

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA

Isadora Koepp Darella

**ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DA MICRODENSIDADE VASCULAR
POR MEIO DOS MARCADORES CD-105 E VEGF E DA INTENSIDADE DO
INFILTRADO INFLAMATÓRIO NA PROGRESSÃO DA DISPLASIA
EPITELIAL ORAL**

Florianópolis

2023

Isadora Koepp Darella

**ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DA MICRODENSIDADE VASCULAR
POR MEIO DOS MARCADORES CD-105 E VEGF E DA INTENSIDADE DO
INFILTRADO INFLAMATÓRIO NA PROGRESSÃO DA DISPLASIA
EPITELIAL ORAL**

Trabalho Conclusão de curso da Graduação em
Odontologia da Universidade Federal de Santa
Catarina como requisito para a obtenção do título
de Bacharel em Odontologia.

Orientador: Prof^ª Dra. Elena Riet Correa Rivero

Coorientador: Dra. Andressa Fernanda Paza
Miguel.

Florianópolis

2023

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

Darella, Isadora Koepp

Análise imuno-histoquímica da microdensidade vascular por meio dos marcadores CD-105 e VEGF e da intensidade do infiltrado inflamatório na progressão da displasia epitelial oral / Isadora Koepp Darella ; orientadora, Elena Riet Correa Rivero, coorientadora, Andressa Fernanda Paza Miguel, 2023.

53 p.

Trabalho de Conclusão de Curso (graduação) -
Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Graduação em Odontologia, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Odontologia. 2. Câncer de boca. 3. Inflamação. 4. CD 105. 5. VEGF. I. Rivero, Elena Riet Correa . II. Miguel, Andressa Fernanda Paza . III. Universidade Federal de Santa Catarina. Graduação em Odontologia. IV. Título.

Isadora Koepp Darella

Análise imuno-histoquímica da microdensidade vascular por meio dos marcadores CD-105 e VEGF e da intensidade do infiltrado inflamatório na progressão da displasia epitelial oral

Este Trabalho de Conclusão de Curso foi julgado adequado para obtenção do título de “Cirurgiã-Dentista” e aprovado em sua forma final pelo Curso de Graduação em Odontologia

Florianópolis, 16 de maio de 2023.

Prof^a. Dr^a. Gláucia Santos Zimmermann,
Coordenadora do Curso

Banca examinadora

Prof^a. Dr^a. Elena Riet Correa Rivero
Orientadora

Prof^a. Dr^a. Carolina Amália Barcellos Silva
UFSC

Mestranda Riéli Elis Schulz
UFSC

Florianópolis, 2023

Dedico este trabalho ao meu querido
avô João Belmiro Koepp (*in memoriam*)
que nunca mediu esforços para me fazer
feliz e é meu maior exemplo de
responsabilidade e integridade

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pela dádiva da vida e por me proporcionar tudo que tenho hoje e que ainda vou ter.

A minha orientadora e mestre, **Prof^ª. Elena Riet** por todo conhecimento e oportunidades que ganhei neste período e foram cruciais para minha caminhada acadêmica. És um exemplo de professora e cientista para mim.

A minha coorientadora **Dra. Andressa Fernanda Paza Miguel**, por todo suporte e auxílio quando precisei, além dos aprendizados que adquiri. Foi uma honra poder contar contigo e tenho certeza do sucesso profissional que terás.

Aos membros da banca por aceitarem participar deste trabalho e dedicar seu tempo em prol deste.

À amada minha família, que são responsáveis por tudo que tenho hoje. Em especial aos meus pais, **Irmgard e George**, que sempre me guiaram e me deram todo suporte para seguir o meu sonho, além de todo o amor que recebi. Aos meus avós, **João, Terezinha e Betty**, que sempre estiveram ao meu lado e tanto zelaram por mim. Ao meu irmão, **Bernardo**, que me mostrou o que é amar e é o melhor presente que meus pais já me deram. A minha tia **Lenita** e a minha prima **Júlia**, por todo incentivo, exemplo e amor. E ao meu namorado, **Christopher**, que acalentou meu coração em momentos de angústia e sempre me trouxe amor, felicidade e coragem. Amo vocês mais que tudo.

À minha dupla, **Bruna**, que deixou a vida clínica mais leve e feliz todos os dias. Sou extremamente grata por tudo que já vivemos juntas e por todo apoio sempre.

Ao meu grupo, **Istmo**, composto por **Jakeline, João, Layana, Letícia e Luana**, que estão desde o início comigo, por todo suporte, troca de conhecimento e risadas. Vocês foram essenciais na minha caminhada.

Aos meus amigos, **Luiz Antônio, Francielle, Victor Hugo, Rafaela, Vicente** por toda alegria e momentos vividos.

E a **UFSC**, pela oportunidade de estudar e me graduar num ensino de tanta qualidade, além das experiências únicas vividas. Tenho muito orgulho de dizer que estudei da Universidade Federal de Santa Catarina.

RESUMO

O carcinoma epidermoide é a principal neoplasia maligna que ocorre na boca, sendo geralmente precedido por lesões potencialmente malignas (LPM). As LPM se caracterizam como alterações epiteliais com risco aumentado de progressão para o carcinoma epidermoide de boca (CEB) comparando a mucosa normal. Histologicamente, as LPM podem apresentar displasia epitelial (DE), que representa um dos primeiros indícios de progressão. Devido às alterações teciduais existentes em lesões potencialmente malignas e malignas, o estroma é permeado por um infiltrado inflamatório crônico, o qual estimula a angiogênese. Tal relação se dá pela intensa participação de mediadores químicos inflamatórios que promovem a neoformação vascular. A fim de entender melhor o papel da angiogênese e do processo inflamatório na carcinogênese, esse estudo teve como objetivo analisar a intensidade do infiltrado inflamatório e a microdensidade vascular em LPM com presença de displasia epitelial oral (DE) e de carcinoma epidermoide de boca. Como controle de epitélio não neoplásico foi incluído um grupo de hiperplasia fibrosa inflamatória (HFI). A amostra foi composta por 22 casos de HFI, 46 de DE e 21 de CEB. Em lâminas coradas pela hematoxilina e eosina, foi feita a análise histológica da intensidade do infiltrado inflamatório, assim como a classificação dos casos de DE segundo o sistema binário, em displasias de alto risco de malignização (DEAM) e baixo risco de malignização (DEBM), e segundo a classificação em três níveis em DE leve, moderada ou severa. A análise da microdensidade vascular (MDV) foi realizada por meio da técnica de imuno-histoquímica com o marcador de angiogênese CD-105 na lâmina própria dos casos de DE e HFI, e no estroma dos casos de CEB. Também foi realizada a avaliação imuno-histoquímica para VEGF no epitélio das lesões. Observou-se que a MDV e a presença de infiltrado inflamatório aumentou conforme o aumento da malignidade da lesão. Dentro das DE, as DE severas e de alto risco obtiveram maiores índices de MDV e infiltrado inflamatório. Já em relação a expressão de VEGF, as DE foram as lesões com maior expressão de tal mediador químico. Ao comparar a MDV com a expressão de VEGF, constatou-se que a MDV aumentou com o aumento da expressão de VEGF, confirmando a relação entre as duas variáveis. Conclui-se que o aumento da MDV e do infiltrado inflamatório é proporcional à progressão maligna do epitélio, diferente da expressão de VEGF, a qual foi mais intensa em DE. Além disso, a associação entre a expressão de VEGF e a MDV suportam o papel desse fator de crescimento na angiogênese durante a carcinogênese oral.

Palavras-chave: câncer de boca, inflamação, densidade vascular, estroma, CD105, VEGF.

ABSTRACT

Squamous cell carcinoma is the main malignant neoplasm that occurs in the mouth, usually preceded by potentially malignant disorders (PMD). PMD are characterized as epithelial alterations with an increased risk of progression to oral squamous cell carcinoma (OSCC) compared to normal mucosa. Histologically, PMD may show epithelial dysplasia (ED), which is one of the first signs of progression. Due to existing tissue changes in potentially malignant and malignant lesions, the stroma is permeated by a chronic inflammatory infiltrate, which stimulates angiogenesis. This relationship is due to the intense participation of inflammatory chemical mediators that promote vascular neof ormation. To better understand the role of angiogenesis and the inflammatory process in carcinogenesis, this study aimed to analyze the intensity of the inflammatory infiltrate and the microvascular density in PMD with the presence of oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma of the mouth. As a non-neoplastic epithelium control, an inflammatory fibrous hyperplasia (IFH) group was included. The sample consisted of 22 cases of IFH, 46 of ED and 21 of OSCC. In slides stained with hematoxylin and eosin, a histological analysis of the intensity of the inflammatory infiltrate was carried out, as well as the classification of ED cases according to the binary system, in dysplasias of high-risk of malignancy (HRED) and low-risk of malignancy (LRED), and according to the classification into three levels of mild, moderate or severe ED. The analysis of microvascular density (MVD) was performed using the immunohistochemical technique with the angiogenesis marker CD-105 in the lamina propria of ED and IFH cases, and in the stroma of OSCC cases. Immunohistochemical evaluation for VEGF in the epithelium of the lesions was also performed. It was observed that the MVD and the presence of inflammatory infiltrate increased as the malignancy of the lesion increased. Within the ED, severe and high-risk ED had higher rates of MVD and inflammatory infiltrate. Regarding the expression of VEGF, the ED were the lesions with the highest expression of this chemical mediator. When comparing MVD with VEGF expression, it was found that MVD increased with increasing VEGF expression, confirming the relationship between the two variables. It is concluded that the increase in MVD and inflammatory infiltrate is proportional to the malignant progression of the epithelium, different from the expression of VEGF, which was more intense in ED. Furthermore, the association between VEGF expression and MVD support the role of this growth factor in angiogenesis during oral carcinogenesis.

Keywords: oral cancer, inflammation, vascular density, stroma, CD105, VEGF.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição das características clínicas, conforme o diagnóstico.....	38
Tabela 2 - Distribuição das características clínicas, conforme o grau de displasia segundo a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS).....	39
Tabela 3 - Distribuição das características clínicas, conforme o grau de displasia de acordo com o sistema binário.....	40
Tabela 4 - Média, desvio padrão, mediana e distância interquartil da microdensidade vascular, conforme o diagnóstico e classificação inflamatória e relação com o VEGF.....	41
Tabela 5 - Distribuição dos diagnósticos, graus de displasia e classificação inflamatória conforme a imunexpressão de VEGF.....	43

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 – Expressão imunoistoquímica de CD105	41
Figura 2 - Expressão imunoistoquímica de VEGF.....	44

LISTA DE ABREVIATURAS

- Cd31** - cluster of differentiation 31
- CD34** - Cluster of Differentiation 34
- CD105** - Endoglin
- CEB** - carcinomas epidermoides bucais
- CEPSH** - Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos
- CIS** - carcinoma *in situ*
- COX-2** - ciclooxigenase 2
- DE** - displasia epitelial
- FGF** - fatores de crescimento de fibroblastos
- HE** - hematoxilina e eosina
- HFI** - hiperplasias epiteliais inflamatórias
- LPM** – lesões potencialmente malignas
- MVD** - “microvascular density”
- MDV** - microdensidade vascular
- miRNAs** - microRNAs específicos
- NF- κ B** - fator nuclear kappa B
- NO** - óxido nítrico
- OMS** - Organização Mundial da Saúde
- OPMD** - “oral potentially malignant disorders”
- PCNA** - Proliferating Cell Nuclear Antigen
- ROS** - espécies reativas de oxigênio
- TGF** - fatores de crescimento transformadores
- TGF- β** - fatores de crescimento transformadores- β
- TNF- α** - fator de necrose tumoral- α
- UFSC** - Universidade Federal de Santa Catarina
- VEGF** - fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	12
2 REVISÃO DE LITERATURA	15
3 OBJETIVOS	26
3.1 OBJETIVO GERAL.....	26
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	26
4 METODOLOGIA	27
5 RESULTADOS	31
5.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DIAGNÓSTICO.....	31
5.2 RELAÇÃO ENTRE O GRAU DE DISPLASIA EPITELIAL E AS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS.....	32
5.3 MARCAÇÃO DE CD105.....	35
5.4 MARCAÇÃO DE VEGF.....	36
6 DISCUSSÃO	39
7 CONCLUSÃO	44
8 REFERÊNCIAS.....	45
ANEXO A – ATA DE APRESENTAÇÃO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO	49
ANEXO B – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP	50

1 INTRODUÇÃO

O câncer oral é uma das principais causas de morbidade e mortalidade em todo o mundo, com cerca de 400.000 novos casos diagnosticados por ano (PATEL *et al.*, 2016). Cerca de 90% dos cânceres orais são carcinomas epidermóides bucais (NIKLANDER *et al.*, 2021). O carcinoma epidermoide de boca (CEB) é uma condição com etiologia multifatorial (PATEL *et al.*, 2016), porém, aproximadamente 90% dessas neoplasias malignas estão associadas ao hábito de tabagismo e etilismo (MAHARUDRAPPA BASNAKER; SATISH, 2014). A exposição a fatores de risco tais como tabaco, álcool, irradiação e infecção viral, resulta na ativação de proto-oncogenes (ras, myc, EGFR) ou inibição de genes supressores de tumor (TP53, pRb, p16) (BUGSHAN; FAROOQ, 2020). O CEB pode ser precedido por lesões potencialmente malignas (LPM), como a leucoplasia e a eritroplasia (GADBAIL *et al.*, 2017; ANURA *et al.*, 2014), e estas podem ou não ter alterações epiteliais arquiteturais e celulares, as quais caracterizam a displasia epitelial (DE) (GADBAIL *et al.*, 2017).

