



ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA – PPGO
MESTRADO EM ESTOMATOLOGIA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL
VASCULAR E DO FATOR DE VIII EM QUEILITE ACTÍNICA E CARCINOMA
ESCAMOCELULAR DE LÁBIO**

Rebeca Mota Vasconcelos

Orientador: Prof. Dr. Miguel Gustavo Setúbal Andrade

Salvador

2010

REBECA MOTA VASCONCELOS

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL
VASCULAR E DO FATOR DE VIII EM QUEILITE ACTÍNICA E CARCINOMA
ESCAMOCELULAR DE LÁBIO**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública para obtenção do título de Mestre em Odontologia. Área de concentração em Estomatologia.

Orientador: Prof. Dr. Miguel Gustavo Setúbal
Andrade

Salvador

2010

Ficha Catalográfica elaborada pela
Biblioteca Central da EBMS

- V 331 Vasconcelos, Rebeca Mota
Análise da Expressão do Fator de Crescimento Endotelial Vascular
e do Fator VIII em Queilite Actínica e Carcinoma Escamocelular de Lábio./
Rebeca Mota Vasconcelos. – Salvador.- 2010.
48 f.
- Dissertação (Mestrado) apresentada à Escola Bahiana de Medicina e
Saúde Pública -EBMS. Programa de Pós-graduação em Odontologia,
mestrado em Estomatologia, 2010.
Orientador: Prof. Dr. Miguel Gustavo Setúbal Andrade
Inclui bibliografia
1. Queilite Actínica. 2. VEGF. 3. Fator VIII. 4. Carcinoma Escamocelular.
I . Título.

CDU: 616.317

REBECA MOTA VASCONCELOS

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL
VASCULAR E DO FATOR DE VIII EM QUEILITE ACTÍNICA E CARCINOMA
ESCAMOCELULAR DE LÁBIO**

Comissão Examinadora:

Dra. Sílvia Regina Reis

Dra. Em Patologia Oral pela Universidade de Berlim.

Professora Adjunta da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP)

Dra. Luciana Maria Pedreira Ramalho

Dra. em Estomatologia Clínica pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUC-RS)

Professora Adjunta da Universidade Federal da Bahia (UFBA)

Dr. Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Junior

Dr. Em Patologia Oral pela Universidade Federal do Rio Grande do Norte (UFRN)

Professor Titular de Diagnóstico Estomatológico integrado da Universidade de Tiradentes (UNIT)

Salvador

2010

INSTITUIÇÕES ENVOLVIDAS



- Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública



- Universidade Federal da Bahia

Dedico este trabalho aos meus pais Marília e Carlos e à minha irmã Carol pelo amor e apoio incondicional dedicados a mim em todos os momentos desta dura jornada

“Graças , porém, à Deus que em Cristo sempre nos conduz em triunfo”

(II Coríntios 2:1)

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar agradeço ao meu **Deus** pela fé e graça concedida, por ter me escolhido para ser sua filha, e pela garantia de proteção em abundância.

Aos meus pais **Marília e Carlos** que me deram a vida, que me apoiaram incondicionalmente em todos os momentos, em especial nesta reta final. Sem vocês não teria realizado este sonho. O amor de vocês me faz sentir alguém especial.

À minha irmã gêmea, **Carol** pelo companheirismo, amor, amizade, fidelidade. Por ser meu braço direito me fazendo levantar e acreditar que sou capaz.

Ao meu orientador **Prof. Dr. Miguel Setúbal**, agradeço pela transmissão de seus vastos conhecimentos, pelo incentivo ao estudo e pela confiança em mim depositada. Mas, principalmente, pela amizade. Ganhei um amigo, que me conquistou com a sua alegria, humildade e generosidade.

À **Profa. Dra Sílvia Reis**, exemplo de dedicação como pesquisadora e docente, agradeço pela confiança ao me proporcionar o projeto de pesquisa que resultou na realização desta dissertação, e engrandecimento profissional.

Ao **Prof. Dr. Urbino Tunes** pelo acolhimento e dedicação, tornando-se um exemplo para meu aprimoramento profissional e pessoal.

Aos Professores da disciplina de Estomatologia III, **Dra. Gabriela Botelho e Dr. Márcio Marchionni**, pelos ensinamentos que muito contribuíram à minha formação acadêmica.

A todos professores do mestrado que contribuíram de alguma forma

A **Profa. Dra. Luciana Ramalho**, exemplo de humildade e dedicação. Agradeço por me incentivar a trilhar o caminho da Estomatologia. Agradeço pelos conselhos profissionais e pessoais, e especialmente pelo carinho e amizade.

Ao **Prof. Dr. Ricardo Albuquerque** pela generosidade e disponibilidade de vir participar da minha banca.

Ao meu cunhado **Camilo**, pelo dom de me fazer rir nos momentos mais tensos. Seus comentários fora de hora foram revigorantes.

A amiga **Flávia Pires**, pelos momentos de alegria e amizade incondicional. Com certeza minhas idas e vindas ao Hospital das Clínicas, Nazaré e a Pernambués não teria sido tão agradáveis se você não estivesse ao meu lado.

A amiga **Lais Pires** pelo apoio técnico. Inserir rodapé, formatar numeração de página, centralizar tabela... sua ajuda me poupou um tempo precioso.

A **tia Dora e tio Paulo** pelo acolhimento em seu lar e por cuidarem de mim como uma filha.

Aos meus colegas de turma, **Carine, Lara, Flavia, Maybel, Thais, Faber e Deyla** pela união nos momentos difíceis e nos menos difíceis. Cada um de vocês me ajudou de forma peculiar, e ficarão pra sempre guardado no meu coração.

Às minhas sócias e afilhadas, **Diana e Paloma**, pela compreensão, incentivo e amizade.

Ao Distrito Cabula-Beiru, em especial **a Dra. Fátima, Sr. João, Antônio Carlos e Val** pelo carinho, enorme paciência e apoio fundamental para realização deste mestrado.

A **Rodrigo Oliveira** agradeço por ter me recebido no laboratório de Imunopatologia da UFBA (Hupes) e proporcionado todas as condições para o experimento que resultaram nesta dissertação.

Aos funcionários da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública em especial **Verinha, Lena, Ritinha, Débora e Josy** pelos preciosos serviços prestados durante a realização deste curso.

Aos pacientes da Estomatologia pela confiança.

A todos que de alguma forma me apoiaram, torceram e oraram pelo meu sucesso.

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

®: símbolo para marca registrada

AC: Actinic Cheilitis

Bcl-2: célula B/linfoma 2

bFGF: Fator de Crescimento Fibroblástico básico

CEC: Carcinoma Escamocelular

CEP: Comitê de Ética em Pesquisa

CXCL-1: ligante 1 da cisteína (aminoácido)-cisteína

CXCL-8: ligante 8da cisteína (aminoácido)-cisteína

DAB: diaminobenzidina, líquido DAB, sistema substrato-cromógeno

flk-1:quinase de fígado fetal-1

flt-1: tirosina quinase fms-like

HE: coloração histológica por Hematoxilina e Eosina.

IL-8: Interleucina-8

KDR: região de domínio quinase

OMS: Organização Mundial de Saúde

PDGF: Fator de Crescimento derivado de plaqueta

pH: potencial hidrogeniônico

PI3-K: fosfatidilinositol-3 quinase

PIGF: Fator de Crescimento Placentário

QA: Queilite Actínica

SCC: Squamous Cell Carcinomas

TGF- α : fator de crescimento tumoral alfa

TN: Tecido da mucosa normal

VEGF: Fator de Crescimento Endotelial Vascular

VEGF₁₆₅: Isoforma do VEGF-A

VEGFR: Receptor para o Fator de Crescimento Endotelial Vascular

VPF: Fator Vascular de Permeabilidade

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição dos casos em relação aos diferentes graus de displasia e carcinoma. (Página 32)

Tabela 2 - Percentual das alterações histológicas de acordo com os diferentes graus de displasia epitelial. (Página 33)

Tabela 3 - Associação entre os graus de atipia de displasia epitelial e os graus de diferenciação de CEC apresentados. (Página 34)

Tabela 4 - Expressão do VEGF e do Fator VIII no tecido normal, na displasia e no carcinoma. (Página 38)

Tabela 5 - Expressão do VEGF e do FVIII no tecido normal, e nos diferentes graus de displasia. (Página 38)

Tabela 6 - Expressão do VEGF e do FVIII no tecido normal, e nos diferentes graus de carcinomas. (Página 39)

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Associação entre a expressão do VEGF e do FVIII nos tecidos normais. (Página 39)

Gráfico 2 - Associação entre a expressão do VEGF e do FVIII nas displasias. (Página 40)

Gráfico 3 - Associação entre a expressão do VEGF e do FVIII nos carcinomas. (Página 40)

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Fotomicrografia da elastose solar.(HE, 400X) (Página 34)

Figura 2a - Intensa imunomarcção de VEGF na camada basal e parabasal. (Streptavidina-biotina 400X) (Página 35)

Figura 2b – Intensa imunomarcção de VEGF na camada basal e parabasal. (Streptavidina-biotina 400X) (Página 36)

Figura 2c – Expressão do VEGF na camada basal e parabasal. (Streptavidina-biotina 400X) (Página 36)

Figura 3a – Intensa imunomarcção de Fator VIII nos vasos endoteliais. (Streptavidina-biotina 400X). (Página 37)

Figura 3b – Intensa imunomarcção de Fator VIII nos vasos endoteliais. (Streptavidina-biotina 400X). (Página 37)

Figura 3c – Intensa imunomarcção de Fator VIII nos vasos endoteliais. (Streptavidina-biotina 400x). (Página 37)

SUMÁRIO

Introdução	14
Manuscrito I	16
Resumo	16
Introdução	16
Revisão de Literatura	18
Considerações Finais	23
Abstract	23
Referências	23
Manuscrito II	27
Resumo	27
Introdução	28
Metodologia	29
Resultados	32
Discussão	40
Conclusão	43
Abstract	43
Referências	44
Anexos	47

INTRODUÇÃO

O câncer continua sendo o grande desafio para a ciência, pois em sua maioria, a etiologia permanece desconhecida.^{R10} Estima-se que 95% dos casos de carcinomas escamocelulares (CEC) de lábio originam-se de queilite actínica (QA).^{R14} Santos *et al.*,^{R14} afirmaram que a transformação maligna da QA ocorrem em aproximadamente 10-20% dos casos de queilite.

