

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA MARIA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CIÊNCIAS
ODONTOLÓGICAS**

**ANÁLISE MORFOLÓGICA DE ISOFORMAS DE
MIOSINA NÃO MUSCULAR TIPO II EM CARCINOMA
EPIDERMÓIDE**

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO

Otávio Francisco Dias

**Santa Maria, RS, Brasil
2012**

ANÁLISE MORFOLÓGICA DE ISOFORMAS DE MIOSINA NÃO MUSCULAR TIPO II EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE

Otávio Francisco Dias

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, Área de Concentração em Odontologia, com ênfase em Patologia Bucal, da Universidade Federal de Santa Maria (UFSM,RS) em associação com a Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS, RS), como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Odontológicas.**

Orientador: Prof. Dr. Marcelo Lazzaron Lamers

Santa Maria, RS, Brasil

2012

Universidade Federal de Santa Maria
Centro de Ciências da Saúde
Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas

A Comissão Examinadora, abaixo assinada, aprova a Dissertação de Mestrado:

**ANÁLISE MORFOLÓGICA DE ISOFORMAS DE MIOSINA NÃO MUSCULAR TIPO
II EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE**

elaborada por

Otávio Francisco Dias

como requisito parcial para obtenção do grau de **Mestre em Ciências Odontológicas**

COMISSÃO EXAMINADORA:

Marcelo Lazzaron Lamers, Dr.

(Presidente/Orientador)

Manoela Domingues Martins, Dra. (UFRGS)

Laura de Campos Hildebrand, Dra. (UFRGS)

Santa Maria, 29 de Agosto de 2012.

AGRADECIMENTOS

A Deus

Aos meus familiares

*Ao meu orientador, prof Dr **Marcelo Lazzaron Lamers***

*À professora da disciplina de Patologia Bucal da UFSM, Dra **Cristiane Cademartori Danesi***

*Aos **professores** do PPGCO (UFSM) e do departamento de patologia bucal da UFRGS*

*Ao **curso de Odontologia** e **departamentos de Patologia Bucal** da UFSM e da UFRGS*

*À **equipe técnica** dos laboratórios de Imunoistoquímica e Biologia Bucal da UFRGS em especial às funcionárias técnicas **Isabel da Silva Lauxen** e **Alessandra Sellinger Magnusson***

*Ao **laboratório de Histofisiologia comparada** –Simone Marcuzzo- UFRGS*

*À funcionária da pós-graduação da UFSM, **Jéssica Dalcin da Silva***

*Aos **pacientes** do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA)*

*À **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)***

*Aos **membros da banca.***

O coração ainda é primitivo. E é bom que as universidades ainda não tenham encontrado um jeito de ensinar ao coração e torná-lo civilizado. Essa é a única esperança que a humanidade tem de sobreviver.

(Osho)

RESUMO

Dissertação de Mestrado
Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas
Universidade Federal de Santa Maria

ANÁLISE MORFOLÓGICA DE ISOFORMAS DE MIOSINA NÃO MUSCULAR TIPO II EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE

AUTOR: OTÁVIO FRANCISCO DIAS

ORIENTADOR: MARCELO LAZZARON LAMERS

Data e Local da Defesa: Santa Maria, 29 de Agosto de 2012.

A migração celular é uma característica proeminente na metástase do câncer e a caracterização de proteínas relacionadas com a migração é importante para que se compreenda o comportamento de células tumorais e sua capacidade de invasão durante a progressão tumoral. Entre as proteínas envolvidas na migração celular, as isoformas de miosina não-muscular do tipo II desempenham um papel central em vários eventos relacionados com a migração de células, como a contratilidade, a adesão e a sinalização celular. Existem três isoformas de miosina do tipo II que podem ser expressas em células de mamíferos: miosina IIA (MIIA), miosina IIB (MIIB) e miosina IIC (MIIC). Entretanto, poucos estudos têm sido realizados para caracterizar a sua expressão e padrões de distribuição em células de diferentes tipos de tumores, incluindo carcinoma epidermóide. O objetivo do estudo foi analisar a expressão e distribuição de isoformas de miosina II (A, B e C) em fragmentos de peça cirúrgica de carcinoma epidermóide. Os fragmentos de peça cirúrgica foram coletados a partir de distintas regiões do tumor: a zona livre de tumor, o centro do tumor e a zona de invasão. Estas amostras (n = 4) foram fixadas, crioprotegidas, cortadas em criostato, submetidas à imunolocalização de MIIA, MIIB e MIIC e analisadas em microscopia confocal. As três isoformas de miosina II foram expressas diferentemente e apresentaram distribuição distinta de acordo com a região da amostra de tumor. MIIA e MIIC foram superexpressas na zona central quando comparadas com a zona livre, ao passo que MIIB revelou forte marcação para região de zona de invasão. Com base nas presentes observações, as isoformas de miosina IIA e IIC pareceram estar mais associadas ao evento de proliferação tumoral ao passo que MIIB pareceu mostrar-se mais envolvida com o comportamento invasivo do tumor, indicando que as isoformas podem participar de formas distintas na regulação do comportamento e do desenvolvimento do tipo de tumor analisado.

Palavras-chave: Câncer. Migração Celular. Citoesqueleto. Biomarcadores Tumorais. Metástase.

ABSTRACT

Cell migration is a prominent feature in cancer metastasis and the characterization of proteins related to migration is important in order to understand the behavior of tumor cells and their invasiveness during tumor progression. Among the proteins involved in cell migration, isoforms of non-muscle myosin type II play a pivotal role in several events related to cell migration, such as contractility, adhesion and cellular signaling. There are three isoforms of myosin type II that can be expressed in mammalian cells: myosin IIA (MIIA), myosin IIB (MIIB) and myosin IIC (MIIC). However, few studies have been conducted to characterize the expression and distribution patterns in cells of different types of tumors, including oral squamous cell carcinoma. The aim of the study was to analyze the expression and distribution of isoforms of myosin II (A, B and C) in surgical fragments of squamous cell carcinoma. Fragments of surgical specimen were collected from different regions of the tumor: a tumor-free zone, the center of the tumor and the invasion zone. These samples (n = 4) were fixed, crioprotected, cut on criostat, submitted to immunolocalization of MIIA, MIIB and MIIC and analyzed on confocal microscopy. The three isoforms of myosin II were expressed differently and showed distinct distribution in accordance with the region of the tumor sample. MIIA and MIIC were overexpressed at the center zone when compared with the free zone, whereas strong staining revealed MIIB at the zone invasion. Based on these observations, the isoforms of myosin IIC and IIA appeared to be more associated with tumor proliferation while MIIB appeared to be more involved in the invasive behavior of tumor, indicating that the isoforms can participate in different ways regulating the behavior and development of tumor type analyzed.

Keywords: Cancer. Cell Migration. Cytoskeleton. Cancer Biomarkers. Metastasis.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	9
2. REVISÃO DE LITERATURA	11
2.1 Mecanismos envolvidos na Progressão Tumoral.....	12
2.2 Eventos envolvidos na migração celular.....	13
2.3 Proteínas contráteis	14
2.4 Papel da miosina na migração celular	15
2.5 Papel da miosina na progressão tumoral	17
3 OBJETIVOS.....	19
4 MATERIAIS E MÉTODOS.....	20
4.1 Considerações éticas.....	20
4.2 Amostras	20
4.3 Coleta	21
4.4 Delineamento do estudo.....	22
4.4.1 Descongelamento, processamento e inclusão das amostras coletadas	22
4.4.2. Reação de Imunolocalização e Análise Morfológica das Isoformas de Miosina Não Muscular tipo II.....	23
5 RESULTADOS	25
5.1. Isoforma de miosina IIA:	25
5.2. Isoforma de Miosina IIB:	29
5.3. Isoforma de Miosina IIC:	33
6 DISCUSSÃO	38
7 CONCLUSÃO.....	44
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	45
9 ANEXOS	51
10 APÊNDICES	54

1. INTRODUÇÃO

Segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS, 2012) registram-se cerca de 10 casos de câncer oral para cada 10.000 indivíduos na maior parte do mundo. O mais frequente é o carcinoma epidermóide bucal, correspondendo a cerca de 95% das neoplasias orais (Brener et al., 2007). Recente estudo epidemiológico identificou o Brasil como um dos três países em desenvolvimento com maior incidência de câncer de cavidade oral (Cancela et al., 2010).

Dentre os traços fenotípicos que uma célula precisa adquirir para que ocorra a progressão de um tumor, têm-se a invasão tecidual e o desenvolvimento de potencial metastático, podendo ser considerados as maiores causas de insucessos clínicos em termos de terapia e prognóstico (Painter et al., 2010).

A invasão tumoral facilita a emergência de metástases, espalhando as células do câncer para outras partes do corpo e contribuindo para a formação de tumores à distância. A migração celular é uma característica crítica para a ocorrência de metástases (Boateng & Huttenlocher, 2012). Miosinas não-musculares tipo II são proteínas motoras que participam do controle da dinâmica do citoesqueleto e são consideradas protagonistas da migração celular (Chen et al., 2012). Três isoformas de miosina do tipo II são expressas em células de mamíferos: miosina IIA (MIIA), miosina IIB (MIIB) e miosina IIC (MIIC). A distinção entre as três moléculas de miosina II é baseada em suas únicas cadeias pesadas, uma vez que cada isoforma realiza a mesma função molecular básica, que é a ligação e a contração do citoesqueleto de actina de uma forma ATP-dependente, gerando força dentro do corpo celular e na parte traseira da célula através da retração, possibilitando a translocação do corpo celular e separação das adesões (Vicente-Manzanares et al., 2009). A força gerada por miosina II também suprime protrusão nos lados da célula, mantém a estabilidade da polaridade e da tração e promove maturação da adesão e sua estabilidade (Gupton et al., 2005; Betapudi et al., 2006; Cramer, 2010; Parsons et al., 2010).

O aumento da atividade ou expressão das proteínas RhoA e RhoC, proteínas de sinalização relacionadas à regulação da atividade de miosina, foram encontrados em neoplasias humanas de maneira proporcional ao grau de malignidade. Estas alterações levaram a um aumento da contratilidade celular, a qual resultou em

alterações na orientação do fuso mitótico em relação ao substrato, eventualmente facilitando a separação de células-filho de um lençol epitelial (Vasiliet et al., 2004; Jana et al., 2006). Este aumento de contratilidade também é necessário para que as células tumorais consigam transpor barreiras de matriz extracelular mais espessas (Wyckoff et al., 2006). Estudos recentes *in vitro* têm demonstrado dramático aumento no perfil de atividade de isoformas de miosina (especialmente IIA e IIB) após indução de eventos de migração celular em células tumorais e também após indução de transição epitélio-mesênquima (Dulyaninova et al., 2007; Salhia et al., 2008; Di Wu et al., 2009; Khuon et al., 2010; Beach et al., 2011; Kim & Adelstein, 2011).