Sabe-se que o processo inflamatório crônico desempenha papel fundamental no desenvolvimento e progressão do câncer bucal (PATEL *et al.*, 2016). Mediadores inflamatórios provenientes de células do sistema imune inato e adaptativo e das células tumorais, como fator nuclear kappa B (NF- κ B), fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), citocinas inflamatórias, prostaglandinas, óxido nítrico (NO), espécies reativas de oxigênio (ROS) e microRNAs específicos (miRNAs), exacerbam o processo inflamatório e promovem a proliferação celular, invasão tecidual e angiogênese (PATEL *et al.*, 2016).

A angiogênese é o processo de formação de novos vasos a partir do recrutamento de células endoteliais precursoras ou pela multiplicação das células endoteliais de capilares já existentes (SHEELAM *et al.*, 2018). É um processo fundamental para a manutenção da homeostase nos seres vivos, estando associado a diversas condições fisiológicas (MICHAILIDOU; MARKOPOULOS; ANTONIADES, 2012). A angiogênese é rigidamente controlada por um equilíbrio químico entre fatores de crescimento e citocinas pró-angiogênicas e inibidores da neovascularização, sendo ativada apenas em situações necessárias. Logo, em tecidos normais, os vasos sanguíneos

geralmente estão quiescentes e as células geralmente secretam níveis baixos de indutores e níveis elevados de inibidores da angiogênese (MARLA; HEGDE; SHRESTHA, 2015).

Além de exercer um papel fisiológico importante, a angiogênese também está associada a diversas condições patológicas, como desordens oculares, malformações vasculares e neoplasias (MARLA; HEGDE; SHRESTHA, 2015; MICHAILIDOU; MARKOPOULOS; ANTONIADES, 2012). Em neoplasias malignas, inicialmente, as células mutadas são dependentes de vasos sanguíneos proximais para o suprimento de oxigênio e nutrientes (MARLA; HEGDE; SHRESTHA, 2015). Conforme ocorre a progressão tumoral, as células malignas passam a estimular a angiogênese tecidual, criando seu próprio aporte sanguíneo o qual permite seu crescimento, além de desempenhar um papel importante na progressão e metástase do tumor (MARLA; HEGDE; SHRESTHA, 2015). Existem diversas moléculas que funcionam como reguladores positivos da angiogênese, como os fatores de crescimento endotelial vascular (VEGF), fatores de crescimento de fibroblastos (aFGF e bFGF), fatores de crescimento transformadores- β (TGF- β), fator de necrose tumoral- α (TNF- α), interleucina-8 e angiopoietinas (MARLA; HEGDE; SHRESTHA, 2015). Uma característica marcante da angiogênese tumoral é a estruturação irregular e desorganizada dos vasos sanguíneos, isso porque a neoformação vascular nestes casos é mantida principalmente a partir do estímulo de VEGF (CARMELIET, 2005).

Quando se analisa a angiogênese necessária para o crescimento e progressão de um câncer, o VEGF é um dos principais mediadores químicos associados a esse processo (PATEL *et al.*, 2016). Em situações fisiológicas, a expressão de VEGF culmina na formação de novos vasos sanguíneos (proliferação, migração e sobrevivência das células endoteliais), regulação da permeabilidade vascular e manutenção da homeostase e reparo ósseo (NIKLANDER *et al.*, 2021). O VEGF é considerado o fator angiogênico mais importante e foi identificado pela primeira vez por Ferrara e Henzel a partir da cultura de células foliculares da glândula pituitária bovina (KIM; PARK; KIM, 2015). O VEGF é uma glicoproteína homodimérica e constitui uma família com os subtipos: VEGF-A, PlGF-1, VEGF-B, VEGF-C e VEGF-D10-12. A família VEGF liga-se aos receptores 1 de VEGF (VEGF-1 ou Flt-1) e ao receptor 2 de VEGF (VEGF-2 ou KDR / Flk-1) para promover a diferenciação e proliferação de células endoteliais (KIM; PARK; KIM, 2015). Em neoplasias malignas, o VEGF é superproduzido pelas células tumorais para promover

o aumento da permeabilidade dos vasos, a proliferação, migração e inibição da apoptose de células endoteliais, sendo um importante fator angiogênico (PATEL *et al.*, 2016). Geralmente o aumento da vascularização e da expressão de VEGF estão associados a um estágio tumoral avançado e mau prognóstico em uma variedade de cânceres humanos (CHENG *et al.*, 2011).

Outro potente estimulador da angiogênese é a Endoglina (CD105). O CD105 é uma glicoproteína transmembrana homodimérica que funciona como um receptor para dois tipos de fatores de crescimento transformadores (TGF-1 e TGF-3), os quais estão associados a angiogênese e fibrogênese (MAHARUDRAPPAS BASNAKER; SATISH, 2014; GADBAIL *et al.*, 2017). A endoglina é um potente fator angiogênico pleiotrópico expresso em células endoteliais ativadas durante a angiogênese (MAHARUDRAPPAS BASNAKER; SATISH, 2014). Uma das características importantes do CD105 é a baixa expressão em vasos já existentes, e uma intensa e precisa expressão em vasos neoformados, tornando-o um marcador específico para a detecção de angiogênese tumoral (GADBAIL *et al.*, 2017; MAHARUDRAPPAS BASNAKER; SATISH, 2014).

Diante do exposto, tendo em vista a notória relevância da expressão de VEGF pelo epitélio para a neoangiogênese e a expressão de CD-105 em vasos neoformados durante a carcinogênese bucal, nosso estudo irá avaliar a presença de tais marcadores, bem como avaliar a intensidade do infiltrado inflamatório, em amostras de DE bucais e CEB, com o propósito de entender melhor o papel da angiogênese na progressão do câncer de boca.

2 REVISÃO DE LITERATURA

Um biomarcador pode ser classificado em genômico, proteômico ou metabolômico. Estes têm uma grande importância clínica e laboratorial para o CEB, pois sua utilidade vai desde a determinação do risco de transformação maligna de uma lesão potencialmente maligna, até determinar o prognóstico e a resposta a uma terapia. Existem diversas técnicas moleculares para a identificação de um novo biomarcador, como matrizes de DNA, sequenciamento de alto rendimento, reação em cadeia da polimerase, e imuno-histoquímica. Depois de ser estatisticamente comprovado, o novo candidato a biomarcador deve passar pela análise e validação de hipótese, e após comprovada sua validade clínica, pode ser utilizado na tomada de decisão clínica (SANTOSH *et al.*, 2016).

As alterações moleculares subjacentes aos eventos carcinogênicos guiam as escolhas dos biomarcadores em neoplasias malignas. Destas alterações, encontra-se uma das principais características do câncer, a angiogênese. Angiogênese é o processo de formação de novos capilares sanguíneos a partir de vasos sanguíneos preexistentes por brotamento ou, por um mecanismo menos conhecido, chamado de angiogênese intussusceptiva. De qualquer maneira, a neoformação vascular é fundamental e importante para diversos processos e configurações fisiológicas, mas também participa de condições patológicas. Nas situações de normalidade, a neoformação vascular é rigidamente regulada e somente é ativada quando necessário. Ao analisar o processo de angiogênese em DE, à medida que as células acumulam alterações genéticas elas adquirem a capacidade de induzir a angiogênese a partir do aumento da secreção de indutores e da diminuição de inibidores de angiogênese, ocorrendo a chamada "mudança angiogênica". A angiogênese é ativada por diversos mecanismos, desde a expressão de indutores pelas próprias células tumorais, até o estímulo por parte de outras células que foram induzidas pelas células tumorais. Além de estimular a angiogênese, as células geneticamente mutadas bloqueiam a produção de inibidores da angiogênese ou tornam-se refratárias a eles. Somado a isso, as células inflamatórias presentes no estroma do tumor também podem contribuir para o processo, fornecendo uma variedade de fatores de crescimento, citocinas e proteases, que estimulam a neoformação vascular, semelhantes as moléculas secretadas pelas próprias células tumorais (MARLA; HEGDE; SHRESTHA, 2015).

A fim de analisar o papel da neoformação vascular na submucosa e do infiltrado inflamatório perante a gravidade de uma lesão, Mashhadiabbas e Fayazi-Boroujeni (2017) analisaram tais parâmetros em lâminas coradas com hematoxilina e eosina (HE) em casos de leucoplasias bucais. Para isso foram usadas 125 amostras de lesões leucoplásicas, sendo 35 casos de DE leve/moderada, 38 casos de DE severa/carcinoma *in situ* e 52 casos de CEB (classificação de acordo com a OMS). A vascularização foi avaliada em áreas livres de inflamação do tecido conjuntivo adjacente à lesão displásica e da borda invasiva do CEB. A partir disso, o número médio de vasos sanguíneos com $\leq 0,5\mu\text{m}$ de diâmetro em cinco campos de *hotspot* foi determinado sob um aumento de 400X. Em relação à inflamação, a intensidade do infiltrado inflamatório foi graduado como leve, moderado e severo. Observou-se que, as lesões de CEB tiveram uma maior quantidade de vasos quando comparadas com o grupo da DE severa/carcinoma *in situ* e com o grupo de DE leve/moderada. Além disso, a densidade vascular foi significativamente maior em DE severas, carcinoma *in situ* e CEB em comparação com DE leve e moderada, mas a vascularização de DE severa e carcinoma *in situ* não foi estatisticamente diferente do CEB. Já ao analisar a intensidade do infiltrado inflamatório, as lesões de CEB e de DE severa e carcinoma *in situ* obtiveram porcentagens maiores de inflamação severa, e as DE leve e moderada tiveram porcentagens maiores de inflamação leve. Os resultados mostraram que uma lesão com inflamação severa aumentou a chance de desenvolver lesões mais graves em 4,42 vezes em comparação com uma lesão com inflamação leve. Ao relacionar a densidade vascular com a intensidade do infiltrado inflamatório, o número de vasos foi maior conforme o aumento da intensidade de infiltração de células inflamatórias nos três grupos. Entretanto, não foi observada diferença significativa no número médio de vasos ao comparar lesões com inflamação de intensidade moderada e severa (MASHHADIABBAS; FAYAZI-BOROUJENI, 2017).

Ao analisar a angiogênese que ocorre durante o crescimento e progressão de um câncer, observa-se diversos mediadores químicos associados a esse processo, tal qual o VEGF, que desempenha papel primordial na formação de novos vasos. De forma geral, a família VEGF regula a morfogênese e a permeabilidade dos vasos sanguíneos. Como o VEGF é fundamental para a angiogênese, sua ação é importante para o crescimento e progressão de um tumor maligno, pois, assim como um tecido normal, tumores precisam de nutrição, oxigenação e um sistema para evacuar os resíduos metabólicos e o dióxido de carbono. Além do seu papel fundamental na angiogênese, o VEGF também participa

do recrutamento de células inflamatórias e inibe a apoptose das células endoteliais, que é uma função importante na manutenção dos vasos neoformados. O recrutamento de células inflamatória se dá a partir da indução da ativação da ciclooxigenase 2 (COX-2), que leva à ativação de NF-kB com subsequente liberação de citocinas inflamatórias, como IL-1 e TNF- α , entre outras. Já a inibição da apoptose das células endoteliais se dá pela indução da expressão de proteínas anti-apoptóticas, como Bcl-2, survivina e A1, ou pela ativação da via PI3K / Akt. Na mucosa oral normal, o VEGF geralmente não é detectado. Durante o processo de carcinogênese, vê-se um aumento progressivo da expressão de VEGF conforme aumenta-se a malignidade da lesão (NIKLANDER *et al.*, 2021).

