

**ESTUDO DAS PROTEÍNAS COMPONENTES DA
JUNÇÃO COMPACTA NA EVOLUÇÃO DO
CARCINOMA EPIDERMÓIDE DO LÁBIO**

ANDRÉA DE MORAES CARVALHO

**Dissertação apresentada à Fundação Antônio
Prudente para obtenção do Título de Mestre
em Ciências**

Área de concentração: Oncologia

Orientadora: Dra. Silvia Vanessa Lourenço

São Paulo

2012

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca da Fundação Antônio Prudente

Carvalho, Andréa de Moraes

Estudo das proteínas componentes da junção compacta na evolução do carcinoma epidermóide do lábio / Andréa de Moraes Carvalho – São Paulo, 2012.

70p.

Dissertação (Mestrado)-Fundação Antônio Prudente.

Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia.

Orientadora: Silvia Vanessa Lourenço

Descritores: 1. CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS. 2. CARCINOMA EPIDERMÓIDE. 3. LÁBIO. 4. JUNÇÕES CELULARES. 5. CLAUDINAS.

“I shall never forget that silence when I finished the last line.”

Noel Gallagher

Aos meus pais, José Eduardo Carvalho e Rosely de Moraes Carvalho e ao meu irmão Nicolas de Moraes Carvalho, pelo amor, apoio e, muitas vezes, pelo sacrifício dedicado de maneira incondicional para que eu pudesse superar as dificuldades e concretizar muitos dos meus sonhos, mesmo que isso significasse renúncia e sofrimento para si próprios. Os valores que vocês me ensinaram são muito maiores que qualquer título pode conceder, e, estes sim, levarei sempre comigo. A vocês, dedico não só este trabalho, mas minha vida, meu amor e minha eterna gratidão.

AGRADECIMENTOS

Todo esse trabalho não teria sido possível sem a ajuda de inúmeras pessoas, tenho receio de esquecer algum nome, mas acreditem todos que conviveram nesse período contribuíram de alguma forma.

À Professora Dra. Silvia Vanessa Lourenço, orientadora deste trabalho, por garantir que o mesmo fosse realizado da melhor maneira possível, não medindo esforços para tal, e, nos momentos de dificuldade pela confiança e apoio.

À funcionária do Instituto de Medicina Tropical Cristina, pelo qual seu apoio técnico na microtomia das lâminas foi essencial para a execução da dissertação.

À Dra. Adriana da Costa Neves por ter confiado em mim e no meu trabalho, pelo apoio e palavras tão sinceras em todos os momentos.

Aos funcionários do Hospital das Clínicas do Departamento de Dermatologia Maria Cristina Gallardo, Jaqueline Maria Cruz Meneghin, Leandro Riente e Rosângela, pelo qual apoio no levantamento da casuística deste trabalho foi essencial.

À Aline Damascena, do departamento de estatística do Hospital A.C. Camargo pela colaboração nas análises estatísticas deste trabalho.

À Dra. Érika Martins, do Hospital A.C Camargo pelo apoio na estatística da dissertação.

Aos funcionários do Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, Elisa dos Santos, Adriana Fraga

Costa Samos Paris, Néia Barbosa, Zilda Alves e Nair Maria Pereira pelos momentos de descontração nas horas do almoço, ajuda na parte laboratorial da dissertação e companheirismo.

Aos funcionários da secretaria da Pós Graduação do Hospital A.C Camargo que sempre prestavam ajuda nas dúvidas e informações para realização do mestrado.

Aos colegas da Pós-Graduação do Hospital A.C. Camargo, André Lavorato, Ana Urvanegia, Beatriz Maia, Camila Santos, Caroline Fernandes e Kelly Siqueira pela amizade e companhia nas manhãs de quarta feira e pela inspiração de que algum dia tudo isso vai acabar e no fim vamos dar risadas.

À amiga Michele Carvalho, bióloga e companheira de laboratório. Terminar esta dissertação é como terminarmos nossa jornada. Pelo apoio quando pensei em desistir, não há palavras para te agradecer, além de um profundo e sincero, obrigada pela amizade.

À cirurgiã dentista Nelise Lascane doutoranda da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, amiga de laboratório pelo apoio na redação deste trabalho.

Às amigas Cícera Maria Gomes, Fernanda Somma Paioli e Janaína Peixoto por compartilharem comigo inúmeros momentos de alegria e descontração, mesmo que muitas vezes estivessem do meu lado nas horas mais difíceis e por entenderem toda a loucura da pós-graduação. Pelo nosso sonho que será realizado em breve.

Aos meus amigos e amigas Rosemeire Cobo, Sueli Galdino, Lourdes Galdino, Janairis Cobo Lopez e Bruno Hirata, que para mim são como minha

segunda família do coração. Eles que não se importam nem um pouco se vou ser mestre ou não, e, no final é o que importa.

Ao meu professor de violão Jonatan Paulo da Costa que compartilha sua sabedoria musical e de vida comigo e alegra minhas sextas-feiras.

Ao meu irmão Nicolas de Moraes Carvalho, por sua ajuda em inúmeros momentos que o computador pifou, impressora travou, o pen-drive morreu e outros problemas tecnológicos sempre prestou auxílio, e que no final das contas salvou essa dissertação.

À minha cachorra Holly, que ficou do meu lado o tempo todo enquanto eu passava vários fins de semana e feriados redigindo este trabalho na frente do computador, que me fazia rir quando deitava em cima das minhas referências e não deixava tirar, mas nunca me abandonava quando todo mundo já tinha ido dormir.

Às minhas avós Aparecida Golfeto de Oliveira (*in memoriam*) e Ignez de Castro Moraes, tios, tias, enfim a família em geral, que cada um à sua maneira, contribuíram e torceram por mim.

À minha extensa biblioteca musical, companheiro nas horas solitárias durante a digitação. Noel Gallagher, te dedico por High Flying Birds, Arcade Fire por The Suburbs, Oasis por Definitely Maybe, U2 por The Joshua Tree, The Smiths por The Queen is Dead, Beatles, Rolling Stones, Queen, Adele e tantos outros, a lista é interminável.

À minha biblioteca de livros que não me deixa enlouquecer só lendo artigos do Pubmed. Fiódor Dostoiévski, te dedico por Irmãos Karamazov, Gabriel Garcia Márquez por Cem Anos de Solidão, John Steinbeck por Ratos e Homens, J.R.R Tolkien por O Senhor dos Anéis, Jane Austen por

Orgulho e Preconceito, Henry James por A Outra Volta do Parafuso e outros tantos, pelas quais suas obras são inesquecíveis.

Ao CNPQ, pelo apoio financeiro através da concessão da bolsa de estudo, facilitando a realização do meu Mestrado e deste estudo.

Enfim, à todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho, que em dois anos consumiram muitas noites mal dormidas, pesadelos, medo, sentimento de fracasso, mas que no fim ficaram ao meu lado mesmo quando outros já tinham virado às costas. Obrigada pela paciência, garanto que ao fim desta tese, vocês terão a verdadeira Andréa de volta.

RESUMO

Carvalho AM. **Estudo das proteínas componentes da junção compacta na evolução do carcinoma epidermóide do lábio**. São Paulo; 2012. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Queilite actínica é uma doença que afeta geralmente o lábio inferior e é causada por exposição excessiva a radiação solar. Esta doença abriga no epitélio do lábio, alterações histológicas que são consideradas atualmente como a fase inicial, incipiente do carcinoma epidermóide. As junções compactas são importantes no processo de transporte paracelular, servindo de barreira a passagens de íons, água e macromoléculas, mantendo a polaridade celular. Uma das principais moléculas destas junções compactas são as claudinas que são essenciais na formação das junções compactas. Durante o processo de tumorigênese as moléculas destas junções podem sofrer alterações em sua expressão e distribuição no tecido, tornando-se assim, importantes moléculas na compreensão do processo de invasão tumoral. Para avaliar a expressão das claudinas em casos de queilite actínica e carcinoma epidermóide de lábio foi utilizada a técnica de imunistoquímica em 100 casos. O padrão de expressão foi avaliado de forma qualitativa em cada caso. O padrão de marcação encontrado para claudina-1, -3, -5 e -7 foi de positividade nas áreas correspondentes ao terço inferior, médio e superior do epitélio em lesões de neoplasia intraepitelial de baixo grau, o padrão para claudina-11 apresentou marcação no terço inferior e médio. Em casos de neoplasia intraepitelial de alto grau observou-se ausência de marcação para claudina-1, -3, e -7 no terço inferior do epitélio com positividade no terço médio e superior; claudina-5 notou-se marcação em todos os terços do epitélio, claudina-11 observou-se marcação no terço inferior e médio. Em casos de carcinoma epidermóide superficialmente invasivo observa-se ausência de marcação nas áreas de frente de invasão e marcação nos terços médio e superior do epitélio para claudina-1, -3 e -7,

claudina -11 apresentou marcação apenas no terço médio e claudina -5 apresentou marcação no fronte de invasão e no terço médio e superior do epitélio. Casos de carcinoma epidermóide invasivo apresentaram ausência de marcação no fronte de invasão e marcação nas áreas centrais para as claudina -1, -3, -7 e -11, claudina -5 apresentou marcação citoplasmática no fronte de invasão e nas áreas centrais dos blocos tumorais. Concluindo, todas as fases da queilite actínica, desde as que abrigam alterações epiteliais precoces até o carcinoma epidermóide, apresentam alterações nos padrões das claudinas, com ênfase na diminuição da expressão das claudinas 1, 3, 7 e 11.

SUMMARY

Carvalho AM. **[Study of tight junction proteins on the squamous cell lip carcinoma evolution]**. São Paulo; 2012. [Dissertação de Mestrado-Fundação Antônio Prudente].

Actinic cheilitis is a pathologic condition that usually affects the lower lip and is caused by excessive exposure to solar radiation; it corresponds to the early, incipient phase of squamous cell carcinoma. Tight junctions are important on the paracellular transport process; it functions as a barrier to ions, water and macromolecules to maintain the cellular polarity. Claudins are the key molecules of tight junctions, regarded as essential on the formation of the tight strands. During the tumorigenesis process these proteins may present altered expression and distribution throughout the tissue, therefore, considered important molecules in the invasion process of cancer cells. To evaluate the claudin expression in cases of actinic cheilitis and squamous cell carcinoma of the lip immunohistochemistry technique was performed in 100 cases that were analysed in light microscopy. Claudins -1, -3, -5, and -7 were positive on the areas corresponding to medium, inferior and superior thirds of the epithelium in lesions of intraepithelial neoplasia of low grade; claudin-11 it was observed in the inferior and medium third of the epithelium. In cases of high grade intraepithelial neoplasia the absence of claudins -1, -3 and -7 on the inferior third of the epithelium was observed, and expression of this molecule was seen in the medium and superior thirds; claudin -5 was detected on all epithelial layers and claudin-11 showed positivity on the inferior and medium thirds. In cases of superficially invasive squamous cell carcinoma of the lip the molecule was not expressed in the invasive front of the tumor islands but immunoreactivity was detected on the central areas for claudins -1, -3 and -7; claudin -11 showed positivity only on the medium third and claudin-5 showed immunoreactivity in the invasive front and in central areas. Cases of invasive squamous cell carcinoma showed

absence of claudins -1, -3, -7 and -11 in the invasive front, claudin -5 showed cytoplasmatic positivity on the invasive front and on central areas of the tumor islands. In conclusion, altered expression of some specific claudins subtypes are present in actinic cheilitis from its incipient phase throughout invasive squamous cell carcinoma.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Estrutura da claudina.....	15
Figura 2	Distribuição da Casuística Geral.....	28
Figura 3	Distribuição da Casuística por Diagnóstico Histopatológico Geral.....	29
Figura 4	Distribuição da Casuística por Diagnóstico Histopatológico por Sexo.....	29
Figura 5	Imunoexpressão de claudinas-1 e -3.....	41
Figura 6	Imunoexpressão de claudinas-5, -7 e -11.....	43

LISTA DE TABELAS E QUADROS

Tabela 1	Resultados estatísticos - valor de p.....	37
Tabela 2	Resultados Claudina -1.....	38
Tabela 3	Resultados Claudina -3.....	38
Tabela 4	Resultados Claudina -5.....	39
Tabela 5	Resultados Claudina -7.....	39
Tabela 6	Resultados Claudina -11.....	40
Quadro 1	Expressão de Claudinas em câncer.....	19
Quadro 2	Alterações citológicas e arquiteturais avaliadas nos casos incluídos no estudo.....	22
Quadro 3	Especificação dos anticorpos e recuperação antigênica.....	23

ÍNDICE

1	INTRODUÇÃO	1
2	JUSTIFICATIVA.....	3
3	OBJETIVOS	4
3.1	Objetivo Geral.....	4
3.2	Objetivos Específicos	4
4	REVISÃO BIBLIOGRÁFICA	5
4.1	Queilite actínica	5
4.2	Junções Celulares	8
4.3	Claudinas.....	13
4.4	Expressão de claudinas.....	15
5	MATERIAIS E MÉTODOS	21
5.1	Estudo Imunoistoquímico	23
6	RESULTADOS.....	27
6.1	Casuística.....	27
6.2	Resultados Imunoistoquímicos.....	30
6.2.1	Neoplasia intraepitelial de baixo grau.....	30
6.2.2	Neoplasia intraepitelial de alto grau.....	33
6.2.3	Carcinoma epidermóide superficialmente invasivo.....	34
6.2.4	Carcinoma epidermóide invasivo.....	35
7	DISCUSSÃO	45
8	CONCLUSÕES	56

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS 57

ANEXOS

- Anexo 1** Dados gerais dos pacientes
- Anexo 2** Resultados imunoistoquímicos em neoplasia intraepitelial de baixo grau.
- Anexo 3** Resultados imunoistoquímicos em neoplasia intraepitelial de alto grau.
- Anexo 4** Resultados imunoistoquímicos em carcinoma epidermóide superficialmente invasivo
- Anexo 5** Resultados imunoistoquímicos em carcinoma epidermóide invasivo
- Anexo 6** Testes estatísticos

1 INTRODUÇÃO

O tipo mais comum de câncer oral é o carcinoma epidermóide, que representa cerca de 90% dos casos de neoplasias malignas nessa localização anatômica (THOMAS et al. 1997). Segundo o Instituto Nacional do Câncer dos Estados Unidos, o câncer oral é responsável anualmente por 2% de todos os cânceres diagnosticados. Aproximadamente 35.000 pessoas serão diagnosticadas com a doença anualmente (NIH 2008). No Brasil, a incidência anual de carcinoma epidermóide é estimada em 10,9 para homens e 3,05 para mulheres para cada 100.000 pessoas (ABDO et al. 2002).

Queilite actínica (QA), é a lesão do lábio mais comum que resulta da exposição excessiva a radiação ultravioleta (UV). A (QA) é modernamente considerada como uma fase incipiente do carcinoma epidermóide do lábio (MARKOPOULOS et al. 2004; NETO PIMENTEL et al. 2006).

A etiopatologia do carcinoma do lábio está relacionada à exposição aos raios UV, acometendo principalmente homens brancos expostos cronicamente à radiação UV, sendo raro em negros e abaixo dos 40 anos de idade (ANTUNES e ANTUNES 2004). A correlação da queilite actínica com o carcinoma epidermóide do lábio é há muito tempo observada tanto do ponto de vista epidemiológico como clínico-patológico (BERNIER e REYNOLDS 1955). A progressão da queilite actínica para carcinoma invasivo é estimada entre 12 a 20% (KOTEN et al. 1967; WARNOCK et al. 1981; KOOPMANN e COULTHARD 1982).

No processo de progressão do carcinoma epidermóide, diversos mecanismos responsáveis pela homeostasia epitelial são alterados. Essas alterações englobam cascatas moleculares de controle do ciclo celular e de sinalização que culminam com importantes mudanças no padrão de expressão de diversas proteínas que mantêm a integridade epitelial e sua relação com o tecido conjuntivo subjacente. Nesse contexto, moléculas de adesão têm um papel central tanto na manutenção da adesão intercelular, mas também nas relações entre as células epiteliais e a matriz extracelular e também no controle das trocas iônicas entre o compartimento epitelial e conjuntivo (ALBERTS et al. 2004).

Nesse panorama, as junções celulares compactas (junções “tight”) parecem ser importantes. Essas junções têm a função de controlar a difusão de solutos no espaço paracelular conferindo a propriedade de barreira aos epitélios e endotélios. A perda de função das junções compactas é um passo importante na progressão do câncer, o que modifica o microambiente dos tecidos. As funções de tais junções encontram-se comprometidas devido a mudanças na expressão e localização das claudinas que são as principais proteínas que participam na formação destas junções (ZAVALA-ZENDEJAS e RENDÓN-HUERTA 2008).

Frente o exposto, este estudo tem o objetivo de avaliar a participação de moléculas que compõem as junções celulares compactas na progressão do carcinoma epidermóide do lábio de forma a compreender o padrão de alteração dessas junções durante a carcinogênese.

2 JUSTIFICATIVA

Recentemente uma nova família de proteínas das junções compactas foi descoberta, as claudinas. A sua expressão em casos de câncer combinado com sua localização na membrana pode tornar estas proteínas alvos importantes no tratamento/diagnóstico do câncer. Apesar disso, os estudos ainda são poucos para elucidar o padrão de expressão destas moléculas em vários tipos de câncer e, no caso do câncer do lábio e queilite actínica a bibliografia disponível é escassa e aborda principalmente os casos de câncer invasivos. Portanto, este trabalho elucidará a expressão de claudinas desde os casos iniciais e incipientes de queilite actínica e sua evolução à carcinoma epidermóide do lábio.

