



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO – DIAGNÓSTICO BUCAL

JUSSARA MARIA GONÇALVES

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS
PROTEÍNAS P53, USP1 E WDR48 COM OS DADOS
CLÍNICO- HISTOPATOLÓGICOS EM CARCINOMAS
EPIDERMÓIDES INTRABUCAIS**

Florianópolis
2016

JUSSARA MARIA GONÇALVES

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS
PROTEÍNAS P53, USP1 E WDR48 COM OS DADOS
CLÍNICO- HISTOPATOLÓGICOS EM CARCINOMAS
EPIDERMÓIDES INTRABUCAIS**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Centro de Ciências da Saúde, da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia - Área de Concentração: Diagnóstico Bucal

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro
Coorientadora: Prof^a. Dr^a. Elena Riet Correa Rivero

Florianópolis
2016

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor,
através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Gonçalves, Jussara Maria

Análise da expressão imuno-histoquímica das proteínas p53, USPl e WDR48 com os dados clínico-histopatológicos em carcinomas epidermóides intrabucais / Jussara Maria Gonçalves ; orientadora, Mabel Mariela Rodriguez Cordeiro ; coorientadora, Elena Riet Correa Rivero. - Florianópolis, SC, 2016.

110 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde. Programa de Pós Graduação em Odontologia.

Inclui referências

1. Odontologia. 2. Células-tronco neoplásicas . 3. Imuno-histoquímica . 4. Carcinoma Epidermóide . 5. Cabeça e pescoço . I. Cordeiro, Mabel Mariela Rodriguez . II. Rivero, Elena Riet Correa. III. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. IV. Título.

JUSSARA MARIA GONÇALVES

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DAS
PROTEÍNAS P53, USP1 E WDR48 COM OS DADOS
CLÍNICO- HISTOPATOLÓGICOS EM CARCINOMAS
EPIDERMÓIDES INTRABUCAIS**

Esta dissertação foi julgada adequada para obtenção do Título de “Mestre”, e aprovada em sua forma final pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC).

Florianópolis, 12 de fevereiro de 2016.

Prof^a Dr^a Izabel Cristina Santos Almeida
Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Odontologia

Banca Examinadora:

Prof^a Dr^a Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro
Orientadora
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof^o Dr^o Alessandra Rodriguez de Camargo
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Prof^a Dr^a Carolina Amália Barcellos Silva
Universidade do Planalto Catarinense (UNIPLAC)

Prof^o Dr^o Rogério Gondak
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Dedico este trabalho primeiramente a **Deus**, que se fez presente durante o percurso e não me deixou desistir diante de qualquer dificuldade.

Aos meus pais, **Juscelino Gonçalves** e **Sueli Coelho Gonçalves**, que me apoiaram em todos os momentos dessa trajetória e persistiram para me fazer vencedora.

E por último, mas não menos importante, ao **Giovani Wolff Sfredo**, pela inspiração que me transmite.

AGRADECIMENTOS

Agradeço a **Deus** pelos dons que me ofereceu e pela saúde que é essencial.

Aos meus pais, **Juscelino Gonçalves** e **Sueli Coelho Gonçalves**, e também as minhas irmãs, **Rosiana Gonçalves** e **Maria Denise Gonçalves**, por terem me dado esta oportunidade e não medirem esforços para que eu pudesse concluir os meus estudos. Obrigada pela compreensão nos momentos difíceis, pela felicidade compartilhada nos momentos de vitória e pelo amor verdadeiro que este laço constrói.

Ao meu namorado, **Giovani Wolff Sfredo**, cujo apoio foi incondicional durante estes dois anos. Obrigada pela compreensão da ausência, companheirismo e encorajamento.

A minha orientadora Prof^a Dr^a. **Mabel Mariela Rodríguez Cordeiro** e a minha Co-orientadora Prof^a Dr^a **Elena Riet Correa Rivero**, pelos ensinamentos e lições não só didáticos, mas também para a vida, os quais levarei durante toda carreira. Obrigada pela confiança depositada em mim para com este trabalho, bem como pelo tempo despendido.

Ao Prof^o Dr^o **João Luiz Dornelles Bastos** pela colaboração durante a execução desse trabalho. Sua ajuda foi essencial para a realização das análises estatísticas.

A todos os **professores do Departamento de Patologia**, sem exceção. Obrigada por partilhar comigo, de maneira tão generosa, seus conhecimentos científicos.

Aos **professores do Departamento de Odontologia** da Universidade da Região de Joinville (Univille). Especialmente, a professora **Lucia Ávila**, por ter me apresentado à estomatologia com tanto carinho. Obrigada pelos ensinamentos cedidos.

Aos meus amigos e colegas **Diogo, Angélica, Caroline, Emanuely, Maria del Rosario, Rubia, Georgia, Adelino**,

Eduardo, Mariana, Guilherme e Fernanda, por deixarem meus dias mais alegres.

Aos **membros do Laboratório e do Departamento de Patologia** da Universidade Federal de Santa Catarina - UFSC, pelo apoio durante o desempenho do trabalho.

A **CAPES**, Coordenação de Aperfeiçoamento de Nível Pessoal, pela concessão da bolsa de estudos.

“A alegria está na luta, na tentativa, no sofrimento envolvido e não na vitória propriamente dita”

(Mahatma Gandhi)

RESUMO

Para inibir a diferenciação e manter as características das células-tronco, proteínas inibidoras da ligação de DNA (ID) antagonizam os fatores de transcrição *basic helix-loop-helix* (bHLH). A ubiquitinação da proteína ID ocorre em diferentes tecidos, mas em muitos neoplasmas esta consegue escapar da degradação. O complexo proteico USP1/WDR48 pode estar envolvido nesse processo. Paralelamente, a proteína p53, guardião do genoma humano, controla a auto renovação neoplásica. Este estudo objetivou associar a expressão imuno-histoquímica das proteínas p53, USP1 e WDR48 aos dados clínico-histopatológicos de Carcinomas Epidermóides Intrabuciais (CEI). Trinta casos de CEI, grupo teste, e 40 casos de Hiperplasia Fibrosa (HF), grupo controle, foram utilizados para as análises imuno-histoquímicas (anticorpos anti-p53, anti-USP1 e anti-WDR48). A expressão destes marcadores foi dividida em 4 categorias (núcleo+, citoplasma+, núcleo e citoplasma+ e células-). As fichas de biópsia, laudos e prontuários foram avaliados. A classificação histopatológica (Bryne *et al.*, 1992) foi realizada por meio de lâminas com coloração HE. Após, os dados foram submetidos a análise estatística (Kruskal Wallis). Os resultados imuno-histoquímicos apresentaram diferença estatisticamente significativa entre os três marcadores (p53, USP1 e WDR48) ($p=0,0001$ para todos os grupos), e também entre as lesões (CEI ou HF) em 5 grupos ($p=0,0000$; $0,0028$; $0,0010$; $0,0000$; $0,0413$), sendo que, na maioria das vezes, a expressão em HF foi inferior à expressão em CEI. Nenhuma associação com os achados clínicos foi identificada (TNM), mas observou-se com os histopatológicos. Os CEIs bem diferenciados foram os que obtiveram as menores médias de expressão dos marcadores. Conclui-se que parece haver uma associação entre a expressão das proteínas investigadas e CEI, bem como com o grau de malignidade deste tipo de lesão, porém não com as suas características clínicas. Deste modo, os marcadores p53, USP1 e WDR48 têm potencial determinante de prognóstico e tratamento de CEI.

Palavras-chave: Células-tronco neoplásicas, carcinoma epidermóide, imuno-histoquímica

ABSTRACT

To inhibit differentiation and maintain stem cell fate, Inhibitors of DNA binding (IDs) antagonize basic helix-loop-helix (bHLH) transcription factors. ID ubiquitination occurs in differentiated tissues, but IDs in many neoplasms appear to escape degradation. The protein complex USP1/WDR48 can be involved in this process. At the same time, p53 protein, human genome guardian, controls the neoplastic self renewal. When occurs loss of function of the tumor suppressor gene TP53 there is the possibility of cancer development. This study aimed to associate the immunohistochemical expression of p53, USP1, WDR48 and clinical-histopathological characteristic of OSCC (oral squamous cell carcinoma). Thirty OSCC cases, test group, and 40 FH cases (fibrous hyperplasia), control group, were used for immunohistochemical analysis (anti-p53, anti-USP1 and anti-WDR48). The expression of these markers was divided into 4 categories (nucleus+; cytoplasm+, nucleus and cytoplasm+ and cells-). Biopsy form, histopathological results and patients' records were evaluated. The histopathological classification (Bryne et al., 1992) was performed using HE staining. After that, data were subjected to statistical analysis (Kruskal Wallis). The immunohistochemical results revealed a statistically significant difference among the three markers (p53, USP1 and WDR48) ($p=0,0001$ to all groups), and also between the lesions (OSCC or FH) in 5 groups ($p=0,0000$; $0,0028$; $0,0010$; $0,0000$; $0,0413$). The expression in FH was less commonly found than expression in OSCC. No association with clinical findings was identified (TNM), but it was noted regarding histopathological issues. Well differentiated OSCC achieved the lowest average of expression of the markers. We may conclude that, possibly, exist an association between these proteins and OSCC, its immunolocalization can be connected with malignant grading. However, the association with clinical findings cannot be determined. The p53, USP1 and WDR48 have the potential to define OSCC prognosis and treatment.

Keywords: Cancer stem cell, squamous cell carcir
Immunohistochemistry

LISTA DE FIGURAS

| | |
|---|----|
| Figura 1– Teoria das células-tronco neoplásicas..... | 37 |
| Figura 2- Ilustração da heterodimerização da ligação de Ácido Desoxirribonucleico (<i>deoxyribonucleic acid</i>) (DNA) ao <i>Basic-Helix-Loop-Helix</i> (bHLH) pela proteína Inibidora de Ligação de DNA (<i>Inhibitors of DNA binding</i>) (ID)..... | 47 |
| Figura 3- Ilustração do método Avidina - Biotina..... | 65 |
| Figura 4- Padrão de expressão dos marcadores p53, USP1 e WDR48 em Hiperplasia Fibrosa (HF) e Carcinoma Epidermóide Intrabucal (CEI)..... | 73 |
| Figura 5- Expressão citoplasmática do marcador WDR48, em Carcinoma Epidermóide Intrabucal (CEI), com aspecto “salpicado” | 74 |
| Figura 6- Identificação dos grupos do estudo..... | 75 |
| Figura 7- Importação nuclear do complexo proteico USP1/WDR48..... | 88 |

LISTA DE QUADROS E TABELAS

| | |
|--|----|
| Quadro 1- Lista de marcadores de células-tronco neoplásicas (CTN)..... | 38 |
| Quadro 2- Grupamento por estágios..... | 58 |
| Quadro 3- Adaptação de classificação histopatológica proposta por Bryne e colaboradores (1992)..... | 68 |
| Tabela 1 – Descrição das características dos anticorpos utilizados nas reações de imuno-histoquímica..... | 63 |
| Tabela 2 – Especificação dos valores de expressão para o marcador p53 em Carcinoma Epidermóide Intrabucal (CEI) e Hiperplasia Fibrosa (HF) e a respectiva percentagem de células positivas e negativas..... | 76 |
| Tabela 3- Especificação dos valores de expressão para o marcador USP1 em Carcinoma Epidermóide Intrabucal (CEI) e Hiperplasia Fibrosa (HF) e a respectiva percentagem de células positivas e negativas..... | 76 |
| Tabela 4- Especificação dos valores de expressão para o marcador WDR48 em Carcinoma Epidermóide Intrabucal (CEI) e Hiperplasia Fibrosa (HF) e a respectiva percentagem de células positivas e negativas..... | 77 |
| Tabela 5- Média de expressão dos marcadores p53, USP1, WDR48, comparados entre si, em uma mesma lesão, Carcinoma Epidermóide Intrabucal (CEI) ou Hiperplasia Fibrosa (HF)..... | 78 |
| Tabela 6- Média de expressão dos marcadores p53, USP1, WDR48, comparados com os seus análogos, em diferentes | |

| | |
|--|----|
| lesões, Carcinoma Epidermóide Intrabucal (CEI) e Hiperplasia Fibrosa (HF)..... | 80 |
| Tabela 7- Características clínicas correspondentes às amostras de Carcinoma Epidermóide Intrabucal (CEI)..... | 82 |
| Tabela 8- Correlação entre o estadiamento das amostras de Carcinoma Epidermóide Intrabucal (CEI) e a expressão dos marcadores p53, USP1 e WDR48..... | 83 |
| Tabela 9- Correlação entre a gradação histopatológica das amostras de Carcinoma Epidermóide Intrabucal (CEI) e a expressão dos marcadores p53, USP1 e WDR48..... | 84 |

LISTA DE GRÁFICOS

| | |
|--|----|
| Gráfico 1- Média de expressão dos marcadores p53, USP1, WDR48, comparados entre si, em uma mesma lesão, Carcinoma Epidermóide Intrabucal (CEI) ou Hiperplasia Fibrosa (HF)..... | 79 |
| Gráfico 2- Média de expressão dos marcadores p53, USP1, WDR48, comparados com os seus análogos, em diferentes lesões, Carcinoma Epidermóide Intrabucal (CEI) e Hiperplasia Fibrosa (HF)..... | 81 |

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

| | |
|-------------------------------------|---|
| ALDH..... | Aldeído Desidrogenase |
| ATP..... | Trifosfato de adenosina |
| ATPS..... | <i>3-aminopropyltriethoxysilene</i> |
| bHLH..... | <i>basic-Helix-Loop-Helix</i> |
| CAAE..... | Certificado de Apresentação para Apreciação Ética |
| CDKN..... | Inibidor de Quinase Dependente de Ciclina |
| cDNA..... | Ácido Desoxirribonucleico Complementar |
| CE..... | Carcinoma Epidermóide |
| CEB..... | Carcinoma Epidermóide Bucal |
| CEI..... | Carcinoma Epidermóide Intrabucal |
| CECP..... | Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço |
| CEPON..... | Centro de Pesquisa em Oncologia |
| CEPSH..... | Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos |
| CTN..... | Células-tronco neoplásicas |
| DAB..... | Diaminobenzidina |
| DNA..... | Ácido Desoxirribonucleico |
| DUB..... | Desubiquitinase |
| ID..... | Inibidora da Ligação de DNA |
| INCA..... | Instituto Nacional de Câncer |
| H ₂ O ₂ | Peróxido de Hidrogênio |
| HE..... | Hematoxilina e Eosina |
| HF..... | Hiperplasia Fibrosa |
| HU..... | Hospital Universitário |
| LPB..... | Laboratório de Patologia Bucal |
| LSAB..... | Marcação com Biotina Estreptavidina |

MDM2..... *Murine Doble Minute 2*
mRNA.....Ácido Ribonucleico Mensageiro
microRNA.....micro Ácido Ribonucleico
MRP1.....Proteína Resistente a Multidrogas 1
OMS.....Organização Mundial da Saúde
PBS.....Tampão Fosfato-salino
PCNA.....Antígeno Nuclear de Proliferação Celular
p53.....Proteína p53
P-gp.....P- Glicoproteína 1
PPGO.....Programa de Pós-Graduação em Odontologia
TNM.....Classificação de Tumores Malignos
TP53.....Gene Proteína Tumoral p53
UFSC.....Universidade Federal de Santa Catarina
USP1..... Protease específica da Ubiquitina 1
WDR48..... *WD repeat-containing protein 48*

LISTA DE SÍMBOLOS

| | |
|--------------------------|---------------|
| μm | Micrômetro |
| <..... | Menor |
| >..... | Maior |
| %..... | Porcento |
| $^{\circ}\text{C}$ | Graus Celsius |
| mL..... | Microlitro |
| X..... | Vezes |
| min..... | Minutos |

SUMÁRIO

| | |
|---|----|
| 1 INTRODUÇÃO | 31 |
| 2 REVISÃO DE LITERATURA | 33 |
| 2.1 Células-tronco..... | 33 |
| 2.2 Células-tronco neoplásicas..... | 35 |
| 2.2.1 Resistência à múltiplas drogas..... | 41 |
| 2.3 Auto renovação das células-tronco..... | 42 |
| 2.4 Proteínas Inibidoras da Ligação de DNA..... | 44 |
| 2.5 Ubiquitina..... | 47 |
| 2.6 Desubiquitinase..... | 48 |
| 2.6.1 Proteínas do complexo USP1/WDR48..... | 49 |
| 2.7 Proteína p53..... | 52 |
| 2.8 Carcinoma Epidermóide Intrabucal..... | 54 |
| 3 JUSTIFICATIVA | 59 |
| 4 HIPÓTESE DE ESTUDO | 60 |
| 5 OBJETIVOS | 60 |
| 5.1 Objetivo Geral..... | 60 |
| 5.2 Objetivos específicos..... | 60 |
| 6 METODOLOGIA | 61 |
| 6.1 Delineamento do Estudo..... | 61 |
| 6.2 Aspectos Éticos e Legais..... | 61 |
| 6.3 Seleção da amostra..... | 61 |
| 6.4 Levantamento dos dados imuno-histoquímicos..... | 62 |
| 6.4.1 Procedimentos Laboratoriais..... | 62 |
| 6.4.2 Análise imuno-histoquímica..... | 65 |
| 6.5 Levantamento dos dados clínicos | 66 |

| | |
|---|-----------|
| 6.6 Gradação histopatológica..... | 67 |
| 6.7 Análise estatística..... | 68 |
| 6.8 Relação entre achados clínicos, imuno-histoquímicos e histopatológicos..... | 69 |
| 7 RESULTADOS..... | 69 |
| 7.1 Análise microscópica observacional da expressão dos marcadores..... | 69 |
| 7.1.1 p53..... | 70 |
| 7.1.2 USP1..... | 70 |
| 7.1.3 WDR48..... | 71 |
| 7.2 Análise quantitativa da expressão dos marcadores..... | 74 |
| 7.2.1 Especificação dos valores..... | 75 |
| 7.2.2 Comparação entre os marcadores p53, USP1 e WDR48..... | 77 |
| 7.2.3 Comparação entre as lesões CEI e HF..... | 79 |
| 7.3 Dados clínicos tumorais..... | 81 |
| 7.3.1 Correlação entre a expressão dos marcadores e o estadiamento (TNM)..... | 82 |
| 7.4 Gradação histopatológica..... | 83 |
| 8 DISCUSSÃO..... | 85 |
| 9 CONCLUSÕES..... | 94 |
| 10 REFERÊNCIAS..... | 95 |
| APÊNDICE A..... | 103 |
| APÊNDICE B..... | 106 |
| ANEXO A..... | 109 |

1 INTRODUÇÃO

Atualmente, é amplamente aceito que a tumorigenese é um processo de múltiplos passos. A sua progressão é caracterizada por alterações celulares, genéticas e epigenéticas que propiciam uma reprogramação celular, gerando o descontrole da divisão celular e a conseqüente formação da massa tumoral (REYA *et al.*, 2001).