Também em relação ao VEGF, a revisão sistemática de Gupta *et al.* (2016) reuniu uma série de artigos referentes a este mediador químico. Na normalidade, este fator de crescimento está associado a formação de vasos sanguíneos e sobrevivência endotelial, além de participar da formação do osso endocondral. Já no CEB, observou-se que maiores níveis de VEGF foram associados à piora do prognóstico em pacientes com CEB, e que existe uma forte positividade de VEGF em tecidos potencialmente malignos e malignos. Em relação aos receptores de VEGF, notou-se que células malignas do carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço expressam VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3, indicando que o VEGF pode ser um regulador autócrino da atividade celular tumoral, além do seu efeito angiogênico nas células endoteliais (GUPTA *et al.*, 2016).

Cheng *et al.* (2011) avaliaram a expressão de VEGF imuno-histoquimicamente em lesões potencialmente malignas e CEB. Para isso, foram selecionadas 100 amostras de CEB (79 CEB bem e 21 moderadamente diferenciados), 66 amostras de DE (sendo 20 amostras de DE severa, 22 de DE moderada e 24 de DE leve), e 36 amostras de tecido oral normal. A expressão de VEGF foi verificada em diferentes locais dependendo da classificação do tecido. No tecido normal, o epitélio oral demonstrou uma expressão negativa de VEGF ou positiva somente em células basais ou parabasais. Nas DE, observou-se a expressão de VEGF nas células nos dois terços inferiores do epitélio displásico, e as células basais e parabasais foram VEGF-negativas. No CEB, o VEGF foi marcado no citoplasma das células neoplásicas do ninho tumoral, sendo que as células periféricas do ninho estavam mais fortemente marcadas. As células neoplásicas da frente de invasão foram mais intensamente marcadas do que as células neoplásicas que estavam em outros locais. Além disso, a marcação de VEGF foi observada no citoplasma de

células endoteliais e macrófagos na lâmina própria de DE e no estroma de CEB. Em relação a quantificação da expressão de VEGF, esta teve um aumento progressivo do tecido normal, para a DE leve, para a DE moderada, para a DE grave, e para o CEB. Não se observou vínculo entre a expressão de VEGF e idade do paciente, localização do câncer, tamanho do tumor, recorrência, características histológicas do CEB e hábitos do paciente. Por outro lado, obteve-se maiores médias de expressão de VEGF em casos de CEB com metástase linfonodal, estágios clínicos mais avançados e menor tempo de sobrevida (CHENG *et al.*, 2011).

A relação da intensidade de expressão de VEGF com a carcinogênese, agressividade do tumor, metástases para linfonodos, prognóstico, e densidade vascular é algo controverso. Alguns estudos demonstram e outros não encontram tais relações (KYZAS; STEFANOY; AGNANTIS, 2004; TAE *et al.*, 2000; SAUTER *et al.*, 1999; MORIYAMA *et al.*, 1997). A discrepância observada nos estudos a esse respeito pode ser explicada pela utilização de diferentes métodos de análise e pela dificuldade de diferenciar a vascularização induzida por epitélios em transformação maligna e aquela induzida por mediadores de inflamação presentes em lesões potencialmente malignas e no estroma tumoral. Visto isso, Gandolfo *et al.* (2011) analisaram apenas a angiogênese induzida pelo epitélio da mucosa oral e a vascularização na lâmina própria, a partir da marcação imuno-histoquímica de VEGF no epitélio e CD34 nos vasos sanguíneos da lâmina própria. Para isso, eles analisaram a expressão destes marcadores em 29 casos de leucoplasia oral em áreas exibindo escasso infiltrado inflamatório e em áreas distantes da infiltrado inflamatório, com e sem DE. Também foram selecionadas 45 amostras de CEB com bordas epiteliais não tumorais dentro da mesma biopsia, sendo que essa borda foi classificada com ou sem DE. Como controles, foram selecionados 22 espécimes de mucosa oral clinicamente e histologicamente normal de pacientes que não faziam o consumo de álcool ou tabaco. A análise imuno-histoquímica demonstrou um aumento da expressão de VEGF e na vascularização da lâmina própria nas leucoplasias e bordas não tumorais adjacentes ao carcinoma, sendo que leucoplasias com DE apresentaram expressão significativamente maior do que as leucoplasias sem DE. Porém, não foi observada diferença estatisticamente significativa na expressão de VEGF ao comparar epitélios adjacentes ao carcinoma com e sem DE. Em relação ao CD34, observou-se uma maior vascularização nas leucoplasias, em especial as leucoplasias com DE, e bordas não

tumorais adjacentes ao carcinoma, evidenciando a hipótese que o que a angiogênese é induzida por epitélio nos estágios iniciais da cancerização (GANDOLFO *et al.*, 2011).

Como a expressão de VEGF está muito relacionada com a neoangiogênese no câncer oral, Astekar *et al.* (2012) analisaram imuno-histoquimicamente, além da intensidade expressão de VEGF, a densidade microvascular (MVD, do inglês *microvascular density*) com o CD34, buscando identificar a associação entre ambas. Foram utilizadas 10 amostras de mucosa oral normal, 20 amostras de DE (sendo 7 de DE leve, 8 DE moderada e 5 DE severa), e 30 amostras de CEB (14 CEB bem diferenciado, 11 CEB moderadamente diferenciado e 5 CEB pouco diferenciado). A partir da imuno-histoquímica, avaliou-se a localização, intensidade e área das células coradas. A intensidade de expressão de VEGF de cada lâmina foi classificada de 0 (sem coloração) a 3 (coloração intensa), e a área da coloração foi classificada de 0 (sem células coradas em qualquer campo microscópico) a 4 (mais de 75% das células tumorais coradas positivamente). A MDV foi determinada a partir da média de microvasos em três campos de *hotspots* para cada lâmina. Como resultado, obteve-se um aumento de expressão de VEGF conforme o aumento da malignidade, ou seja, o CEB foi mais marcado quando comparado com as DE, e as DE foram mais marcadas do que a mucosa normal. Dentro do grupo de CEB, houve uma diminuição da marcação de VEGF conforme de CEB bem diferenciado para CEB moderadamente diferenciado, e para CEB pouco diferenciado. Em relação a MDV, também se observou um aumento da MDV da mucosa normal para o CEB. Mas houve uma diminuição da MDV conforme o grau histológico do CEB, onde as lesões pouco diferenciadas tiveram uma densidade menor quando comparadas com a moderadamente diferenciadas, e as moderadamente diferenciadas tiveram uma densidade menor que as bem diferenciadas. Dentro das DE, as DE severas obteve uma maior expressão de VEGF e MDV, seguida pela DE leve e moderada (ASTEKAR *et al.*, 2012).

Nos casos de CEB, além do desequilíbrio do controle da angiogênese, há uma desregulação da proliferação celular, uma vez que estes dois processos estão intimamente ligados um ao outro. No estudo de Sheelam *et al.* (2018) avaliou-se o processo de angiogênese e proliferação celular a partir da análise da expressão imuno-histoquímica de VEGF, de CD34 e de PCNA em 10 lesões de líquen plano oral, 10 de leucoplasia oral, 10 de fibrose submucosa oral e 30 de CEB. Além disso, foram incluídos 10 casos de mucosa oral normal como controle negativo. A reatividade do PCNA foi classificada em

positiva (>5% das células foram coradas) e negativa (<5% das células coradas). A expressão de VEGF foi classificada de 0 a 4, dependendo da área de coloração no tecido conjuntivo sob um aumento de 10x de cada lâmina. Por último, a MDV foi obtida a partir da contagem de microvasos imunomarcados por CD34 nas três áreas mais densamente coradas de cada lâmina. A partir disso, os autores observaram um aumento progressivo da vascularização e da proliferação celular conforme a progressão das lesões potencialmente malignas para CEB (SHEELAM *et al.*, 2018).

Além de estar associado à angiogênese, o VEGF participa da quimiotaxia de mastócitos e monócitos. Os mastócitos são células altamente granuladas capazes de produzir muitas moléculas pró-inflamatórias, imunorreguladoras e angiogênicas. Diante disso, Michailidou, Markopoulos e Antoniadis (2012) analisaram o papel do VEGF e dos mastócitos na angiogênese na carcinogênese. Para isso, foram utilizadas 31 amostras de CEB, 13 de leucoplasias (5 sem DE, 4 com DE leve/moderada e 4 com DE leve) e 5 de tecido oral normal como controle negativo. A expressão de VEGF foi analisada imuno-histoquimicamente, a presença de mastócitos foi visualizada a partir da coloração de azul de toluidina, e a MDV foi analisada a partir da expressão de CD34. Os autores observaram um aumento gradativo da expressão de VEGF na progressão de mucosa normal para as leucoplasias e CEB. A MDV também aumentou da mucosa normal para o CEB. Não se observou correlação entre a expressão de VEGF e a MDV. A densidade de mastócitos nas amostras aumentou entre tecido normal, DE e CEB. Observou-se uma correlação estatisticamente significativa entre a densidade de mastócitos e a expressão de VEGF, e entre a densidade de mastócitos e a MDV (MICHAILIDOU; MARKOPOULOS; ANTONIADES, 2012).

Em relação aos subtipos de VEGF, VEGF-A é um dos mais estudados. Thiem *et al.* (2017) avaliaram, por meio de imuno-histoquímica, a expressão de VEGF-A e MDV (com a marcação de CD31) em lesões de leucoplasias com e sem DE e em CEB. Para isso foram utilizadas 49 amostras de leucoplasia sem DE, 33 amostras de leucoplasia com DE leve, 13 amostras de leucoplasia com DE moderada e 36 amostras de CEB derivados de leucoplasia. A MDV foi obtida a partir da média de vasos CD31+ contados em 6 *hotspots*. A coloração do VEGF foi contabilizada a partir da porcentagem de áreas imunopositivas ao VEGF-A. Observou-se um aumento significativo na MDV entre as lesões de leucoplasia sem DE e as lesões de leucoplasia com DE moderada e de CEB, e entre as

lesões de leucoplasia com DE leve e lesões de CEB. Notou-se também um diâmetro de vasos maior nas lesões de CEB quando comparadas com as leucoplasias sem DE. A expressão de VEGF-A aumentou significativamente de forma gradual de leucoplasia com DE leve para CEB. Por fim, observou-se uma leve relação entre a expressão de VEGF e a MDV (THIEM *et al.*, 2017).

A expressão imunohistoquímica de VEGF-A também já foi analisada por Nayak *et al.* (2012) juntamente com os níveis séricos de VEGF-A por ELISA, assim como a MDV com o CD34. Foram usadas 60 amostras de lesões potencialmente malignas (48 com DE e 12 sem DE), 60 amostras de CEB e 20 controles saudáveis com mucosa normal. Observou-se uma maior expressão de VEGF-A em tecidos de CEB quando comparadas com lesões potencialmente malignas. A expressão de VEGF-A foi maior nos casos de CEB com envolvimento de linfonodos quando comparados com os sem envolvimento. Os controles não mostraram expressão de VEGF-A (6 casos tiveram apenas uma coloração focal). A imunorreatividade de VEGF-A em casos de lesões potencialmente malignas não se correlacionou significativamente com o estado de DE. Foi observado um aumento da vascularização subepitelial nas leucoplasias. A média de MDV foi maior nas lesões potencialmente malignas e nos casos de CEB quando comparadas com os controles, mas maior nas lesões potencialmente malignas do que nos casos de CEB. Não houve correlação entre a expressão de VEGF-A e MDV (NAYAK *et al.*, 2012).