Queilite actínica é uma lesão pré-maligna do vermelhão do lábio inferior resultante de exposição crônica à radiação solar.^{R4} O potencial incerto de malignização da QA pode ser explicado pela inconstância no espectro histopatológico.^{P14}

Além das transformações celulares individuais referidas como atípicas, a angiogênese tecidual é essencial para o desenvolvimento e expansão dos tumores.^{P4} O Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF), regulador chave da angiogênese age promovendo a permeabilidade, proliferação, migração e diferenciação de células endoteliais.^{P6}

Johnstone *et al.*,^{P6} observaram um significativo aumento da vascularização durante a transformação da mucosa normal, através de diferentes estágios de displasia até o CEC do lábio. Alguns estudos correlacionaram a expressão do VEGF com a densidade microvascular em tumores e lesões displásicas, porém, com resultados conflitantes.

Diante disto, este estudo tem como objetivo geral analisar através de técnica imunohistoquímica a expressão do VEGF e do Fator VIII em tecido normal, displásico e neoplásico de lábio inferior.

Devido aos resultados divergentes encontrados na literatura, suportes a mais no estudo da várias etapas da carcinogênese bucal através da imuno-expressão do VEGF e do Fator VIII em lesões de QA, CEC de lábio e tecido normal justificam a realização desta pesquisa.

Este trabalho consiste em uma dissertação de mestrado com concentração na área de Estomatologia apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública, intitulada: “Análise da Expressão do Fator de Crescimento Endotelial Vascular e do Fator de VIII em Queilite Actínica e Carcinoma Escamocelular de lábio”. A primeira parte do trabalho consiste em uma revisão de literatura sob a forma do Manuscrito I intitulada: “Análise da Expressão do Fator de Crescimento Endotelial Vascular em Queilite Actínica e Carcinoma Escamocelular de lábio”. A segunda parte está sob a forma do manuscrito II e corresponde à dissertação propriamente dita com informações sobre metodologia, resultados, discussão e conclusão.*

* As citações referentes ao manuscrito I estão precedidas pela letra R. As citações referentes aos manuscritos II estão precedidas pela letra P.

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR EM QUEILITE ACTÍNICA E CARCINOMA ESCAMOCELULAR DE LÁBIO – REVISÃO DE LITERATURA

Rebeca Mota Vasconcelos*; Sílvia Regina de Almeida Reis**; Miguel Gustavo Setúbal Andrade***

* Aluna do curso de Pós-Graduação em Odontologia pela Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP)

** Doutora em Patologia Oral pela Universidade de Berlim. Professora Adjunta do curso de Odontologia da EBMSP. Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Odontologia pela EBMSP

*** Doutor em Imunologia pela Universidade Federal da Bahia (UFBA). Professor Adjunto do curso de Odontologia da EBMSP

Resumo

Um melhor conhecimento sobre a patogênese tumoral pode ajudar no desenvolvimento de novos tratamentos, aumentando a sobrevida e as chances de cura para os pacientes. A angiogênese é um evento crítico no crescimento de lesões pré-malignas, como a queilite actínica (QA) e de tumores, sendo mediado por diversos fatores de crescimento, entre eles o fator de crescimento vascular endotelial (VEGF). O VEGF é o estimulador chave que atua na proliferação celular, aumenta a permeabilidade vascular, a migração de células endoteliais e a inibição da apoptose. Diversos estudos têm sido realizados com a proposta de conhecer o real papel do VEGF nos carcinomas orais, porém com resultados conflitantes. Poucos relatos se têm sobre a sua ocorrência em lesões cancerizáveis, a exemplo da queilite actínica. Esta revisão tem como objetivo entender a correlação entre QA e carcinomas escamocelulares (CEC) de lábio e a influência do VEGF na carcinogênese labial e na QA.

Palavras-chave: Queilite Actínica, VEGF, Carcinoma Escamocelular

1. INTRODUÇÃO

A radiação solar ultravioleta é identificada como o maior agente etiológico das lesões pele e lábio.¹ A queilite actínica (QA) apresenta-se, clinicamente, como o primeiro sinal dos danos causados à mucosa labial, que muitas vezes são irreparáveis. Com a

exposição crônica à radiação solar, 10 a 20% das QAs que são consideradas, segundo a classificação histopatológica da Organização Mundial da Saúde (OMS),² como lesões cancerizáveis do lábio, podem evoluir para CEC.³

A QA apresenta um espectro de alterações histológicas que, fundamentalmente consiste de graus variados de ceratose, hiperplasia ou atrofia do epitélio, e presença ou não de atipia epitelial. No tecido conjuntivo, a degeneração basofílica do colágeno, conhecida como elastose solar é um achado universal potencialmente associado a infiltrado inflamatório. A displasia epitelial, quando presente, varia em função de diferentes graus de atipia do epitélio, e pode estar restrita ao terço profundo, médio, ou envolvendo toda a espessura do epitélio, no caso, o carcinoma *in situ*. Áreas de rompimento na membrana basal, já caracterizam o carcinoma escamocelular invasivo. A displasia do epitélio bucal indica um possível risco de transformação maligna em curso e, geralmente, quando intensa, este risco se mostra ainda mais iminente.⁴

O Fator de Crescimento do Endotélio Vascular (VEGF) é uma citocina multifuncional que possui um importante papel na angiogênese *in vivo*, promovendo aumento do suprimento sanguíneo, proliferação, migração e remodelação da matriz extracelular.⁵ Também conhecido por Fator Vascular de Permeabilidade (VPF), pertence a uma família de genes que inclui Fator de Crescimento Placentário (PIGF), VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e VEGF-E. Entre as suas várias isoformas, o VEGF-C tem como função principal a regulação do crescimento de vasos linfáticos.⁶ Desta forma, estudos sugerem que o VEGF-C pode estar associado à metástase tumoral através de vasos linfáticos, a principal forma de disseminação do CEC de boca.⁷

Quando o aparecimento do CEC de lábio é precedido por uma lesão cancerizável, a exemplo da QA, os tecidos epitelial e conjuntivo apresentam transformações celulares que apontam para um subsequente desenvolvimento de malignidade. Desta forma este trabalho tem como objetivo apresentar uma revisão de literatura abordando a relação existente entre QA e CEC de lábio e a influência do VEGF na carcinogênese labial e na QA.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. QA X CEC

Exposição prolongada à radiação solar pode causar modificações teciduais na mucosa labial, acarretando alterações histomorfológicas indicativas de anormalidades na diferenciação celular.³ A alteração mais comumente causada pela radiação ultravioleta é a manifestação de QA no lábio inferior.^{3,4,8} A QA é uma lesão cancerizável que pode se transformar em CEC.^{1,3,4} O CEC corresponde a 95% de todas as lesões malignas da boca.⁸

A evolução lenta dos estágios iniciais da QA geralmente é negligenciada pelos pacientes que buscam tratamento quando a lesão está em um estágio mais avançado, favorecendo o desenvolvimento do CEC.⁸

A QA ocorre quase que exclusivamente em pessoas faiodermas que trabalham ao ar livre e expostas ao sol. Apresenta-se mais comumente em pacientes adultos ou idosos.^{4,8,9} Geralmente, os sinais clínicos iniciais da QA são lesão branca, assintomática, de espessura variável, bem ou mal definida, com áreas avermelhadas interpostas no vermelhão do lábio inferior.⁸

Do ponto de vista histopatológico, a QA é caracterizada por epitélio escamoso estratificado, com hiper-orto ou hiper-paraceratose,^{3,4} disceratose,¹⁰ hiperplasia ou atrofia, áreas de acantose, ulcerações e displasia epitelial nos casos mais severos.^{3,11} No tecido conjuntivo, presença de infiltrado inflamatório crônico pode estar associado ou não a elastose solar.^{1,3,11} Vasodilatação também pode ser visualizada neste tecido.¹⁰

O potencial de malignidade nas QAs pode ser explicado pelos inconstantes espectros de achados histopatológicos encontrados nesta lesão.¹² Em estudo realizado por Xavier *et al*,¹² observaram ausência de displasia epitelial leve e maior frequência de displasia severa em lesões de QAs. A displasia epitelial é diagnosticada quando duas ou mais das seguintes características ocorrem: presença ou não de estratificação epitelial irregular, hiperplasia da camada basal, processos reticulares em forma de gota, perda da

polaridade das células basais, aumento da razão núcleo/citoplasma, polimorfismo nuclear, aumento do tamanho dos nucléolos, hiperchromatismo nuclear, redução da aderência intercelular, mitoses suprabasais e disceratose.² Quanto à classificação da displasia epitelial, ela será leve quando duas características estiverem presentes; moderada, quando três a quatro características estiverem presentes; e severa, quando cinco ou mais características estiverem presentes.¹³

É estimado que 95% dos CEC de lábio originam-se de QAs.¹⁴ Não ocorrem modificações clínicas perceptíveis que antecipem essas transformações.⁸ Pimentel *et al.*,¹⁵ afirmaram que em lesões bucais cancerizáveis, o fator preditivo mais importante de uma transformação maligna é a severidade da displasia epitelial.

Evidências histológicas apontam a radiação solar como causa do CEC do lábio, pois ocorre presença de elastose solar no tecido conjuntivo e de alterações epiteliais sugestivas de displasia epitelial no vermelhão adjacente ao tumor em quase todos os casos, havendo uma relação significativa entre essas condições.^{8,10}

Abreu *et al.*,¹⁰ elaboraram um estudo de coorte retrospectivo em CEC de lábio e verificaram a relação entre a QA e o prognóstico do CEC, correlacionando a ausência ou ocorrência de metástase com a presença ou ausência de QA no vermelhão. Observaram uma menor ocorrência de metástase em tumores com QA adjacente do que em tumores sem QA adjacente, levando a supor que os tumores que se originam de QA têm melhor prognóstico. A QA prévia poderia, portanto, ser considerada como um indicador de melhor prognóstico para o CEC do lábio, fato não relatado na literatura.¹⁰

2.2 Angiogênese e Fator de Crescimento Vascular Endotelial (VEGF)

Angiogênese é o processo pelo qual se formam novos vasos a partir de vasos pré-existentes. O Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) é primordial para este fenômeno. A proliferação de vasos sanguíneos é crucial para uma grande variedade de processos fisiológicos tais como desenvolvimento embriológico, crescimento normal e diferenciação, cicatrização e funções reprodutivas.⁶

A angiogênese é um evento crítico no crescimento tumoral e na metástase.¹⁶ Neoplasias não se desenvolvem mais do que 1 a 2mm³ a menos que uma rede capilar intratumoral seja construída por mediação de fatores de crescimento secretados por células tumorais.¹⁷

O processo de neoformação vascular é composto por uma seqüência de eventos, controlados por um balanço entre fatores indutores e inibidores.¹⁸ O VEGF foi recentemente reconhecido como o regulador chave da angiogênese tumoral, promovendo a permeabilidade vascular, a proliferação celular, a migração de células endoteliais e a inibição da apoptose.^{16,19}

