESQUISA -

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O estudo possui mérito científico e o mostra mbasamento sólido. Há justificativa sobre tamanho de amostra, cronograma e orçamentos estão adequados.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos de apresentação obrigatória exigidos são apresentados.

Recomendações:

O projeto encontra-se em condições de aprovação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O projeto encontra-se em condições de aprovação.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Encaminha-se.

PORTO ALEGRE, 08 de Março de 2013

**Assinador por: José
Artur Bogo Chies
(Coordenador)**

Endereço: Av. Paulo Gama, 110 - 2º andar do Prédio da Reitoria - Campus Centro
Bairro: Farroupilha **CEP:** 90.040-060
UF: RS **Município:** PORTO ALEGRE
Telefone: (51)3308-3738 **Fax:** (51)3308-4085 **E-mail:** etica@propesq.ufrgs.br

ANEXO 2

BIORREPOSITÓRIO DA PATOLOGIA BUCAL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
Av. Ramiro Barcelos, 2492 Sala 503
(51) 3308 5023

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Você será submetido a uma cirurgia para fins de diagnóstico ou tratamento. O cirurgião irá remover um fragmento de tecido para realizar alguns exames. O resultado destes exames será utilizado para melhor planejar seu tratamento. Após os testes, o material que sobrar será descartado (jogado no lixo).

Nós gostaríamos de guardar o tecido restante para pesquisas, que será coletado no bloco cirúrgico durante sua cirurgia. Se você concordar, este tecido será armazenado e poderá ser usado em pesquisas que nos ajudarão a melhor entender as doenças bem como a prevenção e o desenvolvimento de novos tratamentos.

Dados sobre a pesquisa realizada com seu tecido e/ou sangue não estarão disponíveis para você ou seu cirurgião e estes dados não serão anexados ao seu prontuário. **A pesquisa não terá nenhuma repercussão no seu tratamento.**

A escolha do armazenamento do tecido no Biorrepositório para pesquisas futuras é sua. **Seu tratamento não será afetado independentemente da sua escolha.** Caso decida autorizar o armazenamento do seu tecido, você poderá mudar de idéia a qualquer momento. Para isso você deve entrar em contato com a administração do Biorrepositório e solicitar a retirada do seu tecido.

No futuro, pesquisadores poderão precisar de informações sobre sua saúde. Estes dados serão fornecidos pela administração do Biorrepositório, porém sem conter seu nome, endereço, número de telefone ou qualquer outra informação que permita o pesquisador ou outro membro da pesquisa identificá-lo.

O tecido e/ou sangue poderão ser utilizados para pesquisas genéticas (estudo de doenças que ocorrem entre familiares). Se seu tecido e/ou sangue forem utilizados para este tipo de pesquisa, os resultados não serão colocados no seu prontuário. Seu tecido e/ou sangue serão usados somente para pesquisa e não serão vendidos. Não há riscos adicionais além da cirurgia já programada pelo seu cirurgião. A equipe de administração do Biorrepositório compromete-se a manter em sigilo as informações que possam identificá-lo, como nome, endereço e número de telefone.

Pelo presente consentimento informado, declaro que fui esclarecido, de forma detalhada

e livre de qualquer constrangimento, da justificativa e dos procedimentos que serei submetido pelo presente projeto de pesquisa.

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

O professor responsável pelo Biorrepositório da Patologia Bucal é o Prof. Dr. Manoel Sant'Anna Filho (fone: 51-3308 5011). O coordenador deste projeto de pesquisa é o Prof. Dr. Marcelo Lamers (fone:51-3308 5023).

Qualquer dúvida referente a este termo de consentimento podem ser resolvidas diretamente com os pesquisadores responsáveis ou junto ao comitê de Ética da UFRGS (51-3308-3738) ou ao comitê de Ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (51-3359-8290).

Nome e Assinatura do voluntário

Data: _____ Telefone: _____

Nome e assinatura do pesquisador

Data: _____ Telefone: _____

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

ANEXO 3**TERMO DE CONFIDENCIALIDADE**

Título do projeto: “Análise da correlação entre o grau de diferenciação de lesões bucais e a regulação de proteínas de adesão celular”

Pesquisador responsável: Marcelo Lazzaron Lamers

**Instituição/Departamento: Instituto de Ciências Básicas da Saúde /
Departamento de Ciências Morfológicas**

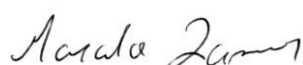
Telefone para contato: 3308-5023 / 3308-5011

Local de coleta de dados: Comitês de Bioética

Os pesquisadores do presente projeto se comprometem a preservar a privacidade dos sujeitos da pesquisa. Concordam, igualmente, que estas informações serão utilizadas única e exclusivamente para execução do presente projeto. As informações somente poderão ser divulgadas de forma anônima e serão mantidas no Departamento de Ciências Morfológicas por um período de 5 anos sob a responsabilidade do Prof. Marcelo Lazzaron Lamers. Após este período, os dados serão destruídos. Este projeto de pesquisa foi revisado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da UFRGS em/.../....., com o número do CAAE

Porto Alegre, ____ de _____ de 2012.

Prof. Dr. Marcelo Lazzaron Lamers.