Frente aos estudo que avaliaram o papel do VEGF na neoformação vascular no processo de carcinogênese, questiona-se a o papel deste mediador na progressão do CEB. Levando em conta este questionamento, Kukreja *et al.* (2013) analisaram a expressão imuno-histoquímica de VEGF em CEB, assim como a relação entre o VEGF e a MDV (CD34). Foram usados 12 casos de CEB bem diferenciado, 6 casos de CEB moderadamente diferenciado e 15 casos de CEB pouco diferenciado. A intensidade de VEGF foi classificada em ausente (0), leve (1), moderada (2) e intensa (3). Para a determinação da MDV, foi feita a contagem de microvasos em três *hotspots* de cada lâmina. Em relação ao VEGF, os autores não observaram associação entre o grau histológico do tumor e a intensidade de expressão de VEGF. Também não houve correlação entre o grau de MDV e o grau de diferenciação histológica do tumor. Porém, foi no CEB bem diferenciado que se obteve a maior MDV. Além disso, os autores não observaram correlação entre a expressão de VEGF e a MDV (KUKREJA *et al.*, 2013).

Com o mesmo objetivo, Kapoor e Deshmukh (2012) compararam a expressão de VEGF com os diferentes graus histopatológicos em amostras de CEB (bem, moderadamente ou pouco diferenciado), tamanhos (maior ou menor que 8 cm²) e status dos linfonodos (palpáveis, sensíveis ou duros). Cerca de 90% das amostras tiveram expressão positiva para VEGF, sendo esta independente do grau histopatológico do tumor. Em relação ao tamanho do tumor, observou-se que à medida que o tamanho do tumor aumentou, a expressão de VEGF também aumentou. Em relação aos linfonodos, os resultados mostraram que à medida que os gânglios linfáticos se tornaram sensíveis e difíceis de palpar, a intensidade da expressão de VEGF também aumentou de fraca para forte (KAPOOR; DESHMUKH, 2012).

A relação entre a expressão de VEGF e MDV com as características histopatológicas e clínicas do CEB são controversas. Buscando elucidar este assunto, Naderi, Tirgari e Keshavarz, (2016) utilizaram 22 amostras de CEB e estas foram submetidas ao exame imuno-histoquímico para VEGF. A expressão de VEGF foi obtida a partir da intensidade da coloração e a área de coloração. A intensidade da coloração foi classificada como sem coloração, coloração fraca, coloração moderada, e coloração forte. A área de coloração foi classificada de 0 a 3. A MDV foi obtida com a contagem de vasos em 6 *hotspots* de cada amostra. Os autores observaram que a maior parte das amostras (50%) apresentaram uma coloração de VEGF moderada. Não houve correlação entre a intensidade de coloração de VEGF com idade, sexo, envolvimento de linfonodos, tamanho do tumor, diferenciação histológica tumoral e MDV. Em relação a área de coloração de VEGF, a maior parte (36,4%) dos casos exibiu mais de 75% das células tumorais positivas. Não houve correlação entre as áreas de coloração de VEGF com idade, sexo, envolvimento de linfonodos, diferenciação tumoral e MDV. Já as áreas de coloração de VEGF foram significativamente correlacionadas com o tamanho do tumor (NADERI; TIRGARI; KESHAVARZ, 2016).

Kim, Park e Kim (2015) concluíram que o VEGF é o fator angiogênico mais importante na carcinogênese. Eles examinaram a expressão de VEGF comparando com as informações clínicas do paciente, além de comparar a expressão de VEGF entre o CEB e o carcinoma *in situ* (CIS). Para isso, foram analisadas 40 amostras teciduais, sendo 20 amostras de CEB e 20 de CIS. A análise de VEGF foi feita a partir de imuno-histoquímica, e a intensidade de expressão foi classificada como de baixo nível, quando

era fraca ou negativa, ou de alto nível, quando a expressão era uniforme e forte. Também foi feita a análise da expressão gênica do VEGF por meio do *quantitative real-time polymerase chain reaction* (qRT-PCR). Imuno-histoquimicamente, no tecido normal ou CIS foi observada uma pequena expressão de VEGF, já no citoplasma de células de CEB moderadamente diferenciado se observou um aumento da expressão de VEGF. Ao analisarem a relação entre expressão de VEGF e as características clínicas do paciente, houve uma forte correlação positiva entre o grau de diferenciação histológica e a classificação TNM com a expressão de VEGF. Na análise quantitativa de RT-PCR de VEGF, o CEB mostrou uma maior expressão de VEGF que o CIS (KIM; PARK; KIM, 2015).

No que tange os hábitos do paciente, Scheidt *et al.* (2013) comparam a expressão imuno-histoquímica de VEGF, caspase-3 e p53 entre pacientes usuários e não usuários de tabaco e diagnosticados com CEB. Para isso, foram usadas 30 amostras de pacientes usuários de tabaco, 30 amostras de pacientes usuários de tabaco e álcool, e 30 amostras de não usuários de tabaco e álcool. Não se observou diferença significativa em relação à imunorreatividade do VEGF, caspase-3 e p53 entre os grupos. Porém, houve diferenças clínico-patológicas importantes entre os grupos. O grupo de pacientes usuários de tabaco e álcool apresentou tumores maiores em relação ao grupo de pacientes que não tinham esse hábito. O grupo de pacientes sem o hábito de tabaco e álcool também apresentou um maior número de lesões de CEB bem diferenciado e um menor número de lesões de CEB pouco diferenciado (SCHEIDT *et al.* 2013).

Em relação ao CD105, tal molécula em questão é uma glicoproteína transmembrana homodimérica que funciona como um receptor para dois tipos de fatores de crescimento transformadores (TGF- β 1 e TGF- β 3). Ele é considerado um importante marcador de MDV em tumores malignos por marcar apenas vasos neoformados. Considerando essa característica, Maharudrappa Basnaker e Satish (2014) avaliaram a expressão de CD105 e a MDV em mucosa normal e em CEB, em pacientes tabagistas e não tabagistas, a fim de compreender melhor a neoformação vascular durante a carcinogênese e o papel dos principais fatores indutores de angiogênese. Para isso, a amostra foi dividida em três grupos: grupo I com 12 pacientes não tabagistas e com mucosa clinicamente normal; grupo II com 20 pacientes com hábito de mascar ou fumar tabaco e com mucosa oral clinicamente normal (foi feito biópsia e caso houvesse DE, ela

foi classificada em leve, moderada ou grave); e grupo III com 20 casos de CEB diagnosticados histopatologicamente. Por meio da expressão de CD105, primeiramente avaliada em relação a localização e intensidade, foi determinada a MDV sendo classificada de 0 a 4 de acordo com a quantidade de células coradas num campo. No grupo I, 2/12 pacientes foram negativos para a expressão de CD105 e maioria tinha uma MDV classificada como grau 2; no grupo II, 7/20 pacientes foram negativos para expressão de CD105, e a maioria das amostras apresentaram MDV grau 2; no grupo III, 6/20 pacientes foram negativos para a expressão de CD105 e a maioria dos casos apresentaram MDV grau 4. Ou seja, observou-se um aumento da expressão de CD105 associado ao consumo de tabaco, assim como um aumento na MDV associado ao aumento da malignidade da lesão (MAHARUDRAPPA BASNAKER; SATISH, 2014).

Khalili *et al.* (2015) avaliaram imuno-histoquimicamente a MDV por meio da expressão de CD105 e a proliferação celular por meio da expressão de Ki-67, e correlacionaram os níveis de angiogênese com a atividade proliferativa das células neoplásicas. Para isso foram selecionadas 24 amostras de CEB da língua. A MDV foi obtida a partir da média de microvasos marcados por CD105 em 4 *hotspots*. Os carcinomas bem diferenciados obtiveram maiores índices de MDV que os carcinomas de moderadamente e pouco diferenciados. Além disso, observou-se uma maior expressão de CD105 em carcinomas bem diferenciados. Não se viu correlação significativa entre proliferação celular e angiogênese (KHALILI *et al.*, 2015).

Em relação às DE, Gadbail *et al.* (2017), utilizando o sistema de classificação binário de DE, avaliaram a neoangiogênese a partir da imunomarcagem de CD105, a proliferação celular por meio do Ki-67, e a presença de miofibroblastos através da marcação de α -SMA, que desempenham um papel importante no estroma tumoral. Foram usadas 30 amostras de mucosa oral normal e 140 espécimes de LPM. Os casos de DE foram classificados como DE de baixo e alto risco. A MDV média foi obtida a partir da contagem de vasos marcados por CD105 em dois campos num aumento de 100x. Os autores observaram um aumento progressivo da MDV, da marcação de Ki-67 e da expressão de α -SMA da mucosa normal para as DE de baixo e alto risco, evidenciando uma correlação entre as três variáveis avaliadas (GADBAIL *et al.*, 2017).

Anura *et al.* (2014) analisaram amostras de fibrose submucosa oral (sendo 18 sem displasia e 40 com displasia) para a imunexpressão epitelial de E-caderina e VEGF, e a

MDV na lâmina própria utilizando o CD105. A expressão de VEGF aumentou gradativamente na camada suprabasal do epitélio conforme a progressão das amostras de tecido normal para displasia severa. Em relação à MDV evidenciada por CD105, o número médio de vasos sanguíneos aumentou também gradativamente conforme a progressão tecidual das lesões. Os autores observaram uma correlação forte e positiva entre a expressão de VEGF e a MDV nos casos com displasia epitelial severa. Segundo os autores, essa correlação pode ser justificada pelo mecanismo de regulação dessas duas proteínas, sendo a expressão de ambas induzidas pela presença de hipóxia tecidual (ANURA *et al.*, 2014).

Perante o exposto, observamos que o VEGF e o CD105 apresentam um mecanismo regulatório em comum. Entretanto, não foram encontrados estudos relacionando essas variáveis em lesões de leucoplasia oral. Por essa razão, neste estudo estudamos a associação entre esses marcadores, além de relacioná-los com a intensidade do infiltrado inflamatório na lâmina própria de lesões com displasia epitelial, utilizando como grupos de comparação amostras de CEB (controle positivo de malignidade) e amostras de hiperplasia fibrosa inflamatória (controle negativo de malignidade).

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O objetivo principal deste trabalho foi analisar a MDV e a expressão de VEGF em displasia epitelial (DE) comparando com epitélio não neoplásico e neoplásico.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- 1- Proceder a avaliação histológica dos casos selecionados e classificar as DE epiteliais segundo o sistema binário, em displasias de alto risco e baixo risco e segundo a OMS em DE leve, moderada e severa;
- 2- Relacionar a intensidade da MDV e a expressão de VEGF com o grau de DE;
- 3- Comparar a MDV e a expressão de VEGF entre os casos de DE, comparando essa expressão com epitélio neoplásico (carcinoma epidermoide de boca - CEB) e epitélio não neoplásico (hiperplasia fibrosa inflamatória – HFI);
- 4- Analisar e comparar a intensidade do infiltrado inflamatório entre os casos de DE, HFI e CEB;
- 5- Relacionar a intensidade do infiltrado inflamatório com o grau de DE;
- 6- Investigar a correlação entre a presença de células inflamatórias e a MDV nos grupos em estudo.

4 METODOLOGIA

4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

O estudo proposto é do tipo observacional transversal, com amostra retrospectiva.

4.2 ASPECTOS ÉTICOS E LEGAIS

O presente projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEPSH) da Universidade Federal de Santa Catarina, parecer N° 1.005.587 de 30/03/2015 (Plataforma Brasil - CAAE: 42976715.3.0000.0121).

4.3 SELEÇÃO DA AMOSTRA

Foram selecionados 46 casos de DE (todos casos de leucoplasias) dos arquivos do Laboratório de Patologia Bucal da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC), sendo 28 casos de DE leve, 10 casos de DE moderada e 8 casos de DE severa seguindo o critério classificatório da OMS, e 31 casos de DE de baixo risco e 15 casos de DE de alto risco de malignização seguindo o critério de classificação binário. Como amostra positiva de neoplasia invasiva foram incluídos 21 casos de CEB e como amostra de tecido não neoplásico foram incluídos 22 casos de HFI. O período do levantamento dos casos foi de 2007 a 2018. A seleção dos casos foi feita com base no diagnóstico histopatológico e na análise das lâminas coradas em H&E.