Adicionalmente, o uso de inibidores da contratilidade celular, como as drogas blebstatina e ML-7, é capaz de influenciar o comportamento invasivo de células originadas de diferentes tipos tumorais (Kaneko et al., 2002; Duxbury et al., 2003; Tohtong et al., 2003; Betapudi et al., 2006; Gillespie et al., 2009; Sen et al., 2009; Ren et al., 2010).

A proposta do estudo foi descrever o padrão de distribuição e de expressão das isoformas de miosina II (A, B e C) em carcinoma epidermóide em três diferentes regiões do tumor (zona livre, zona central, zona de invasão). A hipótese principal do estudo foi a de que exista uma associação entre a alteração do nível de expressão e/ou distribuição de miosina e as diferentes regiões de tumor.

2. REVISÃO DE LITERATURA

As neoplasias têm como definição o termo “novo e desordenado crescimento”. Este alterado crescimento é observado em células neoplásicas, que por algum motivo, têm sua morfologia, migração e replicação alteradas, passando a ter certa autonomia e apresentando características de células mutantes dentro do organismo (Franco et al., 2010). Uma neoplasia maligna ou câncer caracteriza-se pela habilidade destas células de invadirem os tecidos circundantes.

Em relação ao câncer da cavidade oral, ou carcinoma epidermóide bucal, conforme dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA), a previsão de incidência desse câncer no Brasil para o ano de 2012 será de 14.170 novos casos, tendo uma maior incidência em homens, com cerca de 9.990 casos.

A agressividade do carcinoma epidermóide pode ser classificada conforme a invasividade, a percentagem de células indiferenciadas e a proliferação celular em carcinoma de grau I, II, III ou IV. Ressaltando a hipótese de que as características moleculares e morfológicas da frente de invasão são as mais importantes para o prognóstico do paciente e uma vez que eventos considerados importantes para a disseminação tumoral, como o ganho e perda de moléculas de adesão que ocorrem na interface tumor/hospedeiro, frequentemente se apresentam diferentes em outras partes (central e superficial de um mesmo tumor), criou-se o sistema de gradação histológica da frente de invasão (IFG) para o carcinoma epidermóide oral, em que somente as áreas mais invasivas do tumor são graduadas, a este sistema deu-se o nome de sistema de gradação das margens invasivas (Bryne et al., 1992). A figura 1 mostra a gradação histopatológica proposta por Bryne et al. em 1992.

Sistema de Gradação das Margens Invasivas				
	PONTUAÇÃO			
<i>Característica Morfológica</i>	1	2	3	4
<i>Grau de Ceratinização</i>	Altamente ceratinizado (>50% das células)	Moderadamente ceratinizado (20-50% das células)	Ceratinização mínima (5-20% das células)	Sem ceratinização (0-5% das células)
<i>Pleomorfismo Nuclear</i>	Pouco pleomorfismo nuclear (>75% das células maduras)	Moderadamente abundante pleomorfismo nuclear (50-75% das células maduras)	Abundante pleomorfismo nuclear (25-50% das células maduras)	Extremo pleomorfismo nuclear (0-25% das células maduras)
<i>Padrão de Invasão</i>	Compressivo, bordas infiltrantes bem delineadas	Infiltrante, cordões sólidos, bandas ou fios	Pequenos grupos ou cordões de células infiltrantes (n > 15)	Marcante e disseminada dissociação em grupos pequenos e/ou em células individuais
<i>Infiltrado Linfo - plasmocitário</i>	Marcante	Moderado	Leve	Ausente

Figura 1- Sistema de Gradação das Margens Invasivas proposta por Bryne et al. em 1992.

2.1 Mecanismos envolvidos na Progressão Tumoral

Os tumores podem apresentar aspectos comportamentais distintos de acordo com a evolução da doença. Dentre os fatores relacionados à progressão tumoral pode-se citar a invasão e a ocorrência de metástase. A invasão tecidual e o desenvolvimento de potencial metastático de tumores malignos é a maior causa de insucessos clínicos em termos de terapia e prognóstico. As invasões celulares, que podem ser coletivas ou individuais, são caracterizadas por alterações moleculares importantes, tais como modificação da adesão entre as células e a da adesão da matriz celular, facilitando o processo de invasão (Painter et al., 2010).

A migração celular é uma característica crítica de numerosos fenômenos fisiológicos e patológicos, incluindo metástases. A direcionalidade da migração das células é essencial para a manutenção de um tecido funcional. Contatos intercelulares intactos mantêm a estrutura do tecido e coordenam a migração celular. Contudo, as células migratórias de um tumor não são coordenadas, estão randomicamente orientadas e se dividem em grupos de confusa organização ou se isolam, levando à alteração da estrutura tecidual. Em tecido epitelial ocorre a ruptura da lâmina basal e invasão do tumor para dentro do tecido adjacente. Dentro deste processo invasivo, ocorre a transição de uma migração coletiva para uma migração individual conhecida como transição epitélio-mesênquima (TEM). Assim sendo, a invasão tumoral facilita a emergência das metástases, espalhando as células do

câncer para outras partes do corpo e contribuindo para a formação de tumores secundários (Guarino, 2007; Etienne-Manneville et al., 2008; Chauviere et al., 2010, Friedl & Alexander, 2011).

2.2 Eventos envolvidos na migração celular

A atividade migratória é um fenômeno cíclico que requer a ativação coordenada de moléculas estruturais e de sinalização, as quais vão determinar uma assimetria espacial, gerando uma morfologia polarizada. Quando a migração é iniciada, ocorre polimerização de actina na porção frontal da célula (leading edge), promovendo a formação de grandes projeções de membrana (lamelipódios) e o estabelecimento de novas adesões ao substrato. A adesão celular é um processo extremamente dinâmico e ocorre a partir da interação de proteínas transmembrana (integrinas) com proteínas da matriz extracelular resultando na liberação de moléculas sinalizadoras intracelulares bem como no recrutamento de proteínas moduladoras da ligação entre integrinas e proteínas do citoesqueleto. Algumas destas adesões nascentes amadurecem através da troca hierárquica e temporalmente definida de moléculas de adesão (turnover), as quais se ancoram em feixes contráteis de actina-miosina II (fibras de estresse) e geram forças contráteis que facilitam o movimento do corpo celular na direção determinada. O ciclo se encerra com a liberação das adesões na porção posterior da célula (Webb & Horwitz, 2003; Choi et al., 2008; Gardel et al., 2010; Parsons et al., 2010; Sandquist et al., 2010).

Cada etapa da migração celular é regulada por GTPases de baixo peso molecular pertencentes à família Rho (de Ras-homology), que desempenham um papel fundamental nesse processo. Quando ativadas, exercem seus efeitos por meio de uma vasta quantidade de proteínas efetoras. Entre estas GTPases, podemos destacar RhoA, que está envolvida principalmente com protrusão e contração celulares através da ativação de miosinas. (Karlsson et al., 2009).

2.3 Proteínas contráteis

As células apresentam um variado repertório de motores moleculares para mudanças de forma e motilidade, bem como para o transporte intracelular de vesículas e organelas. Esses processos de movimento são desempenhados por proteínas motoras, com especial ênfase para a família das miosinas as quais participam do controle da dinâmica do citoesqueleto de actina (Vicente- Manzanares et al., 2009). Até o momento, já foram descritas mais de 35 tipos de miosinas, sendo que 13 delas são expressas em seres humanos. A miosina é uma proteína de alto peso molecular constituída por um domínio catalítico denominado cabeça ou cadeia leve, e um domínio relacionado à sublocalização celular, denominado cauda ou cadeia pesada. A cadeia leve está relacionada à atividade ATPase, sendo constituída por um braço de alavanca em forma de hélice estendida que contém um número variável de sítios para interação com calmodulina (light chain binding sites). Já a cadeia pesada é constituída por uma região espiralada (coiled coil) a qual contém sequências de aminoácidos específicas que interagem com plataformas proteicas e determinam a sua localização. As moléculas de miosina têm uma ou duas cabeças; algumas delas podem ou ser individuais ou duplicadas dependendo das interações com os ligantes associados (Sweeney & Houdusse, 2010).

As miosinas do tipo II foram a primeira classe de miosinas a serem descritas. São hexâmeros consistindo de 2 cadeias pesadas e dois pares de cadeias leves. Elas possuem uma longa cauda do tipo alfa hélice espiralada que capacitam as miosinas a dimerizar e formar filamentos que projetam domínios motores. Já o domínio motor, quando ligado ao filamento de actina, sofre mudança conformacional o qual resulta em produção de força e contração permitindo o deslizamento dos filamentos de actina sobre os filamentos de miosina (Vicente-Manzanares et al., 2009). A atividade catalítica da miosina é controlada através de fosforilação da sua cadeia leve através das proteínas cinases da cadeia leve de miosina MLCK (*myosin light chain kinase*) (Sandquist et al., 2006).

A miosina II tem várias funções celulares, as quais são atribuídas às suas propriedades biofísicas e regulatórias. Três isoformas de miosinas do tipo II são expressas em células de mamíferos: miosina IIA (MIIA), miosina IIB (MIIB) e miosina IIC (MIIC). Essas três isomorfias são codificadas por três diferentes genes. Apesar de

considerável homologia, estas isoformas exibem diferenças em suas propriedades enzimáticas, localização celular e modelos de expressão tecidual. A distinção entre as três moléculas de miosina II é baseada em suas únicas cadeias pesadas, uma vez que cada isoforma realiza a mesma função molecular básica, que é a ligação e a contração de F-actina de uma forma ATP-dependente. (Sandquist et al., 2006).

2.4 Papel da miosina na migração celular

A contratilidade dos filamentos de actinmiosina desempenham um papel central nas células durante a motilidade. Para a formação do lamelopódio é necessária a produção de filamentos de actina com a produção de forças móveis na porção anterior da célula. Isto direciona a formação inicial da frente da célula e continuada protrusão na extremidade anterior (Figura 2). Miosina II associa-se com filamentos existentes de actina e usa sua atividade ATPase para gerar força motora dentro do corpo celular e na parte traseira da célula. Em algumas células, a miosina IIA se concentra no córtex, enquanto a miosina IIB encontra-se distribuída pelo citoplasma (Vicente-Manzanares et al., 2009). Em ambos os casos a força gerada por miosina II é necessária para a retração da parte posterior da célula (Kolega, 2003; Piekny et al., 2005), possibilitando a translocação do corpo celular, e a separação das adesões.