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar por meio da técnica de imunohistoquímica a expressão e distribuição das proteínas que compõem as junções compactas na queilite actínica e no carcinoma epidermóide do lábio.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Estudar os aspectos morfológicos e histológicos da progressão do carcinoma epidermóide do lábio;
2. Comparar a distribuição das proteínas que compõem as junções compactas ao na progressão do carcinoma epidermóide do lábio, desde suas formas incipientes até suas formas invasivas.

4 REVISÃO BIBLIOGRÁFICA

4.1 QUEILITE ACTÍNICA

Queilite actínica (QA), também conhecida por queilite solar, queratose solar e queratose actínica são os termos usados para designar as fases incipientes do carcinoma epidermóide do lábio. Foi primeiramente caracterizada pelos pesquisadores em 1923 (BENTLEY et al. 2003; CAVALCANTE et al. 2008).

A queilite actínica, ou solar é uma lesão que ocorre no vermelhão do lábio inferior e está diretamente relacionada à exposição solar. Ocorre com mais freqüência em pessoas que, por sua atividade, têm uma maior exposição à luz solar, como é o caso de agricultores, marinheiros e em pessoas de pele clara (ARAÚJO e ARAÚJO 1984). Os homens representam o sexo mais acometido pela doença (ROGERS e BEKIC 1997). A radiação ultravioleta B é o principal responsável pelo dano actínico. A maior parte dos 70% dos raios UVB é absorvida pela pele; somente 5% a 10% são refletidos. O lábio inferior é o mais atingido por ser a área mais exposta à luz UV (KAUGARS et al. 1999).

Clinicamente o lábio mostra-se ressecado e friável com coloração esbranquiçada e usualmente com aspecto descamativo. Podem aparecer, erosões, fissuras, ulcerações e placas queratinizadas, as quais

desaparecem espontaneamente e tornam a aparecer (ARAÚJO e ARAÚJO 1984; MENTA SIMONSEN NICO et al. 2007).

Os aspectos histopatológicos da queilite actínica consistem de alterações epiteliais arquiteturais e citológicas que cursam com hiperplasia, atrofia e atipia celular em graus variáveis (ARAÚJO e ARAÚJO 1984; MENTA SIMONSEN NICO et al. 2007). Usualmente é caracterizada por um epitélio escamoso estratificado atrófico, freqüentemente apresentando acentuada produção de queratina. Graus variados de displasia epitelial podem ser encontrados. Um infiltrado crônico de células inflamatórias pode estar associado ao quadro. O tecido conjuntivo mostra uma faixa de alteração basofílica, acelular e amorfa, conhecida como elastose solar; uma alteração do colágeno e das fibras elásticas induzida pela luz ultravioleta. Dentre as alterações arquiteturais destacam-se as papilas epiteliais em forma de gota, perda da polaridade, pérolas córneas, perda da coesão celular (NEVILLE et al. 2004).

Para a graduação histomorfológica, NICO (2004) adaptou a proposição de outros tumores epiteliais do trato aero-digestório considerando as seguintes categorias:

- 1 Ausência de displasia: sem alterações celulares ou arquiteturais, ou apenas queratose.
- 2 Displasia leve: alterações celulares e arquiteturais limitadas à camada basal e para-basal;
- 3 Displasia moderada: comprometimento celular desde a camada basal até a metade da espinhosa;

- 4 Displasia grave: comprometimento celular e arquitetural da camada basal até acima da metade do epitélio;
- 5 Carcinoma *in situ*: desarranjo arquitetural acompanhado de alterações citológicas em toda a espessura do epitélio.
- 6 Carcinoma superficialmente invasivo: presença de pequenos blocos epiteliais na lâmina própria desconectados do restante do epitélio ou presença de focos circunscritos de infiltração conectados ao epitélio, porém apresentando queratinização basal anômala com resposta desmoplásica na lâmina adjacente.
- 7 Carcinoma epidermóide invasivo: nítidos blocos de células escamosas desconectados do epitélio presentes na derme/lâmina própria.

Há uma série de estudos relacionados à patogênese molecular da QA; estudos demonstraram que amostras de QA possuem alta expressão de p53 e MDM-2, indicativo de estresse celular e de mutações induzidas por raios UV do gene p53, mutações do receptor de fator de crescimento fibroblástico 3 (FGFR3) e outras mutações genômicas estão associadas à presença de queilite actínica (DE FREITAS et al. 2008; CHOU et al. 2009). Isto indica que um balanço entre fatores apoptóticos e proliferativos participam da evolução de QA a carcinoma epidermóide do lábio (SHAH et al. 2010).

Diversos tipos de abordagens terapêuticas da doença incluem: a criocirurgia, 5-fluorouracil, imiquimod, terapia fotodinâmica, ácido

tricloroacético, vermelhonectomia, eletrodissecção, entre outros (SHAH et al. 2010).

A evolução da lesão da queilite actínica em carcinoma do lábio pode ocorrer gradualmente: o vermelhão do lábio torna-se menos visível, ocorre à presença de infiltração, atrofia e perda da nitidez da linha de transição entre o vermelho do lábio e a pele indicando displasia epitelial e carcinoma epidermóide (NICOLAU e BALUS 1964).

O carcinoma epidermóide do lábio geralmente atinge grupos etários superiores a 40 anos de pele clara, porém o fator idade não é restrito da doença, pois não invalida a ocorrência em grupo etário de maior ou menor idade (ARAÚJO e ARAÚJO 1984). Quando atinge jovens é geralmente devido a uma doença pré - existente ou a uma imunodepressão (THOMAS et al. 1993; VAN ZUUREN et al. 1998).

O comportamento do carcinoma do lábio não segue o mesmo padrão descrito para câncer da pele ou boca. As neoplasias do lábio são mais propensas às metástases comparadas a cânceres da pele, com taxas que variam de 3% a 20%, entretanto, a prognose é melhor se comparada a câncer intra oral (PICASCIA e ROBINSON 1987; ALMEIDA e LOPES 1997; MOY 2000).

4.2 JUNÇÕES CELULARES

A função dos epitélios é separar diferentes compartimentos de um mesmo organismo e regular a passagem de diferentes substâncias entre si,

através de mecanismos de transporte transcelular assimétricos, que se dão graças à presença de bombas e canais de membrana e por transporte paracelular em que se regula a difusão de íons e pequenas moléculas através dos espaços intercelulares. Esta função requer que as células adjacentes sejam seladas por junções bloqueadoras (MULLIN 2004; ALBERTS et al. 2004). As células epiteliais apresentam uma intensa adesão mútua e para separá-las, são necessárias forças mecânicas relativamente grandes. Essa coesão varia com o tipo epitelial, mas é especialmente desenvolvida nos epitélios sujeitos a fortes trações e pressões, como no caso da pele. Portanto, os vários tipos de junções celulares servem não só como locais de adesão, mas eventualmente também como vedantes prevenindo o fluxo de materiais pelo espaço intercelular e ainda podem oferecer canais para a comunicação entre células adjacentes (JUNQUEIRA e CARNEIRO 2008).

As junções celulares são classificadas em três grupos:

- Junções aderentes e desmossomos: são os responsáveis pela adesão mecânica das células formam o que é conhecido como “cinturão de adesão contínuo” que serve para manter as células vizinhas unidas através de uma família de moléculas de adesão dependente de cálcio, as caderinas, que se unem a filamentos de actina e miosina (DENKER e NIGAM 1998).
- Junções comunicantes medeiam a comunicação entre as células permitindo a passagem de íons e pequenas moléculas de até 1000

kDA permitindo o acoplamento metabólico e elétrico entre as células (QU e DAHL 2002).

- Junções compactas funcionam como uma barreira que separa os domínios apicais e basolaterais e possuem um papel importante na manutenção da homeostase e da polaridade dos tecidos (DENKER e NIGAM 1998).

Células epiteliais estão interconectadas por complexos de contatos célula-célula, do qual a junção compacta compõe a principal barreira de difusão paracelular.

A base morfológica da junção compacta foi descoberta em 1960 com a sua visualização por meio da microscopia eletrônica que indicou que a junção compacta fornece uma barreira a difusão de solutos através de transporte paracelular (TURKSEN e TROY 2004).

As junções compactas selam as células vizinhas de tal forma que, se proteínas marcadas de baixo peso molecular forem colocadas em um lado do epitélio, geralmente não passarão além da junção compacta. No entanto, a selagem não é absoluta. Embora as junções compactas sejam impermeáveis a macromoléculas, sua permeabilidade a pequenas moléculas varia em diferentes epitélios. As junções compactas no epitélio que reveste o intestino delgado, por exemplo, são 10 mil vezes mais permeáveis a íons inorgânicos, tais como Na^+ , do que as junções compactas no epitélio que reveste a bexiga. Essas diferenças refletem-se nas proteínas que formam as junções compactas (ALBERTS et al. 2004).

As células epiteliais podem alterar suas junções compactas temporariamente para permitir um aumento do fluxo de soluto e de água através de aberturas nas barreiras juncionais. Tal transporte paracelular é especialmente importante na absorção de aminoácidos e de monossacarídeos do lúmen do intestino, onde sua concentração pode estar aumentada após a refeição, para direcionar o transporte passivo (ALBERTS et al. 2004).

O grande interesse nos estudos das junções compactas é devido à interação de suas funções principais; a função de barreira para regular a permeabilidade paracelular e a função de cerca que mantém a polaridade celular. Primeiramente, a função de cerca da junção compacta ajuda a manter a polaridade celular ao prevenir que as moléculas localizadas na membrana apical misturem-se com aquelas localizadas na membrana lateral. Essa função característica está intrinsicamente relacionada com a biologia do câncer, pois a perda da polaridade celular e permeabilidade são fatores essenciais para a invasão tumoral (MARTIN e JIANG 2009). Em relação à função de barreira ocorre o envolvimento de três elementos importantes no desenvolvimento do câncer que são:

- Receptores de fatores de crescimento normalmente situados na parte baso-lateral da célula em contato com o fluido intersticial e a corrente sanguínea;
- Proteínas de fatores de crescimento que são ligantes dos receptores de crescimento são frequentemente compartimentados em altas concentrações em fluidos luminiais nos tecidos epiteliais;

- No processo de tumorigênese, ocorrem alterações nas junções compactas que facilitam a passagem de solutos pela barreira epitelial que normalmente restringe a movimentação das mesmas ocasionando o fenômeno chamado de “vazamento lesional” (SINGH et al. 2010).

Esses dados corroboraram a designação de que alterações nas junções compactas nos estágios iniciais do câncer podem aumentar a probabilidade que este câncer evolua para lesão invasiva devido à desregulação da divisão celular de células iniciadoras pré-malignas que irão passar pela barreira da junção compacta (SINGH et al. 2010).

O complexo da junção compacta é formado por vários componentes: claudinas, ocludinas, tricelulina, moléculas de adesão juncional (JAM), o receptor associado à coxsackie/adenovírus (CAR), proteínas “scaffold” que ligam proteínas de membrana ao citoesqueleto de actina; como a zona ocludente 1 (ZO-1), ZO-2 e ZO-3, e outras proteínas com funções de sinalização com fatores de transcrição, kinases e fosfatases (ANGELOW et al. 2008).

Em FURUSE et al. (1993), descobriram a primeira proteína constituinte da junção compacta, a ocludina, cujo papel até o momento ainda é indefinido, porém sabe-se que é uma proteína estrutural e funcional da junção compacta. Sua expressão foi identificada em sarcoma sinovial pouco diferenciado (BILLINGS et al. 2004).

As proteínas ocludina e JAM, não são responsáveis pela formação dos cordões da junção compactas e dado seu número limitado de isoformas, não

são definidas como essenciais na permeabilidade da junção compacta (SAITOU et al. 1998). Em contraste, 27 isoformas de claudinas foram descritas em vertebrados. Estudos *in vitro* demonstraram que as claudinas são capazes de induzir a formação das junções compactas e que cada claudina varia em sua habilidade de formar tal junção ou barreira (ANGELOW et al. 2008).

4.3 CLAUDINAS

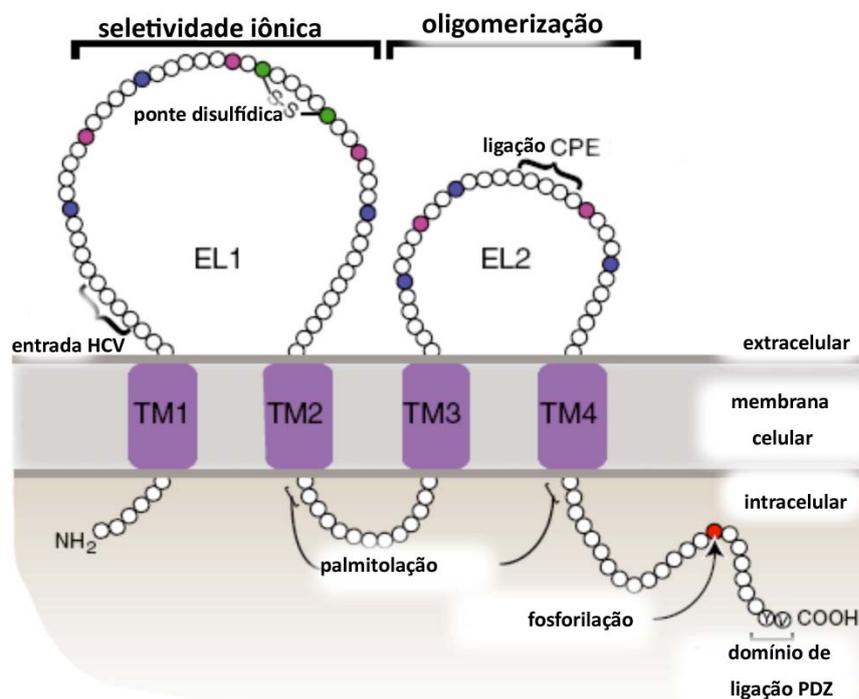
Logo após a descoberta da ocludina, foram identificadas duas novas proteínas da junção compacta, denominadas Claudina-1 e Claudina-2, derivadas da palavra em latim “claudere” que significa selar (FURUSE et al. 1998).

As claudinas possuem peso molecular variando entre 20 – 34 kDA, são compostas por quatro domínios transmembrânicos, duas alças extracelulares, e uma pequena alça intracelular com o domínio N-terminal e C-terminal localizado no citoplasma (Ver Figura 1). Baseado em estudo recente, foi proposto que membros da família das claudinas sejam divididos em dois grupos; as claudinas clássicas que são claudinas -1 à -10, -14, -15, -17 e -19 e as claudinas não clássicas que correspondem as claudinas -11 à -13, -16, -18, -20 à -24 (KRAUSE et al. 2008).

A primeira alça extracelular contém aproximadamente 52 aminoácidos e possui uma considerável variação na seqüência dos mesmos. Duas cisteínas altamente conservadas são responsáveis por aumentar a

estabilidade através de uma ponte dissulfídica e tais aminoácidos desempenham papéis essenciais na seletividade de íons que irão passar pela barreira da junção compacta (VAN ITALLIE e ANDERSON 2006). A segunda alça extracelular contém de 16-33 aminoácidos e participa da oligomerização das claudinas que irão participar da formação dos cordões da junção compacta com a célula, assim como interações celulares entre claudinas e células adjacentes (DAUGHERTY et al. 2007). Além da participação na formação da junção compacta, a primeira alça extracelular e a segunda alça têm sido descritas como receptores do vírus da Hepatite C (HCV) e da enterotoxina do *Clostridium perfringens* (CPE), respectivamente (EVANS et al. 2007; VAN ITALLIE et al. 2008).

A cauda citoplasmática da claudina possui variação considerável entre as diferentes isoformas. Caracterizada como local das modificações pós-traducionais, que influencia na adesão da junção com a claudina e contém resíduos que regulam sua estabilidade (VAN ITALLIE et al. 2004).



Legenda: Desenho esquemático da estrutura de uma molécula de claudina.

Fonte: GUPTA E RYAN (2010).

Figura 1 - Estrutura da claudina.

4.4 EXPRESSÃO DE CLAUDINAS

Uma área de intenso interesse é descobrir como a desregulação de claudinas contribui para a perda da polaridade celular afetando a barreira formada pela junção compacta em diferentes tumores e como essas alterações são reguladas. Geralmente, grande parte dos estudos foca primeiro na confirmação da expressão aberrante de claudinas em vários tumores; seja por análise imunistoquímica, microarranjos, ou por proteômica usando espectrofotometria. Até o momento, nenhuma regra

universal foi descoberta com estas análises, há somente a comprovação quês estas alterações em claudinas ocorrem em diferentes tumores dependendo do seu estágio, tipo e grau (TURKSEN e TROY 2011). Dentre as hipóteses sobre como as claudinas interagem na tumorigênese é a de que mutações em claudinas podem ser decorrentes da formação tumoral. Outro ponto é a hipermetilação do DNA que pode controlar a baixa regulação de claudinas em alguns tumores. Por exemplo, a ilha CpG foi identificada com o código para o gene de claudina -4 e ao receber tratamento com inibidor de metiltransferase a expressão protéica de claudina -4 foi restaurada em cultura primária de tumores de bexiga de alto grau (BOIREAU et al. 2007; GOPALAKRISHNAN et al. 2008). Outros estudos sugerem que mecanismos repressores podem estar ativos na alta regulação de certas claudinas. Esses mecanismos repressores podem ser a deacetilação de histonas já comprovados em estudos com tumores colorretais (KRISHNAN et al. 2010).