4.4 LEVANTAMENTO DOS DADOS CLÍNICOS

A verificação dos dados clínicos dos casos selecionados foi realizada através da análise das fichas de biópsia arquivadas no LPB/UFSC. Os dados avaliados foram: em relação ao paciente: idade e sexo; os dados com relação às lesões foram: localização e diagnóstico histopatológico. Também foi avaliado a presença de hábitos nocivos dos pacientes, com relação ao uso de tabaco e de bebida alcoólica.

Foi confeccionado uma ficha para registro das informações que foram armazenadas em um banco de dados eletrônico para posterior análise descritiva.

4.5 CLASSIFICAÇÃO DAS DISPLASIAS EPITELIAIS

A classificação das DE foi feita seguindo a classificação da OMS em DE leve, moderada e severa, e seguindo a classificação binária em alto risco de malignização (DEAM) e baixo risco de malignização (DEBM) (TAKATA; SLOOTWEG, 2017; KUJAN *et al.*, 2006).

4.6 AVALIAÇÃO DO PROCESSO INFLAMATÓRIO

A intensidade de infiltrado inflamatório foi avaliada a partir da contagem total de células inflamatórias (mononucleares e polimorfonucleares) em um aumento de 400x, com o auxílio da ferramenta “cell counter” do software NIH ImageJ 1.45q. Foram avaliados cinco campos consecutivos e para cada caso foi calculado a média e mediana dos campos analisados. Em seguida, a intensidade do infiltrado inflamatório foi classificada em: 0 - ausência de inflamação, [0-10] células/área; 1 - inflamação discreta, [11-25] células inflamatórias/área; 2 - inflamação moderada, [26-65] células inflamatórias/área; 3 - inflamação intensa, [>65] células inflamatórias/área. (24).

4.7 PROCEDIMENTOS LABORATORIAIS PARA AS REAÇÕES IMUNO-HISTOQUÍMICAS

Os casos selecionados, fixados em formol e emblocados em parafina, foram submetidos à técnica de imuno-histoquímica pelo método do polímero marcado-HRP, para avaliação da proteína CD105 utilizando-se o anticorpo primário anti-CD105 (Endoglin clone A-8, Santa Cruz Biotechnology). Para avaliação do VEGF foi utilizado o anticorpo primário anti-VEGF (clone C1; sc-7269; Santa Cruz Biotechnology).

Foram realizados cortes teciduais de 3 μ m de espessura, montados em lâmina preparada com solução de ATPS (3-aminopropyltriethoxysilene). Os cortes foram inicialmente desparafinados em xilol e hidratados por passagens sucessivas em etanol de concentrações decrescentes (100, 90, 80%).

Previamente à incubação com o anticorpo primário, os cortes foram submetidos ao bloqueio da atividade endógena da peroxidase através de solução de peróxido de hidrogênio a 6% e metanol. Em seguida, foi realizado o tratamento para recuperação antigênica, em tampão citrato 0,01M pré-aquecido, em banho maria por 40 minutos. Em seguida, as lâminas foram imersas durante 40 minutos em solução de leite desnatado em pó diluído em solução salina tamponada 0.05M, pH 7.4 (PBS), para bloqueio das reações

inespecíficas. As lavagens entre as etapas foram realizadas com solução tamponada de Tris-HCl 0,05M, pH 7,4. As lâminas foram então incubadas com os anticorpos primários durante a noite em câmara úmida a 4°C.

No segundo dia de reação, para amplificação da reação, foi utilizado o Envision (Dako), que consta de um polímero de horseradish peroxidase que é conjugado a um anticorpo secundário policlonal. A revelação da reação foi realizada através de solução cromógena, contendo diaminobenzidina (DAB) em tampão Tris-HCl 0,05M, pH 7,4. Após a revelação, foi realizada a contra-coloração das lâminas com hematoxilina de Herrys, seguido de desidratação em cadeias de concentração crescentes de etanol (etanol 50% à etanol absoluto), diafanização em xilol e montagem em Permount®. O controle negativo das reações foi realizado pela abolição do anticorpo primário.

4.8 ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA

A microdensidade vascular (MDV) no tecido conjuntivo dos espécimes foi determinada pelo número médio de vasos imunomarcados para o anticorpo anti-CD105. No processo de contagem, as células endoteliais isoladas e os arranjos celulares endoteliais, com ou sem lúmen conspícuo e corados positivamente, foram considerados vasos unitários. Todas as contagens foram realizadas com auxílio do software NIH ImageJ 1.36b (National Institutes of Health, Maryland, EUA), a partir de imagens capturadas em uma magnitude de 200x. Calculou-se a média de vasos positivo de três campos de *hotspots* por caso. A avaliação do infiltrado inflamatório e da MDV foi realizada a partir de cortes histológicos seriados, a fim que ambas as avaliações sejam realizadas nas mesmas regiões dos espécimes.

A intensidade da marcação por VEGF no epitélio foi classificada de forma binária em ausente/leve ou moderada/intensa. Esta análise foi realizada duas vezes em dois momentos laboratoriais distintos por dois avaliadores. Os casos com resultados distintos nas duas análises foram reavaliados chegando à um consenso.

4.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados pelo software IBM SPSS Statistics 18 (SPSS Inc., Brasil) utilizando-se testes estatísticos apropriados para análise das diferenças entre os grupos para os marcadores imuno-histoquímicos e contagem de células inflamatórias.

Após aplicação do teste de normalidade Shapiro-Wilk e a constatação da distribuição anormal dos dados avaliados, optou-se pela realização do teste não paramétrico de Kruskal-Wallis, quando mais de três grupos estavam sendo comparados e o teste de Mann-Whitney, quando apenas dois grupos estavam sendo comparados. No caso de comparações múltiplas entre os grupos foi utilizado o teste post hoc de Dunn- Bonferroni. A correlação entre variáveis quantitativas foi feita por meio do índice de correlação de Spearman. O nível de significância foi estabelecido em $P < 0.05$.

Os resultados foram expressos como número médio de vasos sanguíneos (MDV) \pm o desvio padrão da média (DPM) e mediana e distância interquartil (DIQ). A análise do infiltrado inflamatório foi abordada como variável quantitativa, expressa em média \pm DV e mediana e DIQ e como qualitativa conforme a classificação Ausente, Discreta, Moderada e Intensa. Foi considerado o valor de $P < 0,05$ para dados com significância estatística.

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E DIAGNÓSTICO

Os locais mais acometidos pelo CEB foram a língua, assoalho bucal e gengiva, correspondendo à 23,8% dos casos cada (Tabela 1). Em relação a localização das DE, a região bucal mais acometida foi a língua (30,4%), seguida pela mucosa jugal (26,1%) e gengiva (19,6%). Ao analisar as localizações das HFI, as regiões mais afetadas por tal lesão foram a mucosa jugal (40,9%), língua (22,7%) e mucosa labial (22,7%).

A média de idade dos pacientes diagnosticados com CEB foi $57 \pm \text{DPM}$ anos, e a de displasia foi $58 \pm \text{DPM}$ anos (Tabela 1). Os pacientes homens foram mais acometidos pelo câncer (95,2%). Por outro lado, nas DE, houve uma distribuição semelhante entre o sexo feminino e masculino, com discreto predomínio de mulheres (54,3%) (Tabela 1).

A maioria dos pacientes que tiveram amostras diagnosticadas como CEB utilizavam tabaco e álcool. De 21 casos de CEB, obtiveram-se dados sobre tabagismo para 17 participantes, dos quais 16 eram tabagistas. Em relação ao etilismo, obtiveram-se os dados de 14 pacientes, dos quais 13 eram usuários. Além disso, 12 pacientes faziam o uso simultâneo de álcool e tabaco (Tabela 1). Apenas um paciente diagnosticado com CEB na região do palato alegou não fazer o uso nem de álcool nem de tabaco. Nos casos de DE não foi diferente, a maioria dos casos (85,7%) fazia o uso de tabaco, e 59,3% era etilista (Tabela 1).

Em relação ao CEB, a maioria dos casos exibiu inflamação intensa (57,1%). É importante evidenciar que, nos casos de CEB, nenhuma biópsia foi classificada com inflamação ausente. Na displasia epitelial, a maior parte dos casos foram enquadrados em inflamação intensa (34,8%), sendo logo seguida por inflamação moderada (32,6%), e a inflamação discreta e ausente foram menos prevalentes, obtendo a porcentagem de 23,9% e 8,7%, respectivamente. Ao analisar o grau de inflamação nas HFI, 77,3% foram classificados como inflamação ausente, 18,2% como inflamação discreta, e apenas 4,5% como inflamação moderada. Nesse caso, ao contrário do CEB, não houve nenhum caso de inflamação intensa (Tabela 1).

Tabela 1: Distribuição das características clínicas, conforme o diagnóstico

		Diagnóstico					
		HFI		DE		CEB	
Idade média ± DP		50±15		58±14		57±8	
Sexo N(%)	Masculino	11	50,0%	21	45,7%	20	95,2%
	Feminino	11	50,0%	25	54,3%	1	4,8%
Tabagismo N(%)	Não	6	50,0%	6	14,3%	1	5,9%
	Sim	6	50,0%	36	85,7%	16	94,1%
Etilismo N(%)	Não	8	88,9%	11	40,7%	1	7,1%
	Sim	1	11,1%	16	59,3%	13	92,9%
Classificação inflamação N(%)	Ausente	17	77,3%	4	8,7%	0	0,0%
	Discreto	4	18,2%	11	23,9%	4	19,0%
	Moderado	1	4,5%	15	32,6%	5	23,8%
	Intenso	0	0,0%	16	34,8%	12	57,1%
Localização	Língua	5	22,7%	14	30,4%	5	23,8%
	Assoalho	0	0,0%	6	13,0%	5	23,8%
	Gengiva	0	0,0%	9	19,6%	5	23,8%
	Mucosa Jugal	9	40,9%	12	26,1%	4	19,0%
	Palato	3	13,6%	5	10,9%	2	9,5%
	Mucosa labial	5	22,7%	0	0,0%	0	0,0%

Legenda: HFI, hiperplasia fibrosa inflamatória; DE, displasia epitelial; CEB, carcinoma epidermoide; DP, desvio padrão; N, número da amostra.

Fonte: elaborada pelo autor.

5.2 RELAÇÃO ENTRE O GRAU DE DISPLASIA EPITELIAL E AS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

Em relação às lesões de DE, segundo a classificação da OMS, a maior parte apresentava DE leve (28/46). As idades médias dos pacientes diagnosticados com DE leve, moderada e severa foram respectivamente 57, 58, 59±DP anos. Ambos os sexos foram mais afetados pelas DE leves, e estas também foram mais prevalentes em pacientes que alegaram ser tabagistas (63,9%) e etilistas (62,5%). Lesões na gengiva e assoalho exibiram maior frequência de DE leve, enquanto nas lesões de palato houve predomínio de displasias moderadas/severas. Nas outras localizações houve uma distribuição

semelhante entre lesões com DE leve e DE moderada/severa. DE severas foram observadas com maior frequência na língua, mucosa jugal e palato (Tabela 2).

Tabela 2: Distribuição das características clínicas, conforme o grau de displasia segundo a classificação da Organização Mundial da Saúde (OMS).

		Displasia epitelial					
		Leve		Moderada		Severa	
Idade média ± DP		57±14	14	58±12	12	59±14	
Sexo N(%)	Masculino	16	76,2%	1	4,8%	4	19,0%
	Feminino	12	48,0%	9	36,0%	4	16,0%
Tabagismo N(%)	Não	2	33,3%	1	16,7%	3	50,0%
	Sim	23	63,9%	8	22,2%	5	13,9%
Etilismo N(%)	Não	5	45,5%	2	18,2%	4	36,4%
	Sim	10	62,5%	2	12,5%	4	25,0%
Localização N(%)	Língua	7	50,0%	3	21,4%	4	28,6%
	Assoalho	5	83,3%	1	16,7%	0	0,0%
	Gengiva	8	88,9%	1	11,1%	0	0,0%
	Mucosa jugal	6	50,0%	3	25,0%	3	25,0%
	Palato	2	40,0%	2	40,0%	1	20,0%

Legenda: DP, desvio padrão; N, número da amostra.

Fonte: elaborada pelo autor.