Nos últimos anos, houve o aumento de evidências que sugerem que as células-tronco podem ter um papel decisivo não apenas na geração de um organismo multicelular com uma complexa estrutura, mas também podem ter influência direta sobre o processo de tumorigênese (CLARKE *et al.*, 2006). As propriedades das células-tronco podem propiciar o desenvolvimento e a perpetuação de vários cânceres humanos, e, nesses casos, essas células são chamadas de células-tronco neoplásicas (CLARKE *et al.*, 2006).

Muito se tem investigado sobre os mecanismos reguladores da diferenciação das células-tronco neoplásicas. Alguns estudos têm identificado o fator de transcrição *Basic-Helix-Loop-Helix* (bHLH) como importante regulador do desenvolvimento de neoplasias. A ação das proteínas bHLH pode ser inibida pela heterodimerização com as proteínas inibidoras da ligação de DNA (*Inhibitors of DNA binding*), chamadas ID. (LASORELLA *et al.*, 2006). Os IDs previnem a diferenciação celular, promovem o crescimento e sustentam o

desenvolvimento do tumor. A expressão de células-tronco em tumores promovidos por determinadas proteínas ID sugere que genes ID possam ser essenciais na progressão das células-tronco neoplásicas (CIARAPICA *et al.*, 2009).

Recentemente, a enzima desubiquitinizadora 1 (*ubiquitin-specific protease 1*) (USP1) foi relatada por desubiquitinar e estabilizar os IDs. Devido a essa ação das proteínas ID, a USP1 contribui para prevenir a diferenciação mediada por bHLH e, assim, manter as características originais das células-tronco (WILLIAMS *et al.*, 2011). Além disso, a USP1 tem a sua atividade potencializada quando ligada à proteína WDR48 (*WD repeat-containing protein 48*). Dessa forma, a vantagem de inibir as USPs, nos casos de intervenção terapêutica específica, é que se pode conduzir à melhor eficácia do tratamento e reduzir seus efeitos colaterais não específicos. Portanto, USPs humanas estão emergindo como alvos para a intervenção farmacológica (CHEN *et al.*, 2011).

Entretanto, pouco é conhecido sobre este processo em Carcinoma Epidermóide Intra-bucal (CEI) (LIN *et al.*, 2010), sendo que mais de 90% dos neoplasmas malignos da cavidade oral e orofaringe correspondem a essa lesão (BARNES *et al.*, 2005). Globalmente, 389.650 casos ocorreram no ano de 2000. Isto representa 5% da média de todos os cânceres para os homens e 2% para as mulheres (BARNES *et al.*, 2005). Segundo dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA, 2010), no Brasil, estima-se, que no ano de 2014, surgiram 11.280 casos novos de CEI em homens e 4.010 em mulheres. Tais valores

correspondem a um risco estimado de 11,54 casos novos a cada 100 mil homens e 3,92 a cada 100 mil mulheres. Só no estado de Santa Catarina, o número estimado de casos novos de CEI em 2014 foi 420 (homens) e 70 (mulheres). Entretanto, apesar dos avanços terapêuticos nas áreas de cirurgia, radioterapia e quimioterapia terem melhorado o prognóstico dos pacientes, em casos mais graves, os resultados ainda são pouco favoráveis, mostrando uma taxa de sobrevida de apenas 50% em cinco anos (ZHAO *et al.*, 2013).

Alguns estudos têm demonstrado relação entre as proteínas USP1, WDR48 e p53 e o desenvolvimento e progressão de neoplasias, entre elas osteossarcomas (WILLIAMS *et al.*, 2011) e leucemias (MISTRY *et al.*, 2013). Contudo, não há relato algum sobre essas proteínas e a sua participação na progressão do CEI (LIN *et al.*, 2010). Partindo desse pressuposto, o objetivo desse estudo é associar os achados da expressão imuno-histoquímica destas proteínas aos dados clínicos e histopatológicos em casos de CEI.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Células-tronco

Em 1978, Prindull e colaboradores, pela primeira vez, demonstraram uma colônia de células-tronco isoladas a partir do cordão umbilical (PRINDULL; PRINDULL; MEULLEN, 1978) . Anos depois, Martin (1981) demonstrou, *in vitro*, que, por meio

da pluripotência, as células-tronco embrionárias podem diferenciar-se em uma ampla variedade de células. Isso ocorre quando o meio condicionado contém um fator de crescimento que estimula a proliferação ou inibe a diferenciação de células embriogênicas pluripotentes normais (MARTIN, 1981). Em 1998, Thompson e colaboradores isolaram células de embriões e desenvolveram a primeira linhagem de células embriogênicas (THOMSON et al., 1998). No mesmo ano, Shambloott e colaboradores (1998), descobriram que as células germinativas derivadas do tecido gonadal fetal e as células estaminais pluripotentes poderiam ser potenciais fontes de células-tronco (SHAMBLOTT et al., 1998). Em seguida, em 1999, Guan e colaboradores, descobriram que células-tronco de embrião de rato eram capazes de se diferenciar, *in vitro*, nos três folhetos embrionários (ectoderma, mesoderma e endoderma) (GUAN; ROHWEDEL; WOBUS, 1999).

Nos últimos anos, a Organização Mundial da Saúde (OMS) definiu as células-tronco como estruturas que podem se diferenciar tanto em outras células como em uma célula mais especializada (GAVAGHAN, 2001). São consideradas células indiferenciadas capazes de proliferar, auto renovar, produzir um amplo número de progenitores e proporcionar regeneração tecidual (BLAU; BRAZELTON; WEIMANN, 2001). Portanto, permitem a origem de uma variedade de tipos celulares distintos (WATT e HOGAN, 2000).

Estas células podem ser classificadas, do ponto de vista da capacidade de diferenciação, em totipotentes, pluripotentes e

multipotentes. Estas são classificadas de acordo com o seu nível de plasticidade, quantas diferentes vias de diferenciação podem seguir, e para qual tecido de um organismo elas podem contribuir (SOUZA, 2003).

As células-tronco totipotentes podem originar qualquer tipo celular do corpo e anexos embrionários (GAGE, 2000). Correspondem às células do embrião recém-formado (zigoto). As células pluripotentes são capazes de originar qualquer tipo de tecido do corpo, mas não possuem a capacidade de originar um organismo completo por não se diferenciarem nos anexos embrionários (ROBEY, 2000). As células-tronco multipotentes são as mais diferenciadas, ou seja, possuem a capacidade de originar apenas um limitado número de tipos teciduais. Estas células estão mais associadas com os tecidos que as derivam (GAGE, 2000).

Do ponto de vista de origem, as células-tronco podem ser classificadas como embrionárias ou adultas. A célula-tronco embrionária pode derivar do zigoto ou da massa celular interna de um blastocisto (embrião prematuro) (SOUZA, 2003). As células-tronco adultas encontram-se, teoricamente, em um tecido celularizado e atuam na homeostase tecidual, gerando novas células devido à renovação fisiológica ou em resposta a uma injúria (CLARKE *et al.*, 2000).

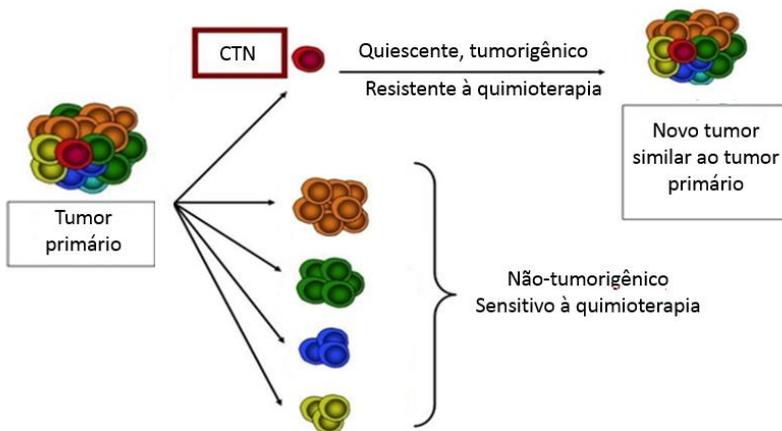
2.2 Células-tronco neoplásicas

A tumorigenese é um processo de múltiplos passos, a sua progressão depende de um acúmulo sequencial de mutações nas células. Essas mutações resultam na violação da homeostase como, por exemplo, o aumento da taxa de proliferação, resistência a apoptose e a criação de um ambiente favorável ao crescimento celular. A instabilidade genética é uma característica de muitos tumores. Evidências experimentais sugerem que há apenas um pequeno grupo celular capaz de originar um tumor, essas células são chamadas de células-tronco neoplásicas (CTN) (REYA *et al.*, 2001).

As CTNs são consideradas células raras e com indefinido potencial de proliferação que dirigem a formação e crescimento dos tumores (REYA *et al.*, 2001). Em um modelo de tumor há um pequeno subconjunto de CTN, que constituem um reservatório de auto sustentação das células com habilidade exclusiva para auto renovação e manutenção do tumor (Figura 1). Essas CTNs têm a capacidade de dividir-se, expandir-se e diferenciar-se em células neoplásicas heterogêneas que, em muitos casos, constituem a estrutura do tumor (CLARKE *et al.*, 2006).

Figura 1 – Teoria das células-tronco neoplásicas. Dentre as células do tumor primário, há um pequeno grupo celular. Este grupo é responsável por resistir à quimioterapia e desenvolver metástase. (Adaptado:

<http://www.biopro.de/magazin/thema/03779/index.html?lang=en&artikelid=/artikel/03837/index.html>)



Ao contrário das células neoplásicas, diferem para formar novos tumores quando xenotransplantadas em modelos animais imunodeficientes. Uma limitação experimental relevante é a dificuldade dos pesquisadores em identificar e isolar as CTNs das outras células de um tumor. Entretanto, no quadro abaixo (Quadro 1) estão descritas as moléculas identificadas na literatura atual como marcadores de CTNs detectadas em diferentes neoplasias (R&D SYSTEMS, A BIOTECHNE BRAND, 2015).

Quadro 1: Lista de marcadores de células-tronco neoplásicas (CTN) (Adaptado de: <https://www.rndsystems.com/research-area/cancer-stem-cell-markers>).

| |
|--|
| Mama |
| Aldehyde Dehydrogenases 1-A1/ALDH1A1; BMI-1; CD24; CD44; Connexin 43/GJA1; CRCR4; DLL4; EpCAM/TROP1; ErbB2/Her2; GLI-1; GLI-2; IL-1 alpha/IL-1F1; IL-6 R alpha; CXCR1/IL-8 RA; Integrin alpha 6/CD49f; PON1; PTEN. |
| Cólon |
| ALCAM/CD166; Aldehyde Dehydrogenases 1-A1/ALDH1A1; CD44; DPPIV/CD26; EpCAM/TROP1; GLI-1; Lgr5/GPR49; Musashi-1. |
| Estômago |
| CD44; DLL4; Lgr5/GPR49. |
| Glioma e meduloblastoma |
| A20/TNFAIP3; ABCG2; Aldehyde Dehydrogenases 1-A1/ALDH1A1; BM1-1; CD15/Lewis X; CD44; CX3CLI/Fractalkine; CX3CR1; CXCR4; HIF- 2 alpha/EPAS1; IL-6 R alpha; Integrin alpha 6/CD49f; L1CAM; c-Maf; Musashi-1; c-Myc; Nestin; Podoplanin; SOX2. |
| Cabeça e Pescoço |
| ABCG2; Aldehyde Dehydrogenase 1-A1/ALDH1A1; BM1-1; CD44; HGF R/c-MET; Lgr5/GPR49. |
| Leucemia |
| BM1-1; CD34; CD38; CD44; CD47; CD96; CD117/c-kit; GLI-1; GLI-2; IL-3 R alpha/CD123; M1CL/CLEC12A; Musashi-2; TIM-3. |
| Fígado |

| |
|---|
| Alpha-Fetoprotein/AFP; Aminopeptidase N/CD13; CD45; CD45.1; CD45.2; CD90/Thy1; NF2/Merlin. |
| Melanoma |
| ABCB5; ABCG2; ALCAM/CD166; MS4A1/CD20; Nestin; NGF R/TNFRSF16. |
| Mieloma |
| ABCB5; CD19; CD27/TNFRSF7; CD38; MS4A1/CD20; Syndecan-1/CD138. |
| Osteossarcoma |
| ABCG2; CD44; Endoglin/CD105; Nestin; STRO-1. |
| Ovário |
| Alpha-Methylacyl-CoA Racemase/AMACR; CD44; CD117/c-kit; Endoglin/CD105; Ovastacin. |
| Pancreas |
| Aldehyde Dehydrogenase 1-A1/ALDH1A1; BM1-1; CD24; CD44; CXCR4; EpCAM/TROP1; PON1. |
| Próstata |
| ABCG2; ALCAM/CD166; Aldehyde Dehydrogenase 1-A1/ALDH1A1; alpha-Methylacyl-CoA Racemase/AMACR; BMI-1; CD44; CD151; c-Maf; c-Myc; TRA-1-60 (R). |

Ainda, é importante destacar que as CTNs presentes no Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço (CECP) têm sido consideradas responsáveis pelo comportamento agressivo dos tumores (PRINCE *et al.*, 2007). Prince e colaboradores (2007) desenvolveram um estudo cujo objetivo foi testar o potencial

tumorigênico de diferentes populações de CTNs em amostras humanas de CECP, implantadas no subcutâneo do dorso de camundongos. A imuno-histoquímica realizada com os marcadores das células basais Citoqueratina revelou que as células neoplásicas CD44+ (Marcador de superfície celular) têm uma morfologia celular primitiva, enquanto que as células neoplásicas CD44- se assemelham ao epitélio pavimentoso estratificado diferenciado e expressam o marcador de diferenciação involucrina. Os resultados demonstraram que as células CD44+ da população humana de Carcinoma Epidermóide (CE) possuem propriedades de células-tronco neoplásicas em ensaios funcionais para a auto renovação, diferenciação das CTNs e morfologia única que pode colaborar no diagnóstico de câncer.

Hildebrand e colaboradores (2014) desenvolveram um estudo cujo objetivo foi avaliar a distribuição dos marcadores de células-tronco neoplásicas CD44+ e ALDH1+ (Aldeído Desidrogenase, do inglês *Aldehyde dehydrogenases*) em duas diferentes áreas de CECP e também em epitélio saudável adjacente ao tumor. A amostra foi composta por 44 pacientes com CE primário. Foram utilizados os anticorpos Anti-CD44 e anti-ALDH1 para a avaliação imuno-histoquímica. Os resultados mostraram imunomarcção na área de invasão do tumor, também mostrou associação positiva com o tamanho do tumor, potencial de metástase, classificação histopatológica segundo o grau de diferenciação e progressão da doença. A expressão de CD44 foi heterogênea em todas as áreas. Os autores concluíram

que a imunomarcção de ALDH1 em epitélio de tumores invasivos e de regiões adjacentes ao tumor pode contribuir para a identificação de tumores mais agressivos relacionados às células-tronco neoplásicas.

