

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
Faculdade de Odontologia

Camila Ferreira Leite

**AVALIAÇÃO DO *BUDDING* TUMORAL EM BIÓPSIAS INCISIONAIS DE  
CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE BOCA E SUA ASSOCIAÇÃO  
COM CARACTERÍSTICAS CLÍNICOPATOLÓGICAS E COM A EXPRESSÃO  
IMUNOISTOQUÍMICA DAS PROTEÍNAS CADERINA-E E PODOPLANINA**

Belo Horizonte  
2015

Camila Ferreira Leite

**AVALIAÇÃO DO *BUDDING* TUMORAL EM BIÓPSIAS INCISIONAIS DE  
CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE BOCA E SUA ASSOCIAÇÃO  
COM CARACTERÍSTICAS CLÍNICOPATOLÓGICAS E COM A EXPRESSÃO  
IMUNOISTOQUÍMICA DAS PROTEÍNAS CADERINA-E E PODOPLANINA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Odontologia.

Área de Concentração: Patologia Bucal.

Orientadora: Profa. Dra. Maria Cássia Ferreira de Aguiar

Coorientador: Prof. Dr. Martinho Campolina Rebello Horta

Belo Horizonte

2015



## FICHA CATALOGRÁFICA

L533a  
2015  
T

Leite, Camila Ferreira

Avaliação do budding tumoral em biópsias incisionais de carcinomas de células escamosas de boca e sua associação com características clinicopatológicas e com a expressão imunohistoquímica das proteínas caderina-E e podoplanina / Camila Ferreira Leite. – 2015.

63f. : il.

Orientadora: Maria Cássia Ferreira de Aguiar

Coorientador: Martinho Campolina Rebello Horta

Dissertação (Mestrado) – Universidade Federal de Minas Gerais, Faculdade de Odontologia.

1. Carcinoma de células escamosas. 2. Caderinas.  
3. Neoplasias bucais. I. Aguiar, Maria Cássia Ferreira de.  
II. Horta, Martinho Campolina Rebello. III. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade de Odontologia. IV. Título.

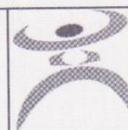
BLACK D047

Biblioteca da Faculdade de Odontologia - UFMG



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA



## FOLHA DE APROVAÇÃO

**AVALIAÇÃO DO BUDDING TUMORAL EM BIÓPSIAS INCISIONAIS DE CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE BOCA E SUA ASSOCIAÇÃO COM CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-PATOLÓGICAS E COM A EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DAS PROTEÍNAS CADERINA-E E PODOPLANINA**

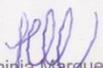
**CAMILA FERREIRA LEITE**

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em ODONTOLOGIA, como requisito para obtenção do grau de Mestre em ODONTOLOGIA, área de concentração PATOLOGIA BUCAL.

Aprovada em 17 de julho de 2015, pela banca constituída pelos membros:

  
Prof(a). Maria Cassia Ferreira de Aguiar - Orientador  
UFMG

  
Prof(a). Martinho Campolina Rebello Horta  
PUC/MG

  
Prof(a). Herminia Marques Capistrano  
PUCMG

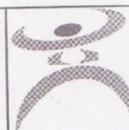
  
Prof(a). Patricia Carlos Caldeira  
UFMG

Belo Horizonte, 17 de julho de 2015.



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA



## ATA DA DEFESA DA DISSERTAÇÃO DA ALUNA CAMILA FERREIRA LEITE

Realizou-se, no dia 17 de julho de 2015, às 14:00 horas, Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais. Sala 3403., da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de dissertação, intitulada *AVALIAÇÃO DO BUDDING TUMORAL EM BIÓPSIAS INCISIONAIS DE CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE BOCA E SUA ASSOCIAÇÃO COM CARACTERÍSTICAS CLÍNICOPATOLÓGICAS E COM A EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DAS PROTEÍNAS CADERINA-E E PODOPLANINA*, apresentada por CAMILA FERREIRA LEITE, número de registro 2013710962, graduada no curso de ODONTOLOGIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Mestre em ODONTOLOGIA, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Maria Cassia Ferreira de Aguiar - Orientador (UFMG), Prof(a). Martinho Campolina Rebello Horta (PUCMG), Prof(a). Herminia Marques Capistrano (PUCMG), Prof(a). Patrícia Carlos Caldeira (UFMG).

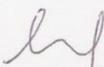
A Comissão considerou a dissertação:

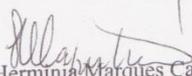
Aprovada

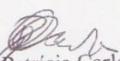
Reprovada

Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.  
Belo Horizonte, 17 de julho de 2015.

  
Prof(a). Maria Cassia Ferreira de Aguiar ( Doutora )

  
Prof(a). Martinho Campolina Rebello Horta ( Doutor )

  
Prof(a). Herminia Marques Capistrano ( Doutora )

  
Prof(a). Patricia Carlos Caldeira ( Doutor )



**Aos meus avós, Aristone e Isabel,  
que vivem como se fossem seus os meus sonhos,  
dificuldades e conquistas.**



## AGRADECIMENTOS

A Deus e à Nossa Senhora Aparecida, por me darem coragem, sabedoria e demonstrações de estarem sempre comigo.

À Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), pela gratuidade do ensino de qualidade e ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pela contribuição no desenvolvimento da pesquisa.

À equipe do Programa de Avaliação e Vigilância do Câncer-PAV-MG, em especial, à Berenice Navarro Antoniazzi, pelo inestimável auxílio na busca dos dados complementares dessa pesquisa.

À minha orientadora, Profa. Dra. Maria Cássia Ferreira de Aguiar, exemplo de competência; pela oportunidade, compreensão e por compartilhar comigo todas as alegrias e dificuldades encontradas pelo caminho.

Ao meu coorientador, Prof. Dr. Martinho Campolina Rebello Horta, meus sinceros agradecimentos pela sua orientação, segura e atenciosa, dedicação e disponibilidade que contribuiu de forma significativa para o meu crescimento profissional e pessoal.

Aos professores de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da UFMG: Tarcília Aparecida Silva, Maria Auxiliadora Vieira do Carmo, Maria Cássia Ferreira de Aguiar, Ricardo Alves de Mesquita, Vagner Rodrigues Santos e Ricardo Santiago Gomez, pelos valiosos ensinamentos.

À aluna de pós-doutorado, Patrícia Carlos Caldeira, por compartilhar comigo sua experiência e conhecimentos.

A todos os colegas do Mestrado 2013 da Faculdade de Odontologia da UFMG, em especial à Marcela de Oliveira Brant, pela amizade e gratificante convivência durante o curso.

Aos professores de Estomatologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC Minas): Carlos Roberto Martins, Rosana Maria Leal, Martinho Campolina Rebello Horta, Hermínia Marques Capistrano, Franca Arenare Jeunon, Helenice de Andrade Marigo Grandinetti e Paulo Eduardo Alencar de Souza, por me mostrarem na graduação a importância da dedicação aos estudos e encaminharem os meus primeiros passos para área científica. Muito obrigada por tudo!

À PUC Minas, ao Departamento de Odontologia e ao Laboratório de Patologia Oral da PUC Minas por toda contribuição nas várias etapas desse trabalho.



Às funcionárias da Secretaria do Mestrado em Odontologia da PUC Minas, Silvania Martins Ferreira e Maria Angélica Paradizi por toda ajuda e carinho nesse percurso desde a graduação.

Aos funcionários dos Laboratórios de Patologia Oral da PUC Minas e da UFMG, Maria Reni Gonçalves Moitinha, Andreia Alves Cardoso, Domênico Romani, Inês Ferreira e Daniella Rocha, essenciais para que essa pesquisa pudesse ser realizada.

Aos meus pais, José Malta Furtado Leite e Maria do Carmo de Oliveira Ferreira Leite, meus grandes exemplos de fé, trabalho e determinação. Muito obrigada por acreditarem nos meus sonhos e por me ajudar na realização deles.

Às minhas irmãs e primeiras amigas, Raquel Ferreira Leite e Isabela Ferreira Leite, pela compreensão e alegria de cada dia.

Aos meus avós, Aristone Camilo Ferreira e Isabel de Oliveira Ferreira, nos quais sempre encontrei amor e estímulo.

Ao David Bittencourt, com todo o meu amor e carinho.

A toda minha família, em especial aos meus tios: Raimundo Fernandes, Maria Goretti de Oliveira Ferreira Fernandes, Suely Madureira Ferreira, Eustáquio de Oliveira Ferreira e Efigênia Ferreira.

Às minhas primas, Júlia Madureira Ferreira, Marina Madureira Ferreira e Ana Carolina Ferreira Fernandes pela amizade.

À Dona Alice Santana e família, por me receber em sua casa com tanto carinho, pela torcida e por compartilharem de todos os momentos importantes da minha vida.

Ao Max Filipe Cota pelas inúmeras oportunidades de crescimento profissional, confiança e amizade.

A todos aqueles que de alguma forma prestaram sua contribuição para a realização deste trabalho, o meu muito obrigada!



**O saber a gente aprende com os mestres e com os livros.  
A sabedoria, se aprende é com a vida e com os humildes.**

***Cora Coralina.***



## RESUMO

### AVALIAÇÃO DO *BUDDING* TUMORAL EM BIÓPSIAS INCISIONAIS DE CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE BOCA E SUA ASSOCIAÇÃO COM CARACTERÍSTICAS CLÍNICOPATOLÓGICAS E COM A EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DAS PROTEÍNAS CADERINA-E E PODOPLANINA

O sucesso do tratamento do carcinoma de células escamosas de boca (CCEB) depende em parte, da identificação de características que permitam selecionar os pacientes que se beneficiariam de terapias mais agressivas. O *budding* tumoral é reconhecido como a presença de células isoladas ou pequenos agrupamentos de células no estroma tumoral, frequentemente distribuídas próximas a região do fronte de invasão e tem sido associado a tumores mais agressivos sendo útil como fator prognóstico e preditivo destes tumores, mas pouco avaliado ainda no CCEB. A caderina-E é a principal molécula de adesão do tecido epitelial e sua perda está associada ao processo de invasão tumoral e a um pior prognóstico no CCEB. A podoplanina também é uma proteína que está relacionada ao processo de invasão das células epiteliais neoplásicas, sendo sua alta expressão correlacionada com um pior prognóstico. Uma relação caderina-E negativa/podoplanina positiva pode ser considerada um fator preditivo do desenvolvimento de metástases para o CCEB. O objetivo deste estudo foi avaliar o *budding* tumoral em uma amostra de biópsias incisionais de CCEB e adicionalmente verificar a associação desta característica com características clinicopatológicas e com a imunoexpressão das proteínas caderina-E e podoplanina. Foram selecionadas e avaliadas amostras de carcinomas de células escamosas emblocadas em parafina e preparadas em lâminas para a avaliação do *budding* e realização da técnica de imunoistoquímica para as proteínas caderina-E e podoplanina. Adicionalmente, a intensidade do *budding* e dados imunoistoquímicos foram associados com o estadiamento clínico, grau histológico de malignidade, modo de invasão e desenvolvimento de metástases. A intensidade do *budding* foi associada com o estadiamento clínico, grau histológico de malignidade, modo de invasão e desenvolvimento de metástases e com a imunoexpressão de caderina-E e podoplanina. O *budding* tumoral mostrou associação apenas com o padrão de invasão tumoral. Nenhuma das outras características clinicopatológicas avaliadas tiveram associação com o *budding* tumoral. Observou-se a perda da

expressão da caderina-E nas áreas profundas do tumor em relação às áreas centrais e superficiais. A partir dos resultados obtidos pode-se concluir que das características clinicopatológicas investigadas apenas o modo de invasão apresentou associação com o *budding* tumoral. Os resultados deste trabalho no momento, não permitem apontar o *budding* como fator preditivo do CCEB quando utilizado em biópsias incisionais.

Palavras-chave: Carcinoma de células escamosas de boca. *Budding* tumoral. caderina-E. Podoplanina. Imunoistoquímica.

## ABSTRACT

### EVALUATION OF TUMOR *BUDDING* IN PREOPERATIVE BIOPSY SPECIMENS OF ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA AND ITS ASSOCIATION WITH CLINICOPATHOLOGICAL FEATURES AND IMMUNOHISTOCHEMICAL EXPRESSION OF E-CADHERIN AND PODOPLANIN

The success of the treatment of oral squamous cell carcinoma (OSCC) depends on the development of effective tools that can help clinicians and surgeons in their decisions about surgical treatment of oral squamous cell carcinoma, especially about the elective lymph node dissection. The tumor *budding* is recognized as the presence of isolated cells or small clusters of cells in the tumor stroma often distributed near the invasive front region and has been associated with more aggressive tumors. E-cadherin is a principal adhesion molecule of epithelial tissue, which is essential for the establishment and maintenance of apical-basal cell polarity and the structural integrity of the epithelium. The loss of E-cadherin is associated with the process of tumor invasion and with a worse prognosis in OSCC. The Podoplanin is also a protein related to the process of invasion of neoplastic epithelial cells, and its overexpression correlates with a poor prognosis. A relationship E-cadherin negative / positive Podoplanin can be considered a predictive factor of development of metastasis to the OSCC. The objective of this study was to evaluate tumor *budding* in a sample of incisional biopsies of OSCC and additionally verify the association of this feature with clinicopathological characteristics and the immunoreactivity of the proteins E-cadherin and podoplanin. Fifty-six cases of oral squamous cell carcinoma were enrolled in the retrospective study. Parafin embedded specimens and slices were recovered and immunohistochemical reaction performed. Tumor *budding* was investigated and the intensity of *budding* was associated with clinical staging, histological grade of malignancy, invasion mode, development of metastases and immunohistochemical expression of E-cadherin and podoplanin. Tumor *budding* was associated with the pattern of tumor invasion. None of the other clinicopathologic characteristics evaluated were associated to tumor *budding*. E-cadherin was lost in the deep areas of the tumor in comparison with the superficial/central areas. In conclusion, in this sample, tumor *budding* has an association only with the mode of

invasion. Further studies are necessary before recommending *budding* for routine pathological diagnosis supporting the treatment decision.

Keywords: Oral squamous cell carcinoma. Tumor *budding*. E-cadherin. Podoplanin. Immunohistochemistry.

## LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

$\mu\text{m}$  – Micrometro (ou micrômetro)

$\gamma$  – Gama

$\alpha$  – Alfa

$\beta$  – Beta

AE1/AE3 – pan-citoqueratina

ACS – Áreas centrais superficiais

AP – Áreas profundas

$^{\circ}\text{C}$  – Graus célsius

CA – California

$\text{Ca}^{+2}$  – Cálcio

CCEB – Carcinoma de células escamosas de boca

CNPq – Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico

CNS – Conselho Nacional de Saúde

COEP – Comitê de Ética em Pesquisa

D2-40 – Anticorpo monoclonal de vasos linfáticos

DAB – Diaminobenzidine (diaminobenzidina)

EMT – Transição-epitélio-mesênquima

EUA – Estados Unidos da América

FI – Frente de invasão

HE – Hematoxylin-eosin (hematoxilina-eosina)

HPV – Papiloma Vírus Humano

INCA – Instituto Nacional de Câncer

LSAB – Labelled streptavidin biotin (sistema de detecção imunoistoquímica)

mg – Miligrama

mL – Microlitro

mM – Milimolar

PAV-MG – Programa de Avaliação e Vigilância do Câncer de Minas Gerais

TA – Temperatura ambiente

TNM – Tumor, nodal disease, metastatic disease (sistema de estadiamento - tamanho do tumor, envolvimento linfonodal e metástase)

TRIS-HCL – Hidroximetil amino metano - ácido clorídrico

UFMG – Universidade Federal de Minas Gerais

USA – United States of America



## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1** - Modo de invasão: **A.** grau 1 (HE 200x); **B.** grau 2 (HE 200x); **C.** grau 3 (HE 200x); **D.** grau 4C (HE 200x); **E.** grau 4D (HE 200x) ..... 40

**Figura 2** - *Budding* tumoral: **A.** *Budding* tumoral positivo; **B.** *Budding* tumoral negativo (técnica imunistoquímica da biotina peroxidase para AE1/AE3 200x) ..... 43

**Figura 3** - Padrões de invasão encontrados: **A.** Padrão de invasão grau 1 (HE 100x); **B.** Padrão de invasão grau 2 (HE 100x); **C.** Padrão de invasão grau 3 (HE 100x); **D.** Padrão de invasão grau 4C (HE 100x) ..... 44

**Figura 4** - Expressão da caderina-E: **A.** Caderina-E positiva nas ACS do tumor e negativa nas AP (setas) (técnica imunistoquímica livre de biotina para caderina-E 100x); **B.** Caderina-E positiva nas ACS do tumor (técnica imunistoquímica livre de biotina para caderina-E 400x) ..... 45

**Figura 5** - Expressão da podoplanina: **A.** Podoplanina positiva nas ACS do tumor (técnica imunistoquímica livre de biotina para D2-40 100X); **B.** Podoplanina positiva nas ACS do tumor (técnica imunistoquímica livre de biotina para D2-40 400x) ..... 46

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1</b> - Estudos associando a intensidade do <i>budding</i> tumoral com prognóstico dos pacientes com diferentes neoplasias malignas.....	23
<b>Quadro 2</b> - Padronização imunoistoquímica para os anticorpos primários usados no estudo.....	36
<b>Quadro 3</b> - Graduação histológica .....	39

## LISTA DE TABELAS

**Tabela 1** - Expressão da Caderina-E e D2-40 nas áreas centrais/superficiais e nas áreas profundas do tumor..... 46

**Tabela 2** - Associação do *budding* com as características clinicopatológicas e com a expressão das proteínas caderina-E e podoplanina..... 48



## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO .....</b>	<b>17</b>
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>19</b>
2.1 Carcinoma de células escamosas de boca (CCEB) .....	19
2.2 <i>Budding</i> tumoral.....	21
2.3 Caderina-E.....	27
2.4 Podoplanina .....	28
<b>3 OBJETIVOS .....</b>	<b>31</b>
3.1 Objetivo geral.....	31
3.2 Objetivos específicos.....	31
<b>4 MÉTODOS .....</b>	<b>32</b>
4.1 Aspectos éticos e legais .....	32
4.2 Seleção da amostra .....	32
4.3 Reações imunoistoquímicas .....	32
4.4 Identificação e graduação do <i>budding</i> tumoral .....	36
4.5 Avaliação das reações imunoistoquímicas.....	37
4.6 Graduação histológica de toda a extensão da neoplasia .....	38
4.7 Graduação do modo de invasão .....	39
4.8 Análise estatística .....	41
<b>5 RESULTADOS.....</b>	<b>42</b>
5.1 Caracterização da amostra .....	42
5.2 Avaliação imunoistoquímica da caderina-E e da podoplanina .....	44
5.3 Associação do <i>budding</i> com características clinicopatológicas e com as proteínas caderina-E e podoplanina.....	47
<b>6 DISCUSSÃO .....</b>	<b>49</b>
<b>7 CONCLUSÕES .....</b>	<b>53</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>54</b>
<b>ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG .....</b>	<b>60</b>
<b>ANEXO B - Dados clinicopatológicos completos dos casos estudados.....</b>	<b>61</b>
<b>ANEXO C - Produção científica realizada durante o Mestrado.....</b>	<b>62</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O carcinoma de células escamosas representa mais de 90% das neoplasias malignas que acometem a boca, estando relacionado a altos índices de morbidade e mortalidade associados principalmente à recorrência da doença e as metástases regionais e a distância.<sup>1-3</sup> Apesar da evolução no conhecimento sobre esta doença não há ainda marcadores que possam ser empregados com sucesso na fase pré-tratamento, ajudando na previsão do comportamento e auxiliando na seleção dos pacientes que possam se beneficiar de terapias mais agressivas.

O *budding* tumoral é reconhecido como a presença de células isoladas ou pequenos agrupamentos de células no estroma tumoral, frequentemente distribuídas próximas a região do fronte de invasão. Esta característica tem sido associada a agressividade de vários tipos de carcinoma, especialmente o carcinoma colorretal, mas poucos estudos tem avaliado a relevância prognóstica do *budding* no carcinoma de células escamosas de boca, priorizando nestes casos amostras cirúrgicas pós ressecção.<sup>4-6</sup> O *budding* indica algumas características das células malignas: a perda de coesão e a invasividade.<sup>4-7</sup>

A literatura apresenta grande quantidade de estudos versando sobre a caderina-E, molécula de adesão localizada no epitélio normal, e associando sua perda ao processo de invasão tumoral do carcinoma de células escamosas . Já foi demonstrado que a perda da caderina-E está associada a um pior prognóstico nos carcinomas de células escamosas de boca (CCEB), mas a sua relação com o *budding* ainda não foi avaliada.<sup>8-11</sup>

A podoplanina também é uma proteína que está relacionada ao processo de invasão das células epiteliais neoplásicas, sendo sua alta expressão correlacionada com um pior prognóstico para os pacientes com câncer de cabeça e pescoço. Uma relação caderina-E negativa/podoplanina positiva pode ser considerada um fator preditivo do desenvolvimento de metástases para o CCEB.<sup>12,13</sup>

O objetivo deste estudo foi avaliar o *budding* tumoral em uma amostra de biópsias incisionais de carcinoma de células escamosas de boca e adicionalmente verificar a associação desta característica com características clinicopatológicas e com a imunoexpressão das proteínas caderina-E e podoplanina.

O estudo neste tipo de amostra é importante porque pode esclarecer a utilidade da avaliação do *budding* tumoral no estágio pré-tratamento tumoral,

podendo auxiliar na escolha do tipo de tratamento a ser conduzido. A associação desta avaliação à marcadores imunistoquímicos de possível valor prognóstico pode ampliar o valor preditivo desta análise.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Carcinoma de células escamosas de boca (CCEB)

O carcinoma de células escamosas de boca (CCEB) representa 90% das neoplasias malignas da boca e se encontra entre o sexto a oitavo tipo de câncer mais comum em diferentes regiões do mundo.<sup>3,14</sup> No Brasil, o CCEB é, nos homens, o quarto tipo mais frequente nas regiões Sudeste (15,48/ 100 mil) e Nordeste (7,16/ 100 mil). Na região Centro-Oeste, é o quinto (8,18/ 100 mil). Nas regiões Sul (15,21/ 100 mil) e Norte (3,21/ 100 mil), o sexto. Para as mulheres, é o nono mais frequente nas regiões Sudeste (4,88/ 100 mil) e Nordeste (3,72/ 100 mil). Na região Norte (1,60/ 100 mil), ocupa a 11ª posição. Na região Centro-Oeste (3,30/ 100 mil), é o 12º mais frequente e, na região Sul (3,09/ 100 mil), o 15º.<sup>2</sup>

O CCEB é, portanto, a neoplasia epitelial maligna mais comum da boca, estando relacionada a altos índices de morbidade e mortalidade. Esse alto índice de mortalidade, está relacionado ao número de metástases que ainda é muito grande e não somente pelo descobrimento do tumor primário tardiamente.<sup>1-3,15</sup>

O Instituto Nacional do Câncer (INCA) em seu mais recente levantamento estimou, para o ano de 2014, 11.280 casos novos de câncer da cavidade oral em homens e 4.010 em mulheres. Tais valores correspondem a um risco estimado de 11,54 casos novos a cada 100 mil homens e 3,92 a cada 100 mil mulheres.<sup>2</sup>

O CCEB acomete principalmente indivíduos do sexo masculino, entre a quinta e sexta décadas de vida.<sup>2</sup> Entretanto, nas últimas décadas, tem sido observado um aumento no número de pacientes adultos jovens e do sexo feminino.<sup>2,15</sup> Borges et al.<sup>16</sup> (2008) enfatizaram essa tendência à diminuição da diferença registrada na ocorrência do CCEB entre os dois sexos, principalmente devido ao fato de que certos hábitos masculinos provavelmente relacionados à etiologia da doença tenham sido adotados pelas mulheres, o que pode justificar, pelo menos em parte, o aumento da prevalência no gênero feminino.<sup>16</sup> Além disso, as taxas de incidência para CCEB relacionado à infecção pelo HPV, vêm aumentando entre a população de adultos jovens em ambos os sexos. Parte desse aumento pode ser em razão de mudanças no comportamento sexual.<sup>2</sup>

O prognóstico do CCEB está diretamente relacionado ao estadiamento clínico do tumor através do sistema TNM. Este sistema utiliza três parâmetros, onde T

indica o tamanho do tumor, N a presença e extensão de metástases para linfonodos regionais e M a presença de metástases à distância. Estes parâmetros são mensurados e reunidos em quatro estádios, numerados de I a IV em ordem crescente de acordo com o grau de disseminação do tumor. Quanto maior o estágio, pior é o prognóstico da neoplasia. A sobrevivência de 5 anos é de aproximadamente 85% no estágio I, 66% no estágio II, 41% no estágio III e 9% no estágio IV.<sup>17</sup> Em geral, um fator decisivo para o pior prognóstico é o desenvolvimento de metástases regionais. Há entretanto carência de parâmetros que possam prever esta característica de forma confiável, antes do tratamento cirúrgico do CCEB, indicando casos que poderão se beneficiar de um protocolo terapêutico mais agressivo, incluindo a dissecação dos linfonodos regionais. Além disso, outra limitação do uso dos parâmetros morfológicos e histológicos convencionais como indicadores de planejamento do tratamento e prognóstico, é que eles não podem ser julgados adequadamente antes da cirurgia. No entanto, alguns autores indicam a possibilidade de avaliação do *budding* tumoral em biópsias incisionais.<sup>18</sup>

A etiologia do CCEB é multifatorial e os principais fatores de risco para o seu desenvolvimento são tabaco, álcool, radiação ultravioleta (sobretudo nas lesões localizadas em lábio inferior) e infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV), principalmente os subtipos 16 e 18.<sup>2,14,15</sup>

A apresentação clínica do CCEB é variável, podendo se mostrar como lesões exofíticas, endofíticas, leucoplásticas, eritroplásticas ou eritroleucoplásticas.<sup>1</sup> As regiões da mucosa bucal mais acometidas são: lábio inferior, língua, assoalho bucal, gengiva, palato duro e mucosa jugal.<sup>1,15</sup>

Histologicamente, observa-se a invasão da lâmina própria por lençóis, cordões, ninhos ou pequenos grupos de células epiteliais de revestimento neoplásticas. Essas células podem apresentar diversas alterações, entre elas, alterações morfológicas, caracterizadas por nucléolos proeminentes, hipercromatismo e pleomorfismo nuclear, pleomorfismo celular, multinucleação, disqueratose e aumento no número de mitoses típicas e atípicas.<sup>19</sup>

Os tratamentos de escolha para o CCEB são cirurgia, radioterapia ou ambos, dependendo da localização e do estadiamento clínico do tumor, obtido através do sistema TNM. Convencionalmente, a quimioterapia é utilizada como um tratamento paliativo para lesões em estágios mais avançados, quando a cirurgia não é possível,

seja pela extensão do tumor, seja pelo o paciente não estar em condições de realizar a cirurgia.<sup>19</sup>

## 2.2 *Budding* tumoral

Segundo os autores<sup>3</sup>, o *budding* tumoral foi inicialmente chamado de “brotamento” por Imai *et al.*<sup>20</sup> (1954), sendo observado em carcinomas colorretais. Posteriormente, diversos estudos foram realizados em diferentes tipos de carcinomas, associando a intensidade do *budding* tumoral e o prognóstico dos pacientes, como pode-se observar no quadro 1.

A definição mais apropriada para o *budding* tumoral é a proposta por WANG *et al.*<sup>5</sup> (2009): presença de células neoplásicas isoladas ou agrupadas em pequenos ninhos (compostos por até quatro células) presentes no estroma tumoral, distribuídas próximas ao fronte de invasão do tumor, mas não exclusivamente restrito a esta localização. O *budding* tumoral representa, portanto, duas importantes características das neoplasias: perda da adesão celular e invasão local.<sup>4-7</sup>

Segundo alguns autores<sup>18</sup>, o *budding* tumoral é uma característica morfológica altamente reprodutível. No diagnóstico de rotina, o patologista pode identificar o número de *buddings* e dividir os pacientes com CCEB em 2 grupos: grupo de alto risco e grupo de baixo risco. Entretanto, como a maioria dos espécimes de CCEB apresentam infiltrado inflamatório, a identificação do *budding* tumoral no campo de baixa potência é difícil. Dessa forma, a imunoistoquímica de pan citoqueratina é útil para identificar as células epiteliais quando o infiltrado inflamatório torna a observação confusa.<sup>18,21</sup>

Já os autores<sup>18</sup> discutem ainda as limitações do uso da morfologia e histologia convencional como parâmetros indicadores para planejamento do tratamento e prognóstico, pois a maioria dos parâmetros não podem ser julgados antes da cirurgia. No entanto, é possível avaliar o *budding* tumoral em biópsias pré-operatórias ou intra-operatórias de material congelado.

A graduação do *budding* tumoral, ou a determinação de sua ausência e presença é outro aspecto importante que deve ser considerado. De acordo com os autores<sup>4</sup>, o *budding* é considerado positivo quando  $\geq 10$  grupos de  $\leq 5$  células são contados em um campo com aumento de 20x (*budding* de alto grau). Em casos limítrofes, em que apenas 5 a 10 *budding* são observados, mas há a possibilidade

de que outras células tumorais estejam obscurecidas pelo estroma, recomenda-se a imunoistoquímica para comprovação. Entretanto, deve-se ter cautela em relação ao uso da imunoistoquímica nestes casos.