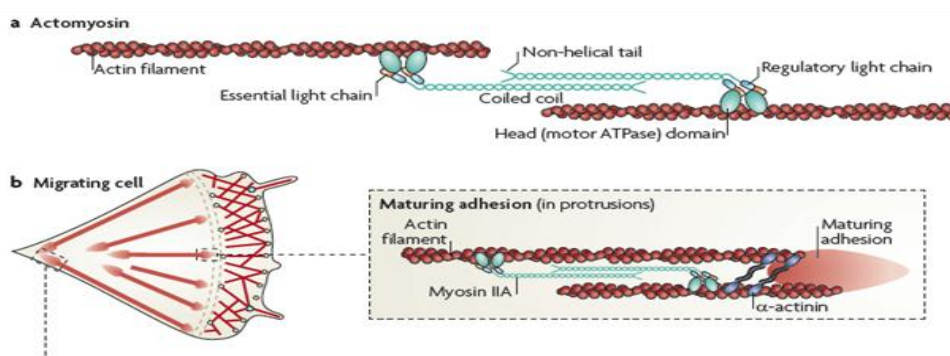


Figura 2- A) esquema representando o crosslink entre os feixes de actina (vermelho) e a proteína contrátil miosina (azul); B) esquema representando a tensão gerada na porção anterior, a qual permite o amadurecimento das adesões celulares e a manutenção do formato e a retração do corpo celular. (Parsons et al., 2010)

A força gerada por miosina II também suprime protrusão nos lados da célula e parte de trás, mantém a estabilidade da polaridade e da tração e promove maturação da adesão (Gupton et al., 2005; Betapudi et al., 2006, Cramer, 2010; Parsons et al., 2010). A maturação da adesão celular ocorre através da indução local de tensões que fornecem mudanças conformacionais em várias proteínas adesivas. Este processo ocorre através da ativação da GTPase RhoA que ativa a miosina II através da regulação da atividade da proteína MLCK. As células sentem as propriedades mecânicas dos substratos através da ativação de integrinas, a qual resulta na ativação das GTPases e subsequentemente modulam a atividade de miosina II, o tamanho e a composição dos complexos adesivos. Substratos densos exibem largas adesões focais dependentes de miosina II ao passo que células sobre substratos flexíveis apresentam menor índice de adesão. Os resultados desses ciclos, que atrelam adesão, contratilidade e sinalização, envolvem: 1- GTPases; 2- regulação da atividade de miosina II; e 3- tensão de actinmiosina. Esses três fatores desempenham papel central na polarização ântero-posterior da migração celular e consequentemente na regulação da mobilidade direcional. (Parsons et al., 2010). O balanço específico entre a atividade de miosina II e força de adesão (de acordo com o substrato em que a célula se encontra) pode mediar a geração de um fenótipo específico no módulo de contratilidade envolvendo adesões focais e filamentos de actina de maneira que otimize a migração celular (Gupton & Waterman-Storer, 2006).

Em estudo realizado por Sandquist et al. (2006), foram identificadas diferentes funções de miosina IIA e IIB em migração de lençóis de células epiteliais. Mostrou-se que a fosforilação de cadeia leve de miosina associada com MIIA ou MIIB é diferentemente regulada por Rho Kinase, sugerindo que ao menos parte de como MIIA e MIIB realizam suas funções celulares é regulada por diferentes caminhos sinalizantes. Células *knock out* para miosina IIA exibiram diminuição nas fibras de estresse e adesões focais, enquanto que células *knock out* para miosina IIB exibiram alta tendência em direção à retração do que extensão (Sandquist et al., 2006; Vicente-Manzanares et al., 2009). Evidências sugerem que miosina IIB possui uma maior taxa de rendimento e maior afinidade por ADP, sintonizando-se de forma prolongada na produção de força e com o mínimo consumo de energia (Wang et al., 2003); ao passo que miosina IIA é requerida para a reciclagem de filamentos da

parte distal para anterior em regiões do lamelipódio celular, onde ela pode contribuir para a estabilidade de adesão focal e maturação (Giannone et al., 2007; Breckerindge et al., 2010). A interação entre as isoformas é essencial para que se estabeleça uma polaridade ântero-posterior, em que miosina IIA exibe um papel mais dinâmico e um agrupamento anterógrado promovendo a protrusão e miosina IIB forma uma extremidade bem definida na região posterior da célula durante migração (Vicente-Manzanares et al., 2011). O papel da miosina IIC ainda é controverso, acredita-se que tenha função na regulação da extensão da membrana celular e na formação de contatos focais (Wylie & Chantler,2008), sendo que a sua expressão encontra-se aumentada em diferentes tipos de tumores (Jana et al., 2006).

2.5 Papel da miosina na progressão tumoral

Recentes investigações demonstram que um balanço de forças entre adesão celular do lado externo e contratilidade de miosina no interior da célula controla muitos aspectos do comportamento celular. A interrupção deste equilíbrio contribui para a patogênese de muitas doenças humanas, dentre elas o câncer. Para tanto, elaboradas vias de sinalização celular modulam a atividade de miosina II e mantém a homeostase tensional (Clark et al., 2007).

Uma das hipóteses que existe em relação aos mecanismos do processo metastático é que a invasão tecidual ocorre através de diferentes modos migratórios, como o ameboide e o mesenquimal, de uma maneira dependente da geração de força pela célula (Beach et al., 2011). Estudos recentes sugerem que a translocação nuclear pode ser uma etapa limitante durante migração 3D ameboide (Beadle et al., 2008; Breckenridge et al., 2009) enquanto outros estudos afirmam que a contração da região posterior celular é absolutamente necessária para invasão de células cancerígenas (Poincluxa et al.,2011) e a miosina não muscular II parece estar envolvida em ambos os processos (Beach et al.,2011).

O aumento da atividade ou expressão dos genes intimamente relatados RhoA e RhoC foram encontrados em neoplasias humanas de maneira proporcional ao grau de malignidade. Estas alterações levaram a um aumento da contratilidade

celular, a qual resultou em alterações na orientação do fuso mitótico em relação ao substrato, eventualmente facilitando a separação de células-filho de um lençol epitelial (Vasiliev et al., 2004; Jana et al., 2006).

Este aumento de contratilidade também é necessário para que as células tumorais consigam transpor barreiras de matriz extracelular mais espessas (Wyckoff et al., 2006). Beach et al. (2011) demonstraram *in vitro* um aumento dramático da fosforilação da cadeia pesada de ambas as isoformas de miosina IIA e IIB durante processo de transição epitélio-mesênquima, sugerindo que fluxos na expressão e fosforilação de miosina podem ter importantes papéis durante metástase de células cancerígenas. Diversos outros estudos *in vitro* têm demonstrado que a eficiência da migração de células oriundas de diferentes tipos de tumores pode estar relacionada em alguns estudos ora ao grau de atividade de miosina (análise de reguladores da proteína, por exemplo, MLCK) ora ao grau de expressão de miosina (análise por quantificação da proteína) (Dulyaninova et al. , 2007; Salhia et al.,2008; Di Wu et al., 2009; Khuon et al., 2009; Betapudi et al., 2011; Derycke et al., 2011; Kim & Adelstein, 2011; Ivkovic et al., 2012).

Adicionalmente, o uso de inibidores da contratilidade celular, como as drogas blebstatina e ML-7, é capaz de influenciar o comportamento invasivo de células originadas de diferentes tipos tumorais, alterando as características morfológicas e fisiológicas destas células (Kaneko et al.,2002; Duxbury et al., 2003; Tohtong et al., 2003 Betapudi et al., 2006; Gillespie et al.,2009; Sen et al., 2009; Ren et al., 2010).

3 OBJETIVOS

3.1. Objetivo geral

O objetivo deste trabalho foi analisar a distribuição das isoformas de miosina não muscular tipo II em diferentes regiões de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço.

3.2. Objetivos específicos

Realizar a imunolocalização das diferentes isoformas de miosina não muscular (tipos IIA, IIB e IIC) em distintas regiões do tumor: zona livre de tumor, centro e zona de invasão, comparando a sublocalização celular destas isoformas, a intensidade de marcação e a colocalização com o citoesqueleto de actina.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Considerações éticas

O protocolo de pesquisa do presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Pesquisa da Faculdade de Odontologia do Rio Grande do Sul (Anexo A), do Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas de Porto Alegre (Anexo B) e do Comitê de Ética da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (Anexo C).

4.2 Amostras

Durante um período de 07 meses analisamos um total de 08 amostras. Destas 08 amostras, 04 eram adequadas à proposta do projeto, ou seja, apresentavam as regiões de epitélio livre de tumor, de centro e de zona de invasão. A descrição das amostras e as imagens do exame histopatológico estão respectivamente presentes nas figuras abaixo:

Paciente	Sexo	Idade	TNM	Gradação Histopatológica	Localização	Tratamento	Follow-up (2 a 3 anos)
1	M	72anos	T3N2M0	Moderado	Assoalho de Boca	Cirurgia e radioterapia	Metástase em pulmão e órbita
2	M	69anos	T2M0N0	Moderado	Pescoço	Cirurgia	Sem lesão
3	M	46anos	T1M0N0	Baixo	Mucosa Jugal	Cirurgia	Sem lesão
4	F	71anos	T1N0M0	Baixo	Língua	Cirurgia	Sem lesão

Figura 3- Quadro contendo as informações dos pacientes cujas amostras foram coletadas para o estudo quanto à(ao): sexo, idade, TNM, gradação histopatológica, localização, tratamento e follow-up que consistiu em um período de 2 a 3 anos.