O VEGF é um mitógeno seletivo de células endoteliais vasculares, estimulando diretamente a formação de novos vasos sanguíneos. Ao mesmo tempo, a elevação do nível de VEGF irá resultar no extravasamento, no espaço extravascular, de proteínas plasmáticas, a exemplo do fibrinogênio pelo aumento da permeabilidade vascular. Essas proteínas são então incorporadas na rede de fibrina, que é uma matriz essencial para o crescimento da célula endotelial.¹⁷

A família VEGF consiste em várias glicoproteínas dominantes secretadas na sua forma ativa por células neoplásicas, leucócitos, células endoteliais e células do estroma tumoral.²⁰ A família VEGF em humanos é composta pelos membros VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D, e o Fator de Crescimento Placentário (PlGF).¹⁹ O VEGF é produzido por vários tipos de tecidos, sendo secretado na sua forma ativa e ligando-se com alta afinidade a receptores transmembranares tirosina-quinases como flt-1 (tirosina quinase fms-like) e KDR (região de domínio quinase)/flk-1(quinase de fígado fetal-1) e conhecidos como VEGFR-1 e VEGFR-2 respectivamente.⁵ A ligação dos fatores de crescimento pró-angiogênicos a esses receptores expressos pelas células endoteliais dos vasos sanguíneos são responsáveis pela sinalização para a proliferação e diferenciação das células endoteliais em humanos.²¹ A expressão do VEGFR-3 (flt-4) restringe-se às células endoteliais linfáticas, capilares fenestrados e veias de órgãos endócrinos, monócitos e macrófagos.²²

Uma importante via reguladora da angiogênese ocorre quando VEGF liga-se ao seu receptor VEGFR-2 e através da via de sinalização PI3-K (fosfatidilinositol-3 quinase),

induz a expressão da proteína antiapoptótica Bcl-2 que eleva a expressão de citocinas pró-angiogênicas CXCL-8(ligante 8 da cisteína-aminoácido-cisteína) e CXCL-1 (ligante 1 da cisteína-aminoácido-cisteína) resultando na proliferação de células endoteliais.²³

A hipóxia tem sido considerada a maior indutora da expressão local do gene VEGF em tumores, pois, geralmente, o fluxo sanguíneo tumoral é caótico e variável, criando áreas de hipóxia e de acidez o que regula a produção de inibidores ou estimuladores da angiogênese e seleciona células cancerosas de maior agressividade e com potencial metastático.¹⁶

VEGF X QA X CEC

Durante a transição da mucosa normal, passando por displasia, para CEC foi observada uma super-regulação do VEGF. Isto sugere um importante papel do VEGF na transformação de mucosa normal para CEC.²⁴

Dados conflitantes na literatura e falta de consenso sobre a relação entre VEGF e a QA sugerem que o aumento da severidade da displasia não está necessariamente ligado com o aumento da expressão do VEGF.²⁵ Kitdal *et al*,²⁶ estudaram vários espécimes de arquivo de mucosa normal, displásica e CEC de esôfago por meio de imunohistoquímica para VEGF e concluíram que as lesões displásicas de esôfago apresentaram neovascularização aumentada quando comparada ao epitélio normal, indicando um estágio precoce do desenvolvimento tumoral.

É bem aceito que a produção de fatores angiogênicos por células tumorais é essencial para o desenvolvimento de tumores sólidos, e uma alta expressão desses fatores está relacionada com um pior quadro clínico, sugerindo que propriedades angiogênicas relacionam-se com agressividade tumoral.¹⁶

A sobreprodução de VEGF por células neoplásicas sugere que este fator angiogênico possui um papel importante na formação tumoral. Análises quantitativas de tumores mostraram a associação entre um pior prognóstico com baixas taxas de sobrevida e a sobreexpressão do VEGF.¹⁵ A associação entre a expressão do VEGF e o prognóstico, vascularização e progressão da doença em CEC de boca não está bem elucidada.²⁷

Existem dados conflitantes na literatura sobre o assunto, e uma falta de consenso foi observada quando se estudou outros tipos de tumores.¹⁷

A metástase está associada com uma pior taxa de sobrevida e a necessidade de um tratamento mais agressivo. As metástases são de difícil diagnóstico clínico, e marcadores químicos podem apresentar vantagens. A maioria das pesquisas não encontrou diferença significativa entre tumores VEGF-positivo e a ocorrência das metástases. Por outro lado, alguns estudos encontraram que a expressão do VEGF foi significativamente maior em pacientes com envolvimento dos linfonodos regionais. Moryama *et al*,²⁸ relacionaram o CEC de boca com uma expressão intensa do VEGF evidenciando uma alta frequência de metástases para os linfonodos.

2.3. Terapia antiangiogênica

Nas últimas décadas, o avanço da biologia molecular permitiu a identificação de diversos fatores de crescimento responsáveis pelo desenvolvimento dos tumores sólidos como o CEC. Uma das terapias promissoras no tratamento deste tipo de câncer está baseada nas drogas antiangiogênicas.²⁹

A terapia antiangiogênica pode inibir a proliferação endotelial no tumor ou induzir a apoptose da célula endotelial dependendo da concentração de reguladores angiogênicos positivos (VEGF, bFGF, PDGF) e negativos (endostatina, angiostatina) gerados pelo tumor.³⁰

Essa terapia antiangiogênica tem sido baseada principalmente na inibição de vias de sinalização pró-angiogênicas tumorais com destaque para via VEGF-VEGFR. Várias estratégias foram desenvolvidas para se inibir a sinalização de VEGF incluindo anticorpo monoclonal para VEGF ou VEGFR, os receptores extracelulares solúveis que se ligam ao domínio da heparina do VEGF₁₆₅, entre outros.³¹

Algumas drogas para a terapêutica anti-angiogênica com diferentes mecanismos de ação têm sido desenvolvidas destacando-se dentre elas: Interferon-alfa (inibidor da produção de bFGF), Neovastat-AE941 (inibidor de metaloproteinase e VEGFR), SU5416 (bloqueio de sinalização de VEGFR), TNP-470 (inibidor de proliferação endotelial),

entre outras. Muitas drogas já se encontram em fase de estudo clínico e outras já foram aprovadas pelo órgão americano FDA (*Food and Drug Administration*) para uso terapêutico.³²

Em animais tratados com o anticorpo anti-VEGF, a densidade de vasos sanguíneos em secções tumorais foi menor quando comparada com a dos controles.⁶ Futuros estudos são necessários para um melhor mecanismo da regulação do VEGF na tumorigênese de carcinomas orais.²⁷

3. CONSIDERAÇÕES FINAIS

Dados conflitantes na literatura e falta de consenso sobre a relação entre VEGF, QA e CEC sugerem necessidade de mais estudos para elucidar melhor os mecanismos patogênicos do câncer oral. Isto não apenas facilitará o desenvolvimento de um regime de tratamento efetivo, como também poderá melhorar a taxa de sobrevida desses pacientes.

4. ABSTRACT

A better understanding of the pathogenesis of tumor can help in developing new treatments, increasing survival and cure rates for patients. Angiogenesis is a critical event in the growth of premalignant lesions such as actinic cheilitis (AC) and tumors, being mediated by several growth factors, including Growth Factor Vascular Endothelial (VEGF). VEGF is a key stimulator that acts in cell proliferation, increases vascular permeability, migration of endothelial cells and inhibition of apoptosis. Several studies have been conducted with the proposal to meet the real role of VEGF in oral carcinomas and precancerous lesions, but with conflicting results. Have been few reports on their occurrence in precancerous lesions, such as the actinic cheilitis. This review aims to understand the correlation between AC and squamous cell carcinomas (SCC) of the lip and the influence of VEGF in carcinogenesis of the oral cavity and QA

Keywords: actinic cheilitis, VEGF, squamous cell carcinoma

5. REFERÊNCIAS

1. Rojas G, Martínez A, Brethauer U, Grez P, Yefi R, Luza S, Marchesani FJ. Actinic Cheilitis: Epithelial expression of COX-2 and its association with mast cell tryptase and PAR-2. *J Oral Oncology*. 2008; doi:10.1016/j.oraloncology.2008.05.019
2. Pindborg JJ, Reichart PA, Smith CJ, van der Waal. *Histological Typing of Cancer and Precancer of the oral mucosa*. WHO International Classification of tumours. Berlin Heidelberg: Springer Verlag; 1997
3. Freitas M, Ramalho LMP, Xavier FCA, Moreira ALG, Reis SRA. p53 and MDM2 protein expression in actinic cheilitis. *J Appl Oral Sci*. 2008; 16(6): 414-9
4. Martinez A, Brethauer I, Rojas IG, Spencer M, Mucientes F, Borlando J, Rodolph MI. Expression of apoptotic and cell proliferation regulatory proteins in actinic cheilitis. *J Oral Pathol Med*. 2008; 34: 257-62
5. Jablonska E, Piotrowski L, Jablonski J, Grabowska Z. VEGF in the culture of PMN and the serum in oral cavity cancer patients. 2002; 38: 605-609.
6. Shemirani B, Crowe DL. Head and neck squamous cell carcinoma lines produce biologically active angiogenic factors. 2000; 36: 61-66.
7. Kishimoto K, Sasaki A, Yoshihama Y, Mese H, Tsukamoto G. Expression of vascular endothelial growth factor-C predicts regional lymph node metastasis in early squamous cell carcinoma. 2003; 38: 391-396
8. Gomes APN, Johann JE, Lovato GG, Ferreira AM. Comparative Analysis of the Mast Cell Density in Normal Oral Mucosa, Actinic Cheilitis and Lip Squamous Cell Carcinoma. *Braz Dent J*. 2008; 19(3): 186-189
9. Cavalcante AS, Anbinder AL, Carvalho YR. Actinic cheilitis: clinical and histological features. *J Oral Maxillofac Surg*. 2008; 66(3): 498-503.
10. Abreu MAMM, Silva OMP, Pimentel DRN, Hirata, CHW, Weckx LLM, Alchorne MMA, Michalany NS. Actinic Cheilitis adjacent to squamous carcinoma of the lips as an indicator of prognosis. *Rev Bras Otorrinolaringologia*. 2006; 72(6): 767-771.
11. Cury PR, Furuse C, Araújo NS, Araújo VC de. Signal transducer and activator of transcription-3 expression and activation is desregulated in actinic cheilitis. *J Cutan Pathol*. 2007; 34: 606-611.
12. Xavier, FCA, Takiya CM, Reis RAR, Ramalho LMP. p63 Immunoexpression in lip carcinogenesis. *J Mol Hist*. 2009; 40: 131-137.
13. Banczy J, Csiba A. Occurrence of epithelial dysplasia in oral leukoplakia. *Oral Surg*. 1976; 42(6): 766-74.
14. Santos JN, Souza SOM, Nunes FD, Sotto MN, Araújo VC. Altered cytokeratin expression in actinic cheilitis. *J Cutan Pathol*. 2003; 30: 237-241.