Segundo os autores<sup>6</sup>, primeiros a avaliarem o *budding* em CCEB consideraram *budding* de alto grau/presente, quando 5 ou mais *buddings* foram quantificados em aumento de 20x.

Apesar das dúvidas ainda quanto a avaliação, o *budding* tem se mostrado um biomarcador histopatológico de predição e prognóstico bastante confiável para diferentes tumores, incluindo os de boca.

**Quadro 1 - Estudos associando a intensidade do *budding* tumoral com prognóstico dos pacientes com diferentes neoplasias malignas**

Continuação...

Autores	Ano	Tipo de Amostra	Gradação do <i>budding</i> tumoral	Resultado
<b>Hase et al.<sup>22</sup></b>	<b>1993</b>	663 amostras de ressecção cirúrgica de adenocarcinomas de cólon e reto	1) nenhuma presença ou leve presença <i>budding</i> tumoral; 2) moderada ou intensa presença de <i>budding</i> tumoral	O grupo 2 estava associado a um pior prognóstico quando comparado ao grupo 1, apresentando uma pior sobrevida
<b>Ueno et al.<sup>4</sup></b>	<b>2002</b>	638 espécimes de carcinomas de reto	1) alto grau de intensidade de <i>budding</i> (10 ou mais focos no campo); 2) baixo grau de intensidade de <i>budding</i> (menos de 10 focos no campo)	Amostras com alto grau de intensidade de <i>budding</i> estavam associadas a menor sobrevida
<b>Kanazawa et al.<sup>23</sup></b>	<b>2008</b>	159 amostras de carcinomas colorretais	Leve (presença de <i>budding</i> em até um terço da margem invasiva do tumor); moderado (presença de <i>budding</i> em um terço a dois terços da margem invasiva do tumor); intenso (presença de <i>budding</i> em mais de dois terços da margem invasiva do tumor)	Tumores apresentando <i>budding</i> intenso estavam associados a baixa diferenciação histológica, metástase regional e estadio avançado na classificação TNM. Pacientes cujos tumores apresentaram maior intensidade de <i>budding</i> apresentaram menor sobrevida
<b>Koike et al.<sup>24</sup></b>	<b>2008</b>	126 amostras de carcinomas de células escamosas de esôfago	1) presença frequente de <i>budding</i> ; presença de 5 ou mais focos de <i>budding</i> em um campo de 200x; 2) presença rara de <i>budding</i> ; presença de menos de 5 focos de <i>budding</i> em um campo de 200x	Uma análise multivariada identificou o <i>budding</i> tumoral como uma variável independente de prognóstico, estando os casos com presença frequente de <i>budding</i> associados a menor sobrevida
<b>Wang et al.<sup>5</sup></b>	<b>2009</b>	128 casos de carcinomas colorretais	Os casos foram classificados em alto e baixo grau de <i>budding</i> por meio da obtenção de medianas do número de focos de <i>budding</i>	Alto grau de <i>budding</i> estava associado a padrão de invasão histológico infiltrativo e invasão de vasos linfáticos. A intensidade de <i>budding</i> foi um fator independente de prognóstico, estando os tumores com alta intensidade de <i>budding</i> associados a menor sobrevida

## Conclusão

Autores	Ano	Tipo de Amostra	Gradação do <i>budding</i> tumoral	Resultado
Yamaguchi <i>et al.</i> <sup>25</sup>	2010	201 amostras de ressecção completa de adenocarcinomas de pulmão	Grau 1) quando estavam presentes de 1 a 4 focos de <i>budding</i> no campo; grau 2) quando estavam presentes de 5 a 10 focos de <i>budding</i> no campo; grau 3) quando estavam presentes 11 ou mais focos de <i>budding</i> no campo	Maior intensidade de <i>budding</i> estava associada a metástase regional, invasão linfática, invasão vascular, invasão pleural e menor sobrevida
Sarioglu <i>et al.</i> <sup>26</sup>	2010	64 amostras de carcinomas de células escamosas de laringe	Leve, moderado ou intenso, de acordo com os critérios adotados por Kanazawa <i>et al.</i> <sup>23</sup> (2008)	Associação entre maior intensidade do <i>budding</i> tumoral e ocorrência de metástases regionais

Fonte: Elaborado pela autora

Como pode ser visto no quadro 1, a avaliação do *budding* tumoral é um forte e reprodutível marcador de prognóstico para as diversas neoplasias avaliadas. Koike *et al.*<sup>24</sup> (2008) ainda sugerem que o *budding* tumoral é a primeira etapa morfológicamente identificável no processo de metástase e que sua avaliação pode ser utilizada como um parâmetro universal indicativo de agressividade.

Até o momento, poucos estudos avaliaram o valor prognóstico do *budding* tumoral em CCEB. Entre os que avaliaram, Wang *et al.*<sup>6</sup> (2011) e Almangush *et al.*<sup>27</sup> (2014) se destacam. Ambos avaliaram apenas carcinomas de língua e utilizaram espécimes cirúrgicos. Além desses, devemos destacar também os estudos de alguns autores<sup>3,7,18</sup> or sua avaliação do *budding* em carcinomas de células escamosas de boca e sua relação com o prognóstico.

Já alguns autores<sup>6</sup> analisaram amostras de 230 pacientes com carcinoma de células escamosas de língua quanto a intensidade de *budding* tumoral. Para a avaliação do *budding* tumoral foi realizada a coloração por Hematoxilina & Eosina. A imunistoquímica para pan-citoqueratina (AE1/AE3) foi realizada apenas em 30 amostras de forma a auxiliar na detecção dos focos de *buddings*. Foram considerados como *budding* tumoral aqueles casos nos quais foi possível observar a presença de células neoplásicas isoladas ou agrupadas em pequenos ninhos compostos por até quatro células, no fronte de invasão tumoral. As amostras foram inicialmente avaliadas em aumento de 40x para selecionar as áreas com maior

intensidade de *budding*. Posteriormente, foi selecionado o campo em aumento de 200x que se mostrava com uma maior intensidade de *budding* tumoral. Somente este campo foi avaliado e a intensidade de *budding* tumoral foi classificada em: 1) ausência ou baixa intensidade de *budding* (menos de 5 focos de *budding* no campo); 2) alta intensidade de *budding* (cinco ou mais focos de *budding* no campo). A alta intensidade de *budding* tumoral foi observada em 111 (48,3%) e ausência ou baixa intensidade de *budding* foi encontrada em 119 (51,7%). Observou-se ainda que aqueles casos com alta intensidade de *budding* tumoral estava associada a perda de expressão de caderina-E e ganho de expressão de vimentina pelas células neoplásicas. Além disso, foi encontrada associação entre alta intensidade de *budding* tumoral e menor sobrevida dos pacientes. Os autores concluíram que o *budding* tumoral é um marcador de prognóstico independente em CCEB.

Maragon *et al.*<sup>7</sup> (2014) avaliaram a expressão da laminina-5 cadeia gama 2 (laminina-5  $\gamma$ 2) em uma amostra de 57 biópsias incisionais de carcinomas de células escamosas de boca e sua associação com a intensidade do *budding* e a densidade dos miofibroblastos no estroma. A imunistoquímica foi empregada para detectar a laminina 5-  $\gamma$ 2, a actina de músculo liso (marcador de miofibroblastos do estroma) e a multicitoqueratina AE1/AE3 (para identificar o *budding* tumoral). Os autores observaram uma maior expressão da laminina-5  $\gamma$ 2 associada com uma alta intensidade de *budding* ( $P < 0,05$ ) e com maior densidade de miofibroblastos do estroma ( $P < 0,05$ ). Além disso, a alta intensidade de *budding* tumoral foi associada com uma maior densidade de miofibroblastos do estroma ( $P < 0,05$ ). Diante dos achados, os autores concluíram que no CCEB a maior expressão de laminina-5  $\gamma$ 2 está associada com carcinomas de alta intensidade de *budding* e com maior densidade de miofibroblastos do estroma, sugerindo que esta expressão está relacionada com o estabelecimento de um fenótipo invasivo de células neoplásicas e um ambiente mais permissivo para a invasão tumoral nesta neoplasia.

No estudo de Almangush *et al.*<sup>27</sup> (2014) os autores destacam que os carcinomas de células escamosas de boca localizados na língua são caracterizados por um prognóstico muito variável na fase inicial da doença (T1/T2 N0M0) e acrescentam que a capacidade de classificar esses carcinomas de língua em categorias de baixo risco e de alto risco representaria um grande avanço no planejamento terapêutico. O estudo avaliou a profundidade de invasão, o *budding* tumoral, score da avaliação histológica e a densidade dos fibroblastos em 233 casos

de T1/T2 N0M0 de CCEB em língua de pacientes em tratamento em 5 hospitais. O *budding* tumoral foi avaliado em espécimes cirúrgicos. Os casos com *budding* tumoral ( $\geq 5$  clusters no fronte de invasão) e com profundidade de invasão  $\geq 4$  mm foram associados com um pior prognóstico. Os autores concluíram que é recomendado analisar a profundidade da invasão e o *budding* tumoral para um melhor planejamento do tratamento de pacientes com CCEB.

Já alguns autores<sup>3</sup> ressaltaram que apesar dos enormes avanços em diversas modalidades de diagnóstico e de conduta no tratamento do carcinoma de células escamosas de boca as taxas de mortalidade permaneceram estagnadas com uma taxa de sobrevida  $< 50\%$  em 5 anos, desafiando os métodos disponíveis de avaliação prognóstica. Estes autores relatam a avaliação do *budding* tumoral em vários tipos de câncer e com boa possibilidade de aplicação também na avaliação do CCEB. Um total de 75 casos de espécimes cirúrgicos de CCEB foram analisados para o *budding* tumoral, juntamente com outros parâmetros clinicopatológicos. O *budding* tumoral foi classificado como sendo de alta ou baixa intensidade baseado na presença ou ausência de  $\geq 10$  *buddings* ou  $< 10$  *buddings* em lâminas coradas em hematoxilina e eosina. Uma associação entre os parâmetros clinicopatológicos, metástases linfonodais com a intensidade do *budding* foi avaliada utilizando análises uni e multivariada. O *budding* tumoral foi evidente em 89% dos casos com 45,3% demonstrando alta intensidade. Os casos com alta intensidade de *budding* tumoral foram significativamente associados com metástases em linfonodos e profundidade de invasão. A análise multivariada mostrou que o *budding* tumoral e a profundidade da invasão foram preditores independentes significativos para metástase linfonodal. Diante dos achados, os autores concluíram que o *budding* tumoral é um importante marcador histológico encontrado frequentemente em CCEB e quando em alta intensidade é um fator prognóstico independente para a previsão de metástases linfonodais.

Xie *et al.*<sup>18</sup> (2015) analisaram a correlação do *budding* tumoral com as características clínico-patológicas, e seu significado prognóstico para o estágio T1 e T2 do carcinoma de células escamosas de boca em língua, em 195 biópsias incisionais. A profundidade de invasão do tumor e a análise de sobrevida também foram analisadas. Os autores observaram nesse estudo que a frequência do *budding* tumoral nos carcinomas foi de 85,6%. Além disso, a intensidade do *budding* tumoral mostrou forte correlação com metástases em linfonodo, recidivas locais, pior

padrão de invasão e profundidade de invasão. A profundidade de invasão foi significativamente associada com a classificação T e metástases em linfonodos. A redução da sobrevida global esteve correlacionada com a alta intensidade do *budding* tumoral e uma maior profundidade de invasão. Os autores concluíram que o *budding* tumoral é um evento frequente em carcinomas de células escamosas de boca localizados em língua em estágios T1 e T2. Ele foi um fator prognóstico independente e pode ser utilizado para a rotina de diagnóstico patológico e para a decisão da dissecação do linfonodo.

### 2.3 Caderina-E

No epitélio normal, a adesão célula-célula determina a polaridade celular, sendo importante nos processos morfogênético e de diferenciação celular, e ainda na manutenção da integridade e homeostase tecidual.<sup>28</sup>

Como principais moléculas da adesão célula-célula, podemos citar as caderinas que são importantes glicoproteínas transmembrana dependentes de  $\text{Ca}^{+2}$ .<sup>28,29</sup> Segundo o autor<sup>29</sup> as caderinas podem ser divididas basicamente em clássicas e não-clássicas. Uma das clássicas, objeto de estudo deste trabalho, é a caderina-E. Ela está localizada principalmente no epitélio, sendo a principal molécula de adesão desse tecido, fundamental para o estabelecimento e manutenção da polaridade celular ápico-basal e da sua integridade estrutural.<sup>28</sup>

Essa molécula transmembrana, apresenta um domínio extracelular e um domínio intracelular. Para que aconteça a adesão célula-célula, é necessário que o domínio intracelular esteja ligado corretamente ao citoesqueleto através de proteínas de ancoragem denominadas cateninas ( $\alpha$ ,  $\beta$ , *gama*, p120). O braço citoplasmático das caderinas une-se ao complexo multiproteico  $\beta$ -catenina, *gama*-catenina e p120-catenina. Posteriormente, este complexo liga-se diretamente à  $\alpha$ -catenina, sendo esta responsável por unir ao citoesqueleto.<sup>30,31</sup>

A ocorrência da redução, total ou parcial, na expressão da caderina-E é relatada na literatura como um fenômeno frequente em diversas neoplasias malignas de origem epitelial e está diretamente associada à pouca diferenciação histológica tumoral e ao alto potencial invasivo e metastático.<sup>8-11</sup>

Segundo os autores<sup>32</sup> demonstraram que diminuição da expressão do complexo caderina-E/ $\beta$ -catenina nas células epiteliais neoplásicas está associada a um pior prognóstico em carcinoma de células escamosas de boca.

Já os autores<sup>33</sup> ressaltaram que no evento denominado transição-epitélio-mesênquima (EMT), as células epiteliais adquirem características de células mesenquimais como, por exemplo, exibir alta mobilidade. Este fenótipo migratório é significativo durante a invasão tumoral e metástase. O objetivo do estudo foi avaliar a expressão dos marcadores de EMT E-caderina, N-caderina e vimentina em uma amostra de 20 biópsias incisionais de carcinoma de células escamosas de boca. As diferenças na expressão de cada proteína foram avaliadas no fronte de invasão (FI) e nas áreas centrais/superficiais (ACS) do tumor. Correlações entre os níveis de expressão de cada proteína no FI e metástase regional também foram avaliados. Foi observada a redução da expressão da caderina-E em 15 amostras (75%). A expressão da caderina-E foi reduzida no FI quando comparado com a ACS. Todas as amostras eram negativas para a N-caderina, embora uma amostra apresentasse uma expressão discreta. A expressão de vimentina positiva foi observada em seis casos (30%). No entanto, não houve diferença na expressão vimentina entre o FI e a ACS. Não foram observadas correlações entre os níveis de cada proteína e metástase regional. Os autores concluíram que a redução na expressão de caderina-E no FI e sua associação com capacidade de invasão histológica sugere que esta proteína é um marcador da EMT notável em CCEB. E, que embora a vimentina também tenha sido detectada como um marcador da EMT, sua expressão não era nem limitada ao FI nem foi relacionado à capacidade de invasão histológica.