Outro fator importante na regulação das claudinas é a transição epitélio-mesênquima (EMT). O processo de aquisição de um fenótipo invasivo por tumores de origem epitelial pode estar relacionado com uma versão patológica dos fatores envolvidos nesta transição (TURKSEN e TROY 2011). Para tal comprovação, estudos foram realizados com repressores de claudinas observando a expressão das moléculas da família Snail e Slug. Sabe-se que alta expressão de Snail em células epiteliais ativa a EMT e a aquisição de perfis migratórios invasivos pelas células. Segundo este estudo, Snail e Slug ligam-se a motivos E-box encontrados nos

promotores de claudina -1 promovendo a regulação negativa desta claudina em tumores de mama (MARTÍNEZ-ESTRADA et al. 2006).

As claudinas estão expressas nos tecidos epiteliais e endoteliais desde o desenvolvimento embrionário até em tecidos adultos (GUPTA e RYAN 2010) Apesar das claudinas estarem localizadas na porção apical das junções compactas, as mesmas já foram identificadas no citoplasma e em células não epiteliais (ACHARYA et al. 2004; LI et al. 2004). Apesar desta expressão citoplasmática definida na literatura seu entendimento ainda precisa ser elucidado (GUPTA e RYAN 2010).

As claudinas foram associadas com a carcinogênese, pois alterações nestas moléculas podem aumentar a difusão de nutrientes e influenciam outros fatores que promovem o desenvolvimento de tumores como os carcinomas (OLIVEIRA e MORGADO-DÍAZ 2007).

Imunoreatividade de claudinas pode ser observada em diferentes lesões e neoplasias. Entretanto, diferença em sua expressão está relacionada a cada tecido específico. Alta expressão desta proteína foi detectada em displasia epitelial oral, neoplasia intraepitelial cervical e carcinoma de língua (SOBEL et al. 2005; DOS REIS et al. 2008; BELLO et al. 2008). Enquanto outros trabalhos demonstraram baixa expressão em carcinoma de pele, carcinoma de esôfago, câncer de mama, carcinoma gástrico e carcinoma de cólon (RESNICK et al. 2005; SOINI 2005; USAMI et al. 2006; TAKALA et al. 2007; MATSUDA et al. 2007).

Outro dado importante é que a localização citoplasmática e nuclear foi observada em carcinoma de esôfago e cólon, respectivamente (DHAWAN et

al. 2005; USAMI et al. 2006). Esta localização citoplasmática de claudinas pode estar relacionada com a perda de função destas proteínas, resultado de diferentes mecanismos como a fosforilação protéica. Outros estudos sugerem esta localização com a progressão tumoral (DHAWAN et al. 2005; ARABZADEH et al. 2007). Em estudo proposto por IVANOV et al. (2005), correlacionou esta localização com uma função importante na sinalização intracelular, ao demonstrar que a translocação da junção compacta da membrana para o citoplasma pode estar relacionada com a endocitose destas proteínas e, por conseguinte, perda e redução de sua função.

Vários trabalhos vêm explorando o papel das junções compactas nas neoplasias, com atenção especial ao papel das claudinas. Pode-se verificar uma expressão heterogênea entre os tecidos (Quadro 1). A razão para essa discrepância na expressão de claudinas entre diferentes lesões ainda não está totalmente clara, porém isto se deve em parte às diferentes funções que estas proteínas possuem em cada tecido ou até mesmo de características específicas do microambiente tecidual (OLIVEIRA e MORGADO-DÍAZ 2007).

Quadro 1 - Expressão de Claudinas em câncer.

Neoplasia	Claudina	Expressão	Referências Bibliográficas
Cabeça e pescoço	7	baixa	AL MOUSTAFA et al. 2002
Cólon	1	elevada	MIWA et al. 2001
Cervical	1,7	elevada	LEE et al. 2005
Gástrico	4,7 4,18	Elevada baixa	JOHNSON et al. 2005; MIMA et al. 2005
Glioblastoma multiforme	1	baixa	LIEBNER et al. 2000
Hepatocelular	10	elevada	CHEUNG et al. 2005
Mama	3,4 1,2,4,7	Elevada baixa	KOMINSKY et al. 2004 SWISSHELM et al. 1999; KOMINSKY et al. 2003;
Melanoma	1	baixa	CHOU et al. 2009
Ovário	3,4,16	elevada	RANGEL et al. 2003; D'SOUZA et al. 2005; SANTIN et al. 2005
Pâncreas	4	elevada	MICHL et al. 2001
Próstata	3,4	Elevada	LONG et al. 2001
Tireóide	10	elevada	ALDRED et al. 2004

As claudinas possuem um papel importante nas junções compactas, assim como na homeostase e na formação de barreiras. Desta forma, o estudo da expressão destas moléculas em diferentes tecidos epiteliais e endoteliais pode ser a primeira linha de defesa contra durante o processo de carcinogênese (SWISSHELM et al. 2005).

Quanto à distribuição das claudinas no epitélio também não há um consenso geral. Com relação à displasia oral CARVALHO et al. (2010) verificou ausência de claudina -1 no terço inferior do epitélio. Outros autores demonstraram que as claudinas estão presentes em sua maioria nas camadas superiores do epitélio (YUKI et al. 2007; YAMAMOTO et al. 2008). Expressão reduzida de claudina -1 no terço médio do epitélio foi observada

em casos de displasia oral moderada e severa. Nesses casos a expressão reduzida em áreas displásicas pode estar associada com o quadro de alterações dentro da célula que resulta em transformação maligna do tecido epitelial (CARVALHO et al. 2010).

Enfim, esses achados sugerem que tanto expressão reduzida quanto aumentado de claudinas está envolvida na carcinogênese. Entende-se que esta forma aberrante de expressão pode interferir diretamente com a estrutura da junção compacta, resultando em uma desorganização tecidual e aumentar a permeabilidade celular, o que pode contribuir para o desenvolvimento do câncer (RESNICK et al. 2005).

5 MATERIAIS E MÉTODOS

Os casos clínicos diagnosticados como carcinoma epidermóide do lábio e que foram operados com a técnica de vermelhnectomia e biopsiados foram levantados dos arquivos e prontuários do Departamento de Dermatologia do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo.

Dados clínico demográficos foram compilados.

Lâminas coradas com hematoxilina e eosina foram estudadas e classificadas de acordo com as alterações histológicas encontradas. Foram então selecionados espécimes representativos das várias fases de evolução do carcinoma epidermóide (desde lesões incipientes – displasias moderada e grave; neoplasias intraepiteliais de baixo e alto grau) até tumores invasivos para o estudo imunoistoquímico das proteínas das junções compactas

Os casos clínicos provenientes de vermelhnectomia, técnica cirúrgica em que o lábio acometido é cirurgicamente excisado, possibilitaram a seleção de casos de áreas que apresentam alterações histopatológicas diferentes entre si de acordo com os cortes seriados que são realizados no espécime, portanto foram selecionados para a casuística aquelas áreas que exibiam as alterações arquiteturais e histopatológicas descritas na literatura como característica da pior área do diagnóstico.

Para a graduação histomorfológica, utilizou-se a seguinte classificação (NICO 2004):

Quadro 2 - Alterações citológicas e arquiteturais avaliadas nos casos incluídos no estudo

Alterações citológicas	Alteração da relação núcleo/citoplasma
	Mitoses atípicas
	Mitoses suprabasais
	Nucléolos proeminentes
Alterações arquiteturais	Hiper celularidade
	Duplicação da camada basal
	Queratose
	Ulceração
	Formação de cristas epiteliais em gota

Estas alterações foram compiladas e classificadas como:

- 1 Neoplasia intraepitelial de baixo grau: alterações celulares e arquiteturais limitadas à camada basal e para-basal;
- 2 Neoplasia intraepitelial de alto grau: comprometimento celular desde a camada basal até acima da metade do epitélio;
- 3 Carcinoma superficialmente invasivo: presença de pequenos blocos epiteliais na lâmina própria desconectados do restante do epitélio ou presença de focos circunscritos de infiltração conectados ao epitélio, porém apresentando queratinização basal anômala com resposta desmoplásica na lâmina adjacente.
- 4 Carcinoma epidermóide invasivo: nítidos blocos de células escamosas desconectados do epitélio presentes na derme/lâmina própria.

Casos que não possuíam informações no prontuário ou que não apresentavam material suficiente para a análise imunoistoquímica foram excluídos do estudo.

Ver Anexo 1 – Dados Gerais dos Pacientes.

5.1 ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO

Do material embocado em parafina foram obtidos cortes de 3 μ m e distendidos em lâminas previamente limpas e preparadas com Organosilano para posteriormente serem submetidos à técnica de imunistoquímica (descrita a seguir) seguindo-se a especificidade para cada anticorpo (conforme descrito no Quadro 2).

Quadro 3 - Especificação dos anticorpos e recuperação antigênica.

Anticorpo	Clone	Procedência	Recuperação antigênica	Título	Tempo de incubação
Claudina 1	2H10D10	Zymed	Citrato 10 mM pH: 6. 3 passagens de 5 minutos em microondas.	1:40	Overnight
Claudina 3	Policlonal	Lab Vision		1:50	
Claudina 5	4C3C2	Zymed		1:100	
Claudina 7	5D10F3	Invitrogen		1:80	
Claudina 11	Policlonal	Sigma-Aldrich		1:80	

Os cortes de 3 μ m foram desparafinizados em três banhos de xilol: o primeiro a 60°C por 30 minutos e o segundo e terceiro à temperatura ambiente por 10 minutos. A seguir, os cortes foram re-hidratados em cadeia descendente de etanol (100% e 95%) e hidróxido de amônio para remoção de pigmentos formólicos por 10 minutos, e posteriormente, lavagem em água corrente e em água destilada por 5 minutos, respectivamente.

Após a lavagem em água destilada, realizou-se a recuperação antigênica conforme especificado no Quadro 2. Ao término da etapa de

recuperação antigênica as lâminas são resfriadas por 20 minutos à temperatura ambiente e encaminhadas a lavagem em água corrente e em água destilada por 5 minutos.

Em seguida, os cortes foram incubados em peróxido de hidrogênio a 6% (20 volumes) 2 passagem por 10 minutos cada, com o intuito de se bloquear a peroxidase endógena tecidual com subsequente lavagem em água corrente e destilada por 5 minutos cada. Imersão em tampão PBS (solução salina fosfatada) pH 7.4 foi feita por 5 minutos.

A seguir, os cortes foram incubados com o soro primário diluído em BSA (soro de albumina bovina) 1% e dispostos em câmara úmida a 4°C *overnight*. Informações sobre os anticorpos estão descritos no Quadro 2.

Os procedimentos posteriores foram sempre precedidos de duas lavagens em tampão PBS pH 7.4, durante 5 minutos cada.

Após a incubação do anticorpo primário, os espécimes foram incubados com anticorpo secundário, contendo *pool* de anticorpo anti-camundongo e anti-coelho, utilizando o *kit Ultravision LPValue Detection System HRP Polymer* (Thermo Scientific, Fremont, USA) em duas etapas de 20 minutos cada.

Para a reação de revelação, os espécimes foram incubados com o revelador 3'3- diaminobenzidina – DAB (Thermo Scientific, Fremont, USA) que evidencia a reação por meio da coloração castanha.

Os cortes foram lavados em água corrente e água destilada durante 5 minutos cada e contra-corados com hematoxilina de Mayer por 1 minuto.

Posteriormente, os cortes foram desidratados em cadeia ascendente de etanóis (50%, 80%, 95% e 100%), diafanizados em três banhos de xilol, e montados em resina *Permount* (Fisher Scientific, Fair Lawn, NJ/USA).

Os controles negativos foram tratados com protocolo similar, mas o anticorpo primário foi substituído por soro não-imune. Os controles positivos foram empregados de acordo com a recomendação do fabricante. Controles das reações foram realizados com a utilização de fragmentos de mucosa oral normal (margens cirúrgicas livres). Todas as reações foram realizadas em duplicatas.

A análise dos resultados foi realizada por meio de exame das lâminas utilizando-se microscópio óptico.

A análise dos resultados imunoistoquímicos foi qualitativa/ morfológica.

Para analisar qualitativamente estes casos as neoplasias foram divididas em estratos:

Neoplasias de baixo e alto grau: epitélio dividido em terço inferior, médio e superior

CESI: frente de invasão, terço médio e superior

CEI: periferia das ilhotas tumorais e áreas centrais

Os resultados foram registrados por meio de fotomicrografias com câmara digital acoplada ao microscópio óptico.

As análises estatísticas qualitativas foram feitas com o teste de Qui-quadrado de Pearson, que é um teste de hipóteses que se destina a encontrar um valor de dispersão para duas variáveis nominais e avalia a associação existente entre variáveis qualitativas. É um teste não-

paramétrico, ou seja, não depende de parâmetros populacionais, como média e variância. Devido algumas amostras deste trabalho possuírem casuística pequena inferior a $n < 20$, foi utilizado como correção o Teste Exato de Fisher, que compara dados categóricos em tabelas 2x2 quando o número total de casos é menor que 20. As análises foram feitas através do programa de computador SPSS versão 15.0 para Windows (Statistical Package for the Social Sciences). A análise foi considerada estatisticamente significativa quando $p < 0,05$, equivalente a 5%, tanto para o teste de qui-quadrado quanto para o Teste Exato de Fisher, e basearam-se na comparação dos dados obtidos entre as regiões do epitélio estudado onde a marcação (positiva e negativa) foi observada, de acordo com o diagnóstico histopatológico e o anticorpo avaliado. Foi realizado o teste de correlação de Pearson para verificar se a expressão de uma claudina interferia em outra, porém os testes não apresentaram nenhum dado significativo para nenhuma claudina estudada, portanto, tais dados foram excluídos do estudo.

6 RESULTADOS

6.1 CASUÍSTICA

Foram obtidos 100 casos, destes 24 casos são de neoplasias intraepiteliais de baixo grau e 29 de alto grau, 28 casos de carcinoma epidermóide superficialmente invasivo e 19 carcinoma epidermóide invasivo. Deste total, 67 casos acometeram o gênero masculino e 33 o gênero feminino. Com média de idade geral ao diagnóstico de 60,7 anos. Entre os gêneros a média de idade que acomete os homens é de 59,6 anos. Entre as mulheres a média de idade ao diagnóstico foi de 62,9 anos.

Em relação à média de idade de acordo com o diagnóstico histopatológico os resultados foram:

- Neoplasia intraepitelial de baixo grau geral 60,6 anos; masculino 60,9 anos e feminino 60 anos
- Neoplasia intraepitelial de alto grau geral 64,1 anos; masculino 63,1 anos e feminino 65,8 anos
- Carcinoma epidermóide superficialmente invasivo geral 53,9 anos; masculino 52,5 anos e feminino 56,5 anos.
- Carcinoma epidermóide invasivo geral 65,3 anos; masculino 62,7 anos e feminino 73,4 anos.

Todos os doentes eram brancos e, aqueles que possuem idade inferior a 10 anos no estudo são portadores da síndrome Xeroderma Pigmentoso.

Estes últimos não apresentaram diferenças nos padrões de expressão das claudinas em comparação com os outros pacientes. Nenhum dos pacientes deste estudo foram a óbito e possuem seguimento clínico de 5 anos, assim como não apresentavam ao diagnóstico invasão vascular, perineural e ruptura de linfonodos, assim como não apresentaram recidiva da doença após o tratamento.

Gráficos com a distribuição da casuística geral e de acordo com o diagnóstico histopatológico seguem abaixo.

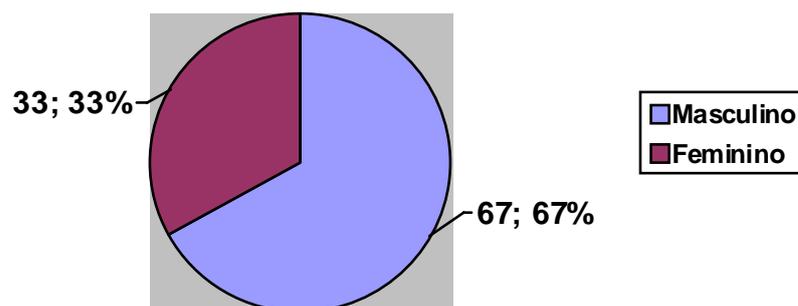


Figura 2 - Distribuição da Casuística Geral.