15. Pimentel DRN, Michalany N, Alchorne M, Abreu M, Borra RC, Weckx L. Actinic Cheilitis: histopathology and p53. *J Cutan Pathol*. 2006; 33: 539–544.
16. Mohamed KM, Le A, Doung H, Wu Y, Zhang Q, Messadi DV. Correlation between VEGF and HIF - 1 α expression in human oral squamous cell carcinoma. 2004; 72: 143-152.
17. Shang Z, Li J, Li Z. Upregulation of Serum and Tissue Vascular Endothelial Growth Factor Correlates With Angiogenesis and Prognosis of Oral Squamous Cell Carcinoma. 2005; doi: 10.1016/j.joms,2005,11.105.
18. Chen Y, Jin Y, Shieh D, Tsai S, Wu L. Molecular characterization of angiogenic properties of human oral squamous cell carcinoma cells. *Oral Oncology*. 2002; 38: 699-705.
19. Michi Y, Morita I, Amagasa T, Murota M. Human oral squamous cell carcinoma lines promote angiogenesis via expression of vascular endothelial growth factor and upregulation of KDR / flk - 1 expression in endothelial cells. *Oral Oncology*. 2000; 36: 81-88
20. Veikkola T, Karkkainen M, Claesson-Welsh L, Alitalo K. Regulation of angiogenesis via vascular endothelial growth factor receptors. *Cancer Res*. 2000;60(2):203-12
21. Takahashi T, Shibuya M. The vascular endothelial growth factor (VEGF)-VEGF receptor system and its role under physiological and pathological conditions. *Clin Sci*. 2005;109(3):227-41.
22. Shibuya M, Claesson-Welsh L. Signal transduction by VEGF receptors in regulation of angiogenesis and lymphangiogenesis. *Exp Cell Res*. 2006;312(5):549-60.
23. Karl E, Warner K, Zeitlin B, Kaneko T, Wurtzel L, Jin T, et al. Bcl-2 in a proangiogenic signaling pathway through Nuclear Factor- κ B and CXC chemokines. *Cancer Res*. 2005;65(12):5063-9.
24. Johnstone S, Logan RM. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in normal oral mucosa, oral dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg*. 2007; 36: 263-266.
25. Carlile J, Harada K, Baillie R, Macluskey M, Chisholm DM, Ogden G, Schor SL, Schor AM. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in oral tissues: possible relevance to angiogenesis, tumour progression and field cancerisation. *J Oral Pathol Med*. 2001; 30: 449-457.
26. Kitidai Y, Onogawa S, Kuwai T, Matsumura S, Hamada H, Ito M, et al. Angiogenic switch occurs during the precancerous stage of human esophageal squamous cell carcinoma. *Oncol Rep*. 2004;11(2):315-9.
27. Arora S, Kaur J, Sharma C, Mathur M, Bahadur S, Shukla NK, Deo SVS, Ralhan R. Stromelysin 3, Ets-1, and vascular endothelial growth factor in oral precancerous and

cancerous lesions: Correlation with density, progression, and prognosis. *Clinical Cancer Research*. 2005; 11: 2272-2284.

28. Moriyama M, Kumagai S, Kojima K, Kakihara K, Yamamoto E. Immunohistochemical study of tumour angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology*. 1997; 33(5): 369-374.

29. Myoung H, Hong S, Kim Y, Hong S, Kim M. Evaluation of the anti-tumor and anti-angiogenic effect of paclitaxel and thalidomide on the xenotransplanted oral squamous cell carcinoma. *Cancer Letters*. 2001; 163: 191-200.

30. Folkman J, Shing J. Angiogenesis. *J of Biological Chemistry*. 1992;267(16):10931-34).

31. Harmey JH, Bouchier-Hayes D. Vascular endothelial growth factor (VEGF), a survival factor for tumour cells: implications for anti-angiogenic therapy. *Bioessays*. 2002;24(3):280-3

32. Ferrara N, Kerbel RS. Angiogenesis as a therapeutic target. *Nature*. 2005;438 (7070):967-74.

ANÁLISE DA EXPRESSÃO DO FATOR DE CRESCIMENTO ENDOTELIAL VASCULAR E DO FATOR VIII EM QUEILITE ACTÍNICA E CARCINOMA ESCAMOCELULAR DE LÁBIO

Rebeca Mota Vasconcelos*; Sílvia Regina de Almeida Reis**; Miguel Gustavo Setúbal Andrade***

* Aluna do curso de Pós-Graduação em Odontologia pela Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP)

** Doutora em Patologia Oral pela Universidade de Berlim. Professora Adjunta do curso de Odontologia da EBMSP. Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Odontologia pela EBMSP

*** Doutor em Imunologia pela Universidade Federal da Bahia (UFBA). Professor Adjunto do curso de Odontologia da EBMSP

Resumo **Introdução:** Quando o aparecimento do carcinoma escamocelular (CEC) de lábio é precedido por uma lesão cancerizável, os tecidos epitelial e conjuntivo apresentam transformações celulares que apontam para um desenvolvimento de malignidade. **Objetivo:** Estudar a expressão do VEGF e do Fator VIII, relacionando-os com os graus de displasia epitelial e com os graus de diferenciação dos CECs. **Metodologia:** Foram analisados 10 casos de tecido da mucosa normal (TN) e 34 casos de CECs associados a queilites actínicas (QAs). A expressão dos anticorpos anti-VEGF e anti-Fator VIII foi analisada por métodos imunohistoquímicos. **Resultados:** Observou-se que a displasia epitelial nas QAs quando presente variou de leve a severa. Não foi encontrada associação entre os tipos de displasias e o grau de diferenciação dos CECs. Todos os CECs, QAs e TNs expressaram o Fator VIII e o VEGF. Observou-se aumento significativo na expressão do VEGF e do Fator VIII nos CECs em relação às QAs e aos TNs. Notou-se ausência de significância na expressão do VEGF e do Fator VIII nos diferentes graus de severidade da displasia. Houve expressão significativa do VEGF nos diferentes graus de diferenciação do carcinoma. No entanto, não foi observada esta expressão ao analisar o Fator VIII nestes tecidos. Ao correlacionar o Fator VIII e o VEGF observou significância apenas nos TNs. **Conclusão:** A expressão do VEGF e do Fator VIII pode ser um importante indicador de carcinogênese bucal, no entanto estudos adicionais com isoformas específicas, a exemplo do VEGF-C associado à progressão tumoral e metástase, tornam-se necessários, para um melhor entendimento do papel do VEGF na tumorigênese labial.

Palavras-chave: Queilite Actínica, VEGF, Fator VIII, Carcinoma Escamocelular.

1. INTRODUÇÃO

Queilite actínica é uma lesão cancerizável que pode se transformar em carcinoma escamocelular de lábio.¹ O lábio inferior é o local mais acometido pela radiação solar e dentre as principais manifestações clínicas da QA observa-se a presença de úlcera de base endurecida, rígida, exudativa e crostosa. Histologicamente são freqüentes na QA, atipias celulares a exemplo de perda da razão núcleo citoplasma, hiperchromatismo nuclear, pleomorfismo celular e nuclear, grande número de mitoses irregulares, podendo apresentar ainda, cordões e ilhas invasivas de células epiteliais malignas e pérolas de queratina.² No CEC de lábio, a presença de elastose solar e outras alterações histológicas, sugestivas de queilite actínicas crônicas prévias adjacentes ao tumor são achados comuns em quase todos os casos.³

Paralelamente a estas transformações celulares individuais, a angiogênese no tecido é essencial para o desenvolvimento e expansão dos tumores.⁴ Muitos fatores angiogênicos implicam na progressão do tumor⁵. Entre estes, o Fator de Crescimento Endotelial Vascular (VEGF) é uma potente citocina angiogênica que promove o aumento do suporte sanguíneo em vários diferentes tumores. Esse fator de crescimento age aumentando a permeabilidade vascular e o crescimento de células endoteliais, sua proliferação, migração e diferenciação. Um significativo aumento da vascularização ocorre durante a transformação da mucosa normal, através de diferentes estágios de displasia até o CEC do lábio.⁶

A expressão do VEGF tem sido estudada em muitos cânceres, inclusive no carcinoma de boca, com resultados conflitantes. Todo esse conhecimento relativo à angiogênese e a comprovação de que as neoplasias malignas dependem essencialmente do suprimento sanguíneo tem inspirado muitos pesquisadores pela busca de moléculas antiangiogênicas a serem utilizadas como alvos potenciais no tratamento do câncer.

Desta forma, este trabalho tem como objetivo estudar a imuno-expressão do VEGF e do Fator VIII, um marcador de densidade endotelial, em lesões de QA e CEC de lábio com intuito de oferecer um suporte a mais na pesquisa das etapas iniciais da carcinogênese labial.

2. METODOLOGIA

O projeto desta pesquisa quantitativa foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (CEP-Bahiana/EBMSP) sob o número de protocolo 22/2008 (ANEXO 1)

2.1. Seleção dos casos

Trinta e quatro casos de CECs associados a lesões de QAs foram selecionados dos arquivos do laboratório de Patologia bucal da Escola Bahiana de Medicina e Saúde Pública (EBMSP). Todos estes casos foram provenientes de peças cirúrgicas de ressecção de lábio inferior. O diagnóstico anátomo-patológico foi revisado e confirmado por dois patologistas experientes em lâminas coradas pela hematoxilina-eosina (HE) e analisadas morfológicamente em microscopia de luz. Como grupo controle, dez casos de tecido normal (mucocele) foram selecionados randomizadamente.

A seleção dos casos teve como fim observar o padrão imunohistoquímico dos anticorpos (VEGF e Fator VIII) em epitélio normal, displásico e neoplásico de lábio.

2.2. Estudo histopatológico

Nas lesões de QAs foram utilizados os critérios histológicos para diagnóstico de displasia epitelial definidos pela Organização Mundial de Saúde (OMS).⁷ Foram considerados em cada secção a presença ou não de estratificação epitelial irregular, hiperplasia da camada basal, processos reticulares em forma de gota, perda da polaridade das células basais, aumento da razão núcleo/citoplasma, polimorfismo nuclear, aumento do tamanho dos nucléolos, hiperchromatismo nuclear, redução da aderência intercelular, mitoses suprabasais e disceratose.