## 2.4 Podoplanina

A podoplanina humana é uma glicoproteína transmembrana de 43Kda constituída por 162 aminoácidos, sendo nove destes, de domínio intracelular.<sup>34,35</sup> Em análises bioquímicas esse antígeno é descrito como uma sialoglicoproteína de 40Kda, com carboidratos do tipo mucina simples, necessária para antigenicidade do anticorpo que se expressa nas células endoteliais dos vasos linfáticos, mas não nas células dos vasos sanguíneos.<sup>36,37</sup>

Esta proteína foi descoberta em estudos *in vitro*<sup>38-40</sup> e atualmente já se sabe que, a podoplanina se expressa em várias células e tecidos normais.<sup>41</sup> Ela é

reconhecida pelo anticorpo monoclonal D2-40, que tem capacidade de detectar o epítopo de fixação da podoplanina, inclusive em tecidos humanos emblocados em parafina.<sup>40,42-44</sup>

A podoplanina foi relatada pela primeira vez, *in vivo*, no ano de 1996 quando foi reconhecida como antígeno E11<sup>38,39</sup>, sendo, posteriormente, chamada de podoplanina devido a sua baixa expressão nos podócitos dos corpúsculos renais em nefropatias experimentalmente induzida em ratos<sup>39</sup>, permanecendo com esta denominação até hoje.

Desde sua descoberta e recente liberação comercial, o anticorpo D2-40 vem sendo utilizado em diversos estudos na linfangiogênese tumoral como marcador específico de vasos linfáticos.<sup>45</sup> Nos estudos de alguns autores<sup>46,47</sup>, realizaram-se uma comparação da precisão de marcação entre os anticorpos anti-podoplanina e o D2-40, e os resultados sugeriram que ambos os anticorpos são excelentes marcadores de endotélio linfático.<sup>46,47</sup> Entretanto, a expressão do D2-40 em células tumorais levou a investigação de qual seria seu papel nestas células. Atualmente, já se sabe que além do endotélio linfático, a imunoreatividade do D2-40 é vista também em células neoplásicas.<sup>48,49</sup>

A função da podoplanina nas células tumorais não é ainda totalmente compreendida, mas é sugerido que a podoplanina promova a invasão tumoral por aumentar a mobilidade das células tumorais.<sup>12</sup> A podoplanina pode promover a remodelação do citoesqueleto proporcionando a mobilidade celular.<sup>48</sup>

A expressão da podoplanina em lesões potencialmente malignas da cavidade bucal (leucoplasias com diversos graus de displasia) foi avaliada por duas pesquisas relacionando-se o grau de displasia e o risco de progressão tumoral com os níveis de marcação da podoplanina. Altos níveis de expressão dessa molécula foram relacionados com maior grau de displasia e maior risco de progressão tumoral, sendo que na análise multivariada somente a expressão da podoplanina demonstrou um risco aumentado para progressão em carcinoma espinocelular de boca, sugerindo a podoplanina como um potencial marcador de transformação tumoral em leucoplasias bucais.<sup>50,51</sup>

Segundo os autores<sup>52</sup> colocaram em destaque em seu estudo, o microambiente do linfonodo, usando o D2-40. Ao contrário de outros estudos semelhantes, neste, a expressão dos principais fatores de crescimento linfático foi investigada não somente no tumor primário, mas também nos gânglios linfáticos,

tendo como objetivo avaliar a linfangiogênese no CCEB e nos linfonodos associados, metastáticos e não metastáticos. Observou-se uma forte associação entre a expressão da podoplanina e o grau de diferenciação do tumor no fronte de invasão, com expressão aumentada da podoplanina em tumores indiferenciados, sugerindo que esta expressão poderia ser um indicador da agressividade do tumor.

Para testar a possibilidade da podoplanina estar envolvida no processo de transição epitélio-mesenquimal, Foschini *et al.*<sup>13</sup> (2013) analisaram a expressão de podoplanina e caderina-E utilizando a técnica de imunoistoquímica, em 102 biópsias incisionais de carcinomas espinocelulares de boca. Os resultados demonstraram que, quando as biópsias apresentavam caderina-E alta ou podoplanina baixa, o índice de metástases era baixo. Com base nesses resultados os autores denominaram como “Perfil Favorável”, os casos que demonstravam alta expressão de caderina-E e baixa expressão de podoplanina, e como “Perfil Desfavorável”, uma associação inversa. Marcações fortes para a podoplanina quase dobravam o risco de ocorrência de metástase (de 25% para 43,9%), sendo que 77,8% dos casos que apresentaram metástases durante o acompanhamento tinham forte marcação nas biópsias incisionais. Esses resultados demonstraram uma correlação estatística entre alta expressão de podoplanina/baixa expressão de caderina-E com presença de metástases linfonodais. Os autores sugeriram que a avaliação desses biomarcadores em biópsias incisionais de carcinomas de células escamosas de boca poderia auxiliar na predição de metástases.

### 3 OBJETIVOS

#### 3.1 Objetivo geral

Avaliar o *budding* tumoral em biópsias incisionais de carcinoma de células escamosas de boca e sua associação com características clinicopatológicas e com a expressão imunohistoquímica das proteínas caderina-E e podoplanina.

#### 3.2 Objetivos específicos

- a) associar a intensidade do *budding* com: o grau histológico de malignidade tumoral, o modo de invasão tumoral e com o TNM no momento do diagnóstico;
- b) descrever a expressão de caderina-E e podoplanina nas regiões central e superficial do tumor e nas áreas profundas;
- c) associar a expressão de caderina-E e podoplanina com a intensidade do *budding*.

## 4 MÉTODOS

### 4.1 Aspectos éticos e legais

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP-UFMG), sob o número 35575414.7.0000.5149, obedecendo ao exigido pela legislação brasileira, conforme as resoluções CNS no. 466/12 e 347/05 do Conselho Nacional de Saúde sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos (ANEXO A).

### 4.2 Seleção da amostra

A amostra selecionada compreendeu 56 espécimes de carcinoma de células escamosas de boca provenientes do Serviço de Patologia da PUC Minas.

A amostra foi de conveniência e incluiu casos de diferentes localizações em boca.

Foram excluídos os casos com material insuficiente para o preparo das lâminas e análises propostas.

Dados clínicos, tais como, sexo, idade, localização do tumor primário, incluindo o estadiamento clínico foram obtidos dos prontuários médicos dos pacientes e laudos histopatológicos, com o auxílio do Programa de Avaliação e Vigilância do Câncer-PAV-MG.

Lâminas coradas em hematoxilina-eosina (HE) foram avaliadas para confirmação do diagnóstico e graduação histopatológica.

Os tecidos emblocados em parafina foram submetidos, em micrótomo por profissional experiente, a cortes histológicos com espessura de 3µm e foram montados em lâminas de vidro previamente gelatinizadas, para a realização da técnica imunoistoquímica.

### 4.3 Reações imunoistoquímicas

Dois protocolos diferentes foram utilizados para as reações imunoistoquímicas. O sistema de detecção estreptavidina-biotina-peroxidase foi empregado para identificação do *budding* com a citoqueratina AE1/AE3. Para a

identificação da expressão da Caderina-E e podoplanina foi utilizado um sistema de polímero livre de biotina.

Protocolo para citoqueratina AE1/AE3:

- a) remoção da parafina, com a imersão dos cortes em três banhos de xilol em temperatura ambiente, sendo o primeiro por dezoito horas, o segundo por quinze minutos e o terceiro por cinco minutos;
- b) reidratação em cadeia descendente de etanol, a partir de três passagens em etanol absoluto, seguidos por etanol 95 e 80%, durante cinco minutos cada;
- c) remoção do pigmento formólico, imersão por dez minutos em solução de hidróxido de amônio a 10% em etanol a 95% e lavagem em sete banhos de água destilada;
- d) recuperação antigênica: imersão das amostras em tampão citrato pH 6, durante 30 minutos, no steamer a 96°C;
- e) inibição da peroxidase endógena, os cortes passaram por dois banhos de cinco minutos em peróxido de hidrogênio 10 volumes, sendo posteriormente lavados em cinco banhos de água destilada;
- f) cada um dos procedimentos de incubação descritos a seguir foi precedido por três lavagens de cinco minutos em solução tampão TRIS (tris-hidroxi-metil-aminometano) pH 7,4;
- g) incubação com o anticorpo primário a 4°C, por 18 horas, conforme protocolo descrito no quadro 1;
- h) lavagem em tampão TRIS-HCl 20 mM pH 7,4;
- i) incubação do anticorpo secundário e do complexo terciário pertencentes ao kit LSAB+ Peroxidase (Dako Corporation, Carpinteria, USA). Inicialmente, os espécimes foram incubados com o anticorpo secundário biotinilado polivalente, durante 30 minutos, à temperatura ambiente, em câmara umidificada. Sequencialmente, foi efetuada a incubação com o complexo estreptavidina-peroxidase, durante 30 minutos, à temperatura ambiente, em câmara umidificada;
- j) incubação com a solução cromógena contendo 14 mg de diaminobenzidina (Sigma Chemical, St Louis, USA) diluídos em 120 mL de tampão TRIS pH 7,4, aos quais foram adicionado 1,2 mL de peróxido

de hidrogênio 10 volumes. Os cortes permaneceram nesta solução durante 3 minutos, sendo então lavados em água corrente por cinco minutos;

- k) contracoloração com hematoxilina de Mayer por dois minutos e trinta segundos;
- l) imersão rápida das lâminas em solução aquosa de hidróxido de amônio a 10% e lavagem em água corrente por cinco minutos;
- m) desidratação dos cortes em soluções com concentrações crescentes de etanol, a partir de uma passagem em etanol 70%, uma passagem em etanol 90% e três passagens em etanol absoluto, durante cinco minutos cada;
- n) diafanização dos cortes através de três banhos de xilol, em temperatura ambiente, de cinco minutos cada;
- o) montagem das lâminas com lamínulas de vidro utilizando-se Permount (Fisher Scientific, Fair Lawn, EUA).

Os controles negativos consistiram na omissão do anticorpo primário.

Protocolo para podoplanina e caderina-E:

- a) remoção da parafina, com a imersão dos cortes em três banhos de xilol em temperatura ambiente, sendo o primeiro por dezoito horas, o segundo por quinze minutos e o terceiro por cinco minutos;
- b) reidratação em cadeia descendente de etanol, a partir de três passagens em etanol absoluto, seguidos por etanol 95 e 80%, durante cinco minutos cada;
- c) cinco banhos de água destilada;
- d) recuperação antigênica: imersão das amostras em tampão citrato pH 6, durante 30 minutos, em banho maria a 96°C;
- e) resfriamento das lâminas por 20 minutos em temperatura ambiente;
- f) cinco banhos de água destilada;
- g) incubação com Hydrogen Peroxidase Block (Spring Bioscience, Plaesanton, EUA) por 10 minutos;
- h) banho rápido de TRIS (tris-hidroxi-metil-aminometano) pH 7,4 seguidos de mais dois banhos de 5 minutos;

- i) incubação com Protein Block (Spring Bioscience, Pleasanton, EUA) por 10 minutos;
- j) banho rápido de TRIS (tris-hidroxi-metil-aminometano) pH 7,4 seguidos de mais dois banhos de 5 minutos;
- k) incubação com os anticorpos primários (podoplanina e caderina-E) em temperatura ambiente por 1 hora, conforme protocolo descrito no quadro 1;
- l) lavagem em tampão TRIS-HCl 20 mM pH 7,4, 3 banhos de 5 minutos cada;
- m) incubação do anticorpo secundário e o complexo terciário pertencentes ao kit Spring livre de biotina (Reveal polyvalent HRP, Spring Bioscience, Pleasanton, EUA). Inicialmente, os espécimes foram incubados com o reagente complemento amarelo, durante 10 minutos, à temperatura ambiente, em câmara umidificada. Sequencialmente, foi efetuada a incubação com o Spring reveal conjugate vermelho, durante 15 minutos, à temperatura ambiente, em câmara umidificada;
- n) lavagem em solução tampão TRIS-HCl 20 mM pH 7,4, 3 banhos de 5 minutos cada;
- o) incubação com a solução cromógena contendo solução cromógena de 3,3' diaminobenzidina (DAB) – Reveal Polyvalent HRP Liquid DAB + Substrate-Chromogen System. Os cortes permaneceram nesta solução durante 1 minuto, sendo então lavados em água corrente por cinco minutos;
- p) a contracoloração foi realizada com hematoxilina de Mayer por dois minutos e quarenta e cinco segundos;
- q) lavagem das lâminas em água corrente por cinco minutos;
- r) desidratação dos cortes em soluções com concentrações crescentes de etanol, a partir de uma passagem em etanol 70%, uma passagem em etanol 90% e três passagens em etanol absoluto, durante cinco minutos. Os cortes foram então diafanizados através de dois banhos de xilol, em temperatura ambiente, de cinco minutos cada;
- s) montagem das lâminas com lamínulas de vidro utilizando-se Permount (Fisher Scientific, Fair Lawn, USA).

Os controles negativos foram realizados pela omissão do anticorpo primário. Os controles positivos foram os controles internos: vasos linfáticos no estroma tumoral para a podoplanina e epitélio tumoral e adjacente para a caderina-E. O protocolo de utilização dos anticorpos primários é apresentado resumidamente no quadro 2.

**Quadro 2 - Padronização imunoistoquímica para os anticorpos primários usados no estudo**

Anticorpo Primário	Clone / Fabricante	Recuperação Antigênica	Diluição	Incubação
D2-40	Clone D2-40 Dako Cytomation	Ácido cítrico pH 6.0em banho maria por 30', a 96°C	1:100	1h/TA
Caderina-E	Clone 36B5 - Leyca Microsystems	Ácido cítrico pH 6.0em banho maria por 30', a 96°C	1:50	1h/TA
AE1/AE3	cocktail de clones AE1 e AE3 - Leica Biosystems	Ácido cítrico pH 6.0 no steamer, por 30', a 96°C	1:50	18h/4°C

TA: Temperatura ambiente

**Fonte:** Elaborado pela autora

#### 4.4 Identificação e graduação do *budding* tumoral

O *budding* tumoral foi definido como a presença de células tumorais isoladas ou em pequenos ninhos (< 5 células tumorais) no estroma próximo ao fronte de invasão, porém não restrito a esta região. O *budding* tumoral foi avaliado inicialmente em cortes histológicos corados por hematoxilina e eosina. As lâminas foram escaneadas em menor aumento para a identificação das seguintes características: padrão de crescimento infiltrativo, irregularidade marcante no fronte invasivo e “borramento” na interface tumor/estroma.<sup>21</sup> A região com maior

concentração destas características foi avaliada em aumento de 200x para caracterização do *budding*. A classificação do *budding* foi realizada em cortes histológicos seriados submetidos à reação imunoistoquímica para as citoqueratinas AE1/AE3. A graduação do *budding* tumoral foi baseada na classificação de Wang *et al.*<sup>6</sup> (2011):

- a) baixa intensidade de *budding* tumoral ou ausência de *budding* tumoral (< 5 focos de *budding* tumoral);
- b) alta intensidade de *budding* tumoral ( $\geq$  5 focos de *budding* tumoral).