2.2.1 Resistência a múltiplas drogas

O primeiro uso de agentes quimioterápicos para o tratamento do câncer ocorreu no século XX. Embora não tenha sido originalmente usado para isso, o gás de mostarda foi utilizado como uma arma química durante a Primeira Guerra Mundial, devido à sua potencial supressão da hematopoese (KRUMBHAAR, 1919). Com o passar dos anos, os agentes quimioterápicos foram aprimorados. Entretanto, em 1970, Biedler e Riehm, identificaram o desenvolvimento de resistência para Actinomycin-D em linhagens celulares de hamsters chineses. Os autores concluíram que houve diminuição da permeabilidade da membrana citoplasmática, que impediu a infusão do agente quimioterápico (BIEDLER; RIEHM, 1970). Atualmente, a quimioterapia ainda é utilizada como o tratamento de escolha contra uma variedade de cânceres. Sua efetividade continua, no entanto, limitada pela resistência das células às múltiplas drogas. Tornam-se insensitivas não apenas para a droga primária utilizada, mas também para outros agentes farmacológicos (GOTTESMAN, 2002).

A hipótese das CTNs indica que a célula iniciadora do câncer é uma célula-tronco alterada, que retém as propriedades

essenciais de auto-proteção através da atividade de resistência a múltiplas drogas, ou seja, da expressão da proteína de membrana celular Proteína Resistente a Multidrogas 1 (*Multidrug Resistance Protein 1*) (MRP1) (DONNENBERG; DONNENBERG, 2005). A MRP1, também conhecida como P-glicoproteína 1 (*P-glycoprotein 1*) (P-gp) é uma importante proteína da membrana celular que bomba substâncias estranhas para fora da célula. Portanto, essa proteína é uma bomba de efluxo Trifosfato de Adenosina-dependente (*Adenosine Triphosphate*) (ATP) com uma ampla especificidade de substrato (FLETCHER *et al.*, 2010).

Tsuzuki e colaboradores (1998) avaliaram a expressão de MRP1 em 115 casos de CECP. Trinta e quatro casos (30%) dos 115 de CECP expressaram a proteína. A quimiosensibilidade *in vitro* foi testada com cinco agentes quimioterápicos (cis-diamminedichloroplatinum, 5-fluorouracil, peplomycin, mitomycin C and Adriamycin) pela análise de ATP. Entretanto, nenhuma correlação entre a sensibilidade das células neoplásicas e a expressão de MRP1 foi encontrada. Os resultados sugerem que a resistência às drogas anticâncer não é dependente apenas da expressão de MRP1 em CECP.

2.3 Auto renovação das células-tronco

Um das mais importantes questões na biologia celular é compreender os mecanismos que regulam a auto renovação. A auto renovação é crucial para a função das células, porque

requer muitos tipos de células-tronco para persistir pelo tempo de vida ideal. Além disso, células-tronco de diferentes organismos podem variar em seu potencial de desenvolvimento, e todas regulam a balança entre auto renovação e diferenciação. É extremamente importante compreender o processo de regulação da auto renovação de células-tronco normais, pois este conhecimento é fundamental para o entendimento da proliferação de CTNs, as quais mostram uma proliferação desordenada (REYA *et al.*, 2001).

Os fatores de transcrição bHLH incluem a terceira maior família de fatores de transcrição reconhecida no genoma humano (TUPLER, PERINI e GREEN, 2001). Estes fatores são essencialmente reguladores do desenvolvimento e diferenciação por meio dos elementos de ligação ao DNA (MASSARI e MURRE, 2000). A classe I de homodímeros bLHL é amplamente expressa (desenvolvimento do músculo esquelético, neurogênese e hematopoese) e promove a ativação de genes antiproliferativos, tais como o Inibidor de Quinase Dependente de Ciclina (*Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor*) (CDKN1A, CDKN2A e CDKN2B) (YOKOTA e MORI, 2002). A Classe II de proteínas bHLH mostra expressão mais restrita e forma heterodímeros com a classe I de proteínas que guiam genes tecido-específicos. Além da indução combinada de genes tecido-específicos e genes antiproliferativos, a transcrição de fatores bHLH serve para a perpetuação da linhagem (WILLIAMS *et al.*, 2011).

2.4 Proteínas inibidoras da ligação de DNA

A família de Proteínas Inibidoras da Ligação de DNA (IDs) consiste em quatro membros, ID1, ID2, ID3 e ID4. Todas as quatro IDs pertencem à família bHLH de fatores de transcrição (PERK, IAVARONE, & BENEZRA, 2005). Essas proteínas IDs são expressas durante o desenvolvimento em várias células indiferenciadas e proliferativas (YOKOTA e MORI, 2002). Elas são reguladoras negativas de bHLH, que se ligam ao DNA e promovem a diferenciação de vários tipos de células. A ligação ao DNA de proteínas bHLH é limitada pela heterodimerização com inibição das IDs (Figura 2) (PERK, IAVARONE e BENEZRA, 2005).

Elevados níveis de IDs são observados em um amplo espectro de malignidades humanas, variando de carcinoma pancreático a neuroblastoma (PERK *et al.*, 2005). As IDs previnem a diferenciação celular, promovem o crescimento e sustentam o desenvolvimento do tumor. A expressão de proteínas ID por células-tronco e tumores sugerem que genes ID podem ser essenciais no desenvolvimento das células-tronco neoplásicas (CIARAPICA *et al.*, 2009).

As IDs são transcricionalmente induzidas por incontáveis fatores de crescimento, incluindo proteína morfogenética óssea, fator de crescimento epidermal, bem como ligações de receptores de células-T. ID1, ID2, e ID3, mas não ID4, são submetidas à ligação-K48 poliubiquitinação e subsequentemente à degradação pelo proteossomo 26S

(YOKOTA e MORI, 2002). Consequentemente, as IDs apresentam uma curta duração em muitos tecidos (BOUNPHENG *et al.*, 1999). Em tecidos adultos diferenciados normais, as proteínas IDs são escassas, mas são abundantes em tecidos em proliferação, incluindo embriogênico (YOKOTA e MORI, 2002).

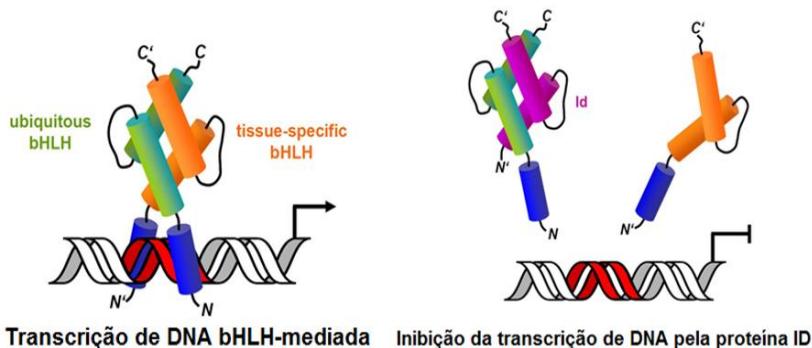
Langlands e colaboradores (2000) avaliaram a expressão de ID1, ID2, e ID3, em nível de Ácido Ribonucleico Mensageiro (*Messenger Ribonucleic Acid*) (mRNA), na proliferação de queratinócitos humanos *in vitro* com subsequente diminuição da regulação da diferenciação. Foi realizada a cultura celular com fragmentos de biópsia de CECP. Os estudos de imunoprecipitação demonstraram baixa reatividade cruzada entre ID e anticorpos. A análise imunohistoquímica de cortes de tecidos humanos identificou expressão citoplasmática de ID1, e nuclear de ID2 e ID3. Além disso, observou-se um padrão colunar de coloração ID2 e ID3, a qual pode estar relacionada com a proliferação epidérmica. Em CECP as proteínas ID imunorreativas foram observadas na maioria dos queratinócitos malignos de lesões pobremente diferenciadas, com expressão reduzida nas lesões bem diferenciadas.

Sumida e colaboradores (2013) realizaram um estudo objetivando determinar o papel das proteínas ID, particularmente ID1, durante a progressão de câncer de glândulas salivares humanas. Foram determinados os níveis de expressão de ID1 e ID2 em quatro linhagens celulares: dois adenocarcinomas e dois

carcinomas adenoides císticos. Foram usados construtos que expressam Ácido Desoxirribonucleico Complementar (*Complementary deoxyribonucleic acid*) (cDNAs) anti-senso para ID1 e ID2 a fim de bloquear a expressão destas proteínas em linhagens celulares, e determinar os efeitos da alteração sobre a proliferação celular, migração e invasão. A expressão de ID1, em nível de mRNA e proteína, foi detectada em todas as linhagens celulares, enquanto que a expressão de ID2 foi variável de ausente para alta. Estes resultados demonstram que ID1 tem um importante papel no controle de câncer de glândulas salivares, e sugere potencial como marcador de diagnóstico, prognóstico e progressão para esta lesão. A supressão de ID1 poderia representar uma nova e eficaz abordagem para o tratamento de câncer das glândulas salivares.

Zhao e colaboradores (2013) investigaram a expressão de ID1 associada com vários fatores clínico-histopatológicos em CEI. A expressão de ID1 foi avaliada através de imunohistoquímica em 76 amostras de CEI. Foi encontrada uma super expressão de ID1 (73,8%) na maioria das amostras avaliadas, e a expressão estava significativamente correlacionada com estágio clínico avançado, metástase e recorrência. Não foi observada relação aparente com sexo, idade, diferenciação e hábitos nocivos. As taxas de sobrevida dos pacientes com expressão aumentada de ID1 foram significativamente piores do que aqueles com baixa expressão dessa proteína. A inibição da expressão de ID1 pode melhorar a eficácia do tratamento de hipertermia em CEI.

Figura 2 - Ilustração da heterodimerização da ligação de Ácido Desoxirribonucleico (*deoxyribonucleic acid*) (DNA) ao *Basic-Helix-Loop-Helix* (bHLH) pela proteína Inibidora de Ligação de DNA (*Inhibitors of DNA binding*) (ID). (Adaptado de <http://www.uni-salzburg.at/index.php?id=25633>).



2.5 Ubiquitina

Este marcador de proteína por modificação pós-translacional é uma importante estratégia que permite à célula reagir dinamicamente às mudanças ambientais intracelulares causadas pela exposição a fatores de estresse, estímulos de crescimento ou sinais de diferenciação. Entre muitas possibilidades de modificações, a ubiquitinização é uma das mais frequentes, induzíveis e reversíveis modificações proteicas envolvidas em homeostase e sinalização celular. A ubiquitinização é a terceira etapa do processo que resulta na ligação da pequena proteína ubiquitina para lisar resíduos sobre o substrato de uma proteína (HAGLUND e DIKIC, 2005).

Originalmente descrita como um marcador de destruição das proteínas em desuso, a ubiquitina tem tido a sua participação reconhecida em muitos processos fundamentais, como o ciclo celular, reparo de DNA, endocitose, processamento de antígeno e apoptose. O papel da ubiquitina nestes processos não está restrito à marcação das proteínas para degradação, assim, permanentemente, muda sua função específica. A ubiquitina tem sido descoberta como um competente sinalizador, capaz de ser um gatilho para eventos moleculares na célula (HAGLUND e DIKIC, 2005).

2.6 Desubiquitinase (DUB)

A ubiquitinização proteica reversível está emergindo como um processo fundamental para a manutenção da homeostase celular. As enzimas que participam desse processo, em particular as desubiquitinases (DUBs), estão cada vez sendo mais consideradas como possíveis descobertas para a droga terapêutica ideal. O interesse em DUBs como alvos terapêuticos é ainda mais refletido pelo número impressionante de esforços para desenvolver e caracterizar inibidores de DUB usando inovadoras estratégias, tais como a síntese química de ubiquitina bioconjugada (OHAYON *et al.*, 2012).

As DUBs tem são importantes reguladores do processo de ubiquitinização. As células são submetidas a vários estresses e podem responder por meio de diferentes formas de ativação de vias que promovem a morte celular. O mecanismo de

apoptose depende do balanço entre a ubiquitinação e a desubiquitinação. Há um reconhecimento crescente de que DUBs desempenham um papel essencial na regulação de vários parceiros de ligação para modular o processo da apoptose (RAMAKRISHNA; BHARATHI; KWANG-HYUN, 2011)

DUBs humanos são consideradas um grupo de aproximadamente 100 proteínas, cujas funções e mecanismos de regulação celular permanecem, com algumas exceções, pouco caracterizados. Há evidências que suportam a teoria de que DUBs possuem um importante papel no desenvolvimento de câncer. Pelo menos seis diferentes DUBs (USP2a, USP4, USP7/HAUSP, USP10, USP29 e USP42) contribuem para regular a proteína supressora de tumor p53 (HOCK *et al.*, 2011).

Uma das melhores caracterizações de DUBs humanas é a ubiquitina-protease específica 1 (USP1), que tem um importante papel na resposta celular para o dano de DNA. Níveis de USP1, localização e atividade são modulados por meio de diversos mecanismos, incluindo interações proteicas, autoclivagem/degradação e fosforilação. Estes mecanismos asseguram que a função da USP1 seja realizada de uma maneira adequadamente regulada. No entanto, a expressão de USP1 é desregulada em certos tipos de câncer (GARCÍA-SANTISTEBAN *et al.*, 2013).

2.6.1 Proteínas do Complexo USP1/WDR48

A melhor função caracterizada da USP1 é como regulador de algumas importantes etapas na resposta a danos ao DNA (NIJMAN *et al.*, 2005) e no processo de Síntese de Translação (HUANG *et al.*, 2006). Em adição, recentes evidências sugerem que a USP1 pode contribuir para regular a proliferação em um contexto celular específico (WILLIAMS *et al.*, 2011). Esta enzima tem sido reportada por contribuir para o reparo de quebras de dupla-fitas de DNA, por meio de recombinação homóloga (MURAI *et al.*, 2011). A USP1 também pode ajudar, principalmente, a estabilizar o genoma (JONES, COLNAGHI, e HUANG, 2012).

Além dessas funções relacionadas com a reparação do DNA, a USP1 foi recentemente relatada por desubiquitinar e estabilizar três membros da família ID, ou seja, ID1, ID2 e ID3. Devido a essa função, USP1 contribui para prevenir a diferenciação mediada por bHLH e, assim, mantém as características das células-tronco em células neoplásicas, sugerindo que a USP1 estabiliza a proteína ID (WILLIAMS *et al.*, 2011).

Entretanto, o fator associado à USP1, WDR48, regula hermeticamente complexas atividades desta enzima. O WDR48 forma um complexo com a USP1 *in vivo*, e este complexo proteico tem alta atividade da enzima desubiquitinase, ao contrário da USP1 livre, que por si própria é inativa (COHN *et al.*, 2009). Além disso, a formação do complexo favorece uma seletividade desejada quando se objetiva estabelecer um alvo terapeutico, pois várias proteínas compõe a família de DUBs.

A desubiquitinase USP1 desempenha um importante papel no processo de oncogênese, tanto como resposta a danos no DNA, quanto na manutenção do estado indiferenciado das células no osteossarcoma. A desubiquitinase USP1 ativada é criticamente regulada pela interação com a proteína WDR48. A inibição da função do complexo USP1/WDR48 sensibiliza as células neoplásicas durante a quimioterapia, o que sugere que este complexo é um alvo terapêutico relevante (GARCIA-SANTISTEBAN, ZORROZA, e RODRIGUEZ, 2012).

Williams e colaboradores (2011) investigaram a expressão desse complexo em casos de osteossarcomas de linhagem humana e compararam com um tecido ósseo saudável. Os achados revelaram que os osteossarcomas expressaram mais USP1 mRNA do que o osso saudável. Os resultados do teste *Western blotting*, referente a outro grupo de osteossarcomas, apresentaram elevada expressão em 7 de 14 osteossarcomas quando comparados com três amostras de osso saudável. A quantidade de proteína USP1 está correlacionada com a abundância de mRNA, sugerindo uma super regulação transcricional. Esse estudo concluiu, principalmente, que a expressão de USP1 em células-tronco mesenquimais estabilizou proteínas ID, inibiu diferenciação osteoblástica e aumentou a proliferação. Essas observações implicam que USP1 mantém as células-tronco em estado indiferenciado o que caracterizou o osteossarcoma. Esse marcador tem potencial para ser um alvo terapêutico.

2.7 Proteína p53

Segundo Reya e colaboradores (2001) a proteína p53, a qual é codificada pelo gene supressor Proteína Tumoral p53 (*Tumor protein p53*) (TP53), também pode ser considerada um importante mecanismo de auto regulação das células-tronco neoplásicas. Esta proteína se liga a sequências específicas de DNA a fim de controlar, de forma positiva ou negativa, a expressão de diversos genes envolvidos no controle do ciclo celular. Assim, a proteína p53 é um fator de transcrição que controla a auto renovação neoplásica (HOCK *et al.*, 2011).

A estabilidade da p53 está hermeticamente regulada pela ubiquitina - degradação dependente, impulsionada principalmente pela ubiquitina ligase (*Murine Doble Minute 2*) (MDM2) (HOCK *et al.*, 2011). Quando ocorre a perda de função do gene de supressão tumoral TP53, ocorre a possibilidade de desenvolvimento do câncer. Esta proteína regula a atividade de vias de sinalização que levam a uma variedade de interrupções do ciclo celular, reparo do DNA, senescência ou apoptose acompanhada de exposição de células para estresse celular endógeno ou exógeno. Estes estresses que causam danos no DNA são de particular interesse. A p53 tem sido investigada em um amplo espectro de malignidades humanas, com mutações no gene p53 encontradas em mais de 50% dos cânceres. A condição do gene p53 em carcinomas está diretamente ligado com a sobrevida do paciente. Isso ocorre, em parte, como

consequência da reduzida possibilidade das células malignas entrarem em apoptose (SOUSSI, 2007).