O grau de severidade da displasia seguiu os parâmetros estabelecidos por Bánóczy e Csiba:⁸ a) epitélio com ausência de atipia; b) displasia epitelial leve quando duas características estiverem presentes; c) displasia epitelial moderada, quando três a quatro

características estiverem presentes; d) displasia epitelial severa, quando cinco ou mais características estiverem presentes.

A avaliação histológica dos CECs de lábio foi realizada de acordo com o sistema de graduação de malignidade desenvolvido pela OMS⁹ que classifica o tumor em pouco, moderadamente e bem diferenciado. Os bem diferenciados foram assim denominados quando sua arquitetura tecidual se assemelha a um padrão normal de epitélio escamoso. Já os pouco diferenciados caracterizam-se pelo predomínio de células imaturas, numerosas mitoses típicas e atípicas, com mínima ceratinização. Os CECs moderadamente diferenciados apresentam certo grau de pleomorfismo nuclear, atividade mitótica e pouca ceratinização.⁹

2.3. Procedimentos Imunohistoquímico

Em todos os materiais incluídos em parafina foram realizados cortes de tecido de quatro micrômetros (μm) de espessura que foram montados em lâmina de vidro previamente preparadas com organossilano a 6%.

O método de imuno-marcação utilizado foi o da streptavidina-biotina peroxidase, e os anticorpos primários foram o monoclonal anti-VEGF (DAKO; 1:50) e o policlonal anti-FatorVIII (DAKO; 1:25). Os cortes histológicos foram submetidos à desparafinização em banhos sequenciais de xilol, acetona, álcool, (absoluto, 95%, 70%, 50%, 30%) e água destilada em temperatura ambiente. Em seguida, submetidos, à recuperação antigênica com tampão citrato, pH 6,0 com posterior bloqueio das ligações inespecíficas (leite Mólico a 10%) e então incubados "overnight" a 4°C com o anticorpo primário. Os anticorpos secundários utilizados seguiram as orientações do Kit LSAB-Peroxidase (DAKO Corporation, USA) e a revelação foi realizada através do DAB com peróxido de hidrogênio a 30%. As lâminas foram contra-coradas com hematoxilina e montadas em lamínula com bálsamo do Canadá para avaliação morfológica e análise quantitativa.

Como controles positivos foram utilizados cortes de tecido de granulação removidos por indicação cirúrgica prévia e como controles negativos, os mesmos tecidos, sendo suprimidos da reação os anticorpos primários.

2.4. Histomorfometria

A expressão tecidual do VEGF e do Fator VIII foram analisadas de forma quantitativa através do software Motic Images Advanced 3.0[®] no laboratório de microscopia da EBMSp. Em cortes de tecidos normais, displásicos e carcinoma, obteve-se uma área padrão para todos os casos. Dentro dessa área mensurou-se o tamanho da área marcada pelo VEGF e pelo Fator VIII. Em seguida foi calculada a porcentagem da área com marcação dos anticorpos em relação à área total selecionada. Todas as análises foram feitas por um mesmo examinador calibrado para evitar viés de tendenciosidade.

2.5. Análise estatística

A diferença da incidência de alterações histológicas entre as diferentes severidades da displasia foi analisada pelo teste Qui-quadrado (χ^2).

Para associar os graus de diferenciação do CEC com os graus de severidade da displasia foi utilizado o teste de ANOVA, seguido do post hoc de Tukey.

A diferença de porcentagem da área marcada pelo VEGF e pelo Fator VIII nos tecidos normais, displásicos e neoplásicos foi analisada pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

A análise da expressão do VEGF e do Fator VIII entre os tecidos normais e os displásicos e neoplásicos, respectivamente foi realizada pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis.

A expressão do VEGF e do Fator VIII nos diferentes graus de displasia e nos diferentes graus de diferenciação dos CECs foi analisada pelo teste de Mann-Whitney, após observar a normalidade dos dados através do teste de Shapiro-Willkie.

A associação entre a expressão do VEGF e do Fator VIII nos diferentes tipos de tecidos foi analisado pelo coeficiente de correlação de Spearman.

[®] Motic China Group CO. LTD

3. RESULTADOS

3.1. Análise histológica

Os 34 casos estudados, corados com hematoxilina-eosina (HE) foram avaliados sob microscopia de luz. Todos os tumores possuíam lesões de QA associados, onde o grau displásico variou de ausente a severo, de acordo com os parâmetros de Banoczy e Csiba, 1976.⁸

Em relação às lesões de QA, observou-se que dois casos apresentaram ausência de displasia (6%), dez casos (29,4%) foram graduados como displasia leve, treze casos (38,2%) como displasia moderada e nove casos (26,4%) como displasia severa. Dos casos de CEC de lábio, observou-se que vinte e dois (64,7%) foram bem diferenciados, doze (35,3%) foram moderadamente diferenciados e nenhuma neoplasia apresentou-se como pouco diferenciada (Tabela 1).

Tabela 1 - Distribuição dos casos em relação aos diferentes graus de displasia e carcinoma.

<i>Condição</i>	<i>Classificação</i>	<i>n (%)</i>
Displasia	<i>Ausente</i>	2(6%)
	<i>Leve</i>	10 (29,4%)
	<i>Moderada</i>	13(38,2%)
	<i>Severa</i>	9(26,4%)
Carcinoma	<i>Bem diferenciado</i>	22(64,7%)
	<i>Moderadamente diferenciado</i>	12(35,3%)

Fonte: Serviço de Estomatologia da EBMSP, 2010

Em relação à distribuição das alterações histológicas nas displasias epiteliais, observou-se que a estratificação epitelial irregular foi a atipia mais freqüente (75%), seguidas pelo hiperchromatismo nuclear (71,8%), processos reticulares em gota (53,1%) e hiperplasia da camada basal (34,3%) (Tabela 2). Alterações histológicas, como aumento da razão núcleo citoplasma, polimorfismo nuclear e redução da aderência intercelular foram

estatisticamente mais prevalentes em displasia severa quando comparado com os outros graus de displasia (Teste Qui-quadrado, $p < 0,005$) (Tabela 2).

Tabela 2 – Percentual das alterações histológicas de acordo com os diferentes graus de displasia epitelial.

Alterações Histológicas	Displasia Epitelial				p
	Leve (n=10)	Moderada (n=13)	Severa (n=9)	Total (n=32)	
Estratificação epitelial irregular	50	76,9	100	75	0,68
Hiperplasia da camada basal	20	38,4	44,4	34,3	0,27
Processos reticulares em gota	50	53,8	55,5	53,1	0,77
Aumento de mitoses	0	15,3	33,3	15,6	0,45
Perda da polaridade das células basais	10	23	55,5	28,1	0,06
Aumento da razão núcleo-citoplasma	0	0	33,3	9,3	0,02
Hipercromatismo nuclear	60	76,9	77,7	71,8	0,20
Polimorfismo nuclear	0	30,7	77,7	34,3	0,007
Aumento do tamanho dos nucléolos	20	15,3	66,6	31,2	0,12
Redução da aderência intercelular	0	0	55,5	15,6	0,05
Ceratinização da camada espinhosa	10	1,69	11,1	9,3	0,75

Fonte: Serviço de Estomatologia da EBMSP

Teste Qui-quadrado

Nível de significância de 5%

Nos casos de CEC o rompimento da membrana basal foi claramente visível, apresentando invasão de cordões e ilhas de células epiteliais malignas e pérolas de ceratina. Estas células tumorais estavam mostrando atipias, como o hipercromatismo nuclear, pleomorfismo celular e nuclear, mitoses atípicas, perda da razão núcleo-citoplasma e aumento do tamanho dos nucléolos. Além disso, foi observado presença de elastose solar (Figura 1).

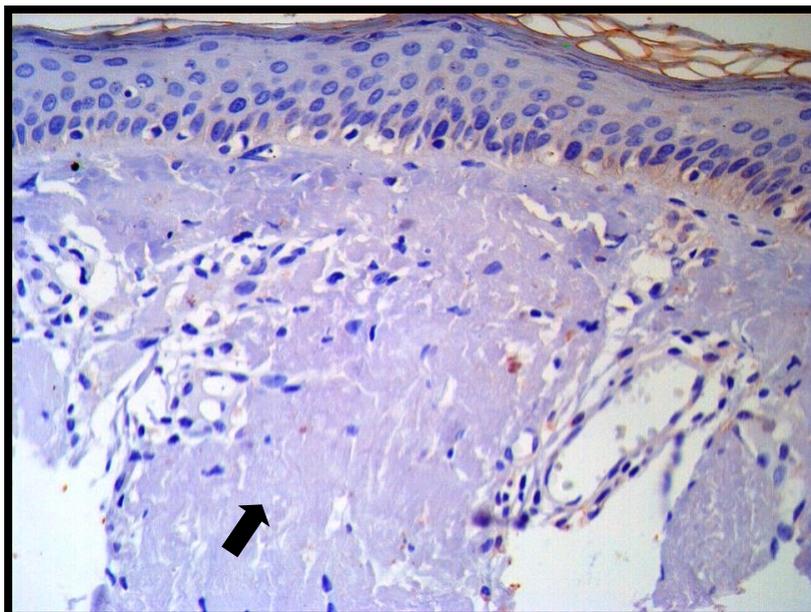


Figura 1 - Fotomicrografia da elastose solar (HE 400X)

Na verificação da existência de associação significativa entre os diferentes graus de severidade de displasia epitelial e os diferentes graus de diferenciação dos CECs não foi observado diferença entre os graus de malignidade do carcinoma em relação aos graus de severidade da displasia epitelial (Teste Tukey, $p > 0,05$) (Tabela 3).

Tabela 3 - Associação entre os graus de atipia de displasia epitelial e os graus de diferenciação de CEC apresentados

Tipo de Carcinoma	Displasia Epitelial			<i>p</i>
	Leve	Moderada	Severa	
Bem Diferenciado	3 (30%)	7 (53,8%)	2 (22%)	$p > 0,05$
Moderadamente Diferenciado	7 (70%)	6 (46,2%)	7 (88%)	$p > 0,05$

Fonte: Serviço de Estomatologia da EBMSP
 Teste Tukey
 Nível de significância de 5%

3.2. Análise da expressão imunohistoquímica do VEGF e do Fator VIII em tecido normal e nas lesões de QA e CEC.

Dos 34 casos de QAs analisados observou-se que 100% da amostra expressaram a proteína VEGF. Nestas lesões, independente do grau de displasia, observou-se expressão do VEGF na camada basal e parabasal, com uma concentração desta proteína na camada basal (Figura 2a). Em relação ao CEC de lábio, todos os espécimes analisados apresentaram positividade para o VEGF com predomínio de expressão nas camadas basal e parabasal (Figura 2b). Em ambas as lesões o padrão de marcação foi difuso e o fator de crescimento estava expresso no citoplasma das células epiteliais. Observou-se também a expressão do VEGF nas células inflamatórias estromais, ácinos das glândulas salivares e músculo. Todos os 10 casos de tecido normal expressaram a citocina VEGF na camada basal e parabasal, a despeito de que em 2 (dois) dos tecidos pôde-se observar uma expressão mais intensa do VEGF na camada parabasal (Figura 2c).