A avaliação do *budding* foi realizada independentemente por dois dos pesquisadores e conjuntamente para consenso no caso de discordância. Para a análise estatística foi realizada a dicotomização sendo o escore 2 considerado como positivo e escore 1 como negativo.

#### **4.5 Avaliação das reações imunoistoquímicas**

A avaliação das reações imunoistoquímicas foi realizada em microscópio de luz por dois observadores, sem conhecimento dos dados clínicos e de forma independente. Casos discordantes foram discutidos. Foram consideradas positivas as células apresentando coloração marrom no citoplasma. Para a podoplanina, a análise realizada foi semiquantitativa. Foi identificado o percentual de células positivamente marcadas pelo D2-40, seguindo os seguintes escores baseado na análise proposta por Sousa *et al.*<sup>52</sup> (2012):

- 0- Ausência de marcação
- 1- Menos de 50% das células marcadas
- 2- Entre 50% e 75% das células marcadas
- 3- Mais de 75% das células marcadas

Para análise estatística, os tumores com escores 0 e 1 foram considerados negativos e os tumores com escores 2 e 3 foram considerados positivos para a marcação.

O padrão de imunomarcção para caderina-E foi considerado normal quando houve marcação membranosa completa e contínua das células epiteliais neoplásicas. Este padrão foi considerado anormal quando houver descontinuidade ou ausência desta marcação membranosa, com ou sem marcação citoplasmática. A imunexpressão de caderina-E foi então classificada de acordo com os autores<sup>10</sup> em:

- a) Perdida ( $\leq 50\%$  das células com padrão de imunomarcção normal);
- b) Mantida ( $> 50$  das células com padrão de imunomarcção normal).

#### **4.6 Graduação histológica de toda a extensão da neoplasia**

A graduação histológica de toda a extensão da neoplasia teve como objetivo avaliar o tumor em toda sua extensão, gerando valores que pudessem ser trabalhados posteriormente.

Para tal foi utilizado um sistema no qual os parâmetros morfológicos grau de queratinização e pleomorfismo nuclear são avaliados em toda a extensão da neoplasia, incluindo a região do fronte de invasão, nos casos em que ele era visualizado. A graduação destes parâmetros foi realizada de acordo com os critérios propostos pelo sistema de Bryne *et al.*<sup>53</sup> (1992), expostos no quadro 3.

Desse modo, no sistema proposto os parâmetros morfológicos grau de queratinização e pleomorfismo nuclear foram avaliados em toda a extensão da neoplasia e graduados de 1 a 4, em ordem crescente, na medida em que denotam menor diferenciação histológica. Os valores estabelecidos para os dois parâmetros são então somados, perfazendo um produto final denominado grau histológico de malignidade, que pode variar de dois a oito. Quanto maior o valor deste grau histológico, menos diferenciado é o tumor. Tumores com grau histológico de malignidade de 2 a 5 são clasificados como bem diferenciados e de 6 a 8 como mal diferenciados.

**Quadro 3 - Graduação histológica**

<b>Parâmetro morfológico</b>	<b>Grau 1</b>	<b>Grau 2</b>	<b>Grau 3</b>	<b>Grau 4</b>
<b>Grau de queratinização</b>	Altamente queratinizado (acima de 50% das células)	Moderadamente queratinizado (entre 20 e 50% das células)	Queratinização mínima (entre 5 e 20% das células)	Queratinização ausente (entre 0 e 5% das células)
<b>Pleomorfismo nuclear</b>	Pleomorfismo nuclear pequeno (acima de 75% de células maduras)	Pleomorfismo nuclear moderado (entre 50 e 75% de células maduras)	Pleomorfismo nuclear abundante (entre 25 e 50% de células maduras)	Pleomorfismo nuclear extremo (entre 0 e 25% de células maduras)
<b>Padrão de invasão</b>	Invasão através de bordas tumorais amplas e bem delineadas	Invasão através de feixes, bandas ou cordões sólidos	Invasão através de cordões ou pequenos grupos (com mais de 15 células)	Invasão difusa através de células individuais ou pequenos grupos (como menos de 15 células)
<b>Infiltrado inflamatório</b>	Intenso	Moderado	Leve	Ausente

Fonte: Bryne *et al.*<sup>53</sup> (1992)

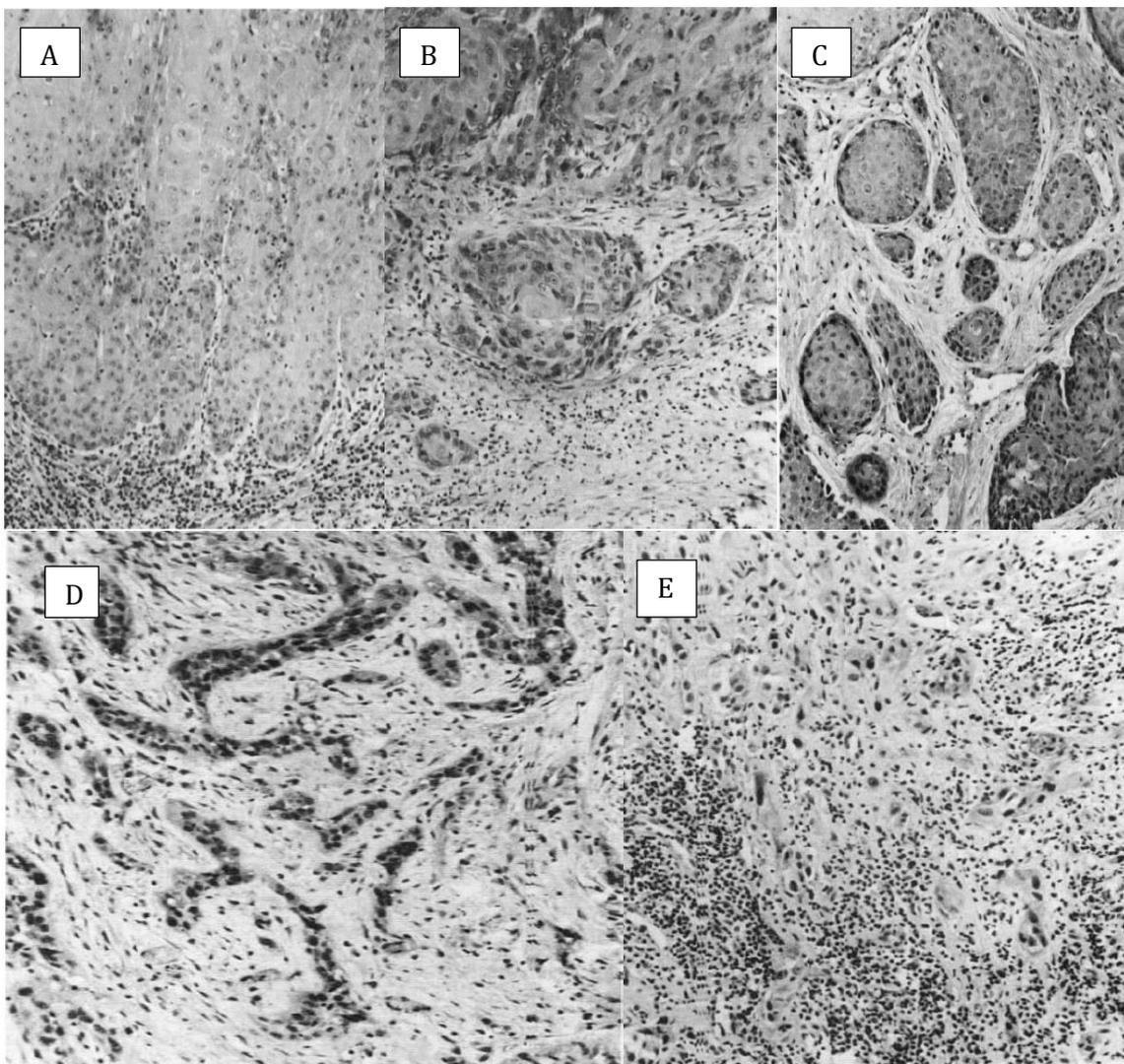
#### 4.7 Graduação do modo de invasão

A graduação do modo de invasão foi realizada avaliando a neoplasia como uma todo e classificando-a de acordo com os autores.<sup>54</sup>

Nessa classificação as neoplasias são graduadas em 4 graus, sendo o último subdividido em 4C e 4D.

No grau 1 o modo de invasão acontece por meio de bordas bem definidas. No grau 2 essa invasão acontece em cordões com bordas mal definidas. O grau 3, por sua vez, é caracterizado por grupos de células neoplásicas, sem limites bem definidos. Por fim, o grau 4 que se divide no 4C caracteriza-se por invasão difusa em forma de cordões e 4D, também com uma invasão mais difusa, com células neoplásicas agrupadas em ninhos menores e/ou isoladas (Figura 1).

**Figura 1** - Modo de invasão: **A.** grau 1 (HE 200x); **B.** grau 2 (HE 200x); **C.** grau 3 (HE 200x); **D.** grau 4C (HE 200x); **E.** grau 4D (HE 200x)



Fonte: Yamamoto *et al.*<sup>54</sup> (1983)

#### 4.8 Análise estatística

O teste exato de Fisher foi utilizado para avaliar a existência de associação entre: 1) *Budding* e graduação histológica; 2) *Budding* e modo de invasão; 3) *Budding* e TNM; 4) *Budding* e metástase regional; 5) *Budding* e expressão de caderina-E; 6) *Budding* e expressão de D2-40.

O teste de concordância de Kappa foi utilizado para avaliar a reprodutibilidade entre os métodos de graduação histológica, avaliados aos pares: 1) *Budding* e graduação histológica; 2) *Budding* e modo de invasão.

O teste de McNemar foi utilizado para avaliar a existência de diferenças na expressão de caderina-E e na expressão de D2-40 entre as seguintes regiões do tumor: áreas centrais/superficiais e áreas profundas.

O nível de significância foi estabelecido em 5%. As análises foram realizadas pelo software GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, San Diego, California, EUA), com exceção dos testes de concordância de Kappa, que foram realizadas por meio do software BioEstat 5.0 (Optical Digital Technology, Belém, Pará, Brasil).

## 5 RESULTADOS

### 5.1 Caracterização da amostra

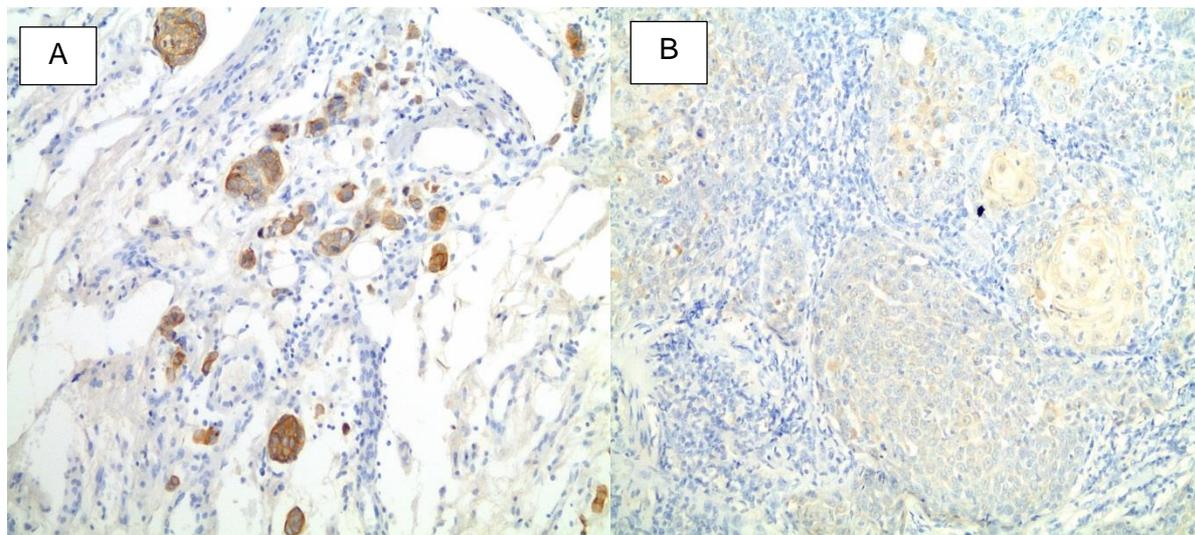
Foram avaliados um total de 56 carcinomas de células escamosas de boca obtidos por biópsias incisionais. Das 56 amostras de CCEB, 44 (78,6%) eram do sexo masculino e 12 (21,4%) do sexo feminino. A idade dos pacientes variou de 38 a 90 anos (média de idade de 60,48 anos).

Os 56 casos estudados foram localizados em diferentes locais anatômicos e 7 tumores foram situados em mais de um local, devido às suas dimensões. A língua foi o local mais afetado com 29 tumores, 9 tumores foram localizados no assoalho bucal, 7 tumores foram localizados no rebordo alveolar, 4 no palato mole, 3 no triângulo retromolar, 2 na mucosa jugal e 2 no lábio inferior.

Trinta e nove casos foram classificados como bem diferenciados e 17 mal diferenciados. Quanto ao *budding*, 37 foram *budding* positivos e 19 foram negativos. Quanto ao modo de invasão, o padrão 3 foi predominante (27 casos). Sete casos apresentaram-se com modo de invasão 1, 10 casos como 2, 11 casos como 4C e 1 caso como modo de invasão 4D. Nas figuras 2 e 3 é possível observar alguns desses aspectos.

