



**CAROLINA CARNEIRO SOARES MACEDO**

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS  
EM ILHAS NEOPLÁSICAS GRANDES E PEQUENAS POR  
ESPECTROMETRIA DE MASSAS BASEADA EM  
PROTEÔMICA E SUA RELAÇÃO COM O PROGNÓSTICO**

**Piracicaba  
2015**





Universidade Estadual de Campinas  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba

CAROLINA CARNEIRO SOARES MACEDO

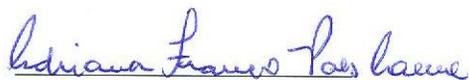
**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DIFERENCIAL DE PROTEÍNAS EM  
ILHAS NEOPLÁSICAS GRANDES E PEQUENAS POR  
ESPECTROMETRIA DE MASSAS BASEADA EM PROTEÔMICA E  
SUA RELAÇÃO COM O PROGNÓSTICO**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Mestra em Estomatopatologia, na Área de Concentração Patologia.

Orientadora: Profa. Dra. Adriana Franco Paes Leme

Co-orientador: Prof. Dr. Ricardo Della Coletta

Este exemplar corresponde à versão final da dissertação defendida por Carolina Carneiro Soares Macedo e orientada pela Profa. Dra. Adriana Franco Paes Leme.

  
Assinatura da Orientadora

Piracicaba  
2015

Agência de fomento: FAPESP  
Nº processo: 2014/02288-4

Ficha catalográfica  
Universidade Estadual de Campinas  
Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Piracicaba  
Marilene Girello - CRB 8/6159

M151a Macedo, Carolina Carneiro Soares, 1989-  
Análise da expressão diferencial de proteínas em ilhas neoplásicas grandes e pequenas por espectrometria de massas baseada em proteômica e sua relação com o prognóstico / Carolina Carneiro Soares Macedo. – Piracicaba, SP : [s.n.], 2015.

Orientador: Adriana Franco Paes Leme.

Coorientador: Ricardo Della Coletta.

Dissertação (mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Carcinoma de células escamosas. 2. Microdissecção e captura a laser. 3. Proteômica. 4. Espectrometria de massas. I. Leme, Adriana Franco Paes. II. Della Coletta, Ricardo, 1972-. III. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. IV. Título.

#### Informações para Biblioteca Digital

**Titulo em outro idioma:** Analysis of differential protein expression in large and small neoplastic islands by mass spectrometry based proteomics and its relationship with prognosis

**Palavras-chave em inglês:**

Carcinoma, squamous cell

Laser capture microdissection

Proteomics

Mass spectrometry

**Área de concentração:** Patologia

**Titulação:** Mestra em Estomatopatologia

**Banca examinadora:**

Adriana Franco Paes Leme [Orientador]

Eloiza Helena Tajara da Silva

Marcelo Rocha Marques

**Data de defesa:** 30-07-2015

**Programa de Pós-Graduação:** Estomatopatologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS  
Faculdade de Odontologia de Piracicaba



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de Mestrado, em sessão pública realizada em 30 de Julho de 2015, considerou a candidata CAROLINA CARNEIRO SOARES MACEDO aprovada.

Handwritten signature of Adriana Franco Paes Leme in blue ink.

---

Profa. Dra. ADRIANA FRANCO PAES LEME

Handwritten signature of Eloiza Helena Tajara da Silva in blue ink.

---

Profa. Dra. ELOIZA HELENA TAJARA DA SILVA

Handwritten signature of Marcelo Rocha Marques in blue ink.

---

Prof. Dr. MARCELO ROCHA MARQUES



## RESUMO

O carcinoma espinocelular oral (CEC) é o tipo de neoplasia maligna mais comum em cabeça e pescoço, com alta prevalência e morbidade. O tratamento é baseado em sistemas de classificação pouco precisos e o prognóstico é ruim em muitos casos. Diferentes padrões histológicos já foram descritos na tentativa de melhor compreender o curso da doença, prever prognóstico e auxiliar no tratamento. As diferentes áreas do tumor apresentam características morfológicas e moleculares distintas resultando em comportamentos clínicos específicos, e estudos recentes apontam a região de invasão tumoral (do inglês *invasive front tumor*) como área de interesse para análises de perfil molecular e identificação de possíveis marcadores de prognóstico. O padrão de invasão neoplásico tem relação com a agressividade tumoral e a presença de ilhas no fronte invasivo já foi descrita como pior padrão. Assim, o objetivo desta dissertação foi comparar a composição diferencial de proteínas totais de ilhas neoplásicas grandes e pequenas do fronte e do interior do tumor, e correlacionar essas proteínas com o prognóstico. A proteômica foi associada à microdissecção a laser (ML), consideradas juntas como ferramentas de alta robustez para identificação de proteínas em tecidos neoplásicos em regiões específicas. Vinte peças cirúrgicas de CEC oral de língua fixadas em parafina foram submetidas a ML para obtenção das amostras compostas pelas seguintes regiões do tecido: 1) ilhas neoplásicas grandes da região frontal, 2) ilhas neoplásicas pequenas da região frontal, 3) ilhas neoplásicas grandes do interior do tumor e 4) ilhas neoplásicas pequenas do interior do tumor, seguida pela extração de proteínas e análise por cromatografia líquida acoplada à espectrometria de massas (LC-MS/MS). A anotação funcional das proteínas e a correlação aos dados clínico-patológicos dos pacientes foram realizadas. Foram identificadas 1906 proteínas totais, sendo 1480 proteínas comuns entre as quatro regiões estudadas. Duas proteínas foram exclusivas nas ilhas grandes do fronte e sete nas ilhas grandes do interior. Oitenta e cinco proteínas foram diferencialmente expressas entre a região do fronte e o interior tumoral, e destas, 57 foram relacionadas a dados clínico-patológicos importantes para o prognóstico. Os processos biológicos, como desenvolvimento da epiderme, adesão celular, apoptose, ciclo celular, degradação da matriz extracelular e expressão gênica, evidenciados entre as proteínas diferencialmente expressas confirmam as mudanças

moleculares associadas à progressão neoplásica. A combinação de ML, MS e bioinformática foi capaz de identificar um painel de proteínas que podem auxiliar a desvendar o curso do CEC oral, predizendo agressividade e prognóstico. Em acréscimo, essa abordagem pode ajudar ainda na compreensão das diferenças e dos mecanismos de sinalização entre diferentes áreas do tecido neoplásico.

**Palavras-chave:** Carcinoma de Células Escamosas. Microdissecção e Captura a Laser. Proteômica. Espectrometria de Massas.

## ABSTRACT

Oral squamous cell carcinoma (SCC) is the most common type of malignant tumor in head and neck, with high prevalence and morbidity. Treatment is based on inaccurate classification systems and the prognosis is poor in many cases. Different histological patterns have been described in an attempt to better understand the course of the disease, predict prognosis and assist in treatment. Different areas of the tumor have different morphological and molecular characteristics resulting in specific clinical behaviors, and recent studies point to the region of tumor invasion as an area of interest for molecular profile analysis and identification of possible prognostic markers. The pattern of neoplastic invasion is related to tumor aggressiveness and the presence of islands in the invasive front has been described as worst invasion pattern. The objective of this work was to compare the protein differential expression of large and small islands neoplastic from the front and the inner tumor, and to correlate these proteins with prognosis. Proteomics was associated with laser microdissection (ML), and together they are considered robustness tools to identify proteins in neoplastic tissues in specific regions of interest. Twenty surgical specimens of oral tongue SCC fixed in paraffin were subjected to ML to obtain sample composed by the following regions of tissue: 1) large neoplastic frontal islands, 2) small neoplastic islands of the frontal region, 3) large neoplastic islands inside the tumor and 4) small islands within the neoplastic tumor, followed by extraction and analysis of proteins by liquid chromatography coupled to mass spectrometry (LC-MS/MS). The functional annotation of proteins and correlation with clinicopathological data from patients were performed. A total of 1906 proteins were identified, with 1480 common proteins between the four regions studied. Two proteins were exclusives in the large islands of the forehead and seven in large islands in the interior. Eighty-five proteins were differentially expressed between the front region and inner tumor, and of these, 57 were related to clinical and pathological data. The biological processes such as development of the epidermis, cell adhesion, apoptosis, cell cycle, disassembly of the extracellular matrix and gene expression, evidenced among the differentially expressed proteins confirmed the molecular changes associated with neoplastic progression. The combination of ML, MS,

and bioinformatics was able to identify a panel of proteins that may help to unravel the course of oral SCC, predicting aggressiveness and prognosis. In addition, this approach may also help in understanding the differences and signaling mechanisms between different areas of the tumor tissue.

**Key Words:** Oral Squamous Cell Carcinoma. Laser Capture Microdissection. Proteomics. Mass Spectrometry.

## SUMÁRIO

DEDICATÓRIA.....	xiii
AGRADECIMENTOS.....	xv
AGRADECIMENTOS ESPECIAIS.....	xvii
LISTA DE ILUSTRAÇÕES.....	xxi
1 INTRODUÇÃO.....	1
2 REVISÃO DE LITERATURA.....	3
2.1 Carcinoma espinocelular oral.....	3
2.1.1 Patogênese.....	5
2.1.2 Tratamento, prognóstico e sobrevida.....	6
2.1.3 Sistemas de classificação histológica em CEC oral.....	10
2.1.4 Região de frente invasivo tumoral.....	12
2.2 Alvos terapêuticos e marcadores de prognóstico em CEC oral.....	13
2.3 Proteômica na abordagem do câncer oral.....	14
2.4 Espectrometria de massas baseada em proteômica.....	14
2.5 Associação de microdissecção a laser e espectrometria de massas na abordagem proteômica de tecidos embebidos em parafina e fixados em formalina.....	16
3 PROPOSIÇÃO.....	19
3.1 Objetivo Geral.....	19
3.2 Objetivos específicos.....	19
4 MATERIAL E MÉTODOS.....	20
4.1 Aprovação Comitê de Ética.....	20
4.2 Amostras e Dados Clínico-patológicos.....	20
4.3 Preparação das amostras e microdissecção a laser (ML).....	24
4.4 Preparação das amostras teciduais para espectrometria de massas (MS).....	27
4.5 Análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS).....	28
4.6 Análise dos dados brutos – estatística e bioinformática.....	28
5 RESULTADOS.....	31

6	DISCUSSÃO.....	44
6.1	A eficiência da associação de ML e MS na abordagem proteômica das diferentes regiões tumorais do CEC oral de língua.....	44
6.2	Proteínas exclusivas e proteínas diferencialmente expressas evidenciadas nas diferentes regiões tumorais de CEC oral de língua.....	46
6.3	Proteômica das regiões de frente versus interior tumoral e sua relação com o prognóstico.....	50
7	CONCLUSÃO.....	56
	REFERÊNCIAS.....	57
	ANEXO 1.....	66

## DEDICATÓRIA

À minha mãe, Rosane Carneiro Soares.  
Ao meu pai, Ricardo Carlyle de Aguiar Macedo (*in memoriam*)

*“Tudo tem o seu tempo determinado, e há tempo para todo o propósito  
debaixo do céu.”  
(Eclesiastes 3:1).*



## AGRADECIMENTOS

À **Faculdade de Odontologia de Piracicaba FOP/UNICAMP**, na pessoa do seu diretor **Dr. Guilherme Elias Pessanha Henriques**.

À **Profa. Dra. Cíntia Pereira Machado Tabchoury**, coordenadora do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba – UNICAMP.

Aos professores do **Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia** da **FOP/UNICAMP**, na pessoa do seu coordenador **Prof. Dr. Alan Roger dos Santos Silva**.

À **CAPES** pela concessão de bolsa de mestrado nos primeiros meses de pós-graduação.

À **FAPESP** pelo financeiro através da concessão de bolsa com reserva técnica no processo 2014/02288-4.



## AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

À **Profa. Dra. Adriana Franco Paes Leme** pela orientação, amizade e conhecimento compartilhado. Muito obrigada por ensinar, incentivar e inspirar os seus alunos. É muito gratificante aprender ao seu lado e com o seu exemplo.

Ao **Prof. Dr. Ricardo Della Coletta** pela co-orientação, convivência, competência e ensinamentos. Obrigada pela oportunidade de aprender e por confiar no meu trabalho.

Aos professores do **Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia da FOP/UNICAMP**.

Aos meus amigos de pós-graduação que se me acompanharam nesta jornada. À **Marcondes Sena Filho**, meu primeiro amigo aqui, obrigada pela amizade, por dividir comigo o seu conhecimento, por me amparar sempre, nos melhores e piores momentos. Ao meu irmão de coração **Maurício Dourado**, obrigada pela amizade, por me acompanhar desde a graduação, pelas conversas e por fazer de Piracicaba um pedacinho de Minas. À **Elisabete Bagordakis** obrigada por ser uma amiga tão maravilhosa e estar do meu lado sempre. À **família Messetti** por ser um porto seguro nestes anos longe de casa, obrigada **Ana Camila, Marcelo e Valentina**. À **Raiza, Renata e Camila**, minha turma de mestrado, obrigada por compartilharem comigo esses anos. Ao meu querido amigo **Wilfredo**, obrigada por *compartir* comigo a sua casa e as suas coisas, obrigada pela amizade e ensinamentos. Aos queridos **Vinícius, José Laurentino, Felipe, Priscila Diniz, Leonardo, Mariana, Elisa, Wagner, Rebeca, Diego, Débora, César, Celeste, Ciro, Alicia, Marisol, Florence, Patrícia, Priscila Campioni, Luciana, Fernanda, Renato, Sibele e Estevão**. Obrigada por dividirem comigo as alegrias e desafios da pós-graduação, por preencherem meu dia a dia de alegria, cumplicidade e aprendizagem. Obrigada por me acolherem como família!

À **Dra. Nilva Cervigne** por ser meu exemplo, por me ensinar tanto, por me encorajar. Obrigada pela amizade, pela sinceridade e pelo carinho.

À **Dra. Carine Ervolino** obrigada pela amizade, por cuidar tanto de mim, por se preocupar com a minha vida na FOP e fora dela, por me guiar desde o primeiro momento. Obrigada por ter escolhido Patologia Oral e me inspirar tanto!

Aos funcionários e ex-funcionários do departamento de Diagnóstico Oral, **Geovania, Luana, Fabiana, João, Fábio, Emílio e Adriano**, pelo convívio, ensinamentos e amizade.

Ao **Laboratório Nacional de Biociências – LNBio**, na pessoa do seu diretor **Dr. Kleber Gomes Franchini**.

Aos meus queridos amigos do **Laboratório de Espectrometria de Massas no LNBio**, **Flávia Zandonadi, Rebeca, Daniela, Rute, Johhanna, Tatiane, Flávia**. Obrigada por toda ajuda e amizade. À **Sami** pelo acolhimento e conhecimentos compartilhados. À **Bianca Pauletti** pelo carinho e ajuda nas análises. À **Carolina Carnielli** por dividir comigo um grande projeto, por me ensinar proteômica e bioinformática, pela ajuda, pelo carinho e solicitude. À **Romênia Domingues** por me apresentar o Orbitrap, por construir uma amizade linda, pelo apoio, pelas ajudas, pelas conversas e alegria. É muito gratificante conviver e aprender com vocês!

À **Profa. Dra. Gabriela Meirelles** pela parceria e ajuda nas análises de bioinformática.

Ao **Centro de Energia Nuclear na Agricultura – CENA, USP**, na pessoa de sua diretora **Profa. Dra. Tsai Siu Mui**, pelo uso do equipamento de microdissecção a laser. Aos queridos **Gustavo e Marina** pela ajuda na fase de microdissecção.

Ao programa de **Pós-graduação em Patologia Oral da Universidade Federal do Rio Grande do Norte – UFRN**, na pessoa de sua coordenadora **Profa. Dra. Lélia Batista de Souza**, obrigada pela oportunidade de aprender. À querida **Profa. Dra. Márcia Miguel** por me acompanhar no início do mestrado e pela amizade estabelecida. Aos amigos de Natal, **Bárbara, Ana Luiza, Thalita, Leórick, Jefferson, Luiz Arthur, Mara, Angélica, Amanda, Hugo, Eduardo, Maria Luiza**. Obrigada por dividirem comigo dias de muita aprendizagem e obrigada pela convivência maravilhosa.

À **Universidade Estadual de Montes Claros UNIMONTES**, na pessoa do seu reitor **Dr. João dos Reis Canela**, pela minha formação como cirurgiã-dentista.

À minha amiga e eterna orientadora **Profa. Dra. Desirée S'Antana Haikal** por me encantar pela pesquisa, ensinar, e apoiar; pelas inúmeras conversas e cumplicidade. Obrigada por fazer parte das minhas conquistas. Ao querido **Prof. Dr. Alfredo Maurício Batista de Paula** por me apresentar à Patologia e me mostrar que é na conclusão da graduação que tudo começa. Obrigada por apoiarem a minha escolha pela pós-graduação.

À **Profa. Dra. Livia Máris Ribeiro Paranaíba** pela amizade, suporte e principalmente por ter acreditado em mim antes mesmo que eu acreditasse e por me encorajar a fazer pós-graduação em Estomatopatologia na **FOP/UNICAMP**. Ao **Prof. Dr. Hercílio Martelli Júnior**, pelo exemplo, amizade e apoio.

Aos meus queridos professores **Dra. Andrea Maria Eleutério de Barros Lima Martins, Dr. Luis Nogueira, Dr. Mário Melo, Dra. Sabina Pêgo, Dr. André Sena Guimarães, Dr. André Luís Faria e Silva, Dr. Robertson Carvalho Batista e Dr. Manoel Brito Júnior**, por serem meus exemplos de mestres e pelos ensinamentos em Odontologia

Aos meus amigos da graduação em Odontologia, **Amanda Alves, Priscila Almeida, Pedro Emílio, Hiram Silveira, Patrícia Souza, Priscila Leocádio, Guilherme Passos, Maílson Eleutério, Cláudia Rabelo, André Fagundes**.

Ao **Colégio Berlaar Imaculada Conceição**, na pessoa de sua diretora **Irmã Leda**, pela minha formação escolar básica e por minha formação espiritual.

Aos meus amigos do colégio que compartilham comigo a vida e estão presentes desde sempre, **Priscilla Lessa, Mariana Giovannini, Virgínia Ribeiro, Débora Freitas, Emuriela Dourado, Ana Carolina Ferreira, Gil Tolentino, Tiago Dias, Flávia Barros, Felipe Mendes, Jaísa Arruda, Carlos Viriato, André Leopoldo, Bruna Maia**. Obrigada por se fazerem presentes mesmo na distância. Aos meus **amigos da 4ª série** e à **eterna 8ªD**, obrigada por serem a minha memória mais linda do colégio. E a **João Henrigue**, nosso eterno anjo.

Aos amigos das cidades **Capitão Enéas, Patis, Santa Fé de Minas, MG**. Obrigada por dividirem comigo as alegrias e dificuldades do início da minha vida profissional.

À família **Carneiro Soares** pela alegria, pela força e pelas orações.

À minha família, base da minha vida, força e esteio. Obrigada à minha mãe **Rosane** por ser a melhor pessoa que eu conheço e permitir que eu seguisse os meus sonhos. Às minhas irmãs **Camila** e **Carla**, pelo amor e amizade. Ao meu pai **Ricardo**, por sempre confiar na minha caminhada. Obrigada por acreditarem em mim e me amarem com gratuidade.

À Piracicaba por me proporcionar uma nova vida e às pessoas especiais que conheci aqui, **Dona Leni, Dona Ana, Sr.Samuel, Luana e Jakob**.

Ao meu bom **Deus**, pela vida.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1** - Fotomicrografia de corte histológico de CEC oral de língua evidenciando a região de frente invasivo e a região de interior tumoral, ambas com profundidade de 1mm, como indicado na figura. Em A, detalhe do frente invasivo e em B, detalhe do interior tumoral. \_\_\_\_\_ 22
- Figura 2** - Fotomicrografia de detalhe do frente invasivo tumoral de CEC oral de língua com padrão de invasão em ilhas pequenas (setas azuis) e grandes (setas pretas). \_\_\_\_\_ 23
- Figura 3** - Fotomicrografia do interior tumoral de CEC oral de língua evidenciando ilhas neoplásicas grandes (seta preta) e pequenas (seta azul). \_\_\_\_\_ 24
- Figura 4** - Sequência de ML na região de frente invasivo tumoral. Em A, corte histológico do frente tumoral de CEC de língua preparado para ML e corado com hematoxilina, evidenciando ilhas neoplásicas grandes e pequenas, no aumento 10x. B, mesma região da figura A mostrando as ilhas já cortadas, no aumento 10x. Em detalhe, imagens dos microtubos coletores das amostras mostrando em seu interior a presença das ilhas pequenas (C) e ilhas grandes (D) no aumento 6,3x. Cada linha representa um paciente diferente. \_\_ 26
- Figura 5** - Sequência de ML na região de interior tumoral. Em A, corte histológico do interior tumoral de CEC de língua preparado para ML e corado com hematoxilina, evidenciando ilhas neoplásicas grandes e pequenas. B, mesmo corte da figura A mostrando as ilhas já cortadas, no aumento 10x. Em detalhe, imagens dos microtubos coletores das amostras mostrando em seu interior a presença das ilhas pequenas (C) e ilhas grandes (D) no aumento de 6,3x. Cada linha representa um paciente diferente. \_\_\_\_\_ 27
- Figura 6** - Diagrama de Venn evidenciando o número de proteínas encontradas e compartilhadas entre as ilhas pequenas da região de frente invasivo, ilhas grandes da região de frente invasivo, ilhas pequenas do interior tumoral e ilhas grande do interior tumoral das amostras de CEC oral de língua deste estudo. \_\_\_\_\_ 34
- Figura 7** - Diagrama de Venn evidenciando o número de proteínas compartilhadas entre as ilhas pequenas do frente invasivo e do interior tumoral e entre as ilhas grandes do frente invasivo e interior do tumor das amostras de CEC oral de língua deste estudo. \_\_\_\_\_ 35
- Figura 8** - Associação entre as proteínas RAB10, MOB1B, FAM83H e JUP com a sobrevida livre de doença em meses. De uma maneira geral a maior expressão dessas proteínas associa-se à uma diminuição no tempo de sobrevida. \_\_\_\_\_ 41
- Figura 9** - Associação entre as proteínas DSC2, C1S, SORD e BSG com a sobrevida livre de doença em meses. De uma maneira geral a maior expressão dessas proteínas associa-se à uma diminuição no tempo de sobrevida. \_\_\_\_\_ 42
- Figura 10** - Rede de enriquecimento dos processos biológicos a partir de proteínas identificadas nas ilhas neoplásicas grandes e pequenas das regiões de frente e interior

tumoral de amostras de tecido de CEC oral fixadas e emblocadas em parafina. A rede foi construída pelo programa IIS e visualizada pelo programa Cytoscape. Nos círculos é possível visualizar as proteínas com maior abundância em vermelho e menor abundância em verde encontradas como estatisticamente significantes. As proteínas que não mudaram a expressão entre essas duas expressões estão em amarelo e as proteínas provenientes do banco de dados do IIS estão em cinza. Cada processo biológico contém pelo menos uma proteína identificada nos dados de proteômica e o valor de significância está indicado entre parênteses.