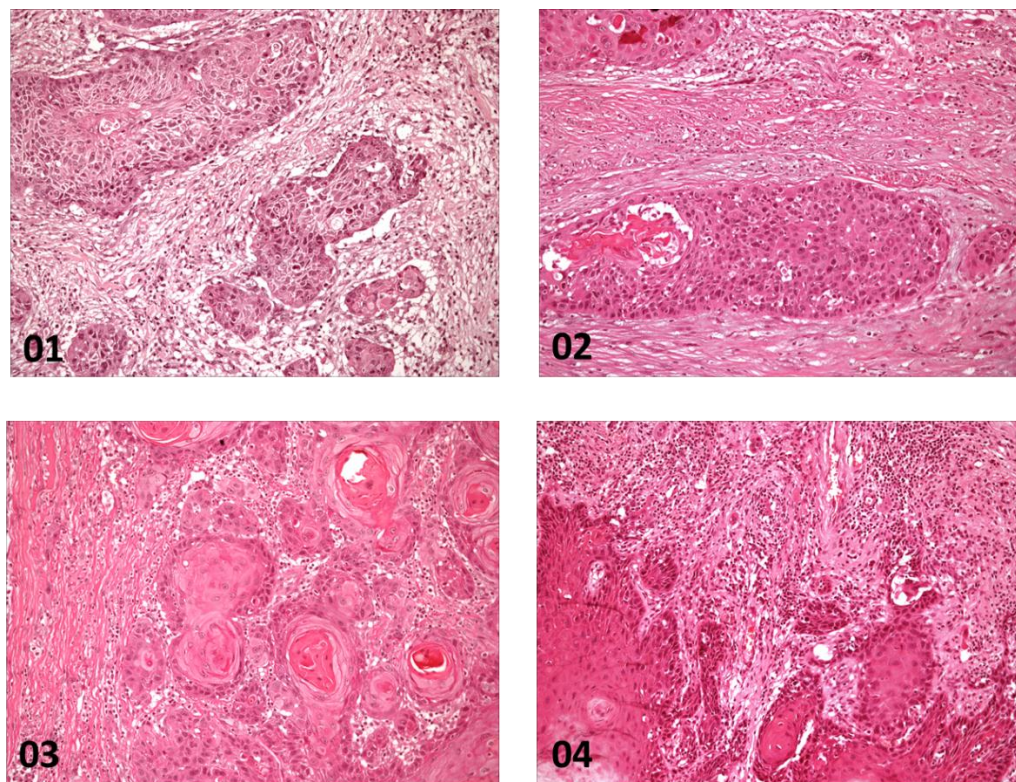


Figura 4- Imagens correspondentes à graduação histopatológica dos pacientes analisados. Pacientes 1 e 2 com graus moderados, exibindo abundante pleomorfismo nuclear, baixa ceratinização e ilhas de células infiltrantes. Pacientes 3 e 4 com graus baixos, exibindo pouco pleomorfismo nuclear e marcante ceratinização. Aumento de 200X.

4.3 Coleta

Após avaliação do paciente pela equipe de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do HCPA e estabelecimento do protocolo terapêutico de acordo com o estadiamento clínico do tumor (sistema TNM) estabelecido pela equipe médica, os pacientes foram consultados sobre a participação na pesquisa. Neste primeiro contato, foram dados esclarecimentos e respondidas possíveis dúvidas sobre o estudo para o paciente e acompanhante. O paciente ao demonstrar vontade de participar, assinou um termo de Consentimento Livre e Esclarecido (Apêndice A) e respondeu a uma entrevista com informações pertinentes à pesquisa (Apêndice B). Os dados referentes ao tumor foram registrados em uma ficha da pesquisa (Apêndice C). Foi criado um código para os dados pessoais dos pacientes os quais ficaram em posse do pesquisador responsável e as demais informações estiveram disponíveis apenas às pessoas envolvidas no estudo. Foram utilizados fragmentos de tecido coletados a

partir da peça cirúrgica, os quais não pudessem interferir no diagnóstico final e avaliação das margens da lesão afim de não gerar dano para o tratamento e prognóstico do paciente. A coleta foi realizada no Setor de Patologia junto ao bloco cirúrgico do HCPA e sob orientação da Equipe de Patologia do mesmo hospital, cujos membros não faziam parte deste grupo de pesquisa.

Foram coletados fragmentos de tecido de três regiões distintas: centro do tumor, evitando área de necrose; zona de invasão (limite entre epitélio neoplásico e sadio); zona de epitélio livre de tumor. Os fragmentos coletados das áreas de interesse foram armazenados em um criotubo, congelados em nitrogênio líquido e encaminhados para o biorrepositório da FO-UFRGS. De acordo com a rotina do hospital, o restante da peça cirúrgica foi fixada, processada para inclusão em parafina, corte e confecção de lâminas histológicas para diagnóstico e avaliação das margens do tumor no setor de Patologia do HCPA. Em um segundo momento estas lâminas foram disponibilizadas para que fosse realizada a graduação histológica para este estudo e voltaram para os arquivos do HCPA.

4.4 Delineamento do estudo

O estudo apresenta um delineamento observacional e analítico. Em relação às amostras obtidas, o material proveniente da borda invasiva, e que não foi utilizado para fins diagnósticos, foi coletado e encaminhado para a realização da imunofluorescência e análise morfológica das isoformas de miosina não muscular tipo II.

4.4.1 Descongelamento, processamento e inclusão das amostras coletadas

As amostras já divididas por regiões do tumor e tecido não neoplásico que estavam armazenadas no biorrepositório da FO-UFRGS foram descongeladas. Cada amostra foi removida individualmente e exposta a uma temperatura ambiente sobre uma superfície gelada durante um tempo suficiente para ser descongelada.

Logo após estas peças foram processadas, sendo fixadas em formaldeído 4% a uma temperatura ambiente por um período de 4h e depois crioprotetidas em

concentrações crescentes de sacarose a 10, 20 e 30% a 4°C por um período mínimo de 12h.

Após este intervalo de 12h, estes materiais foram incluídos em O.C.T. (Sakura Finetechnical Co., Tokyo), congelados em nitrogênio líquido e cortados em criostato (7 μ m). Os cortes foram colocados em lâminas revestidas de gelatina e armazenados (-20°C) até a análise por hematoxilina-eosina ou por imunofluorescência.

4.4.2. Reação de Imunolocalização e Análise Morfológica das Isoformas de Miosina Não Muscular tipo II

Após a rehidratação dos cortes, os sítios de ligação inespecíficos foram bloqueados por 1 h com solução de BSA diluído em PBS + tween 20 em diferentes concentrações (5%, 2% e 1%, 20 minutos cada). Os anticorpos primários MMIIA, MMIIIB, MMIIIC (Cell Signaling) foram diluídos em PBS + tween 20 na proporção 1:50 e os cortes incubados overnight em temperatura ambiente (TA). Após, os cortes foram lavados com PBS (3X, 5 minutos cada) e incubados com o anticorpo secundário apropriado, associado ao fluoróforo Alexa 488 (goat anti-rabbit; Life Technologies), diluído em PBS (contendo tween 20) na proporção de 1:1000, por 1 hora e meia a temperatura ambiente. O controle para os experimentos constou da omissão dos anticorpos primários, substituídos por solução de PBS. Após a lavagem, o material foi incubado com a toxina ligadora do citoesqueleto filamentososo de actina (faloidina) associada ao fluoróforo Rhodamina (Invitrogen-Molecular Probes) na proporção 1:100 por 1 hora e meia a TA. Após as lavagens finais com PBS (2X, 10 minutos cada) e com água destilada (1X, 10 minutos), o tecido foi montado com o uso de uma gota de Prolong Gold com Dapi (Invitrogen-Molecular Probes) e lamínulas, selado com esmalte, sendo após analisado em microscópio confocal (Olympus) em aumento de 63x. Foram realizados 20 cortes de 0,3 μ m utilizando zoom digital de 5X na região correspondente à borda de invasão.

As reações imunoistoquímicas foram realizadas pelo menos duas vezes para cada indivíduo, com duplicatas. Durante a análise confocal, apenas as fotos que mostraram os campos representativos foram tomadas (5-6 fotos/slide). Todas as análises morfológicas (análise qualitativa) foram realizadas por um examinador

devidamente calibrado antes e durante os experimentos. Foi feita sistematicamente uma análise da distribuição espacial das isoformas de miosina NMMII-A, NMM-IIB e NMM-IIC dentro das amostras teciduais, conforme repartição anatômica estipulada. Foram realizadas fotografias de todos os campos possíveis de uma mesma lâmina e entregues ao examinador. As figuras foram montadas com o software Olympus Fluoview (FV 1000, 2.0), sem processamento.

5 RESULTADOS

5.1. Isoforma de miosina IIA:

5.1.1. Zona Livre:

Em zona livre de tumor (Figura 5), a proteína miosina IIA (Figura 5-C,G) apresentou uma marcação na maior parte das células da camada espinhosa do epitélio. Intracelularmente, a marcação para MIIA foi observada principalmente na região do córtex celular sendo que, em determinadas regiões, apresentou uma fraca co-localização com actina (Figura 5-D,H).

5.1.2. Centro do tumor:

No centro do tumor, observou-se que houve uma menor distribuição da marcação de isoforma MIIA pela região tumoral, porém um aumento de intensidade (Figura 6-C,G) quando comparado com região de zona livre de tumor. (Figura 5-C,G) A isoforma também apresentou uma distribuição difusa no citoplasma celular. Também foi possível observar marcação mais pronunciada de co-localização com filamentos de actina (Figura 6-D,H) quando comparada com a zona livre de tumor (Figura 5-D,H).

5.1.3. Zona de invasão:

Em zona de invasão a isoforma de miosina IIA distribuiu-se de maneira difusa no citoplasma, com fraca presença na região do córtex celular (Figura 7- C,G). A isoforma IIA apresentou fraca co-localização com actina (Figura 7-D,H) quando comparada com as demais regiões do tumor.

5.2. Isoforma de Miosina IIB:

5.2.1. Zona livre:

Em zona livre do tumor, a isoforma de miosina IIB expressou-se mais em algumas regiões da camada basal do epitélio (Figura 8-C,G). MIIB foi observada envolvendo todo o córtex da maioria das células da camada basal do epitélio mostrando co-localização com filamentos de actina (figura 8-D,H). Esta expressão foi menos pronunciada em áreas mais distantes da camada basal . Adicionalmente, foi observada uma intensa marcação para MIIB nas células localizadas no tecido peritumoral.

5.2.2. Centro do tumor:

Em região central do tumor, MIIB foi marcadamente pronunciada em células epiteliais de borda de ilha tumoral, mais próximas de estroma de tecido conjuntivo (Figura 9-C,G) de maneira similar ao aumento observado em região de camada basal na região de zona livre de tumor, bem como nas células do tecido peritumoral (Figura 8-C,G). Entretanto, observou-se um aumento na intensidade de marcação na região de interface com o tecido peritumoral (Figura 9-C,G), a qual foi acompanhada de uma forte co-localização com actina (Figura 9-D,H). Esta isoforma não teve uma forte marcação em centro de tumor e sim nas células epiteliais mais externas e próximas do tecido conjuntivo.

5.2.3. Zona de Invasão:

Em região de zona de invasão, a isoforma de miosina IIB distribuiu-se difusamente ao longo da região tumoral.(Figura 10- C,G), principalmente nas células localizadas na periferia do tumor. MIIB apresentou uma marcação puntiforme na região do córtex celular, com uma forte colocação com o citoesqueleto de actina(Figura 10-D,H). Adicionalmente, algumas células tumorais apresentaram marcação na região perinuclear.

5.3. Isoforma de Miosina IIC:

5.3.1. Zona livre:

Na zona livre do tumor, MIIC mostrou-se fracamente expressa (Figura 11-C,G), distribuída na maior parte das células da camada espinhosa. A marcação para colocalização com filamentos de actina também mostrou-se restrita a algumas células localizadas em áreas distantes da membrana basal do epitélio.(Figura 11-D,H).