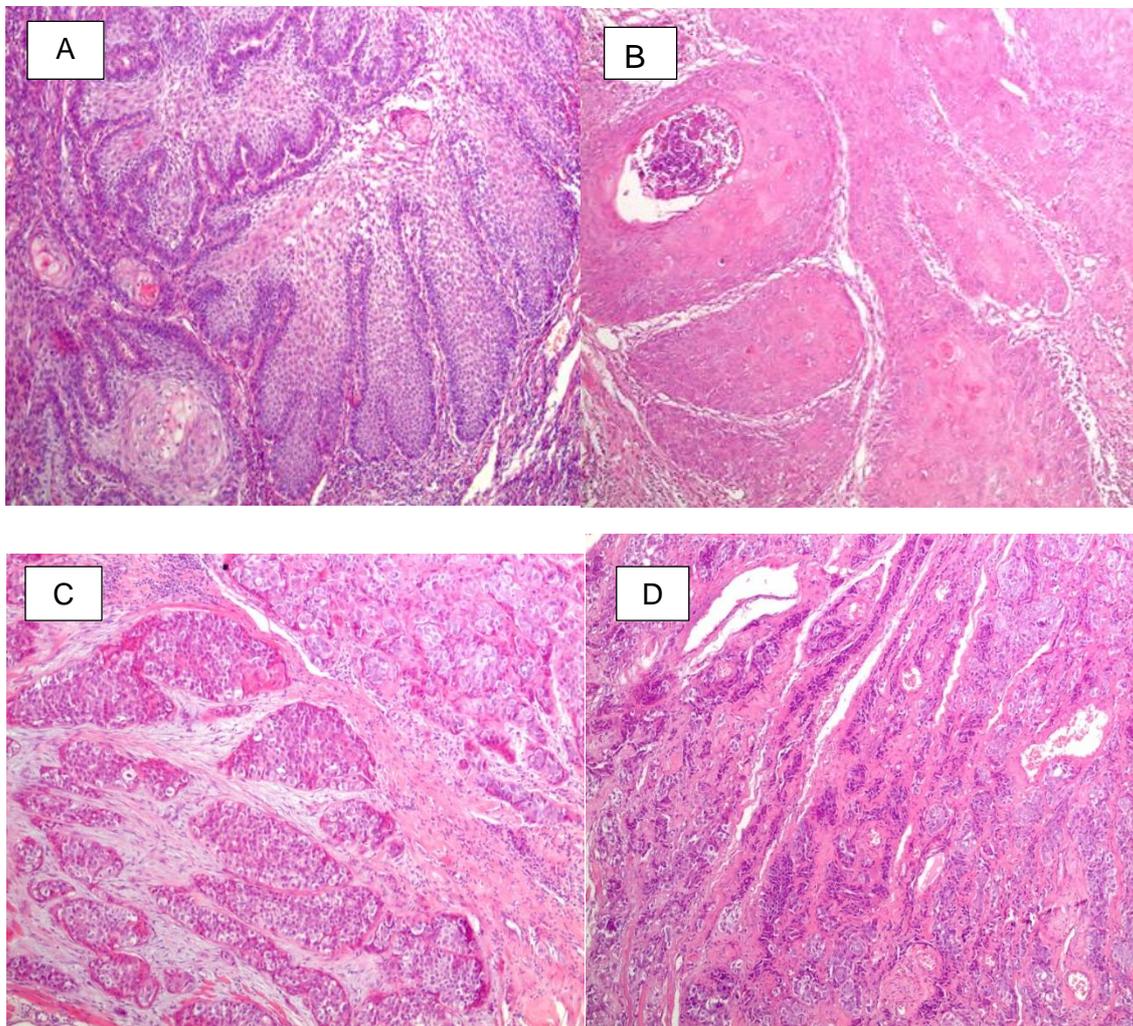
Os dados de estadiamento clínico (TNM) puderam ser recuperados apenas para 19 casos. Para fins de análise, os tumores foram classificados em estágios e posteriormente dicotomizados em estágio inicial (I/II) e estágio avançado (III/IV). O modo de invasão também foi dicotomizado para fins de análise, 1, 2 e 3 foram considerados separados dos casos 4C e 4D. Os dados clinicopatológicos completos dos casos estudados podem ser vistos no Anexo B.

**Figura 2** - *Budding* tumoral: **A.** *Budding* tumoral positivo; **B.** *Budding* tumoral negativo (técnica imunohistoquímica da biotina peroxidase para AE1/AE3 200x)



**Fonte:** Elaborado pela autora

**Figura 3** - Padrões de invasão encontrados: **A.** Padrão de invasão grau 1 (HE 100x); **B.** Padrão de invasão grau 2 (HE 100x); **C.** Padrão de invasão grau 3 (HE 100x); **D.** Padrão de invasão grau 4C (HE 100x)



Fonte: Elaborado pela autora

## 5.2 Avaliação imunoistoquímica da caderina-E e da podoplanina

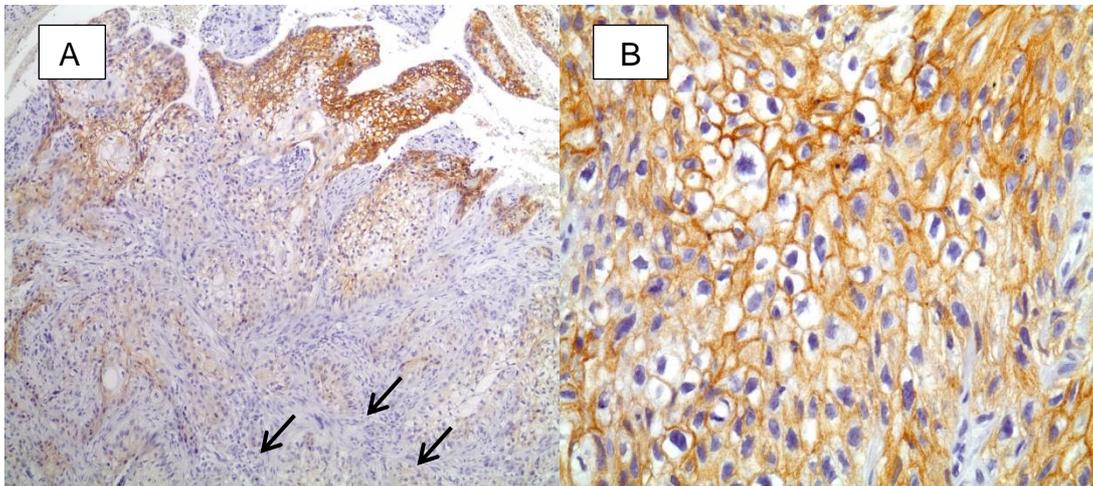
A expressão da Caderina-E foi observada no citoplasma e membrana das células como coloração amarronzada. Trinta e seis casos foram positivos nas porções centrais superficiais do tumor e 14 foram positivos nas porções mais profundas. Em 14 casos não foi possível identificar o fronte invasivo dos tumores (Figuras 4A e B).

A positividade para a podoplanina foi identificada como coloração amarronzada no citoplasma das células. Dos casos avaliados 5 apresentaram positividade para podoplanina nas porções centrais superficiais e 4 nas porções

mais profundas. Em 12 casos não foi possível localizar o fronte invasivo dos tumores. A figura 5 A e B demonstra alguns desses aspectos.

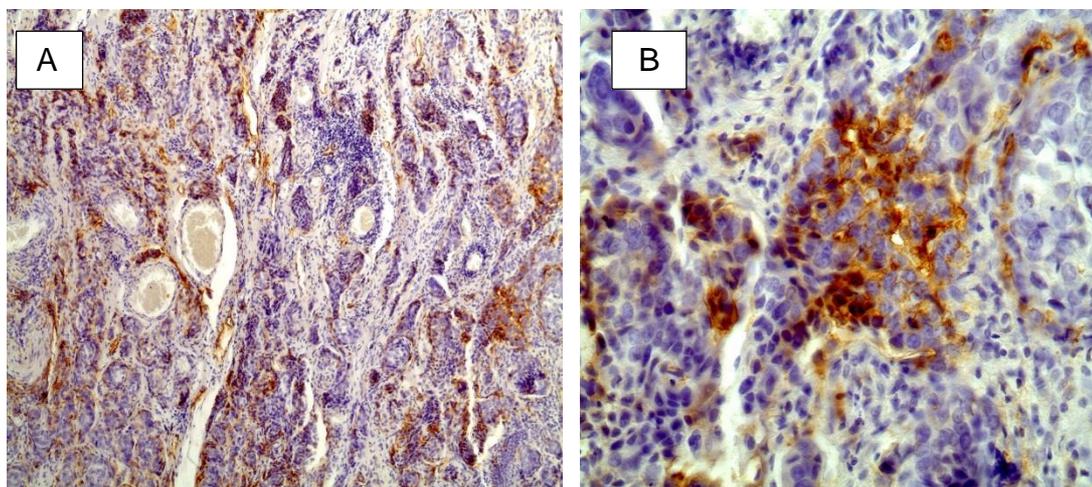
A avaliação de diferenças na expressão de caderina-E e na expressão de D2-40 entre as diferentes regiões do tumor, áreas centrais superficiais (ACS) e áreas mais profundas foram avaliadas pelo teste de McNemar (Tabela 1). Para a caderina-E houve diferença significativa, com a perda de expressão desta proteína nas áreas profundas (AP) do tumor.

**Figura 4** - Expressão da caderina-E: **A.** Caderina-E positiva nas ACS do tumor e negativa nas AP (setas) (técnica imunohistoquímica livre de biotina para caderina-E 100x); **B.** Caderina-E positiva nas ACS do tumor (técnica imunohistoquímica livre de biotina para caderina-E 400x)



Fonte: Elaborado pela autora

**Figura 5** - Expressão da podoplanina: **A.** Podoplanina positiva nas ACS do tumor (técnica imunoistoquímica livre de biotina para D2-40 100X); **B.** Podoplanina positiva nas ACS do tumor (técnica imunoistoquímica livre de biotina para D2-40 400x)



Fonte: Elaborado pela autora

**Tabela 1** - Expressão da Caderina-E e D2-40 nas áreas centrais/superficiais e nas áreas profundas do tumor

Expressão Caderina-E	n	Valor de p*
Positiva nas ACS / Positiva nas AP	13 (31%)	<0.05
Positiva nas ACS / Negativa nas AP	14 (33,3%)	
Negativa nas ACS / Positiva nas AP	1 (2,4%)	
Negativa nas ACS / Negativa nas AP	14 (33,3%)	
Total	42 (100%)	
Expressão da Podoplanina	n	Valor de p*
Positiva nas ACS / Positiva nas AP	1 (2,3%)	n.s.
Positiva nas ACS / Negativa nas AP	1 (2,3%)	
Negativa nas ACS / Positiva nas AP	3 (6,8%)	
Negativa nas ACS / Negativa nas AP	39 (88,6%)	
Total	44 (100%)	

\* valor de p foi obtido pelo teste de McNemar.  
n.s. – não significante (p>0,05)

Fonte: Elaborado pela autora

### **5.3 Associação do *budding* com características clínicopatológicas e com as proteínas caderina-E e podoplanina**

O *budding* tumoral mostrou associação com o padrão de invasão tumoral. Nenhuma das outras características clínicopatológicas avaliadas tiveram associação com o *budding* tumoral (Tabela 2).

**Tabela 2 - Associação do *budding* com as características clinicopatológicas e com a expressão das proteínas caderina-E e podoplanina**

Nº	Variável	Nº pacientes (%)	Budding + (%)	Budding - (%)	Valor de p	Kappa	Odds Ratio
1.	Idade						
	< 50	9 (16,1)	8 (14,3)	1 (1,8)			
	≥ 50	47 (83,9)	29 (51,8)	18 (32,1)			
2.	Sexo						
	Femino	12 (21,4)	7 (12,5)	5 (8,9)			
	Masculino	44 (78,6)	30 (53,6)	14 (25,0)			
3.	Localização						
	Língua	29 (51,8)	21 (37,5)	8 (14,2)			
	Rebordo alveolar	7 (12,5)	4 (7,1)	3 (5,3)			
	Assoalho bucal	9 (16,1)	7 (12,5)	2 (3,6)			
	Palato mole	4 (7,1)	2 (3,6)	2 (3,6)			
	Mucosa jugal	2 (3,6)	1 (1,8)	1 (1,8)			
	Trígono retromolar	3 (5,3)	2 (3,6)	1 (1,8)			
	Lábio inferior	2 (3,6)	0 (0)	2 (3,6)			
4.	Estágio						
	I						
	II	5 (26,3)	3 (15,8)	2 (10,5)	n.s.		2,75
	III						
	IV	14 (73,7)	11 (57,9)	3 (15,8)			(0,28-26,62)
5.	Gradação Histológica						
	Bem diferenciado	38 (67,9)	25 (44,6)	14 (25,0)	n.s.	0,13	2,61
	Mal diferenciado	18 (32,1)	14 (25,0)	3 (5,4)			(0,63-10,69)
6.	Modo de invasão						
	1						
	2	44 (78,6)	25 (44,6)	19 (34)	<0,05	0,23	19,12
	3						
	4C	12 (21,4)	12 (21,4)	0 (0)			
	4D						(1,06-343,4)
7.	Proteínas						
	Caderina-E +	14 (33,3)	9 (21,4)	5 (12,0)	n.s.		0,60 (0,14-2,40)
	Caderina-E -	28 (66,7)	21 (50,0)	7 (16,6)			
	D2-40 +	4 (9,1)	5 (11,4)	0	n.s.		5,60 (0,28-109,1)

**Fonte:** Elaborado pela autora

## 6 DISCUSSÃO

Segundo alguns autores<sup>3</sup>, o *budding* tumoral foi inicialmente chamado de “brotamento” por Imai *et al.*<sup>20</sup> (1954), sendo observado em carcinomas colorretais e sugerida sua correlação com um maior potencial de malignidade e agressividade desses tumores.

O *budding* tumoral é uma característica histopatológica que pode ser evidenciada no tumores e é caracterizado pela presença de células isoladas ou em agrupamentos de até cinco células, espalhadas pelo estroma em distâncias variadas do fronte invasivo.<sup>3,5-7,18</sup> Em tumores de diferentes localizações, o *budding* tem sido associado com o comportamento agressivo do tumor e com o desenvolvimento de metástases regionais e a distância e com a sobrevida dos pacientes.<sup>3,18,55</sup> Poucos estudos avaliaram o *budding* em CCEB, a grande maioria em carcinoma de língua em em espécimes cirúrgicos.

Este trabalho procurou avaliar o *budding* em uma amostra de biópsias incisionais de CCEB buscando associar a positividade para o *budding* com características clínicas e histopatológicas que expressam a agressividade tumoral, e com as proteínas caderina-E e podoplanina.

Uma das limitações quanto ao uso de espécimes cirúrgicos para o planejamento do tratamento e prognóstico é que a maioria dos parâmetros avaliados não podem ser julgados antes da cirurgia. O *budding* tumoral apresenta a vantagem de poder ser avaliado em biópsias pré-operatórias. Este trabalho empregou amostras previamente avaliadas quanto ao *budding*. Dos 56 casos incluídos no estudo, 37 foram *budding* positivos e 19 negativos.