Além dos mecanismos de auto regulação já consolidados na literatura, nos últimos anos têm-se relatado uma associação com a transição epitélio-mesênquima. Este processo torna as células epiteliais capazes de perderem a sua polaridade celular, bem como a adesão entre as células. Em contrapartida, este processo promove a migração celular e, conseqüentemente, aumenta a capacidade metastática do tumor. Sobretudo, a transição epitélio-mesênquima tem demonstrado influência sobre o fenótipo das células-tronco epiteliais (CHANG et al., 2011).

Chang e colaboradores (2011) realizaram um estudo utilizando abordagens genômicas. A proteína p53 exerceu um papel fundamental em regular tanto a transição epitélio-mesênquima quanto mesênquima-epitélio, através da ativação transcricional do microRNA (*microRibonucleic Acid*) miR-200c. A p53 ativa este microRNA através da ligação direta entre ambos. A perda de p53 em epitélio mamário, que foi o tecido estudado, leva à diminuição da expressão de miR-200c e ativa o programa de transição epitélio-mesênquima, acompanhado por um aumento na população de células-tronco de origem mamária. A reexpressão de miR-200 suprime genes que mediam a transição epitélio-mesênquima e as propriedades *stemness*, a terapia reverte o fenótipo mesênquima de *células-tronco like* causado pela perda de p53 para um fenótipo epitelial diferenciado. Portanto, a perda de p53 está correlacionada com a diminuição

no nível de miR-200c, conseqüentemente, está relacionada a um aumento na transição epitélio-mesênquima, nos marcadores de *stemness*, e no desenvolvimento de uma gradação tumoral mais severa segundo a classificação dos tumores de mama.

Percebe-se o aumento da prevalência e do espectro de mutações no gene TP53 durante a progressão do CEI em pacientes tabagistas. Quando comparado com pacientes que nunca fumaram, observa-se um número significativamente menor de mutações durante a expressão da proteína p53 (BARNES *et al.*, 2005).

Tandon e colaboradores (2010) realizaram uma revisão sistemática que objetivou utilizar a presença de mutações, ou super regulação de p53, como um fator de prognóstico para pacientes com CECP. Nos resultados percebeu-se que houve uma grande heterogeneidade entre as meta-análises da maioria dos estudos. Os valores de prognóstico para a p53 foram, geralmente, inconsistentes e inconclusivos entre os estudos. Por essa razão, mais estudos devem ser realizados (TANDON *et al.*, 2010).

2.8 Carcinoma Epidermóide Intrabucal

A OMS define CEI como uma neoplasia epitelial invasiva com vários graus de diferenciação histopatológica e uma alta propensão para metástase. Ocorre, principalmente, em homens com idade entre a quinta e sexta décadas de vida (BARNES *et al.*, 2005).

A apresentação clínica do CEI é muito variável, podendo se apresentar como uma úlcera exofítica ou endofítica, de superfície irregular, vegetante, papilar ou verruciforme e sua cor poderá variar da coloração normal ao vermelho ou branco. A superfície é frequentemente ulcerada e o tumor é endurecido à palpação. As lesões leucoplásicas, eritroleucoplásicas e eritroplásicas possuem um aspecto distinto do normal. Este aspecto clínico já pode se tratar do início de alterações celulares que têm o potencial para se transformar em um carcinoma (NEVILLE; DAY, 2002). O CEI, quando presente no lábio, possui como principal fator etiológico a exposição solar. Entretanto, quando o mesmo é intrabucal está diretamente relacionado a hábitos nocivos (etilismo e tabagismo) (BARNES *et al.*, 2005). A localização intrabucal mais comum é a língua, geralmente as superfícies ventral e posterior lateral são mais atingidas. Outros locais de predileção são assoalho de boca, palato mole/duro e gengiva (NEVILLE; DAY, 2002).

O TNM (classificação de tumores malignos) é um sistema criado pela União Internacional Contra o Câncer (UICC) para prever o prognóstico de vários tipos de câncer, dentre eles o CEI. Nessa classificação, o T representa o tamanho do tumor primário, N significa a presença de tumores metastáticos em linfonodos regionais e M significa a existência ou não de metástases à distância em algum outro local (UICC, 2004). Abaixo, podemos observar as subdivisões do TNM:

T - Tumor Primário

TX: O tumor primário não pode ser avaliado.

T0: Não há evidência de tumor primário.

Tis: Carcinoma *in situ*.

T1: Tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão.

T2: Tumor com mais de 2 cm e até 4 cm em sua maior dimensão.

T3: Tumor com mais de 4 cm em sua maior dimensão.

T4a: Tumor que invade estruturas adja-centes: cortical óssea, músculos profundos/extrínsecos da língua (genioglosso, hioglosso, palatoglosso e estiloglosso), seios maxilares ou pele da face.

T4b: Tumor que invade o espaço mastigador, lâminas pterigóides ou base do crânio ou envolve artéria carótida interna.

N - Linfonodos Regionais

NX: Os linfonodos regionais não podem ser avaliados.

N0: Ausência de metástase em linfonodos regionais.

N1: Metástase em um único linfonodo homolateral, com 3cm ou menos em sua maior dimensão.

N2: Metástase em um único linfonodo homolateral, com mais de 3 cm e até 6 cm em sua maior dimensão, ou em linfonodos homolaterais múltiplos, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão; ou em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão.

N2a: Metástase em um único linfonodo homolateral, com mais de 3 cm e até 6 cm em sua maior dimensão.

N2b: Metástase em linfonodos homolaterais múltiplos, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior imensão.

N2c: Metástase em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão.

N3 Metástase em linfonodo com mais de 6 cm em sua maior dimensão.

M - Metástase à Distância

MX: A presença de metástase à distância não pode ser avaliada.

M0: Ausência de metástase à distância.

M1: Metástase à distância.

Com a finalidade de tabulação e análise, exceto em grandes séries, é necessário condensar essas categorias num número conveniente de estádios TNM. O grupamento, conforme elucidado no quadro 2, deve assegurar, tanto quanto possível, que cada grupo seja mais ou menos homogêneo, em termos de sobrevida. Portanto, o estadiamento de um tumor reflete a extensão da doença e disseminação metastática. Esses são os melhores indicadores de prognóstico dos pacientes com CEI. Quanto maior for o estágio da classificação, pior será o prognóstico (UICC, 2004).

Quadro 2: Grupamento por estágios

| Grupamento por estágios | | | |
|-------------------------|------------|------------|----|
| Estádio 0 | Tis | N0 | M0 |
| Estádio I: | T1 | N0 | M0 |
| Estádio II: | T2 | N0 | M0 |
| Estádio III | T1, T2, | N1 | M0 |
| | T3 | N0 N1 | M0 |
| Estádio IVA | T1, T2, T3 | N2 | M0 |
| | T4a | N0, N1, N2 | M0 |
| Estádio IVB | Qualquer T | N3 | M0 |
| | T4b | Qualquer N | M0 |
| Estádio IVC | Qualquer T | Qualquer N | M1 |

A classificação do epitélio neoplásico pode ser feita em gradações de acordo com o quanto o tecido neoplásico lembra o seu tecido de origem, sendo que quanto mais diferente for, maior será sua gradação. Neste sentido as lesões podem ser classificadas em três gradações, sendo que a primeira representa um tecido neoplásico bem diferenciado (que lembra o tecido de origem), a terceira representa um tecido mais alterado, ou seja, pobremente diferenciado, sendo, muitas vezes, difícil a determinação de seu tecido de origem, e a segunda é uma fase intermediária entre a primeira e a última gradação, moderadamente diferenciado (BARNES *et al.*, 2005).

Juntos, a extensão, localização, gradação histológica e a presença de metástase determinam o tratamento que deve ser utilizado e o prognóstico da lesão (MUÑOZ HERRERA *et al.*,

2001). O CEI apresenta progressão rápida e é, na maioria das vezes, diagnosticado em fase avançada de desenvolvimento. Um diagnóstico precoce é essencial para um aumento da taxa de sobrevida, melhorando, assim, o quadro clínico dos pacientes com a doença (REIBEL, 2003).

3. JUSTIFICATIVA

A literatura científica apresenta estudos sobre a relação entre as proteínas p53, USP1 e WDR48 e a progressão de osteossarcomas (WILLIAMS *et al.*, 2011) e leucemias (MISTRY *et al.*, 2013). Contudo, não há relatos sobre a sua participação na progressão do CEI, bem como sobre a sua possível influência nos aspectos clínicos e histopatológicos desta lesão. Sabe-se que estas proteínas podem estar relacionadas com o processo de tumorigênese, bem como com a alta proliferatividade e inibição de diferenciação de células-tronco normais. Portanto, a investigação do complexo proteico USP1/WDR48 pode elucidar a possibilidade de utilização destas proteínas como um possível alvo terapêutico, além de ser um potencial determinante de progressão de lesões malignas. Partindo desse pressuposto, este trabalho pretende preencher essa lacuna no conhecimento e elucidar esses importantes questionamentos.

4. HIPÓTESE DO ESTUDO

A hipótese deste estudo é que há diferença entre o grupo teste, CEI, e o grupo controle (Hiperplasia Fibrosa - HF), no que se refere à expressão imuno-histoquímica dos marcadores p53, USP1 e WDR48. Além disso, existe relação entre estes marcadores e os dados clínico-histopatológico tumoral.

5. OBJETIVOS

5.1 Objetivo geral

Analisar a expressão imuno-histoquímica das proteínas p53, USP1 e WDR48 e sua associação com os dados clínicos e histopatológicos em casos de CEI.

5.2 Objetivos específicos

- Avaliar o padrão de expressão da proteína relacionada ao ciclo celular p53.
- Analisar o padrão de expressão imuno-histoquímico do complexo de proteínas WDR48/USP1.
- Relacionar a gradação histopatológica dos CEIs com a quantificação da expressão das proteínas mencionadas.

- Verificar a associação entre os dados clínicos referentes às amostras analisadas e a quantificação da expressão das proteínas em estudo.

6 METODOLOGIA

6.1 Delineamento do estudo

O estudo proposto é de natureza básica, observacional descritivo retrospectivo. Os resultados foram avaliados de forma quantitativa e acompanhados por uma descrição morfológica.

6.2 Aspectos éticos e legais

O presente estudo foi submetido para apreciação pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), tendo recebido parecer favorável (CAAE 42380814.1.0000.0115) (Anexo A). Para a análise dos prontuários, o estudo também foi submetido ao Comitê Avaliador do Hospital Universitário – HU/UFSC, que também foi favorável à execução da pesquisa.

6.3 Seleção das amostras

Realizou-se um levantamento dos casos diagnosticados como CE intrabucais, com base nos laudos histopatológicos do Laboratório de Patologia (LBP-UFSC). Também foram

selecionados casos de Hiperplasia Fibrosa (HF), como controle de tecido epitelial não neoplásico. Para obter o número de casos ideal para cada grupo, optou-se por realizar um cálculo amostral, por meio do teste Qui-quadrado de Pearson, que determinou o número de 30 casos de CEI e 40 casos de HF.

Foram selecionados os blocos de parafina contendo fragmentos de tecido obtidos através de biópsia, incisional ou excisional, com fichas de biópsia adequadamente preenchidas e com os laudos correspondentes. Além disso, para ser incluído na amostra, o material biológico deveria:

- Ter sido devidamente fixado em formol 10% por no mínimo 1 dia e no máximo 5 dias.

- Conter tecido suficiente para análise sem esgotar completamente o material biológico do caso.

Deste modo, foram excluídos da amostra todos os casos que não preencheram esses requisitos.

6.4 Levantamento dos dados imuno-histoquímicos

6.4.1 Procedimentos Laboratoriais

As reações de imuno-histoquímica foram realizadas no laboratório de pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO-UFSC).

As amostras selecionadas foram submetidas à técnica de imuno-histoquímica pelo método da estreptavidina-biotina-

peroxidase, utilizando os anticorpos anti-antígeno humano p53, USP1 e WDR48 (Tabela 1).

Tabela 1 – Descrição das características dos anticorpos utilizados nas reações de imuno-histoquímica.

| Marca | Especificidade | Origem | Padrão de coloração | Controle positivo |
|----------------------|----------------|--------------------------|----------------------------|-------------------|
| Sigma-Aldrich | Anti-p53 | Monoclonal de camundongo | Nuclear | Cérebro |
| Abcam | Anti-USP1 | Policlonal de coelho | Nuclear/ Citoplasmática | Placenta |
| Sigma-Aldrich | Anti-WDR48 | Policlonal de coelho | Núcleo/ citoplasmática | Cólon |

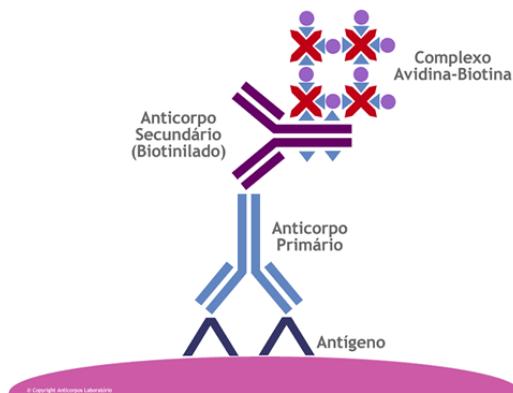
Foram realizados cortes teciduais de 3µm de espessura, montados em lâminas preparadas com solução de ATPS (3-aminopropyltriethoxysilene). Os cortes foram inicialmente fixados na lâmina mantendo-as em estufa a 65°C, durante 3 horas. Após, as lâminas foram submetidas a dois banhos de xilol em temperatura ambiente (no primeiro banho foram imersas *overnight* e, no segundo, durante 20 minutos). Posteriormente, foram realizados três banhos em soluções decrescentes de álcool etílico (absoluto, 95% e 85%), seguidos de dois banhos em água destilada, todos de 5 minutos cada. As lâminas foram imersas em solução para bloqueio da peroxidase endógena (80ml de álcool metílico + 20ml de Peróxido de Hidrogênio - H₂O₂), com dois banhos de 20 minutos cada.

A reativação antigênica foi realizada mantendo as lâminas em solução de tampão citrato 0,01M, pH 6,0, em banho-maria com a temperatura constante de 96°C, durante 40 minutos. Os sítios não específicos foram bloqueados com leite desnatado (5%) em solução de tampão fosfato-salino (PBS) por 40 min. A incubação com os anticorpos primários (p53, USP1 e WDR48) foi realizada em câmara úmida mantida sob refrigeração (4 a 8°C), durante 18 horas.

Para amplificação da reação foi utilizado o kit de marcação Estreptavidina Biotina (*labelled streptavidin biotin*) (LSAB) - Dako, que consta de soro secundário policlonal e do soro terciário streptavidina-biotina com peroxidase conjugada. A revelação da reação foi realizada através de solução cromógena, contendo diaminobenzidina (DAB) em tampão Tris-HCl 0,05M, pH 7,4, e adicionando peróxido de hidrogênio a 0,3% (Figura 3). Após a revelação, foi realizada a contra coloração dos cortes com hematoxilina de Harris (40 segundos), seguido de desidratação em cadeias de concentração crescentes de etanol (etanol 50% a etanol absoluto), diafanização em xilol e montagem com Entellan (Merck, Alemanha). Após montadas, as lâminas foram mantidas em estufa (40°C) por, no mínimo, 24 horas, antes de serem examinadas ao microscópio de luz.

O controle negativo das reações foi realizado pela abolição do anticorpo primário, enquanto que o controle positivo foi procedido de acordo com as orientações dos fabricantes dos anticorpos (Tabela 1).

Figura 3: Ilustração do método Avidina - Biotina. Adaptado de (<http://www.anticorpos.com.br/exames/imuno-histoquimica.aspx>).



6.4.2 Análise imuno-histoquímica

As lâminas foram examinadas por meio de um microscópio, com câmera digital para documentação acoplada, em uma magnitude final de 400X.

Para cada anticorpo, em cada caso, foi avaliada a frequência e o local de marcação, bem como a análise quantitativa da expressão.

Foram consideradas positivas as células que tiveram marcação castanha no núcleo/citoplasma, independentemente da intensidade (Tabela 1), excluindo as células inflamatórias. Para cada caso foram fotografados cinco campos microscópicos equidistantes. A imunopositividade das células epiteliais foi obtida pela média de células coradas nestes cinco campos.

Todas as contagens foram realizadas com auxílio do software *NIH ImageJ 1.36b* (*National Institutes of Health, Maryland, EUA*).

As informações obtidas nas análises foram armazenadas em uma planilha do software *Microsoft Excel®* (*Microsoft Office Corporation, EUA*). Posteriormente, foram organizadas através do software *EpiData3.1* (*JM Lauritsen, Dinamarca*) para análise estatística.

6.5 Levantamento dos dados clínicos

A verificação dos dados clínicos das amostras selecionadas foi realizada através da análise das fichas de biópsia, laudos arquivados no LPB/UFSC e dos prontuários arquivados no Hospital Universitário/UFSC. Os dados avaliados foram:

- A) Em relação ao paciente: idade, sexo, etnia e hábitos deletérios (tabagismo e etilismo).
- B) Em relação à lesão: localização, TNM, tratamento (quimioterapia, radioterapia e cirurgia), recidiva e metástase.