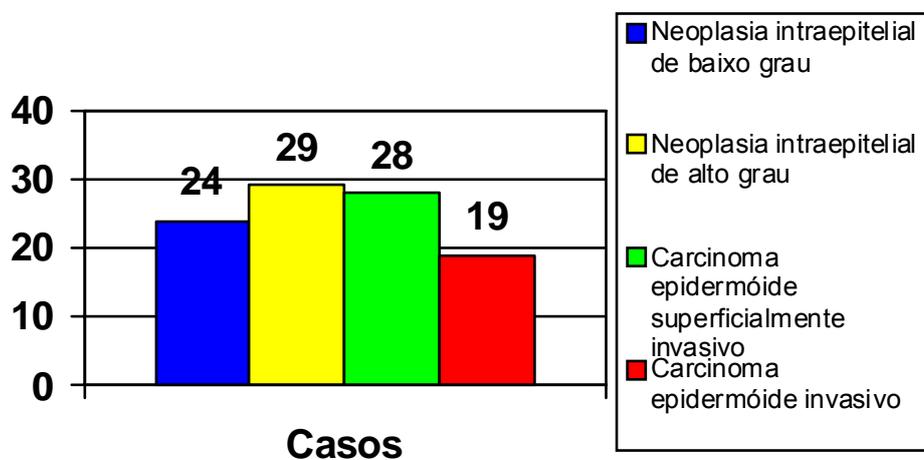


Figura 3 - Distribuição da Casuística por Diagnóstico Histopatológico Geral.

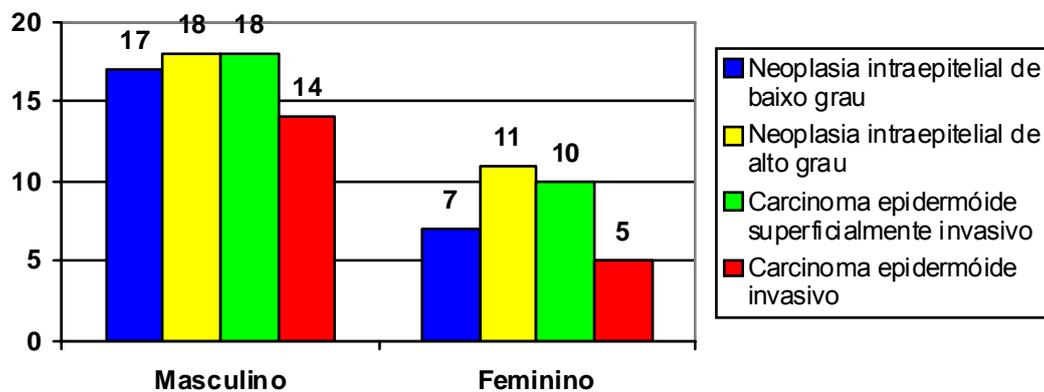


Figura 4 - Distribuição da Casuística por Diagnóstico Histopatológico por Sexo.

6.2 RESULTADOS IMUNOISTOQUÍMICOS

Foram realizados os testes de imunexpressão em 100 casos, sendo 24 casos de neoplasia intraepitelial de baixo grau, 29 casos neoplasia intraepitelial de alto grau, 28 casos de carcinoma epidermóide superficialmente invasivo e 19 casos de carcinoma epidermóide invasivo.

A imunexpressão para as proteínas estudadas foi analisada de forma qualitativa e está ilustrada a seguir nas Tabelas 1 a 6. As áreas que não apresentaram marcação foram consideradas negativas: – (negativo); as áreas que apresentavam marcação consideradas positivas: + (positivo) conforme Figuras 5 e 6 (Figura 5A, 5B, 5C e 5D são fotos das lâminas de H/E). A intensidade da marcação não foi categorizada em nossa avaliação. As tabelas completas com os resultados de cada caso e as análises estatísticas estão compiladas em Anexos 2 e 3.

6.2.1 Neoplasia intraepitelial de baixo grau

Entre os 24 casos de neoplasia intraepitelial de baixo grau observou-se positividade para claudina-1 em 8 casos avaliados (33,3%) no terços inferior, o restante dos casos 66,7% que apresentaram ausência da marcação neste terço foram aqueles que apresentavam áreas mais atípicas em sua histopatologia. Quanto ao terço médio e superior do epitélio todos os casos apresentaram imunomarcação. A positividade foi detectada em padrão de membrana, característica de claudinas. Estatisticamente, ao se analisar a imunexpressão de claudina-1 entre as neoplasias avaliadas os

resultados foram estatisticamente significativos com $p=0.004$ ao se comparar os terços inferiores das neoplasias intraepiteliais de baixo grau, com carcinoma epidermóide superficialmente invasivo de $p=0,001$, e invasivo de $p=0,005$. (Ver Tabela 2 e Figura 5 – Foto E).

Padrão semelhante também foi verificado para a claudina-3. Dos 24 casos avaliados, notou-se a positividade no terço inferior em apenas 5 casos (20,9%), terço médio e superior do epitélio apresentaram marcação na maioria dos casos (83,3% e 95,9%, respectivamente). Associando os resultados encontrados do terço inferior de neoplasia intraepitelial de baixo grau comparado com as neoplasias de alto grau, carcinoma superficialmente invasivo e invasivo estudadas obteve-se valores de: neoplasia intraepitelial de alto grau $p=0,000$, carcinoma superficialmente invasivo $p=0,000$ e invasivo $p=0,001$, portanto, resultados estatisticamente significantes. (Ver Tabela 3 e Figura 5 – Foto I).

Imunoexpressão da claudina-5 foi observada em todos os terços do epitélio, que compreendem o terço inferior, médio e superior (91,6%, 95,9% e 87,5%, respectivamente), com apenas 3 casos (12,5%) apresentando ausência no terço superior do epitélio. Observou-se além da marcação localizada na membrana, característica de claudinas, marcação citoplasmática desta proteína em todos os terços, em especial o terço inferior. Para claudina-5 os resultados estatísticos por apresentarem alta porcentagem de positividade não demonstraram estatísticas significativas variando de $p=0,200$ à $p=1,000$ nas comparações dos terços inferiores entre as neoplasias (Ver Tabela 4 e Figura 6 – Foto A).

Verificou-se a positividade para claudina-7 na membrana citoplasmática de queratinócitos localizados apenas nos terços médio e superior (33,4% e 41,7%, respectivamente) do epitélio e tal marcação também se apresentou no citoplasma das células. A positividade no terço inferior foi observada em 9 casos (37,5%), porém esta marcação não foi contínua por todo o epitélio representado no espécime, e notou-se a ausência de marcação em áreas com atipia acentuada dos queratinócitos. Os resultados das comparações estatísticas foram de $p=0,006$ entre neoplasia intraepitelial de baixo grau e alto grau, $p=0,022$ entre neoplasia intraepitelial de baixo grau e carcinoma epidermóide superficialmente invasivo e entre neoplasia intraepitelial de baixo grau e carcinoma epidermóide invasivo o valor foi de $p=0,003$, portanto resultados estatisticamente significativos (Ver Tabela 5 e Figura 6 – Foto E).

Enquanto que o padrão de expressão para claudina-11 apresentou marcação em praticamente todos os casos nos terços inferior e médio (91,6%, em ambos terços) e ausência de marcação no terço superior (95,8%). Há de ressaltar que esta marcação no terço inferior e médio foi detectada bem esparsa que não acompanhava toda a extensão do epitélio e também apresentou marcação citoplasmática. As comparações estatísticas foram de $p=0,211$ entre neoplasia de intraepitelial de baixo/alto grau, $p=0,000$ entre neoplasia de intraepitelial de baixo grau/carcinoma epidermóide superficialmente invasivo e invasivo (Ver Tabela 6 e Figura 6 – Foto I).

6.2.2 Neoplasia intraepitelial de alto grau

Os 29 casos de neoplasia intraepitelial de alto grau apresentaram o seguinte padrão de marcação para claudina-1: positividade nos terços médio e superior (100%) com ausência de marcação no terço inferior (96,6%). A análise estatística não apresentou resultado significativo na relação terço inferior de NIAG/CESI e CEI com valor de $p > 0,05$ (Ver Tabela 2 e Figura 5 – Foto F).

O padrão de marcação para claudina-3 também foi muito semelhante ao da claudina-1, onde se observou ausência de marcação no terço inferior (79,1%) e positividade nos terços médio e superior (83,3 % e 95,9%, respectivamente), sendo predominante no terço superior. Os dados estatísticos de claudina-3 não foram aplicáveis, a associação terço inferior/ de NIAG/CESI e CEI apresentaram alto índice de positividade, portanto uma variável constante (Ver Tabela 3 e Figura 5 – Foto J).

A marcação encontrada na imunistoquímica para claudina-5 mostrou-se bem distinta. Dos 29 casos avaliados observou-se positividade em todos os terços do epitélio avaliados, porém com algumas ressalvas. A maioria dos casos apresentou marcação citoplasmática no terço inferior e nas áreas mais atípicas do epitélio. A estatística devido a essa particularidade apresentou resultados não significantes de $p > 0,05$ na comparação dos terços inferior/ de NIAG/CESI e CEI (Ver Tabela 4 e Figura 6 – Foto B).

Para claudina-7 observou-se ausência de marcação nos terços inferiores e médio (93,1% e 72,4%, respectivamente), e uma discreta

marcação em membrana no terço superior. Notou-se na marcação em terço superior uma leve marcação citoplasmática (51,8 %). Os resultados estatísticos não foram significativos $p>0.05$ na comparação dos terços inferior/ de NIAG/CESI e CEI (Ver Tabela 5 e Figura 6 – Foto F).

Em claudina-11 obteve-se predominantemente a marcação nos terços inferior e médio (79,3% e 89,6%, respectivamente) do epitélio com ausência no terço superior (82,7%), o padrão citoplasmático encontrado em neoplasia intraepitelial de baixo grau também se mantém. Os resultados estatísticos foram significativos de $p=0,000$ na associação dos terços inferior/ de NIAG/CESI e CEI (Ver Tabela 6 e Figura 6 – Foto J).

6.2.3 Carcinoma epidermóide superficialmente invasivo

Foram avaliados 28 casos de carcinoma epidermóide superficialmente invasivos e obteve-se para claudina-1 positividade na área correspondente ao terço médio e superior do epitélio e ausência de marcação nas áreas de frente de invasão. A marcação continua bem definida na membrana. A análise estatística foi feita comparando a frente de invasão de CESI com a frente de invasão de CEI, o valor encontrado não foi aplicável, devido a 100% de positividade, sem variáveis (Ver Tabela 2 e Figura 5 – Foto G).

Para claudina-3 também se observou positividade em terço médio e superior (92,8% e 100%, respectivamente) e ausência de marcação nas áreas de frente de invasão (96,5%). O resultado estatístico não foi significativo, devido a não aplicabilidade do teste (Ver Tabela 3 e Figura 5 – Foto L).

A claudina-5 apresentou padrão de marcação similar aos espécimes anteriores. A marcação foi borrada e difusa no citoplasma; a marcação na membrana não foi regular. A positividade se manteve nas áreas de frente de invasão e em terço médio e superior do epitélio (100%). Devido a esta positividade os valores estatísticos não foram significativos $p=0,220$ (Ver Tabela 4 e Figura 6 – Foto C).

Ausência de marcação para claudina-7 foi observada nas áreas de frente de invasão (89,2%); positividade de padrão citoplasmático nas regiões correspondentes ao terço médio do epitélio (64,3%) e ausência no terço superior (89,2%) foi notada. Os dados não foram estatisticamente significativos com $p= 0,140$ na comparação frente de invasão de CESI com a frente de invasão de CEI (Ver Tabela 5 e Figura 6 – Foto G).

A claudina-11 apresentou positividade em 9 (32,2%) casos avaliados dos 28 na área de frente de invasão, porém essa marcação manteve-se com padrão citoplasmático. Positividade presente foi detectada em sua maioria no terço médio do epitélio com ausência no terço superior. A associação do frente de invasão de CESI com a frente de invasão de CEI não foi significativa com $p=0,404$ (Ver Tabela 6 e Figura 6 – Foto L).

6.2.4 Carcinoma epidermóide invasivo

Avaliou-se 19 casos de carcinoma epidermóide invasivo. Verificou-se ausência de marcação para claudina-1 nas áreas de frente de invasão em todos os casos. A positividade para esta claudina foi observada apenas nas áreas centrais dos blocos tumorais (94,8%), com marcação de membrana

bem definida. Os dados estatísticos de carcinoma epidermóide invasivo já foram abordados em associação com as outras neoplasias estudadas (Ver Tabela 2 e Figura 5 – Foto H).

A claudina-3 apresentou padrão de marcação idêntico ao encontrado para a claudina- 1. Notou-se positividade apenas nas áreas centrais do epitélio e ausência de marcação nas periferias das ilhotas tumorais (Ver Tabela 3 e Figura 5 – Foto M).

Marcação para claudina-5 apresentou positividade nas áreas centrais (100%) e na periferia do tumoral de (94,8%). Esta positividade seguiu as demais vistas nos outros espécimes avaliados: a marcação foi irregular, inespecífica e citoplasmática, em algumas áreas e negativa nas regiões periféricas. (Ver Tabela 4 e Figura 6 – Foto D).

A claudina-7 foi negativa nas áreas periféricas (100%), e positiva nas regiões centrais dos blocos tumorais em alguns espécimes (36,9%). (Ver Tabela 5 e Figura 6 – Foto H).

Para claudina-11 verificou-se ausência de marcação nas áreas periféricas (78,9%), apenas 4 casos apresentaram marcação nesta área com expressão citoplasmática. Positividade encontrada na maioria dos casos em áreas centrais dos blocos tumorais (84,2%). (Ver Tabela 6 e Figura 6 – Foto M).

As tabelas a seguir pontuam a marcação dos anticorpos estudados segundo o diagnóstico histopatológico e região de marcação. As tabelas com os resultados de cada caso, assim como os resultados estatísticos referentes a cada anticorpo estudado, estão compilados na Tabela 1.

Tabela 1 - Resultados estatísticos - valor de p

Associações estatísticas terço inferior X frente de invasão	Claudina-1		Valor p	Claudina -3		Valor p	Claudina-5		Valor p	Claudina-7		Valor p	Claudina-11		Valor p
	- negativos	+ positivos		- negativos	+ positivos		- negativos	+ positivos		- negativos	+ positivos		- negativos	+ positivos	
NIBG X NIAG	16 (66,7%)	8 (33,3%)	0,004	13 (54,1%)	11 (45,9%)	0,000	2 (8,4%)	22 (91,6%)	0,113	15 (62,5%)	9 (37,5%)	0,006	2 (8,4%)	22 (91,6%)	0,211
	28 (96,6%)	1 (3,4%)		29 (100%)	0		0	29 (100%)		27 (93,1%)	2 (6,9%)		6 (20,7%)	23 (79,3%)	
NIBG X CESI	16 (66,7%)	8 (33,3%)	0,001	13 (54,1%)	11 (45,9%)	0,000	2 (8,4%)	22 (91,6%)	0,119	15 (62,5%)	9 (37,5%)	0,022	2 (8,4%)	22 (91,6%)	0,000
	28(100%)	0		28 (100%)	0		0	28 (100%)		25 (89,2%)	3 (10,8%)		19 (67,8%)	9 (32,2%)	
NIBG X CEI	16 (66,7%)	8 (33,3%)	0,005	13 (54,1%)	11 (45,9%)	0,001	2 (8,4%)	22 (91,6%)	0,695	15 (62,5%)	9 (37,5%)	0,003	2 (8,4%)	22 (91,6%)	0,000
	19 (100%)	0		19 (100%)	0		1 (5,2%)	18 (94,8%)		19 (100%)	0		15 (78,9%)	4 (21,1%)	
NIAG X CESI	28 (96,6%)	1 (3,4%)	0,322	29 (100%)	0	NA	0	29 (100%)	NA	27 (93,1%)	2 (6,9%)	0,610	6 (20,7%)	23 (79,3%)	0,000
	28(100%)	0		28 (100%)	0		0	28 (100%)		25 (89,2%)	3 (10,8%)		19 (67,8%)	9 (32,2%)	
NIAG X CEI	28 (96,6%)	1 (3,4%)	0,413	29 (100%)	0	NA	0	29 (100%)	0,212	27 (93,1%)	2 (6,9%)	0,242	6 (20,7%)	23 (79,3%)	0,000
	19 (100%)	0		19 (100%)	0		1 (5,2%)	18 (94,8%)		19 (100%)	0		15 (78,9%)	4 (21,1%)	
CESI X CEI	28(100%)	0	NA	28 (100%)	0	NA	0	28 (100%)	0,220	25 (89,2%)	3 (10,8%)	0,140	19 (67,8%)	9 (32,2%)	0,404
	19 (100%)	0		19 (100%)	0		1 (5,2%)	18 (94,8%)		19 (100%)	0		15 (78,9%)	4 (21,1%)	

Nível de significância de $p < 0,05$, Valor de $p = NA$ (não aplicável)

Tabela 2 - Resultados Claudina -1.

Diagnóstico	Região	Marcação	
		-	+
NIBG	Terço inferior	16 (66,7%)	8 (33,3%)
	Terço médio	0	24 (100%)
	Terço superior	0	24 (100%)
Total: 24 casos			
NIAG	Terço inferior	28 (96,6%)	1 (3,4%)
	Terço médio	0	29 (100%)
	Terço superior	0	29 (100%)
Total: 29 casos			
CESI	Fronte de invasão	28 (100%)	0
	Terço médio	0	28 (100%)
	Terço superior	0	28 (100%)
Total: 28 casos			
CEI	Áreas centrais	1 (5,2%)	18 (94,8%)
	Periferia tumoral	19 (100%)	0
Total: 19 casos			

Legendas: NIBG: neoplasia intraepitelial de baixo grau; NIAG: neoplasia intraepitelial de alto grau; CESI: carcinoma epidermóide superficialmente invasivo; CEI: carcinoma epidermóide invasivo; Sinal (-): ausência de marcação; Sinal (+): positividade de marcação.