A amostra incluiu lesões de diferentes localizações, o que é interessante uma vez que a maioria dos trabalhos com CCEB tem avaliado quase que exclusivamente as lesões de língua.<sup>6,18,27</sup> Não foi encontrada relação com características clínicas, especialmente com o TNM, principal indicador clínico de agressividade. Este resultado está provavelmente relacionado à limitação de informações obtidas para esta característica na amostra avaliada. Outros autores recentemente demonstraram que o *budding* tumoral pode discriminar lesões com tendência a um comportamento mais agressivo (metástases e recidiva)<sup>3,18,27</sup>, observaram isso mesmo em lesões em estágio inicial (T1T2N0M0). Entretanto, são necessários ainda estudos prospectivos

que avaliem a aplicação da presença do *budding* na decisão sobre o tratamento de cada paciente.

Poderia ser esperado que o grau histológico de malignidade tivesse uma associação direta com a presença do *budding* tumoral uma vez que ambos são critérios morfológicos de agressividade. Mas isto não foi observado na amostra. Algumas possíveis explicações são o número maior de lesões consideradas como bem diferenciadas incluídas neste estudo, e a impossibilidade na maioria dos casos de graduação das lesões pelo fronte invasivo tumoral. A similaridade morfológica do *budding* com o padrão IV de invasão tumoral do sistema de Bryne *et al.*<sup>53</sup> (1992), parece apontar para a maior possibilidade de concordância deste sistema de graduação com o *budding* que os demais.<sup>53</sup>

A graduação do modo de invasão foi primeiramente aplicada por Jacobsson *et al.*<sup>56</sup> (1973). Posteriormente, outros autores entre eles Yamamoto *et al.*<sup>54</sup> (1983), empregaram este critério na avaliação da resposta terapêutica à bleomicina em casos de CCEB. É interessante observar, que um critério próximo ao modo de invasão, mas que só pode ser aplicado adequadamente à avaliação de peças cirúrgicas, a profundidade de invasão, mostra associação positiva com o *budding* tumoral.<sup>18</sup> No presente trabalho foi encontrada associação entre *budding* positivo e o modo de invasão 4. Este resultado sugere a possibilidade de utilização dos dois critérios, *budding* e modo de invasão como fatores indicadores de modalidade terapêutica nos estágios pré-operatórios do CCEB, podendo por exemplo ajudar a discriminar quais pacientes se beneficiariam do esvaziamento cervical. Estudos prospectivos são necessários para confirmação desta hipótese.

Segundo os autores<sup>13</sup> avaliando biópsias incisionais de CCEB encontraram que tanto a caderina-E, quanto a podoplanina apresentaram associação com o desenvolvimento de metástases linfonodais. Assim, neste estudo, também esperávamos encontrar uma associação positiva entre o *budding* tumoral e a expressão dessas proteínas.

Diversos estudos vem demonstrando que redução, parcial ou completa, na expressão da caderina-E está associada à pouca diferenciação histológica tumoral e ao alto potencial invasivo e metastático.<sup>8-11</sup>

Liu *et al.*<sup>32</sup> (2010) demonstraram que diminuição da expressão de caderina-E nas células epiteliais neoplásicas está associada a um pior prognóstico em carcinoma de células escamosas de boca. Entretanto, apesar do padrão de

expressão da caderina-E ser o mesmo daquele descrito em trabalhos anteriores não foi encontrada associação com o *budding* tumoral. Costa *et al.*<sup>33</sup> (2015) observaram uma redução na expressão de caderina-E em CCEB, principalmente no fronte invasivo estando associada com uma maior capacidade de invasão histológica desses tumores. Entretanto, apesar do padrão de expressão da caderina-E ser o mesmo daquele descrito em trabalhos anteriores não foi encontrada associação com o *budding* tumoral.

A expressão de podoplanina em células tumorais também é um indicativo de maior potencial metastático. Entretanto, neste trabalho, poucos casos expressaram esta proteína nas regiões profundas do tumor (4 casos), e ela foi encontrada nas áreas superficiais de apenas 5 casos. As diferenças em relação aos resultados relatados por Foschini *et al.*<sup>13</sup> (2013), talvez estejam associados ao tamanho e características da amostra selecionada.

Neste estudo, além da limitação representada pelo tamanho da amostra e pela deficiência em relação aos dados clínicos e de acompanhamento, é necessário também abordar algumas dificuldades quanto ao reconhecimento e classificação do *budding*. Embora a reprodutibilidade da avaliação do *budding* seja mais facilmente alcançada que a concordância em relação a graduação histológica dos tumores, alguns cuidados devem ser tomados na avaliação do *budding*. Embora a quantificação do *budding* teoricamente seja fácil, o reconhecimento do que é ou não é *budding* pode ser mais difícil do que parece. Em geral a identificação do *budding* é feita em cortes histológicos corados em hematoxilina-eosina, mas pode requerer em alguns casos o auxílio da imunistoquímica.<sup>21</sup> Neste trabalho, os mesmos cuidados empregados em trabalho anterior<sup>7</sup> foram utilizados, em relação à seleção dos campos avaliados sempre em um mesmo microscópio, e o emprego da imunistoquímica para citoqueratinas auxiliando na identificação do *budding*. Embora a imunistoquímica não seja indispensável para a identificação do *budding* na rotina diagnóstica, casos com maior infiltrado inflamatório podem confundir no reconhecimento das células epiteliais neoplásicas, sendo a imunistoquímica para pan-citoqueratina muito útil nesses casos.<sup>18</sup>

Os autores<sup>21</sup> recomendam que a utilização da imunistoquímica na avaliação do *budding* seja feita com cautela e em casos específicos. Embora a concordância intra e inter observadores não seja alterada pela utilização da imunistoquímica, nota-se uma tendência a contagem maior de *budding* com o uso da

imunoistoquímica, o que pode levar ao estabelecimento de diferentes pontos de corte para *budding* quando da utilização deste recurso.

Já os autores<sup>5</sup> observaram que o alto grau de *budding* estava associado a padrão de invasão histológico infiltrativo e invasão de vasos linfáticos. No estudo, a análise multivariada demonstrou que a intensidade de *budding* foi um fator independente de prognóstico, estando os tumores com alta intensidade de *budding* associados a menor sobrevida. Os autores sugerem que a avaliação do *budding* tumoral é um forte e reprodutível marcador de prognóstico para esta neoplasia. Neste trabalho não foi possível relacionar o *budding* com a sobrevida dos pacientes devido a limitação de dados necessários para essa análise. Entretanto, observamos que a maioria dos casos *budding* positivos estavam associados ao modo de invasão 4C e 4D, em estágios mais avançados da doença.

O teste de concordância de Kappa foi utilizado para avaliar a reprodutibilidade entre os métodos de graduação histológica, avaliado aos pares: 1) *Budding* e graduação histológica; 2) *Budding* e modo de invasão. Os valores encontrados foram respectivamente 0,13 e 0,23, logo, houve uma concordância fraca.

Em resumo, os resultados deste trabalho não permitem no momento apontar o *budding* como indicador de comportamento do CCEB e indicativo de tratamento quando utilizado em biópsias incisionais, mas reforça a possibilidade de emprego deste parâmetro na avaliação deste tumor, e aponta o modo de invasão como um critério morfológico que também pode ser aplicado facilmente à análise de biópsias incisionais.

Estudos que avaliem em amostras maiores de biópsias incisionais a prevalência do *budding* são necessários. Outra sugestão para validação do *budding* em biópsias incisionais é a comparação desta característica em espécimes cirúrgico e biópsias de um mesmo paciente conforme fizeram Zlobec *et al.*<sup>55</sup> (2012) com casos de câncer retal. Espera-se desta forma a abertura de uma nova possibilidade para a determinação prognóstica do CCEB.

## 7 CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos no presente estudo, pode-se concluir que:

- a) o *budding* tumoral pode ser identificado em biópsias incisionais de carcinoma de células escamosas de boca, apresentando associação com o modo de invasão tumoral. Na amostra avaliada, nenhuma outra característica clinicopatológica apresentou associação com o *budding* tumoral;
- b) os resultados deste trabalho no momento, não permitem apontar o *budding* como indicador de comportamento do CCEB e indicativo de tratamento quando utilizado em biópsias incisionais.

## REFERÊNCIAS

1. Bagan J, Sarrion G, Jimenez Y. Oral cancer: clinical features. *Oral Oncol*, 2010 June;46(6):414-17.
2. Instituto Nacional do Câncer. Estimativa 2014: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2014. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/sintese-de-resultados-comentarios.asp>> Acesso em: 27 de jan. 2015.
3. Angadi PV, Patil PV, Hallikeri K, Mallapur MD, Hallikerimath S, Kale AD. Tumor *budding* is an independent prognostic factor for prediction of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Int J Surg Pathol*, 2015;23(2):102-10.
4. Ueno H, Murphy J, Jass JR, Mochizuki H, Talbot IC. Tumour 'budding' as an index to estimate the potential of aggressiveness in rectal cancer. *Histopathology*, 2002 Feb;40(2):127-32.
5. Wang LM, Kevans D, Mulcahy H, O'Sullivan J, Fennelly D, Hyland J, *et al.* Tumor *budding* is a strong and reproducible prognostic marker in T3N0 colorectal cancer. *Am J Surg Pathol*, 2009 Jan;33(1):134-41.
6. Wang C, Huang H, Huang Z, Wang A, Chen X, Huang L, *et al.* Tumor *budding* correlates with poor prognosis and epithelial-mesenchymal transition in tongue squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*, 2011 Aug;40(7):545-51.
7. Marangon Junior H, Rocha VN, Leite CF, de Aguiar MC, Souza PE, Horta MC. Laminin-5 $\gamma$ 2 chain expression is associated with intensity of tumor *budding* and density of stromal myofibroblasts in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*, 2014 Mar;43(3):199-204.
8. Bánkfalvi A, Krassort M, Buchwalow IB, Végh A, Felszeghy E, Piffkó J. Gains and losses of adhesion molecules (CD44, E-cadherin, and  $\beta$ -catenin) during oral carcinogenesis and tumour progression. *J Pathol*, 2002 Nov;198(3):343-51.
9. Yokoyama K, Kamata N, Hayashi E, Hoteiya T, Ueda N, Fujimoto R, *et al.* Reverse correlation of E-cadherin and snail expression in oral squamous cell carcinoma cells in vitro. *Oral Oncol*, 2001 Jan;37(1):65-71.
10. Mahomed F, Altini M, Meer S. Altered E-cadherin/ $\beta$ -catenin expression in oral squamous carcinoma with and without nodal metastasis. *Oral Dis*, 2007 July;13(4):386-92.

11. Wang X, Zhang J, Fan M, Zhou Q, Deng H, Aisharif MJ, *et al.* The expression of E-cadherin at the invasive tumor front of oral squamous cell carcinoma: immunohistochemical and RT-PCR analysis with clinicopathological correlation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodont* 2009 Apr;107(4):547-54.
12. Raica M, Cimpean AM, Ribatti D. The role of podoplanin in tumor progression and metastasis. *Anticancer Res*, 2008 Sept-Oct;28(5B):2997-3006.
13. Foschini MP, Leonardi E, Eusebi LH, Farnedi A, Poli T, Tarsitano A, *et al.* Podoplanin and E-cadherin Expression in Preoperative Incisional Biopsies of Oral Squamous Cell Carcinoma Is Related to Lymph Node Metastases. *Int J Surg Pathol*, 2013 Abr;21(2):133-41.
14. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol*, 2009;45:309-16.
15. Johnson N, Franceschi S, Ferlay J, Ramadas K, Schmid S, McDonald DG, *et al.* Tumours of the oral cavity and oropharynx. In: Barnes L, Everson JW, Reichart P, Sidransky D. World health organization classification of tumours pathology and genetics head and neck tumours. Lyon: World Health Organization; 2005. Cap. 4, p. 164-75.
16. Borges FT, Garbin CAS, Carvalhosa AA, Castro PHS, Hidalgo LRC. Epidemiologia do câncer de boca em laboratório público do Estado de Mato Grosso, Brasil. *Cad Saúde Pú*b, 2008 set;24(9):1977-82.
17. Jones AS. Prognosis in mouth cancer: tumour factors. *Eur J Cancer. Part B, Oral Oncol*, 1994 Jan;30B(1):8-15.
18. Xie N, Wang C, Liu X, Li R, Hou J, Chen X, *et al.* Tumor *budding* correlates with occult cervical lymph node metastasis and poor prognosis in clinical early-stage tongue squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*, 2015 Jan;44(4):266-72.
19. Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma overview. *Oral Oncol*, 2009 Apr-May;45(4-5):301-8.
20. Imai T. The growth of human carcinoma. A morphological analysis. *Fukuoka Igaku Zasshi*, 1954;45:13-43.
21. Mitrovic B, Schaeffer DF, Riddell RH, Kirsch R. Tumor *budding* in colorectal carcinoma: time to take notice. *Mod Pathol*, 2012 Oct;25(10):1315-25.
22. Hase K, Shatney C, Johnson D, Trollope M, Vierra M. Prognostic value of tumor *budding* in patients with colorectal cancer. *Dis Colon Rectum*, 1993 July;36(7):627-35.

23. Kanazawa H, Mitomi H, Nishiyama Y, Kishimoto I, Fukui N, Nakamura T, *et al.* Tumour *budding* at invasive margins and outcome in colorectal cancer. *Colorectal Dis*, 2008 Jan;10(1):41-7.
24. Koike M, Kodera Y, Itoh Y, Nakayama G, Fujiwara M, Hamajima N, *et al.* Multivariate Analysis of the Pathologic Features of Esophageal Squamous Cell Cancer: Tumor *Budding* Is a Significant Independent Prognostic Factor. *Ann Surg Oncol*, 2008 July;15(7):1977-82.
25. Yamaguchi Y, Ishii G, Kojima M, Yoh K, Otsuka H, Otaki Y, *et al.* Histopathologic Features of the Tumor *Budding* in Adenocarcinoma of the Lung. Tumor *budding* as an index to predict the potential aggressiveness. *J Thorac Oncol*, 2010 Sept;5(9):1361-8.
26. Sarioglu S, Acara C, Akman FC, Dag N, Ecevit C, Ikiz AO, *et al.* Tumor *budding* as a prognostic marker in laryngeal carcinoma. *Pathol Res Pract*, 2010 Feb;206(2):88-92.
27. Almangush A, Bello IO, Keski-Säntti H, Mäkinen LK, Kauppila JH, Pukkila M, *et al.* Depth of invasion, tumor *budding*, and worst pattern of invasion: Prognostic indicators in early-stage oral tongue cancer. *Head Neck-J Sci Spec Head Neck*, 2014 June;36(6):811-18.
28. Alberts B; Johnson A; Lewis J; Raff M; Roberts K; Walter P. *Biologia molecular da célula*. 5. ed. Porto Alegre: Artmed; 2010. 1396p.
29. Stemmler MP. Cadherins in development and cancer. *Mol BioSyst*, 2008 Aug;4(8):835-50.
30. Cavallaro U, Shaffhauser B, Christofori G. Cadherins and the tumor progression: is it all in a switch? *Cancer Lett*, 2002 Feb;176(2):123-8.
31. Guarino M, Rubino B, Ballabio G. The role of epithelial-mesenchymal transition in cancer pathology. *Pathol*, 2007 June;39(3):305-18.
32. Liu LK, Jiang XY, Zhou XX, Wang DM, Song XL, Jiang HB. Upregulation of vimentin and aberrant expression of E-cadherin/beta-catenin complex in oral squamous cell carcinomas: correlation with the clinicopathological features and patient outcome. *Mod Pathol*, 2010 Feb;23(2):213-24.
33. Costa LC, Leite CF, Cardoso SV, Loyola AM, Faria PR, Souza PE, *et al.* Expression of epithelial-mesenchymal transition markers at the invasive front of oral squamous cell carcinoma. *J Appl Oral Sci*, 2015 Mar-Abr;23(2):169-78.