Segundo a classificação binária, a idade média dos pacientes diagnosticados com DE de baixo risco foi 56±DP anos e a de DE de alto risco foi 61DP anos. Em ambos os sexos houve predomínio de lesões de baixo risco, correspondendo a 76,2% dos casos em homens e 60,0% em mulheres, entretanto, mulheres exibiram maior frequência de lesões com DE de alto risco em comparação aos homens. A maior parte dos pacientes que alegaram não fazer o uso de tabaco e álcool foram diagnosticados com DE de alto risco, e os que tinham esses hábitos foram diagnosticados com DE de baixo risco. Apesar de lesões de baixo risco terem sido mais prevalentes em todos os sítios, lesões na língua, mucosa jugal e assoalho exibiram as maiores frequências de DE de alto risco (Tabela 3).

Tabela 3: Distribuição das características clínicas, conforme o grau de displasia de acordo com o sistema binário.

		Displasia epitelial			
		Baixo risco		Alto risco	
Idade média ± DP		56±14		61±13	
Sexo N(%)	Masculino	16	76,2%	5	23,8%
	Feminino	15	60,0%	10	40,0%
Tabagismo N(%)	Não	2	33,3%	4	66,7%
	Sim	26	72,2%	10	27,8%
Etilismo N(%)	Não	5	45,5%	6	54,5%
	Sim	11	68,8%	5	31,3%
Localização N(%)	Língua	8	57,1%	6	42,9%
	Assoalho	4	66,7%	2	33,3%
	Gengiva	8	88,9%	1	11,1%
	Mucosa jugal	7	58,3%	5	41,7%
	Palato	4	80,0%	1	20,0%
Classificação inflamação N (%)	Ausente	4	100,0%	0	0,0%
	Discreto	10	90,9%	1	9,1%
	Moderado	11	73,3%	4	26,7%
	Intenso	6	37,5%	10	62,5%

Legenda: DP, desvio padrão; N, número da amostra.

Fonte: elaborada pelo autor,

Em relação à intensidade do infiltrado inflamatório, segundo a classificação da OMS, todos os casos exibindo infiltrado inflamatório ausente eram DE leves. Por outro lado, 68,8% dos casos de inflamação intensa foram DE moderadas e severas. Observou-se também que todos os casos de DE severa eram permeados por um infiltrado inflamatório intenso (Tabela 2). No sistema de classificação binário, todas os casos com infiltrado inflamatório ausente eram DE de baixo risco, e a maioria das amostras teciduais classificadas com inflamação discreta e moderada também eram DE de baixo risco. Em contrapartida, a maior parte dos casos de inflamação intensa eram DE de alto risco (Tabela 3).

5.3 MARCAÇÃO DE CD105

A MDV foi maior nos casos de CEB, seguidos pelos casos de DE, sendo as lesões menos vascularizadas as HFIs (Figura 1 e Tabela 4), no entanto não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

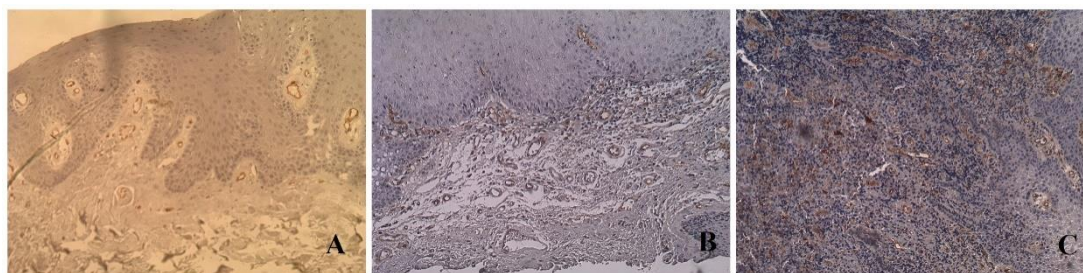
Tabela 4: Média, desvio padrão, mediana e distância interquartil da microdensidade vascular, conforme o diagnóstico e classificação inflamatória e relação com o VEGF.

		CD105				
		Média	DP	Mediana	DIQ	P
Diagnóstico	CEB	121,56	97,72	102,00	130,67	0,237
	DE	119,45	90,80	92,50	75,33	
	HFI	77,70	35,32	71,00	48,00	
Binário	Baixo risco	109,25	80,68	91,33	65,66	0,241
	Alto risco	140,53	108,85	111,67	112,66	
OMS	DE leve	115,81	90,33	92,17	75,83	0,328
	DE moderada	99,63	60,45	91,83	59,00	
	DE severa	156,96	120,90	110,17	125,33	
Classificação inflamação	Ausente	90,81	67,22	75,00	58,33	0,741
	Discreto	97,81	49,50	91,33	85,66	
	Moderado	118,68	99,51	91,67	125,67	
	Intenso	124,96	99,47	98,50	94,34	
VEGF	Ausente a leve	97,83	75,61	71,50	83,84	0,111
	Moderada a severa	121,15	90,47	95,33	61,00	

Legenda: CEB, carcinoma epidermoide; DE, displasia epitelial; HFI, hiperplasia fibrosa inflamatória; DP, desvio padrão; DIQ, distância interquartil; OMS, Organização Mundial da Saúde.

Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 1 – Expressão imunoistoquímica de CD105



Legenda: A) Hiperplasia Fibrosa Inflamatória, B) Displasia Epitelial, C) Carcinoma Epidermoide. 200X

Ao comparar as DE entre si segundo a classificação da OMS, a MDV foi maior nas DE severas. De maneira semelhante, segundo a classificação binária, as DE de alto risco obtiveram uma média de MDV maior que as de baixo risco (Tabela 4), no entanto não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

A marcação de CD105 aumentou conforme o aumento da intensidade do infiltrado inflamatório, onde os maiores índices de marcação foram nas lesões intensamente permeadas de infiltrado inflamatório, seguidas pelas lesões com o grau de inflamação moderado (Tabela 4), no entanto não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Ao se comparar a expressão de VEGF com a MDV, observou-se que a MDV foi maior nos casos classificados como expressão de VEGF moderada a severa (média: $121,15 \pm 90,47$), em relação à MDV em casos com expressão de VEGF ausente ou leve (média: $97,83 \pm 75,61$) (Tabela 4), no entanto não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

5.4 MARCAÇÃO DE VEGF

Em relação aos grandes grupos diagnósticos, casos de DE exibiram discreto predomínio de expressão de VEGF moderada/severa (58,7%). Por outro lado, a maior parte dos casos de CEB foram classificados como expressão ausente ou leve (57,1%), assim como os casos de HFI (59,1%) (Tabela 5), no entanto não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Dentro das DE, conforme a classificação da OMS, as DE leves exibiram predomínio de expressão moderada a severa (67,9%), assim como as DE severas (62,5%) (Tabela 5), no entanto não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

Ainda no que se refere às DE, segundo a classificação binária, a maior parte das DE de baixo risco foram classificadas como expressão de VEGF moderada a severa (64,5%). Oposto às lesões de alto risco, em que houve um discreto predomínio de

expressão ausente a leve (53,3%) (Tabela 5), no entanto não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos

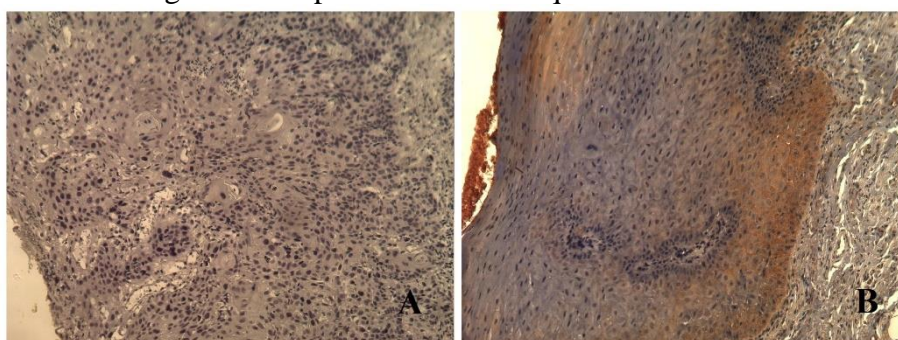
Tabela 5: Distribuição dos diagnósticos, graus de displasia e classificação inflamatória conforme a imunexpressão de VEGF.

		VEGF				P
		Ausente a leve		Moderada a severa		
Diagnóstico N(%)	CEB	12	57,1%	9	42,9%	0,284
	DE	19	41,3%	27	58,7%	
	HFI	13	59,1%	9	40,9%	
Binário N(%)	Baixo risco	11	35,5%	20	64,5%	0,295
	Alto risco	8	53,3%	7	46,7%	
OMS N(%)	DE leve	9	32,1%	19	67,9%	0,147
	DE moderada	7	70,0%	3	30,0%	
	DE severa	3	37,5%	5	62,5%	
Classificação inflamação N(%)	Ausente	8	38,1%	13	61,9%	0,065
	Discreto	13	68,4%	6	31,6%	
	Moderado	13	61,9%	8	38,1%	
	Intenso	10	35,7%	18	64,3%	

Legenda: N, número da amostra; CEB, carcinoma epidermoide; DE, displasia epitelial; HFI, hiperplasia fibrosa inflamatória; OMS, Organização Mundial da Saúde.

Fonte: elaborada pelo autor.

Figura 2 – Expressão imunistoquímica de VEGF



Legenda: comparação das expressões de VEGF, onde na imagem A observa-se a expressão ausente de VEGF, e na B expressão intensa de VEGF em 200x.

Nos casos com infiltrado inflamatório intenso houve maior frequência de expressão de VEGF moderada a severa (64,3%). Observou-se também que a maior parte dos casos classificados com inflamação ausente foram classificados como expressão

moderada a severa. Por outro lado, nos casos de inflamação discreta e moderada a expressão de VEGF foi frequentemente classificada como ausente ou leve (Tabela 5). Porém, não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos.

6 DISCUSSÃO

Ao analisar as características clínicas da amostra, a média de idade dos pacientes do nosso estudo com DE foi de 58 anos, havendo um discreto predomínio por mulheres. Arduino *et al.* (2009), apesar de obterem resultados ligeiramente diferentes, observaram padrões semelhantes, onde a idade média foi 63,8 anos e não se observou predileção significativa por sexo (51,7% eram homens).

No que se trata dos CEB, de 21 casos diagnosticados, apenas um era mulher, observando-se uma grande prevalência desta condição em homens, com uma média de idade de 57 anos. Ambos os dados estão de acordo com a literatura, como descrito na revisão de Warnakulasuriya (2009), que constatou uma predileção por homens de 1.5:1 e uma média de idade de 62 anos, sendo que a maioria dos casos ocorre em pessoas com mais de 50 anos. Tal predileção pode ser explicada pela característica masculina de ter hábitos nocivos mais contundentes (WARNAKULASURIYA, 2009).

Ao comparar nossos resultados com o estudo de Arduino *et al.* (2009) em relação aos hábitos de tabagismo e etilismo em DE, observa-se dados conflitantes. Segundo Arduino *et al.* (2009), a maior parte dos participantes com DE não tinham estes hábitos, e no nosso estudo a maioria dos casos que tinham esse dado coletado e foram diagnosticados com DE faziam o consumo de álcool e tabaco, predominando os casos de hábito simultâneo (ARDUINO *et al.*, 2009). Apesar dos resultados díspares, a relação do tabagismo e etilismo como fatores etiológicos das lesões potencialmente malignas e do CEB é amplamente conhecida (TILAKARATNE *et al.*, 2019). Tal relação se dá pela capacidade do tabaco de promover alterações genéticas nas células epiteliais a partir da ação das substâncias carcinogênicas existentes, e do álcool de promover um ambiente favorável para a ação dos carcinógenos, auxiliando no processo de carcinogênese oral (MELLO *et al.*, 2019).

Sobre as localizações predominantes das DE no presente estudo, observou-se predomínio de lesões na língua e mucosa jugal, o que está de acordo com a literatura estudada. No estudo de Arduino *et al.* (2009), os locais de predileção da DE foram língua, mucosa bucal e palato. Porém, a displasia epitelial pode acometer quaisquer sítios da cavidade oral e a determinação do local de acometimento da DE vai depender de diversos fatores, como os hábitos deletérios do paciente e frequência destes (JABER, 2010).