Tabela 3 - Resultados Claudina -3

Diagnóstico	Região	Marcação	
		-	+
NIBG	Terço inferior	13 (54,1%)	11 (45,9%)
	Terço médio	4 (16,7%)	20 (83,3%)
	Terço superior	1 (4,1%)	23 (95,9%)
Total: 24 casos			
NIAG	Terço inferior	29 (100%)	0
	Terço médio	6 (20,7%)	23 (79,3%)
	Terço superior	1 (3,5%)	28 (96,5%)
Total: 29 casos			
CESI	Fronte de invasão	28 (100%)	0
	Terço médio	0	28 (100%)
	Terço superior	0	28 (100%)
Total: 28 casos			
CEI	Áreas centrais	0	19 (100%)
	Fronte de invasão	19 (100%)	0
Total: 19 casos			

Legendas: NIBG: neoplasia intraepitelial de baixo grau; NIAG: neoplasia intraepitelial de alto grau; CESI: carcinoma epidermóide superficialmente invasivo; CEI: carcinoma epidermóide invasivo; Sinal (-): ausência de marcação; Sinal (+): positividade de marcação

Tabela 4 - Resultados Claudina -5.

Diagnóstico	Região	Marcação	
		-	+
NIBG	Terço inferior	2 (8,4%)	22 (91,6%)
	Terço médio	1 (4,1%)	23 (95,9%)
	Terço superior	3 (12,5%)	21 (87,5%)
Total: 24 casos			
NIAG	Terço inferior	0	29 (100%)
	Terço médio	0	29 (100%)
	Terço superior	5 (17,3%)	24 (82,7%)
Total: 29 casos			
CESI	Fronte de invasão	0	28 (100%)
	Terço médio	0	28 (100%)
	Terço superior	0	28 (100%)
Total: 28 casos			
CEI	Áreas centrais	0	19 (100%)
	Fronte de invasão	1 (5,2%)	18 (94,8%)
Total: 19 casos			

Legendas: NIBG: neoplasia intraepitelial de baixo grau; NIAG: neoplasia intraepitelial de alto grau; CESI: carcinoma epidermóide superficialmente invasivo; CEI: carcinoma epidermóide invasivo; Sinal (-): ausência de marcação; Sinal (+): positividade de marcação.

Tabela 5 - Resultados Claudina -7.

Diagnóstico	Região	Marcação	
		-	+
NIBG	Terço inferior	15 (62,5%)	9 (37,5%)
	Terço médio	16 (66,6%)	8 (33,4%)
	Terço superior	14 (58,3%)	10 (41,7%)
Total: 24 casos			
NIAG	Terço inferior	27 (93,1%)	2 (6,9%)
	Terço médio	21 (72,4%)	8 (27,6%)
	Terço superior	14 (48,2%)	15 (51,8%)
Total: 29 casos			
CESI	Fronte de invasão	25 (89,2%)	3 (10,8%)
	Terço médio	10 (35,7%)	18 (64,3%)
	Terço superior	25 (89,2%)	3 (10,8%)
Total: 28 casos			
CEI	Áreas centrais	12 (63,1%)	7 (36,9%)
	Fronte de invasão	19 (100%)	0
Total: 19 casos			

Legendas: NIBG: neoplasia intraepitelial de baixo grau; NIAG: neoplasia intraepitelial de alto grau; CESI: carcinoma epidermóide superficialmente invasivo; CEI: carcinoma epidermóide invasivo; Sinal (-): ausência de marcação; Sinal (+): positividade de marcação

Tabela 6 - Resultados Claudina -11.

Diagnóstico	Região	Marcação	
		-	+
NIBG	Terço inferior	2 (8,4%)	22 (91,6%)
	Terço médio	2 (8,4%)	22 (91,6%)
	Terço superior	23 (95,8%)	1 (4,2%)
Total: 24 casos			
NIAG	Terço inferior	6 (20,7%)	23 (79,3%)
	Terço médio	3 (10,4%)	26 (89,6%)
	Terço superior	24 (82,7%)	5 (17,3%)
Total: 29 casos			
CESI	Fronte de invasão	19 (67,8%)	9 (32,2%)
	Terço médio	0	28 (100%)
	Terço superior	28 (100%)	0
Total: 28 casos			
CEI	Áreas centrais	3 (15,2%)	16 (84,2%)
	Fronte de invasão	15 (78,9%)	4 (21,1%)
Total: 19 casos			

Legendas: NIBG: neoplasia intraepitelial de baixo grau; NIAG: neoplasia intraepitelial de alto grau; CESI: carcinoma epidermóide superficialmente invasivo; CEI: carcinoma epidermóide invasivo; Sinal (-): ausência de marcação; Sinal (+): positividade de marcação

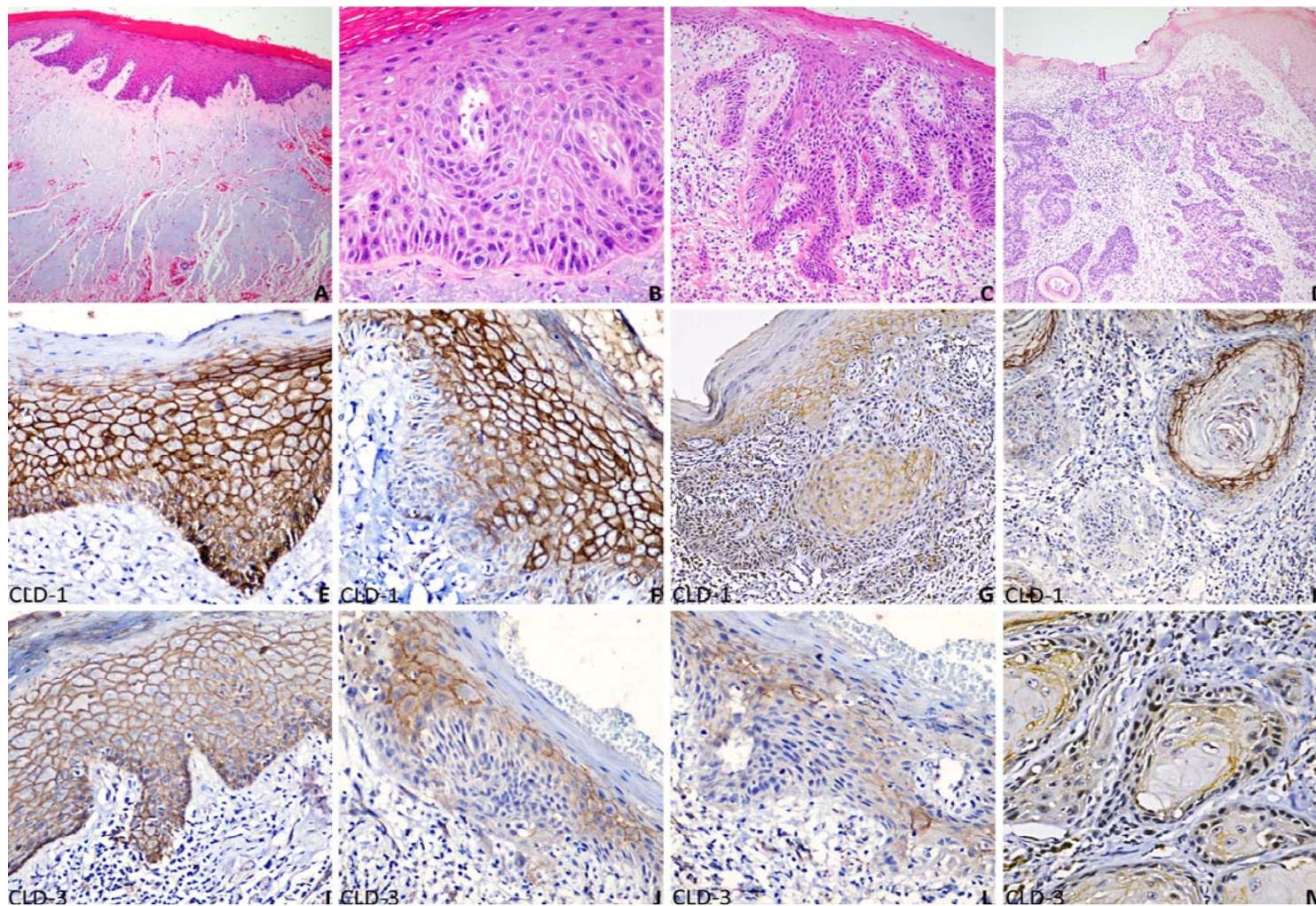


Figura 5 - Imunoexpressão de claudinas-1 e -3.

Figura 5 - Legenda - Imunoexpressão de claudinas-1 e -3

Coluna A – Neoplasia intraepitelial de baixo grau.

Fotomicrografia A: neoplasia intraepitelial de baixo grau corada por HE.

Fotomicrografia E- CLD-1: positividade de claudina-1 nos terços inferior, médio e superior do epitélio.

Fotomicrografia I- CLD-3: positividade de claudina-3 nos terços inferior, médio e superior do epitélio.

Coluna B - Neoplasia intraepitelial de alto grau Fotomicrografia B: neoplasia intraepitelial de alto grau corado por HE.

Fotomicrografia B: neoplasia intraepitelial de baixo grau corada por HE.

Fotomicrografia F- CLD-1: positividade de claudina-1 nos terços médio e superior do epitélio.

Fotomicrografia J- CLD-3: positividade de claudina-3 nos terços médio e superior do epitélio, ausência de marcação do terço inferior.

Coluna C - Carcinoma epidermóide superficialmente invasivo

Fotomicrografia C: carcinoma epidermóide superficialmente invasivo corado por HE

Fotomicrografia G- CLD-1: ausência de marcação de claudina-1 nas áreas de frente de invasão, positividade nos terços médio e superior do epitélio.

Fotomicrografia L- CLD-3: ausência de marcação de claudina-3 nas áreas de frente de invasão, positividade nos terços médio e superior do epitélio.

Coluna D - Carcinoma epidermóide invasivo

Fotomicrografia D: carcinoma epidermóide invasivo corado por HE

Fotomicrografia H- CLD-1: ausência de marcação de claudina-1 nas áreas periféricas, positividade nas áreas centrais.

Fotomicrografia M- CLD-3: ausência de marcação de claudina-3 nas áreas periféricas, positividade nas áreas centrais.

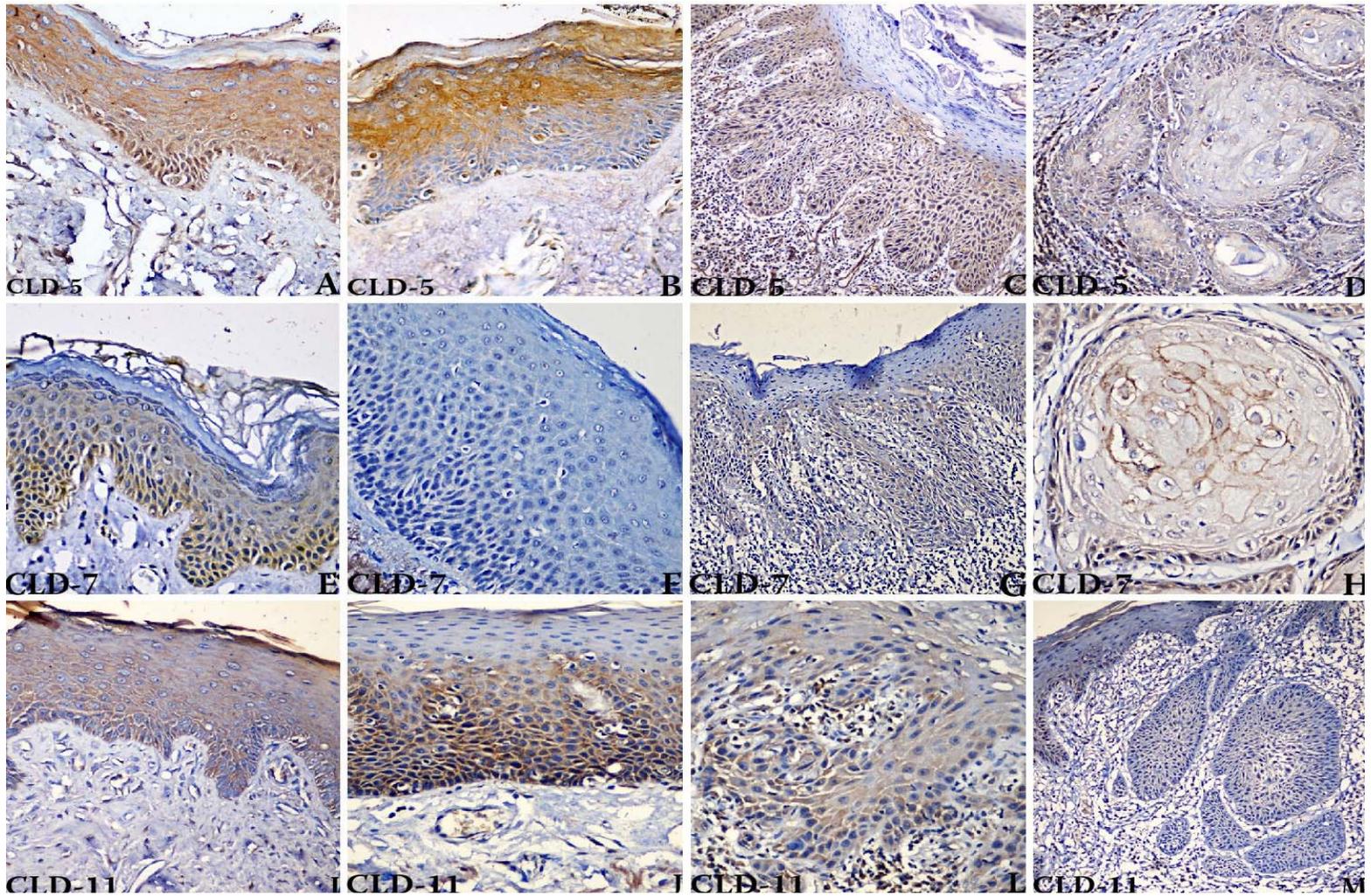


Figura 6 - Imunoexpressão de claudinas-5, -7 e -11.

Figura 6 – Legenda - Imunoexpressão de claudinas-5, -7 e -11.

Coluna A – Neoplasia intraepitelial de baixo grau.

Fotomicrografia A- CLD-5: positividade de claudina-5 nos terços inferior, médio e superior do epitélio.

Fotomicrografia E- CLD-7: positividade de claudina-7 nos terços inferior, médio e superior do epitélio.

Fotomicrografia I- CLD-11: positividade de claudina-11 nos terços inferior, médio do epitélio

Coluna B – Neoplasia intraepitelial de alto grau

Fotomicrografia B- CLD-5: positividade de claudina-5 nos terços médio e superior do epitélio, ausência de marcação no terço inferior

Fotomicrografia F- CLD-7: ausência de marcação de claudina-7 em todos os terços do epitélio.

Fotomicrografia J- CLD-11: positividade de claudina-11 nos terços inferior, médio do epitélio

Coluna C – Carcinoma epidermóide superficialmente invasivo

Fotomicrografia C- CLD-5: positividade de claudina-5 nas áreas de frente de invasão e terço médio e superior bem esparsa e citoplasmática.

Fotomicrografia G- CLD-7: ausência de marcação de claudina-7 nas áreas de frente de invasão, positividade no terço médio e superior citoplasmática.

Fotomicrografia L- CLD-11: ausência de marcação de claudina-11 no frente de invasão e marcação citoplasmática no terço médio do epitélio

Coluna D – Carcinoma epidermóide invasivo

Fotomicrografia D- CLD-5: marcação em citoplasma de claudina-5 nas áreas periféricas, positividade nas áreas centrais.

Fotomicrografia H- CLD-7: ausência de marcação de claudina-7 nas áreas periféricas, positividade nas áreas centrais.

Fotomicrografia M- CLD-11: ausência de marcação na periferia e positividade em áreas centrais.

7 DISCUSSÃO

Este trabalho demonstrou uma associação da expressão das claudinas com o estágio e grau da doença. Para atingir tal resultado, o modelo de estudo utilizado com a avaliação das neoplasias intraepiteliais de baixo e alto grau (NIBG e NIAG, respectivamente) e carcinoma epidermóide superficialmente invasivo e invasivo (CESI e CEI, respectivamente) foi importante para destacar essa diferença de expressão ao longo da evolução da doença.

Em relação à casuística, os pacientes diagnosticados com a doença apresentaram características semelhantes a outros estudos. O fato de homens serem mais suscetíveis que as mulheres neste levantamento com 67% e 33%, respectivamente, assim como a média de idade de acometimento de 60,7 anos, está de acordo com outros estudos publicados na literatura (BENTLEY et al. 2003; ABREU et al. 2006). Outras características clínicas presentes na casuística também foram observadas, como o bom prognóstico com o tratamento adequado da doença, visto que nenhum dos 100 casos avaliados apresentou morbidade no seguimento mínimo de cinco anos, sendo que os 53 casos de neoplasias intraepiteliais de baixo e alto grau não apresentaram recidiva, característica pontuada por KAUGARS et al. (1999) e MOY (2000). Quanto aos 47 casos de carcinoma epidermóide superficialmente invasivo e invasivo, apenas 2 casos, sendo 1 de cada respectivamente, apresentaram recidiva. Segundo COTRAN et al.