34. Al-Rawi MMA, Mansel RE, Jiang WG. Molecular and cellular mechanisms of lymphangiogenesis. *Eur J Surg Oncol*, 2005;31(2):117-21.
35. Wicki A, Christofori G. The potencial role of podoplanin in tumor invasion. *Br J Cancer*, 2007 Jan;96(1):1-5.
36. Kahn HJ, Marks A. A new monoclonal antibody, D2-40, for detection of lymphatic invasion in primary tumors. *Lab Invest*, 2002 Sept;82(9):1255-7.
37. Choi WW, Lewis MM, Lawson D, Yin-Goen Q, Birdsong GG, Cotsonis GA, *et al.* Angiogenic and lymphangiogenic microvessel density inbreast carcinoma: correlation with clinicopathologic parameters and VEGF-family gene expression. *Mod Pathol*, 2005 Jan;18:143-52.
38. Wetterwald A, Hoffstetter W, Cecchini MG, Lanske B, Wagner C, Fleisch H, *et al.* Characterization and clonig of the Eli antigen, a marker expressed by rat osteoblasts and osteocytes. *Bone*, 1996 Feb;8(2):125-32.
39. Breiteneder-Geleff S, Matsui K, Soleiman A, Meraner P, Poczewski H, Kalt R, *et al.* Podoplanin, novel 43-kd membrane protein of glomerular epithelial cells, is down-regulated in puromycin nephrosis. *Am J Pathol*, 1997 Oct;151(4):1141-52.
40. Schacht V, Dadras SS, Johnson LA, Jackson DG, Hong YK, Detmar M. Up-regulation of the lymphatic marker podoplanin, a mucin-type transmembrane glycoprotein, in human squamous cell carcinomas and germ cell tumors. *Am J Pathol*, 2005 Mar;166(3):913-21.
41. Kaddu S, Leinweber B. Podoplanin expression in fibrous histiocytomas and cellular neurothekeomas. *Am J Dermatopathol*, 2009;31(2):137-9.
42. Breiteneder-Geleff S, Soleiman A, Kowalski H, Horvat R, Amann G, Kriehuber E, *et al.* Angiosarcomas express mixed endothelial phenotypes of blood and lymphatic capillaries: podoplanin as a specific marker for lymphatic endothelium. *Am J Pathol*, 1999 Feb;154(2):385-94, 1999.
43. Franchi A, Gallo O, Massi D, Baroni G, Santucci M. Tumor lymphangiogenesis in head and neck squamous cell carcinoma: a morphometric study with clinical correlations. *Cancer*, 2004 Sept;101(5):973-8.
44. Dumoff KL, Chu CS, Harris EE, Holtz D, Xu X, Zhang PJ, *et al.* Low podoplanin expression in pretreatment biopsy material predicts poor prognosis in advancedstage squamous cell carcinoma of the uterine cervix treated by primary radiation. *Mod Pathol*, 2006 May;19(5):708-16.

45. Sugiura T, Inoue Y, Matsuki R, Ishii K, Takahashi M, Abe M, *et al.* VEGF-C and VEGF-D expression is correlated with lymphatic vessel density and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma: implications for use as a prognostic marker. *Int J Oncol*, 2009 Mar;34(3):673-80.
46. Evangelou E, Kyzas PA, Trikalinos TA. Comparison of the diagnostic accuracy of lymphatic endothelium markers: bayesian approach. *Mod Pathol*, 2005;18(11):1490-7.
47. Ohno F, Nakanishi H, Abe A, Seki Y, Kinoshita A, Hasegawa Y, *et al.* Regional difference in intratumoral lymphangiogenesis of oral squamous cell carcinomas evaluated by immunohistochemistry using D2-40 and podoplanin antibody: an analysis in comparison with angiogenesis. *J Oral Pathol Med*, 2007 May;36(5):281-9.
48. Kreppel M, Scheer M, Drebber U, Ritter L, Zöller JE. Impact of podoplanin expression in oral squamous cell carcinoma: clinical and histopathologic correlations. *Virchows Arch*, 2010 May;456(5):473-82.
49. Kadota K, Huang CL, Liu D, Nakashima N, Yokomise H, Ueno M, *et al.* The clinical significance of the tumor cell D2-40 immunoreactivity in non-small cell lung cancer. *Lung Cancer*, 2010 Oct;70(1):88-93.
50. Kawaguchi H, El-Naggar AK, Papadimitrakopoulou V, Ren H, Fan YH, Feng L, *et al.* Podoplanin: a novel marker for oral cancer risk in patients with oral premalignancy. *J Clin Oncol*, 2008 Jan;26(3):354-60.
51. De Vicente JC, Rodrigo JP, Rodriguez-Santamarta T, Lequerica-Fernández P, Allonca E, García-Pedrero JM. Podoplanin expression in oral leukoplakia: tumorigenic role. *Oral Oncol*, 2013 June;49(6):598-603.
52. Sousa SF, Gleber-Netto FO, Oliveira-Neto HH, Batista AC, Nogueira Guimarães Abreu MH, Aguiar MC. Lymphangiogenesis and podoplanin expression in oral squamous cell carcinoma and the associated lymph nodes. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*, 2012 Dec;20(6):588-94.
53. Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Kjaerheim A, *et al.* Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. *J Pathol*, 1992 Apr;166(4):375-81.
54. Yamamoto E, Kohama G, Sunakawa H, Iwai M, Hiratsuka H. Mode of invasion, bleomycin sensitivity, and clinical course in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer*, 1983 June;51(12):2175-80.

55. Zlobec I, Borner M, Lugli A, Inderbitzin D. Role of intra- and peritumoral *budding* in the interdisciplinary management of rectal cancer patients. *Int J Surg Oncol*, 2012;2012:795945.
56. Jakobsson PA, Eneroth CM, Killander D, Moberger G, Mårtensson B. Histologic classification and grading of malignancy in carcinoma of the larynx. *Acta Radiol Ther Phys Biol*, 1973 Feb;12(1):1-8.

**ANEXO A - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG**

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 35575414.7.0000.5149

Interessado(a): **Profa. Maria Cássia Ferreira de Aguiar**  
Departamento de Clínica, Patologia e  
Cirurgia Odontológicas  
Faculdade de Odontologia - UFMG

**DECISÃO**

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 24 de novembro de 2014, o projeto de pesquisa intitulado **"Avaliação imunoistoquímica das proteínas Caderina-E e Podoplanina no carcinoma de células escamosas de boca e sua associação com o budding tumoral"**.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto através da Plataforma Brasil.

Profa. Dra. Telma Campos Medeiros Lorentz  
Coordenadora do COEP-UFMG

## ANEXO B - Dados clinicopatológicos completos dos casos estudados

Nº	IDADE	SEXO	LOCALIZAÇÃO	TNM	Gradação Histológica
1	70	F	Palato mole e língua	T2N0M0	Bem diferenciado
2	65	M	Palato mole direito e orofaringe		Bem diferenciado
3	75	M	Bordo lateral de língua		Bem diferenciado
4	44	M	Mucosa de palato mole, uvula e orofaringe	T4N0M0	Bem diferenciado
5	65	M	Soalho de língua, lado direito	T3N2M0	Bem diferenciado
6	69	M	Lábio inferior lado esquerdo		Bem diferenciado
7	90	M	Borda lateral esquerda de língua		Bem diferenciado
8	78	M	Bordo lateral de língua	T2N2M0	Mal diferenciado
9	51	M	Bordo lateral de língua direita	T4N0M0	Mal diferenciado
10	58	F	Bordo lateral de língua		Bem diferenciado
11	58	M	Assoalho bucal lado esquerdo, região do 33		Bem diferenciado
12	51	F	Bordo e ventre de língua		Bem diferenciado
13	57	M	Assoalho bucal lado direito	T3N1M0	Mal diferenciado
14	54	M	Assoalho bucal	T1N0M0	Mal diferenciado
15	67	M	Assoalho bucal		Bem diferenciado
16	86	M	Rebordo alveolar		Mal diferenciado
17	58	M	Trígono retromolar		Mal diferenciado
18	69	F	Rebordo alveolar inferior do lado esquerdo	T2N0M0	Mal diferenciado
19	71	M	Borda lateral esquerda de língua		Bem diferenciado
20	56	F	Bordo lateral de língua	T4N2M0	Bem diferenciado
21	54	M	Bordo lateral de língua		Mal diferenciado
22	52	M	Trígono retromolar esquerdo se estendendo para orofaringe	T3N0M0	Bem diferenciado
23	64	M	Assoalho bucal		Bem diferenciado
24	60	M	Trígono retromolar esquerdo se estendendo para orofaringe		Mal diferenciado
25	59	M	Bordo lateral de língua	T2N0M0	Bem diferenciado
26	80	M	Bordo lateral de língua		Bem diferenciado
27	44	M	Rebordo de língua		Mal diferenciado
28	48	M	Rebordo alveolar inferior		Bem diferenciado
29	52	M	Bordo lateral direito e base de língua		Bem diferenciado
30	50	M	Soalho bucal direito se estendendo para rebordo alveolar direito e região vestibular	T2N2M0	Mal diferenciado
31	56	M	Rebordo alveolar posterior		Bem diferenciado
32	56	M	Borda da língua posterior direita		Bem diferenciado
33	51	F	Ventre lingual		Bem diferenciado
34	56	M	Borda lateral de língua direita, região posterior		Bem diferenciado
35	77	M	Bordo lateral de língua esquerda	T2N1M0	Bem diferenciado
36	58	M	Borda lateral de língua lado direito		Mal diferenciado
37	59	M	Ventre lingual, 1/3 médio, lado esquerdo	T3N0M0	Bem diferenciado
38	46	M	Borda lateral de língua esquerda		Mal diferenciado
39	38	F	Borda de língua direita	T3N1M0	Bem diferenciado
40	75	F	Rebordo alveolar inferior		Bem diferenciado
41	62	F	Região posterior da mucosa jugal, palato mole, estendendo-se à orofaringe		Mal diferenciado
42	68	F	Região posterior do rebordo alveolar inferior direito		Bem diferenciado
43	49	F	Borda lateral de língua direita		Bem diferenciado
44	57	F	Bordo lateral de língua		Bem diferenciado
45	49	M	Bordo lateral de língua direita	T4N2M0	Bem diferenciado
46	56	M	Assoalho bucal		Bem diferenciado
47	67	M	Bordo esquerdo de língua	T4N2M0	Bem diferenciado
48	65	M	Assoalho bucal		Mal diferenciado
49	52	M	Lábio inferior lado esquerdo		Bem diferenciado
50	80	M	Bordo lateral de língua		Bem diferenciado
51	43	M	Mucosa jugal do lado direito		Bem diferenciado
52	71	M	Borda lateral de língua posterior, lado esquerdo	T1N0M0	Mal diferenciado
53	42	M	Borda de língua	T4N3M0	Bem diferenciado
54	63	M	Rebordo alveolar		Mal diferenciado
55	71	M	Assoalho bucal		Bem diferenciado
56	65	M	Palato mole		Bem diferenciado

### **ANEXO C - Produção científica realizada durante o Mestrado**

- **XII Encontro de Pesquisa da Faculdade de Odontologia da UFMG – 08 a 10/05/2014**
  - ✓ Apresentação do pôster intitulado: Avaliação imunoistoquímica de marcadores da transição epitélio mesênquima no fronte de invasão do carcinoma de células escamosas de boca. Autores: Camila Ferreira Leite\*, Liana Cristina Melo Carneiro Costa, Sérgio Vitorino Cardoso, Adriano Mota Loyola, Paulo Rogério de Faria, Paulo Eduardo Alencar Souza, Martinho Campolina Rebello Horta.  
Local: Belo Horizonte – Minas Gerais.
  
- **XXII Congresso Brasileiro de Estomatologia e Patologia Oral – 23 a 26/07/2014**
  - ✓ Apresentação do pôster intitulado: Mucosal Leishmaniosis. Autores: Camila Ferreira Leite\*, Renata Gonçalves Resende, Júlio César Tanos de Lacerda, Aline Fernanda Cruz, Maria Cássia Ferreira de Aguiar.  
Local: Campina Grande – Paraíba.
  
- **XXI Jornada Mineira De Estomatologia – 20 a 22/08/2014**
  - ✓ Co-autoria e participação no pôster intitulado: Sífilis Secundária: Manifestação Oral. Autores: Kelvin Marques Miguel, Camila Ferreira Leite, Ricardo Alves Mesquita, Wagner Henriques Castro, Tarcília Aparecida da Silva.  
Local: UninCor - Campus Belo Horizonte – Minas Gerais.
  
- **IV Reunião Brasileira de Patologia Oral Digital – 6 e 7/11/2014**
  - ✓ Apresentação oral do trabalho intitulado: Xantoma primário. Autores: Camila Ferreira Leite\*, Tarcília Aparecida da Silva, Ricardo Alves de Mesquita.  
Local: Rio de Janeiro – Rio de Janeiro.

- **Artigos publicados em periódicos internacionais**

- ✓ MARANGON JUNIOR, HELVÉCIO; ROCHA, VALÉRIA NAZARÉ; LEITE, CAMILA FERREIRA; DE AGUIAR, MARIA CÁSSIA FERREIRA; SOUZA, PAULO EDUARDO ALENCAR; HORTA, MARTINHO CAMPOLINA REBELLO. Laminin-5 gamma 2 chain expression is associated with intensity of tumor *budding* and density of stromal myofibroblasts in oral squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, v. 43, p. 199-204, 2014.
- ✓ COSTA, LIANA CRISTINA MELO CARNEIRO; LEITE, CAMILA FERREIRA; CARDOSO, SÉRGIO VITORINO; LOYOLA, ADRIANO MOTA; FARIA, PAULO ROGÉRIO DE; SOUZA, PAULO EDUARDO ALENCAR; HORTA, MARTINHO CAMPOLINA REBELLO. Expression of epithelial-mesenchymal transition markers at the invasive front of oral squamous cell carcinoma. *Journal of Applied Oral Science (Online)*, v. 23, p. 169-178, 2015.