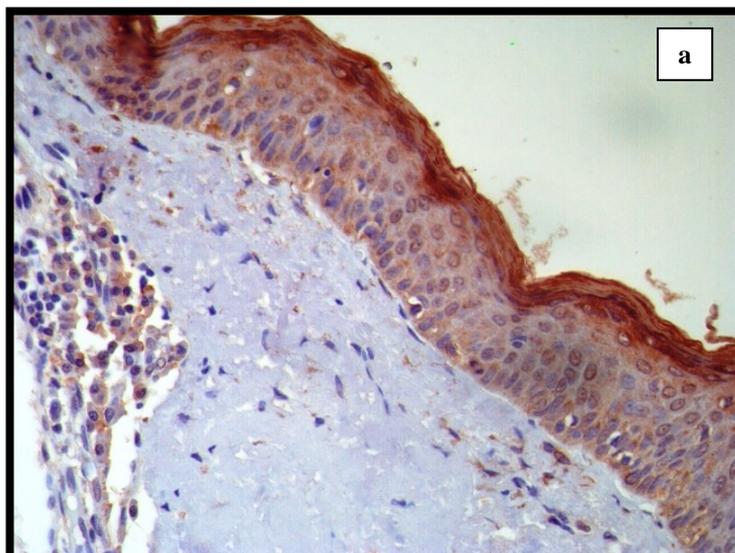


Figura 2a – Intensa imunomarcção de VEGF na camada basal e parabasal. (Streptavidina-biotina 400X)

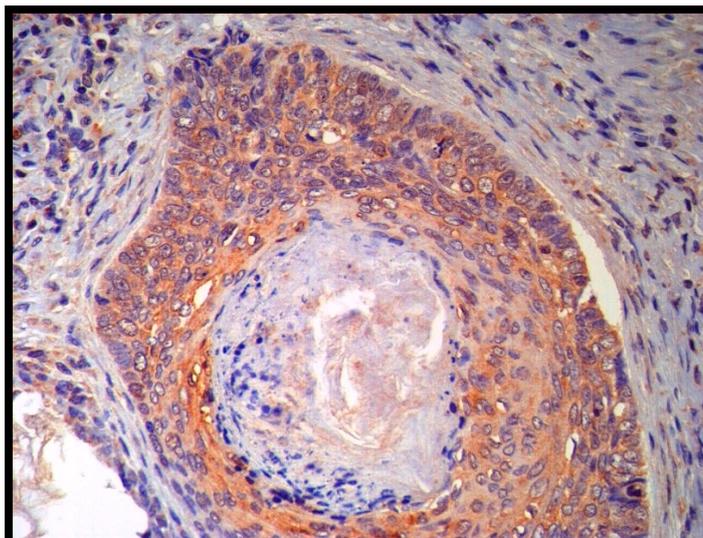


Figura 2b – Intensa imunomarcção de VEGF na camada basal e parabasal. (Streptavidina-biotina 400X)

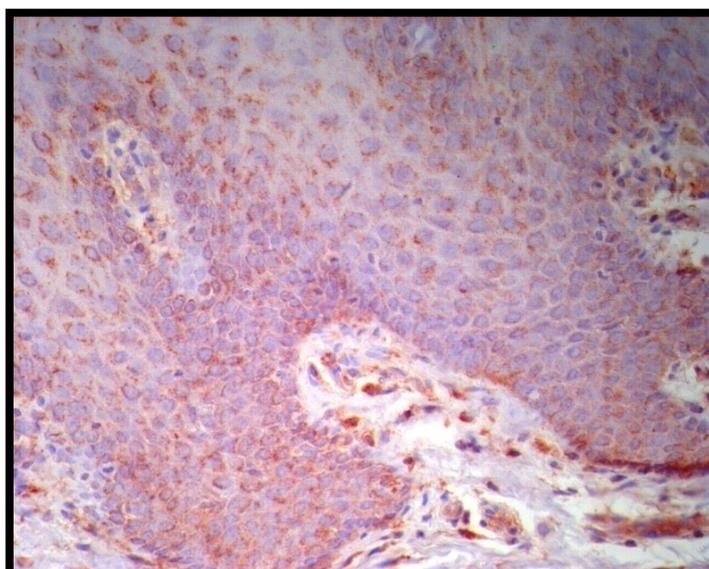


Figura 2c – Expressão do VEGF na camada basal e parabasal. (Streptavidina-biotina 400X)

Em relação à expressão do Fator VIII foi observado expressão em todos os casos de QA (Figura 3a), CEC (figura 3b) e de tecido normal (Figura 3c).

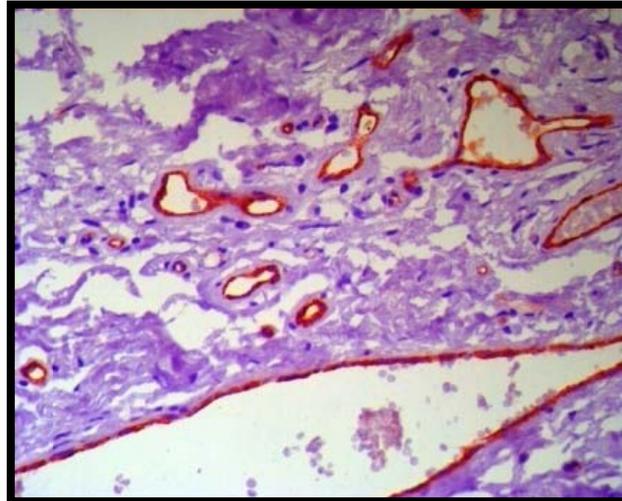


Figura 3a – Intensa imunomarcção de Fator VIII nos vasos endoteliais. (Streptavidina-biotina 400X)

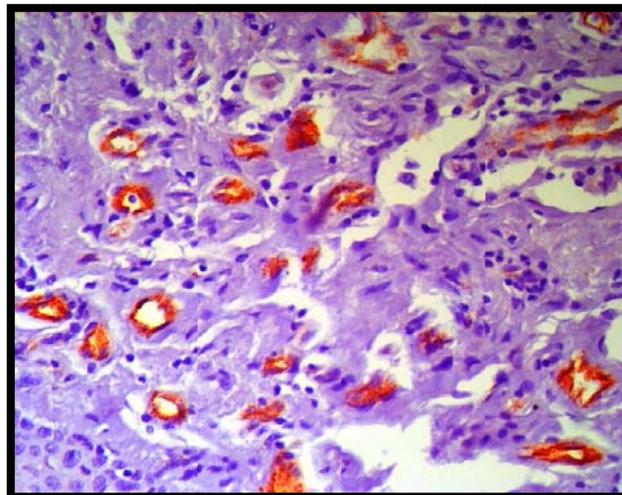


Figura 3b – Intensa imunomarcção de Fator VIII nos vasos endoteliais. (Streptavidina-biotina 400X)

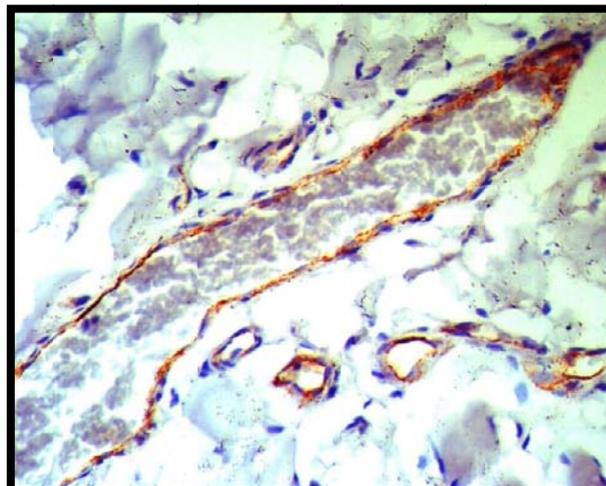


Figura 3c – Intensa imunomarcção de Fator VIII nos vasos endoteliais. (Streptavidina-biotina 400X).

Ao analisar a porcentagem da área marcada pelo VEGF e pelo Fator VIII constatou uma maior expressão destas proteínas nos CECs quando comparado com lesões displásicas e com o tecido normal (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$) (Tabela 4)

Tabela 4 - Expressão do VEGF e do Fator VIII no tecido normal, na displasia e no carcinoma

<i>Variavel</i>	<i>VEGF</i> <i>Media±DP</i>	<i>P</i>	<i>FVIII</i> <i>Media±DP</i>	<i>p</i>
Normal	14,26±8,65		2,12±1,53	
Displasia	7,19±5,30	$p < 0,05$	5,43±2,60	$p < 0,05$
Carcinoma	19,69±9,96		7,23±4,09	

Fonte: Serviço de Estomatologia da EBMSp, 2010

*Teste de Kruskal-Wallis

Nível de significância de 5%

Ao analisar a diferença de expressão do VEGF e do FATOR VIII entre os tecidos normais e os displásicos observou uma maior expressão do VEGF nos tecidos normais quando comparado aos tecidos displásicos, e uma maior expressão do Fator VIII nos tecidos displásicos do que nos normais (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$) (Tabela 5). Também foi feita análise da expressão do VEGF e do Fator VIII para os diferentes tipos de displasia. Constatou-se que não houve diferença estatística na expressão do VEGF e do Fator VIII entre os diferentes graus de displasias. (Teste de Mann-Whitney, $p < 0,05$) (Tabela 5).

Tabela 5 - Expressão do VEGF e do FVIII no tecido normal, e nos diferentes graus de displasia.

<i>Condição</i>	<i>Classificação</i>	<i>VEGF</i> <i>Media±DP</i>	<i>p1</i>	<i>p2*</i>	<i>FVIII</i> <i>Media±DP</i>	<i>p1</i>	<i>p2*</i>
Normal	-	14,26±8,65			2,12±1,53		
Displasia	<i>Leve</i>	7,69±3,58	$p < 0,05$	$p > 0,05$	5,06±2,29	$p < 0,05$	$p > 0,05$
	<i>Moderada</i>	5,46±3,40			5,84±2,79		
	<i>Severa</i>	10,40±6,26			5,61±2,72		

Fonte: Serviço de Estomatologia da EBMSp, 2010

1. Teste de Kruskal-Wallis para todas as variáveis

2.* Teste de Mann-Whitney para os diferentes tipos de displasia

Nível de significância de 5%

A diferença da expressão do VEGF e do FATOR VIII entre os tecidos normais e os diferentes graus de carcinomas também foi analisado. Observou uma maior expressão do VEGF e do Fator VIII nos CECs quando comparado aos tecidos normais (Kruskal-Wallis, $p < 0,05$) (Tabela 6). Ao analisar a expressão do VEGF entre os diferentes graus de carcinoma constatou-se que o CEC bem diferenciado expressou mais esta proteína que o CEC moderadamente diferenciado ($p < 0,05$). Em relação a expressão do Fator VIII, não houve diferença estatística entre os diferentes graus de CEC de lábio ($p < 0,05$) (Teste de Mann-Whitney) (Tabela 6).