---

## 1 INTRODUÇÃO

O carcinoma espinocelular oral (CEC oral) é o tipo de neoplasia maligna mais comum na região de cabeça e pescoço, com grande incidência mundial, alta prevalência e morbidade (Siegel et al., 2015; Ferlay et al., 2010). O tratamento é baseado em sistemas de classificação clínica, como TNM (Edge e Compton, 2010) que leva em consideração o tamanho do tumor (T), a presença de metástase linfonodal (N) e a presença de metástase à distância (M), mas que tem falhado na previsão de agressividade tumoral. Apesar dos esforços realizados em pesquisa e do progresso nas estratégias de detecção e terapia, o prognóstico é bastante grave, podendo variar mesmo nas fases iniciais da doença, onde evidências mostram 20% a 40% de metástase oculta já na primeira apresentação do CEC oral (Ganly et al., 2012).

Estudos de prognóstico tentam identificar um subconjunto de pacientes que estão em um risco de evolução desfavorável, necessitando assim de um tratamento mais agressivo, como a terapia multimodal, em contrapartida com o outro subconjunto que apresenta chances aumentadas de um resultado favorável. O tratamento cirúrgico local deveria ser suficiente para os pacientes em estágio inicial da doença (T1/T2N0M0), mas a classificação do tamanho clínico da neoplasia (T1 ou T2) para CEC oral de língua inicial (N0) por si só tem falhado consistentemente na diferenciação entre os grupos em estágio inicial e avançado da doença (Keski-Säntti et al., 2007; Almangush et al., 2015). A literatura atual inclui uma série de estudos que avaliam parâmetros histomorfológicos para ajudar no prognóstico de CEC oral. O principal papel do prognóstico baseado em características histopatológicas é complementar as deficiências do sistema de estadiamento TNM para CEC oral (Brandwein-Gensler et al., 2010; Almangush et al., 2015). As classificações histológicas poderiam então ser úteis para estratificar pacientes em categorias de baixo risco e de alto risco, auxiliar no tratamento e na compreensão do curso da doença. Além disso, tais classificações podem auxiliar estudos moleculares dessas neoplasias, uma vez que células dentro do tumor e na região de frente invasivo tumoral mostram características morfológicas e moleculares distintas, resultando em comportamentos clínicos específicos (Sharma et al., 2013; Tsai e Yang, 2013). Estudos recentes apontam a região de invasão tumoral como área de interesse para análises de perfil molecular e

identificação de possíveis biomarcadores (Metwaly et al., 2012; Sharma et al., 2013; Tsai e Yang, 2013).

Os mecanismos moleculares e fatores que levam à transformação neoplásica da mucosa oral normal ainda não são bem compreendidos. Como trata-se de uma doença complexa e multifatorial, explorar as vias moleculares envolvidas neste processo é necessário para conseguir um tratamento bem sucedido, auxiliar na previsão do prognóstico e melhorar o entendimento da patogênese (Omar, 2015).

A proteômica baseada em espectrometria de massas é uma importante ferramenta em análises da biologia celular, a fim de investigar processos celulares, biomarcadores e alvos potenciais de drogas em câncer, podendo identificar milhares de proteínas em um único experimento (Chen e Pramanik, 2009; Bohnenberger et al., 2015). A análise proteômica permite avaliar a dinâmica de mudanças nos padrões de proteínas que ocorrem no tumor para melhor compreender a patogênese e contribuir para a descoberta de proteínas associadas à neoplasia (Granato et al., 2014).

Em câncer, a proteômica pode ser associada à microdissecção a laser (ML), para superar o desafio de um elevado grau de heterogeneidade celular no microambiente tumoral, devido à presença de vários tipos de células, incluindo células neoplásicas, células do sistema imunológico, células endoteliais e fibroblastos (Bohnenberger et al., 2015). Essa combinação permite alta robustez para identificação de proteínas em regiões específicas de tecidos neoplásicos.

A busca de indicadores de agressividade em áreas específicas do tumor poderia, então, antecipar o comportamento clínico do CEC oral e auxiliar no prognóstico. Além disso, considerando a alta heterogeneidade desta neoplasia associada aos diferentes comportamentos clínicos e padrões de invasão, o estudo proteômico poderia revelar vias moleculares envolvidas em cada um destes comportamentos. Estudos prévios das diferentes regiões do tumor baseiam-se apenas na análise histopatológica dos padrões de invasão (Almangush et al., 2015; Brandwein-Gensler et al., 2010; Li et al., 2013; Sawazaki-Calone et al., 2015) ou imunohistoquímica do CEC oral (Costa et al., 2015; Xie et al., 2015; Romanska et al., 2013), o que torna este estudo inédito no que se refere à robustez da técnica, individualizando as regiões de interesse com uma análise sensível e precisa, levando em consideração as características clínico-patológicas dos pacientes.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

### **2.1 Carcinoma espinocelular oral**

Em todo mundo o câncer oral é responsável por 170.000 mortes por ano, representando a sexta malignidade mais comum, 6% de todos os tumores malignos e 2% de todos os novos casos de câncer diagnosticados, com estimativa de 300 mil novos casos ao ano (Uchiyama et al., 2014; Dunkel et al., 2013; Ferlay et al., 2010; Leemans et al., 2011). Essa neoplasia representa de 3% a 5% das neoplasias malignas na maioria dos países ocidentais, podendo atingir até 10% dos casos. Além disso, o câncer oral tem sido considerado um sério e crescente problema de saúde pública em alguns países, pois geralmente é diagnosticado em estágios avançados o que acarreta um pobre prognóstico (Scully e Bagan, 2009). No Brasil é a 5ª neoplasia maligna mais comum em homens e a 11ª mais comum em mulheres, com uma média de 15.000 novos casos por ano, 11.280 casos novos em homens e 4.010 em mulheres. Tais valores correspondem um risco estimado de 11,54 casos novos a cada 100 mil homens e 3,92 a cada 100 mil mulheres (Instituto Nacional do Câncer - INCA 2014). A distribuição geográfica é variável nas diferentes regiões do mundo com distinção entre hábitos, cultura, expectativa de vida e educação preventiva (Scully e Bagan, 2009).

O carcinoma espinocelular oral (CEC oral) é a variante histopatológica mais frequente representando mais de 90% de todas as neoplasias malignas em cabeça e pescoço, e é definido como a neoplasia maligna invasiva de origem epitelial que apresenta vários graus de diferenciação escamosa, com propensão à metástase linfonodal (Scully e Bagan, 2009). Os componentes básicos desta neoplasia são: 1) parênquima, composto por células neoplásicas da camada escamosa de um epitélio oral de superfície displásico, que ditam o comportamento biológico e a nomenclatura do tumor e 2) estroma, composto por tecido conjuntivo subjacente, vasos sanguíneos, e células inflamatórias, e confere suporte para o crescimento tumoral, com importante relação de troca entre as células estromais e as células neoplásicas. Assim, histologicamente o CEC oral caracteriza-se por ilhas e cordões invasivos de células escamosas epiteliais malignas infiltrando os tecidos normais subjacentes (Sharma et al., 2013; Scully e Bagan, 2009).

O CEC oral exibe etiologia multifatorial, com a participação tanto de fatores extrínsecos quanto intrínsecos, e é provável que esteja ocorrendo a participação de mais de um fator (cocarcinogênese) em seu desenvolvimento (Petti, 2009; Scully e Bagan, 2009). Assim, os principais fatores de risco extrínsecos são o tabaco, álcool, radiação ultravioleta, além da infecção pelo papilomavírus humano (HPV) principalmente os subtipos 16 e 18, e os fatores intrínsecos que podem estar envolvidos são alterações genéticas, deficiências nutricionais e imunossupressão. É amplamente aceito que o consumo de tabaco em todas as suas formas e o uso de álcool são os fatores etiológicos mais importantes, com atividade sinérgica e dose dependente (Petti, 2009; Fulzele et al., 2013). À partir dos fatores etiológicos iniciadores, várias alterações genéticas são necessárias, podendo ser afetadas por predisposição genética e condições ambientais (Omar, 2015).

O perfil epidemiológico clássico dos pacientes com esta condição trata-se de homens da quinta a oitava décadas de vida, tabagistas e etilistas crônicos. Porém, houve uma ligeira mudança nesse perfil com o aparecimento de novos casos em pacientes jovens e pacientes do sexo feminino, e alguns fatores como predisposição genética e HPV estão sendo fortemente associados ao CEC oral nesses pacientes, além da mudança do hábito tabagista entre as mulheres (Fakhry e D'Souza, 2013; Túri et al., 2013).

Os principais locais de acometimento são língua, lábios e assoalho da boca (Scully e Bagan, 2009). Mas também pode acometer a mucosa de revestimento do trígono retromolar, mucosa jugal, mucosas alveolares e palato. O CEC oral tem uma apresentação clínica variada que depende da localização e extensão do tumor e pode incluir as seguintes manifestações: exofítica (formação de aumento de volume vegetante, papilar, verruciforme), endofítica (invasiva escavada, ulcerada), leucoplásica (mancha branca), eritroplásica (mancha vermelha), eritroleucoplásica (combinação de áreas vermelhas e brancas) (Scully e Bagan, 2009). Os aspectos imaginológicos incluem destruição do osso subjacente em “roído por traças”, com margem desiguais e mal definidas, e uma aparência semelhante à osteomielite, com presença de dentes em flutuação.

A disseminação ocorre por invasão de estruturas adjacentes, como musculatura profunda da língua, musculatura pterigóidea, mandíbula, maxila, laringe, hipofaringe, nasofaringe e por via linfática. As metástases à distância não são muito frequentes em estágios iniciais, mas podem ocorrer, e os locais mais comuns são pulmão, ossos e fígado,

que devem ser investigados principalmente em casos de recidiva ou doença avançada (Noguti et al., 2012). A prevenção depende de se evitar os fatores de risco e o diagnóstico precoce é de suma importância para o manejo dos pacientes com CEC oral e está relacionado à um melhor prognóstico (Petersen, 2009). A microscopia na maioria dos casos é suficiente para o diagnóstico histológico. O diagnóstico clínico é então feito através da investigação de uma lesão com suspeita de malignidade, levando-se em consideração o histórico médico do paciente, realização de exame físico de cabeça e pescoço e biópsia incisional (Omar, 2015).

### **2.1.1 Patogênese**

O CEC oral é uma doença heterogênea, tanto a nível molecular quanto a nível clínico (Leemans et al., 2011). Origina-se a partir do acúmulo de certo número de eventos genéticos discretos que levam ao câncer invasivo. Essas alterações ocorrem nos genes que codificam proteínas que controlam o ciclo celular, a sobrevivência celular, a motilidade celular e a angiogênese. Cada mutação genética oferece uma vantagem de crescimento seletiva, permitindo a expansão clonal de células mutantes com o potencial maligno aumentado. Assim eventos genéticos nos oncogenes e genes supressores de tumor como mutação, amplificação ou inativação, levam a perda do controle do ciclo celular, proliferação aumentada e apoptose reduzida, além da aquisição de motilidade celular tumoral aumentada propiciando invasão e metástase (Sinha et al., 2013). A progressão tumoral é caracterizada por um desequilíbrio entre a proliferação celular e a apoptose (Kato et al., 2011).

Embora a sequência precisa e o número de eventos necessário para carcinogênese permaneça desconhecida, a compreensão da mesma pode ajudar no desenvolvimento de métodos mais eficazes para o diagnóstico e tratamento. A recente série de experiências executadas por Hanahan e Weinberg, (2011) demonstraram que os seis passos importantes a seguir são provavelmente necessários para desenvolvimento neoplásico: 1) aquisição de sinalização proliferativa autônoma; 2) inibição dos sinais inibidores de crescimento; 3) a evasão da morte celular programada; 4) imortalização; 5)

aquisição de um fornecimento de sangue (angiogênese); e 6) aquisição da capacidade de invadir tecidos (invasão).

No caminho para a malignização o epitélio oral passa por diferentes estágios de progressão, como hiperplasia, graus de displasia até desenvolver a carcinoma in situ e carcinoma invasivo. Origina-se do epitélio normal e pode estar associado à presença ou não de lesões potencialmente malignizáveis como leucoplasia, eritroplasia ou leucoeritroplasias (Scully e Bagan, 2009). Uma das características principais que parecem preceder o início dos tumores malignos é a displasia epitelial, um termo histológico que descreve a combinação da maturação desordenada e distúrbio da proliferação celular (Scully e Bagan, 2009). As alterações atípicas que podem estar presentes no epitélio displásico são quereatinização intrepitelial, aumento da atividade mitótica, perda de estratificação do epitélio, perda da polaridade, pleomorfismo celular e nuclear, mitoses atípicas (Barnes et al., 2005).

As leucoplasias desenvolvem-se em 1-4% da população. A transformação maligna é bastante imprevisível e pode desenvolver-se em 1-40% das leucoplasias em cinco anos. As lesões displásicas sob a forma de eritroplasia implicam um risco de 90% de conversão maligna. A detecção do tumor é ainda mais complicada por uma tendência de campo cancerização, levando a lesões multicêntricas, todas as quais podem não ser clinicamente visíveis (Acha et al., 2005).

### **2.1.2 Tratamento, prognóstico e sobrevida**

A escolha do tratamento para o CEC oral depende de fatores como a extensão da doença, estado geral do paciente, comorbidades, opções do paciente. Sem ressecção cirúrgica o CEC é fatal (Uchiyama et al., 2014), por isso a importância do tratamento correto. Na prática clínica, o plano de tratamento e prognóstico do CEC oral é baseado no sistema TNM (Edge e Compton, 2010), onde T é o tumor primário, N metástase em linfonodo regional e M metástase à distância (Quadros 1 e 2). Quando em estágio inicial (T1 e T2) são tratados com cirurgia ou radioterapia e têm um prognóstico favorável. Lesões extensas requerem uma maior ressecção, esvaziamento linfático e reconstrução de tecidos, radioterapia pós-operatória e/ou quimioterapia (Dunkel et al., 2013; Uchiyama et al., 2014).

Em grandes ressecções a margem cirúrgica com frequência impede a manutenção de função oral. Enquanto é amplamente aceito que os tumores avançados sejam tratados com dissecação cervical eletiva, a gestão dos tumores em estágio inicial permanece controversa (Noguti et al., 2012). Na ausência, clinicamente, de metástase linfonodal o CEC oral em estágio inicial é muitas vezes tratado com ressecção do tumor primário e acompanhamento clínico dos linfonodos cervicais. No entanto, os estudos mostraram a incidência de metástases cervicais ocultas nas fases iniciais da doença em 20% a 40% dos casos (Ganly et al., 2012).

Portanto, os critérios para a ressecção cirúrgica precisa são necessários (Uchiyama et al., 2014), surgindo estudos de novas técnicas de tratamento (Leemans et al., 2011), com avanços na cirurgia, quimioterapia, radiação e combinação de outras técnicas (Zheng et al., 2008).

**Quadro 1 - Sistema de Estadiamento Tumor-Linfonodo-Metástase (TNM) para o CEC oral.**

<b>Tamanho do Tumor Primário (T)</b>	
<b>TX</b>	Nenhuma informação disponível sobre o tumor primário.
<b>T0</b>	Nenhuma evidência de tumor primário.
<b>Tis</b>	Somente carcinoma <i>in situ</i> no sítio primário.
<b>T1</b>	Tumor de 2 cm ou menor em seu maior diâmetro.
<b>T2</b>	Tumor maior que 2 cm, porém não maior do que 4 cm em seu maior diâmetro.
<b>T3</b>	Tumor maior que 4 cm em seu maior diâmetro.
<b>T4a</b>	(Lábio) Tumor invade através da cortical óssea, nervo alveolar inferior, soalho de boca, ou pele da face (ou seja, queixo e nariz) Tumor passível de ressecção cirúrgica.
<b>T4a</b>	(Cavidade oral) Tumor invade através da cortical óssea, para o interior da musculatura profunda extrínseca da língua (genioglosso, hioglosso, palatoglosso e estiloglosso), seio maxilar ou pele da face Tumor passível de ressecção cirúrgica.
<b>T4b</b>	Tumor envolve espaço mastigatório, lâminas do processo pterigóide ou base do crânio e/ou envolve completamente a artéria carótida interna. Tumor inoperável.
<b>Envolvimento do linfonodo regional (N)</b>	
<b>NX</b>	Linfonodos não puderam ou não foram avaliados.
<b>N0</b>	Nenhuma metástase para linfonodos regionais.
<b>N1</b>	Metástase em um único linfonodo ipsilateral, menor ou igual a 3 cm em seu maior diâmetro.
<b>N2</b>	Metástase em um único linfonodo ipsilateral, maior do que 3 cm porém menor do que 6 cm em seu maior diâmetro; múltiplos linfonodos ipsilaterais, nenhum maior do que 6 cm em seu maior diâmetro; ou linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum maior do que 6 cm em seu maior diâmetro.
<b>N2a</b>	Metástase em um único linfonodo ipsilateral, maior do que 3 cm porém menor que 6cm em seu maior diâmetro.
<b>N2b</b>	Metástase em múltiplos linfonodos ipsilaterais, nenhum maior do que 6 cm em seu maior diâmetro.
<b>N2c</b>	Metástase em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum maior do que 6 cm em seu maior diâmetro.
<b>N3</b>	N3 Metástase em um linfonodo maior do que 6 cm em seu maior diâmetro.
<b>Envolvimento por Metástase à distância (M)</b>	
<b>MX</b>	Metástase a distância não foi avaliada.
<b>M0</b>	Sem evidência de metástase à distância.
<b>M1</b>	Metástase a distância presente.

**Quadro 2** - Categorias de Estadiamento Clínico TNM para o CEC oral.

<b>Estágio</b>	<b>T</b>	<b>N</b>	<b>M</b>
I	1	0	0
II	2	0	0
III	3 1, 2 ou 3	0 1	0 0
IV			
IVA	T4a T1, T2, T3 ou T4a	0 ou 1 1	0 0
IVB	Qualquer T ou T4b	Qualquer N	0
IVC	Qualquer T	Qualquer N	1

No entanto, o avanço nas terapias e tratamentos não significou melhora no prognóstico dos pacientes. Nas últimas décadas, observa-se que a sobrevida também não melhorou consideravelmente, uma vez que os pacientes ainda desenvolvem com frequência recidiva loco-regional, metástases à distância e segundos tumores primários. (Alam et al., 2012; Leemans et al., 2011). Apenas 40-50% dos pacientes com CEC oral vão sobreviver após cinco anos (Leemans et al., 2011).

Mais de 60% dos CEC são diagnosticados tardiamente o que implica maior agressividade dessa neoplasia e tratamentos mutiladores, impactando negativamente na qualidade de vida. A dificuldade de diagnóstico em lesões incipientes e dificuldade de se prever a agressividade da doença devido aos fatores prognósticos subjetivos, deixam clara a falha na classificação desses pacientes, dos quais 10-30% sofrem recidivas após ressecção cirúrgica com margens livres de doença (Sepiashvili et al., 2012). O CEC oral está sujeito ainda, ao "fenômeno de cancerização de campo", com maior risco de desenvolvimento de um segundo tumor primário de qualquer tipo de câncer (Omar, 2015). Além da localização anatômica complexa desses tumores, um dos principais fatores responsáveis pela baixa eficácia terapêutica é um conhecimento limitado dos mecanismos moleculares que controlam o desenvolvimento da doença. Em adição, o sistema TNM não fornece informações sobre características biológicas e comportamento clínico agressivo do CEC oral (Romanska et al., 2013).

Estudos recentes sobre prognóstico em CEC oral encontraram associação estatisticamente significativa entre algumas características clinico-patológicas e histopatológicas importantes com um pior prognóstico, como o tamanho do tumor,

recorrência ou recidiva local e regional nos linfonos cervicais (Fan et al., 2011), padrão de invasão em ilhas nos tecidos subjacentes, invasão perineural, profundidade de invasão (Almangush et al., 2015; Brandwein-Gensler et al., 2010; Sawazaki-Calone et al., 2015; Xie et al., 2015), presença de infiltrado inflamatório (Brandwein-Gensler et al., 2010; Wolf et al., 2015).

### **2.1.3 Sistemas de classificação histológica em CEC oral**

O estadiamento clínico da doença com base na classificação TNM e localização do tumor são rotineiramente os principais critérios para o prognóstico e tratamento de CEC oral (Ganly et al., 2012). No entanto, as variações na resposta ao tratamento e prognóstico são altas para os CECs orais estudados, alguns pacientes apresentam tumores no mesmo local e no mesmo estágio clínico com sobrevida prolongada, enquanto outros podem morrer de metástase rapidamente. Diante disso, foi proposto que a gradação histopatológica detalhada dos tumores com sistemas específicos de pontuação histopatológicos poderia ajudar os médicos na individualização do tratamento e no prognóstico de pacientes com CEC (Almangush et al., 2015; Brandwein-Gensler et al., 2005; Bryne et al., 1992).

O primeiro sistema de classificação histopatológica de CEC foi desenvolvido por Broders em 1920 (Broders, 1920), que mais tarde foi adotado pela Organização Mundial da Saúde (OMS) (Barnes et al., 2005). Este sistema leva em conta o grau de queratinização do tumor, os níveis de pleomorfismo celular e nuclear, e presença de atividade mitótica. As lesões são gradadas em escalas de três pontos (graus I a III) ou em escalas de quatro pontos (graus I a IV). Os tumores menos diferenciados recebem maiores números. A gradação histopatológica de um tumor está de alguma forma relacionada ao seu comportamento biológico. Um tumor que é maduro o suficiente para lembrar muito bem seu tecido de origem parece crescer em uma velocidade levemente menor e metastatizar em um estágio avançado de seu curso clínico. Tal tumor é denominado CEC oral de baixo grau I ou bem diferenciado. Por outro lado um tumor com muito pleomorfismo celular e nuclear e com pouca ou nenhuma produção de ceratina provavelmente será tão imaturo que se torna difícil identificar o seu tecido de origem. Tal tumor frequentemente cresce rapidamente, metastatiza precocemente em seu curso clínico e é denominado alto grau, grau III/IV,

pobrememente diferenciado ou anaplásico. Um tumor que apresente aparência microscópica situada em algum local entre esses dois extremos é considerado como carcinoma moderadamente diferenciado (Barnes et al., 2005).

Mais tarde, foram propostos outros sistemas de classificação histopatológica de CEC oral estudados no século passado. A classificação de malignidade nas margens invasivas (MI), do inglês *deep invasive margins*, propostos por Bryne e colaboradores (Bryne et al., 1992) é um sistema que marca o grau de queratinização, polimorfismo nuclear, padrão de invasão e infiltração linfoplasmocitária somente nas áreas mais invasivas do tumor. Este sistema de classificação foi usado para prognóstico e terapêutica de CEC oral com resultados satisfatórios (Gueiros et al., 2011).

O modelo de risco histológico (RH), do inglês *histological risk*, proposto por Brandwein-Gensler et al. (2005) baseia-se na avaliação de espécimes cirúrgicos com três parâmetros histopatológicos: pior padrão de invasão (PPI), resposta linfocítica do hospedeiro (RLH), e invasão perineural (IP). Este modelo mostrou poder preditivo significativo para a recidiva e sobrevida global em CEC oral (Brandwein-Gensler et al., 2010; Li et al., 2013). De uma maneira geral, o padrão de invasão tumoral refere-se à maneira como o tumor infiltra no tecido subjacente na interface tumor/hospedeiro. É intuitivo dizer que se a invasão ocorrer de um modo disperso, com ilhas celulares ou células soltas, a neoplasia é mais agressiva do que em padrões de crescimento mais uniformes, por inteiro (Brandwein-Gensler et al., 2005). A resposta linfocitária do hospedeiro pode estar presente ao redor da neoplasia, como uma faixa contínua de células inflamatórias, como placas de células inflamatórias dispersas ou pode não estar presente. A invasão perineural, por sua vez, pode ocorrer, com presença de células e/ou ilhas neoplásicas ao longo ou dentro de um fascículo nervoso e está relacionada a um padrão mais invasivo do tumor (Brandwein-Gensler et al., 2005).