Foi confeccionada uma base de dados digital para o armazenamento dessas informações para posterior análise descritiva de todos os itens. A análise estatística do estadiamento das lesões (TNM) foi realizada com o intuito de relacionar esta variável com a expressão dos marcadores

estudados e, conseqüentemente, determinar algum possível valor de prognóstico.

6.6 Gradação histológica

Bryne e colaboradores (1989) propuseram uma classificação histopatológica para os CEIs. Entretanto, mais tarde, em 1992, estes mesmos autores propuseram uma adaptação dessa ferramenta em função da inconcordância que a quantificação de mitoses gerava, pois, primeiramente, esse item era considerado. Na adaptação proposta, o número de mitoses foi desconsiderado. Para este estudo, as amostras de CEI foram histopatologicamente graduadas usando a adaptação do sistema de gradação (Quadro 3). Um observador calibrado (Patologista com mais de dez anos de experiência), que obteve valores de Kappa para concordância intra-examinador superiores a 0.7, realizou as análises.

É importante destacar que para esse estudo foram utilizados fragmentos de tecido oriundos de biópsia excisionais, mas, principalmente, incisionais. Esse ocorrido pôde ter significado uma limitação na hora da classificação histopatológica, tendo em vista que na maioria das vezes foi possível observar parcialmente o tumor.

A análise estatística da gradação histopatológica foi realizada com o intuito de relacionar esta variável com a expressão dos marcadores estudados e, conseqüentemente, também determinar algum possível valor de prognóstico.

Quadro 3: Adaptação de classificação histopatológica proposta por Bryne e colaboradores (1992)

| | 1 | 2 | 3 | 4 |
|--------------------------------|---|--|---|---|
| Grau de queratinização | Intenso >50% de células produtoras de queratina | Moderado 20-50% de células produtoras de queratina | Discreto 5-25% de células produtoras de queratina | Ausente 0-5% de células produtoras de queratina |
| Pleomorfismo nuclear | Discreto >75% de células maduras | Moderado 50-75% de células maduras | Intenso 25-50% de células maduras | Extremo 0-25% das células maduras |
| Padrão de invasão | Bordos infiltrantes bem delimitados | Cordões sólidos ou ilhotas | Pequenos grupos ou cordões de células infiltrantes | Dissociação celular difusa em pequenos grupos e/ou células solitárias |
| Infiltrado inflamatório | Intenso | Moderado | Leve | Nenhum |
| Bem diferenciado | Moderadamente diferenciado | | Pobrememente diferenciado | |
| 4-8 | 9-12 | | 13-16 | |

6.7 Análise estatística

Os dados foram analisados pelo *software Stata13.1* (*Stata Corporation, Texas, USA*) utilizando-se o teste estatístico *Kruskal-Wallis*, sendo este uma alternativa não paramétrica para o ANOVA. Os resultados foram expressos como média da porcentagem de células coradas \pm os desvios padrão da média.

Valores de P menores a 0,05 ($p < 0,05$) foram considerados estatisticamente significantes.

6.8 Relação entre achados imuno-histoquímicos, clínicos e histopatológicos

A partir da obtenção dos resultados da análise imuno-histoquímica, do ponto de vista quantitativo e morfológico, esses achados foram comparados às informações clínicas e histopatológicas, a fim de verificar a existência de uma relação entre o padrão de expressão proteica e a progressão dos respectivos tumores. Para comprovar a existência de alguma correlação estatística, o teste Kruskal-Wallis foi aplicado, levando-se em consideração o mesmo nível de significância ($p < 0,05$).

7 RESULTADOS

7.1 Análise microscópica observacional da expressão dos marcadores

A expressão das proteínas p53, USP1 e WDR48, em tecido neoplásico (CEI) e não neoplásico (HF), foi verificada por meio da utilização dos seus respectivos marcadores. Além da quantificação da imunolocalização das proteínas de escolha, os achados foram submetidos a uma análise observacional do padrão de expressão.

7.1.1 p53

A expressão desse marcador foi predominantemente nuclear. Entretanto, o grau de coloração das células marcadas foi diferente entre o CEI e a HF, sendo que nos casos de CEI os núcleos apresentaram-se extremamente mais acastanhadas do que na HF. Em relação à distribuição das células marcadas, nos casos de CEI observou-se um padrão mais difuso, com uma leve tendência a marcação de células localizadas, principalmente, na periferia das ilhas de epitélio neoplásico. Quando comparado com o padrão de expressão da HF, observaram-se algumas diferenças. Na HF a expressão tendeu a se concentrar mais no terço médio do epitélio, a camada basal apresentou algumas células com o núcleo corado, mas não ocorreu com predominância. O terço superior do epitélio raramente apresentou algum tipo de expressão (Figura 4, A-B).

7.1.2 USP1

Com relação a este marcador, a expressão foi difusa e, portanto, atingiu tanto o citoplasma quanto o núcleo. O padrão de imunolocalização entre as proteínas p53 e USP1, em alguns casos, foi extremamente semelhante, com uma maior tendência de marcação nuclear na periferia de ninhos e cordões de epitélio neoplásico. Em contrapartida, alguns casos também apresentaram um padrão de expressão com predominância de

marcação citoplasmática. Ambas características foram observadas nos casos de CEI.

O padrão de expressão da proteína USP1 em HF segue o mesmo perfil do padrão relatado no marcador p53. A expressão tendeu a se concentrar mais no terço médio do epitélio, a camada basal apresentou algumas células com o núcleo corado, mas não ocorreu com predominância. O terço superior do epitélio raramente apresentou algum tipo de expressão. Não observou-se diferença entre o grau de coloração das células marcadas nos casos de CEI e HF (Figura 4, C-D).

7.1.3 WDR48

Assim como na USP1, a expressão desse marcador apresentou-se nuclear e citoplasmática, mas a expressão nuclear isolada não foi comumente encontrada. A expressão do WDR48 ocorreu preferencialmente na periferia das ilhas e cordões de epitélio neoplásico, assim como nos dois marcadores anteriores. Entretanto, a sua expressão, quando citoplasmática, foi peculiar, com um aspecto “salpicado” (marcação em *dotz* paranuclear).

Dois casos de CEI apresentaram um padrão de marcação diferente. Nesses dois casos, a expressão do marcador WDR48 foi predominantemente nuclear, sem nenhuma relação com o citoplasma. Não encontrou-se nenhuma correlação desse perfil de expressão do WDR48 com os outros marcadores ou com os dados clínicos dos pacientes.

Quando comparado com os casos de HF, o padrão “salpicado” também foi encontrado (Figura 5). Entretanto, a expressão teve predominância no terço inferior do epitélio. A coloração das células nos casos de HF foi mais sutil quando comparada com os casos de CEI.

Em uma análise comparativa observacional, os casos de CEI, expressando USP1, WDR48 e p53, apresentaram uma relação entre si, quando avaliada a expressão apenas nuclear. Dos 30 casos avaliados, apenas dois apresentaram uma alta expressão nuclear de USP1, sendo que estes mesmos casos também mostraram as mais altas expressões de WDR48 e p53. Essa relação foi encontrada apenas nos casos de CEI (Figura 4, E-F). Não se observou nenhum dado clínico ou histopatológico que seja capaz de justificar tal achado.

Figura 4 - Padrão de expressão dos marcadores p53, USP1 e WDR48 em Carcinoma Epidermóide Intrabucal (CEI) (A, C e E) e Hiperplasia Fibrosa (HF) (B, D e F). Magnificação de 400x.

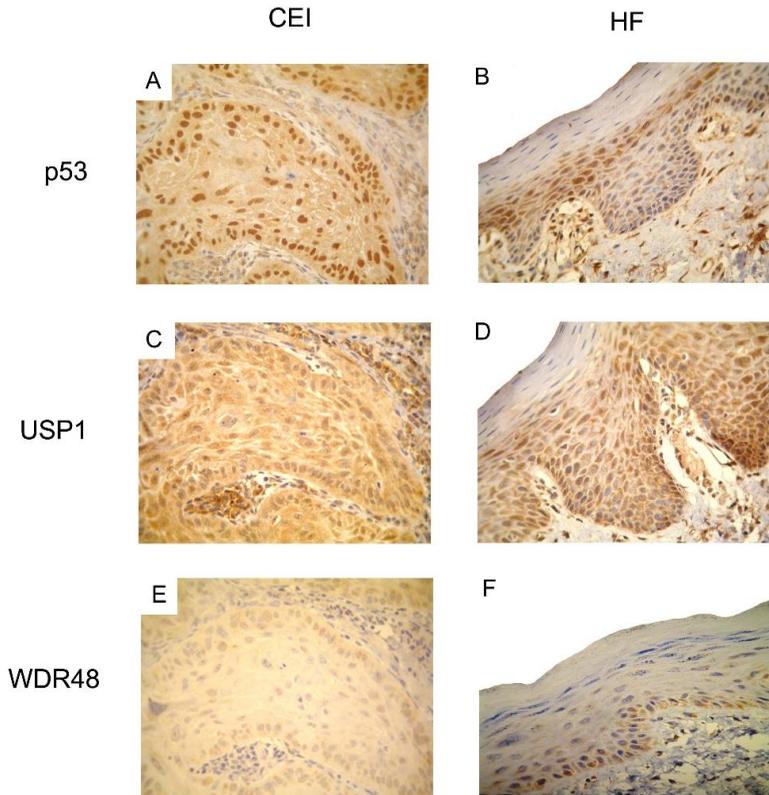
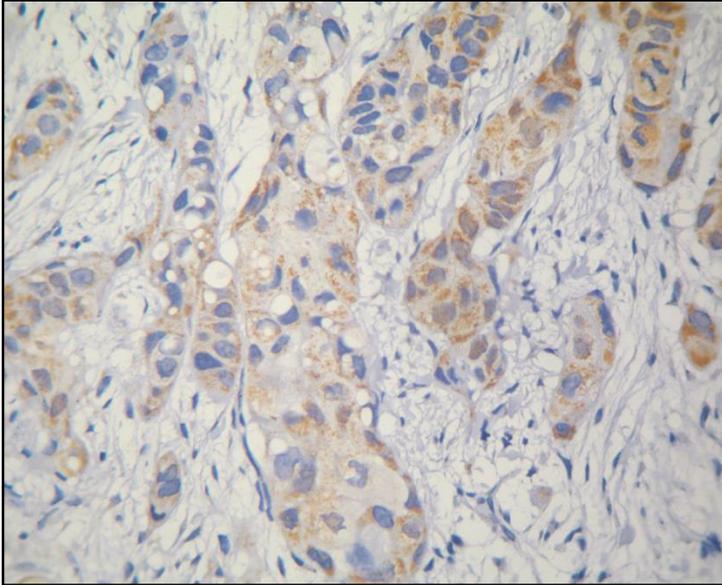


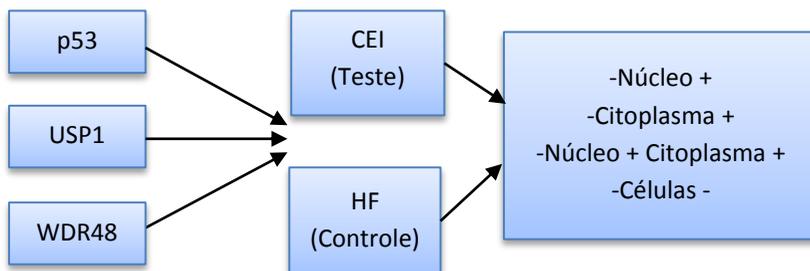
Figura 5: Expressão citoplasmática do marcador WDR48, casos de Carcinoma Epidermóide Intrabucal (CEI), com aspecto “salpicado”. Magnificação de 400x.



7.2 Análise quantitativa da expressão dos marcadores

Os dados foram analisados a partir dos grupos formados de acordo com cada variável: lesão (CEI e HF), marcador (p53, USP1, WDR48) e local (núcleo+; citoplasma+; núcleo e citoplasma+ e células-) (Figura 6). Teve-se como hipótese a igualdade de médias entre as variáveis. No entanto, a hipótese de igualdade foi rejeitada se o p-valor < 0,05.

Figura 6- Identificação dos grupos do estudo



7.2.1 Especificação de valores

A Tabela 2 apresenta as especificações para os valores de expressão do marcador p53, tanto em CEI quanto em HF, cuja localização foi nuclear. Também contabilizou-se as células que não obtiveram nenhuma expressão. Para este marcador não foi considerada a expressão citoplasmática, pois a sua função é estritamente nuclear.

Tabela 2- Especificação dos valores de expressão para o marcador p53 em Carcinoma Epidermóide Intrabucal (CEI) e Hiperplasia Fibrosa (HF) e a respectiva percentagem de células positivas e negativas.

| | <i>Local</i> | <i>Lesão</i> | <i>n</i> | <i>média</i> | <i>DP</i> | <i>%</i> |
|------------|--------------|--------------|----------|--------------|-----------|----------|
| p53 | Núcleo + | CEI | 30 | 191,9 | 88,1 | 62,3 |
| | | HF | 40 | 84,1 | 63,2 | 35,6 |
| | Células - | CEI | 30 | 112,5 | 96,5 | 37,6 |
| | | HF | 40 | 155,2 | 65,7 | 64,3 |

A Tabela 3 mostra os valores de expressão do marcador USP1, tanto em CEI quanto em HF, cuja localização foi núcleo, citoplasma ou ambos. Também contabilizou-se as células que não obtiveram nenhuma expressão.

Tabela 3- Especificação dos valores de expressão para o marcador USP1 em Carcinoma Epidermóide Intrabucal (CEI) e Hiperplasia Fibrosa (HF) e a respectiva percentagem de células positivas e negativas.

| | <i>Local</i> | <i>Lesão</i> | <i>n</i> | <i>média</i> | <i>DP</i> | <i>%</i> |
|-------------|--------------------------|--------------|----------|--------------|-----------|----------|
| USP1 | Núcleo + | CEI | 30 | 3,4 | 12,6 | 1,16 |
| | | HF | 40 | 2,7 | 7,2 | 1,14 |
| | Citoplasma + | CEI | 30 | 154 | 124,6 | 49,7 |
| | | HF | 40 | 78,2 | 58,7 | 33 |
| | Núcleo e Citoplasma + | CEI | 30 | 139 | 63,9 | 45,8 |
| | | HF | 40 | 119,8 | 60,2 | 50,6 |
| | Células - | CEI | 30 | 9,4 | 15,0 | 3,16 |
| | | HF | 40 | 35,8 | 45,5 | 15,1 |

Na tabela 4 são apresentadas as especificações para os valores de expressão do marcador WDR48, tanto em CEI quanto em HF, cuja localização é núcleo, citoplasma ou ambos.

Também contabilizou-se as células que não obtiveram nenhuma expressão.

Tabela 4- Especificação dos valores de expressão para o marcador WDR48 em Carcinoma Epidermóide Intrabucal (CEI) e Hiperplasia Fibrosa (HF) e a respectiva percentagem de células positivas e negativas.

| | <i>Local</i> | <i>Lesão</i> | <i>n</i> | <i>Média</i> | <i>DP</i> | <i>%</i> |
|--------------|--------------------------|--------------|----------|--------------|-----------|----------|
| WDR48 | Núcleo + | CEC | 30 | 9,11 | 28,6 | 2,61 |
| | | HF | 40 | 0,04 | 0,22 | 0,01 |
| | Citoplasma + | CEC | 30 | 217,2 | 143,9 | 62,38 |
| | | HF | 40 | 179,8 | 96,5 | 66,5 |
| | Núcleo e Citoplasma + | CEC | 30 | 5,7 | 16,5 | 1,63 |
| | | HF | 40 | 1,7 | 3,9 | 0,62 |
| | Células - | CEC | 30 | 116,2 | 144,0 | 33,30 |
| | | HF | 40 | 87,5 | 69,5 | 32,7 |

7.2.2 Comparação entre os marcadores (p53, USP1 e WDR48)

Na análise da média de expressão dos três marcadores (p53, USP1 e WDR48) comparados entre si, em uma mesma lesão, ou seja, CEI ou HF, observou-se diferença estatisticamente significativa entre todos os grupos (Tabela 5 e Gráfico 1):

CEI

-Núcleo +: p53 > USP1 < WDR48 < p53

-Citoplasma +: USP1 < WDR48

-Núcleo e Citoplasma +: USP1 > WDR48

-Células -: p53 > USP1 < WDR48 > p53

HF

-Núcleo +: p53 > USP1 > WDR48 < p53

-Citoplasma +: USP1 < WDR48

-Núcleo e Citoplasma +: USP1 > WDR48

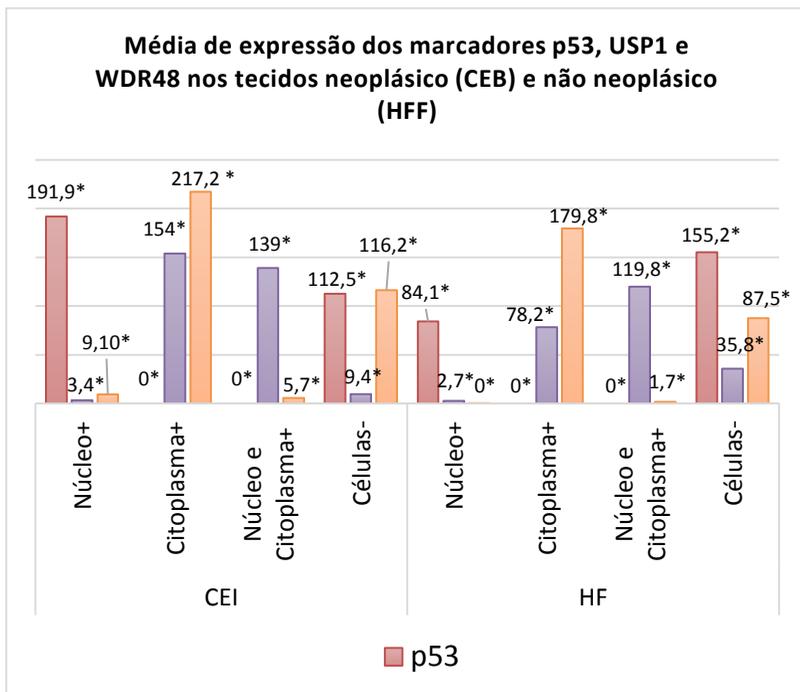
-Células -: p53 > USP1 < WDR48 < p53

Tabela 5- Média de expressão dos marcadores p53, USP1, WDR48, comparados entre si, em uma mesma lesão, Carcinoma Epidermóide Intrabucal (CEI) ou Hiperplasia Fibrosa (HF).

| | | <i>Lesão</i> | <i>Local</i> | <i>P</i> |
|---------------------------|------------|--------------|-----------------------|----------|
| P53 X USP1 X WDR48 | CEI | | Núcleo + | 0.0001* |
| | | | Citoplasma + | 0.0001* |
| | | | Núcleo e Citoplasma + | 0.0001* |
| | | | Células - | 0.0001* |
| | | | Local | P |
| | HF | | Núcleo + | 0.0001* |
| | | | Citoplasma + | 0.0001* |
| | | | Núcleo e Citoplasma + | 0.0001* |
| | | Células - | 0.0001* | |

*para valores P significativos

Gráfico 1- Média de expressão dos marcadores p53, USP1, WDR48, comparados entre si, em uma mesma lesão, Carcinoma Epidermóide Intrabucal (CEI) ou Hiperplasia Fibrosa (HF).