Tabela 6 - Expressão do VEGF e do FVIII no tecido normal, e nos diferentes graus de carcinomas.

<i>Condição</i>	<i>Classificação</i>	<i>VEGF</i> <i>Media±DP</i>	<i>p1</i>	<i>p2*</i>	<i>FVIII</i> <i>Media±DP</i>	<i>p1</i>	<i>p2*</i>
Normal	-	14,26±8,65			2,12±1,53		
Carcinoma	<i>BD</i>	21,75±9,71	$p < 0,05$	$p < 0,05$	6,88±4,83	$p < 0,05$	$p > 0,05$
	<i>MD</i>	15,80±9,58			7,96±3,60		

Fonte: Serviço de Estomatologia da EBMSP, 2010

1. Teste de Kruskal-Wallis para todas as variáveis

2.* Teste de Mann-Whitney para os diferentes tipos de carcinomas

Nível de significância de 5%

Ao correlacionar a expressão do VEGF e do FVIII observou significância apenas nos tecidos normais (Gráfico1). Nos demais tecidos, não foi observada correlação entre o VEGF e FVIII (Gráfico 2 e 3) (Teste de Spearman, $p < 0,005$)

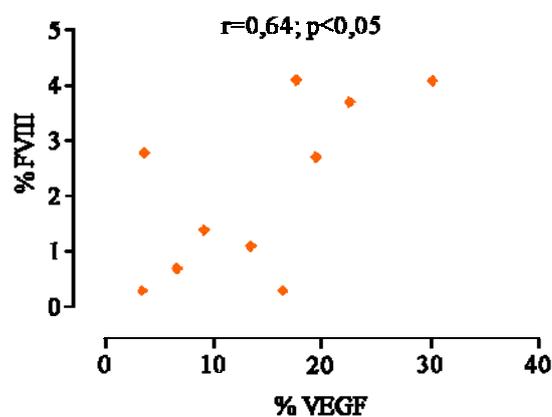


Gráfico 1 - Associação entre a expressão do VEGF e do FVIII nos tecidos normais

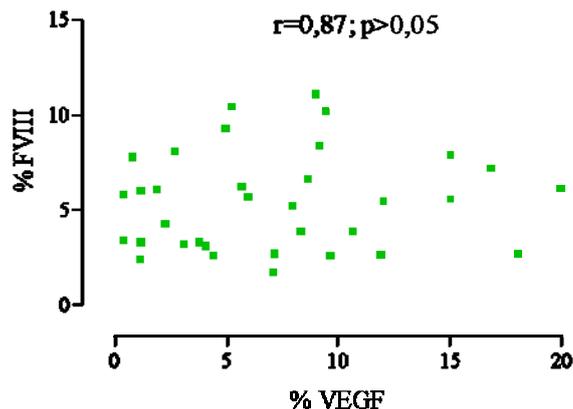


Gráfico 2 - Associação entre a expressão do VEGF e do FVIII nas displasias

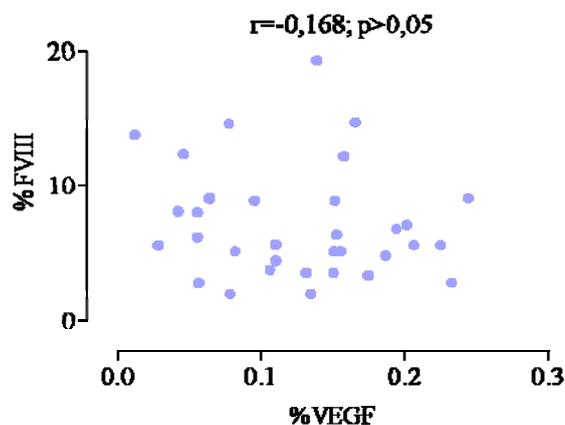


Gráfico 3 - Associação entre a expressão do VEGF e do FVIII nos carcinomas

4. DISCUSSÃO

No presente estudo foram analisados 34 casos de CEC de lábio onde todas estas lesões possuíam QAs associadas. Esses resultados não foram encontrados nos estudos de Xavier *et al.*,¹⁰ onde apenas 56,9% dos casos de CEC de lábio, provenientes de biópsias incisoriais, possuíam lesões de QAs associadas. Esta relação da QA com CEC de lábio e ambas com a exposição da radiação solar forneceu suporte para classificação proposta por Cataldo e Doku,¹¹ em considerar a QA uma lesão pré-maligna.

O elemento básico preditor da evolução das lesões cancerizáveis tem sido a severidade da displasia epitelial.¹² Xavier *et al.*,¹⁰ e Freitas *et al.*,¹³ observaram ausência de displasia leve e maior frequência de displasia severa em lesões de queilite actínica, entretanto, Kaugars *et al.*,¹⁴ detectaram numa amostra de 152 casos de QAs, 52% de

displasia leve. Em nosso estudo, observou que a displasia epitelial, quando presente variou de leve a severa, sendo 26,9% as do tipo severa. Estes diferentes resultados refletem os vários critérios para se estabelecer o grau de displasia em lesões de boca, que embora se reconheçam detalhadamente os aspectos histológicos que as caracterizam, a sua interpretação final é subjetiva.¹⁰

Durante os estágios iniciais da queilite actínica são observadas alterações histológicas no epitélio como hiperqueratose e acantose. Para Pimentel *et al.*,¹² estas alterações podem estar presentes, em algum grau, nas etapas subsequentes da lesão.

As atipias mais frequentes associadas às lesões de displasia severa no presente estudo foram aumento da razão núcleo-citoplasma, polimorfismo nuclear e redução da aderência intercelular. Costa *et al.*,¹⁵ observou estratificação epitelial irregular, aumento da razão núcleo citoplasma, aumento do tamanho dos nucléolos, pleomorfismo nuclear e redução da aderência intercelular como as atipias associados ao aumento da severidade da displasia epitelial. Em contrapartida, Kaugars *et al.*,¹⁴ encontraram esta associação em relação a outras características histológicas como acantose, presença de inflamação no tecido conjuntivo, inflamação perivascular, espessura da camada de ceratina e degeneração basofílica do tecido conjuntivo.

Considerando a evolução do comportamento biológico dos CECs, as lesões que acometem o lábio inferior são geralmente bem definidas, de mais fácil diagnóstico e melhor prognóstico em relação aos CECs localizados em outras regiões da cavidade bucal¹⁶. Em relação ao CECs de lábio deste estudo observou-se que a maioria foi bem diferenciada, e não foram encontradas lesões anaplásicas ou pouco diferenciadas. Estes resultados talvez possam ser justificados pelo fato das lesões que acometem o lábio serem geralmente bem diferenciadas.¹⁶

Para um melhor entendimento das bases moleculares do CEC de lábio, optou-se nesta pesquisa, fazer uma associação entre métodos imunohistoquímicos e avaliações histológicas de rotina, analisando a expressão do VEGF e do Fator VIII nas lesões de CECs do lábio associadas às lesões de QAs.

O VEGF é uma citocina multifuncional que possui um importante papel na angiogênese *in vivo*, promovendo aumento do suprimento sanguíneo, proliferação, migração e

remodelação da matriz extracelular.¹⁷ Também conhecido por Fator de Permeabilidade Vasculare (VPF), pertence a uma família de genes que inclui Fator de Crescimento Placentário (PIGF), VEGF-A, VEGF-B, VEGF-C, VEGF-D e VEGF-E.¹⁸ Dentre as suas várias isoformas, o VEGF-C encontra-se relacionado à progressão tumoral e metástases.¹⁹ No nosso estudo foi utilizado o anticorpo monoclonal anti-VEGF com marcação de todas as isoformas da proteína.

Nas lesões de queilite actínica estudadas, notou-se expressão do VEGF em 100% dos casos. Ao comparar a expressão desta proteína com os tipos de displasia pôde-se perceber que houve uma marcação uniforme em todos os casos de displasias com uma concentração desta proteína na camada basal do epitélio, independente do grau de severidade. No entanto, Carlile *et al.*,⁵ e Tae *et al.*,²⁰ encontraram em lesões displásicas predomínio de expressividade do VEGF na camada parabasal. Foi observado ainda, um decréscimo da expressividade deste anticorpo na displasia severa.²⁰

Neste estudo observou-se uma maior expressão do VEGF nos tecidos normais quando comparado aos tecidos displásicos. Kyzas *et al.*,²¹ e Maeda *et al.*,²² não observaram diferenças significativas entre a expressão do VEGF em displasia epitelial quando comparado com a mucosa normal. Kyzas *et al.*,²⁰ sugere que esta marcação expressiva do VEGF em mucosa normal pode está associada à função que esta citocina exerce na regulação de funções da mucosa sob condições fisiológicas.²⁰ É interessante lembrar que o VEGF tem papel na angiogênese embrionária, fisiológica como, por exemplo na cicatrização de tecidos, e inflamatórias.²⁰

De acordo com Li *et al.*,⁴ Johnstone e Logan,⁶ e Kyzas *et al.*,²³ não existe associação entre o grau de diferenciação da neoplasia e a expressão do VEGF. Em relação aos CEC estudados, todos os casos evidenciaram marcação homogênea positiva para o VEGF, com predomínio na porção basal e parabasal, e com maior significância nos carcinomas bem diferenciados. Estes resultados não foram encontrados por Maeda *et al.*,²² onde dos 45 CEC orais avaliados, apenas 42,2% apresentaram positividade para este anticorpo. Com relação ao padrão de marcação, Carlile *et al.*,⁵ afirmaram ser heterogênea com alternância de áreas fortemente positivas e negativas. Tae *et al.*,²⁰ acreditam que a expressão do VEGF por si só não é suficiente para marcar tumores invasivos, uma vez

que esta proteína também expressa-se em mucosa normal do epitélio, hiperplasias e displasias.

Existem poucos estudos que correlacionam a expressão do VEGF com a densidade microvascular em tumores e lesões displásicas. Neste estudo não foi encontrada correlação entre estes fatores no CEC e na QA, no entanto apresentou associação significativa nos tecidos normais. Tae *et al*, 2000²⁰ observaram esta correlação entre os diferentes graus de displasias.