Recentemente, Almangush et al. (2015) introduziram o modelo BD, que é baseado em dois parâmetros: 1) brotamento tumoral, do inglês *tumor buddings* (B), com duas propriedades de malignidade - perda da coesão celular e ativo movimento invasivo; 2) profundidade de invasão tumoral do inglês *depth of tumor invasion* (D), em milímetros. O brotamento tumoral, definido como a presença de uma única célula neoplásica ou um pequeno grupo de <5 células neoplásicas na região de frente invasivo (Wang et., 2011),

mostrou-se associado a um alto risco de recorrência loco-regional e diminuição da sobrevida para CEC (Almangush et al., 2015). Da mesma forma, a profundidade de invasão do tumor tem sido descrito como um importante parâmetro prognóstico para CEC oral, e o ponto de corte de 4 mm mostrou uma associação com metástases em linfonodos, o marcador mais importante para a terapia e prognóstico do CEC oral (Xie et al., 2015). O modelo BD mostrou um forte potencial para identificar CECs orais agressivos (Almangush et al., 2015).

Até o momento, nenhum sistema de classificação histopatológica tem sido universalmente aceito para os CECs orais (Sawazaki-Calone et al., 2015). Os diferentes perfis histológicos do CEC poderiam estar relacionados com a agressividade do carcinoma, não apenas pelo seu padrão histomorfológico, mas também pela composição bioquímica de regiões específicas. Deixando evidente a necessidade de um estudo mais aprofundado dessas áreas, principalmente na região de frente tumoral em comparação a outras regiões do tumor.

#### **2.1.4 Região de frente invasivo tumoral**

Em 1989, Bryne já sugeria que a histologia das áreas invasivas do tumor (do inglês “*invasive front*”) eram as primeiras responsáveis pelo comportamento clínico do CEC e que isso talvez fosse importante na escolha do tratamento. Atualmente, estudos apontam a região frontal do tumor como área de interesse em análises de composição molecular e morfológica por se tratar da área que primeiramente invade os tecidos subjacentes (Almangush et al., 2015; Agarwal e Ballabh, 2013; Metwaly et al., 2012).

A região de frente invasivo tumoral é um local dinâmico fundamental na diferenciação dos tumores malignos. Na verdade, ela pode ser considerada a frente invasiva do epitélio na margem do tecido conjuntivo na transição epitelial–mesenquimal (do inglês *epithelial mesenchymal transition – EMT*). Moléculas existentes no frente invasivo tornam essa área uma forte preditora de prognóstico em comparação com outras áreas (Costa et al., 2015; Romanska et al., 2013; Kato et al., 2011). A região de frente invasivo é um ponto crítico para a resposta imunológica e inflamatória e representa o padrão de crescimento infiltrativo do tumor (Costa et al., 2015; Sharma et al., 2013; Bryne, 1992). Nesta região, o

tumor frequentemente mostra um menor grau de diferenciação e um maior grau de dissociação celular do que outras partes tumorais (Kato et al., 2011).

Tem sido bem estabelecido que cordões irregulares de células e as células individuais apresentam mais probabilidade de obter acesso ao sistema vascular e desenvolver metástases. Assim, áreas invasivas deve ser sempre o campo de estudo para alterações em CEC oral (Agarwal e Ballabh, 2013). Vários eventos moleculares de importância para a disseminação do tumor, tais como ganho e perda de moléculas de adesão, secreção de enzimas proteolíticas, aumento da proliferação celular, e iniciação de angiogênese ocorrem na interface tumor-hospedeiro. Assim, as células da região invasiva do tumor se diferem do interior tumoral, onde estes eventos estão ligadas ao risco de metástase em CEC, e o fronte invasivo tumoral pode refletir melhor o prognóstico do tumor do que outras partes (Sharma et al., 2013).

## **2.2 Alvos terapêuticos e marcadores de prognóstico em CEC oral**

Componentes identificados nos estudos moleculares de câncer fazem parte de redes complexas de interação que promovem a carcinogênese (Kreeger e Lauffenburger, 2009). Assim, a busca por alvos importantes para atividade funcional dessas redes ajuda no desenvolvimento de novas terapias. Da mesma maneira moléculas indentificadas nesses estudos, quando correlacionadas a dados clinico-patológicos dos pacientes, podem predizer agressividade e se caracterizarem como marcadores de prognóstico, ajudando a direcionar o tratamento e acompanhamento dos pacientes de maior risco (Harris et al., 2015; Lee et al., 2014; Polachini et al., 2012; Kato et al., 2011).

Várias moléculas presentes em câncer oral foram descritos e vem sendo pesquisadas atualmente. Estudos incluindo proteínas p16, p53, Bcl-2, ciclina D1 (CCND1), Cox-2, CD147, receptores de tirosina-quinase tais como, o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) e fator de crescimento vascular endotelial (VEGF); metaloproteinases de matriz (MMPs), Ki67 (marcador de proliferação), HIF-1a (marcador de hipóxia), citoqueratinas K4, K13, K14, K16 e K17, integrinas, caderinas, demostram resultados ainda inconsistentes na sua relação de predizer o câncer oral (Dunkel et al., 2013; Tung et al., 2013; Leemans et al., 2011; Shaaij-Visser et al., 2009). Embora várias estudos investiguem

marcadores ou biomarcadores diagnósticos aplicados para a detecção precoce de neoplasias orais ou para prever prognóstico, é ainda urgente a identificação de novas moléculas marcadoras tumorais (Chen et al., 2013), uma vez que nenhum deles são rotineiramente utilizados na prática clínica (Dunkel et al., 2013) e ainda não foi possível compreender a heterogeneidade dessas neoplasias.

### **2.3 Proteômica na abordagem do câncer oral**

A análise de alvos moleculares em nível celular através de um painel de amostras de tecidos normais e doentes, e da avaliação de seu significado clínico, pode fornecer informações significativas para diagnóstico de câncer, tratamento e prognóstico (Ni et al., 2015). A proteômica pode ser definida como a análise sistemática de proteínas para a sua identificação, quantificação e função, observando-se as proteínas que são diferencialmente expressas em um determinado tecido ou fluido corporal. Esta abordagem também é uma ferramenta para a identificação de marcadores de doenças (marcadores ou biomarcadores tumorais) que podem ser importantes para a detecção e diagnóstico precoce do câncer, no controle da eficácia do tratamento e preditor de agressividade (Hoeben et al., 2006).

A proteômica pode identificar milhares de proteínas que são expressas em uma amostra biológica (Chen e Pramanik, 2009; Ong e Mann, 2005), traçando o perfil proteico de determinada condição, auxiliando assim, na compreensão dos processos biológicos das células neoplásicas, por exemplo (Hoeben et al., 2006). As alterações de um conjunto de proteínas vêm sendo apontadas como mais relevantes que a identificação de uma proteína isolada, o que contribuiria assim, para traçar um perfil de expressão proteica específica da neoplasia estudada (do inglês “*protein expression signature*”) podendo servir como um indicador do processo de carcinogênese (Kreeger e Lauffenburger, 2009).

### **2.4 Espectrometria de massas baseada em proteômica**

A espectrometria de massas (MS) é uma importante ferramenta utilizada para análise da expressão de proteínas de forma qualitativa e quantitativa, como também para determinação de modificações pós-traducionais, interação proteína-proteína, entre outros.

Essa tecnologia apresenta avanços que tem contribuído no estudo sobre câncer, com forte impacto na descoberta de potenciais candidatos à biomarcadores e alvos terapêuticos (Davalieva et al., 2015; Ni et al., 2015; Fulzele et al., 2013; Tung et al., 2013; Huttenhain et al., 2012). Apresenta como objetivo avaliar em larga-escala misturas complexas de proteínas utilizando-se principalmente cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas, através da separação dos peptídeos mais comumente por hidrofobicidade seguida pela medida dos íons pela determinação da razão massa/carga ( $m/z$ ) dos mesmos (Ong e Mann, 2005).

Os experimentos proteômicos baseados em espectrometria de massas geram uma grande quantidade de dados. Em câncer, múltiplas vias interconectadas estão desreguladas, abrangendo processos celulares fundamentais, como proliferação, diferenciação, migração e morte (Kreeger e Lauffenburger, 2009). As proteínas identificadas na condição neoplásica podem estar relacionadas com uma ampla diversidade de funções biológicas, as quais podem ter um papel importante em muitos processos biológicos diferentes. Além disso, variações nos níveis de expressão da proteína podem dar indícios sobre alterações dos mecanismos celulares, tais como alterações decorrentes do desenvolvimento de processos patológicos. Assim, a simples identificação e quantificação de proteínas a partir de um proteoma de células ou de um subproteoma não é suficiente para a completa compreensão dos mecanismos complexos que ocorrem em sistemas biológicos (Carnielli et al., 2015) sendo fundamental o uso de programas computacionais para o armazenamento, busca, análise e integração do grande volume de dados gerados (Carazzolle et al., 2014). Portanto, a combinação dos dados proteômicos com a bioinformática por meio da análise de anotação funcional das proteínas é essencial para a interpretação dos resultados de proteômica de alto rendimento (Carnielli et al., 2015). A integração de dados relativos a genes e proteínas individuais auxilia na investigação do comportamento e das relações entre os diversos elementos de um sistema biológico para explicar o seu funcionamento (Carazzolle et al., 2014; Kreeger e Lauffenburger, 2009).

## **2.5 Associação de microdissecção a laser e espectrometria de massas na abordagem proteômica de tecidos embebidos em parafina e fixados em formalina**

A microdissecção à laser (ML) é uma ferramenta bem estabelecida utilizada para facilitar a obtenção de áreas de interesse, permitindo superar a questão da heterogeneidade do tecido, com aquisição de populações celulares individualizadas (Legres et al., 2014). ML permite a seleção de uma determinada região de interesse, através de um sistema de laser infravermelho para captura e de laser ultravioleta para corte acoplados a um microscópio para a obtenção da região de interesse sob observação direta (Legres et al., 2014).

As técnicas de ML podem ser aplicadas em células vivas e culturas de células, material vegetal, tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina (FFEP), tecidos frescos congelados e tecidos corados ou não corados, sendo capaz de isolar células individualmente (Datta et al., 2015). Mesmo secções de tecidos corados e arquivados podem ser microdissectados com sucesso após a remoção da lamínula (Fend e Raffeld, 2000). Os equipamentos de ML são capazes de microdissectar tecidos com variadas espessuras, porém tecidos com espessuras mais finas do que 5 $\mu$ m podem não fornecer a espessura completa das células. As secções ou cortes são recolhidos em lâminas especiais cobertas com membrans e submetidos ao protocolo de coloração seguido pela desidratação, que é um ponto crucial para minimizar força adesiva para cima entre a lâmina e o tecido. Por causa da facilidade de manuseio o microscópio de ML pode ser facilmente calibrado e ajustado. O laser de baixa potência não afeta a integridade do material genético, e após a microdissecção o material coletado pode ser utilizado para análises do perfil molecular com investigação proteômica, genômica e transcriptômica (Datta et al., 2015).

As células, ou áreas de interesse capturadas podem ser analisadas por MS para identificação de um perfil protéico (Sugihara et al., 2013; Patel et al., 2008). Essa possibilidade de estudo de regiões específicas do tecido tem sido fundamental para a sua associação com a espectrometria de massas em tandem, por permitir estudar subproteomas bem definidos (Espina et al., 2007).

A associação de ferramentas em combinação com a proteômica vem sendo amplamente utilizada para descoberta de proteínas diferencialmente expressas no CEC oral. Patel et al. (2008) utilizaram a análise proteômica, combinando ML e técnica de extração

de proteínas na identificação de novas moléculas para detecção precoce, prevenção e tratamento de CEC de cabeça e pescoço. Esse estudo detectou proteínas diferencialmente expressas no epitélio oral normal e CEC, incluindo-se citoqueratinas, marcadores de diferenciação, e proteínas envolvidas na transdução de sinal, migração, regulação do ciclo celular, crescimento e angiogênese, degradação da matriz, e proteínas com potencial de supressão de tumor e potencial oncogênico. Chen et al., (2013) utilizaram MS e *tissue array* em seu estudo com uma abordagem de glicoproteômica sugerindo CD147 como um novo potencial marcador tumoral para o diagnóstico do câncer bucal. Fulzele et al. (2013) também utilizou a espectrometria de massas para identificar as citoqueratinas K4, K13, K14, K16 e K17 como potenciais biomarcadores de câncer no complexo buco-gengival. Estudo recente realizado em nosso laboratório combinou técnicas de ML, MS e bioinformática para a identificação de proteínas diferencialmente expressas em amostras teciduais frescas de CEC oral e mucosa oral normal. Foram identificadas 2529 proteínas, dentre as quais 107 proteínas apresentaram maior expressão nas amostras de CEC oral, sendo a proteína EEF1D considerada como um potencial alvo terapêutico para essa neoplasia (Flores et al., submetido).

Fixar tecidos em formalina e embebê-los em parafina constituem o método mais comum de preparação de tecidos para exame histopatológico de diagnóstico e resulta em blocos de parafina que são reservados aos fins de arquivamento. Estes arquivos de tecido são importantes para o cuidado contínuo do paciente, bem como um recurso de grande valor para a pesquisa biomédica (Xie et al., 2011). Os tecidos fixados em formalina e embebidos em parafina (FFEP) conservam características celulares, morfológicas e estruturais observadas por avaliação microscópica de cortes teciduais finos. Além da facilidade e manuseio dos blocos, esse processo também estabiliza os tecidos, permitindo um fácil armazenamento à temperatura ambiente por longos períodos (Hoeben et al., 2006).

A coloração dos cortes de tecido facilita a análise de populações de células dispostas em lâminas histológicas. A combinação hematoxilina e eosina é a técnica de coloração mais comum usado em histologia. O diagnóstico da maioria dos tumores malignos é baseado principalmente nesse procedimento. A coloração total da amostra corada é o resultado do equilíbrio da concentração de hematoxilina e eosina. No entanto, existe relato de um efeito negativo da coloração de eosina sobre a separação de proteínas

(Ahram et al., 2003), sendo a eosina uma coloração, portanto, dispensável na análise proteômica por espectrometria de massas (Sugihara et al., 2013).

### **3 PROPOSIÇÃO**

Diante do que foi exposto e na necessidade de se encontrar indicadores de agressividade em áreas específicas do tumor que poderiam antecipar o comportamento clínico do CEC oral e auxiliar no prognóstico, as finalidades desta dissertação estão fundamentadas nos objetivos:

#### **3.1 Objetivo Geral**

Analisar a composição diferencial de proteínas totais de ilhas neoplásicas grandes e pequenas da região de frente invasivo e do interior do tumor, e correlacionar essas proteínas com o prognóstico em CEC oral.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- 1) Avaliar a expressão de proteínas em ilhas neoplásicas pequenas;
- 2) Avaliar a expressão de proteínas em ilhas neoplásicas grandes;
- 3) Verificar se há diferença entre as proteínas expressas em ilhas grandes e pequenas;
- 4) Verificar se há diferença entre as proteínas expressas na região de frente invasivo e no interior tumoral;
- 5) Correlacionar proteínas diferencialmente expressas com os dados clínico-patológicos dos pacientes.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

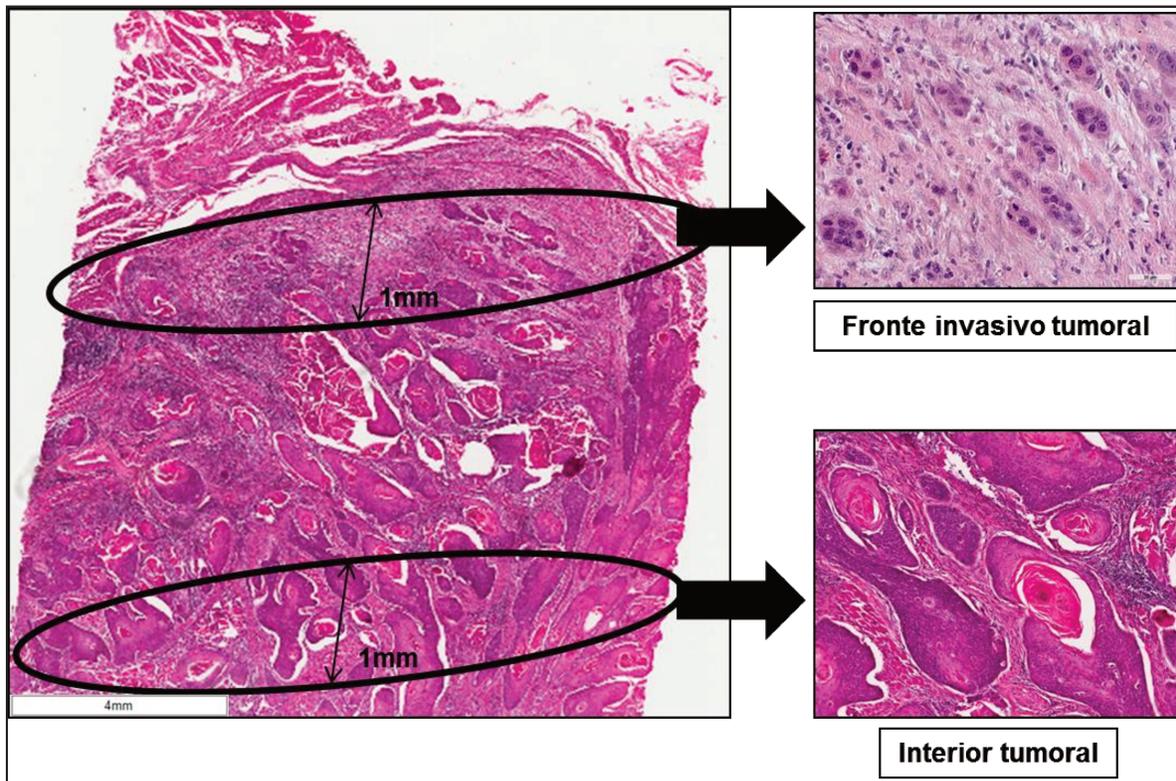
### **4.1 Aprovação Comitê de Ética**

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Ciências Médicas UNICAMP, com o protocolo 435.570/2013 (Anexo 1), submetido na Plataforma Brasil. As etapas e experimentos realizados seguiram as normas referentes a este comitê de ética no que diz respeito ao estudo com seres humanos.

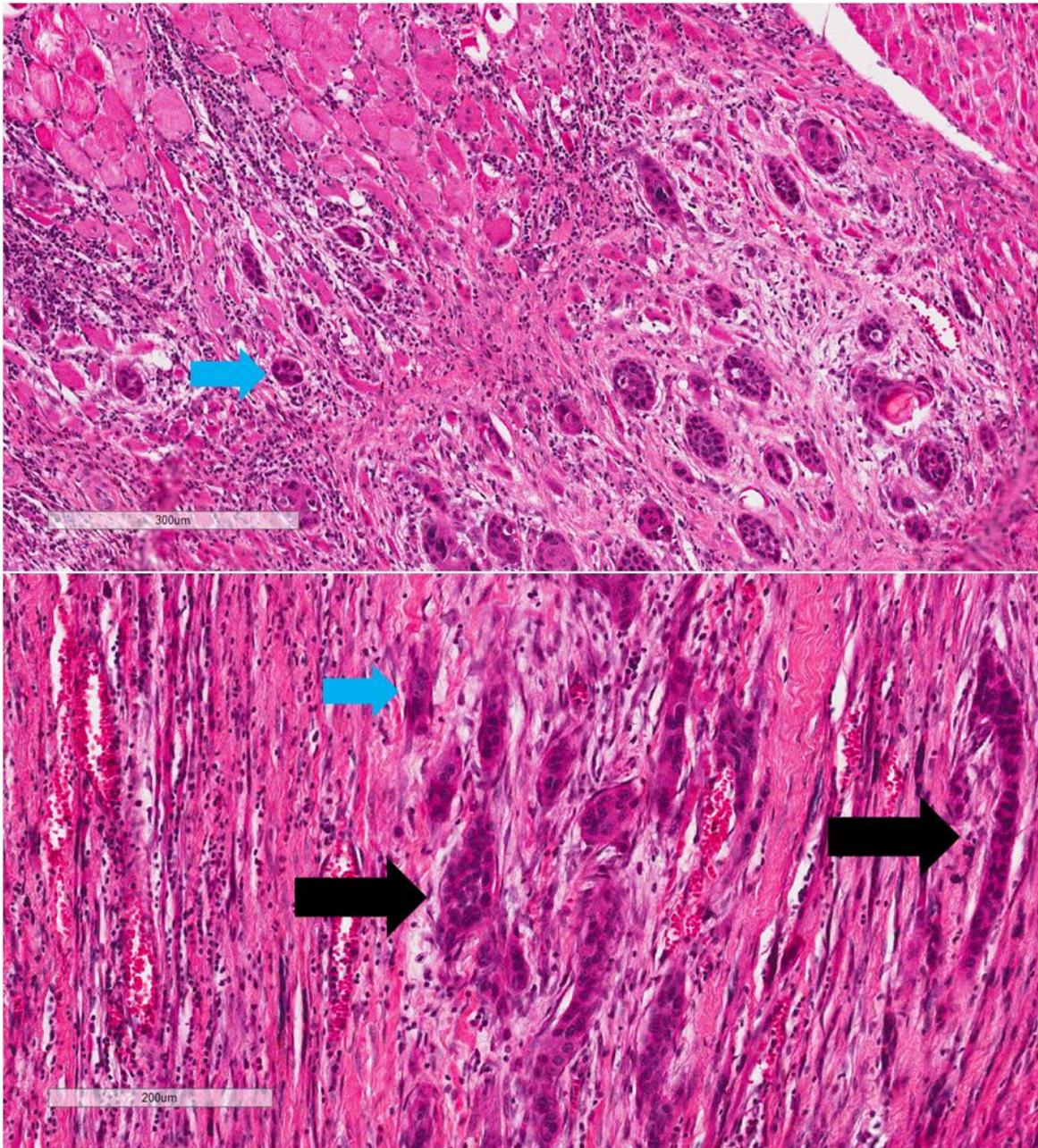
### **4.2 Amostras e Dados Clínico-patológicos**

Este estudo foi realizado em amostras de 20 pacientes com CEC oral primário de língua, diagnosticados e tratados em dois hospitais de referência em Cascavel, estado do Paraná, Brasil: o Centro de Oncologia de Cascavel CEONC e do Hospital do Câncer UOPECCAN no período de 1998–2008. Os critérios de inclusão foram dados demográficos e clínico-patológicos completos, a localização do tumor na língua, o tratamento baseado em cirurgia radical com ou sem radioterapia pós-operatória e/ou quimioterapia, e disponibilidade de todos os blocos das peças cirúrgicas fixadas em formalina e embebidas em parafina. Além disso, a partir de lâminas histológicas coradas em hematoxilina e eosina das peças cirúrgicas de cada paciente, outro critério de inclusão foi a presença das áreas específicas de interesse no tumor: ilhas grandes e ilhas pequenas do fronte invasivo tumoral (Figura 1 e 2), ilhas grandes e ilhas pequenas do interior do tumor (Figura 1 e 3). Para classificação das ilhas foi considerada a discriminação proposta por Brandwein-Gensler et al. (2005): ilhas grandes são aquelas com mais de 15 células por ilha e ilhas pequenas, aquelas contendo 15 células ou menos. Em cada lâmina histológica a região de fronte invasivo tumoral foi considerada aquela área onde ilhas neoplásicas estavam invadindo os tecidos subjacentes como tecido conjuntivo, músculo, glândulas salivares e vasos sanguíneos. O interior do tumor por sua vez, foi considerado como a região mais próxima ao epitélio de origem da neoplasia (quando este estava presente), o mais distante da região de invasão (Figura 1).