5.3.2. Centro do Tumor:

No centro do tumor, MIIC apresentou uma intensa marcação (Figura 12-C,G) quando comparada à zona livre do tumor (Figura 11-C,G), estando localizada de maneira puntiforme no citoplasma celular e bem organizada na região do córtex celular com uma forte co-localização com o citoesqueleto de actina (Figura 12-D,H). Sua distribuição foi consideravelmente difusa ao longo da região tumoral e não manteve um padrão constante em termos de morfologia, podendo apresentar-se ou em formato de estrias mais achatadas e alongadas ou mais curtas e espessas.

5.3.3. Zona de invasão:

Na região de zona de invasão, a isoforma de miosina IIC apresentou-se fracamente expressa (Figura 13-C,G). Quando presente, foi observada uma marcação nas células em contato com o tecido peritumoral com uma distribuição puntiforme na região do córtex celular com fraca localização com actina (Figura 13-D,H).

ISOFORMA	Análise	Z.livre	Centro	Z. Invasão
MIOSINA IIA	<i>Marcação</i>	BAIXA	ALTA	BAIXA
	<i>Distribuição</i>	Difusa	Difusa	Difusa
	<i>Localização</i>	Córtex	Córtex/Citoplasma	Citoplasma
MIOSINA IIB	<i>Marcação</i>	BAIXA	BAIXA	ALTA
	<i>Distribuição</i>	Pontual/Cam.Basal	Pontual/Cam.ext	Difusa
	<i>Localização</i>	Córtex	Córtex	Córtex
MIOSINA IIC	<i>Marcação</i>	BAIXA	ALTA	BAIXA
	<i>Distribuição</i>	Difusa	Difusa	Puntiforme
	<i>Localização</i>	Citoplasma	Córtex	Córtex

Figura 14- Quadro de resultados do presente estudo mostrando as marcações, distribuições e localizações da isoformas de miosina não muscular tipo II (A, B e C) nas três distintas regiões de tumor: zona livre, centro e zona de invasão.

6 DISCUSSÃO

Pacientes com carcinoma epidermóide de células escamosas em cabeça e pescoço, após receber o tratamento padrão, apresentam uma elevada taxa de recorrência do tumor. Esta taxa de recorrência é proporcional ao estágio de agressão da doença, sendo 30% para grau II, 50% para grau III e mais de 70% para grau IV (Meyers, 2010). Adicionalmente, estes pacientes apresentam um elevado desenvolvimento de metástases locais e distantes à origem do tumor, sendo este um indicativo do fenótipo migratório que as células tumorais adquirem. O progresso no desenvolvimento de tratamentos efetivos e de estratégias preventivas para o carcinoma epidermóide de células escamosas tem apresentado avanços modestos principalmente devido ao limitado conhecimento sobre os mecanismos celulares envolvidos no desenvolvimento, progressão e metástase da doença.

É provável que muitos dos mecanismos que dirigem a migração e manutenção de células normais estejam alterados tanto em relação à expressão, quanto à regulação da ação de proteínas como miosina não muscular tipo II durante a metástase de células tumorais. Portanto, o entendimento sobre o grau de expressão e de regulação de moléculas protagonistas da migração, contribui para o surgimento de novos candidatos a biomarcadores tumorais, bem como alvos potenciais de novas terapias coadjuvantes à remoção cirúrgica do tumor.

Entre as diferentes proteínas envolvidas no controle da migração celular, destacam-se as isoformas de miosina não-muscular do tipo II (MIIA, MIIB e MIIC). Estas proteínas estão relacionadas à contratilidade celular e, apesar de alta homologia, as isoformas apresentam características bioquímicas diferentes, as quais permitem alterações na performance migratória das células. No presente estudo foi observado que as três isoformas de miosina II (A, B e C) apresentaram perfil de distribuição e de expressão diferentes quando comparada a zona livre de tumor com as zonas centrais e de borda de invasão. As principais alterações foram relacionadas ao perfil de distribuição de MIIA e MIIC na região de centro de tumor, as quais apresentaram aumento na expressão e intensa marcação para colocalização com actina quando comparadas com a região de zona livre de tumor. Estas fortes imunomarcações para MIIA e MIIC não foram observadas em região de zona de invasão. Ao passo que observamos um aumento da expressão e intensa

marcação para colocalização com actina da isoforma de miosina IIB em região de zona de invasão, característica essa que não observamos em centro de tumor. Adicionalmente, MIIA apresentou uma marcação difusa em todas as amostras analisadas. Estes resultados, em concordância com Friedl & Alexander (2011), sugerem que, de acordo com o microambiente em que se encontra, a célula tumoral é capaz de modular o seu maquinário protéico relacionado à migração celular, o que geraria um perfil migratório mais adequado às barreiras que o tecido peritumoral impõe à célula tumoral. Esta plasticidade morfológica contribui para a criação de diversas rotas e programas de invasão tumoral, aumentando a heterogeneidade do tumor e sustentando a disseminação metastática.

Supõe-se a partir de nossas observações, que durante o processo de desenvolvimento do tumor, estas proteínas, em resposta à interação das células epiteliais com o microambiente tumoral, podem estar relacionadas a diferentes etapas do crescimento tumoral, uma vez que as isoformas sobressaíram-se distintamente de acordo com a região do tumor. As isoformas de miosina IIA e IIC tiveram uma maior marcação em região de centro de tumor, quando comparadas com zona livre o que nos permite supor que as mesmas estariam relacionadas mais com o evento de proliferação das células tumorais ao passo que a isoforma de miosina IIB marcou mais fortemente em região de zona de invasão quando comparada com ambas as isoformas e com zona livre de tumor, o que faz com que suponhamos que esta isoforma esteja mais intimamente relacionada com o alterado aspecto migratório que compõe o fenótipo das células invasivas.

O controle da distribuição das isoformas de miosina, pode estar relacionado à ação das células do tecido peritumoral. A regulação de miosina durante o desenvolvimento do tumor pode estar sendo influenciada pela relação que existe entre as células epiteliais tumorais e a matriz extracelular. O metabolismo da matriz extracelular é um importante aspecto da homeostase tecidual e pode determinar como as células respondem a um estresse agudo ou crônico. Clássicos estudos ultraestruturais e imunoistoquímicos como de Van den Hooff (1988) demonstram a alteração do estroma durante críticas etapas do processo neoplásico. Além disso, este estudo documentou mudanças na expressão de proteínas como vimentina, desmina e miosina muscular, que quando em resposta à inflamação, produzem muitas outras proteínas que refletem em um programa de diferenciação celular mesenquimal. Durante o desenvolvimento do tumor, estas proteínas e moléculas de

matriz extracelular embebidas no tecido neoplásico terminam por favorecer angiogênese, proliferação e migração de células dentro de compartimentos ectópicos teciduais (Tlsty & Coussens,2006). Sendo assim, a miosina não muscular tipo II, como uma proteína altamente envolvida em migração celular, pode ter um papel essencial durante este processo, ao interagir com moléculas e células da matriz extracelular, tais como os fibroblastos, através de regulados e recíprocos diálogos de sinalização que favoreçam a malignidade.

Em nossos resultados, foi observado que em região de centro de tumor, as células epiteliais mais próximas do estroma apresentaram uma forte marcação para co-localização de MIIB com actina ao longo da ilha tumoral. Acredita-se que a densa infiltração de fibroblastos que se interdigitam com ilhas tumorais em carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço pode promover um permissivo crescimento do microambiente tumoral (Lynch & Matrisian, 2002; Almholt & Johsen,2003). A aceleração de malignidades epiteliais dependentes de fibroblastos tem sido estabelecida em estudos *in vivo* e *in vitro* e estes estudos sugerem que mudanças na sinalização entre epitélio e estroma pode levar ao desenvolvimento e à progressão de um tumor (Meyers,2010). Neste contexto, o aumento no nível de expressão de miosinas associado a fatores indutores de alteração epitelial podem ter uma forte participação no processo de transição epitélio-mesênquima (TEM). Recente estudo realizado por Beach et al. (2011) utilizando células epiteliais mamárias revelou um dramático aumento da expressão de miosina IIB e da fosforilação da cadeia pesada de miosina IIA após transição epitélio-mesênquima induzida por TGF- β . Além disso, inibindo-se a expressão de MIIB após TEM houve redução da transmigração e da invasão das células. Sugere-se que a expressão destas isoformas podem ser componentes críticos no conjunto global de mudanças que induzem invasão celular durante processo de TEM.

Uma possível explicação para o perfil de alteração da expressão destas isoformas, pode estar relacionada à organização topográfica da matriz extracelular do tecido peritumoral. Quando observadas em matriz tridimensional, as células cancerígenas utilizam diferentes modos de migração em que se incluem a: 1- migração mesenquimal integrina-dependente, relacionada à adesão celular à matriz remodelada por metaloproteases (MMPs) e; 2- migração ameboide baseada na contração de células mais arredondadas (Poincluxa et al.,2011). A migração ameboide depende de alterações na morfologia das células tumorais de uma

maneira dependente da atividade de miosinas. Em nosso estudo, foi possível observar que miosina IIB, teve um aumento de expressão no córtex celular em região zona de invasão. Adicionalmente, observamos que estas células, quando comparadas com células de centro de tumor, possuíam um formato mais arredondado com forte marcação perinuclear da isoforma. Estes dados indicam que as células podem ter diferentes comportamentos conforme a região do tumor em que se encontra, onde em região central estariam mais envolvidas com migração mesenquimal (dependente de adesão celular), enquanto que na periferia ocorrem uma migração do tipo ameboide (dependente da atividade de MIIB)..

O controle celular da migração do tipo ameboide desempenha papel importante na transição epitélio-mesênquima. Beach et al. (2011) demonstraram, *in vitro*, que durante a TEM as isoformas de miosina IIB, mas não de IIA, permaneceram polarizadas com aumento de expressão da isoforma especificamente em regiões perinucleares. Esta diferença indica que MIIB pode facilitar a constrição nuclear e citoplasmática para que as células possam espremer-se em espaços mais limitados, passo este essencial para o processo de invasão intra e extratumoral. Em nosso estudo, observamos que na região de centro de tumor e na zona de invasão estas células apresentaram-se mais arredondadas a alongadas além de uma forte marcação da isoforma IIB em região perinuclear. Neste mesmo estudo realizado por Beach et al. (2011), durante o processo induzido de transição epitélio-mesênquima a isoforma de miosina IIA embora tenha revelado um aumento de expressão de fosforilação de cadeia pesada, ao contrário de miosina IIB ela não manteve-se polarizada durante o processo de transmigração.