*para valores P significativos

7.2.3 Comparação entre as lesões (CEI e HF)

Na análise da média de expressão dos três marcadores (p53, USP1 e WDR48), comparados com os seus análogos, em diferentes lesões, ou seja, HF ou CEI, observou-se diferença estatisticamente significativa entre quatro grupos (Tabela 6 e gráfico 2):

-Núcleo + (p53): CEI > HF

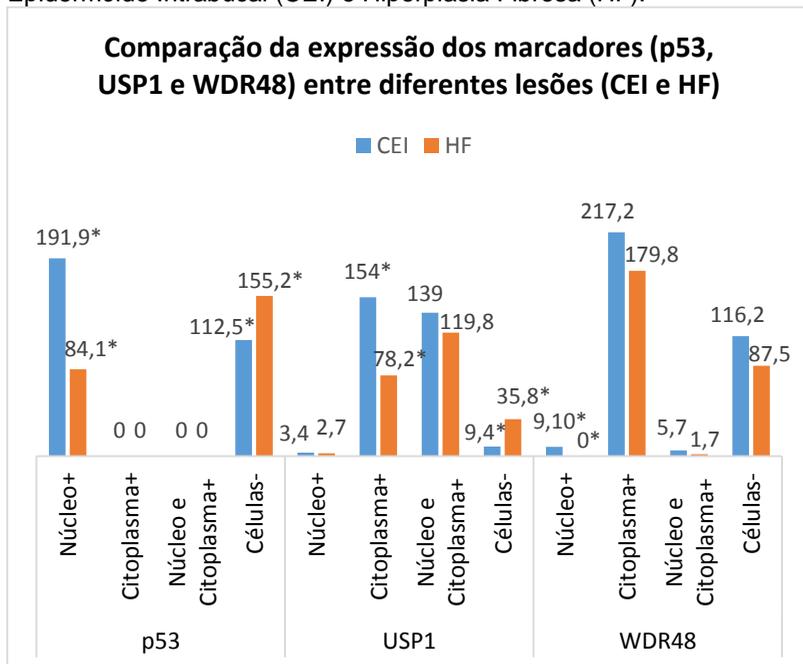
- Células - (p53): CEI < HF
- Citoplasma + (USP1): CEI > HF
- Células - (USP1): CEI < HF
- Núcleo + (WDR48): CEI > HF

Tabela 6- Média de expressão dos marcadores p53, USP1, WDR48, comparados com os seus análogos, em diferentes lesões, Carcinoma Epidermóide Intrabucal (CEI) e Hiperplasia Fibrosa (HF).

| | <i>Local</i> | <i>p53</i> | <i>USP1</i> | <i>WDR48</i> |
|-----------------|-----------------------|---------------|-------------|--------------|
| | | P | P | P |
| HF X CEI | Núcleo + | 0.0000* | 0.3171 | 0.0413* |
| | Citoplasma + | Sem resultado | 0.0010* | 0.2496 |
| | Núcleo e Citoplasma + | Sem resultado | 0.3275 | 0.1810 |
| | Células - | 0.0028* | 0.0000* | 0.7040 |

*para valores P significativos

Gráfico 2- Média de expressão dos marcadores p53, USP1, WDR48, comparados com os seus análogos, em diferentes lesões, Carcinoma Epidermóide Intrabucal (CEI) e Hiperplasia Fibrosa (HF).



*para valores P significativos

7.3 Dados clínicos tumorais

Na tabela abaixo (Tabela 7), observa-se a descrição e quantificação das características clínicas dos pacientes que desenvolveram CEI. Para maiores informações, observar o Apêndice A e B.

Tabela 7- Características clínicas correspondentes às amostras de Carcinoma Epidermóide Intrabucal (CEI).

| CEI | |
|--------------------|--|
| <i>Idade</i> | 59,8 (média) |
| <i>Sexo</i> | 27 (Homens); 3 (Mulheres) |
| <i>Etnia</i> | 26 (Leucoderma); 3 (Melanoderma); 1 (Feoderma) |
| <i>Tabagismo</i> | 26 (sim); 4 (não) |
| <i>Etilismo</i> | 20 (sim); 10 (não) |
| <i>Localização</i> | 8 (assoalho de boca); 6 (língua); 5 (rebordo alveolar); 4 (trígono retromolar); 3 (mucosa jugal); 2 (sublingual); 2 (palato mole). |

7.3.1 Correlação entre a expressão dos marcadores e o estadiamento (TNM)

Na tabela seguinte (Tabela 8), observa-se a média de expressão de cada marcador associada com o estadiamento (TNM) dos casos de CEI. Entretanto, não observou-se diferença estatisticamente significativa entre nenhum grupo.

Tabela 8- Correlação entre o estadiamento das amostras de Carcinoma Epidermóide Intra Bucal (CEI) e a expressão dos marcadores p53, USP1 e WDR48.

| Estágio | I n=2 | II n=2 | III n=5 | IV n=7 | p valor |
|------------------------------|-----------------|------------------|-------------------|------------------|----------------|
| Núcleo + | | | | | |
| p53 | 175,4 | 162 | 201,9 | 175,8 | 0.9178 |
| USP1 | 0 | 0,1 | 5,7 | 0 | 0.7596 |
| WDR48 | 0 | 0 | 27,8 | 0 | 0.9427 |
| Citoplasma + | | | | | |
| p53 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.0000 |
| USP1 | 170 | 90 | 70,8 | 125,4 | 0.1834 |
| WDR48 | 328,5 | 55,5 | 184,8 | 215,5 | 0.1270 |
| Núcleo e Citoplasma + | | | | | |
| p53 | 0 | 0 | 0 | 0 | 1.0000 |
| USP1 | 121 | 112,3 | 171,8 | 118,2 | 0.3633 |
| WDR48 | 0,8 | 0 | 1,6 | 12,3 | 0.7152 |
| Células - | | | | | |
| p53 | 128,7 | 74,6 | 56,2 | 102,9 | 0.3205 |
| USP1 | 0 | 7 | 17,12 | 6,3 | 0.5678 |
| WDR48 | 0 | 170,2 | 83,9 | 111,6 | 0.1152 |

7.4 Gradação histopatológica

A análise dos casos estudados para determinação do grau de diferenciação histopatológica dos CEIs, seguindo a

adaptação dos critérios proposta por Bryne e colaboradores (1992), resultou em 7 casos bem diferenciados, 19 casos moderadamente diferenciados e 4 casos pobremente diferenciados. Após a análise estatística, observou-se apenas uma diferença relevante, sendo esta correspondente às médias da expressão de USP1 (núcleo + citoplasma). Constatou-se que a expressão de USP1 em CEIs bem diferenciados foi a menor obtida (Tabela 9).

Tabela 9- Correlação entre a gradação histopatológica das amostras de Carcinoma Epidermóide Intra-bucal (CEI) e a expressão dos marcadores p53, USP1 e WDR48.

| | | <i>Bem diferenciados</i> | | <i>Moderadamente diferenciados</i> | | <i>Pobremente diferenciados</i> | |
|---------------------|----------|--------------------------|--------------|------------------------------------|--------------|---------------------------------|--------------|
| P53 | | | | | | | |
| | P | n | média | n | média | n | média |
| <i>Núcleo +</i> | 0.6740 | 7 | 174,8 | 19 | 197,5 | 4 | 195,2 |
| <i>Citoplasma +</i> | 0 | 7 | 0 | 19 | 0 | 4 | 0 |
| <i>Núcleo e</i> | | | | | | | |
| <i>Citoplasma +</i> | 0 | 7 | 0 | 19 | 0 | 4 | 0 |
| USP1 | | | | | | | |
| | P | n | média | n | média | n | média |
| <i>Núcleo +</i> | 0.9490 | 7 | 0 | 19 | 4,8 | 4 | 2,75 |
| <i>Citoplasma +</i> | 0.3038 | 7 | 113 | 19 | 181,9 | 4 | 92,7 |
| <i>Núcleo e</i> | 0.0105 | | | | | | |
| <i>Citoplasma +</i> | * | 7 | 85,1 | 19 | 156,7 | 4 | 148,9 |
| WDR48 | | | | | | | |
| | P | n | média | n | média | n | média |
| <i>Núcleo +</i> | 0.9758 | 7 | 10,6 | 19 | 10,4 | 4 | 0,2 |
| <i>Citoplasma +</i> | 0.2831 | 7 | 143,4 | 19 | 247,9 | 4 | 200,9 |
| <i>Núcleo e</i> | | | | | | | |
| <i>Citoplasma +</i> | 0.9813 | 7 | 11,7 | 19 | 4,2 | 4 | 1,85 |

*para valores P significativos

8. DISCUSSÃO

Desde o surgimento da teoria das CTNs como um fator chave para explicar a progressão do câncer, o padrão de expressão de vários marcadores destas células tem sido estudado em tecidos neoplásicos (conforme relatado no Quadro 1) para determinar a sua correlação com o prognóstico do paciente (LEE *et al.*, 2015).

Neste estudo, a expressão das proteínas p53, USP1 e WDR48 foi imuno-histoquimicamente investigada em espécimes de biópsias de 30 pacientes com CEI (grupo teste) e 40 pacientes com HF (grupo controle). Vale ressaltar que HF não é o melhor tecido para se utilizar como grupo controle, pois apresenta componente inflamatório variável. No entanto, frente à ausência de mucosa normal nos arquivos de amostras e aos conflitos éticos envolvidos na aquisição cirúrgica de mucosa normal, HF foi a fonte de epitélio não-neoplásico mais viável. Um dos objetivos deste estudo foi identificar alguma correlação dos marcadores entre si, com as respectivas lesões ou com os dados clínicos e histopatológicos dos tumores.

A proteína USP1 é uma DUB que tem alguns papéis relacionados com resposta a danos ao DNA. Esta proteína está envolvida com o reparo da quebra da dupla fita de DNA através da recombinação homóloga (MURAI *et al.*, 2011). O *knockout* do gene USP1 em camundongos gerou instabilidade genômica (KIM *et al.*, 2009). Além disso, a USP1 desubiquitina e estabiliza as proteínas da família ID, contribuindo para preservar

o estado indiferenciado das células em casos de osteossarcomas (WILLIAMS *et al.*, 2011). Todos esses dados indicam que a função da USP1 é, principalmente, relacionada ao núcleo (NIJMAN *et al.*, 2005).

Adicionalmente, a interação entre a proteína USP1 e WDR48 tem sido descrita. Juntas, essas proteínas formam um complexo. A ligação entre ambas proporciona o aumento da atividade catalítica da USP1 (COHN *et al.*, 2007). Em contrapartida, a proteína WDR48 tem mostrado expressão predominantemente citoplasmática (CÔTÉ-MARTIN *et al.*, 2008).

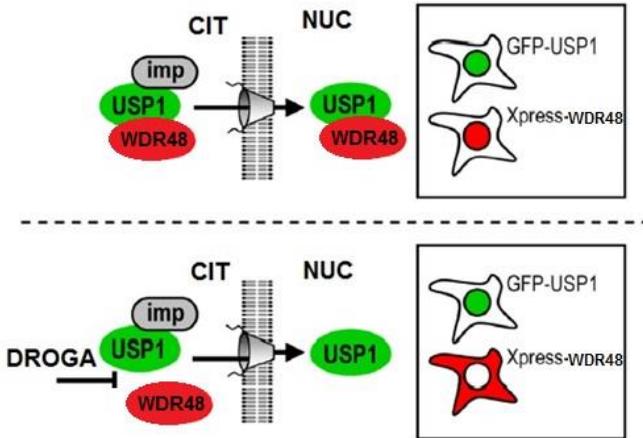
Em 2012, Garcia-Santisteban e colaboradores estudaram o intrigante fato de como essas duas proteínas, mesmo predominantes em regiões diferentes da célula, conseguem formar um complexo. Esse estudo apresentou um contraponto em relação aos trabalhos anteriores. Os resultados obtidos descreveram um complexo formado pelas proteínas USP1 e WDR48 no citoplasma que, sequencialmente, é translocado para o núcleo através de uma importação nuclear ativa, ação esta mediada por dois sinais de localização nuclear. Portanto, conforme a necessidade celular de importação nuclear do complexo, a fim de potencializar a ação desubiquitinizadora da USP1, esta proteína pode ligar-se simultaneamente aos receptores de importação nuclear e ao WDR48 ocorrendo, conseqüentemente, a importação do complexo (Figura 7).

O trabalho de Garcia-Santisteban e colaboradores (2012) permite compreender os resultados obtidos no presente

trabalho, cujo padrão de expressão do marcador USP1 foi, tanto no tecido neoplásico (CEI) quanto no não-neoplásico (HF), nuclear, mas que na maioria das vezes estava associada com o citoplasma. Raramente a expressão nuclear foi encontrada isolada. Entretanto, o padrão de expressão do marcador WDR48 condiz plenamente com os demais estudos, tendo em vista que a sua expressão foi predominantemente citoplasmática, mas em dois casos de CEI este marcador teve a sua expressão restrita ao núcleo.

Diferentemente da USP1 e do WDR48, há um grande número de estudos que retratam o padrão de expressão da proteína p53. Esta proteína se liga a sequências específicas de DNA, a fim de regular, de forma positiva ou negativa, a expressão de diversos genes envolvidos no controle do ciclo celular. P53 é um fator de transcrição que controla a auto renovação neoplásica. Portanto, a sua atividade está, principalmente, relacionada com o núcleo (HOCK *et al.*, 2011). Por essa razão, neste estudo considerou-se apenas a expressão nuclear desse marcador, cujo grau de coloração das células marcadas ressaltou-se mais no CEI do que na HF.

Figura 7 - Importação nuclear do complexo proteico USP1/WDR48. Adaptado de Garcia-Santisteban et al., 2012



Em relação à quantificação dessa expressão, não há muitos estudos sobre os marcadores USP1 e WDR48, tampouco há muitos estudos que quantificam a expressão e que realizem uma comparação entre o neoplásico e o não-neoplásico. Na literatura, em relação às lesões malignas, já foi investigada a expressão dessas proteínas apenas em casos de osteossarcoma (WILLIAMS *et al.*, 2011).

Como relatado por Williams e colaboradores (2011), os achados revelaram que os osteossarcomas expressaram mais USP1 mRNA do que o tecido ósseo saudável. Os resultados do teste *Western blotting* apresentaram elevada expressão em 7 de 14 osteossarcomas, esta expressão foi mais significativa do que quando comparado com três amostras de osso saudável.

Entretanto, há alguns estudos que já investigam essas proteínas em determinadas lesões não com a finalidade de identificar a presença desses importantes marcadores, mas objetivando testar esse complexo proteico como um potencial alvo terapêutico. Este é o caso do estudo realizado por Mistry e colaboradores (2013) com leucemias. Nesse estudo, os autores descreveram uma pequena molécula (C527), que é capaz de inibir a atividade do complexo USP1/WDR48. Sozinha a USP1 tem baixo potencial catalítico. A inibição farmacológica do complexo promove a degradação da proteína ID através da ubiquitinação da mesma; assim, sem o impedimento promovido pela ID, a célula pode diferenciar-se e não há a proliferação de células imaturas.