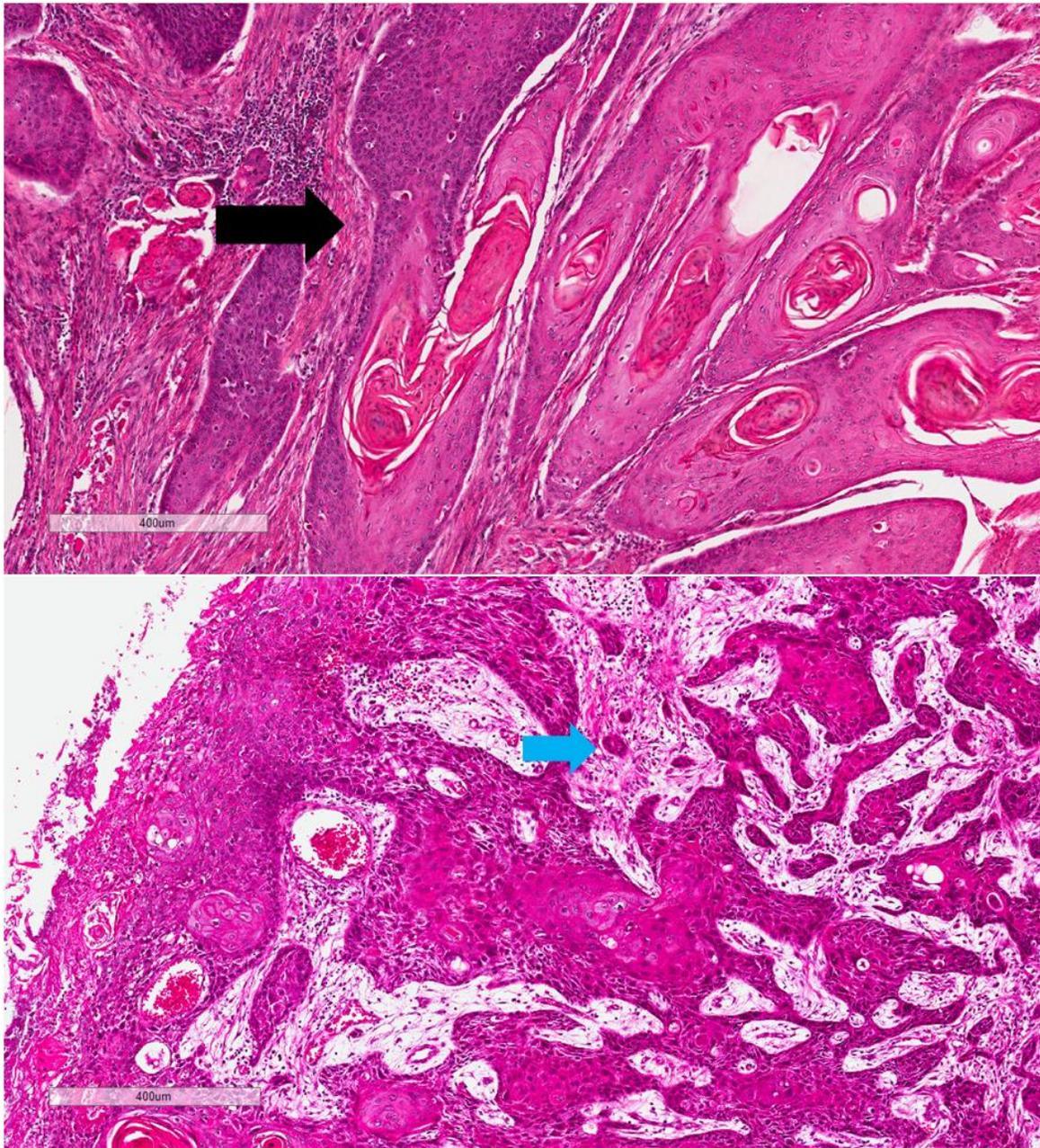
As informações coletadas dos prontuários clínicos e de acompanhamento dos pacientes foram: sexo, idade, hábitos como o tabagismo e o consumo de álcool, localização do tumor, estágio TNM, estado das margens cirúrgicas, recorrência local e linfonodal, metástase, a presença de um segundo tumor primário, tratamento e sobrevivência. Após o tratamento, os pacientes foram acompanhados por pelo menos 5 anos e recorrência da doença foi confirmada histologicamente. Os resultados foram classificados como sobrevida específica para a doença, o tempo de início do tratamento até a morte devido ao CEC oral ou a última data conhecida em que o paciente estava vivo, e sobrevida livre de doença, o tempo de início do tratamento até o diagnóstico da primeira recorrência (local, regional ou à distância) ou últimas informações de acompanhamento para aqueles sem recorrência. Lâminas histológicas de cada caso coradas em hematoxilina e eosina foram avaliadas de acordo com quatro sistemas de classificação histopatológicos: sistema de classificação da OMS (Barnes et al., 2005), sistema de MG (Bryne et al., 1992), modelo RH (Brandwein-Gensler et al., 2005), e do modelo BD (Almangush et al., 2015) por dois patologistas calibrados (Sawazaki-Calone et al., 2015).



**Figura 1** - Fotomicrografia de corte histológico de CEC oral de língua evidenciando a região de frente invasivo e a região de interior tumoral, ambas com profundidade de 1mm, como indicado na figura. Em A, detalhe do frente invasivo e em B, detalhe do interior tumoral.



**Figura 2** - Fotomicrografia de detalhe do fronte invasivo tumoral de CEC oral de língua com padrão de invasão em ilhas pequenas (setas azuis) e grandes (setas pretas).



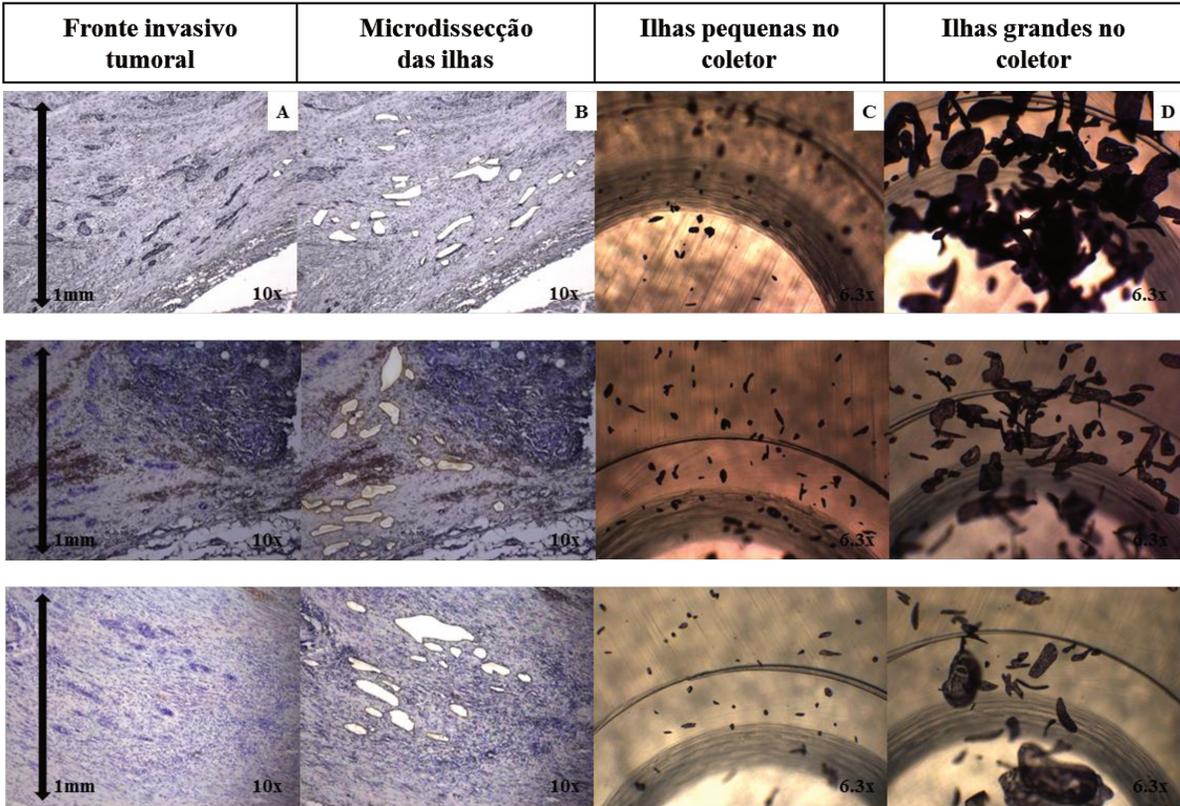
**Figura 3** - Fotomicrografia do interior tumoral de CEC oral de língua evidencianco ilhas neoplásicas grandes (seta preta) e pequenas (seta azul).

### 4.3 Preparação das amostras e microdissecção a laser (ML)

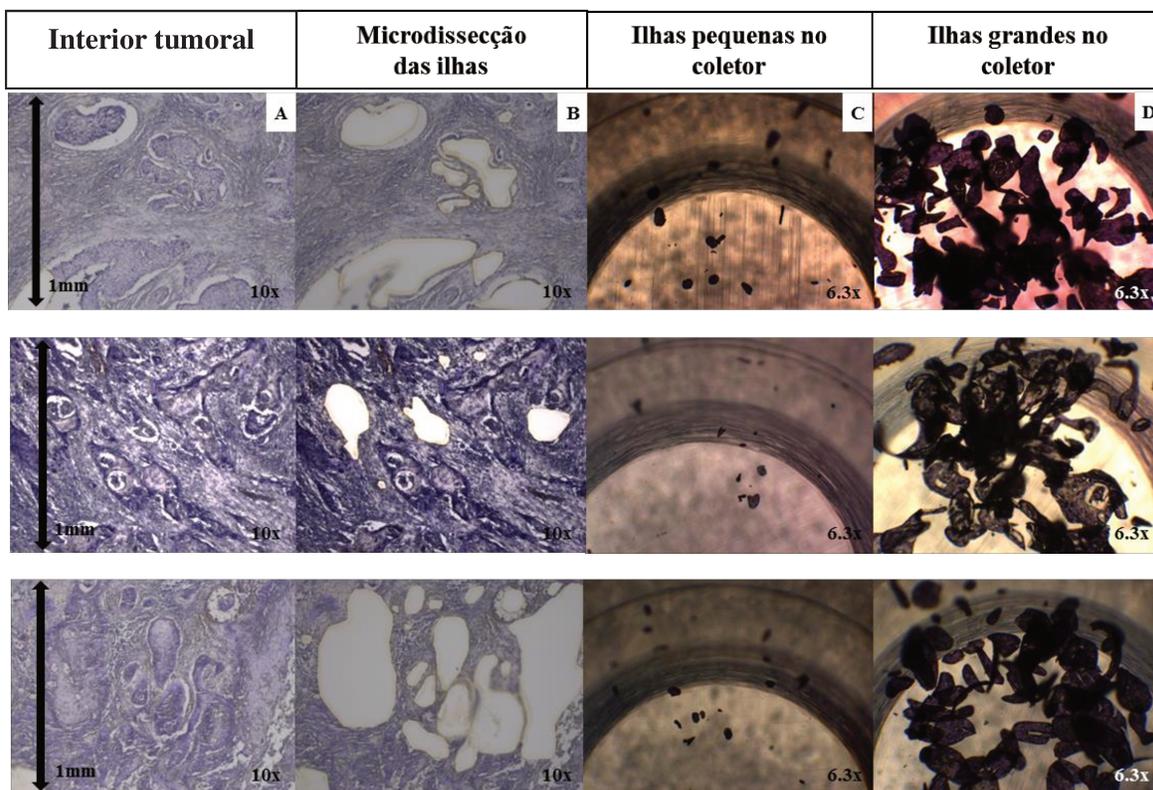
À partir das 20 amostras de CEC oral de língua foram montadas 4 lâminas histológicas de cada bloco de parafina cortado em micrótomo, uma na espessura de 5µm e as outras três na espessura de 10µm. Uma das lâminas histológicas foi confeccionada para

guiar a ML caso necessário e, assim, foi corada em hematoxilina e eosina (5µm). As outras três lâminas foram destinadas à ML e por isso foram confeccionadas utilizando lâminas com membrana específicas para esta finalidade, (Arcturus® PEN Membrane, Life Technologies). Em seguida, as lâminas para microdissecção com os cortes histológicas foram coradas em hematoxilina, submetidas à desidratação em etanol 90% e 100% e armazenadas em recipientes para dessecação antes da ML, segundo orientações do fabricante.

Após esse processo, foi realizada ML utilizando o sistema *Leica Laser Microdissection Systems* (Equipamento Multiusuário – Projeto FAPESP 2009/53998-3-adquirido pelo Laboratório de Biologia Molecular e Celular do Centro de Pesquisa Nuclear na Agricultura – CENA USP). As regiões de interesse para a ML foram assim subdivididas: a) ilhas neoplásicas pequenas da região de frente invasivo, b) ilhas neoplásicas grandes da região de frente invasivo c) ilhas neoplásicas pequenas do interior e d) ilhas neoplásicas grandes do interior. A profundidade e extensão da área microdissecada das regiões de interesse foram padronizadas na objetiva de 10x da seguinte maneira: na região frontal as ilhas foram cortados à partir da ilha mais distante na superfície invasiva do tumor até um milímetro de profundidade do corte histológico, contornando toda a extensão do fronte; e no interior as ilhas foram cortadas à partir da ilha mais distante no interior tumoral até um milímetro a frente, em direção ao meio do tumor, contornando toda sua extensão. (Figuras 1, 4 e 5). Todas as amostras foram coletadas em microtubos de 600µl, identificadas segundo cada paciente e região e armazenadas à -80°C até o momento da extração de proteínas. A microdissecção foi padronizada segundo o tipo de material (tecido fixado em formalina e embebido em parafina) e a espessura do corte (10 µm). Os parâmetros ajustáveis no *Laser Microdissection Leica LMD Software* do equipamento referentes ao controle do laser foram considerados ideias para essas amostras e a área em um<sup>2</sup> cortada para cada paciente foi registrada.



**Figura 4** - Sequência de ML na região de frente invasivo tumoral. Em A, corte histológico do frente tumoral de CEC de língua preparado para ML e corado com hematoxilina, evidenciando ilhas neoplásicas grandes e pequenas, no aumento 10x. B, mesma região da figura A mostrando as ilhas já cortadas, no aumento 10x. Em detalhe, imagens dos microtubos coletores das amostras mostrando em seu interior a presença das ilhas pequenas (C) e ilhas grandes (D) no aumento 6,3x. Cada linha representa um paciente diferente.



**Figura 5** - Sequência de ML na região de interior tumoral. Em A, corte histológico do interior tumoral de CEC de língua preparado para ML e corado com hematoxilina, evidenciando ilhas neoplásicas grandes e pequenas. B, mesmo corte da figura A mostrando as ilhas já cortadas, no aumento 10x. Em detalhe, imagens dos microtubos coletores das amostras mostrando em seu interior a presença das ilhas pequenas (C) e ilhas grandes (D) no aumento de 6,3x. Cada linha representa um paciente diferente.

#### 4.4 Preparação das amostras teciduais para espectrometria de massas (MS)

Os tecidos microdissecados das ilhas neoplásicas na região de frente e interior tumoral foram submetidos à extração de proteínas e digestão com tripsina. A extração de proteínas seguiu protocolo desenvolvido no Laboratório de Espectrometria de Massas do Laboratório Nacional de Biociências do Centro Nacional de Pesquisa em Energia e Materiais - CNPEM (Granato et al., 2014). Para isso, as amostras foram tratadas com uréia na concentração final de 1,6 M, seguido por redução das proteínas com ditioneitol (DTT) a 5 mM por 25 minutos a 56°C, alquilação com iodoacetamida (IAA) a 14mM por 30 minutos a temperatura ambiente e protegido da luz, adição de 1mM de cloreto de cálcio e em seguida digestão com tripsina por 16h a 37°C (proporção enzima:substrato, 1:50). A reação foi interrompida com ácido fórmico a 0,4% e as amostras submetidas à remoção de sais por meio de *stage tips* coluna C18 (Rappsilber et al., 2007). A remoção de sais das amostras consiste em condicionar a coluna com metanol 100%, equilibrar com ácido

fórmico 0,1%, carregar as amostras, lavando com ácido fórmico 0,1% e eluir com uma solução de acetonitrila 80%/ ácido fórmico 0,1%. As amostras foram então submetidas à secagem em um concentrador a vácuo e armazenadas a -20°C para posterior análise no espectrômetro de massas.

#### **4.5 Análise por cromatografia líquida acoplada a espectrometria de massas em tandem (LC-MS/MS)**

As análises por LC-MS/MS foram realizadas com a ressuspensão da mistura de peptídeos em 15 µL de ácido fórmico a 0,1%, sendo 4,5 µL deste volume analisados no espectrômetro de massas LTQ Velos Orbitrap (Thermo Fisher Scientific) conectado ao sistema de cromatografia líquida EASY-nLC (Proxeon Biosystem) através da fonte de nanoeletrospray (Proxeon). Os peptídeos foram então separados por um gradiente de acetonitrila de 2-90% em ácido fórmico a 0,1% em uma coluna analítica PicoFrit (20 cm x 75 µm id e de 5 µm de tamanho de partícula) (New Objective), a um fluxo de 300 nL/min durante 212 minutos. A tensão do nanoeletrospray foi ajustada para 2.2 kV e a temperatura da fonte a 275°C. Todos os métodos de instrumento para o Orbitrap Velos LTQ foram realizados no modo de aquisição de análise dependente dos dados. A resolução no Orbitrap foi definida para  $r=60.000$  e os 20 íons de peptídeos mais intensos com carga  $\geq 2$  foram sequencialmente isolados e fragmentados por dissociação induzida por colisão (CID) (normalizada de 35%). A exclusão dinâmica foi habilitada com uma lista de exclusão de 500 peptídeos, duração da exclusão de 60 segundos e contagem de repetição de 1. Uma ativação de  $q=0,25$  e tempo de ativação de 10 ms foram utilizados.

#### **4.6 Análise dos dados brutos – estatística e bioinformática**

Os dados brutos provenientes da análise por LC-MS/MS das amostras dos 20 pacientes selecionados para este estudo foram processados pelo programa *MaxQuant* v1.3.0.3 (Cox e Mann, 2008) e os espectros MS/MS foram submetidos à busca contra o banco de dados *Human Uniprot* (download em 7 de janeiro de 2015, com 89649 sequências e 35609686 resíduos) por meio da ferramenta *Andromeda* (Cox et al, 2011), com uma

tolerância de massas de 20 ppm para íons precursores e de 0,5 Da para íons fragmentos para a identificação de proteínas e no máximo uma perda de dois sítios de clivagens. Carbamidometilação da cisteínas foi considerada como modificação fixa e oxidação da metionina e acetilação do N-terminal de proteínas foram consideradas modificações variáveis. A identificação de peptídeos e a identificação de proteínas foram filtradas para um máximo de 1% *false discovery rate* (FDR). Análises de bioinformática foram realizadas com o programa *Perseus* v1.2.7.4 (Cox e Mann, 2008), disponível no pacote *MaxQuant*. Entradas identificadas unicamente por sítio de modificação, bem como aquelas identificadas pelo banco reverso, foram excluídas para análises posteriores. A abundância das proteínas foi calculada com base na intensidade normalizada do espectro (*LFQ intensity*) e seus valores convertidos para  $\log_2$ .

As relações entre o número de proteínas identificadas e compartilhadas nas diferentes regiões do tumor foram demonstradas utilizando a ferramenta *InteractiVenn* ([www.interactivenn.net](http://www.interactivenn.net)) (Heberle et al., 2015). As amostras foram agrupadas de acordo com sua origem tumoral, ou seja, ilhas neoplásicas pequenas do fronte, ilhas neoplásicas grandes do fronte, ilhas neoplásicas pequenas do interior e ilhas neoplásicas grandes do interior, e Student's *t*-test foi aplicado para verificar diferenças significativas na intensidade das proteínas entre os grupos estudados, com nível de significância de 5% ( $p \leq 0,05$ ).

Para auxiliar na interpretação dos dados biológicos na identificação de funções ou processos biológicos que estejam sobre-representados na lista de proteínas identificadas, a ferramenta *Integrated Interactome System* (IIS) (Carazzolle et al, 2014) foi utilizada com o intuito de empregar uma análise de enriquecimento da lista de proteínas com expressão diferencial identificadas nas amostras dos 20 pacientes, considerando informações presentes nos banco de dados de anotação funcional Gene Ontology (GO) e Kyoto Encyclopedia of Genes and Genomes (KEGG). Redes de interações proteína-proteína geradas a partir dessa análise foram visualizadas e modificadas por meio do programa *Cytoscape* (Saito et al, 2012).

A análise de regressão linear foi realizada usando R para relacionar as proteínas com diferença estatisticamente significativa na expressão entre as regiões de fronte versus interior com as seguintes variáveis clínico-patológicas: idade (>40 anos e <40 anos), gênero, hábito tabagista, tamanho do tumor, presença de metástase linfonodal no momento

do diagnóstico, estadiamento clínico, tratamento realizado (cirurgia, cirurgia mais radioterapia ou combinação de cirurgia, radioterapia e quimioterapia), sobrevida livre de doença (SLD), segundo tumor primário de outra origem histológica, recidiva local, recidiva linfonodal, presença do pior padrão de invasão, presença de infiltrado inflamatório e presença de invasão perineural segundo classificação histológica de (Brandwein-Gensler et al., 2005), presença de *tumor buddings* segundo classificação do modelo BD (Almangush et al., 2015) e por fim, classificação histológica da OMS (Barnes et al, 2005). Um valor de  $p \leq 0,05$  foi usado para definir a significância estatística.

## 5 RESULTADOS

Dos 20 pacientes com CEC oral, 17 (85%) eram homens com idades entre 31 e 83 anos, e média de 54,5 anos. Três pacientes (15%) tinham menos de 40 anos de idade. Em relação ao consumo de tabaco, 84,3% dos pacientes relataram ser fumantes; e 50% relataram consumo de álcool. No que se refere ao tamanho do tumor (T), 16 pacientes (80%) foram classificados como tumores T1 / T2 e 4 pacientes (20%) como T3 / T4. Onze (55%) pacientes apresentaram metástases regionais no momento do diagnóstico (N +), e todos os pacientes foram estadiados como M0 no momento do diagnóstico. Nove pacientes (45%) foram classificados no estágio clínico I ou II (fase inicial), e onze (55%) foram classificados no estágio clínico avançado (estádios III ou IV). A ressecção cirúrgica como monoterapia foi realizado em cinco (25%) pacientes, enquanto que 13 (65%) foram tratados com uma combinação de cirurgia e radioterapia pós-operatória e dois (10%) foram submetidos à combinação da cirurgia, radioterapia pós-operatória, e quimioterapia.