Até o momento não foram realizados estudos com delineamentos semelhantes que explorem o nível de expressão especificamente de isoformas de miosinas não musculares tipo II em tumores. Os estudos realizados com pacientes com carcinoma epidermóide não basearam-se em imunolocalização protéica mas sim do emprego de técnicas proteômicas para caracterização de expressão de miosinas musculares esqueléticas (Qing-Yu He et al., 2004; Ibrahim et al., 2005; Turhani et al., 2006; Lo et al., 2007).

Actina e miosina são proteínas-chave do citoesqueleto que capacitam mobilidade celular e invasão, comportamento este que é essencial para a formação de um tumor epitelial (Friedl & Gilmour, 2009; Olson & Sahai, 2009). Betapudi (2010) mostrou que as isoformas de miosina IIA e IIB apresentam diferentes funções na

regulação da rede de filamentos de actina e formação de contatos focais determinam o destino da extensão do lamelipódio durante o processo de espalhamento celular. Jong et al., (2010), em estudo realizado em pacientes com lesões pré-malignas e malignas orais, revelou um aumento significativo da quantidade de miosina e de actina na saliva de pacientes com lesões mais agressivas (malignas) quando comparadas com as lesões pré-malignas. Estes resultados quantitativos vêm de encontro com os resultados neste trabalho, onde observamos que ocorre um aumento da co-localização de miosina com filamentos de actina para as três isoformas em região central destes tumores com alta grau de agressividade, quando comparado com as zonas livres do mesmo tumor.

A maioria dos estudos de caracterização do papel da miosina no controle da atividade migratória têm sido realizados *in vitro*, através do uso de diferentes linhagens de células tumorais. Por exemplo, Beadle et al.. (2008) observaram um aumento de expressão de isoformas de miosina IIA e IIB em linhagens de células de gliomas. Já em células de tumores de mama o uso de inibidores e/ou estimulantes de MIIA e MIIB influenciou diretamente o comportamento migratório destas células tumorais (Betapudi et al., 2006; Dulyaninova et al., 2007; Di Wu et al., 2009; Deryck et al., 2011; Kim & Adelstein, 2011). Siddarha et al., (2006) mostrou em seu estudo que um subtipo de miosina não muscular IIC é requerida para a ocorrência de citocinese em linhagens de células tumorais pulmonares. Apesar dos expressivos resultados, estudos *in vitro* necessitam ser interpretados com cautela em termos de implicações terapêuticas uma vez que estes estudos pobremente reproduzem o ambiente tridimensional, multicelular, hipóxico e vascular dos tumores *in vivo*. Não se tem realizado estudos *in vivo* explorando células epiteliais e em região oral de animais. Recente estudo realizado *in vivo* induzindo formação tumoral em pernas de ratos por indução de um agente pró-cancerígeno (Saha et al., 2011) após realização de imunolocalização para as três isoformas de miosina, identificou um significativo aumento de expressão de isoformas de miosina IIA e IIB em fibroblastos quando comparado o tecido sadio com o tecido tumoral, ao passo que a isoforma de miosina IIC expressou-se de forma desprezível. No presente trabalho, demonstramos pela primeira vez que as células dos fragmentos de peça cirúrgica oriundos do centro do tumor expressaram de maneira significativa as isoformas MIIA e MIIC quando comparadas com as células da zona livre de tumor, ao passo que as células oriundas de zona de invasão expressaram de maneira significativa a isoforma de

miosina IIB, indicando que estas isoformas podem participar de maneiras distintas na regulação do comportamento tumoral.

Apesar dos avanços, ainda são necessários mais estudos observacionais que averiguem não apenas o grau de expressão dessas isoformas, mas também o seu nível de regulação. Adicionalmente, torna-se necessário comparar não apenas as zonas livres com as tumorais de biópsias de pacientes com alto grau de agressividade de tumor, mas também analisar e correlacionar as diferenças de expressão de miosina tipo II entre as lesões potencialmente malignas, para assim fornecer uma maior compreensão de como estas proteínas são reguladas durante a progressão tumoral.

7 CONCLUSÃO

A análise de fragmentos de tecidos de pacientes com carcinoma epidermóide bucal demonstrou que as três isoformas de miosina não muscular tipo II expressaram-se diferentemente e apresentaram distribuição distinta de acordo com a região de amostra do tumor. A zona livre de tumor teve uma fraca marcação e difusa distribuição para as isoformas de miosina IIA e IIB. No presente estudo as isoformas de miosina IIA e IIC pareceram estar mais relacionadas com o evento de proliferação tumoral, onde foi possível observar uma forte marcação de ambas para a região de centro de tumor bem como uma forte marcação para colocalização com o citoesqueleto de actina e ambas tiveram uma fraca marcação em região de zona de invasão. Ao passo que a isoforma de miosina IIB pareceu estar mais envolvida com o processo de invasão tumoral, onde revelou forte marcação tanto para a isoforma quanto para colocalização com citoesqueleto de actina em região de zona de invasão e uma fraca marcação para região de centro de tumor, indicando que as isoformas podem participar de formas distintas na regulação do comportamento e do desenvolvimento do tipo de tumor analisado.

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Almholt K, Johnsen M . Stromal cell involvement in cancer. *Recent Results. Cancer Res* (2003) 162:31–42.

Beach JR, Hussey GS, Millera TE, Chaudhury A, Patele P, Monslow J, Zhenga Q, Kerif R, Reizesa O, Bresnicke AR, Howec PH and Egelhoffa TT. Myosin II isoform switching mediates invasiveness after TGF- β -induced epithelial–mesenchymal transition. *PNAS* (2011). 44: 17991-17996.

Beadle C, Assanah MC, Monzo P, Vallee R, Rosenfeld SS and Canoll P. The Role of Myosin II in Glioma Invasion of the Brain. *Molecular Biology of the Cell*. (2008) 19: 3357-3368.

Betapudi V, Gokulrangan G, Chance MR and Egelhoff TT. A Proteomic Study of Myosin II Motor Proteins during Tumor Cell Migration. *J. Mol. Biol.* (2011) 407 : 673–686.

Betapudi V, Licate LS, and Egelhoff TT. Distinct roles of nonmuscle myosin II isoforms in the regulation of MDA-MB-231. *Breast Cancer Cell Spreading and Migration. Cancer Res*(2006). 66: 4725-4733.

Betapudi ,V. Myosin II Motor Proteins with Different Functions Determine the Fate of Lamellipodia Extension during Cell Spreading. *PLoS ONE* (2010). 5: 1-14.

Boateng, L.R., Huttenlocher, A. Spatiotemporal regulation of Src and its substrates at invadosomes. *Eur. J. Cell Biol.* (2012).

Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional De Câncer José Alencar Gomes Da Silva (INCA). Estimativa 2012, incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: 2011.

Breckenridge MT, Dulyaninova NG, Egelhoff TT. Multiple Regulatory Steps Control Mammalian Nonmuscle Myosin II Assembly in Live Cells. *Molecular Biology of the Cell* (2009). 20:338-347.

Brener S, Jeunon FA, Barbosa AA, Grandinetti HAM. Carcinoma de células escamosas bucal: uma revisão de literatura entre o perfil do paciente, estadiamento clínico e tratamento proposto. *Rev. Brasileira de Cancerologia* (2007). 53(1): 63-69.

Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Kjaerheim Å. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. *J Pathol.*(1992). 166:375-81.

Chauviere A, Preziosi L, Byrne H. A model of cell migration within the extracellular matrix based on a phenotypic switching mechanism. *Math Med Biol.*(2010).3:255-81.

Chen L, Vicente-Manzanares M, Potvin-Trottier L, Wiseman PW, Horwitz AR. The Integrin-Ligand Interaction Regulates Adhesion and Migration through a Molecular Clutch. *PLoS ONE* (2012). 7:1-15.

Choi CK, Manzanares VM, Zareno J, Whitmore LA, Mogilner A, Horwitz AR. Actin and alpha-actinin orchestrate the assembly and maturation of nascent adhesions in a myosin II motor-independent manner. *Nat Cell Biol.*(2008). 10:1039-50.

Clark K, Langeslag M, Figdor CG and Leeuwen FN. Myosin II and mechanotransduction: a balancing act. *Trends In Cell Biology* (2007). 17: 178-186.

Cramer LP. Forming the cell rear first: breaking cell symmetry to trigger directed cell migration. *Nature Cell Biology* (2010). 12:628 – 632.

Derycke L, Stove C, Vercoutter-Edouart A, Wever OD, Dollé L, Colpaert N, Depypere H, Michalski J and Bracke M. The role of non-muscle myosin IIA in aggregation and invasion of human MCF-7 breast cancer cells. (2011) *Int. J. Dev. Biol.* 55: 835-840.

Dulyaninova NG, House RP, Betapudi V, Bresnick AR. Myosin-IIA heavy-chain phosphorylation regulates the motility of MDA-MB-231 carcinoma cells. *Mol Biol Cell* (2007). 18:3144–3155.

Duxbury MS, Stanley AW, Edward E and Whang EE. Inhibition of pancreatic adenocarcinoma cellular invasiveness by blebbistatin: a novel myosin II inhibitor. *Biochemical and Biophysical Research Communications*(2004). 313:992–997.

Etienne-Manneville SE. Polarity proteins in migration and invasion. *Oncogene* (2008) 27: 6970–6980.

Franco, M.; Montenegro, M.R.; De Brito, T.; Bacchi, C.E. & Cardoso De Almeida, P. - Patologia. Processos gerais. São Paulo: Atheneu, 2010. 331p.

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

Friedl P., Gilmour D. Collective cell migration in morphogenesis, regeneration and cancer. *Nat Rev Mol Cell Biol* (2009) 10: 445–457.

Gardel ML, Schneider IC, Aratyn SY and Waterman CM. Mechanical integration of actin and adhesion dynamics in cell migration. *Annual Review of Cell and Developmental Biology* (2010). 26: 315-333.

Giannone G, Dubin-Thaler BJ, Rossier O, Cai Y, Chaga O, Jiang G., Beaver W, Döbereiner H, Freund Y, Borisy G, Sheetz M. Lamellipodial Actin Mechanically Links Myosin Activity with Adhesion-Site Formation . *Cell* (2007). 128: 561–575,

Gillespie GY, Soroceanu L, Manning TJ., Gladson CL, and Rosenfeld SS. Glioma migration can be blocked by nontoxic inhibitors of Myosin II. *Cancer Res* (1999). 59: 2076-2082.

Gupton SL, Anderson KL, Kole TP, Fischer RS, Ponti A, Hitchcock-DeGregori SE, Danuser G, Fowler VM, Wirtz D, Hanein D, Waterman-Storer CM: Cell Migration without a lamellipodium: translation of actin dynamics into cell movement mediated by tropomyosin. *J. Cell Biol* (2005). 168: 619-631.