Quando essas informações são aplicadas aos resultados aqui descritos, observam-se algumas semelhanças. Também encontrou-se maior expressão de USP1 e WDR48 em tecido neoplásico (CEI) do que no tecido não neoplásico (HF). Esse achado está de acordo com os resultados explanados por Williams e colaboradores (2011). Sobretudo, fortifica o estudo de Mistry e colaboradores (2013), sugerindo que esse complexo poderia ser um possível alvo terapêutico no combate ao CEI. Portanto, a investigação da molécula C527 nesses casos seria de grande valia para a ciência.

Ainda com relação às diferenças quantitativas entre as expressões no tecido neoplásico e não neoplásico, observou-se uma diferença extremamente significativa entre a expressão do p53 nos casos de HF e CEI, sendo no segundo grupo superior.

Esse resultado, de certa forma, era esperado, tendo em vista que a proteína p53 é pouco expressa em células que estão em condições não-neoplásicas. Entretanto, é importante salientar que mutações no gene p53 permitem que células neoplásicas sobrevivam e proliferem apesar de existir um dano no DNA. O gene equivalente encontra-se mutado na metade dos cânceres humanos. Essas células tendem a escapar da apoptose, e seu DNA, mesmo afetado, sofre replicação sem pausa para reparo (ALBERTS *et al.*, 2002).

Com relação à obtenção dos dados clínicos, uma relevante limitação foi encontrada no presente estudo. O inadequado preenchimento ou a falta de dados nas fichas de biópsia, bem como nos prontuários, dificultou a análise de uma possível relação entre os marcadores e os dados clínicos dos casos de CEI. A explicação para essa dificuldade se deve ao fato de que os pacientes recebem o diagnóstico de CEI no HU/UFSC e, quando a cirurgia é necessária, realizam esse procedimento neste mesmo local. Porém, quando estes são submetidos à quimioterapia e radioterapia, o encaminhamento para outro serviço se faz necessário, que neste caso é o Centro de Pesquisas Oncológicas (CEPON). Nesta troca de serviço é comum que a evolução do paciente seja acompanhada pelo oncologista e/ou radiologista nas sessões de radioterapia e/ou quimioterapia subsequentes, e não mais pelo cirurgião de cabeça e pescoço do HU/UFSC. Outro problema com relação a esse acompanhamento é que muitos pacientes desistem ou

recusam o tratamento. Portanto, a predição de qualquer prognóstico nestes casos se torna impossível.

Quando a literatura é analisada, percebe-se que essa limitação é corriqueira na maioria dos trabalhos que possuem o intuito de realizar este tipo de comparação. Tandon e colaboradores (2010) fizeram uma revisão sistemática associando os dados clínicos de CECP com o marcador p53. Entretanto, mesmo estabelecendo vários filtros, os resultados permaneceram inconclusivos, pois estes foram extremamente heterogêneos. Esta heterogeneidade pode ter ocorrido em função de alguns fatores, tais como os diferentes métodos de quantificação da expressão da proteína p53, o reduzido número de estudos presentes na literatura e, sobretudo, a falta de dados dos pacientes.

Na presente pesquisa, não foi encontrada associação entre a expressão do marcador p53 e os dados clínicos dos CEIs. Este resultado inconclusivo também pode ter sido influenciado pela falta de dados, como relatado anteriormente. Entretanto, a superação dessa limitação clínica se faz essencial, pois o estudo *in vitro* realizado por Hsieh e colaboradores (2001) relatou que a inativação do gene supressor de tumor p53 é um importante evento patogênico no desenvolvimento do CECP. Além disso, na ausência de p53, as células do CECP aumentam a resistência à radiação e agentes quimioterapêuticos padrão. Outro estudo ainda afirma que a p53 pode estar relacionado à transição epitélio-mesênquima das células epiteliais, tornando o

tumor ainda mais susceptível ao desenvolvimento de metástase (CHANG *et al.*, 2011).

Se não há estudos suficientes para garantir uma correlação entre os achados clínicos e a expressão do p53, tampouco haverá relatos dessa relação com a USP1 e o WDR48. Na literatura ainda há muitas teorias, mas nada efetivamente comprovado. Entretanto, o estudo realizado por Lin e colaboradores (2010) identificaram uma super regulação de ID1, proteína que possui relação direta com o complexo USP1/WDR48, em espécimes de CECP oriundos de camundongos. Os autores observaram que curtas interferências no RNA para ID1 reduziram significativamente o volume do tumor. Portanto, a regulação da proteína ID1 pode influenciar a sobrevida dos pacientes com CECP.

Com relação à gradação histológica dos CEIs, os três marcadores (p53, USP1 e WDR48) apresentaram, em sua maioria, maior média de expressão em lesões moderadamente diferenciadas. Os CEIs bem diferenciados apresentaram as menores médias, mas, estatisticamente, constatou-se diferença apenas na expressão de USP1, sendo esta inferior. Um fator que possivelmente contribuiu para a ausência de significância estatística foi o tamanho amostral. Quando estuda-se material biológico humano, o seu uso deve ser extremamente racional. Em trabalhos futuros, a inclusão de casos adicionais pode determinar uma importante correlação entre os marcadores e o padrão histopatológico.

Quando a literatura é revisada, o leitor também se depara com a escassez de estudos que fazem algum tipo de relação entre estes marcadores e o padrão de gradação histopatológica dos CEIs. Com relação às proteínas USP1 e WDR48, não existem trabalhos que estudem essa relevante vertente. Inclusive, quando a abundante literatura sobre a proteína p53 é revisada, observa-se escassez sobre esse assunto. Entretanto, o trabalho de Tang, Xu e Zhou (2010) relacionou a mutação do gene TP53 com a pontuação oriunda da gradação histopatológica (Bryne *et al.*, 1989) na região de invasão de CEIs. Curiosamente, quanto mais pobremente diferenciado o CEI, mais mutação do gene TP53 foi observado. Portanto, estas lesões possuem menos queratinização, mais pleomorfismo nuclear, dissociação celular e menos infiltrado inflamatório.

Partindo dessas considerações, observou-se que ainda é preciso desenvolver inúmeras pesquisas para elucidar a complexa sinalização que acontece entre as proteínas estudadas nesta pesquisa durante o desenvolvimento do câncer. Esse árduo caminho pode levar ao descobrimento de mecanismos ainda ocultos que favorecem a progressão dessa doença. Portanto, a investigação dessas proteínas pode reverter em um significativo valor diagnóstico e prognóstico no futuro.

9. CONCLUSÕES

- ✓ A localização da expressão da proteína p53 é nuclear enquanto que a do complexo proteico USP1/WDR48 é nuclear e citoplasmática.
- ✓ A expressão dos três marcadores é aumentada em tecido neoplásico (CEI) do que no tecido não neoplásico (HF).
- ✓ Em ambos as lesões, neoplásica (CEI) e não neoplásica (HF), a maior marcação nuclear foi do p53, a maior marcação citoplasmática foi do WDR48, e a maior marcação nuclear e citoplasmática foi da USP1.
- ✓ Não foi possível encontrar nenhuma associação da expressão destas proteínas com o estadiamento clínico.
- ✓ Embora sem comprovação estatística, entre os casos de CEI, os bem diferenciados apresentam menor expressão dos marcadores p53, USP1 e WDR48.
- ✓ Estudos complementares sobre esses marcadores são essenciais para a compreensão dos mesmos, pois a literatura ainda é escassa.

10 REFERÊNCIAS

ALBERTS, B. et al. Molecular Biology of the cell. **Garland Science**, fourth edition, 2002.

BARNES, L. et al. Pathology & Genetics Head and Neck Tumours. **World Health Organization Classification of Tumours**, IARCPress, 2005.

BIEDLER, J. L.; RIEHM, H. Cellular resistance to actinomycin D in Chinese hamster cells in vitro: cross-resistance, radioautographic and cytogenetic studies. **Cancer Res**, v. 30, n. April, p. 1174–1184, 1970.

BLAU, H. M.; BRAZELTON, T. R.; WEIMANN, J. M. The evolving concept of a stem cell: Entity or function? **Cell**, v. 105, p. 829–841, 2001.

BOUNPHENG, M. et al. Degradation of Id proteins by the ubiquitin-proteasome pathway. **FASEB Journal: Official Publication of the Federation of American Societies for Experimental Biology**, v. 13, n. 15, pag. 2257–64, 1999.

BRYNE, M. et al. New Malignancy grading is a better prognostic indicator than Broder's grading in oral squamous cell carcinomas. **J oral Pathol Med**, v. 18, p. 432-437, 1989.

BRYNE, M. et al. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. **Journal of pathology**, v. 166: 375-381, 1992.

CHANG, C. et al. p53 regulates epithelial–mesenchymal transition and stem cell properties through modulating miRNAs. **Nature cell biology**, vol 13, n. 3. 2011

CHEN, J. et al. Selective and cell-active inhibitors of the USP1/ UAF1 deubiquitinase complex reverse cisplatin resistance in

non-small cell lung cancer cells. **Chemistry & biology**, v. 18, n. 11, p. 1390–400, 23 nov. 2011.

CIARAPICA, R. et al. Targeting Id protein interactions by an engineered HLH domain induces human neuroblastoma cell differentiation. **Oncogene**, v. 28, n. 17, pag. 1881–91, 2009.

CLARKE, M. et al. Cancer stem cells--perspectives on current status and future directions: AACR Workshop on cancer stem cells. **Cancer Research**, v. 66, n. 19, p. 9339–44, 2006.

CLARKE, D. L. et al. Generalized potential of adult neural stem cells. **Science (New York, N.Y.)**, v. 288, n. 5471, p. 1660–3, 2000.

COHN, M. et al. UAF1 is a subunit of multiple deubiquitinating enzyme complexes. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, n. 8, p. 5343–51, 2009.

COHN, M. A. et al. A UAF1-containing multisubunit protein complex regulates the Fanconi anemia pathway. **Mol Cell**, v. 28, p. 786–797, 2007.

CÔTÉ-MARTIN, A et al. Human papillomavirus E1 helicase interacts with the WD repeat protein p80 to promote maintenance of the viral genome in keratinocytes. **J Virol**, v. 82, p. 1271–1283, 2008.

DONNENBERG, V.; DONNENBERG, A. Multiple drug resistance in cancer revisited: The cancer stem cell hypothesis. **Journal of clinical pharmacology**, v. 45, p. 872–877, 2005.

FLETCHER, J. I. et al. ABC transporters in cancer: more than just drug efflux pumps. **Nature reviews. Cancer**, v. 10, n. 2, p. 147–156, 2010.

GAGE, F. Mammalian Neural Stem Cells. **Science**, v. 287, n. 5457, p. 1433–1438, 2000.

GARCÍA-SANTISTEBAN, I. et al. USP1 deubiquitinase: cellular functions, regulatory mechanisms and emerging potential as target in cancer therapy. **Molecular Cancer**, v. 12, n. 91, 2013.

GARCIA-SANTISTEBAN, I. et al. Two nuclear localization signals in USP1 mediate nuclear import of the USP1/UAF1 complex. **PLoS One**, v. 7, n. 6, 2012.

GAVAGHAN, H. News Features The promise of stem cells. **World Health Organization**, v. 79, n. 8, p. 800–801, 2001.

GOTTESMAN, M. M. Mechanisms of cancer Drug Resistance. **Annu. Rev. Med.**, v. 53, p. 615–627, 2002.

GUAN, K.; ROHWEDEL, J.; WOBUS, A M. Embryonic stem cell differentiation models: cardiogenesis, myogenesis, neurogenesis, epithelial and vascular smooth muscle cell differentiation in vitro. **Cytotechnology**, v. 30, p. 211–226, 1999.

HAGLUND, K. et al. Ubiquitylation and cell signaling. **The EMBO Journal**, v. 24, n. 19, p. 3353–9, 2005.

HILDEBRAND, L. C. et al. Spatial distribution of cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinomas. **Journal of oral pathology & medicine: official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology**, v. 43, n. 7, p. 499–506, 2014.

HOCK, A. K. et al. Regulation of p53 stability and function by the deubiquitinating enzyme USP42. **The EMBO journal**, v. 30, n. 24, p. 4921–30, 2011.

HSIEH, L. et al. Characteristics of mutations in the p53 gene in oral squamous cell carcinoma associated with betel quid chewing and cigarette smoking in Taiwanese. **Carcinogenesis**, v. 22, n. 9, p. 1497-1503, 2001.

HUANG, T. T. et al. Regulation of monoubiquitinated PCNA by DUB autocleavage. **Nature cell biology**, v. 8, n. 4, p. 339–47, 2006.

Instituto Nacional de Câncer – INCA (2010) – Câncer de boca. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/boca+/definicao> >Acesso em 15 de agosto de 2014.

JONES, M. et al. Dysregulation of DNA polymerase κ recruitment to replication forks results in genomic instability. **The EMBO Journal**, v. 31, n. 4, p. 908–18, 2012.

KIM, J.M. et al. Inactivation of murine Usp1 results in genomic instability and a Fanconi anemia phenotype. **Dev Cell**, v. 16, p. 314–320, 2009.

KRUMBHAAR, E. B. Rôle of the blood and the bone marrow in certain forms of gas poisoning. **JAMA**, v. 72, n. 1, p. 39–41, 1919.

LANGLANDS, K. et al. ID proteins are dynamically expressed in normal epidermis and dysregulated in squamous cell carcinoma. **Cancer research**, v. 60, pag. 5929-5933, 2000.

LASORELLA, A. et al. Degradation of Id2 by the anaphase-promoting complex couples cell cycle exit and axonal growth. **Nature**, v. 442, n. 7101, p. 471–4, 27 jul. 2006.

LEE, H. et al. Positive expression of NANOG, mutant p53, and CD44 is directly associated with clinicopathological features and poor prognosis of oral squamous cell carcinoma. **BMC Oral Health**, v. 5, p.153, 2015.

LIN, J. et al. Inhibitor of differentiation 1 contributes to head and neck squamous cell carcinoma survival via the NF- κ B/survivin and phosphoinositide 3-kinase/Akt signaling pathways. **Clinical cancer research : an official journal of the**

American Association for Cancer Research, v. 16, n. 1, p. 77–87, 2010.

MARTIN, G. R. Isolation of a pluripotent cell line from early mouse embryos cultured in medium conditioned by teratocarcinoma stem cells. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 78, n. 12, p. 7634–7638, 1981.

MASSARI, M. et al. MINIREVIEW Helix-Loop-Helix Proteins: Regulators of Transcription in Eucaryotic Organisms. **Molecular and cellular Biology**, v. 20, n. 2, p. 429–440, 2000.

MISTRY, H. et al. Small-Molecule Inhibitors os USP1 target ID1 Degradation in Leukemias Cells. **Mol Cancer Ther**, v. 12, p. 2651-2662, 2013.

MUÑOZ HERRERA, A. et al. Supervivencia en el carcinoma epidermoide de cavidad oral. **Acta Otorrinolaringológica Española**, v. 52, n. 5, p. 381–386, jan. 2001.

MURAI, J. et al. The USP1/UAF1 complex promotes double-strand break repair through homologous recombination. **Molecular and Cellular Biology**, v. 31, n. 12, p. 2462–9, 2011.

NEVILLE, B. W.; DAY, T. A. Oral Cancer and Precancerous Lesions. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 52, n. 4, p. 195–215, 2002.

NIJMAN, S. et al. The deubiquitinating enzyme USP1 regulates the Fanconi anemia pathway. **Molecular Cell**, v. 17, n. 3, p. 331–9, 2005.

OHAYON, S. et al. Targeting deubiquitinases enabled by chemical synthesis of proteins. **Journal of the American Chemical Society**, v. 134, n. 6, p. 3281–9, 2012

PERK, J. et al. Id family of helix-loop-helix proteins in cancer. **Nature Reviews. Cancer**, v. 5, n. 8, p. 603–14, 2005.

PRINCE, M. E. et al. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 104, n. 3, p. 973–8, 16 jan. 2007.

PRINDULL, G.; PRINDULL, B.; MEULLEN, N. Hematopoietic stem cell (CFUc) in human cord Blood. **Acta Paediatr Scand**, v. 67, n. 413-416, 1978.

RAMAKRISHNA, S.; BHARATHI, S; KWANG-HYUN, B. The role of deubiquitinating enzymes in apoptosis. **Cell. Mol. Life Sci.** v. 68, p.15–26, 2011.

REIBEL, J. Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. **Critical Reviews Oral Biology Medicine**, v. 14, n. 1, p. 47-62, 2003.

REYA, T. et al. Stem cells, cancer, and cancer stem cells. **Nature**, v. 414, n. 6859, p. 105–11, 2001.

ROBEY, P. Stem cells near the century mark. **The Journal of Clinical Investigation**, v. 105, n. 11, pag. 1489–91, 2000.

R&D systems, a biotechne brand. Cancer stem cell markers - 2015. Disponível em: < <https://www.rndsystems.com/research-area/cancer-stem-cell-markers>> Acesso em: 07/12/2015.

SOUSSI, T. P53 Alterations in Human Cancer: More Questions Than Answers. **Oncogene**, v. 26, p. 2145–2156, 2007.