No presente estudo, o grau de DE foi avaliado segundo os critérios da OMS e a classificação binária (TAKATA; SLOOTWEG, 2017; KUJAN *et al.*, 2006). Em relação à associação entre grau de displasia e características clínicas, tanto na classificação da OMS quanto na binária os casos com maior desorganização tecidual (DE severa, moderada e de alto risco) foram associados à pacientes sem hábitos de tabagismo e etilismo. Quando se trata de lesões potencialmente malignas, estudos observaram uma maior taxa de progressão maligna em pacientes sem os hábitos de fumar e consumir bebidas alcoólicas quando comparadas à pacientes que eram etilistas e tabagistas, e esses dados podem estar atrelados à suscetibilidade genética e infecção pelo HPV (ROCK *et al.*, 2018; JABER, 2010).

Neste estudo, a MDV foi avaliada no tecido conjuntivo subjacente ao epitélio de lesões de HFI e DE, e no estroma de lesões de CEB, a partir da expressão de CD105, que é um notável biomarcador de MDV reconhecido por marcar apenas vasos neoformados em lesões malignas (MAHARUDRAPPA; SATISH, 2014). Embora sem diferença estatística, no presente estudo foi observado que a MDV foi maior nas lesões de CEB, seguida pelas lesões de DE e por último as de HFI, ou seja, quanto maior o grau de malignidade, maior a MDV, assim como foi constatado por Maharudrappa e Satish (2014). Ainda segundo os presentes resultados, dentre as displasias epiteliais, a MDV foi maior em lesões exibindo DE severa e alto risco de malignização, porém tal dado não obteve diferença estatística entre os grupos. Gadbail *et al.* (2017) também avaliaram imuno-histoquimicamente com CD105 a MDV seguindo o sistema binário de classificação de DE, obtendo uma maior marcação de vasos nas DE de alto risco. Estes resultados podem ser explicados pelo aumento gradual da necessidade de nutrição tecidual conforme a progressão maligna devido ao aumento da quantidade de células e da atividade celular. O aumento da vascularização ocorre em resposta à diferentes mecanismos iniciados pelas células malignas e células do estroma adjacente, em um processo conhecido por “mudança angiogênica” (MARLA; HEGDE; SHRESTHA, 2015).

A carcinogênese também está relacionada com o aumento do infiltrado inflamatório, o qual ocorre em resposta à expressão de fatores de crescimento, citocinas e proteases, e contribui com o desenvolvimento tumoral por estimular a vascularização, manter a proliferação e sobrevivência das células malignas e alterar a composição da

matriz extracelular facilitando o processo de invasão (MARLA; HEGDE; SHRESTHA, 2015). No presente estudo também se analisou a presença e intensidade de infiltrado inflamatório nos casos selecionados. Observou-se um aumento progressivo da intensidade do infiltrado inflamatório conforme o aumento da malignidade da lesão, ou seja, as lesões de CEB tiveram mais casos com inflamação intensa, seguidos pelos casos de DE e HFI. Além disso, as DE severas e de alto risco apresentaram maior presença de infiltrado inflamatório quando comparadas com as DE leves, moderadas e de baixo risco. De modo semelhante, no estudo de Mashhadiabbas e Fayazi-Boroujeni (2017), lesões de CEB, de DE severa e carcinoma *in situ* eram mais permeadas por infiltrado inflamatório quando comparadas com as DE leves e moderadas (MASHHADIABBAS; FAYAZI-BOROUJENI, 2017). Tais resultados expressam a relação entre o grau de malignidade da lesão com o grau de inflamação local, que pode ser explicada pelo aumento da ativação de vias inflamatórias por parte das células displásicas conforme a progressão da carcinogênese, favorecendo a progressão maligna (CHAVEZ-DOMINGUEZ *et al.*, 2021).

O VEGF é um importante fator de estímulo para a formação vascular e tem sido muito associado com o aumento da MDV durante o processo de carcinogênese, como observado por Niklander *et al.* (2021) e Gupta *et al.* (2016). No presente estudo, embora sem diferença estatística entre os grupos, observou-se que a maior parte das DE foram classificadas com expressão moderada a severa de VEGF, de maneira oposta as lesões de CEB e HFI, as quais exibiram um discreto predomínio de casos com expressão ausente ou leve. Tais dados contradizem os resultados observados para a MDV, já que as lesões de CEB exibiram maior MDV em relação às outras lesões. Além disso, nossos resultados discordam da literatura. Cheng *et al.* (2011) analisaram a expressão imuno-histoquímica de VEGF em mucosa oral normal, lesões potencialmente malignas e CEB, e observaram maior expressão deste fator nas lesões de CEB, seguido pelas lesões potencialmente malignas (DE severa, moderada e leve) e mucosa oral normal. A discordância destes resultados pode se dar por diversos motivos, tais como: características da amostra, grau de diferenciação histológica dos casos de CEB, metodologia de análise da expressão dos marcadores imuno-histoquímicos, entre outros.

Analisando-se o grau de DE em relação à expressão de VEGF, segundo a classificação da OMS, nosso estudo observou maior expressão de VEGF nas DE leves e

severas quando comparadas das DE moderadas, mas não se observou diferença estatística entre os grupos. De maneira semelhante, Cheng *et al.* (2011) observaram elevada expressão de VEGF em displasias severas, entretanto, os autores também notaram um aumento progressivo da expressão de VEGF conforme o aumento da severidade das displasias, dado este não observado no presente estudo. Ainda no presente estudo, apesar não ter diferença estatística entre os grupos, houve discreto predomínio de expressão ausente/leve de VEGF em DE de alto risco, enquanto lesões com DE de baixo risco exibiram predomínio de expressão moderada/severa. Esse achado não era esperado, uma vez que em nossa amostra lesões de alto risco exibiram maior vascularização do que lesões de baixo risco. Por ser um dos principais fatores de angiogênese, esperava-se que a expressão de VEGF fosse mais elevada em lesões de alto risco, entretanto, é importante notar que nossa amostra inclui poucos casos de DE de alto risco, logo, os resultados poderiam ser diferentes em amostras maiores.

De maneira geral, no presente estudo observou-se que a MDV foi maior nas lesões classificadas com expressão de VEGF moderada a alta do que nas classificadas como ausente a leve, isto é, casos com maiores expressões de VEGF estão correlacionadas com maior MDV, porém, não se observou diferença estatística entre os grupos. Por outro lado, o estudo de Michailidou, Markopoulos e Antoniadis (2012) não observou correlação entre a MDV (CD34) e a expressão de VEGF, apesar de a expressão de ambos os marcadores aumentar progressivamente conforme o aumento da malignidade da lesão. Anura *et al.* (2014) também verificaram correlação entre a expressão de VEGF e a MDV com CD105 ao analisar tecidos de fibrose submucosa oral com e sem displasia. Tais achados evidenciam a importante relação entre o VEGF e a MDV, sendo o primeiro um dos principais mediadores químicos associados com o aumento da MDV em neoplasias malignas (ASTEKAR *et al.*, 2012).

A relação entre a expressão de VEGF e presença de infiltrado inflamatório foi controversa, onde se observou um aumento progressivo da expressão de VEGF nas lesões com infiltrado inflamatório discreto, moderado e intenso, respectivamente. Porém, as lesões com infiltrado inflamatório ausente também exibiram marcação de VEGF. Tais dados não obtiveram diferença estatística entre os grupos. O aumento progressivo da expressão de VEGF conforme o aumento do infiltrado inflamatório é esperado, já que tal mediador químico, além de exercer um papel fundamental na angiogênese, é responsável

pelo recrutamento de células inflamatórias a partir da ativação da ciclooxigenase 2 (COX-2) (NIKLANDER *et al.*, 2021). Além disso, a expressão de VEGF também pode ser observada em células endoteliais e inflamatórias do estroma, mostrando que as células inflamatórias também atuam como fonte de VEGF (CHENG *et al.*, 2011). Por outro lado, a expressão de VEGF no epitélio de lesões displásicas também pode ser observado em regiões onde não há ou onde a inflamação é discreta, como descrito por Gandolfo *et al.* (2011). Logo, a expressão de VEGF em DE e lesões malignas pode ser associada às alterações malignas do epitélio durante a carcinogênese, e não apenas ao estímulo inflamatório.

O presente estudo apresenta limitações que devem ser levados em consideração ao interpretar os resultados. Dentre as principais limitações, citamos: a avaliação imunohistoquímica representa um único momento de avaliação; quantidade de casos inclusos; utilização de material de arquivo que dificulta a coloração; deficiência do preenchimento das fichas de biópsia, que gera a omissão de alguns dados do estudo em alguns casos; e subjetividade na avaliação do VEGF.

7 CONCLUSÃO

Concluimos, então, que as lesões com DE acometeram mais indivíduos acima dos 50 anos, sem apresentar prevalência pelo sexo dos pacientes. No que se trata as lesões de CEB, tal lesão acometeu muito mais indivíduos do sexo masculino, também acima dos 50 anos. Ambas as condições foram mais prevalentes em pacientes com os hábitos de tabagismo e etilismo.

Também se observou que a MDV e o grau de inflamação presente no estroma estão intimamente relacionadas com o grau de desorganização tecidual, aumentando conforme a progressão maligna do epitélio, porém, tais dados não obtiveram diferença estatística significativa entre os grupos quando relacionados com a MDV.

Já em relação ao VEGF, apesar de não constatar diferença estatística entre os grupos, observou-se uma expressão maior nas DE quando comparadas com os controles, e destas, destaca-se a as DE leves e de baixo risco, que obtiveram maiores porcentagens de expressão de VEGF.

Observou-se um aumento progressivo da MDV conforme o aumento da expressão de VEGF no epitélio, demonstrando, assim, o potencial angiogênicos de VEGF, mas não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos

Por fim, apesar de não constatar diferença estatística entre os grupos, observou-se uma relação entre a expressão de VEGF e a intensidade do infiltrado inflamatório. Entretanto, tal expressão foi detectada mesmo na ausência de inflamação, demonstrando que a expressão de VEGF também é consequência das alterações epiteliais malignas que ocorrem durante a carcinogênese.

8 REFERÊNCIAS

ARDUINO, Paolo G. et al. Outcome of oral dysplasia: a retrospective hospital-based study of 207 patients with a long follow-up. **Journal of oral pathology & medicine**, v. 38, n. 6, p. 540-544, 2009.

ANURA, Anji et al. Correlated analysis of semi-quantitative immunohistochemical features of E-cadherin, VEGF and CD105 in assessing malignant potentiality of oral submucous fibrosis. **Pathology-Research and Practice**, v. 210, n. 12, p. 1054-1063, 2014.

ASTEKAR, Madhusudan et al. Expression of vascular endothelial growth factor and microvessel density in oral tumorigenesis. **Journal of oral and maxillofacial pathology: JOMFP**, v. 16, n. 1, p. 22, 2012.

BUGSHAN, Amr; FAROOQ, Imran. Oral squamous cell carcinoma: metastasis, potentially associated malignant disorders, etiology and recent advancements in diagnosis. **F1000Research**, v. 9, 2020

CARMELIET, Peter. VEGF as a key mediator of angiogenesis in cancer. **Oncology**, v. 69, n. Suppl. 3, p. 4-10, 2005.

CHAVEZ-DOMINGUEZ, Rodolfo et al. Old and new players of inflammation and their relationship with cancer development. **Frontiers in Oncology**, p. 4935, 2021.

CHENG, Shih-Jung et al. Expression of vascular endothelial growth factor is significantly associated with progression and prognosis of oral squamous cell carcinomas in Taiwan. **Journal of the Formosan Medical Association**, v. 110, n. 1, p. 50-57, 2011.

GADBAIL, Amol Ramchandra et al. Ki67, CD 105, and α -SMA expressions better relate the binary oral epithelial dysplasia grading system of World Health Organization. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 46, n. 10, p. 921-927, 2017.

GANDOLFO, Mariana et al. Increased subepithelial vascularization and VEGF expression reveal potentially malignant changes in human oral mucosa lesions. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 111, n. 4, p. 486-493, 2011.

GUPTA, Bhavana et al. Immunohistochemical expression of vascular endothelial growth factor in orofacial lesions—A review. **Journal of oral biology and craniofacial research**, v. 6, n. 3, p. 231-236, 2016.

JABER, Mohamed Abdullah. Tobacco smoking and alcohol consumption as risk factors for site-specific intraoral epithelial dysplasia. **Journal of Investigative and Clinical Dentistry**, v. 1, n. 2, p. 101-107, 2010.