Gupton SL and Waterman-Storer CM: Spatiotemporal Feedback between Actomyosin and Focal-Adhesion Systems Optimizes Rapid Cell Migration. *Cell* (2006). 125: 1361-1374. Guarino M. Epithelial-mesenchymal transition and tumour invasion. *Int J Biochem Cell Biol* (2007). 39: 2153–2160.

He Q, Chen J, Kung HF, Yuen APW and Chiu J. Identification of Tumor-Associated Proteins in Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma by Proteomics. *Proteomics* (2004). 4: 271-278.

Ibrahim SO, Miron T, Krohn M, Amaratunga AS, Ya SW and Vasstrand EN. Tumour-associated Proteins in Oral Squamous Cell Carcinomas by Proteomics. *Cancer Genomics & Proteomics* (2005) 2: 353-364.

Ivkovic S, Beadle C, Noticewala S, Massey SC, Swanson KR, Toro LN, Bresnick AR, Canoll P and Rosenfeld SS. Direct inhibition of myosin II effectively blocks glioma invasion in the presence of multiple mitogens. *Molecular Biology of the Cell* (2012). 23: 533-542.

Jana SS, Kawamoto S, Adelstein RS. A specific isoform of nonmuscle myosin II-C is required for cytokinesis in a tumor cell line. *The Journal of Biological Chemistry*(2006). 281: 24662–24670.

Jong EP, Xie H, Onsong G, Stone MD, Chen X, Kooren JA, Refsland EW, Griffin RJ, Ondrey FG, Wu B, Le CT, Rhodus NL, Carlis JV, Griffin TJ. Quantitative Proteomics Reveals Myosin and Actin as Promising Saliva Biomarkers for Distinguishing Pre-Malignant and Malignant Oral Lesions. *PloS ONE* (2010). 5:1-8.

Karlsson R, Pedersen ED, Wang Z, Brakebusch C. BRIC. Rho GTPase function in tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta* (2009). 176 (2): 91–98

Kaneko K, Satoh K, Masamune A, Satoh A, Shimosegawa T: Myosin light chain kinase inhibitors can block invasion and adhesion of human pancreatic cancer cell lines. *Pancreas* (2002). 24: 34-41.

Khuon S, Liang L, Dettman RW, Sporn PHS, Wysolmerski RB and Chew TL. Myosin light chain kinase mediates transcellular intravasation of breast cancer cells through the underlying endothelial cells: a three-dimensional FRET study. *Journal of Cell Science*(2009). 123:431-440.

Kim JH and Adelstein RS. LPA1-Induced Migration Requires Nonmuscle Myosin II Light Chain Phosphorylation in Breast Cancer Cells . *J. Cell. Physiol.* (2011) 226: 2881–2893.

Kolega J. Asymmetric distribution of Myosin IIB in migration endothelial cells is regulated by a rho-dependent kinase and contributes to tail retraction. *Mol Biol Cell* (2003). 14:4745-4757.

Lourenço SQC, Schueler AF, Camisasca DR, Lindenblatt RC, Bernardo VG. Histological Classifications of Oral Squamous Cell Carcinoma: a Review of the Proposed Systems *Revista Brasileira de Cancerologia* (2007). 53: 325-333.

Lo W, Tsai M, Tsai Y, Hua C, Tsai F, Huang S, Tsai C, Lai C. Identification of over-expressed proteins in oral squamous cell carcinoma (OSCC) patients by clinical proteomic analyses. *Clinica Chimica Acta* (2007) 376: 101–107.

Lynch CC, Matrisian LM (2002) Matrix metalloproteinases in tumor-host cell communication. *Differentiation* (2002). 70: 561–573.

Meyers J, editor. *Oral Cancer Metastasis*. USA: Springer, 2010. 364 p.

Olson MF, Sahai E (2009) The actin cytoskeleton in cancer cell motility. *Clin Exp Metastasis*. (2009) 26(4):273-87.

OMS. Organização Mundial da Saúde. Oral Health. Fact Sheet nº 318. April,2012. Disponível em: <http://www.who.int/mediacentre/factsheets/fs318/en/>. Acesso em: 05 de setembro de 2012.

Painter KJ , Armstrong NJ, Sherratt JA . The impact of adhesion cellular invasion processes in cancer and development . *Journal of Theoretical Biology* (2010). 264: 1057–1067.

Parkin DM, Bray F, Ferlay J, Pisani P. Global cancer statistics, *CA Cancer J Clin*. (2005). 55(2):74-108.

Parsons JT, Alan Rick Horwitz AR and Schwartz MA. Cell adhesion: integrating cytoskeletal dynamics and cellular tension. *Nature Reviews Molecular Cell Biology* (2010). 11: 633-643 .

Piekny A, Werner M, Glotzer M. Cytokinesis: welcome to the Rho zone. *Trends Cell Biol* (2005). 15: 651-658.

Poincloux R, Collina O, Lizárraga F, Romaoa M, Debraye M, Piela M and Chavriera P. Contractility of the cell rear drives invasion of breast tumor cells in 3D Matrigel. *PNAS* (2011). 108 : 1943–1948.

Ren K , Jin H , Bian C , He H , Liu X , Zhang S , Wang Y and Shao R .MR-1 modulates proliferation and migration of human hepatoma HepG2 cells through myosin light chains-2 (MLC2)/ focal adhesion kinase (FAK)/Akt signaling pathway. *The Journal of Biological Chemistry* (2008). 283 35598–35605

Saha S, Dey SK, Das P, Jana SS. Increased expression of nonmuscle myosin IIs is associated with 3MC-induced mouse tumor. *FEBS Journal* (2011). 278: 4025-4034.

Salhia B, Hwang JH, Smith, Nakada M, Rutka F, Symons M and Rutka JT. Role of Myosin II Activity and the Regulation of Myosin Light Chain Phosphorylation in Astrocytomas. *Cell Motility and the Cytoskeleton* (2008). 65: 12–24 .

Sandquist JC, Swenson KI, DeMali KA, Burrige K and Anthony R. Means. Rho kinase differentially regulates phosphorylation of nonmuscle myosin II isoforms A and B during cell rounding and migration. *The Journal of Biological Chemistry*(2006). 281: 35873-35883.

Sen S, Dong M, Kumar S. Isoform-specific contributions of alpha-actinin to glioma Cell Mechanobiology. *PLOS ONE*(2009). 4(12):e8427.

Sweeney HL and Houdusse A. Structural and functional insights into the myosin motor mechanism. *Annu. Rev. Biophys.*(2010). 39:539–557

Tlsty TD and Coussens LM. Tumor Stroma and Regulation of Cancer Development.. *Annu. Rev. Pathol. Mech. Dis.* (2006). 1:119–50

Tohtong, K. Phattarasakul, A Jiraviriyakul, T. Sutthiphongchai Dependence of metastatic cancer cell invasion on MLCK-catalyzed phosphorylation of myosin regulatory light chain. *Prostate Cancer and Prostatic Diseases*. Nature Publishing group. (2003) 6: 212-216.

Turhani D, Krapfenbauer K, Thurnher D, Langen H, Fountoulakis M. Identification of differentially expressed, tumor-associated proteins in oral squamous cell carcinoma by proteomic analysis. *Electrophoresis* (2006). 27: 1417–1423.

Van den Hooff A. 1988. Stromal involvement in malignant growth. *Adv. Cancer Research* (1988). 50:159–96

Vasiliev J.M., T. Omelchenko, I.M.Gelfand, H.H.Feder, and E.M.Bonder. Rho overexpression leads to mitosis-associated detachment of cells from epithelial sheets: A link to mechanism of cancer dissemination. *PNAS* (2004). 101: 12526-12530.

Vicente-Manzanares MV, Ma X, Adelstein RS and Horwitz AR. Non-muscle myosin II takes centre stage in cell adhesion and migration. *Nature Reviews Molecular Biology*(2009). 10: 778-790.

Wang F, Kovács M, Hu A, Limouze J, Harvey EV and Sellers JR. Kinetic Mechanism of Non-muscle Myosin IIB – Functional Adaptations For Tension Generation And Maintenance. (2003). 278: 27439-27448.

Webb DJ, Horwitz AF. New dimensions in cell migration. *Nat Cell Biol.*(2003) 5:690-692.

Wyckoff JB, Pinner SE, Gschmeissner S, Condeelis JS and Sahai E. ROCK- and myosin-dependent matrix Deformation Enables Protease-Independent Tumor-Cell Invasion In Vivo. *Current Biology* (2006). 16: 1515–1523.

Wylie SR, Chantler, PD. Myosin IIC: a third molecular motor driving neuronal dynamics. *Mol Biol Cell* (2008). 19(9): 3956-68.

Wu D, Asiedu M and Wei Q. MyoGEF regulates the invasion activity of MDA-MB-231 breast cancer cells through activation of RhoA and RhoC . *Oncogene*. (2009) 28(22): 2219–223.

9 ANEXOS

9.1. Anexo A



Universidade Federal do Rio Grande do



Faculdade de Odontologia

PARECER DA COMISSÃO DE PESQUISA

Parecer aprovado em reunião do dia 01 de abril de 2011 ATA 02/11.

A Comissão de Pesquisa da Faculdade de Odontologia, da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, após análise aprovou por estar adequado e metodologicamente de acordo com a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde, o seguinte Projeto:

PROJETO: Nº20049. ANÁLISE DA CORRELAÇÃO ENTRE O GRAU DE DIFERENCIAÇÃO DE LESÕES BUCAIS E O NÍVEL DE EXPRESSÃO DE MIOSINA.

PESQUISADOR RESPONSÁVEL: Prof. MARCELO LAZZARON LAMERS

OUTROS PESQUISADORES: Manoel Sant'Ana Filho, Otávio Francisco Dias, Alessandra Magnusson, Simone Marcuzzo, Anna Christina Medeiros Fossati, Isabel Lauxen.

Porto Alegre, 01 de abril de 2011.