A radioterapia foi defendida principalmente para pacientes em estágios avançados da doença, com doença cervical positiva ou com margens cirúrgicas <5 mm. Durante o acompanhamento, sete (35%) pacientes desenvolveram recidiva local, 4 (20%) desenvolveram recidiva linfonodal, e nenhum paciente desenvolveu metástase à distância. Três (15%) pacientes desenvolveram um segundo tumor primário. A sobrevida global variou de 1 a 130 meses, com média de 32 meses. Quatorze (70%) pacientes morreram devido ao tumor ou durante o tratamento, dois (10%) pacientes morreram devido a outras causas, três (15%) pacientes estão vivos sem a doença e um (5%) paciente está vivo com a doença (Tabela 1).

**Tabela 1** - Dados clínico-patológicos dos pacientes com CEC oral de língua deste estudo.

	<b>Número de Casos</b>	<b>%</b>
<b>Gênero (20)</b>		
<b>Masculino</b>	17	85
<b>Feminino</b>	3	15
<b>Faixa Etária (20)</b>		
<b>&gt; 40 anos</b>	17	85
<b>≤ 40 anos</b>	3	15
<b>Tabagismo (19)</b>		
<b>Não Tabagista</b>	3	17,8
<b>Tabagista/Ex Tabagista</b>	16	82,2
<b>Etilismo (14)</b>		
<b>Não Etilista</b>	7	50
<b>Etilista/Ex Etilista</b>	7	50
<b>Tumor Primário (20)</b>		
<b>T1/T2</b>	16	80
<b>T3/T4</b>	4	20
<b>Linfonodos Regionais (20)</b>		
<b>N0</b>	8	40
<b>N+</b>	12	60
<b>Estadiamento Clínico (20)</b>		
<b>I</b>	3	15
<b>II</b>	6	30
<b>III</b>	5	25
<b>IV/IVa</b>	6	30
<b>Recidiva Local (20)</b>		
<b>Não</b>	13	65
<b>Sim</b>	7	35
<b>Recidiva Linfonodal (20)</b>		
<b>Não</b>	16	80
<b>Sim</b>	4	20
<b>Recidiva à Distância (20)</b>		
<b>Não</b>	20	100
<b>Sim</b>	0	0
<b>Sobrevida Livre de Doença (20)</b>		
<b>≤ 32 meses</b>	14	70
<b>&gt; 32 meses</b>	6	30
<b>Situação (20)</b>		
<b>Vivo</b>	4	20
<b>Morto</b>	16	80
<b>Grau de Diferenciação* (20)</b>		
<b>Bem</b>	1	5
<b>Moderadamente</b>	16	80
<b>Pouco diferenciado</b>	3	15

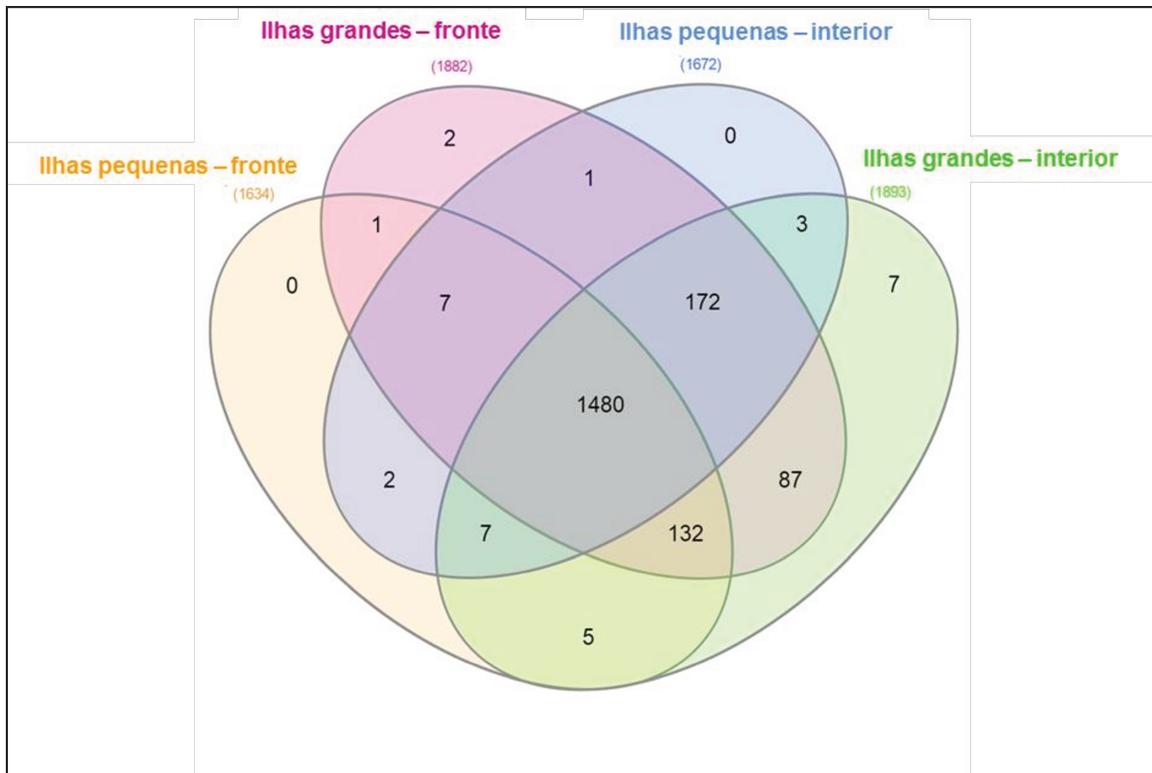
Continuação Tabela 1

<b>Pior Padrão de Invasão** (20)</b>		
<b>Ilhas</b>	10	50
<b>Ilhas satélites</b>	10	50
<b>Presença de Inflamação** (20)</b>		
<b>Não</b>	6	30
<b>Sim</b>	14	70
<b>Invasão Perineural** (18)</b>		
<b>Não</b>	10	50
<b>Sim</b>	8	40
<b>Presença de Buddings*** (20)</b>		
<b>Não</b>	9	45
<b>Sim</b>	11	55

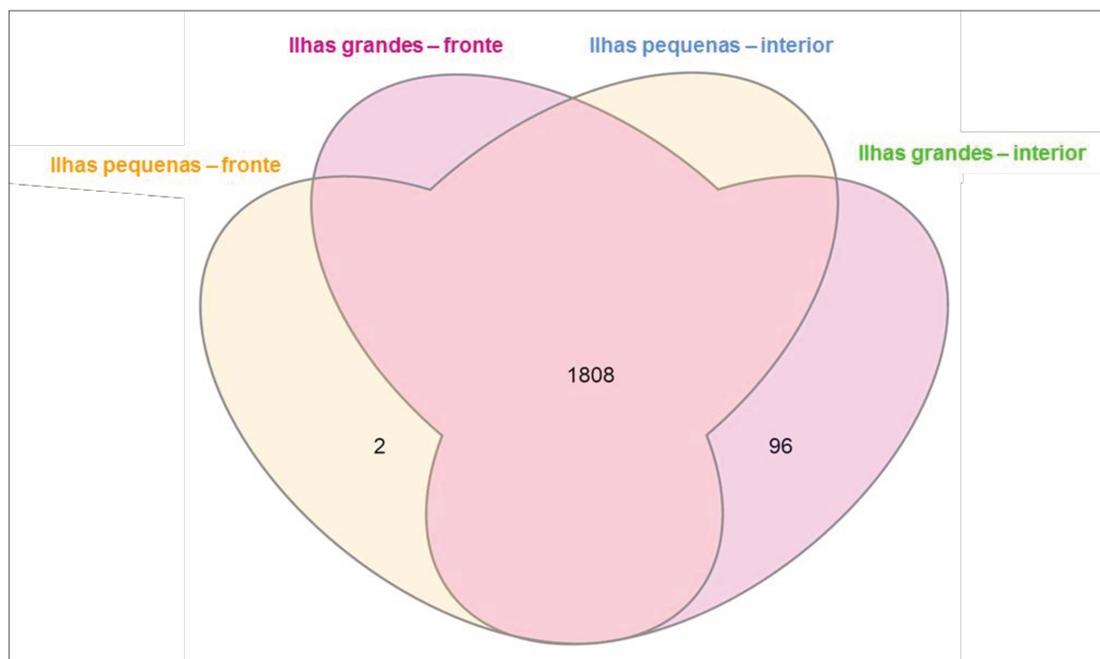
\* Barnes et al. (2005); \*\* Brandwein-Gensler et al. (2005); \*\*\* Almangush et al. (2015)

A ML foi capaz de individualizar as regiões de interesse, separando então as ilhas neoplásicas do estroma tumoral. À partir da ML de ilhas neoplásicas pequenas fronte, ilhas neoplásicas grandes do fronte, ilhas neoplásicas pequenas do interior e ilhas neoplásicas grandes do interior, foram cortadas no total, respectivamente, as áreas médias de 139.314,6 um<sup>2</sup>, 1.134.035um<sup>2</sup>, 77.042,65um<sup>2</sup> e 1.588.689,0um<sup>2</sup>.

A análise dos dados provenientes por LC-MS/MS identificou um total de 1906 proteínas. Nos diagramas de Venn é possível verificar as proteínas compartilhadas entre as diferentes áreas do tumor e proteínas encontradas exclusivas em cada região (Figuras 6 e 7). Um total de 1480 proteínas foi compartilhado entre as quatro regiões do tumor estudadas, sendo que nenhuma proteína foi exclusiva das ilhas neoplásicas pequenas do fronte e do interior. Duas proteínas foram exclusivas entre as ilhas neoplásicas grandes do fronte e sete proteínas foram exclusivas das ilhas neoplásicas grandes do interior. No que se refere ao tamanho das ilhas, duas proteínas foram encontradas apenas em ilhas neoplásicas pequenas e 96 apenas em ilhas neoplásicas grandes. Algumas proteínas foram exclusivas ou detectadas somente em cada área específica do tumor (Tabela 2).



**Figura 6** - Diagrama de Venn evidenciando o número de proteínas encontradas e compartilhadas entre as ilhas pequenas da região de frente invasivo, ilhas grandes da região de frente invasivo, ilhas pequenas do interior tumoral e ilhas grande do interior tumoral das amostras de CEC oral de língua deste estudo.



**Figura 7** - Diagrama de Venn evidenciando o número de proteínas compartilhadas entre as ilhas pequenas do frente invasivo e do interior tumoral e entre as ilhas grandes do frente invasivo e interior do tumor das amostras de CEC oral de língua deste estudo.

**Tabela 2** - Proteínas exclusivas e as respectivas regiões tumorais onde são encontradas.

Proteínas Exclusivas	Gene	Região Tumoral
Cytochrome c oxidase subunit 7A2, mitochondrial	COX7A2	Fronte
Neurofilament light polypeptide	NEFL	Interior
Cornifelin	CNFN	Interior
Small proline-rich protein 3	SPRR3	Interior
Creatine kinase S-type, mitochondrial	CKMT2	INGF
Interferon regulatory factor 2-binding protein-like	IRF2BPL	INGF
Phosphatidate cytidyltransferase 2	CDS2	INGI
Integrin alpha-5	ITGA5	INGI
Actin-related protein 2/3 complex subunit 5-like protein	ARPC5L	INGI
Alpha-ketoglutarate-dependent dioxygenase FTO	FTO	INGI
Isoform long of Serine protease inhibitor Kazal-type 5	SPINK5	INGI
Cornulin	CRNN	INGI
Isoform 2 of Epsin-1	EPN1	INGI

INGF– ilhas neoplásicas grandes do frente; INGI – ilhas neoplásicas grandes do interior

As análises de dados por Student's *t*-test realizadas com o programa *Perseus* identificaram proteínas diferencialmente expressas ( $p \leq 0,05$ ) entre:

- a) combinação das ilhas neoplásicas do fronte versus ilhas neoplásicas do interior,
- b) ilhas neoplásicas pequenas do fronte versus ilhas neoplásicas grandes do fronte,
- c) ilhas neoplásicas pequenas do interior versus ilhas neoplásicas grandes do interior.
- d) ilhas neoplásicas pequenas do fronte versus ilhas neoplásicas pequenas do interior,
- e) ilhas neoplásicas grandes fronte versus ilhas neoplásicas grandes do interior tumoral
- f) ilhas neoplásicas pequenas do fronte versus ilhas neoplásicas grandes do interior,
- g) ilhas neoplásicas grandes fronte versus ilhas neoplásicas pequenas do interior.

Das 1906 proteínas totais identificadas, 85 proteínas mostraram diferença estatisticamente significativa na expressão entre as regiões de fronte e interior, sendo nove proteínas com expressão aumentada e 19 proteínas com expressão diminuída em CEC oral (Student's *t*-teste,  $p \leq 0,05$ ). Da mesma maneira, 341 proteínas foram encontradas diferencialmente expressas entre ilhas neoplásicas pequenas do fronte versus ilhas neoplásicas grandes do fronte, onde 40 apresentaram-se com expressão aumentada e 237 com expressão diminuída. No interior tumoral, 307 foram encontradas diferencialmente expressas entre as ilhas neoplásicas grandes e pequenas; 24 com expressão aumentada e 202 proteínas com expressão diminuída. Entre as ilhas neoplásicas pequenas do fronte versus ilhas neoplásicas pequenas do interior, 55 foram encontradas diferencialmente expressas, sendo seis com expressão aumentada e 15 proteínas com expressão diminuída. Entre as ilhas neoplásicas grandes do fronte versus ilhas neoplásicas grandes do interior tumoral, 62 foram encontradas diferencialmente expressas, onde oito apresentaram-se com expressão aumentada e oito com expressão diminuída. Na comparação de ilhas neoplásicas

pequenas do fronte versus ilhas neoplásicas grandes do interior, 393 apresentaram-se expressão diferencial; 42 com expressão aumentada e 277 com expressão diminuída. Por fim, na comparação entre ilhas neoplásicas grandes do fronte versus ilhas neoplásicas pequenas do interior, 257 proteínas apresentaram diferencialmente expressas, sendo 154 com expressão aumentada e 30 proteínas com expressão diminuída.

As proteínas com diferença estatisticamente significativa na expressão entre as regiões de fronte versus interior tumoral foram então correlacionadas com os dados clínico-patológicos dos pacientes. Das 85 proteínas, 57 mostraram significância estatística ( $p \leq 0,05$ ) na associação com dados clínico-patológicos (Tabela 3). Três das 57 proteínas foram associadas somente com a idade, duas somente com o tamanho do tumor, duas somente com o estadiamento clínico, três somente com a sequência de tratamento, uma somente com recidiva local, 11 somente com o segundo tumor primário, uma somente com invasão perineural, e quatro foram associadas somente com a classificação histológica da OMS (Tabela 3). Trinta proteínas foram associadas a mais do que uma característica clínico-patológica, o que é esperado uma vez que muitas das mesmas vias poderiam levar ao mesmo resultado clínico (Harris et al., 2015). Nove proteínas se mostraram associadas à sobrevida livre de doença, como pode ser observado nas Figuras 8 e 9. A maior parte destas proteínas estava superexpressas nas ilhas grandes do fronte tumoral.

A rede de interações na Figura 10 demonstra os processos biológicos enriquecidos e identificados pelas interações proteína-proteína nas ilhas neoplásicas grandes e pequenas do fronte versus interior tumoral com enriquecimento significativo ( $p \leq 0,05$ ). Os processos biológicos enriquecidos foram morte celular, desenvolvimento da epiderme, crescimento celular, apoptose, regulação negativa da proliferação celular, adesão celular, transporte mediado por vesícula, metilação do DNA, ciclo celular, ubiquitinação de proteínas, angiogênese, transporte de proteínas, regulação da transcrição (DNA dependente), splicing de mRNA, através de spliceossomo, degradação da matriz extracelular, homooligomerização de proteínas, expressão gênica, processo metabólico de moléculas pequenas, resposta à hipóxia e resposta imunológica inata.

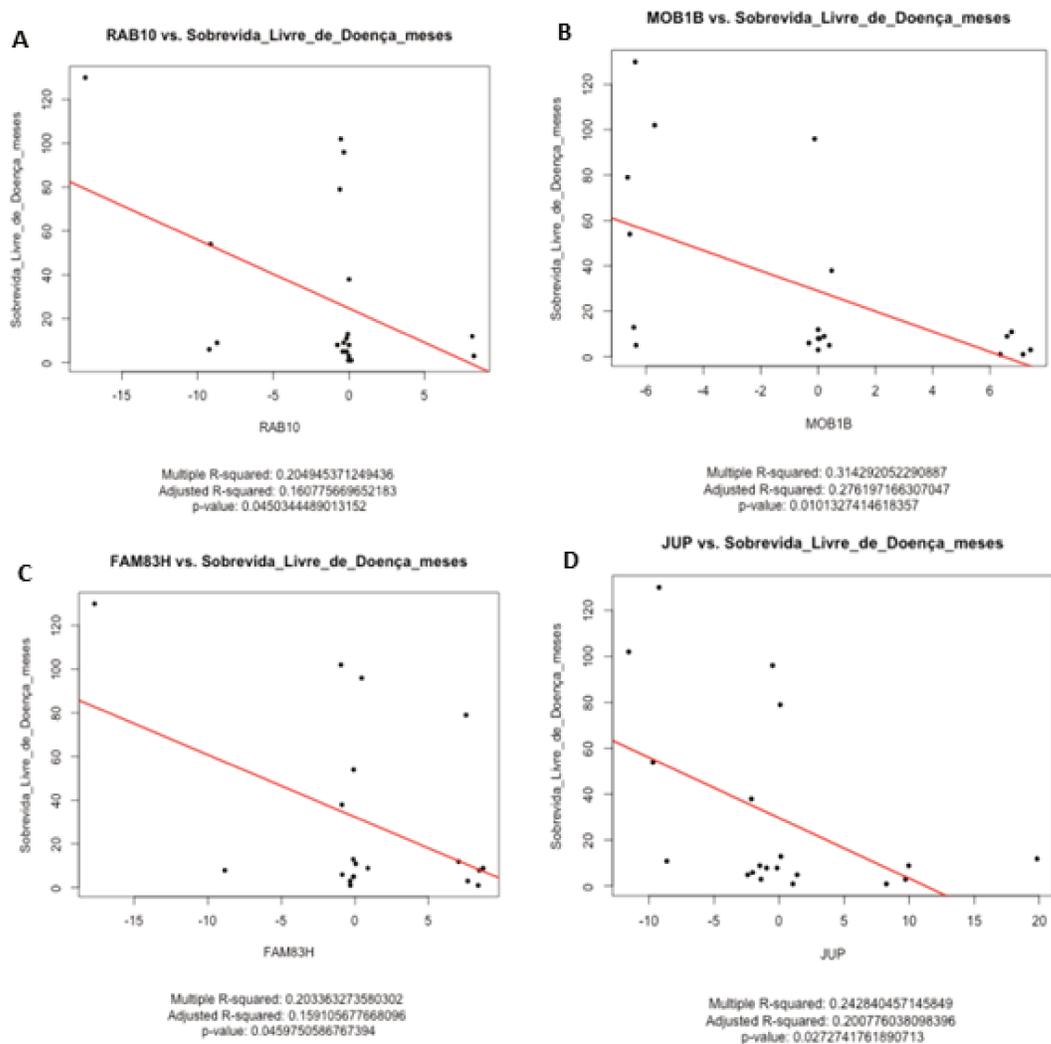
**Tabela 3** - Proteínas com associação significativa ( $p \leq 0,05$ ) aos dados clínico-patológicos segundo regressão linear.

<b>Proteína</b>	<b>Gene</b>	<b>Dado clínico-patológico associado</b>	<b><i>p value</i></b>
<b>Mitotic checkpoint protein BUB3</b>	BUB3	<i>Buddigns</i>	0.024
<b>Isoform 2 of Casein kinase I isoform alpha</b>	CSNK1A1	<i>Buddigns</i>	0.022
<b>Cystatin-B</b>	CSTB	<i>Buddigns</i>	0.024
<b>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like</b>	HNRNPDL	<i>Buddigns</i>	0.017
<b>Junction plakoglobin</b>	JUP	<i>Buddigns</i>	0.025
<b>Lysosome-associated membrane glycoprotein 1</b>	LAMP1	<i>Buddigns</i>	0.033
<b>S-adenosylmethionine synthase isoform type-2</b>	MAT2A	<i>Buddigns</i>	0.033
<b>Isoform 2 of MOB kinase activator 1B</b>	MOB1B	<i>Buddigns</i>	0.038
<b>Isoform 4 of 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 6</b>	PSMD6	<i>Buddigns</i>	0.034
<b>Serpin B5</b>	SERPINB5	<i>Buddigns</i>	0.028
<b>Spectrin beta chain, non-erythrocytic 2</b>	SPTBN2	<i>Buddigns</i>	0.0098
<b>Tubulin alpha-4A chain</b>	TUBA4A	<i>Buddigns</i>	0.017
<b>Vitronectin</b>	VTN	<i>Buddigns</i>	0.026
<b>Mitotic checkpoint protein BUB3</b>	BUB3	EC	0.021
<b>Carbonic anhydrase 2</b>	CA2	EC	0.0087
<b>C-terminal-binding protein 1</b>	CTBP1	EC	0.02
<b>Isoform 4 of 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 6</b>	PSMD6	EC	0.034
<b>Eosinophil cationic protein</b>	RNASE3	EC	0.036
<b>Protein FAM83H</b>	FAM83H	Gênero	0.025
<b>Keratin, type I cytoskeletal 17</b>	KRT17	Idade	0.045
<b>Myristoylated alanine-rich C-kinase substrate</b>	MARCKS	Idade	0.029
<b>Tubulin alpha-4A chain</b>	TUBA4A	Idade	0.046
<b>Voltage-dependent anion-selective channel protein 1</b>	VDAC1	Idade	0.043
<b>Fatty acid-binding protein, epidermal</b>	FABP5	IF	0.0044
<b>Isoform 2 of Kelch-like protein 2</b>	GC	IP	0.0043
<b>Tubulin alpha-4A chain</b>	TUBA4A	IP	0.033
<b>Carbonic anhydrase 2</b>	CA2	N	0.018
<b>Junction plakoglobin</b>	JUP	N	0.039
<b>Laminin subunit gamma-1</b>	LAMC1	N	0.019
<b>Basigin</b>	BSG	OMS	0.023
<b>Collagen alpha-2(I) chain</b>	COL1A2	OMS	0.011
<b>Isoform 2 of Casein kinase I isoform alpha</b>	CSNK1A1	OMS	0.011
<b>C-terminal-binding protein 1</b>	CTBP1	OMS	0.042
<b>Fatty acid-binding protein, epidermal</b>	FABP5	OMS	0.0083