Prof Dr Marcelo Lazzaron Lamers

ANEXO 4

PRONTUÁRIO _____

Local do Exame: _____ Dia: _____

Entrevistador: _____

1. Dados Pessoais

1.1. Nome _____

1.2. Identidade _____

1.3. Endereço _____

1.4. Telefone _____

1.5. Sexo: 1 masc () 2 fem ()

1.6. Qual sua data de nascimento: _____ 1.7 Qual sua idade hoje _____

1.7. A sua raça ou cor é

1 () branca 2 () negra 3 () parda 4 () amarela
5 () indígena

1.9. Você está: 1 () casado 2 () solteiro 3 () divorciado 4 () viúvo

1.10: Você é alfabetizado 1 () sim 2 () não

1.11. Você estudou até:

1 () nunca estudou 2 () 1-4 série 3 () 5-8 série 4 () 2 grau incompleto 5 () 2 grau completo 6 () superior
incompleto 7 () superior completo2. Hábitos de Higiene Bucal

2.1. Com que frequência você escova seus dentes

1 () uma vez por semana 2 () 2-5 vezes por semana 3 () uma vez por dia
4 () mais de uma vez por dia 5 () nunca escova

2.2. Você divide a sua escova com outras pessoas

1 () sim 2 () não

2.3. O que você usa para limpar seus dentes

1 () nada 2 () palito 3 () fio dental 4 () outro _____

2.4. Você usa algum produto para bochecho

1 () não 2 () sim. Qual? _____ Há quanto tempo? _____

2.5. Com que frequência

1 () uma vez por semana 2 () 2-5 vezes por semana 3 () uma vez por dia
4 () mais de uma vez por dia 5 () nunca usa

2.6. Quando iniciou o uso?

1 () antes 2 () depois do diagnóstico de câncer

2.7. Quando foi a última vez que você foi ao dentista

1 () muitos anos atrás 2 () 1-3 anos atrás 3 () menos de 1 ano atrás
4 () não lembra 5 () nunca visitou3. Percepção das Condições Bucais e Atitudes

Nos últimos 12 meses, você teve:	frequent	às vzs	raro	nunca
3.1 mau hálito, gosto ruim, mau cheiro	1()	1 ()	1()	1()
3.2 dor de dente	2 ()	2()	2()	2()
3.3 dentes frouxos	3()	3()	3()	3()
3.4 apertamento	4()	4()	4()	4()
3.5 sensação de boca seca	5()	5()	5()	5()
3.6 dor enquanto escova	6()	6()	6()	6()
3.7 feridas nas gengivas	7()	7 ()	7()	7()
3.8 sangramento nas gengivas	8()	8()	8()	8()

4. Fatores comportamentais

4.1. Você fuma atualmente 1 () sim 2 () não 3.2 Tipo _____

4.3 Quantos cigarros por dia _____ 4.4 Há quantos anos _____

4.5 Você fumou anteriormente 1 () sim 2 () não

4.6 Quantos cigarros por dia _____ 4.7 Por quantos anos _____

4.8 Quanto tempo faz que você parou de fumar _____

4.9 Você toma chimarrão 1 () frequentemente 2 () algumas vezes 3 () raramente 4 () nunca

4.10 Você ingere bebidas alcólicas 1 () frequentemente 2 () algumas vezes 3 () raramente 4 () nunca

4.11 Qual tipo de bebida 1 () nenhum 2 () cerveja 3 () cachaça 4 () vinho
5 () outros _____

4.12 Quantas doses/copos você ingere por semana _____

5. Fatores Psicossociais

Nos últimos 3 anos, você teve:	Sim	Não	Não sei
5.1. um problema sério de saúde	1()	2()	3()
5.2. um problema sério de saúde na família	1()	2()	3()
5.3. morte de alguém próximo	1()	2()	3()
5.4 algum outro problema que tenha afetado você	1()	2()	3()

Em relação a seu presente trabalho:

5.5 Quantas vezes por semana você trabalha _____ horas

- desempregado
 aposentado, do lar

5.6 Você esteve desempregado por mais de 3 meses no últimos 3 anos

- 1() sim 2() não

5.7 Se esteve, por quanto tempo _____ meses

5.8 Você acha que os ganhos mensais de sua família

- 1 () não são suficientes para pagar suas contas 2() apenas para pagar as contas
 3 () suficiente para pagar as contas e economizar um pouco

5.9 Você considera a sua qualidade de vida

- 1() muito ruim 2() ruim 3() razoável 4() boa 5() muito boa

6. Nível Socioeconomico

6.1. Quanto você recebe por mês

- 1() até 1 SM 2() 1- 2 SM 3() 2- 3 SM () 4 3-5 SM () 5 5-10 SM () 6 10-20 SM () 7 +20 SM () 8 não respondeu () 9 não recebe salário

Quantas ...você possui:	não possui	1	2	3	4 ou +
6.2 Tv coloridas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6.3 rádios	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6.4 banheiros	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6.5 automóveis	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6.6 empregadas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6.7 aspiradores de pó	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6.8 máquina de lavar	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6.9 DVD	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6.10 geladeiras	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6.11 freezer	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6.12 computador	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
6.13 microondas	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>

6.12 Quantas pessoas você sustenta economicamente _____ pessoas

6.13 Quantas pessoas moram com você _____ pessoas

7. História Médica

Você tem	Sim	Não	Não sei
7.1 Diabetes	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.2 Asma, alergia a alimentos,pós, etc	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.3 Doença cardíaca ou renal	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.4. Artrite	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.5 Outro problema de saúde (HIV,hepatite)	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>	<input type="checkbox"/>
7.6. Você está usando alguma medicação	1 <input type="checkbox"/> sim	2 <input type="checkbox"/> não	
7.7. Qual			

ANEXO 5

Ficha de Informações dos Pacientes HCPA

Paciente número _____

Leito _____

Sexo () 1 masculino () 2 feminino

Prontuário _____

Data da Cirurgia _____

Localização do Tumor _____

Estadiamento _____

Tumor Primário () 1 Metástase () 2

Tumor:

Tamanho _____

Macroscopia _____

Número do AP _____

Graduação HP _____

Número de fragmentos: _____

Número no Biorrepositório _____