(1999), em um estudo retrospectivo de carcinoma epidermóide de lábio 90% dos pacientes estudados não apresentaram recidiva no seguimento de 5 anos. KRAUS e PFISTER (2001), demonstraram que o diagnóstico precoce leva a cura na maioria dos casos podendo levar de meses a anos para que uma lesão evolua de carcinoma *in situ* a invasivo.

Ao avaliar esta particularidade da evolução da doença é possível identificar sutis diferenças na expressão das claudinas ao longo do epitélio e dividir o mesmo morfológicamente. Desta forma, foi pontuada a expressão das moléculas estudadas de acordo com sua localização no epitélio. De acordo com a literatura, a expressão de claudinas e de outras moléculas das junções compactas variam de acordo com o estrato do epitélio e endotélio. Isto ocorre, pois a organização da epiderme em estrato basal, espinhoso, granuloso e córneo, possibilita que os queratinócitos proliferem no estrato basal se acumulando no estrato espinhoso. Assim, os queratinócitos de cada estrato possuem características e funções diferentes, portanto expressando moléculas diferentes entre si. Portanto, neste trabalho dividimos os estratos em terço inferior, médio e superior para os casos de neoplasia intraepitelial de baixo e alto grau e nos casos de carcinoma epidermóide superficialmente invasivo foi aferida a divisão em áreas de frente de invasão, terço médio e superior, e em casos de carcinoma epidermóide invasivo as áreas avaliadas foram denominadas de áreas de frente de invasão e áreas centrais.

Devido esta divisão e estudo das moléculas neste panorama, evidenciaram-se alterações significativas entre os estratos epiteliais avaliados. Para tal, as análises estatísticas dos estratos foram feitas

conforme o diagnóstico histopatológico e o anticorpo avaliado e atribuído um valor estatisticamente significativo em $p < 0.05$. Neste trabalho, devido ao objetivo principal de avaliar a expressão durante a evolução do carcinoma, não é possível aferir uma marcação de modo global aos casos, tendo sido necessário, a avaliação da positividade e ausência de marcação de acordo com os estratos do epitélio. Desta forma, foram avaliados estatisticamente os estratos correspondentes aos terços inferiores do epitélio para neoplasia intraepitelial de baixo/alto grau e seu corresponde, a região fronte de invasão em casos de carcinoma epidermóide superficialmente invasivo e invasivo. Caracterizando a evolução da doença, visto que estes estratos do epitélio apresentam alterações significativas quanto sua morfologia. Ao utilizar o teste de Qui-quadrado de Pearson, que avalia a associação existente entre variáveis qualitativas, foram estabelecidas as seguintes relações comparativas: os terços inferiores do epitélio dos casos estudados foram analisados entre si para cada anticorpo avaliado, para verificar se houve associação significativa no decorrer da evolução do carcinoma do lábio. Não foi possível realizar comparações entre as expressões de claudinas, por exemplo, ao analisar a expressão de claudina-11 com a claudina-7, o resultado era independente e não demonstrava nenhuma associação estatisticamente significante entre uma e outra, assim como ocorreu com as claudinas -1, -3 e -5. Desta forma, estabeleceu-se que a expressão de uma claudina neste caso, não determina a expressão de outra. Segundo FURUSE (2010) as claudinas apesar de serem responsáveis pela formação das junções compactas através de ligações homotípicas (entre uma mesma

claudina), e heterotípicas (entre claudinas diferentes), também podem exercer sua função separadamente no mesmo tecido dependente ou não de outras moléculas para seu funcionamento como o envolvimento de fatores moleculares como citocinas, fatores de crescimento entre outros que podem regular a expressão de claudinas.

Ao aferir a expressão de claudina -1 em casos de neoplasia intraepitelial de baixo grau identificou-se marcação nos terços médio e superior do epitélio em todos os casos, quanto ao terço inferior 16 dos 24 casos apresentaram ausência de expressão, fato esse pode ser resultado das alterações já presentes no epitélio, pois no caso especial da pele do lábio normal, claudina -1 está expressa em todo o epitélio (MORITA e MIYACHI 2003). Apesar do papel fisiológico da claudina -1 ainda ser incerto, estudos demonstraram que camundongos neonatos deficientes em claudina -1 desenvolvem desidratação e morrem com um dia de nascimento, indicando que a claudina -1 é essencial na formação da junção compacta (FURUSE et al. 2002). Conforme as alterações histopatológicas e arquiteturais se intensificam como nos casos de neoplasia intraepitelial de alto grau observou-se que a claudina -1 perde totalmente sua expressão no terço inferior com positividade restrita aos terços médio e superior, dado este que também foi encontrado em displasia moderada de epitélio oral (CARVALHO et al. 2010). Além disso, claudina -1 foi detectada como um fator importante na transição epitélio-mesenquimal, possivelmente através da modulação da sinalização de β -catenina/Tcf, é possível que a desregulação de claudina -1 seja parte de uma via molecular que leva ao

desenvolvimento do câncer (DHAWAN et al. 2005). De acordo com a evolução do carcinoma do lábio foi possível observar a perda da expressão de claudina -1 nas áreas correspondentes a frente de invasão. Segundo patologistas, a morfologia tumoral nas áreas mais invasivas de um tumor, conhecido como frente de invasão é usualmente, diferente das áreas centrais ou superficiais do mesmo tumor. A frente de invasão caracteriza-se por uma menor diferenciação celular que o restante das áreas tumorais. Este fenômeno é frequentemente observado em carcinomas epidermóides, melanomas e vários adenocarcinomas (BRYNE et al. 1998). Esta particularidade encontrada na área de frente de invasão pode ser explicada devido a vários fatores correlacionados, por exemplo, com a perda da adesão célula-célula ocorre maior migração celular e proliferação celular com a diminuição da apoptose. Desta forma, a área tumoral como um todo é afetada possibilitando que outros fatores participem do processo de invasão como o estímulo da angiogênese, proteólise ente outros. A expressão alterada de moléculas adesivas como caderinas, integrinas, lamininas, tenascinas e oligossacarídeos são observados na frente de invasão de vários tumores (BRYNE 1991; THOMAS et al. 1997). Portanto, as alterações morfológicas registradas na frente de invasão provavelmente refletem estes importantes eventos biológicos dentro das células tumorais e no microambiente tumoral. Tal resultado de perda de expressão de claudina -1 nas áreas de frente de invasão e positividade nas áreas centrais em carcinoma epidermóide invasivo segue com o padrão de perda nas áreas invasivas. Porém em casos de câncer esta expressão de claudina -1 não é

regra. Trabalhos já identificaram a alta expressão de claudina -1 em casos de câncer de cólon, em que o autor correlacionou a expressão com uma maior propriedade invasiva das células epiteliais (DHAWAN et al. 2005). Assim como a ausência de expressão desta molécula foi detectada em câncer de mama, glioblastoma multiforme e melanoma (SWISSHELM et al. 1999; LIEBNER et al. 2000; COHN et al. 2005). Sucintamente, o que se pode observar é que ao longo da evolução do tumor de neoplasia intraepitelial de baixo grau a carcinoma epidermóide invasivo, vai ocorrendo uma ligeira alta de ausência de expressão de claudina-1 nas áreas correspondentes ao terço inferior do epitélio e áreas de frente de invasão (de 66,7% de perda em neoplasias de baixo grau a 100% em invasivo), com variações estatísticas significantes de $p=0.001$ destacando principalmente as associações entre NIBG/CESI. Estes resultados distintos sugerem que o funcionamento das claudinas pode ter efeitos específicos nas células de cada tumor. Também é possível que um balanço da expressão das claudinas seja fisiologicamente necessário, pois um desequilíbrio em qualquer direção resulta em alterações funcionais das junções compactas e do comportamento celular.

A claudina-3 apresentou resultado semelhante ao da claudina-1. A expressão observada foi de ausência nos terços inferior em neoplasia de baixo grau em 79,1% dos casos e 100% em neoplasia intraepitelial de alto grau e nas áreas de frente de invasão ausência de 96,5% em casos de carcinoma superficialmente invasivo e 100% em carcinoma invasivo. Entre as comparações destas regiões o valor foi estatisticamente significativo de

$p=0.001$ entre NIBG/CEI. Estudos indicam que a principal função da claudina-3 é controlar a passagem de água no epitélio, porém esta função pode mudar dependendo do tipo de tecido (BAKER 2010). A expressão desta claudina está principalmente relacionada com câncer de ovário, onde é conhecida como uma molécula chave no desenvolvimento deste câncer, pois em tecidos normais ovarianos não é possível identificar sua expressão e em câncer a claudina-3 apresenta super expressão podendo alterar a formação da junção compacta neste tecido (RANGEL et al. 2003). Outros estudos comprovaram que a expressão de claudina-3 está correlacionada com estágios avançados de invasão tumoral em câncer de próstata (SHEEHAN et al. 2007). Desta forma, a expressão das claudinas também pode ser usada para diferenciar vários tipos de câncer e avaliar o prognóstico. Por exemplo, em câncer do endométrio claudina-3 e -4 estão super expressas no carcinoma seroso tipo 2 não-endometrióide, mas as mesmas claudinas estão ausentes no tipo 1 endometrióide (SANTIN et al. 2007).

Pode-se observar que no decorrer da doença múltiplos fatores participam da invasão tumoral. Estudos apontam que a expressão aumentada de claudinas pode ser um fator inicial na carcinogênese, porém são necessários a interação de outros eventos na patogenia dos tumores. As claudinas apresentam expressão distinta entre os tecidos que varia não apenas em sua localização, mas também na condição patológica que o tecido se encontra. Por exemplo, em tecido normal de mucosa gástrica as claudinas -3,-4 e -7 são minimamente detectáveis, mas são super expressas

tanto em lesões precursoras de adenocarcinoma do esôfago com ou sem displasia e em adenocarcinoma do esôfago primário e metastático (MONTGOMERY et al. 2006).

O padrão de expressão para claudina-5 foi o que apresentou altos índices de positividade em todos os terços do epitélio de todos os casos avaliados e entre todas as claudinas avaliadas. Por isso, as associações estatísticas não foram significativas, devido a sua não aplicabilidade. Outro dado importante foi à localização citoplasmática desta claudina que também foi observada por outros autores em carcinoma epidermóide oral (LOURENÇO et al. 2010a). De acordo com a literatura quando as claudinas estão expressas no citoplasma se caracterizam como inativas, já que exercem sua função apenas nos cordões da membrana plasmática. Outros autores discutem a interação do processo de fosforilação para que a claudina se apresente no citoplasma. Porém, dados concretos sobre essa particularidade ainda precisam ser mais estudados (BLACKMAN et al. 2005; LAL-NAG e MORIN 2010). Claudina-5 está principalmente associada na junção compacta do endotélio, controlando a barreira endotelial (MORITA et al. 1999b). Até o momento, claudina-5 tem sido implicada no desenvolvimento do câncer do esôfago, pois esta proteína não é encontrada em epitélio normal do esôfago e está expressa neste tipo de câncer (CHIBA et al. 2010).

A claudina-7 apresentou padrão de expressão de ausência nos terços inferiores do epitélio desde os casos de neoplasia intraepitelial de baixo grau até as regiões de frente de invasão nos casos de carcinoma. Os dados

estatísticos para claudina-7 apresentaram significância apenas na associação NIBG com as outras neoplasias com valor de p variando entre $p=0,003$ à $p=0,022$, a partir da marcação em neoplasia intraepitelial de alto grau e associação com as outras neoplasias os valores não foram significativos. A claudina-7 está geralmente localizada nos túbulos distais e coletores dos rins de ratos (ALEXANDRE et al. 2004). No câncer seu papel vem sendo largamente estudado. Devido à descoberta em que sugere-se que a perda da claudina-7 está associada com perda da adesão celular e aumento de metástase (PARK et al. 2007). Entretanto, a claudina-7 foi detectada elevada em vários cânceres como o de ovário. Nestes casos detectou-se além da marcação em membrana a marcação citoplasmática desta claudina, assim como nos casos de carcinoma do lábio e os autores designaram esta localização citoplasmática como decorrente da fosforilação da proteína afetando a localização celular da mesma (TASSI et al. 2008). Estudos que avaliaram a ausência desta proteína também identificaram este achado na região de frente de invasão em câncer de esôfago correlacionando com a invasão tumoral (USAMI et al. 2006). Em cânceres de cabeça e pescoço a claudina-7 geralmente apresenta-se com expressão reduzida (AL MOUSTAFA et al. 2002) Em mucosa oral normal uma forte expressão de claudinas -1, -3, e -7 é observada e em lesões de carcinoma oral de estágio avançado observa-se a perda de expressão de claudina -7, associando tal perda com a patogênese da doença e com pior prognóstico (LOURENÇO et al. 2010b). Nos doentes estudados a associação com prognóstico (recorrência e sobrevida) não foi possível, pois os casos

analisados tratavam-se de neoplasias iniciais que sofreram tratamento precoce e todos os doentes encontram-se atualmente vivos e livres de doença.

O padrão de expressão para claudina-11 apresentou um resultado peculiar comparado às outras claudinas. Enquanto as claudinas -1, -3 e -7 apresentam alterações desde os casos iniciais do carcinoma do lábio a claudina-11 só apresentou ausência de expressão mais proeminente nos casos de carcinoma epidermóide superficialmente invasivo e invasivo nas áreas de frente de invasão com valor estatístico significativo de $p < 0.000$. A claudina-11 está presente no sistema nervoso central, também estão presentes nas células de Sertoli, e aparentemente possui papel importante na espermatogênese e a ausência de claudina-11 leva a ruptura do cordão da junção compacta e está associada com deficiências neurológicas e reprodutivas (GOW et al. 1999; MORITA et al. 1999a). Não há muitos estudos com a expressão de claudina-11 em câncer, os poucos estudos existentes relatam que o silenciamento da claudina-11 hipermetilada contribui para o desenvolvimento do câncer gástrico que leva a um aumento da motilidade celular e invasão (AGARWAL et al. 2009).

Portanto, nossos achados demonstram que ao decorrer da evolução do carcinoma epidermóide do lábio a expressão das claudinas vai se alterando gradativamente. Na vigência de alterações arquiteturais e citológicas mais proeminentes nota-se a perda de expressão das claudinas -1, -3 e -7 nos casos de neoplasia intraepitelial de alto grau, indicando uma ruptura do epitélio devida a alterações celulares de proteínas da matriz

extracelular e sua interação com proteínas de adesão celular e fatores de transição epitélio-mesenquimal.

Estudos em câncer de mama demonstram essa ligação da ausência ou baixa expressão de claudinas correlacionando com a interação de fatores de transição epitélio mesênquima como, Goosecoid, Snail e Twist, alguns relatos de que moléculas que induzem EMT podem controlar a expressão de claudinas. Sabe-se que essas interações são cruciais para que as células neoplásicas localizadas na frente de invasão do epitélio tenham a capacidade de invadir tecidos adjacentes (MARTÍNEZ-ESTRADA et al. 2006; TAUBE et al. 2010).

Desta forma, esse padrão de expressão de claudinas -1, -3, -5, -7 e -11 corroboram este achado. Neste panorama de evolução das lesões neoplásicas do lábio categorizamos as claudinas como fatores iniciais (precoces) na carcinogênese da doença, visto que no último estágio em casos de carcinoma epidermóide invasivo observa-se a perda completa da expressão das claudinas na frente de invasão das ilhotas tumorais.

Portanto verificou-se que as claudinas não estão envolvidas no processo biológico da carcinogênese apenas em estágios avançados da doença, mas na complexa relação de inúmeras cascatas moleculares e de sinalização, assim como adesão celular na evolução de lesões incipientes e iniciais até lesões invasivas do carcinoma epidermóide do lábio.

8 CONCLUSÕES

Conclusão Geral:

As claudinas, componentes das junções compactas têm expressão variável nas neoplasias intraepiteliais e reduzida, em sua grande maioria no carcinoma epidermóide.

Conclusões específicas:

1. Os aspectos morfológicos da QA mostram alterações iniciais e incipientes no epitélio labial e que ao longo de sua história natural podem apresentar aspecto morfológico de carcinoma epidermóide.
2. Conclui-se que a distribuição das claudinas ao longo da evolução da doença é de significativa importância, pois foi comprovada a ausência destas proteínas, principalmente claudina-1, -3, -7 e -11 no estudo, desde sua forma incipiente até casos invasivos.

9 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

Abdo EM, Garrocho AA, Aguiar MCF. Perfil do paciente portador do carcinoma epidermóide da cavidade bucal, em tratamento no Hospital Mário Penna em Belo Horizonte. **Rev Bras Cancerol** 2002; 48:357-62.

Abreu MA, Silva OM, Neto Pimentel DR, et al. Actinic cheilitis adjacent to squamous carcinoma of the lips as an indicator of prognosis. **Braz J Otorhinolaryngol** 2006; 72:767-71.

Acharya P, Beckel J, Ruiz WG, et al. Distribution of the tight junction proteins ZO-1, occluding, and claudin-4, -8, and -12 in bladder epithelium. **Am J Physiol Renal Physiol** 2004; 287:F305-18.

Alberts B, Johnson A, Lewis Raff M, Roberts K, Walter P **Biologia molecular da célula**. 4^a ed. Porto Alegre: Artmed; 2004. Junções celulares, adesão celular e matriz extracelular; p.1066-116.