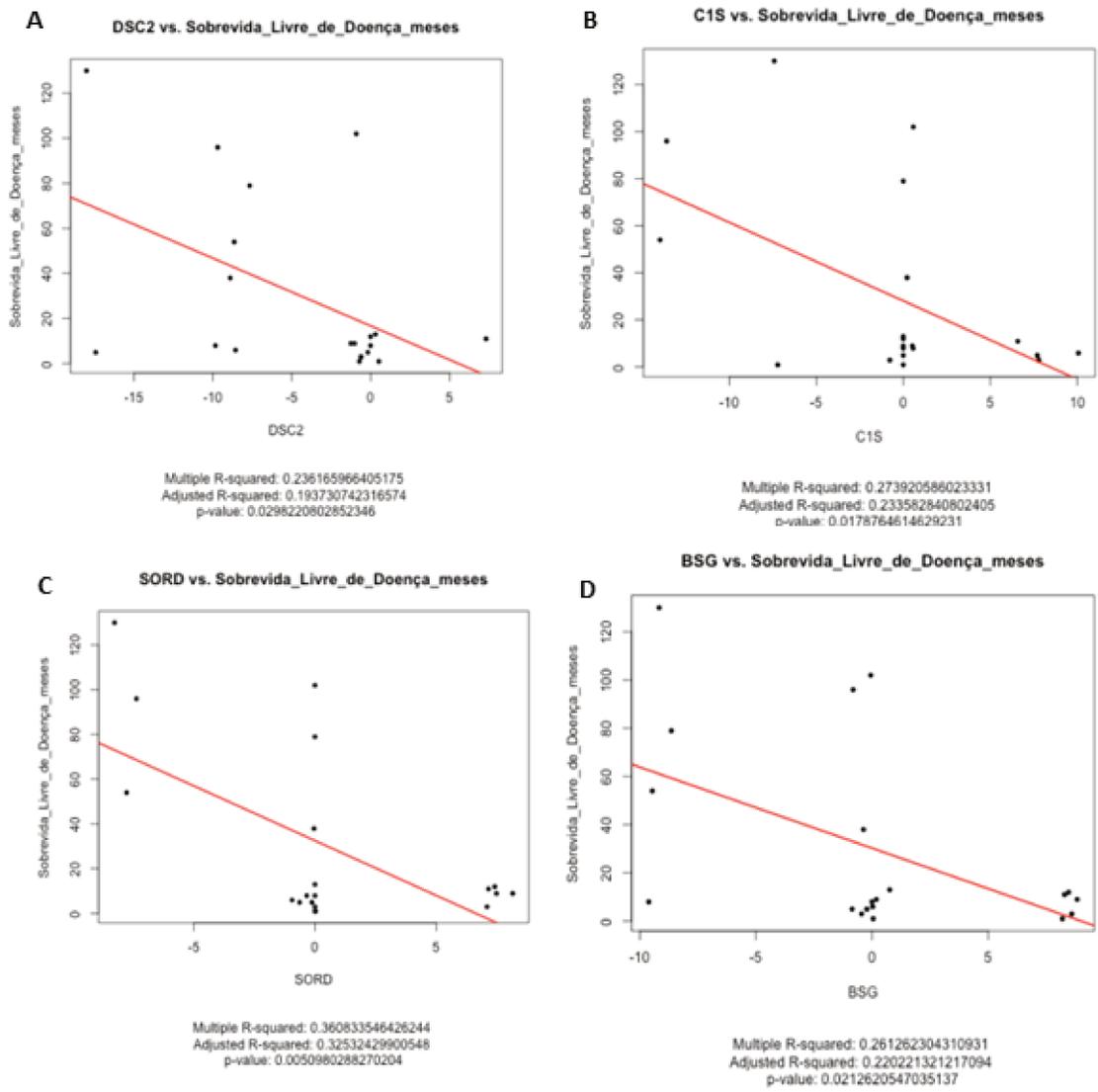
<b>Junction plakoglobin</b>	JUP	OMS	0.035
<b>Keratin, type II cytoskeletal 6B</b>	KRT6B	OMS	0.038
<b>cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit</b>	PRKAR1A	OMS	0.036
<b>14-3-3 protein sigma</b>	SFN	OMS	0.033
<b>Structural maintenance of chromosomes protein 1A</b>	SMC1A	OMS	0.00078
<b>Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3</b>	SNRPD3	OMS	0.037
<b>Lamina-associated polypeptide 2, isoforms beta/gamma</b>	TMPO	OMS	0.0082
<b>Protein dpy-30 homolog</b>	DPY30	RL	0.033
<b>Desmoglein-3</b>	DSG3	RL	0.024
<b>Collagen alpha-2(VI) chain</b>	COL6A2	RLN	0.02
<b>S-adenosylmethionine synthase isoform type-2</b>	MAT2A	RLN	0.011
<b>DNA replication licensing factor MCM6</b>	MCM6	RLN	0.042
<b>RNA-binding protein 39</b>	RBM39	RLN	0.023
<b>Vitronectin</b>	VTN	RLN	0.038
<b>Exportin-1</b>	XPO1	RLN	0.04
<b>Basigin</b>	BSG	SLD	0.021
<b>Complement C1s subcomponent</b>	C1S	SLD	0.017
<b>Desmocollin-2</b>	DSC2	SLD	0.029
<b>Protein FAM83H</b>	FAM83H	SLD	0.045
<b>Junction plakoglobin</b>	JUP	SLD	0.027
<b>Isoform 2 of MOB kinase activator 1B</b>	MOB1B	SLD	0.01
<b>Ras-related protein Rab-10</b>	RAB10	SLD	0.045
<b>Sorbitol dehydrogenase</b>	SORD	SLD	0.005
<b>Annexin A4</b>	ANXA4	STP	0.024
<b>Basigin</b>	BSG	STP	0.0016
<b>Mitotic checkpoint protein BUB3</b>	BUB3	STP	0.013
<b>Complement C1s subcomponent</b>	C1S	STP	0.041
<b>Carbonic anhydrase 2</b>	CA2	STP	0.01
<b>Caveolin-1</b>	CAV1	STP	0.0012
<b>Cytosolic non-specific dipeptidase</b>	CNDP2	STP	0.0018
<b>Isoform 2 of Casein kinase I isoform alpha</b>	CSNK1A1	STP	0.022
<b>2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial</b>	DECR1	STP	0.029
<b>Desmocollin-2</b>	DSC2	STP	0.033
<b>Enhancer of rudimentary homolog</b>	ERH	STP	0.017
<b>Isoform 2 of Golgi apparatus protein 1</b>	GLG1	STP	0.0026
<b>HLA class I histocompatibility antigen, A-68 alpha chain</b>	HLA-A	STP	0.023
<b>Heterogeneous nuclear ribonucleoprotein D-like</b>	HNRNPDL	STP	0.0064
<b>Gamma-interferon-inducible protein 16</b>	IFI16	STP	0.013
<b>Laminin subunit gamma-1</b>	LAMC1	STP	0.047
<b>Lysosome-associated membrane glycoprotein 1</b>	LAMP1	STP	0.021

<b>S-adenosylmethionine synthase isoform type-2</b>	MAT2A	STP	0.02
<b>Isoform 2 of MOB kinase activator 1B</b>	MOB1B	STP	0.012
<b>cAMP-dependent protein kinase type I-alpha regulatory subunit</b>	PRKAR1A	STP	0.024
<b>Isoform 4 of 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 6</b>	PSMD6	STP	0.0018
<b>Ras-related protein Rab-10</b>	RAB10	STP	0.01
<b>RNA-binding protein Raly</b>	RALY	STP	0.0029
<b>RNA-binding protein 39</b>	RBM39	STP	0.021
<b>60S ribosomal protein L14</b>	RPL14	STP	0.037
<b>Protein S100-A14</b>	S100A14	STP	0.0086
<b>Serpin B5</b>	SERPINB5	STP	0.012
<b>Small nuclear ribonucleoprotein Sm D3</b>	SNRPD3	STP	0.013
<b>Sorbitol dehydrogenase</b>	SORD	STP	0.018
<b>Spectrin beta chain, non-erythrocytic 1</b>	SPTBN1	STP	0.0019
<b>Lamina-associated polypeptide 2, isoforms beta/gamma</b>	TMPO	STP	0.039
<b>2,4-dienoyl-CoA reductase, mitochondrial</b>	DECR1	T	0.041
<b>Keratin, type I cytoskeletal 16</b>	KRT16	T	0.041
<b>Metastasis-associated protein MTA2</b>	MTA2	T	0.044
<b>Protein FAM83H</b>	FAM83H	Tabagismo	0.03
<b>Isoform 2 of MOB kinase activator 1B</b>	MOB1B	Tabagismo	0.04
<b>Mitotic checkpoint protein BUB3</b>	BUB3	Tratamento	0.042
<b>Collagen alpha-1(VI) chain</b>	COL6A1	Tratamento	0.034
<b>Collagen alpha-2(VI) chain</b>	COL6A2	Tratamento	0.045
<b>Heat shock protein beta-1</b>	HSPB1	Tratamento	0.007
<b>DNA replication licensing factor MCM6</b>	MCM6	Tratamento	0.01
<b>RNA-binding protein 39</b>	RBM39	Tratamento	0.029
<b>Protein S100-A14</b>	S100A14	Tratamento	0.032

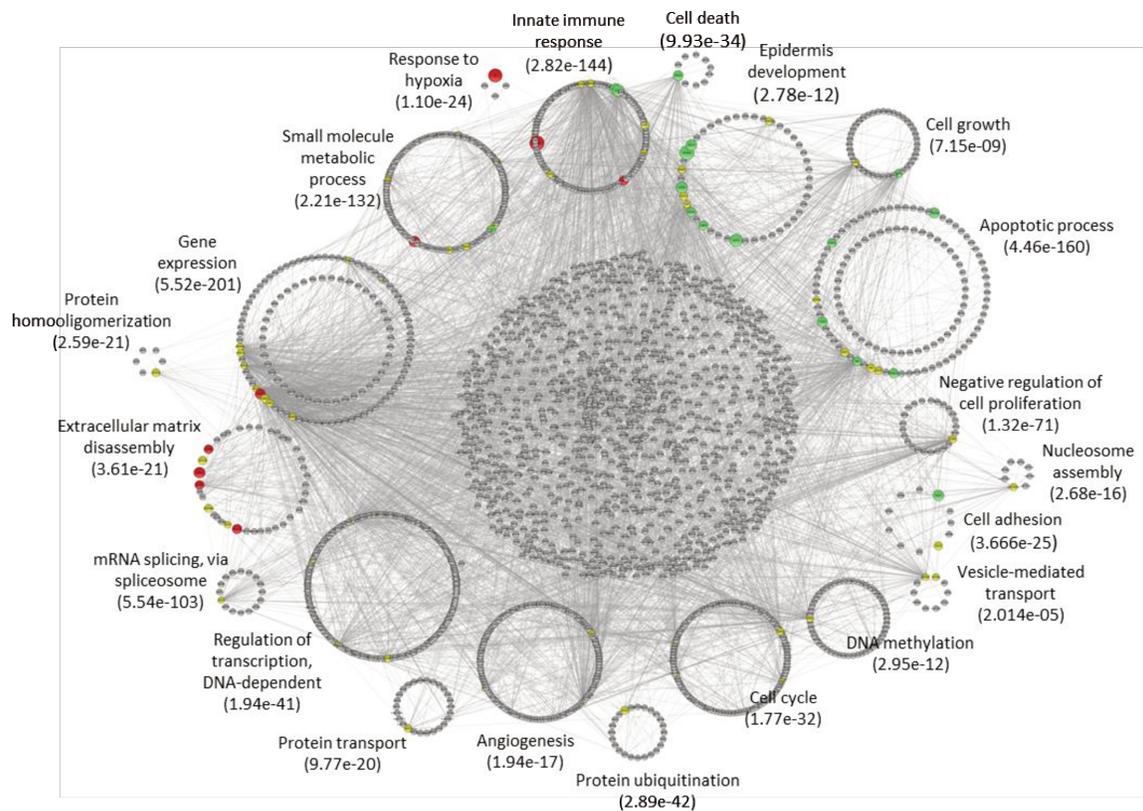
T – tamanho do tumor; N – metástase linfonodal no momento do diagnóstico; EC – estadiamento clínico; RL – recidiva local; RLN – recidiva linfonodal; SLD – sobrevida livre de doença; STP – segundo tumor primário; *Buddings* – presença de *buddings*; IF – presença de infiltrado inflamatório; IP – invasão perineural; OMS – classificação histológica da OMS



**Figura 8** - Associação entre as proteínas RAB10, MOB1B, FAM83H e JUP com a sobrevida livre de doença em meses. De uma maneira geral a maior expressão dessas proteínas associa-se à uma diminuição no tempo de sobrevida.



**Figura 9** - Associação entre as proteínas DSC2, C1S, SORD e BSG com a sobrevida livre de doença em meses. De uma maneira geral a maior expressão dessas proteínas associa-se à uma diminuição no tempo de sobrevida.



**Figura 10** - Rede de enriquecimento dos processos biológicos a partir de proteínas identificadas nas ilhas neoplásicas grandes e pequenas das regiões de frente e interior tumoral de amostras de tecido de CEC oral fixadas e emblocadas em parafina. A rede foi construída pelo programa IIS e visualizada pelo programa Cytoscape. Nos círculos é possível visualizar as proteínas com maior abundância em vermelho e menor abundância em verde encontradas como estatisticamente significativas. As proteínas que não mudaram a expressão entre essas duas expressões estão em amarelo e as proteínas provenientes do banco de dados do IIS estão em cinza. Cada processo biológico contém pelo menos uma proteína identificada nos dados de proteômica e o valor de significância está indicado entre parênteses.

## 6 DISCUSSÃO

### 6.1 A eficiência da associação de ML e MS na abordagem proteômica das diferentes regiões tumorais do CEC oral de língua

O perfil proteômico de tumores é uma abordagem promissora para a descoberta de novos métodos de diagnóstico e marcadores preditivos de agressividade e prognóstico. No entanto, o procedimento de preparação da amostra e análise de MS são desafiadores devido à complexidade dos mesmos (Bohnenberger et al., 2015). Neste estudo a complexidade das amostras foi separada em duas dimensões, no que se refere à separação das ilhas neoplásicas do microambiente tumoral (estroma) e ainda, à separação das ilhas neoplásicas por tamanho e por região através da ML. Os principais estudos prévios de abordagem proteômica de câncer oral avaliaram o tumor de uma maneira global (Harris et al., 2015; Schaaij-Visser et al., 2009), mesmo associando a técnica de ML (Chi et al., 2009; Negishi et al., 2009; Patel et al., 2008; Weinberger et al., 2009), mas não diferenciando as regiões de frente ou interior do tumor. Assim, esse estudo é pioneiro na separação das áreas de interesse dentro do tumor permitindo a análise da composição de regiões específicas, onde foi possível avaliar a diferença de expressão de proteínas entre as quatro regiões estudadas, bem como compreender um pouco mais dos processos biológicos das mesmas.

A fixação em formalina e a inclusão do tecido em parafina é uma abordagem universal para processamento de tecidos para avaliação histopatológica de rotina, uma vez que preserva a morfologia celular e arquitetura dos tecidos (Xie et al., 2011). Vários estudos vêm combinando o uso de MS com técnicas que permitem a extração de proteínas diretamente das amostras de FFEP (Ni et al., 2015). A combinação de análise proteômica permite realizar a caracterização proteômica de tecidos, normais ou lesionais, refletindo-se assim as características *in vivo*.

De uma maneira semelhante à metodologia utilizada neste estudo, Patel et al. (2008) associaram ML e MS para análise de 12 amostras de CEC oral e quatro amostras de mucosa oral normal de tecidos FFEP com uma identificação de 2271 proteínas totais, onde 115 eram compartilhadas pelo tecido normal e o tumor. Para o estudo de 10 pares de amostras de CEC e mucosa oral normal, Negishi et al. (2009) também utilizaram tecido FFEP, ML e LC-MS/MS, e encontraram 72 proteínas com expressão diferenciada, como

candidatas à biomarcadores. Por sua vez, Chang et al. (2011) utilizaram a associação de ML e LC-MS/MS em amostras teciduais de CEC oral e de linfonodos metastáticos e 2901 proteínas totais foram identificadas. Em uma abordagem similar a este estudo, Sugihara et al. (2013) utilizaram ML para individualizar três áreas de interesse de 19 peças cirúrgicas de tecido fresco de câncer colorretal coradas apenas com hematoxilina, em comparação com tecido epitelial normal. Foram investigadas por MS as regiões de frente invasivo, centro do tumor e base de úlcera. Identificou-se 3578 proteínas, onde se observou 151, 133 e 145 proteínas diferencialmente expressas nas regiões de base de úlcera, centro do tumor e frente invasivo, respectivamente. Oitenta e oito proteínas foram encontradas com expressão diferencial em grupos de células tumorais em relação às células epiteliais normais. Estes autores sugeriram então que o proteoma das áreas específicas podem refletir os efeitos do microambiente tumoral, onde a localização das células neoplásicas deve ser considerada na comparação com o tecido normal.

Os pacientes que compõem as amostras deste estudo seguiram o perfil epidemiológico clássico dos pacientes com CEC oral (Fakhry e D'Souza, 2013; Túri et al., 2013), o que também foi semelhante à outros estudos com abordagem proteômica desta neoplasia (Harris et al., 2015; Polachini et al., 2012; Negishi et al., 2009; Weinberger et al., 2009).

Outra estratégia importante deste estudo foi o uso de ferramentas estatísticas e de bioinformática avançadas para trabalhar com a grande quantidade de dados gerados. Os programas *MaxQuant* e *Perseus* foram utilizados na primeira parte da análise dos dados brutos, gerando uma lista de proteínas identificadas e posteriormente, uma lista de proteínas diferencialmente expressas pelo Student's *t*-teste ( $p \leq 0,05$ ). Isso possibilitou reduzir o número de identificações para as proteínas que realmente se expressavam de maneira distinta entre as regiões estudadas. Em acréscimo, associada às análises de bioinformática iniciais, a regressão linear foi utilizada para relacionar o grande volume de dados gerados pela LC-MS/MS com todos os dados clínico-patológicos dos pacientes simultaneamente.

Através do *InteractiVenn*, ferramenta baseada na *web* para construir e analisar diagramas de Venn (Heberle et al., 2015), foi possível visualizar de forma interativa o efeito das uniões das quatro regiões tumorais investigadas neste estudo. A visualização gerada por esta ferramenta permitiu identificar proteínas exclusivas de cada região, bem

como compreender o número e quais proteínas foram compartilhadas, aumentando-se a capacidade de análise dos dados gerados pela LC-MS/MS.

Como o câncer é uma doença que envolve a desregulação de múltiplas vias interconectadas, abrangendo processos celulares fundamentais, como proliferação, diferenciação, migração e morte (Kreeger e Lauffenburger, 2009), um entendimento mais abrangente e de uma maneira dinâmica em redes de interação entre as proteínas identificadas neste estudo se fez necessária. O software IIS permitiu integrar os dados da proteômica baseada em MS (Carazzolle et al., 2014) através da construção de redes biológicas (Figura 10) para as 85 proteínas identificadas pelo Student's *t*-teste com  $p \leq 0,05$  (Tabela suplementar 1), dando um significado biológico aos dados proteômicos (Malik et al., 2010).

De maneira semelhante ao nosso estudo, recentes trabalhos também utilizaram o programa Cytoscape para visualizar redes de interação (Maimaiti et al., 2015; Zhu et al., 2014). Assim, os dados gerados pela MS foram enriquecidos e analisados de maneira robusta, dando origem a uma lista de proteínas com potenciais marcadores para prognóstico em CEC oral de língua que se mostraram envolvidos em processos celulares importantes para carcinogênese. Algumas destas proteínas já foram descritas na literatura e vem sendo estudadas atualmente, o que confirma a robustez e reprodutibilidade da metodologia empregada neste estudo (Harris et al., 2015; Polachini et al., 2012; Patel et al., 2008).

## **6.2 Proteínas exclusivas e proteínas diferencialmente expressas evidenciadas nas diferentes regiões tumorais de CEC oral de língua**

A região de frente invasivo tumoral apresenta mudanças dinâmicas no comportamento da neoplasia, tornando-se a região de interesse para busca de marcadores de prognóstico e de agressividade (Costa et al., 2015; Sharma et al., 2013). A metodologia empregada no presente estudo foi capaz de identificar diferenças na composição proteica de ilhas neoplásicas grandes e pequenas na região de frente em comparação com o interior tumoral bem como identificar proteínas diferencialmente expressas entre essas regiões.

As proteínas encontradas exclusivamente nas regiões tumorais estudadas sugerem um perfil proteômico distinto entre as mesmas. A região de frente invasivo

tumoral expressa proteínas que ajudam na progressão do tumor, mas não se difere totalmente do seu interior, o que era esperado, levando-se em consideração a mesma origem epitelial e o mesmo clone neoplásico. A proteína exclusiva da região de frente invasivo, citocromo c oxidase subunidade 7A2, mitocondrial, do inglês *cytochrome c oxidase subunit 7A2, mitochondrial*, é encontrada na membrana das mitocôndrias e tem papel importante no transporte de elétrons.

Já o interior tumoral apresentou três proteínas exclusivas e uma delas é a cornifelina (*cornifelin*), uma proteína do envelope celular cornificado insolúvel do epitélio escamoso estratificado, descrita recentemente em irritação ocular (Choi et al., 2014), mas tem um importante papel na queratinização e que apresenta com expressão diminuída em câncer de próstata, mama e pulmão (Wang et al., 2000). Outra proteína exclusiva do interior tumoral, a proteína neurofilamento polipéptido, do inglês, *neurofilament light polypeptide* (NEFL), é componente estrutural do citoesqueleto de neurônios maduros. Estudos recentes relataram a desregulação desta proteína e de outros neurofilamentos em várias malignidades, sugerindo um papel em outros tipos de células. A metilação do DNA mediada pela inativação/silenciamento do gene que codifica esta proteína ocorre em câncer de pâncreas, gástrico, de cólon e de mama (Calmom et al., 2015). A proteína pequena rica em prolina 3, do inglês *small proline-rich protein 3*, um constituinte do envelope dos queratinócitos, tem demonstrado ser importante na iniciação e progressão de vários tipos de tumor, incluindo câncer de mama, câncer colorretal e carcinoma espinocelular de esôfago (Luo et al., 2014)

Duas proteínas foram encontradas exclusivamente nas ilhas neoplásicas grandes da região de frente. A primeira delas, creatina quinase tipo S mitocondrial, do inglês *creatine kinase S-type, mitochondrial*, tem sua função bem definida no metabolismo energético, principalmente no metabolismo cardiorrespiratório (Santamarina et al., 2012), porém esta isoforma da proteína não foi descrita em câncer até o momento. A família das proteínas “creatina quinase” estão menos expressas em muitas neoplasias malignas e já foi reportada como alvo terapêutico (Patra et al., 2012). A segunda proteína exclusiva dessa região é o fator regulador de interferon 2 (do inglês *interferon regulatory factor 2*). O fator regulador de interferon 2 é um dos fatores de transcrição que regulam as funções do

interferon e é codificado pelo gene IRF2BPL. Este fator tem sido descrito em câncer de pâncreas e fígado (Sakai et al., 2014; Yi et al., 2012).

Por fim, sete proteínas se mostram exclusivas das ilhas grandes do interior tumoral. Dentre elas, a integrina alfa 5 e a cornulina. A integrina alfa 5 (*integrin alpha-5*), da família das integrinas está entre os genes associados à metástase do câncer de ovário e desempenha um papel importante na tumorigênese através da promoção de proliferação e invasão de células neoplásicas e endoteliais (Mitra et al., 2011). A regulação negativa do gene que codifica a cornulina (*cornulin* - CRNN) pode ser considerada como um marcador de prognóstico para CEC oral (Salahshourifar et al., 2015).

Algumas destas proteínas já foram descritas em câncer (Calmom et al 2015; Salahshourifar et al., 2015; Sakei et al., 2014; Yi et al., 2012), porém vale ressaltar que o papel de cada uma precisa ser avaliado em cada região do tumoral. Principalmente porque ainda não é conhecida a função das mesmas nestas localizações.