A maior dificuldade em estudar angiogênese em humanos é a falta de um protocolo metodológico para medir a atividade angiogênica.²⁰

5. CONCLUSÃO

A expressão do VEGF e do Fator VIII em QAs e CECs labial pode ser um importante indicador de carcinogênese bucal, no entanto não foi possível associar a expressão do VEGF com a progressão tumoral uma vez que esta proteína encontrou-se presente com o mesmo padrão de marcação nos diferentes estágios de QA.

A maior expressão de VEGF nos tecidos normais do que nas displasias indicam o envolvimento do VEGF no papel fisiológico e inflamatório da mucosa normal e uma provável subregulação desta citocina nos tecidos displásicos.

Estudos adicionais com isoformas específicas, a exemplo do VEGF-C associado à progressão tumoral e metástase, tornam-se necessários, para um melhor entendimento do papel do VEGF na tumorigênese labial.

6. ABSTRACT

Background: When the appearance of squamous cell carcinoma (SCC) of the lip is preceded by an of premalignant lesions, the epithelium and connective tissues have

cellular changes that point to a development of malignancy. **Purpose:** To study the expression of VEGF and Factor VIII, relating them to the degrees of epithelial dysplasia and the degree of differentiation of SCCs. **Methods:** It was analyzed 10 cases of normal mucosa tissue (NT) and 34 cases of SCC associated to AC. The expression of antibodies anti-VEGF and anti-Factor VIII was analyzed by immunohistochemical methods. **Results:** It was observed that the epithelial dysplasia in QA ranged from mild to severe. No association was found between the types of dysplasia and degree of differentiation of SCCs. All SCC, AC and NT expressed Factor VIII and VEGF. It was observed significantly increased expression of VEGF and Factor VIII in SCC compared to AC and NT. It was noted lack of significance in the expression of VEGF and Factor VIII in different degrees of severity of dysplasia. There was significant expression of VEGF in different degrees of differentiation of carcinoma. However, a significant expression of Factor VIII in these tissues was observed when analyzing. By correlating the Factor VIII and VEGF was observed significance only in NTs. **Conclusion:** The expression of VEGF and Factor VIII in AC and SCC lip may be an important indicator of oral carcinogenesis, however, additional studies with specific isoforms, such as the VEGF-C associated with tumor progression and metastasis, are necessary to a better understanding of the role of VEGF in tumorigenesis lip.

Keywords: actinic cheilitis, VEGF, Factor VIII, squamous cell carcinoma.

7. REFERÊNCIAS

1. Santos JN, Souza SOM, Nunes FD, Sotto MN, Araújo VC. Altered cytokeratin expression in actinic cheilitis. *J Cutan Pathol.* 2002; 30: 237-241.
2. Silva FD, Daniel FI, Grando LJ, Calvo MC, Rath IBS, Fabro SML. Estudo da prevalência de alterações labiais em pescadores da ilha de Santa Catarina. *Revista Odonto Ciência* 2006 Jan; 21(51): 37-42.
3. Abreu MAMM, Silva OMP, Pimentel DRN, Hirata, CHW, Weckx LLM, Alchorne MMA, Michalany NS. Actinic Cheilitis adjacent to squamous carcinoma of the lips as an indicator of prognosis. *Rev Bras Otorrinolaringologia.* 2006; 72(6): 767-771.
4. Li CS, Shintani N, Terakado SK, Klosek T, Ishikawa K, Nakashiro H. Microvessel density and expression of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and platelet-derived endothelial growth factor in oral squamous cell carcinomas. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2005; 34: 559-565.
5. Carlile J, Harada K, Baillie R, Macluskey M, Chisholm DM, Ogden G, Schor SL, Schor AM. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in oral tissues:

possible relevance to angiogenesis, tumour progression and field cancerisation. *J Oral Pathol Med.* 2001; 30: 449-457.

6. Johnstone S, Logan RM. The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in oral dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology.* 2005; 42: 337-342.

7. Pindborg JJ, Reichart PA, Smith CJ, van der Waal. *Histological Typing of Cancer and Precancer of the oral mucosa. WHO International Classification of tumours.* Berlin Heidelberg: Springer Verlag; 1997.

8. Banoczy J, Csiba A. Occurrence of epithelial dysplasia in oral leukoplakia. *Oral Surg.* 1976; 42(6): 766-74.

9. Lourenço S, Schueler A, Camisasca D, Lindenblatt R, Bernardo V. Classificação histopatológicas para o Carcinoma de Células Escamosas Oral: Revisão de Sistemas Propostos. *Rev Brasileira de Cancerologia.* 2007; 53(3):325-333.

10. Xavier, FCA, Takiya CM, Reis SRA, Ramalho LMP. p63 Immunoexpression in lip carcinogenesis. *J Mol Hist.* 2009; 40: 131-137.

11. Cataldo E, Doku HC. Solar cheilitis. *J Dermatol Surg Oncol.* 1981 Dec;7(12):989-95.

12. Pimentel DRN, Michalany N, Alchorne M, Abreu M, Borra RC, Weckx L. Actinic Cheilitis: histopathology and p53. *J Cutan Pathol.* 2006; 33: 539-544.

13. Freitas M, Ramalho LMP, Xavier FCA, Moreira ALG, Reis SRA. p53 and MDM2 protein expression in actinic cheilitis. *J. Appl Oral Sci.* 2008; 16(6): 414-9.

14. Kaugars GE, Pillion T, Svirsky JA, Page DG, Burns JC, Abbey LM. Actinic cheilitis: a review of 152 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1999;88:181-6.

15. Costa NL, Leite AFO, Junior APC, Alencar RCG, Bittar GOJ, Silva TA, Batista AC. Density and migration of mast cells in lip squamous cell carcinoma and actinic cheilitis. *Histol Histopathol.* 2009; 24: 457-465.

16. Beltrami CA, Desinan L, Rubini C. Prognostic factors in squamous cell carcinoma of the oral cavity. A retrospective study of 80 cases. *Pathol Res Pract.* 1992; 188:510-516.

17. Jablonska E, Piotrowski L, Jablonski J, Grabowska Z. VEGF in the culture of PMN and the serum in oral cavity cancer patients. 2002; 38: 605-609.

18. Shintani S, Li C, Ishikawa T, Mihara M, Nakashiro K, Hamakawa H. Expression of vascular endothelial growth factor A, B, C, and D in oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncology* 2004; 40: 13-20.

19. Kishimoto K, Sasaki A, Yoshihama Y, Mese H, Tsukamoto G. Expression of vascular endothelial growth factor-C predicts regional lymph node metastasis in early squamous cell carcinoma. 2003; 38: 391-396.
20. Tae K, EL-Naggar AK, Yoo E, Feng L, Lee JJ, Hong WK. Expression of vascular endothelial growth factor and microvessel density in head and neck tumorigenesis. Clin Cancer Res. 2000 Jul; 6(7):2821-8.
21. Kyzas AP, Dimitrios S, Batistatou A, Agnantis NJ. Hypoxia-induced tumor angiogenic pathway in head and neck cancer: an in vivo study. Cancer Letters Nov 2004; 225: 297-304.
22. Maeda T, Matsumura S, Hiranuma H, Jikko A, Furukawa S, Ishida T, Fuchihata H. Expression of vascular endothelial growth factor in human oral squamous cell carcinoma: its association with tumour progression and p53 gene status. J Clin Pathol. 1998; 51: 771-775.
23. Kyzas PA, Stefanou D, Agnantis NJ. COX-2 expression correlates with VEGF - C and lymph node metastasis in patients with head and squamous cell carcinoma. Mod Pathol. 2005 Jan;18(1):153-60.
24. Smith BD, Smith GL, Carter D, Sasaki CT, Haffty BG. Prognostic Significance of Vascular Endothelial Growth Factor Protein Levels in Oral and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. Journal of Clinical Oncology. 2000 May; 18(10): 2046-2052.
25. Toi M, Hoshima S, Takayanagi T, Tominaga T. Association of Vascular Endothelial Growth Factor Expression with Tumor Angiogenesis and with Early Relapse in Primary Breast Cancer. J Cancer Res. 1994 October; 85, 1045-1049.

8. ANEXO



FUNDAÇÃO BAHIANA PARA DESENVOLVIMENTO DAS CIÊNCIAS
ESCOLA BAHIANA DE MEDICINA E SAÚDE PÚBLICA

COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Salvador, 16 de maio de 2008.

DOC.N. 060/2008

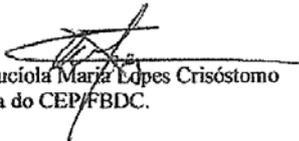
REFERENTE AO PROTOCOLO N. 22/2008

“Análise de expressão imuno-histoquímica do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em queilite actínica e carcinoma escamocelular do lábio”
Julgado em Sessão Extraordinária de 16.05..08.

Pesquisadora: Prof. Sílvia Regina de Almeida Reis

O Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Bahiana para o Desenvolvimento das Ciências, após a análise do ponto de vista bioético do Protocolo acima citado considera que o Protocolo atende aos princípios éticos em pesquisa em seres humanos, segundo a Resolução 196/96 do Conselho Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP CNS-MS). Diante do exposto julga o protocolo supracitado **APROVADO**.

Lembramos a necessidade do envio de relatório anual do andamento da pesquisa, dentro do cronograma citado no mesmo protocolo.


Prof. Dra. Lucíola Maria Lopes Crisóstomo
Coordenadora do CEP/FBDC.

Ilma. Sra.
PROFª SILVIA REGINA DE ALMEIDA REIS
Rua Pedro de Souza Pondé, 181 – Apart. 401 – Ondina
CEP. 40.140-000 – Salvador-Bahia

BAHIANA

Salvador, 28 de junho de 2010

Senhora Coordenadora,

Em relação ao assunto contido no seu DOC.N. 060/2008, em referência ao Protocolo N. 22/2008, informo a V.Sa. que o projeto "Análise de expressão imunohistoquímica do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) em queilite actínica e carcinoma escamocelular do lábio" teve a sua pesquisadora responsável Prof^ª Dr^ª Sílvia Regina de Almeida Reis substituída pelo Prof. Dr. Miguel Gustavo Setúbal Andrade que está respondendo pelo desenvolvimento respectivo.

Cordialmente,


FBDC/EBMSP - Curso de Odontologia
Prof. Dr. Urbino da Rocha Tunes
Coordenador

Ilm^ª Sr^ª
Prof^ª Dr^ª Lucíola Maria Lopes Crisóstomo
M. D. Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa
FBDC