Aldred MA, Huang Y, Liyanarachchi S, et al. Papillary and follicular thyroid carcinomas show distinctly different microarray expression profiles and can be distinguished by a minimum of five genes. **J Clin Oncol** 2004; 22:3531-9.

Alexandre MD, Lu Q, Chen YH. Overexpression of claudin-7 decreases the paracellular Na⁺ conductance in LLC-PK1 cells. **J Cell Sci** 2005; 118:2683-93.

Almeida OP, Lopes MA. Prevenção das doenças bucais. In: Kriger L, editor. **Promoção de saúde bucal**. São Paulo: Artes Médicas; 1997. p.434-46.

Al Moustafa AE, Alaoui-Jamali MA, Batist G, et al. Identification of genes associated with head and neck carcinogenesis by cDNA microarray comparison between matched primary normal epithelial and squamous carcinoma cells. **Oncogene** 2002, 21:2634-40.

Angelow S, Ahlstrom R, Yu AS. Biology of claudins. **Am J Physiol Renal Physiol** 2008; 295:F867-76.

Antunes AA, Antunes AP. Estudo retrospectivo e revisão de literatura dos tumores dos lábios: experiência de 28 anos. **Rev Bras Cancerol** 2004; 50:95-101.

Arabzadeh A, Troy TC, Turksen K. Changes in the distribution pattern of Claudin tight junction proteins during the progression of mouse skin tumorigenesis. **BMC Cancer** 2007; 7:196.

Agarwal R, Mori Y, Cheng Y, et al. Silencing of claudin-11 is associated with increased invasiveness of gastric cancer cells. **Plos One** 2009; 4:e8002.

Araújo NS, Araújo VC. Anatomia patológica nas lesões pré neoplásicas. In: Parise Júnior O, editor. **Câncer de boca: aspectos básicos e terapêuticos**. São Paulo: Sarvier; 2000. p.63-70.

Baker OJ. Tight junctions in salivary epithelium. **J Biomed Biotechnol** 2010; 2010:278948.

Bello IO, Vilen ST, Niinimaa A, Kantola S, Soini Y, Salo T. Expression of claudins 1, 4, 5 and 7 and occludin, and relationship with prognosis in squamous cell carcinoma of the tongue. **Hum Pathol** 2008; 39:1212-20.

Bentley JM, Barankin B, Lauzon GJ. Paying more than lip service to lip lesions. **Can Fam Physician** 2003; 49:1111-6.

Bernier JL, Reynolds MC. The relationship of senile actinic radiation and to squamous cell carcinoma of the lip; further investigation of 835 cases. **Mil Med** 1955, 117:209-21.

Billings SD, Walsh SV, Fisher C, Nusrat A, Weiss SW, Folpe AL. Aberrant expression of tight junction-related protein ZO-1, claudin-1 and occluding in synovial sarcoma: an immunohistochemical study with ultrastructural correlation. **Mod Pathol** 2004; 17:141-9.

Blackman B, Russell T, Nordeen SK, Medina D, Neville MC. Claudin -7 expression and localization in the normal murine gland and mammary tumours. **Breast Cancer Res** 2005; 7:R248-55.

Boireau S, Buchert M, Samuel MS, et al. DNA-methylation-dependent alterations of claudin-4 expression in human bladder carcinoma. **Carcinogenesis** 2007; 28:246-58.

Bryne M. Prognostic value of various molecular and cellular features in oral squamous cell carcinoma: a review. **J Oral Pathol Med** 1991; 20:413-20.

Bryne M, Boysen M, Alfsen CG, et al. Is the invasive front of carcinomas. The most important area for tumour prognosis? **Anticancer Res** 1998; 18:4757-64.

Carvalho Mde V, Pereira Jdos S, Costa Ade L, de Souza LB, Freitas Rde A, Miguel MC. Alterations in the immunoexpression of claudin -1 between different grades of oral epithelial dysplasias. **Arch Oral Biol** 2010; 55:261-7.

Cavalcante AS, Anbinder AL, Carvalho YR. Actinic cheilitis: clinical and histological features. **J Oral Maxillofac Surg** 2008; 66:498-503.

Cheung ST, Leung KL, Ip YC, et al. Claudin -10 expression level is associated with recurrence of primary hepatocellular carcinoma. **Clin Cancer Res** 2005; 11:551-6.

Chiba T, Kawachi H, Kawano T, et al. Independent histological risk factors for lymph node metastasis of superficial esophageal squamous cell carcinoma; implication of claudin-5 immunohistochemistry for expanding the indications of endoscopic resection. **Dis Esophagus** 2010; 23:398-407.

Chou A, Dekker N, Jordan RC. Identification of novel fibroblast growth factor receptor 3 gene mutations in actinic cheilitis and squamous cell carcinoma of the lip. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod** 2009; 107:535-41.

Cohn ML, Goncharuk VN, Diwan AH, Zhang PS, Shen SS, Prieto VG. Loss of claudin-1 expression in tumor-associated vessels correlates with acquisition of metastatic phenotype in melanocytic neoplasms. **J Cutan Pathol** 2005; 32:533-6.

Cotran RS, Kumar V, Collins T, editors. **Robbins pathologic basis of disease**. 6thed. Philadelphia: W B Saunders; 1999. Head and neck; p.756-74.

Daugherty BL, Ward C, Smith T, Ritzenthaler JD, Koval M. Regulation of heterotypic claudin compatibility. **J Biol Chem** 2007; 282:30005-13.

de Freitas Mda C, Ramalho LM, Xavier FC, Moreira AL, Reis SR. p53 e MDM2 protein expression in actinic cheilitis. **J Appl Oral Sci** 2008; 16:414-9.

Denker BM, Nigam SK. Molecular structure and assembly of tight junction. **Am J Physiol** 1998; 274:F1-9.

Dhawan P, Singh AB, Deane NG, et al. Claudin -1 regulates cellular transformation and metastatic behavior in colon cancer. **J Clin Invest** 2005, 115:1765-76.

D'Souza T, Agarwal R, Morin PJ. Phosphorylation of claudin-3 at threonine 192 by cAMP-dependent protein kinase regulates tight junction barrier function in ovarian cancer cells. **J Biol Chem** 2005; 280:26233-40.

Dos Reis PP, Bharadwaj RR, Machado J, et al. Claudin 1 overexpression increases invasion and is associated with aggressive histological features in oral squamous cell carcinoma. **Cancer** 2008, 113:3169-80.

Evans MJ, von Hahn T, Tscherne DM, et al. Claudin-1 is a hepatitis C virus co-receptor required for a late step in entry. **Nature** 2007; 446:801-5.

Furuse M, Hirase T, Itoh M, et al. Occludin: a novel integral membrane protein localizing at tight junctions. **J Cell Biol** 1993; 123:1777-88.

Furuse M, Fujita K, Hiiragi T, Fujimoto K, Tsukita S. Claudin-1 and -2: novel integral membrane proteins localizing at tight junctions with no sequence similarity to occludin. **J Cell Biol** 1998; 141:1539-50.

Furuse M, Hata M, Furuse K, et al. Claudin-based tight junctions are crucial for the mammalian epidermal barrier: a lesson from claudin-1-deficient mice. **J Cell Biol** 2002; 156:1099-11.

Furuse M. Molecular basis of the core structure of tight junctions. **Cold Spring Harb Perspect Biol** 2010; 2:a002907.

Gopalakrishnan S, Van Emburgh BO, Robertson KD. DNA methylation in development and human disease. **Mutat Res** 2008; 647:30-8.

Gow A, Southwood CM, Li JS, et al. CNS myelin and sertoli cell tight junction strands are absent in OSP/claudin-11 null mice. **Cell** 1999; 99:649-59.

Gupta IR, Ryan AK. Claudins: unlocking the code to tight junction function during embryogenesis and in disease. **Clin Genet** 2010; 77:314-25.

Ivanov AI, Nusrat A, Parkos CA. Endocytosis of the apical junctional complex: mechanisms and possible roles in regulation of the epithelial barriers. **Bioessays** 2005; 27:356-65.

Johnson AH, Frierson HF, Zaika A, et al. Expression of tight junction protein claudin- 7 is an early event in gastric tumorigenesis. **Am J Pathol** 2005; 167:577-84.

Junqueira LC, Carneiro J. **Histologia básica**. 11^a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2008. Tecido epithelial; p.67-70.

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.

Kraus DH, Pfister DG. Head and neck oncology. In: Noble J, editors. **Textbook of primary care medicine**. 3rd ed. St. Louis: Mosby Inc; 2001. p.1775.

Krause G, Winkler L, Mueller SL, Haseloff RF, Piontek J, Blasig IE. Structure and function of claudins. **Biochim Biophys Acta** 2008; 1778:631-45.

Krishnan M, Singh AB, Smith JJ, et al. HDAC inhibitors regulate claudin -1 expression in colon cancer cells through modulation of mRNA stability. **Oncogene** 2010; 29:305-12.

Kominsky SL, Argani P, Korz D, et al. Loss of tight junction protein claudin-7 correlates with histological grade in both ductal carcinoma in situ and invasive ductal carcinoma of the breast. **Oncogene** 2003; 22:2021-33.

Kominsky SL, Vali M, Korz D, et al. Clostridium perfringens enterotoxin elicits rapid and specific cytolysis of breast carcinoma cells mediated through tight junction proteins claudin 3 and 4. **Am J Pathol** 2004; 164:1627-33.

Koopmann CF Jr, Coulthard SW. The oral cavity and aging. **Otolaryngol Clin North Am** 1982; 15:293-312.

Koten JW, Verhagen AR, Frank GL. Histopathology of actinic cheilitis. **Dermatologica** 1967; 135:465-71.

Lal-Nag M, Morin PJ. The claudins. **Genome Biol** 2010; 10:235.

Lee JW, Lee SJ, Seo J, et al. Increased expressions of claudin-1 and claudin-7 during the progression of cervical neoplasia. **Gynecol Oncol** 2005; 97:53-9.

Li WY, Huey CL, Yu AS. Expression of claudin-7 and -8 along the mouse nephron. **Am J Physiol Renal Physiol** 2004; 286:F1063-71.

Liebner S, Fischmann A, Rascher G, et al. Claudin-1 and claudin-5 expression and tight junction morphology are altered in blood vessels of human glioblastoma multiforme. **Acta Neuropathol** 2000; 100:323-31.

Long H, Crean CD, Lee WH, Cummings OW, Gabig TG. Expression of Clostridium perfringens enterotoxin receptors claudin-3 and claudin-4 in prostate cancer epithelium. **Cancer Res** 2001; 61:7878-81.

Lourenço SV, Coutinho-Camillo CM, Buim ME, et al. Oral squamous cell carcinoma: status of tight junctions claudins in the different histopathological patterns and relationship with clinical parameters. A tissue-microarray-based study of 136 cases. **J Clin Pathol** 2010a; 63:609-14.

Lourenço SV, Coutinho-Camillo CM, Buim ME, et al. Claudin-7 down-regulation is an important feature in oral squamous cell carcinoma. **Histopathology** 2010b; 57:689-98.

Markopoulos A, Albanidou-Farmaki E, Kayavis I. Actinic cheilitis: clinical and pathologic characteristics in 65 cases. **Oral Dis** 2004; 10:212-6.

Martin TA, Jiang WG. Loss of tight junction barrier function and its role in cancer metastasis. **Biochim Biophys Acta** 2009; 1788:872-91.

Martínez-Estrada OM, Cullerés A, Soriano FX, et al. The transcription factor Slug and Snail act as repressors of claudin -1 expression in epithelial cells. **Biochem J** 2006; 394:446-57.

Matsuda Y, Semba S, Ueda J, et al. Gastric and intestinal claudin expression at the invasive front of gastric carcinoma. **Cancer Sci** 2007; 98:1014-9.

Menta Simonsen Nico M, Rivitti EA, Lourenço SV. Actinic cheilitis: histologic study of the entire vermilion and comparison with previous biopsy. **J Cutan Pathol** 2007; 34:309-14.

Michl P, Buchholz M, Rolke M, et al. Claudin-4: a new target for pancreatic cancer treatment using *Clostridium perfringens* enterotoxin. **Gastroenterology** 2001; 121:678-84.

Mima S, Tsutsumi S, Ushijima H, et al. Induction of claudin-4 by nonsteroidal anti-inflammatory drugs and its contribution to their chemopreventive effect. **Cancer Res** 2005; 65:1868-76.

Miwa N, Furuse M, Tsukita S, Niikawa N, Nakamura Y, Furukawa Y. Involvement of claudin-1 in the beta-catenin/Tcf signaling pathway and its frequent upregulation in human colorectal cancers. **Oncol Res** 2001; 12:469-76.

Montgomery E, Mamelak AJ, Gibson M, et al. Overexpression of claudin proteins esophageal adenocarcinoma and its precursor lesions. **Appl Immunohistochem Mol Morphol** 2006; 14:24-30.

Morita K, Sasaki H, Fujimoto K, Furuse M, Tsukita S. Claudin-11/OSP-based tight junction of myelin sheaths in brain and Sertoli cells in testis. **J Cell Biol** 1999a; 145:579-88.

Morita K, Sasaki H, Furuse M, Tsukita S. Endothelial claudin: claudin-5/TMVCF constitutes tight junction strands in endothelial cells. **J Cell Biol** 1999b; 147:185-94.

Morita K, Miyachi Y. Tight junctions in the skin. **J Dermatol Sci** 2003; 31:81-9.

Moy RL. Clinical presentation of actinic keratoses and squamous cell carcinoma. **J Am Acad Dermatol** 2000; 42:8-10.

Mullin JM. Epithelial barriers, compartmentation and cancer. **Sci STKE** 2004; 2004:pe2.

Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. **Patologia oral & maxilofacial**. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. Patologia epitelial; p.325-54.

Nico MMS. **Queilite actínica; estudo comparativo entre os achados histopatológicos da biopsia e dos cortes seriados provenientes da vermelhonectomia: estudo de 20 casos**. São Paulo; 2004. [Tese de Doutorado-Faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo]

Neto Pimentel DR, Michalany N, Alchorne M, Abreu M, Borra RC, Weckx L. Actinic cheilitis: histopathology and p53. **J Cutan Pathol** 2006; 33:539-44.

Nicolau SG, Balus L. Chronic actinic cheilitis and cancer of the lower lip. **Br J Dermatol** 1964; 76:278-89.

[NIH] National Institute of Health. National Institute of Dental and Craniofacial Research. **NIDCR** 2008; 08:6423.

Oliveira SS, Morgado-Díaz JA. Claudins: multifunctional players in epithelial tight junctions and their role in cancer. **Cell Mol Life Sci** 2007; 64:17-28.

Park D, Kåresen R, Axcróna U, Noren T, Sauer T. Expression pattern of adhesion molecules (E-cadherin, alpha-, beta-, gamma-catenin and claudin-7), their influence on survival in primary breast carcinoma, and their corresponding axillary lymph node metastasis. **APMIS** 2007; 115:52-65.

Picascia DD, Robinson JK. Actinic cheilitis: a review of the etiology, differential diagnosis and treatment. **J Am Acad Dermatol** 1987; 17:255-64.

Qu Y, Dahl G. Function of the voltage gate of gap junction channels: selective exclusion of molecules. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2002; 99:697-702.

Rangel LB, Agarwal R, D'Souza T, et al. Tight junction proteins claudin-3 and claudin-4 are frequently overexpressed in ovarian cancer but not in ovarian cystadenomas. **Clin Cancer Res** 2003; 9:2567-75.

Resnick MB, Konkin T, Routhier J, Sabo E, Pricolo VE. Claudin -1 is a strong prognostic indicator in stage II colonic cancer: a tissue microarray study. **Mod Pathol** 2005; 18:511-8.

Rogers RS 3rd, Bekic M. Diseases of the lips. **Semin Cutan Med Surg** 1997; 16:328-36.

Saitou M, Fujimoto K, Doi Y, et al. Occludin-deficient embryonic stem cells can differentiate into polarized epithelial cells bearing tight junctions. **J Cell Biol** 1998; 141:397-408.

Santin AD, Cané S, Bellone S, et al. Treatment of chemotherapy-resistant human ovarian cancer xenografts in C.B-17/SCID mice by intraperitoneal administration of Clostridium perfringens enterotoxin. **Cancer Res** 2005; 65:4334-42.

Santin AD, Bellone S, Marizzoni M, et al. Overexpression of claudins -3 and claudin -4 receptors in uterine serous papillary carcinoma: novel targets for a type-specific therapy using Clostridium perfringens enterotoxin (CPE). **Cancer** 2007; 109:1312-22.

Shah AY, Doherty SD, Rosen T. Actinic cheilitis: a treatment review. **Int J Dermatol** 2010; 49:1225-34.

Sheehan GM, Kallakury BV, Sheehan CE, Fisher HA, Kaufman RP Jr, Ross JS. Loss of claudin-1 and -7 and expression of claudins-3 and -4 correlate with prognostic variables in prostatic adenocarcinomas. **Hum Pathol** 2007; 38:564-9.

Singh AB, Sharma A, Dhawan P. Claudin family of proteins and cancer: an overview. **J Oncol** 2010; 2010:541957.

Sobel G, Páska C, Szabó I, Kiss A, Kádár A, Schaff Z. Increased expression of claudins in cervical squamous intraepithelial neoplasia and invasive carcinoma. **Hum Pathol** 2005; 36:162-9.

Soini Y. Expression of claudins 1, 2, 3, 4, 5 and 7 in various types of tumours. **Histopathology** 2005, 46:551-60.