Staub et al. (2007) em seu estudo sobre câncer colorretal, utilizou MS associada à expressão gênica por microarray para investigar a região de frente de invasão, o interior tumoral e o tecido epitelial normal. As comparações entre os tumores e o tecido normal mostram muitos genes diferencialmente expressos. Em contraste, as células da frente de invasão e do interior tumoral não apresentaram diferenças significativas em seu perfil de expressão, mesmo em nível de um único gene. Assim, esses autores verificaram que a mesma expressão genômica opera tanto na região de frente de invasão quanto no interior do tumor em câncer colorretal.

Não foram encontrados outros trabalhos que abordassem a mesma metodologia de comparação entre as regiões do tumor e análise proteômica em CEC oral. Entretanto, em vista do que foi evidenciado por Staub et al. (2007) e Sugihara et al. (2013), os resultados de presente estudo demonstram diferenças moleculares entre a região de frente de invasão e o interior do tumor e entre o tamanho das ilhas neoplásicas.

As proteínas identificadas como diferencialmente expressas entre as regiões de frente e interior demonstraram estar envolvidas em processos biológicos que confirmam as mudanças moleculares que são necessárias para a progressão neoplásica. O processo biológico de desenvolvimento da epiderme apresentou proteínas chave que regulam a diferenciação de células epiteliais com baixa expressão, demonstrando defeitos na

diferenciação celular que podem ajudar as células escamosas neoplásicas a sobreviverem e escaparem de uma diferenciação terminal (Qi et al., 2015). Os processos de crescimento celular, morte celular, apoptose e adesão celular também demonstraram proteínas com baixa regulação, confirmando que as células neoplásicas perdem o controle normal do ciclo celular, escapando dos mecanismos de morte (Hanahan e Weinberg, 2011). Os processos de regulação negativa da proliferação celular, transporte mediado por vesícula, metilação do DNA, ciclo celular, ubiquitinação de proteínas, angiogênese, transporte de proteínas, regulação da transcrição, splicing de mRNA, e homooligomerização de proteínas apresentaram proteínas sem regulação alterada, mas que desempenham um papel importante na progressão tumoral.

A degradação da matriz extracelular, expressão gênica, processo metabólico de moléculas pequenas e resposta à hipóxia apresentaram proteínas superexpressas que contribuem para ativação destes processos biológicos e consequentemente, para a progressão neoplásica. Enquanto que o processo biológico de resposta imunológica inata apresentou proteínas com alta e baixa regulação. Vale ressaltar que a rede de interações neste estudo revela apenas os processos biológicos enriquecidos entre as proteínas diferencialmente expressas do fronte versus interior tumoral, sendo, portanto, parte de uma rede mais complexa que compreende todos os processos importantes na carcinogênese de CEC oral.

Outros trabalhos sobre proteômica do CEC oral também evidenciaram alguns dos processos biológicos identificados neste estudo. À partir da classificação de carcinomas orais em relação ao prognóstico e dividindo os tumores em “mais agressivos” e “menos agressivos”, Polachini et al. (2012) encontraram que o grupo “mais agressivo” apresentava regulação positiva de proteínas envolvidos na migração, adesão, angiogênese, regulação do ciclo celular, anti-apoptose e transição epitélio-mesênquima. O grupo “menos agressivo” estava envolvido na diferenciação dos queratinócitos, no desenvolvimento da epiderme, inflamação e resposta imune. Estes autores também demonstraram pela primeira vez o papel da cofilina-1 na modulação de células invasivas em CEC oral; proteína também identificada nas amostras do presente estudo. Chanthammachat et al. (2013) na identificação de proteínas diferencialmente expressas em 10 pares de tumores (divididos em estágio inicial e avançado) e tecidos não tumorais adjacentes, encontraram 68 proteínas

diferencialmente expressas em estágio inicial (63 com expressa aumentada e cinco com expressão diminuída) e 39 proteínas diferencialmente expressas no estágio avançado (37 com expressa aumentada, dois com expressão diminuída). Entre estes, 14 proteínas foram encontradas alteradas em ambos os grupos. Um total de 44 proteínas foram identificadas, incluindo-se as proteínas de choque térmico, queratina (K1, K6A e K17), tubulina, cofilina 1, 14-3-3s e enzimas metabólicas, que estão envolvidas em processos celulares essenciais para o crescimento, a sobrevivência e a migração celular.

### **6.3 Proteômica das regiões de frente versus interior tumoral e sua relação com o prognóstico**

Muitas características clínicas e histopatológicas podem ser relacionadas à um pior prognóstico em CEC oral. Os principais fatores prognósticos para CEC oral são presença de metástase linfonodal, tamanho do tumor, invasão em ilhas (Almangush et al., 2015; Xie et al., 2015; Troeltzsch et al., 2014; Noguti et al., 2012). As proteínas diferencialmente expressas entre a região de frente e interior tumoral revelaram associação estatisticamente significativa com dados clínico-patológicos importantes para o prognóstico.

De uma maneira geral, essas proteínas estão envolvidas na progressão do tumor e em sua maioria já foram relatadas em câncer e neste estudo se apresentaram desreguladas e expressas principalmente no frente tumoral. A proteína isoforma 2 do ativador de quinase MOB 1B, do inglês *isoform 2 of MOB kinase activator 1B* (MOB1B) foi relatada recentemente associada a uma maior agressividade em câncer de próstata (Kim et al., 2015). A proteína basigina, do inglês *basigin* (BSG), pertence à família de imunoglobulinas e é expressa em níveis elevados em células neoplásicas, com um papel importante na degradação de matriz extracelular, via metaloproteinases (Wilson et al., 2005; Weidle et al., 2010; Granja et al., 2014). Por sua vez, a proteína de *checkpoint* mitótico BUB3 (*mitotic checkpoint protein BUB3* - BUB3) é um fator chave no *checkpoint* durante a mitose e já foi descrita em câncer (Han et al., 2014; Mondal et al., 2007). A proteína placoglobina de junção, do inglês *junction plakoglobin*, (JUP) em condições normais desempenha função na ancoragem celular e já foi descrita em CEC *in situ*, displasias epiteliais, e em câncer de pâncreas (Aizawa et al., 2014; Zhu et al., 2014). A proteína cadeia alfa-tubulina 4A (*tubulin alpha-4A chain* - TUBA4A) pertence à família das tubulinas que vem sendo estudada como

biomarcadores em câncer e já foi descrita em outros trabalhos com abordagem proteômica do CEC oral (Chanthammachat et al., 2013). Por sua vez, a proteína anidrase carbônica 2 (*carbonic anhydrase 2* - CA2), pertence à família de metalo-isoenzimas envolvidas em processos fisiológicos importantes ligados à respiração e transporte de CO<sub>2</sub>/bicarbonato, homeostase, e em muitas outras reações metabólicas. Outras proteínas desta família vem sendo estudadas em câncer de pulmão e mama (Cetin et al., 2015; Nigro et al., 2015), e a CA2 foi descrita recentemente em câncer de pulmão (Nigro et al., 2015).

A isoforma 4 da subunidade reguladora 6 de proteassoma 26S não-ATPase (*isoform 4 of 26S proteasome non-ATPase regulatory subunit 6* - PSMD6) é uma subunidade reguladora do proteassoma 26S, que está envolvida na degradação de ATP-dependente das proteínas ubiquitinadas. A atividade aberrante do proteassoma 26S afeta o ciclo celular, apoptose e outros processos celulares relacionados com o câncer. O gene que codifica esta proteína já foi descrito em câncer cervical (Lando et al., 2013) e esta proteína foi descrita recentemente como desregulada em câncer de próstata (Davalieva et al., 2015). A proteína de ligação ao RNA 39 (*RNA-binding protein 39* - RBM39) é um coativador de transcrição para os receptores nucleares esteróides e pode estar envolvida no processo de splicing do pré RNA mensageiro. Uma proteína de ligação ao RNA também foi identificada no trabalho de (Patel et al., 2008). A isoforma 2 da caseína-quinase I alfa (*isoform 2 of Casein kinase I isoform alpha* - CSNK1A1) vem sendo estudada em leucemia (Jaras et al., 2014), câncer de próstata (Davalieva et al., 2015), e glioblastoma (Mishra., 2014). A s-adenosilmetionina sintase tipo-2 (*s-adenosylmethionine synthase isoform type-2* - MAT2A) é uma proteína que está envolvida nos processos de metilação e processos metabólicos, e já foi descrita em câncer de fígado e cólon. Recentemente esta proteína foi estudada em células de carcinoma renal (Wang et al., 2014). Por sua vez, a proteína sorbitol desidrogenase (*sorbitol dehydrogenase* - SORD) é importante no metabolismo celular e o gene que codifica essa proteína foi encontrado como diferencialmente expresso em câncer de pulmão (Lin et al., 2011).

Por fim, a proteína FAM83H pertence à família de proteínas FAM83 que vem sendo investigada atualmente em câncer (Cipriano et al., 2012). Esta proteína foi estudada recentemente na transformação maligna de células epiteliais (Cipriano et al., 2013) e correlacionada com câncer colorretal (Kuga et al., 2013). De uma maneira geral, estas

proteínas estavam mais expressas nas ilhas grandes do fronte tumoral, algumas vezes sendo encontradas na ilhas grandes do interior do tumor. Vale ressaltar, que apesar de descritas na literatura e associadas a câncer, estas proteínas precisam ser investigadas quando ao seu papel nas regiões tumorais de frente e interior bem como quanto a seu papel nas ilhas neoplásicas grandes e pequenas.

Pacientes com CEC oral e menos de 40 anos de idade constituem um novo grupo no perfil epidemiológico dessa neoplasia (Scully e Bagan, 2009). A idade precoce do paciente pode estar relacionada com uma pior progressão do CEC oral, no entanto não existe consenso na literatura quanto a esta informação. Enquanto alguns estudos afirmam que não há diferença no prognóstico entre a doença nas pessoas idosas e nos adultos jovens (Udeabor et al., 2012), outros relatam um pior prognóstico nestes últimos, recomendando um regime de tratamento mais agressivo para este grupo (Túri et al., 2013). Em sua revisão sistemática, Garavello et al. (2007) demonstraram que para pacientes com CEC oral de língua, a idade jovem é um preditor independente de pior sobrevida. No nosso estudo foram evidenciadas proteínas que se apresentaram mais expressas (VDAC1) e menos expressas (TUBA4A, MARCKS, KRT17) em idades precoces de pacientes com CEC oral de língua, sugerindo um possível papel importante das mesmas neste grupo de pacientes.

O tabagismo é o principal fator de risco para CEC oral (Petti, 2009) e se mostrou associado a uma maior expressão das proteína FAM83H e MOB1B entre os pacientes não tabagistas e menor expressão entre pacientes tabagistas. Interessantemente, há um pequeno grupo de pacientes que desenvolvem essa neoplasia sem hábito tabagista e/ou etilista associado. Esse grupo formado por mulheres sem fatores de risco envolvido, acima de 60 anos de idade e com múltiplas lesões leucoplásicas em mucosa oral (leucoplasia verrucosa proliferativa) vão desenvolver CEC em quase 90% dos casos (García-Chías et al., 2014). A proteína FAM83H, mais expressa nas ilhas grandes do fronte, apresentou-se mais expressa também em pacientes do sexo feminino, não tabagistas da amostra deste estudo. Levando-se em consideração o pequeno número de pacientes com estas características, apenas pode-se supor o papel importante da proteína FAM83H na carcinogênese nestas pacientes.

É amplamente aceito que a presença de metástase linfonodal é o indicador de prognóstico mais importante relacionado com a sobrevida em CEC oral (Noguti et al., 2012). Vários estudos têm demonstrado essa influência pela diminuição drástica nas taxas

de sobrevivência em pacientes com linfonodos cervicais positivos (Edge e Compton, 2010; Jang et al., 2015). As proteínas relacionadas com a presença de metástase linfonodal: CA2 (mais expressas entre pacientes sem metástase linfonodal), JUP e LAMC1 (menos expressas em pacientes com metástase linfonodal) sugerem papel nesta condição. A presença de recidiva linfonodal esteve associada a uma maior expressão das proteínas COL6A2, MAT2A, MCM6, RBM39, VTN, XPO1, sugerindo papel importante na progressão tumoral.

Pelo tamanho do tumor e ausência de metástase linfonodal no momento do diagnóstico, os tumores em estágio inicial teoricamente teriam um melhor curso da doença, respondendo melhor ao tratamento e com melhor prognóstico. Porém, uma série de estudos tem demonstrado um curso agressivo para CEC de língua em estágio inicial, com metástases ocultas, recorrências e segundo tumores primários (Almangush et al., 2015; De Aguiar et al., 2007; Ganly et al., 2012). O CEC oral é frequentemente diagnosticado em uma fase tardia da doença, quando as chances de cura são baixas e os tratamentos são mais invasivos. No que se refere às proteínas relacionadas ao estágio clínico do CEC oral de língua, BUB3 e CA2 apresentaram menor expressão em estágios avançados, CTBP1 e PSMD6 maior expressão em estágios iniciais da doença e menor expressão em estágios avançados, e RNASE3 maior expressão em estágios iniciais. Por sua vez, levando-se em consideração apenas o tamanho do tumor, as três proteínas se mostraram envolvidas (DECR1, KRT16 e MTA2) e com maior expressão em tumores T3 e T4. Trinta e uma proteínas estiveram associadas à presença de segundo tumor primário, algumas delas já associadas às outras características clínico-patológicas. Estas proteínas ANXA4, BSG, BUB3, C1S, CA2, CAV1, CNDP2, CSNK1A1, DECR1, DSC2, ERH, GLG1, HLA-A, HNRNPDL, IFI16, LAMC1, LAMP1, MAT2A, MOB1B, PRKAR1A, PSMD6, RAB10, RALY, RBM39, RPL14, S100A14, SERPINB5, SNRPD3, SORD, SPTBN1, TMPO podem compor um painel interessante relacionado ao prognóstico, com proteínas já descritas anteriormente em outros estudos (Harris et al., 2015; Patel et al., 2008; Polachini et al., 2012).

Por outro lado, a sequência de tratamento para CEC oral influencia o prognóstico pela agressividade das terapias utilizadas ou pela incompleta remoção do tumor. A persistência de células neoplásicas após cirurgia em CEC oral representa um grande

desafio, já que muitas vezes leva a recidivas locais (onde as proteínas DPY30 e DSG3 podem estar envolvidas e menos expressas em pacientes com recidiva) e segundos tumores primários, que são eventualmente responsáveis por uma grande proporção de mortes (Tirelli et al., 2015). As proteínas BUB3, COL6A1, COL6A2, HSPB1, MCM6, RBM39, S100A14 foram encontradas relacionadas às diferentes modalidades de tratamento empregadas nos pacientes desta amostra.

Parâmetros histopatológicos do CEC oral também apresentam importante papel no prognóstico desses pacientes. A invasão perineural diz a respeito de uma maior agressividade da neoplasia que ao invadir tecidos subjacentes também pode invadir fascículos nervosos. Vários estudos apontam o papel da invasão perineural no prognóstico de CEC oral (Brandwein-Gensler et al., 2010; Li et al., 2013). No presente estudo as proteínas GC e TUBA4A se mostram relacionadas à presença de invasão ao redor dos nervos, e talvez desempenhem um papel importante nessa característica de invasão. Os pacientes com CECs orais com ausência de infiltrado inflamatório apresentaram maior expressão da proteína FABP5. O brotamento tumoral ou *tumor buddings*, que se associa à transição epitélio-mesênquima, é um evento frequente e parece ser um fator prognóstico independente em CEC oral de língua (Wang et al., 2011). No presente estudo a presença de *buddings* foi associada com as proteínas BUB3, CSNK1A1, CSTB, HNRNPDL, JUP, LAMP1, MAT2A, MOB1B, PSMD6, SERPINB5, SPTBN2, TUBA4A e VTN.

Os CECs orais pouco diferenciados apresentam pior prognóstico por se distanciarem biologicamente da sua célula de origem, e adquirindo características que lhes conferem vantagem na progressão tumoral (Barners et al., 2005). Neste estudo as proteínas BSG, COL1A2, CSNK1A1, CTBP1, FABP5, JUP, KRT6B, PRKAR1A, SFN, SMC1A, SNRPD3 e TMPO foram encontradas mais expressas em tumores pouco diferenciados, em contraste com as outras variantes bem diferenciadas e moderadamente diferenciadas, sugerindo um possível papel na desdiferenciação desta neoplasia.

A taxa de sobrevida em cinco anos para o CEC oral não aumentou significativamente durante as duas últimas décadas, o que é em grande parte devido aos estágios avançados da doença no momento do diagnóstico e ao frequente desenvolvimento de recidiva e segundo tumor primário, além da presença de metástases linfonodais ocultas (Troeltzsch et al., 2014; Ganly et al., 2012). Assim, muitos fatores prognósticos

influenciam a sobrevida dos pacientes com CEC oral, o que reforça o achado de proteínas já descritas em outros fatores prognósticos neste estudo estarem relacionadas à diminuição da sobrevida livre de doença. As proteínas relacionadas com a sobrevida livre de doença, BSG, C1S, DSC2, FAM83H, JUP, MOB1B, RAB10, SORD demonstraram maior expressão à medida que a sobrevida apresentava diminuição e já foram descritas associada a câncer (Kim et al., 2015; Kuga et al., 2013; Patel et al., 2008).

Atualmente, a busca por marcadores prognósticos em câncer tem se tornado relevante na tentativa de prever o curso da doença e futuramente melhorar as sequências de tratamento, de uma maneira mais eficiente e precisa, segundo o risco daquele paciente (Harris et al., 2015; Polachini et al., 2012). A partir da análise da expressão diferencial de proteínas nas áreas de interesse foi possível identificar um painel de proteínas relacionado ao prognóstico que devem ser ainda investigadas. Uma compreensão abrangente da região de frente invasiva do CEC oral pode levar a avaliação prognóstica e planejamento do tratamento adequado, reduzindo assim a possibilidade de recidiva ou metástase linfonodal. No entanto há a necessidade de validação experimental de cada proteína para a demonstração deste efeito (Sharma et al., 2013).

## 7 CONCLUSÃO

A combinação de ML, MS e bioinformática foi capaz de identificar um painel de proteínas expressas nas regiões de frente e interior tumoral e suas respectivas ilhas neoplásicas divididas por tamanho. Além disso, a associação dessas técnicas identificou proteínas diferencialmente expressas entre ilhas grandes e pequenas do frente versus interior do tumor que foram correlacionadas com características clínico-patológicas e processos biológicos importantes para progressão neoplásica, ressaltando o importante papel do proteoma de CEC oral.

A lista de proteínas clinicamente relevantes que foram observadas pode estar direta ou indiretamente envolvida em mecanismos regulatórios que afetam o prognóstico. Assim, a região de frente tumoral, onde essas proteínas estão mais expressas, pode ser correlacionada com o prognóstico.

Os resultados deste estudo são parciais e irão auxiliar novas investigações para validar o papel biológico das proteínas evidenciadas nas diferentes regiões tumorais, bem como compreender melhor o papel delas no prognóstico. Esta abordagem irá ajudar ainda na compreensão das diferenças e dos mecanismos de interação entre áreas do tecido neoplásico e criar novos alvos terapêuticos.

Em resumo, a busca de indicadores de agressividade poderia antecipar o comportamento clínico do CEC oral e auxiliar no prognóstico considerando a alta heterogeneidade desta neoplasia associada aos diferentes comportamentos clínicos e padrões de invasão.

## REFERÊNCIAS

ACHA A., et al. Applications of the oral scraped (exfoliative) cytology in oral cancer and precancer. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**. 2005; (2):95-102.

AHRAM M, et al. Evaluation of ethanol-fixed, paraffin-embedded tissues for proteomic applications. **Proteomics**. 2003; (3): 413-421.

AGARWAL, P.; BALLABH, R. Expression of type IV collagen in different histological grades of oral squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study. **Journal of cancer research and therapeutics**. 2013; 9(2): 272-275.

AIZAWA, S. et al. Heterogeneous and abnormal localization of desmosomal proteins in oral intraepithelial neoplasms. 2014; 56(3):209-214.

ALAM, H. et al. Fascin overexpression promotes neoplastic progression in oral squamous cell carcinoma. **BMC Cancer**. 2012; 12(1):32-38.

ALMANGUSH, A. et al. A simple novel prognostic model for early stage oral tongue cancer. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**. 2015; 44(2):143-150.

ANNERTH, G.; BATSAKIS, J.; LUNA, M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. **Scandinavian journal of dental research**. 1987; 95(3):229-249.

BARNES, L. et al. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. **WHO Classification of Tumour**. 2005; (9):163-175.

BOHNENBERGER, H. et al. Quantitative Mass Spectrometric Profiling of Cancer-cell Proteomes Derived From Liquid and Solid Tumors. **Journal of Visualized Experiments**. 2015; 96:1-8.

BRANDWEIN-GENSLER, M. et al. Oral Squamous Cell Carcinoma Histologic Risk Assessment, but Not Margin Status, Is Strongly Predictive of Local Disease-free and Overall Survival. **Am J Surg Pathol**. 2005; 29(2):167-178

BRANDWEIN-GENSLER, M. et al. Validation of the histologic risk model in a new cohort of patients with head and neck squamous cell carcinoma. **The American journal of surgical pathology**. 2010; 34(5):676-688.

BRYNE, M. et al. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. **The Journal of pathology**. 1992; 166(4): 375-381.

BRODERS AC. Squamous cell cancer of the lip: a study of five hundred and thirty-seven cases. **JAMA**. 1920; 74: 656–664.

CALMOM, MF et al. Epigenetic silencing of neurofilament genes promotes an aggressive phenotype in breast cancer. **Epigenetics**. 2015;10(7):622-632.

CARAZZOLLE, M. F. et al. IIS - Integrated Interactome System: A web-based platform for the annotation, analysis and visualization of protein-metabolite-gene-drug interactions by integrating a variety of data sources and tools. **PLoS ONE**. 2014; 9( 6).

CARNIELLI, C. M.; WINCK, F. V.; PAES LEME, A. F. Functional annotation and biological interpretation of proteomics data. **Biochimica et Biophysica Acta (BBA) - Proteins and Proteomics**. 2015; 1854(1): 46-54.

---

CETIN, B. et al. The impact of immunohistochemical staining with ezrin-carbonic anhydrase IX and neuropilin-2 on prognosis in patients with metastatic renal cell cancer receiving tyrosine kinase inhibitors. **Tumor Biology**, 2015. DOI 10.1007/s13277-015-3589-6.

CHANG, KP et al. Identification of PRDX4 and P4HA2 as metastasis-associated proteins in oral cavity squamous cell carcinoma by comparative tissue proteomics of microdissected specimens using iTRAQ technology. **J Proteome Res**. 2011; 10(11): 4935-4947.

CHANTHAMMACHAT, P et al. Comparative proteomic analysis of oral squamous cell carcinoma and adjacent non-tumour tissue from Thailand. **Arch Oral Biol**. 2013;58(11):1677-1685.

CHEN, G.; PRAMANIK, B. N. Application of LC/MS to proteomics studies: current status and future prospects. **Drug Discovery Today**. 2009; 14( 9): 465-471.

CHEN et al. Identification of novel tumor markers for oral squamous cell carcinoma using glycoproteomic analysis. **Clinica Chimica Acta**. 2013; 420:45-53.

CHI, LM. et al. Enhanced interferon signaling pathway in oral cancer revealed by quantitative proteome analysis of microdissected specimens using 16O/18O labeling and integrated two-dimensional LC-ESI-MALDI tandem MS. **Molecular & cellular proteomics : MCP**. 2009; 8(7):1453-1474.