Profª. Dra. Deise Ponzoni
Coordenadora da Comissão de Pesquisa

Profª. Deise Ponzoni
Coordenadora da COMPECO/ODO

9.2. Anexo B



HCPA - HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE GRUPO DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO

COMISSÃO CIENTÍFICA E COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

A Comissão Científica e o Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (CEP/HCPA), que é reconhecido pela Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP)/MS e pelo Office For Human Research Protections (OHRP)/USDHHS, como Institutional Review Board (IRB00000921) analisaram o projeto:

Projeto: 110289

Data da Versão do Projeto: 27/09/2011

Data da Versão do TCLE: 27/09/2011

Pesquisadores:

MARCELO LAZZARON LAMERS

MANOEL SANTANA FILHO

ISABEL DA SILVA LAUXEN

BERNARDO SALIM SILVEIRA

ALESSANDRA SELINGER MAGNUSSON

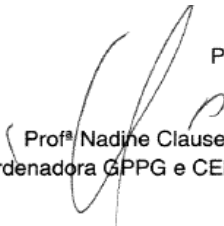
OTÁVIO FRANCISCO GOMES DIAS

Título: ANÁLISE DA CORRELAÇÃO ENTRE O GRAU DE DIFERENCIAÇÃO DE LESÕES BUCAIS E O NÍVEL DE EXPRESSÃO DE MIOSINA

Este projeto foi APROVADO em seus aspectos éticos e metodológicos, bem como o respectivo Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, de acordo com as diretrizes e normas nacionais e internacionais de pesquisa clínica, especialmente as Resoluções 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

- Os membros da Comissão Científica e do Comitê de Ética em Pesquisa não participaram do processo de avaliação dos projetos nos quais constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do projeto, assim como os eventos adversos graves, deverão ser comunicados imediatamente ao CEP/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEP/HCPA.
- Somente poderá ser utilizado o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido no qual conste o carimbo de aprovação do CEP/HCPA.

Porto Alegre, 28 de setembro de 2011.


Profª Nadine Clausell
Coordenadora GPPG e CEP/HCPA

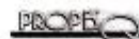
9.3. Anexo C



UFRGS
UNIVERSIDADE FEDERAL
DO RIO GRANDE DO SUL

PRÓ-REITORIA DE PESQUISA

Comitê De Ética Em Pesquisa Da Ufrgs



CARTA DE APROVAÇÃO

Comitê De Ética Em Pesquisa Da Ufrgs analisou o projeto:

Número: 20049

Título: ANÁLISE DA CORRELAÇÃO ENTRE O GRAU DE DIFERENCIAÇÃO DE LESÕES BUCAIS E O NÍVEL DE EXPRESSÃO DE MIOSINA

Pesquisadores:

Equipe UFRGS:

MARCELO LAZZARON LAMERS - coordenador desde 01/04/2011
MANOEL SANT ANA FILHO - pesquisador desde 01/04/2011
Bernardo Salim Silveira - pesquisador desde 01/04/2011
ISABEL DA SILVA LAUXEN - Laboratorista desde 01/04/2011
ALESSANDRA SELINGER MAGNUSSON - Laboratorista desde 01/04/2011

Equipe Externa:

Otávio Francisco Gomes Dias - Aluno de Mestrado desde 01/04/2011
carlos tadeu cersky - pesquisador desde 01/04/2011

Comitê De Ética Em Pesquisa Da Ufrgs aprovou o mesmo, em reunião realizada em 19/04/2012 - Sala 01 de reuniões do Gabinete do Reitor, 6º andar do prédio da Reitoria, por estar adequado ética e metodologicamente e de acordo com a Resolução 196/96 e complementares do Conselho Nacional de Saúde.

Porto Alegre, Terça-Feira, 24 de Abril de 2012

JOSE ARTUR BOGO CHIES
Coordenador da comissão de ética

10 APÊNDICES

10.1. Apêndice A

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

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

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

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

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

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

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

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

Pelo presente consentimento informado, declaro que fui esclarecido, de forma detalhada e livre de qualquer constrangimento, da justificativa e dos procedimentos que serei submetido pelo presente projeto de pesquisa.

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

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

Qualquer dúvida referente a este termo de consentimento podem ser resolvidas diretamente com os pesquisadores responsáveis ou junto ao comitê de Ética da UFRGS (51-3308-3629)

Nome e Assinatura do voluntário

Data: _____ Telefone: _____

Nome e assinatura do pesquisador

Data: _____ Telefone: _____

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

Comitê de Ética em Pesquisa
GPPG/HCPA
VERSÃO APROVADA
28 / 09 / 2011
n.º 110289 88

10.2. Apêndice B

Prontuário: _____ Data: _____ Entrevistador: _____

1. Dados Pessoais:

- 1.1. Nome _____
- 1.2. Identidade _____
- 1.3. Endereço _____
- 1.4. Telefone _____
- 1.5. Sexo 1() masculino 2() feminino
- 1.6. Data de nascimento _____
- 1.7. Qual sua idade hoje _____
- 1.8. Sua raça ou cor 1() branca 2() negra 3() parda 4() amarela 5() indígena
- 1.9. Você está 1() casado 2() solteiro 3() divorciado 4() viúvo
- 1.10. Você é alfabetizado 1() sim 2() não
- 1.11. Você estudou 1() nunca estudou 2() 1-4 série 3() 5-8 série 4() 2º grau incompleto 5() 2º grau completo 6() superior incompleto 7() superior completo

2. Hábitos de Higiene Bucal

- 2.1. Com que frequência você escova os dentes
1() 1x dia 2() 2x dia 3() 3x dia 4() mais que 3x dia 5() não escova
- 2.2. Você divide sua escova com outras pessoas 1() sim 2() não
- 2.3. O que você usa para limpar seus dentes
1() nada 2() palito 3() fio dental 4() outro
- 2.4. Você usa algum produto para bochecho 1() sim 2() não
Qual _____ Há quanto tempo _____
- 2.5. Com que frequência
1() 1x dia 2() 2x dia 3() 3x dia 4() mais que 3x dia 5() não usa
- 2.6. Quando iniciou o uso 1() antes 2() depois do diagnóstico de câncer
- 2.7. Quando foi a última vez que você foi ao dentista 1() muitos anos atrás
2() 1-3 anos atrás 3() menos de 1 ano atrás 4() não lembra 5() nunca visitou

3. Percepção das Condições Bucais

Nos últimos 12 meses você teve:

- 3.1 mau hálito, gosto ruim 1() freq 2() às vezes 3() raro 4() nunca

3.2 dor de dente	1 () freq	2 () às vezes	3 () raro	4 () nunca
3.3 dentes frouxos	1 () freq	2 () às vezes	3 () raro	4 () nunca
3.3 sensação de apertamento	1 () freq	2 () às vezes	3 () raro	4 () nunca
3.4 sensação de boca seca	1 () freq	2 () às vezes	3 () raro	4 () nunca
3.5 dor enquanto escova	1 () freq	2 () às vezes	3 () raro	4 () nunca
3.6. feridas na gengiva	1 () freq	2 () às vezes	3 () raro	4 () nunca
3.7. sangramento na gengiva	1 () freq	2 () às vezes	3 () raro	4 () nunca

4. **Fatores Comportamentais**

- 4.1. Você fuma atualmente 1 () sim 2 () não
- 4.2 Tipo _____
- 4.3 Quantos cigarros por dia _____
- 4.4 Há quantos anos _____
- 4.5 Você fumou anteriormente 1 () sim 2 () não
- 4.6. Quantos cigarros por dia _____
- 4.7. Por quantos anos _____
- 4.8 Quanto tempo faz que você parou de fumar _____
- 4.9 Você toma chimarrão 1 () freq 2 () às vezes 3 () raro 4 () nunca
- 4.10 Você ingere bebidas alcoólicas
1 () freq 2 () às vezes 3 () raro 4 () nunca 5 () parou há _____
- 4.11 Qual tipo de bebida 1 () nenhum 2 () cerveja 3 () cachaça 4 () vinho
- 4.12 Quantas doses/copos você ingere por semana _____
- 4.13 Há quanto tempo 1 () 1 ano 2 () 5 anos 3 () 10 anos 4 () mais de 10 anos

5. **Fatores Psicossociais**

Nos últimos 3 anos você teve algum(a):

5.1 problema sério de saúde	1 () sim	2 () não	3 () não sei
5.2 problema sério de saúde na família	1 () sim	2 () não	3 () não sei
5.3 morte de alguém próximo	1 () sim	2 () não	3 () não sei
5.4 outro problema tenha lhe afetado	1 () sim	2 () não	3 () não sei

Em relação ao seu presente trabalho:

- 5.5 Você está 1 () empregado 2 () desempregado 3 () aposentado, do lar
- 5.6 Quantas vezes por semana você trabalha _____ horas. Profissão: _____
- 5.7 Você esteve desempregado por mais de 3 meses nos últimos 3 anos
1 () sim 2 () não
- 5.8 Se esteve, por quanto tempo _____ meses

5.9 Você acha que os ganhos mensais de sua família

1() não são suficientes para pagar suas contas

2() são suficientes apenas para pagar as contas

3() são suficientes para pagar as contas e economizar um pouco

5.10 Você considera sua qualidade de vida

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

6. Nível Socioeconômico

6.1 Quanto você recebe por mês

1() até 1 SM 2() 1-2 SM 3() 2-3 SM 4() 4-5 SM 5() 5-10 SM 6() 10-20 SM 7() +20

SM 8() não respondeu 9() não recebe salário

Quantos... você possui:

6.2 Tv colorida 1() não possui 2() um 3() dois 4() três 5() quatro ou +

6.3 rádio 1() não possui 2() um 3() dois 4() três 5() quatro ou +

6.4 banheiro 1() não possui 2() um 3() dois 4() três 5() quatro ou +

6.5 carro 1() não possui 2() um 3() dois 4() três 5() quatro ou +

6.6 empregado(a) mensalista 1() não possui 2() um 3() dois 4() três 5() quatro ou +

6.7 aspirador de pó 1() não possui 2() um 3() dois 4() três 5() quatro ou +

6.8 máquina de lavar 1() não possui 2() um 3() dois 4() três 5() quatro ou +

6.9 videocassete ou DVD 1() não possui 2() um 3() dois 4() três 5() quatro ou +

6.10 geladeira 1() não possui 2() um 3() dois 4() três 5() quatro ou +

6.11 freezer (indep. ou geladeira duplex) 1() não possui 2() um 3() dois 4() três 5() quatro ou +

6.12 Quantas pessoas dependem economicamente de você _____

6.13 Quantas pessoas moram com você _____

7. História Médica

7.1 Diabetes 1() sim 2() não 3() não sei

7.2 Asma, alergia a alimentos, pó 1() sim 2() não 3() não sei

7.3 Doença cardíaca ou renal 1() sim 2() não 3() não sei

7.4 Artrite 1() sim 2() não 3() não sei

1() sim 2() não 3() não sei

7.5 Outro problema de saúde (HIV, hepatite...)

Qual?

7.6 Você está usando alguma medicação

1 () sim 2 () não 3 () não sei

Qual?

10.3. Apêndice C

Ficha de Informações dos Pacientes HCPA

Paciente número _____

Leito _____

Sexo () 1 masculino () 2 feminino

Prontuário _____

Data da Cirurgia _____

Localização do Tumor _____

Estadiamento _____

Tumor Primário () 1 Metástase () 2

Tumor:

Tamanho _____

Macroscopia _____

Número do AP _____

Graduação HP _____

Número de fragmentos: _____

Número no Biorrepositório _____