JABER, Mohamed A. Oral epithelial dysplasia in non-users of tobacco and alcohol: an analysis of clinicopathologic characteristics and treatment outcome. **Journal of oral science**, v. 52, n. 1, p. 13-21, 2010.

KAPOOR, Prakhar; DESHMUKH, R. S. VEGF: A critical driver for angiogenesis and subsequent tumor growth: An IHC study. **Journal of oral and maxillofacial pathology: JOMFP**, v. 16, n. 3, p. 330, 2012.

KHALILI, Maryam et al. Immunohistochemical evaluation of angiogenesis and cell proliferation in tongue squamous cell carcinoma. **Journal of Dentistry (Tehran, Iran)**, v. 12, n. 11, p. 846, 2015.

KIM, Seok-Kon; PARK, Seung-Goo; KIM, Kyung-Wook. Expression of vascular endothelial growth factor in oral squamous cell carcinoma. **Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons**, v. 41, n. 1, p. 11-18, 2015.

KUJAN, O. et al. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. **Oral Oncology**, v. 42, n. 10, p. 987–993, 2006.

KUKREJA, Ipsita et al. VEGF and CD 34: A correlation between tumor angiogenesis and microvessel density-an immunohistochemical study. **Journal of oral and maxillofacial pathology: JOMFP**, v. 17, n. 3, p. 367, 2013.

KYZAS, P.; STEFANO, D.; AGNANTIS, N. Immunohistochemical expression of VEGF correlates with positive surgical margins and recurrence in T1 and T2 SCC of the lower lip. **Oral Oncol**, v. 40, p. 941-7, 2004.

MAHARUDRAPPA BASNAKER, Shashikanth SR; SATISH, B. N. V. S. Expression of endoglin (CD-105) and microvessel density in oral dysplasia and squamous cell carcinoma. **Journal of clinical and diagnostic research: JCDR**, v. 8, n. 9, p. ZC91, 2014.

MARLA, V.; HEGDE, V.; SHRESTHA, A. Relationship of angiogenesis and oral squamous cell carcinoma. **Kathmandu University Medical Journal**, v. 13, n. 2, p. 178-185, 2015.

MASHHADIABBAS, Fatemeh; FAYAZI-BOROUJENI, Masoume. Correlation of vascularization and inflammation with severity of oral leukoplakia. **Iranian journal of pathology**, v. 12, n. 3, p. 225, 2017.

MELLO, Fernanda Weber et al. The synergistic effect of tobacco and alcohol consumption on oral squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. **Clinical oral investigations**, v. 23, p. 2849-2859, 2019.

MICHAILIDOU, E. Z.; MARKOPOULOS, A. K.; ANTONIADES, D. Z. VEGF expression from human dysplastic or malignant oral epithelium may be related to mast cell density and the subsequent angiogenetic phenomena. **International journal of oral and maxillofacial surgery**, v. 41, n. 12, p. 1467-1473, 2012.

MORIYAMA, M. et al. Immunohistochemical study of tumour angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. **Oral oncology**, v. 33, n. 5, p. 369-374, 1997.

NADERI, Noushin Jalayer; TIRGARI, Farrokh; KESHAVARZ, Zahra. Vascular endothelial growth factor expression and vascular density in oral squamous cell carcinoma (OSCC): a study on clinical and histopathologic significance. **Medical journal of the Islamic Republic of Iran**, v. 30, p. 358, 2016.

NAYAK, Seema et al. VEGF-A immunohistochemical and mRNA expression in tissues and its serum levels in potentially malignant oral lesions and oral squamous cell carcinomas. **Oral oncology**, v. 48, n. 3, p. 233-239, 2012.

NIKLANDER, Sven et al. Vascular endothelial growth factor: A translational view in oral non-communicable diseases. **Biomolecules**, v. 11, n. 1, p. 85, 2021.

PATEL, Jayendrakumar B. et al. Clinical significance of inflammatory mediators in the pathogenesis of oral cancer. **Journal of cancer research and therapeutics**, v. 12, n. 2, p. 447, 2016.

ROCK, L. D. et al. Characterization of epithelial oral dysplasia in non-smokers: First steps towards precision medicine. **Oral oncology**, v. 78, p. 119-125, 2018.

SANTOSH, Arvind Babu Rajendra et al. A review on oral cancer biomarkers: Understanding the past and learning from the present. **Journal of cancer research and therapeutics**, v. 12, n. 2, p. 486, 2016.

SAUTER, Edward R. et al. Vascular endothelial growth factor is a marker of tumor invasion and metastasis in squamous cell carcinomas of the head and neck. **Clinical cancer research**, v. 5, n. 4, p. 775-782, 1999.

SCHEIDT, Juliana Hintz Germanos et al. Oral squamous cell carcinoma from users and nonusers of tobacco and alcohol: clinicopathologic features and immunoreactivity of VEGF, caspase-3, and p53. **Applied immunohistochemistry & molecular morphology**, v. 21, n. 2, p. 148-153, 2013.

SHEELAM, Suchita et al. Role of cell proliferation and vascularity in malignant transformation of potentially malignant disorders. **Journal of oral and maxillofacial pathology: JOMFP**, v. 22, n. 2, p. 281, 2018.

TAE, Kyung et al. Expression of vascular endothelial growth factor and microvessel density in head and neck tumorigenesis. **Clinical Cancer Research**, v. 6, n. 7, p. 2821-2828, 2000.

Takata T, Slootweg PJ. Tumours of the mobile tongue and oral cavity. In: El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ, eds. **WHO classification of Head and Neck tumours**. 4th ed ed. Lyon: International Agency for Research on Cancer; 2017:112-115.

THIEM, Daniel GE et al. Semiquantifiable angiogenesis parameters in association with the malignant transformation of oral leukoplakia. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 46, n. 9, p. 710-716, 2017.

TILAKARATNE, Wanninayake M. et al. Oral epithelial dysplasia: Causes, quantification, prognosis, and management challenges. **Periodontology 2000**, v. 80, n. 1, p. 126-147, 2019.

WARNAKULASURIYA, Saman. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. **Oral oncology**, v. 45, n. 4-5, p. 309-316, 2009.

ANEXO A – ATA DE APRESENTAÇÃO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
CURSO DE ODONTOLOGIA
DISCIPLINA DE TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO DE ODONTOLOGIA

ATA DE APRESENTAÇÃO DO TRABALHO DE CONCLUSÃO DE CURSO


No dia 16/05/2023, no horário 14:30 horas, na sala 916 do bloco de salas do CCS, na presença da Banca Examinadora presidida pela Professora Dra Elena Riet Correa Rivero e pelos examinadores:

- 1 - Carolina Amália Barcellos Silva,
- 2 - Riéli Elis Schulz,

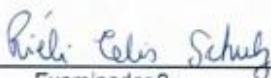
a aluna **Isadora Koepp Darella** apresentou o Trabalho de Conclusão de Curso de Graduação intitulado: **“Análise imuno-histoquímica da microdensidade vascular por meio dos marcadores CD-105 e VEGF e da intensidade do infiltrado inflamatório na progressão da displasia epitelial oral”** como requisito curricular indispensável à aprovação na Disciplina de Defesa do TCC e a integralização do Curso de Graduação em Odontologia. A Banca Examinadora, após reunião em sessão reservada, deliberou e decidiu pela **APROVAÇÃO** do referido Trabalho de Conclusão do Curso, divulgando o resultado formalmente ao aluno e aos demais presentes, e eu, na qualidade de presidente da Banca, lavrei a presente ata que será assinada por mim, pelos demais componentes da Banca Examinadora e pelo aluno orientando.



Presidente da Banca Examinadora



Examinador 1



Examinador 2



Aluno

ANEXO B – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC

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

Título da Pesquisa: O papel do estroma no desenvolvimento e progressão do câncer de boca

Pesquisador: Elena Riet Correa Rivero

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 42976715.3.0000.0121

Instituição Proponente: Departamento de Patologia

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.005.587

Data da Relatoria: 30/03/2015

Apresentação do Projeto:

Trata-se de projeto vinculado à linha de pesquisa "Etiologia, Diagnóstico, Prevenção e Terapias aplicadas à Odontologia", do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UFSC. A professora coordenadora faz parte do grupo de Pesquisa em Diagnóstico Bucal da UFSC. O projeto desdobrar-se-á em uma tese de doutorado e um Trabalho de Conclusão de Curso. Como amostra positiva de neoplasia invasiva serão incluídos casos de carcinoma epidermóide de boca (CEB) e como amostra de tecido não neoplásico serão incluídos casos de HFI (hiperplasia fibrosa inflamatória). A seleção dos casos será feita com base no diagnóstico histopatológico e na análise das lâminas coradas em H&E. Com base na casuística desse Serviço de Diagnóstico espera-se no final ao menos 25 casos de DEBM; 25 casos de DEBM, 20 casos de carcinoma epidermóides de boca e 20 casos de HFI.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

- O objetivo principal deste projeto é contribuir com o entendimento sobre o processo de invasão do CEB (carcinoma epidermóide de boca), por meio do estudo das interações parênquima/estroma nos mecanismos de crescimento e invasão tumoral.

Objetivo Secundário:

1- Promover um levantamento dos laudos histopatológicos de lesões diagnosticadas como displasias epiteliais, CEB e hiperplasia fibrosa inflamatória (HFI), presentes nos arquivos do

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II (Edifício Santa Clara), R: Desembargador Vítor Lima,

Bairro: Trindade

CEP: 88.040-400

UF: SC

Município: FLORIANOPOLIS

Telefone: (48)3721-6094

E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 1.005.587

Laboratório de Patologia Bucal (LPB) da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC);

2- Proceder a avaliação histológica dos casos selecionados e Classificar as displasias epiteliais segundo o sistema binário, em displasias de alto risco de malignização (DEAM) e baixo risco de malignização (DEBM);

3- Investigar a presença de fibroblastos senescentes, por meio de marcadores de senescência celular (p16 e beta galactosidase), assim como por meio de marcadores de FAC (podoplanina), na lâmina própria de DEBM, DEAM e HFI, assim como no estroma de CEB.

4- Investigar a expressão de caveolina-1, osteopontina e MMP-2 na lâmina própria de DEBM, DEAM e HFI, e no CEB.

5- Estabelecer o índice de proliferação epitelial, por meio da marcação do antígeno Ki-67, em DEBM, DEAM, HFI e CEB;

6- Comparar a expressão das proteínas em estudo nos casos de DEBM, DEAM, HFI e CEB;

7- Comparar a expressão das proteínas em estudo nos casos de displasias epiteliais que evoluíram para carcinoma epidermóide;

8- Fazer a correlação das proteínas em estudo nos casos de DEBM, DEAM, HFI e CEB.

9- Correlacionar os achados deste estudo com os já existentes na literatura.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Em relação aos riscos da pesquisa, os pesquisadores esclarecem que "Durante a pesquisa será apenas utilizado o material resultante de biópsia da lesão, previamente realizada, o qual encontra-se armazenado nos arquivos do LPB, sem causar qualquer tipo de desconforto aos pacientes. Como haverá acesso aos dados presentes nas fichas de biópsia e laudos histopatológicos, há um risco de perda de sigilo dessas informações, mas os pesquisadores garantem que tomarão todos os cuidados para evitar que isso ocorra".

No que se refere aos benefícios do estudo, observa-se que "envolvem a produção de conhecimento científico podendo servir de base para outros estudos, e possivelmente tentar ajudar os próximos pacientes que tenham a mesma doença no futuro, facilitando o seu diagnóstico".

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Sem comentários adicionais.

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II (Edifício Santa Clara), R: Desembargador Vitor Lima,
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 1.005.587

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos necessários ao processo estão disponíveis na Plataforma Brasil e de acordo com a legislação vigente: folha de rosto; projeto de pesquisa; informações detalhadas sobre o projeto, incluindo cronograma e orçamento; e termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE) a ser apresentado aos participantes da pesquisa.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

De acordo com o exposto nesse parecer, o projeto de pesquisa "O papel do estroma no desenvolvimento e progressão do câncer de boca" deve ser considerado APROVADO.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

FLORIANOPOLIS, 30 de Março de 2015

Assinado por:
Washington Portela de Souza
(Coordenador)

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II (Edifício Santa Clara), R: Desembargador Vitor Lima,
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br