CHOI, S et al. Identification of cornifelin and early growth response-1 gene as novel biomarkers for in vitro eye irritation using a 3D reconstructed human cornea model MCTT HCE™ **Arch Toxicol**. 2014.

CIPRIANO, R. et al. FAM83B mediates EGFR- and RAS-driven oncogenic transformation. **Journal of Clinical Investigation**. 2012; 122( 9):3197-3210.

CIPRIANO, R. et al. FAM83B-mediated activation of PI3K / AKT and MAPK signaling cooperates to promote epithelial cell transformation and resistance to targeted therapies . **Oncotarget**. 2013; 4(5):729-738.

COSTA, LCMC. et al. Expression of epithelial-mesenchymal transition markers at the invasive front of oral squamous cell carcinoma. **J. Appl. Oral Sci.** 2015;23(2):169-178.

COX, J. e MANN, M. MaxQuant enables high peptide identification rates, individualized p.p.b.-range mass accuracies and proteome-wide protein quantification. **Nat Biotechnol**. 2008; 26:1367-1372

COX et al. Andromeda: a peptide search engine integrated into the MaxQuant environment. **J Proteome Res**. 2011;10(4):1794-1805.

DATTA S et al. Laser capture microdissection: Big data from small samples. **Histol Histopathol**. 2015. Doi:10.14670/HH-11-622

DAVALIEVA, K. et al. Proteomics analysis of malignant and benign prostate tissue by 2D DIGE/MS reveals new insights into proteins involved in prostate cancer. **The Prostate**. 2015. Doi: 10.1002/pros.23034.

DE AGUIAR, AFC.; KOWALSKI, L. P.; DE ALMEIDA, O. P. Clinicopathological and immunohistochemical evaluation of oral squamous cell carcinoma in patients with early local recurrence. **Oral oncology**. 2007; 43(6):593-601.

DUNKEL, J. et al. Prognostic markers in stage I oral cavity squamous cell carcinoma. **The Laryngoscope**. 2013, 123(10):2435-2441.

EDGE, SB.; COMPTON, CC. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. **Annals of surgical oncology**. 2010; 17(6):1471-1474.

FAKHRY, C; D'SOUZA, G. Discussing the diagnosis of HPV-OSCC: Common questions and answers. **Oral Oncology**. 2013; 49(9):863-871.

FAN, S. et al. A review of clinical and histological parameters associated with contralateral neck metastases in oral squamous cell carcinoma. **International Journal of Oral Science**. 2011; 3(4):180-191.

FEND e RAFFELD. Laser capture microdissection in pathology. **J. Clin. Pathol**. 2000; 53: 666-672.

FERLAY, J. et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. **International Journal of Cancer**. 2010; 127(12):2893-2917.

FLORES, IL et al. EEF1D deploys non-canonical functions in oral squamous cell carcinoma. (Submetido) 2015.

FULZELE, A. et al. Proteomic profile of keratins in cancer of the gingivo buccal complex: Consolidating insights for clinical applications. **Journal of Proteomics**. 2013; 91: 242-258.

GANLY, I.; PATEL, S.; SHAH, J. Early stage squamous cell cancer of the oral tongue-clinicopathologic features affecting outcome. **Cancer**. 2012; 118(1):101-111.

GARCÍA-CHÍAS, B. et al. Diagnostic criteria in proliferative verrucous leukoplakia: Evaluation. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**. 2014; 19(4):132-145.

GARAVELLO, W et al. Oral tongue cancer in young patients: a matched analysis. **Oral Oncol**. 2007;43(9):894-897.

GOGILASHVILI, K.; SHONIA, N.; BURKADZE, G. The role of human papillomavirus in oral squamous cell carcinoma (review). **Georgian medical news**. 2012; 213(4):32–36.

GRANATO, D. C. et al. Integrated proteomics identified up-regulated focal adhesion-mediated proteins in human squamous cell carcinoma in an orthotopic murine model. **PLoS ONE**. 2014; 9(5):1–11.

GRANJA, S et al. Disruption of BASIGIN decreases lactic acid export and sensitizes non-small cell lung cancer to biguanides independently of the LKB1 status. **Oncotarget**. 2015;6(9):6708-6721.

GUEIROS, LA ey al. Clinicopathological features and proliferation markers in tongue squamous cell carcinomas. **Int J Oral Maxillofac Surg**. 2011; 40:510-515.

HAN, J. S. et al. Bimodal activation of BubR1 by Bub3 sustains mitotic checkpoint signaling. **Proceedings of the National Academy of Sciences**. 2014; 111(40): E4185-E4193.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**. 2011; 144(5):646-674.

HARRIS, T. M. et al. Proteomic Analysis of Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma Specimens Identifies Patient Outcome–Associated Proteins. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**. 2015; 139(4): 494-507.

HEBERLE, H et al. InteractiVenn: a web-based tool for the analysis of sets through Venn diagrams. **BMC Bioinformatics**. 2015. Doi: 10.1186/s12859-015-0611-3.

HOEBEN, A. et al. Proteomics in cancer research: Methods and application of array-based protein profiling technologies. **Analytica Chimica Acta**. 2006; 564(4):19-33.

HUTTENHAIN, R. et al. Reproducible Quantification of Cancer-Associated Proteins in Body Fluids Using Targeted Proteomics. **Science Translational Medicine**. 2012; 4(142):142ra94-142ra94.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER - INCA. Ministério da Saúde. Estimativa 2014 Incidência de câncer no Brasil. Brasil: 2014

JANG, JY et al. Prediction of Lymph Node Metastasis by Tumor Dimension versus Tumor Biological Properties in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. **Cancer Res Treat**. 2014. Doi: 10.4143/crt.2014.332.

JARAS, M. et al. Csnk1a1 inhibition has p53-dependent therapeutic efficacy in acute myeloid leukemia. *The Journal of experimental medicine*. 2014; 211(4): 605-612.

KATO, K. et al. Expression form of p53 and PCNA at the invasive front in oral squamous cell carcinoma: Correlation with clinicopathological features and prognosis. **Journal of Oral Pathology and Medicine**. 2011; 40(9):693-698.

KESKI-SÄNTTI, H. et al. Predictive value of histopathologic parameters in early squamous cell carcinoma of oral tongue. **Oral Oncology**. 2007; 43(10):1007-1013.

KIM, E. et al. Lower Levels of Human MOB3B Are Associated with Prostate Cancer Susceptibility and Aggressive Clinicopathological Characteristics. **J Korean Med Sci**. 2015; 30(7):937-942.

KREEGER, P. K.; LAUFFENBURGER, D. A. Cancer systems biology: A network modeling perspective. **Carcinogenesis**. 2009; 31(1): 2-8.

KUGA, T. et al. A novel mechanism of keratin cytoskeleton organization through casein kinase I $\alpha$  and FAM83H in colorectal cancer. **Journal of cell science**. 2013; 126( 20):4721-4731.

LANDO, M. et al. Identification of eight candidate target genes of the recurrent 3p12-p14 loss in cervical cancer by integrative genomic profiling. **Journal of Pathology**. 2013; 230(1):59-69.

LEE, S. H. et al. Prognostic significance of syndecan-1 expression in squamous cell carcinoma of the tonsil. **International Journal of Clinical Oncology**. 2014; 19(2):247-253.

LEEMANS, C. R.; BRAAKHUIS, B. J. M.; BRAKENHOFF, R. H. The molecular biology of head and neck cancer. **Nature reviews. Cancer**. 2011; 11(1):9-22.

LEGRES, L. G. et al. Beyond laser microdissection technology: follow the yellow brick road for cancer research. **American journal of cancer research**. 2014; 4(1):1-28.

- LI, Y. et al. Validation of the Risk Model: High-Risk Classification and Tumor Pattern of Invasion Predict Outcome for Patients with Low-Stage Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma. **Head and Neck Pathology**. 2013; 7(3):211-223.
- LIN, CC. et al. Malignant pleural effusion cells show aberrant glucose metabolism gene expression. **European Respiratory Journal**. 2011; 37(6):1453-1465.
- LUO A. et al. Differentiation-associated genes regulated by c-Jun and decreased in the progression of esophageal squamous cell carcinoma. **PLoS One**. 2014;9(5):e96610.
- MAIMAITI, A. et al. MicroRNA expression profiling and functional annotation analysis of their targets associated with the malignant transformation of oral leukoplakia. **Gene**. 2015; 558(2):271-277.
- METWALY, H. et al. Parenchymal-stromal switching for extracellular matrix production on invasion of oral squamous cell carcinoma. **Human Pathology**. 2012; 43(11):1973-1981.
- MISHRA, S et al. CSNK1A1 and Gli2 as Novel Targets Identified Through an Integrative Analysis of Gene Expression Data, Protein-Protein Interaction and Pathways Networks in Glioblastoma Tumors: Can These Two Be Antagonistic Proteins? **Cancer Inform**. 2014;13:93-108.
- MITRA, AK et al. Ligand independent activation of c-Met by fibronectin and  $\alpha 5\beta 1$ -integrin regulates ovarian cancer invasion and metastasis. **Oncogene**. 2011 31; 30(13): 1566-1576.
- MONDAL, G. et al. Overexpression of Cdc20 leads to impairment of the spindle assembly checkpoint and aneuploidization in oral cancer. **Carcinogenesis**. 2007; 28(1):81-92.
- NEGISHI, A. et al. Quantitative proteomics using formalin-fixed paraffin-embedded tissues of oral squamous cell carcinoma. **Cancer Science**. 2009; 100(9):1605-1611.
- NI, Y. et al. Potential biomarkers for oral squamous cell carcinoma: Proteomics discovery and clinical validation. **PROTEOMICS - Clinical Applications**. 2015; 9(1):86-97.
- NIGRO, E. et al. Differentially expressed and activated proteins associated with non small cell lung cancer tissues. **Respiratory Research**. 2015; 16(1):74-82.
- NOGUTI, J. et al. Metastasis from oral cancer: an overview. **Cancer genomics & proteomics**. 2012; 9(5):329-335.
- OMAR, E. Current concepts and future of noninvasive procedures for diagnosing oral squamous cell carcinoma - a systematic review. **Head & Face Medicine**. 2015; 11(1).
- ONG, S.-E.; MANN, M. Mass spectrometry-based proteomics turns quantitative. **Nature chemical biology**. 2005; 1(5): 252-262.

PATEL, V. et al. Proteomic analysis of laser-captured paraffin-embedded tissues: A molecular portrait of head and neck cancer progression. **Clinical Cancer Research**. 2008; 14(4): 1002-1014.

PATRA, S. et al. A short review on creatine-creatine kinase system in relation to cancer and some experimental results on creatine as adjuvant in cancer therapy. **Amino Acids**. 2012;42(6):2319-2330.

PETERSEN, P. E. Oral cancer prevention and control - The approach of the World Health Organization. **Oral Oncology**. 2009; 45(4):454-460.

PETTI, S. Lifestyle risk factors for oral cancer. **Oral Oncology**. 2009; 45(4): 340-350.

POLACHINI, G. M. et al. Proteomic Approaches Identify Members of Cofilin Pathway Involved in Oral Tumorigenesis. **PLoS One**. 2012; 7(12):1-13.

QI, Z et al. The Characteristics and Function of S100A7 Induction in Squamous Cell Carcinoma: Heterogeneity, Promotion of Cell Proliferation and Suppression of Differentiation. **PLoS One**. 2015; 10(6): e0128887.

RAPPSILBER, J.; MANN, M.; ISHIHAMA, Y. Protocol for micro-purification, enrichment, pre-fractionation and storage of peptides for proteomics using StageTips. **Nat Protoc**. 2007;2(8):1896-906.

ROMANSKA, H. M. et al. Loss of CD151/Tspan24 from the complex with integrin  $\alpha 5 \beta 1$  in invasive front of the tumour is a negative predictor of disease-free survival in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**. 2013; 49( 3):224-229.

SAITO, R. et al. A travel guide to Cytoscape plugins. **Nat Methods**. 2012; 9(11):1069-1076.

SAKAI et al. The roles of interferon regulatory factors 1 and 2 in the progression of human pancreatic cancer. **Pancreas**. 2014;43(6):909-16.

SALAHSHOURIFAR I et al. Downregulation of CRNN gene and genomic instability at 1q21.3 in oral squamous cell carcinoma. **Clin Oral Investig**. 2015.

SANTAMERINA E et al. Biomarker level improves the diagnosis of embolic source in ischemic stroke of unknown origin. **J Neurol**. 2012;259(12):2538-45.

SAWAZAKI-CALONE, I. et al. The prognostic value of histopathological grading systems in oral squamous cell carcinomas. **Oral Diseases**. 2015. Doi: 10.1111/odi.12343

SCHAAIJ-VISSER, T. B. M. et al. Differential proteomics identifies protein biomarkers that predict local relapse of head and neck squamous cell carcinomas. **Clinical Cancer Research**. 2009; 15(24):7666-7675.

SCULLY, C.; BAGAN, J. Oral squamous cell carcinoma overview. **Oral Oncol.** 2009; 45(4-5):301-8.

SEPIASHVILI, L. et al. Potentially Novel Candidate Biomarkers for Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Identified Using an Integrated Cell Line-based Discovery Strategy. **Molecular & Cellular Proteomics.** 2012; 11(11):1404-1415.

SHARMA, M. et al. Molecular changes in invasive front of oral cancer. **Journal of oral and maxillofacial pathology : JOMFP.** 2013; 17(2):240-247.

SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer Statistics. 2015; 65(1):5–29.

SINHA, N. et al. Relevance of cancer initiating/stem cells in carcinogenesis and therapy resistance in oral cancer. **Oral Oncology.** 2013; 49(9):854-862.

STAUB, E. et al. Genome-wide expression patterns of invasion front, inner tumor mass and surrounding normal epithelium of colorectal tumors. **Mol Cancer.** 2007; 14;(6):79-84.

SUGIHARA, Y. et al. Laser microdissection and two-dimensional difference gel electrophoresis reveal proteomic intra-tumor heterogeneity in colorectal cancer. **Journal of Proteomics.** 2013; 78:134-147.

TIRELLI, G. et al. Open questions and novel concepts in oral cancer surgery. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology.** 2015. DOI 10.1007/s00405-015-3655-0

TROELTZSCH, M. et al. Clinicopathologic Features of Oral Squamous Cell Carcinoma: Do They Vary in Different Age Groups? **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery.** 2014:1291-1300.

TSAI, J. H.; YANG, J. Epithelial – mesenchymal plasticity in carcinoma metastasis. p. **Genes e Dev.** 2013; 27(20):2192–2206.

TUNG, C. L. et al. Proteomics-based identification of plasma biomarkers in oral squamous cell carcinoma. **Journal of Pharmaceutical and Biomedical Analysis.** 2013; 75(2):7-17.

TÚRI, K. et al. An analysis of the epidemiological and etiological factors of oral tumors of young adults in a central-eastern european population. **Pathology and Oncology Research.** 2013; 19( 3): 353-363.

UCHIYAMA, Y. et al. Imaging mass spectrometry distinguished the cancer and stromal regions of oral squamous cell carcinoma by visualizing phosphatidylcholine (16:0/16:1) and phosphatidylcholine (18:1/20:4). **Analytical and Bioanalytical Chemistry.**2014; 406(5):1307-1316.

UDEABOR, SE. et al. Squamous cell carcinoma of the oral cavity and the oropharynx in patients less than 40 years of age: a 20-year analysis. **Head Neck Oncol.** 2012;4:28. Doi: 10.1186/1758-3284-4-28.

WANG, C. et al. Tumor budding correlates with poor prognosis and epithelial-mesenchymal transition in tongue squamous cell carcinoma. **Journal of Oral Pathology and Medicine.** 2011; 40(7):545-551.

WANG, L. et al. C-CAM1, a candidate tumor suppressor gene, is abnormally expressed in primary lung cancers. **Clin Cancer Res.** 2000;6(8):2988-2993.

WANG, X. et al. Expression of methionine adenosyltransferase 2A in renal cell carcinomas and potential mechanism for kidney carcinogenesis. **BMC Cancer.** 2014; 14(1):196-201.

WEINBERGER, P. M. et al. Use of combination proteomic analysis to demonstrate molecular similarity of head and neck squamous cell carcinoma arising from different subsites. **Archives of otolaryngology--head & neck surgery.** 2009;135(7): 694-703.

WOLF, G. T. et al. Tumor infiltrating lymphocytes (TIL) and prognosis in oral cavity squamous carcinoma: A preliminary study. **Oral Oncology.** 2015; 51(1): 90-95.

XIE, N. et al. Tumor budding correlates with occult cervical lymph node metastasis and poor prognosis in clinical early-stage tongue squamous cell carcinoma. **Journal of Oral Pathology & Medicine.** 2015; 44(4): 266-272.

XIE, R. et al. Factors influencing the degradation of archival formalin-fixed paraffin-embedded tissue sections. **The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society.** 2011; 59(4): 356-365.

YI et al. Interferon regulatory factor (IRF)-1 and IRF-2 are associated with prognosis and tumor invasion in HCC. **Ann Surg Oncol.** 2012; 20(1):267-76.

ZHENG, J.; QIU, W.; ZHANG, Z. Combined and sequential treatment of oral and maxillofacial malignancies: an evolving concept and clinical protocol. **Chinese medical journal.** 2008; 121(19):1945-1952.

ZHU, Y. et al. Proteomic Analysis of Solid Pseudopapillary Tumor of the Pancreas Reveals Dysfunction of the Endoplasmic Reticulum Protein Processing Pathway. **Molecular & Cellular Proteomics.** 2014; 13(10): 2593-2603.

## ANEXO 1

FACULDADE DE CIÊNCIAS  
MÉDICAS - UNICAMP  
(CAMPUS CAMPINAS)



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Estudo da composição de proteínas na área de invasão de carcinoma epidermóide por proteômica baseada em espectrometria de massas.

**Pesquisador:** Carolina Moretto Carnielli

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 23163113.5.1001.5404

**Instituição Proponente:** Instituto de Biologia - Unicamp

**Patrocinador Principal:** FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 435.570

**Data da Relatoria:** 22/10/2013

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo a ser realizado no âmbito de uma tese de doutorado, com apoio financeiro da Fapesp. Para tal, serão avaliadas 25 amostras que encontram-se nos arquivos do Serviço de Histopatologia da Área de Patologia Bucal da FOP-UNICAMP. O estudo é retrospectivo e para tal serão usadas lâminas de tecido fixadas em parafina, as quais foram analisadas previamente por patologistas da Instituição. A pesquisa envolve a combinação das técnicas de microdissecção a laser, espectrometria de massas e bioinformática, com vistas a indicar as proteínas que podem elucidar os mecanismos de interação entre o estroma de tumores, sua progressão e invasão.

#### Objetivo da Pesquisa:

- Identificar as proteínas presentes no estroma na frente do tumor, em comparação a regiões do estroma dentro do tumor e na margem normal.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Não haverá risco, pois serão utilizadas amostras de tecido fixadas em parafina, cujo procedimento é de rotina na Instituição e nenhum procedimento adicional será realizado. Será um estudo retrospectivo, cujos casos já foram analisados anteriormente por patologistas e as lâminas

**Endereço:** Rua Tessália Vieira de Camargo, 126  
**Bairro:** Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887  
**UF:** SP **Município:** CAMPINAS  
**Telefone:** (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br

Continuação do Parecer: 435.570

estocadas ao longo dos anos. Como benefício, pode-se citar o melhor entendimento dos eventos associados com o desenvolvimento do carcinoma oral de células escamosas.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de um estudo de alta relevância, onde se propõe o uso de diferentes técnicas de análise para indicar proteínas que podem elucidar os mecanismos de interação entre o estroma de tumores, sua progressão e invasão. Investigações da comunicação tumor-estroma e estroma-estroma podem revelar novas estratégias terapêuticas para o estudo do câncer oral.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Os termos de apresentação obrigatória apresentados foram:

- Folha de rosto com indicação da pesquisadora responsável e assinada pela diretora do Instituto de Biologia; projeto de pesquisa detalhado; informações básicas nos moldes exigidos pela CONEP; declaração do Prof. da área de Patologia da FOP/Unicamp- Piracicaba- fornecendo as amostras de carcinoma epidermóide oral, as quais se encontram fixadas e emblocadas em parafina nos arquivos da instituição.
- Pesquisadora solicitou dispensa do TCLE, visto que o projeto é um estudo retrospectivo que usará lâminas que já foram utilizadas para o diagnóstico e estocadas na instituição. Mesmo com o acesso aos prontuários, os pesquisadores se comprometem a manter o anonimato da fonte de dados, e que não haverá divulgação do nome ou de dados pessoais dos pacientes na publicação dos resultados ou na apresentação de trabalhos referentes à pesquisa. Justificativa aceita.

**Recomendações:**

--

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Projeto parovado sem restrições, com dispensa de apresentação de TCLE.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Mantido o parecer de aprovação pelo colegiado em reunião de 22/10/2013.

Ao pesquisador cabe desenvolver o projeto conforme delineado, elaborar e apresentar os relatórios parciais e final, bem como encaminhar os resultados para publicação,

Endereço: Rua Tessália Vieira de Camargo, 126  
Bairro: Barão Geraldo CEP: 13.083-887  
UF: SP Município: CAMPINAS  
Telefone: (19)3521-8936 Fax: (19)3521-7187 E-mail: cep@fcm.unicamp.br

FACULDADE DE CIENCIAS  
MEDICAS - UNICAMP  
(CAMPUS CAMPINAS)



Continuação do Parecer: 435.570

com os devidos créditos aos pesquisadores associados e ao pessoal técnico participante do projeto (Resolução 466/2012 CNS/MS).

CAMPINAS, 24 de Outubro de 2013

Assinador por:  
**Fátima Aparecida Bottcher Luiz**  
(Coordenador)

**Dra. Renata Maria dos Santos Celeghini**  
Coordenadora de Comitê de Ética em Pesquisa  
PRP / UNICAMP  
Matricula: 28700-9

**Endereço:** Rua Tessália Vieira de Camargo, 126  
**Bairro:** Barão Geraldo **CEP:** 13.083-887  
**UF:** SP **Município:** CAMPINAS  
**Telefone:** (19)3521-8936 **Fax:** (19)3521-7187 **E-mail:** cep@fcm.unicamp.br



## PROJETO DE PESQUISA ENVOLVENDO SERES HUMANOS

Projeto de Pesquisa: Estudo da composição de proteínas na área de invasão de carcinoma epidermóide por proteômica baseada em espectrometria de massas.

## Informações Preliminares

## Responsável Principal

CPF: 36856565895	Nome: Carolina Moretto Carnielli
Telefone: (16) 9197-4666	E-mail: carolina_carnielli@yahoo.com.br

## Instituição Proponente

CNPJ:	Nome da Instituição: Instituto de Biologia - Unicamp
-------	--

É um estudo internacional? Não

## Assistentes

CPF	Nome
920.856.361-87	Adriana Franco Paes Leme

## Equipe de Pesquisa

CPF	Nome
09241010673	Carolina Carneiro Soares Macedo

## Área de Estudo

Grandes Áreas do Conhecimento (CNPq)

- Grande Área 4. Ciências da Saúde

Propósito Principal do Estudo (OMS)

- Ciências Básicas

Título Público da Pesquisa: Estudo da composição de proteínas na área de invasão de carcinoma epidermóide por proteômica baseada em espectrometria de massas.

## Contato Público

CPF	Nome	Telefone	E-mail
36856565895	Carolina Moretto Carnielli	(16) 9197-4666	carolina_carnielli@yahoo.com.br

Contato: Carolina Moretto Carnielli