SOUZA, V. et al. Células-tronco : uma breve revisão. **Ci. Med. Biol**, v. 71, p. 251–256, 2003.

SHAMBLOTT, M. J. et al. Derivation of pluripotent stem cells from cultured human primordial germ cells. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 95, p. 13726–13731, 1998.

SUMIDA, T. et al. Targeting ID1 reduces proliferation and invasion in aggressive human salivary gland cancer cells. **BMC Cancer**, v. 13, n. 141, 2013.

TANDON, S. et al. A Systematic Review of p53 as a Prognostic Factor of Survival in Squamous Cell Carcinoma of the Four Main Anatomical Subsites of the Head and Neck. **Cancer Epidemiol Biomarkers**, v. 19, n. 2, p. 574–587, 2010.

TANG, S.; XU, D.; ZHOU, B. Analysis of P53 Mutation and Invasion Front Grading in Oral Squamous Cell Carcinomas. **J Huazhong Univ Sci Technol**, v. 30, n. 4, p. 525-529, 2010.

THOMSON, J. A et al. Embryonic stem cell lines derived from human blastocysts. **Science (New York, N.Y.)**, v. 282, p. 1145–1147, 1998.

TSUZUKI, H. et al. Expression of multidrug resistance-associated protein (MRP) in head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer Letters**, v. 126, p. 89–95, 1998.

TUPLER, R. et al. Expressing the human genome. **Nature**, v. 409, n. 6822, p. 832–3, 2001.

UNIÃO INTERNACIONAL CONTRA O CÂNCER (UICC). TNM Classificação de tumores malignos. **Ministério da Saúde, Instituto Nacional de Cancer (INCA)**, 6^o edição. 2004.

WATT, F. et al. Out of Eden: stem cells and their niches. **Science**, v. 287, n. 5457, p. 1427–30, 2000.

WILLIAMS, S. et al. USP1 deubiquitinates ID proteins to preserve a mesenchymal stem cell program in osteosarcoma. **Cell**, v. 146, n. 6, p. 918–30, 2011.

YOKOTA, Y. et al. Role of Id family proteins in growth control. **Journal of Cellular Physiology**, v. 190, n. 1, p. 21–8, 2002.

ZHAO, J. et al. Correlation between the expression of Id-1 and hyperthermia-associated molecules in oral squamous cell carcinoma. **Journal of clinical pathology**, v. 66, n. 9, p. 758–63, 2013.

APÊNDICE A- Informações complementares sobre as características clínicas e histopatológicas dos casos de CEI

| <i>Nº</i> | <i>IDADE</i> | <i>GÊNERO</i> | <i>ETNIA</i> | <i>TAB.</i> | <i>ETIL.</i> | <i>LOCALIZ.</i> | <i>TNM</i> | <i>QUIMIO</i> | <i>RADIO</i> | <i>CIRURGIA</i> | <i>RECOR.</i> | <i>METÁS.</i> | <i>GRAD. HIST.</i> |
|-----------|--------------|---------------|--------------|-------------|--------------|--------------------|-----------------------|---------------|--------------|---------------------|----------------|---------------|--------------------|
| 1 | 55 | M | L | Sim | Não | Língua | -- | Não | Não | Sim | Não | Sim pulmão | Mod. Dif. |
| 2 | 68 | M | L | Não | Não | Assoalho | -- | -- | -- | -- | -- | -- | Bem Dif. |
| 3 | 53 | M | M | Sim | Sim | Rebordo | --- | -- | -- | -- | -- | -- | Mod. Dif. |
| 4 | 68 | M | L | Sim | Sim | Assoalho de boca | -- | -- | -- | -- | -- | -- | Pobr. Dif. |
| 5 | 46 | M | L | Sim | Sim | Assoalho de boca | -- | -- | -- | -- | -- | -- | Mod. Dif. |
| 6 | 80 | M | L | Sim | Sim | Trígono retromolar | -- | -- | -- | -- | -- | -- | Mod. Dif. |
| 7 | 55 | M | -- | Sim | Sim | Assoalho de boca | T2N1M0 | Não | Sim | Sim Glossectomia | Não | Não | Pobr. dif. |
| 8 | 41 | M | L | Sim | Sim | Trígono retromolar | T4N1M0 | Sim | Sim | Sim Mandibulectomia | Sim orofaringe | Não | Bem Dif. |
| 9 | 89 | M | L | Sim | Não | Trígono retromolar | Sem prontuário | | | | | | Bem Dif. |

| | | | | | | | | | | | | | |
|----|----|---|---|-----|-----|--------------------|-----------------------|-----|-----|----------------------------|--------------|------------|------------|
| 10 | 54 | M | L | Sim | Sim | Rebordo alveolar | T2M0NO.2 | Não | Não | Sim Glossomandi bulectomia | Não | Não | Mod. Dif |
| 11 | 54 | M | L | Sim | Sim | Rebordo alveolar | T2 M0 NO.2 | Não | Não | Sim Glossomandi bulectomia | Não | Não | Bem Dif. |
| 12 | 59 | M | L | Não | Não | Assoalho de boca | T2 N2 M0 | Não | Sim | Sim Glossectomia | Não | Sim pulmão | Mod. Dif. |
| 13 | 57 | M | L | Sim | Sim | Mucosa jugal | Sem prontuário | | | | | | Mod. Dif. |
| 14 | 62 | F | L | Sim | Não | Região sublingual | -- | -- | -- | -- | -- | -- | Mod. Dif. |
| 15 | 58 | M | M | Sim | Sim | Assoalho de boca | -- | -- | -- | -- | -- | -- | Bem Dif. |
| 16 | 62 | M | L | Sim | Sim | Bordo de língua | T3N0M0 | Sim | Sim | Não (recusou) | -- | -- | Mod. Dif. |
| 17 | 64 | M | F | Sim | Não | Palato mole | -- | Não | Sim | Sim Mandibulectomia | Sim | Não | Mod. Dif. |
| 18 | 69 | M | L | Não | Não | Bordo de língua | T3N0M0 | -- | -- | Sim Mandibulectomia | Não | Não | Mod. Dif |
| 19 | 69 | M | L | Sim | Sim | Assoalho de boca | T4N2M0 | Não | Sim | Sim Glossectomia | Não | Não | Pobr. Dif. |
| 20 | 56 | M | L | Sim | Sim | Trígono retromolar | Sem prontuário | | | | | | Mod. Dif. |
| 21 | 34 | M | L | Sim | Sim | Bordo de língua | T2N2M0 | Não | Sim | Sim Glossectomia parcial | Sim (língua) | Não | Mod. Dif. |

| | | | | | | | | | | | | | |
|----|--------------------|---|---|-----|-----|-------------------|-----------------------|-----|-----|---|---------------------|-----|------------|
| 22 | 61 | F | M | Sim | Sim | Bordo de Língua | T3N0M0 | Sim | Sim | Não | Não | Não | Pobr. Dif. |
| 23 | 47 | M | L | Sim | Não | Mucosa jugal | T4N2M0 | Não | Sim | Sim Ressecção mucosa jugal | Sim dorso de língua | Não | Mod. Dif. |
| 24 | 59 ÓBITO | M | L | Sim | Sim | Rebordo alveolar | T4N0 | Não | Sim | Sim (duas) 1ª Mandibulectomia 2ª Glossectomia | Sim (duas) | Não | Mod. Dif. |
| 25 | 66 ÓBITO | M | L | Sim | Não | Região sublingual | T2N2 | Não | Sim | Sim Pelviglossectomia | Sim | Não | Bem. Dif. |
| 26 | 52 | M | L | Sim | Sim | Rebordo Alveolar | -- | -- | -- | -- | -- | -- | Mod. Dif. |
| 27 | 71 | M | L | Sim | Sim | Palato mole | T1N0M0 | Não | Não | Sim Bucofaringectomia | Não | Não | Mod. Dif. |
| 28 | 76 | F | L | Não | Não | Bordo de língua | Sem prontuário | | | | | | Bem Dif. |
| 29 | 51 | M | L | Sim | Sim | Assoalho de boca | T1N0M0 | Não | Sim | Sim Pelviglossectomia | Não | Não | Mod. Dif. |
| 30 | 58 | M | L | Sim | Não | Mucosa jugal | T3N0 | Sim | Sim | Não | -- | -- | Mod. Dif. |

APÊNDICE B- Informações complementares sobre as características clínicas e histopatológicas dos casos de HF

| Nº | IDADE | GÊNERO | ETNIA | TAB. | ETIL. | LOCALIZAÇÃO | Nº | IDADE | GÊNERO | ETNIA | TAB. | ETIL. | LOCALIZAÇÃO. |
|-----------|--------------|---------------|--------------|-------------|--------------|-------------------------|-----------|--------------|---------------|--------------|-------------|--------------|-----------------------------------|
| 1 | 16 | M | L | Não | Não | Borda lateral de língua | 21 | 40 | M | F | Não | Não | Língua |
| 2 | 49 | F | L | Não | Não | Mucosa jugal | 22 | 73 | F | -- | Não | Não | Mucosa jugal |
| 3 | 64 | M | L | Não | Não | Assoalho bucal | 23 | 61 | M | L | Sim | Não | Retrocomissura labial |
| 4 | 51 | F | L | Sim | Não | Palato | 24 | 52 | M | -- | Sim | Não | Mucosa jugal |
| 5 | 50 | M | L | Não | Não | Retrocomissura labial | 25 | 49 | M | -- | Sim | Sim | Lábio inferior e rebordo alveolar |
| 6 | 63 | F | L | Não | Não | Mucosa labial | 26 | 42 | F | L | Não | Não | Mucosa jugal |
| 7 | 36 | F | L | Não | Não | Retrocomissura labial | 27 | 62 | F | L | Não | Não | Ápice de língua |
| 8 | 57 | F | L | Não | Não | Mucosa labial inferior | 28 | 58 | F | L | Não | Não | Comissura Labial |

| | | | | | | | | | | | | | |
|----|----|---|----|-----|-----|------------------------|----|----|---|----|-----|-----|-------------------------|
| 9 | 45 | F | L | Não | Não | Palato duro | 29 | 67 | F | L | Não | Não | Lábio inferior |
| 10 | 56 | M | M | Sim | Não | Palato duro | 30 | 61 | M | L | Não | Não | Mucosa labial i |
| 11 | 50 | M | L | Não | Não | Mucosa jugal | 31 | 53 | F | L | Não | Não | Mucosa jugal |
| 12 | 33 | M | L | Não | Não | Mucosa labial inferior | 32 | 70 | F | L | Não | Não | Comissura labial |
| 13 | 57 | M | F | Não | Não | Mucosa labial | 33 | 53 | F | L | Não | Não | Gengiva inserida |
| 14 | -- | F | -- | Não | Não | Mucosa jugal | 34 | 72 | M | L | Não | Não | Ápice de língua |
| 15 | 44 | M | L | Não | Não | Mucosa jugal | 35 | 62 | F | M | Não | Não | Comissura labial |
| 16 | 4 | M | L | Não | Não | Mucosa Labial | 36 | 50 | F | L | Não | Não | Mucosa jugal. |
| 17 | 52 | F | F | Não | Não | Mucosa labial | 37 | 16 | M | -- | Não | Não | Lábio inferior |
| 18 | 32 | M | L | Não | Não | Fundo de vestibulo | 38 | 57 | F | L | Não | Não | Ápice de língua |
| 19 | 52 | F | L | Não | Não | Dorso de língua | 39 | 69 | F | L | Não | Não | Bordo lateral de língua |
| 20 | 58 | F | L | Não | Não | Palato duro | 40 | 62 | F | L | Não | Não | Mucosa jugal |

ANEXO A – Parecer consubstanciado do CEP

SECRETARIA DE ESTADO DA
SAÚDE DE SANTA
CATARINA/SES



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EXPRESSÃO DE PROTEÍNAS RELACIONADAS À INIBIÇÃO DA DIFERENCIAÇÃO CELULAR EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE

Pesquisador: Mabel Mariela Rodriguez Cordeiro

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 42390614.1.0000.0115

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.049.451

Data da Relatoria: 29/04/2015

Apresentação do Projeto:

O estudo proposto é de natureza básica, observacional descritivo retrospectivo e os resultados serão analisados quantitativa e qualitativamente. Serão levantados os casos diagnosticados como carcinoma epidermóide de boca, com base nos laudos histopatológicos do Laboratório de Patologia (LBP) da UFSC. Também serão selecionados casos de Hiperplasia Fibrosa Inflamatória, como controle de tecido epitelial não neoplásico.

A verificação dos dados clínicos e histopatológicos das amostras selecionadas será através da análise das fichas de biópsia e laudos arquivados no LBP/UFSC e dos prontuários dos pacientes no arquivo do Hospital Universitário/UFSC. Após a coleta de dados, serão selecionadas as amostras obtidas entre 2006 e 2014. Os exames imuno-histoquímicos serão realizados no laboratório de pesquisa do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da UFSC. As amostras selecionadas serão submetidas à técnica de Imuno-histoquímica utilizando-se anticorpos anti-antígeno humano USP1, WDR48, e p53. Para cada anticorpo, será avaliada a frequência e o local de marcação, bem como a análise quantitativa da expressão. A contagem terá auxílio do software americano NIH Image J1.36b. As informações obtidas serão armazenadas em uma planilha do software Microsoft Excel®. Os achados serão comparados às informações coletadas no levantamento dos dados clínicos e histopatológicos, de modo a verificar a existência de uma

Endereço: Rua Estevão Junot, 990, Andar Térreo - Biblioteca
Bairro: Centro **CEP:** 88.015-130
UF: SC **Município:** FLORIANÓPOLIS
Telefone: (48)3212-1880 **Fax:** (48)3212-1880 **E-mail:** cepes@saude.sc.gov.br

SECRETARIA DE ESTADO DA
SAÚDE DE SANTA
CATARINA/SES



Continuação do Parecer: 1.049.451

relação entre o padrão de expressão proteica e as características clínicas e histopatológicas dos tumores avaliados.

A análise dos dados será pelo software IBM SPSS Statistics 18 utilizando testes estatísticos apropriados à análise das diferenças entre os grupos para os marcadores Imuno-histoquímicos. A avaliação estatística será por análise de variância (ANOVA) de uma via, seguido do teste post hoc de Student Newman-Keuls. Os resultados serão expressos como média da porcentagem de células coradas \pm os desvios padrão da média (DPM). Os dados clínicos e histológicos serão analisados através de análise descritiva utilizando-se o software Excel®.

Objetivo da Pesquisa:

Geral: Verificar a expressão imuno-histoquímica de proteínas relacionadas à diferenciação celular em casos de carcinoma epidermóide de boca.

Específicos:

- Analisar o padrão de expressão da enzima desubiquitinadora1 (USP1) em carcinoma epidermóide de boca.
- Avaliar o padrão de expressão de fator associado à USP1 (WDR48) em lesões de carcinoma epidermóide de boca.
- Avaliar a expressão da proteína relacionada ao ciclo celular p53.
- Avaliar a presença de células-tronco neoplásicas nas lesões estudadas por meio de marcador de células-tronco neoplásicas epiteliais(WDR48).
- Comparar a presença de células-tronco com o padrão e localização das proteínas analisadas nos casos de carcinoma epidermóide estudados.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e/ou desconfortos são aqueles associados aos procedimentos de realização da biópsia, que não têm qualquer relação com a presente pesquisa, visto que o material contendo a lesão já foi previamente coletado para a realização de análise histopatológica para definição do diagnóstico final e, assim, proceder ao correto tratamento. Ainda, não haverá necessidade de procedimentos adicionais junto ao paciente.

O benefício será a contribuição para a aquisição de conhecimentos científicos da comunidade acadêmica, visando o desenvolvimento de novos métodos diagnósticos e terapias para aplicação futura.

Endereço: Rua Esteves Junior, 590, Andar Térreo - Biblioteca
Bairro: Centro CEP: 88.015-150
UF: SC Município: FLORIANÓPOLIS
Telefone: (48)3212-1680 Fax: (48)3212-1680 E-mail: cepes@saude.sc.gov.br

SECRETARIA DE ESTADO DA
SAÚDE DE SANTA
CATARINA/SES



Continuação do Parecer: 1.049/151

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa se ocupa de um sério problema de saúde pública ao redor do mundo e no Brasil. Apresenta uma revisão de literatura adequada e método bem delineado; Os aspectos éticos estão contemplados; existe a anuência da Instituição proponente para a utilização dos prontuários; o texto apresenta referência ao baixo risco da pesquisa e esta justificado a não utilização do TCLE.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória estão de acordo com as exigências do CEPSES/SC.

Recomendações:

As recomendações do parecer consubstanciado anterior foram atendidas.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

A pesquisa trata de um problema de saúde pública que demanda grandes investimentos em pesquisa, tratamento e reabilitação. Está adequada quanto ao método e aspectos éticos.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Protocolo foi aprovado pelo colegiado, pois as recomendações do relator foram atendidas.

FLORIANOPOLIS, 05 de Maio de 2015

Assinado por:
ELIANE MARIA STUART GARCEZ
(Coordenador)

Endereço: Rua Esteves Junior, 300, Andar Térreo - Biblioteca
Bairro: Centro CEP: 88.015-150
UF: SC Município: FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3212-1680 Fax: (48)3212-1680 E-mail: cepses@saude.sc.gov.br