Swisshelm K, Machl A, Planitzer S, Robertson R, Kubbies M, Hosier S. SEMP1, a senescence associated cDNA isolated from human mammary epithelial cells, is a member of an epithelial membrane protein superfamily. **Gene** 1999; 226:285-95.

Swisshelm K, Macek R, Kubbies M. Role of claudins in tumorigenesis. **Adv Drug Deliv Rev** 2005; 57:919-28.

Takala H, Saarnio J, Wiik H, Soini Y. Claudins 1, 3, 4, 5 and 7 in esophageal cancer: loss of claudin 3 and 4 expression is associated with metastatic behavior. **APMIS** 2007; 115:838-47.

Tassi RA, Bignotti E, Falchetti M, et al. Claudin-7 expression in human epithelial ovarian cancer. **Int J Gynecol Cancer** 2008; 18:1262-71.

Taube JH, Herschkowitz JI, Komurov K, et al. Core epithelium-to-mesenchymal transition interactome gene-expression signature is associated with claudin low and metaplastic breast cancer subtypes. **Proc Natl Acad Sci U S A** 2010; 107:15449-54.

Thomas DW, Seddon SV, Shepherd JP. Systemic immunosuppression and oral malignancy: a report of case and review of the literature. **Br J Oral Maxillofac Surg** 1993; 31:391-3.

Thomas GJ, Jones J, Speight PM. Integrins and oral cancer. **Oral Oncol** 1997; 33:381-8.

Turksen K, Troy TC. Barriers built on claudins. **J Cell Sci** 2004; 117:2435-47.

Turksen K, Troy TC. Junctions gone bad: claudins and loss of the barrier in cancer. **Biochim Biophys Acta** 2011; 1816:73-9.

Usami Y, Chiba H, Nakayama F, et al. Reduced expression of claudin -7 correlates with invasion and metastasis in squamous cell carcinoma of the esophagus. **Hum Pathol** 2006; 37:569-77.

Van Itallie CM, Colegio OR, Anderson JM. The cytoplasmic tails of claudins can influence tight junction barrier properties through effects on protein stability. **J Membr Biol** 2004; 199:29-38.

Van Itallie CM, Anderson JM. Claudins and epithelial paracellular transport. **Annu Rev Physiol** 2006; 68:403-29.

Van Itallie CM, Betts L, Smedley JG 3rd, McClane BA, Anderson JM. Structure of the claudin-binding domain of *Clostridium perfringens* enterotoxin. **J Biol Chem** 2008; 283:268-74.

van Zuuren EJ, de Visscher JG, Bouwes Bavinck JN. Carcinoma of the lip in kidney transplant recipients. **J Am Acad Dermatol** 1998; 38:497-9.

Warnock GR, Fuller RP Jr, Pelleu GB Jr. Evaluation of 5- fluoracil in the treatment of actinic queratosis of the lip. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol** 1981; 52:501-5.

Yamamoto T, Saeki Y, Kurasawa M, Kuroda S, Arase S, Sasaki H. Effect of RNA interference of tight junction-related molecules on intercellular barrier function in cultured human keratinocytes. **Arch Dermatol Res** 2008; 300:517-24.

Yuki T, Haratake A, Koishikawa H, Morita K, Miyachi Y, Inoue S. Tight junction proteins in keratinocytes: localization and contribution to barrier function. **Exp Dermatol** 2007; 16:324-3.

Zavala-Zendejas VE, Rendón-Huerta EP. Alteración de la integridad de las uniones estrechas en el desarrollo del cáncer. El papel de las claudinas. **Bioquimia** 2008; 33:19-29.

Anexo 1 - Dados Gerais dos Pacientes.

Caso	Idade	Sexo	Raça	Diagnóstico
1	72	feminino	Branca	Neoplasia intraepitelial de alto grau
2	56	feminino	Branca	Neoplasia intraepitelial de baixo grau
3	50	feminino	Branca	Neoplasia intraepitelial de alto grau
4	72	masculino	Branca	Neoplasia intraepitelial de alto grau
5	66	masculino	Branca	Neoplasia intraepitelial de alto grau
6	65	feminino	Branca	Neoplasia intraepitelial de alto grau
7	66	feminino	Branca	Neoplasia intraepitelial de alto grau
8	67	masculino	Branca	Neoplasia intraepitelial de alto grau
9	72	feminino	Branca	Neoplasia intraepitelial de alto grau
10	62	masculino	Branca	Neoplasia intraepitelial de alto grau
11	68	masculino	Branca	Neoplasia intraepitelial de baixo grau
12	50	feminino	Branca	Carcinoma epidermóide superficialmente invasivo
13	45	feminino	Branca	Neoplasia intraepitelial de alto grau
14	61	feminino	Branca	Carcinoma epidermóide superficialmente invasivo
15	66	masculino	Branca	Neoplasia intraepitelial de baixo grau
16	29	masculino	Branca	Neoplasia intraepitelial de baixo grau
17	49	masculino	Branca	Carcinoma epidermóide superficialmente invasivo
18	79	masculino	Branca	Neoplasia intraepitelial de alto grau
19	59	masculino	Branca	Carcinoma epidermóide superficialmente invasivo
20	38	masculino	Branca	Carcinoma epidermóide superficialmente invasivo
21	33	masculino	Branca	Carcinoma epidermóide superficialmente invasivo
22	74	masculino	Branca	Carcinoma epidermóide superficialmente invasivo
23	66	masculino	Branca	Neoplasia intraepitelial de alto grau
24	79	feminino	Branca	Carcinoma epidermóide superficialmente invasivo
25	62	masculino	Branca	Carcinoma epidermóide invasivo
26	80	masculino	Branca	Carcinoma epidermóide invasivo
27	76	masculino	Branca	Carcinoma epidermóide superficialmente invasivo
28	17	masculino	Branca	Carcinoma epidermóide superficialmente invasivo
29	67	feminino	Branca	Neoplasia intraepitelial de alto grau
30	45	masculino	Branca	Carcinoma epidermóide superficialmente invasivo
31	42	masculino	Branca	Neoplasia intraepitelial de alto grau

32	72	masculino	Branca	Neoplasia intraepitelial de baixo grau
33	81	masculino	Branca	Carcinoma epidermóide invasivo
34	60	masculino	Branca	Carcinoma epidermóide superficialmente invasivo
35	63	feminino	Branca	Neoplasia intraepitelial de alto grau
36	8	masculino	Branca	Carcinoma epidermóide superficialmente invasivo
37	65	feminino	Branca	Neoplasia intraepitelial de alto grau
38	52	masculino	Branca	Carcinoma epidermóide invasivo
39	76	feminino	Branca	Neoplasia intraepitelial de baixo grau
40	57	masculino	Branca	Neoplasia intraepitelial de baixo grau
41	51	feminino	Branca	Neoplasia intraepitelial de baixo grau
42	61	masculino	Branca	Neoplasia intraepitelial de alto grau
43	51	masculino	Branca	Carcinoma epidermóide invasivo
44	64	masculino	Branca	Neoplasia intraepitelial de baixo grau
45	62	feminino	Branca	Carcinoma epidermóide invasivo
46	48	masculino	Branca	Neoplasia intraepitelial de baixo grau
47	67	masculino	Branca	Neoplasia intraepitelial de baixo grau
48	77	feminino	Branca	Carcinoma epidermóide invasivo
49	60	masculino	Branca	Carcinoma epidermóide superficialmente invasivo
50	45	masculino	Branca	Carcinoma epidermóide invasivo
51	51	masculino	Branca	Carcinoma epidermóide superficialmente invasivo
52	55	masculino	Branca	Carcinoma epidermóide superficialmente invasivo
53	60	masculino	Branca	Carcinoma epidermóide superficialmente invasivo
54	78	masculino	Branca	Neoplasia intraepitelial de baixo grau
55	71	masculino	Branca	Carcinoma epidermóide invasivo
56	10	feminino	Branca	Carcinoma epidermóide superficialmente invasivo
57	42	feminino	Branca	Carcinoma epidermóide superficialmente invasivo
58	48	masculino	Branca	Neoplasia intraepitelial de alto grau
59	67	feminino	Branca	Carcinoma epidermóide superficialmente invasivo
60	48	masculino	Branca	Neoplasia intraepitelial de alto grau
61	64	masculino	Branca	Neoplasia intraepitelial de alto grau
62	78	feminino	Branca	Carcinoma epidermóide invasivo
63	51	masculino	Branca	Carcinoma epidermóide superficialmente invasivo
64	58	feminino	Branca	Carcinoma epidermóide superficialmente invasivo
65	46	masculino	Branca	Carcinoma epidermóide invasivo
66	51	masculino	Branca	Carcinoma epidermóide invasivo
67	53	masculino	Branca	Carcinoma epidermóide invasivo

68	64	masculino	Branca	Carcinoma epidermóide invasivo
69	87	masculino	Branca	Carcinoma epidermóide invasivo
70	59	masculino	Branca	Carcinoma epidermóide invasivo
71	78	feminino	Branca	Carcinoma epidermóide superficialmente invasivo
72	70	masculino	Branca	Carcinoma epidermóide superficialmente invasivo
73	68	feminino	Branca	Carcinoma epidermóide invasivo
74	82	feminino	Branca	Carcinoma epidermóide invasivo
75	90	masculino	Branca	Neoplasia intraepitelial de baixo grau
76	54	feminino	Branca	Neoplasia intraepitelial de baixo grau
77	74	masculino	Branca	Neoplasia intraepitelial de alto grau
78	78	feminino	Branca	Neoplasia intraepitelial de baixo grau
79	69	masculino	Branca	Neoplasia intraepitelial de baixo grau
80	73	masculino	Branca	Neoplasia intraepitelial de baixo grau
81	86	feminino	Branca	Neoplasia intraepitelial de alto grau
82	81	masculino	Branca	Carcinoma epidermóide superficialmente invasivo
83	29	masculino	Branca	Neoplasia intraepitelial de baixo grau
84	57	feminino	Branca	Carcinoma epidermóide superficialmente invasivo
85	74	masculino	Branca	Neoplasia intraepitelial de alto grau
86	51	masculino	Branca	Neoplasia intraepitelial de baixo grau
87	47	feminino	Branca	Neoplasia intraepitelial de baixo grau
88	58	feminino	Branca	Neoplasia intraepitelial de baixo grau
89	86	masculino	Branca	Neoplasia intraepitelial de alto grau
90	73	feminino	Branca	Neoplasia intraepitelial de alto grau
91	41	masculino	Branca	Neoplasia intraepitelial de baixo grau
92	52	masculino	Branca	Neoplasia intraepitelial de alto grau
93	55	masculino	Branca	Neoplasia intraepitelial de baixo grau
94	79	masculino	Branca	Neoplasia intraepitelial de baixo grau
95	48	masculino	Branca	Neoplasia intraepitelial de alto grau
96	49	masculino	Branca	Neoplasia intraepitelial de alto grau
97	76	masculino	Branca	Carcinoma epidermóide invasivo
98	79	masculino	Branca	Neoplasia intraepitelial de alto grau
99	63	feminino	Branca	Carcinoma epidermóide superficialmente invasivo
100	58	masculino	Branca	Carcinoma epidermóide superficialmente invasivo

Anexo 2 - Resultados imunoistoquímicos em neoplasia intraepitelial de baixo grau.

Casos	Terço inferior					Terço médio					Terço superior				
	Claudinas					Claudinas					Claudinas				
	1	3	5	7	11	1	3	5	7	11	1	3	5	7	11
2	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
11	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
15	-	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	-
16	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
32	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
39	+	+	+	-	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-	-
40	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+
41	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-
44	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	-	-	-
46	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
47	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-
54	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
75	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
76	-	-	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
78	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
79	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
80	-	+	+	+	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
83	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
86	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	-	+	-	-
87	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
88	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-	-
91	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
93	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
94	-	+	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-

Anexo 3 - Resultados imunoistoquímicos em neoplasia intraepitelial de alto grau.

	Terço inferior					Terço médio					Terço superior				
	Claudinas					Claudinas					Claudinas				
Casos	1	3	5	7	11	1	3	5	7	11	1	3	5	7	11
1	-	-	+	-	-	+	-	+	-	+	+	+	+	+	+
3	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
4	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
5	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
6	-	-	+	-	+	+	-	+	+	+	+	+	+	-	+
7	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	-	+
8	-	-	+	-	+	+	-	+	-	+	+	+	+	+	-
9	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-	+	+	+	+	-
10	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+	+	+	-	-
13	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+	+	+	-	+	-
18	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+	+	+	+	+	-
23	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	+	+	-
29	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-
31	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-
35	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	-	-
37	-	-	+	-	+	+	+	+	-	-	+	+	+	-	-
42	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+	+	-	+	-

Anexo 5 - Resultados imunoistoquímicos em carcinoma epidermóide invasivo

	Periferia das ilhotas tumorais					Áreas centrais				
	Claudinas					Claudinas				
Casos	1	3	5	7	11	1	3	5	7	11
25	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
26	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-
33	-	-	+	-	-	+	+	+	+	-
38	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
43	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
45	-	-	+	-	-	+	+	+	-	-
48	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+
50	-	-	-	-	+	+	+	+	-	+
55	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+
62	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+
65	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+
66	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+
67	-	-	+	-	-	+	+	+	+	+
68	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+
69	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+
70	-	-	+	-	-	-	+	+	-	+
73	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+
74	-	-	+	-	+	+	+	+	-	+
97	-	-	+	-	+	+	+	+	+	+

Anexo 6 - Tabela testes estatísticos.

Claudina-1				
		Marcação		
Tipo de neoplasia	-	+	Total	
NIBG terço inferior	16 (66,7%)	8 (33,3%)	24 (100%)	
NIAG terço inferior	28 (100%)	1 (3,4%)	29 (100%)	
Total	44 (83 %)	9 (17%)	53 (100%)	
qui-quadrado = 8,320				
Valor mínimo qui-quadrado = 4,08				
p = 0,004 / Teste de Fisher = 0,007				
		Marcação		
Tipo de neoplasia	-	+	Total	
NIBG terço inferior	16 (66,7%)	8 (33,3%)	24 (100%)	
CESI fronte de invasão	28 (100%)	0	28 (100%)	
Total	44 (83 %)	8 (15,4%)	52 (100%)	
qui-quadrado = 11,030				
Valor mínimo qui-quadrado = 3,69				
p = 0,001 / Teste de Fisher = 0,001				
		Marcação		
Tipo de neoplasia	-	+	Total	
NIBG terço inferior	16 (66,7%)	8 (33,3%)	24 (100%)	
CEI periferia tumoral	19 (100%)	0	19 (100%)	
Total	35 (81,4%)	8 (18,6%)	43 (100%)	
qui-quadrado = 7,781				
Valor mínimo qui-quadrado = 3,53				
p = 0,005 / Teste de Fisher = 0,006				
		Marcação		
Tipo de neoplasia	-	+	Total	
NIAG terço inferior	28 (100%)	1 (3,4%)	29 (100%)	
CESI fronte de invasão	28 (100%)	0	28 (100%)	
Total	56 (98,2%)	1 (1,8%)	57 (100%)	
qui-quadrado = 0,983				
Valor mínimo qui-quadrado = 0,49				
p = 0,322 / Teste de Fisher = 1,000				
		Marcação		
Tipo de neoplasia	-	+	Total	
NIAG terço inferior	28 (100%)	1 (3,4%)	29 (100%)	
CEI periferia tumoral	19 (100%)	0	19 (100%)	
Total	47 (97,9%)	1 (2,1%)	48 (100%)	
qui-quadrado = 0,669				
Valor mínimo qui-quadrado = 0,40				
p = 0,413/ Teste de Fisher = 1,000				

		Marcação			
	Tipo de neoplasia	-	+	Total	
	CESI frente de invasão	28 (100%)	0	28 (100%)	
	CEI periferia tumoral	19 (100%)	0	19 (100%)	
	Total	47 (100%)	0	47 (100%)	
	qui-quadrado = NA				
	Valor mínimo qui-quadrado = NA				
	p = NA				
Claudina -3	Claudina-3				
		Marcação			
		Tipo de neoplasia	-	+	Total
		NIBG terço inferior	13 (54,2%)	11 (45,8%)	24 (100%)
		NIAG terço inferior	29 (100%)	0	29 (100%)
		Total	42 (79,2%)	11 (20,8%)	53 (100%)
		qui-quadrado = 16,773			
		Valor mínimo qui-quadrado = 4,98			
		p = 0,000 / Teste de Fisher = 0,000			
			Marcação		
		Tipo de neoplasia	-	+	Total
		NIBG terço inferior	13 (54,2%)	11 (45,8%)	24 (100%)
		CESI frente de invasão	28 (100%)	0	28 (100%)
		Total	41 (78,8%)	11 (21,2%)	52 (100%)
		qui-quadrado = 16,276			
		Valor mínimo qui-quadrado = 5,08			
		p = 0,000 / Teste de Fisher = 0,000			
		Marcação			
	Tipo de neoplasia	-	+	Total	
	NIBG terço inferior	13 (54,2%)	11 (45,8%)	24 (100%)	
	CEI periferia tumoral	19 (100%)	0	19 (100%)	
	Total	32 (74,4%)	11 (25,6%)	43 (100%)	
	qui-quadrado = 11,702				
	Valor mínimo qui-quadrado = 4,86				
	p = 0,001 / Teste de Fisher = 0,001				
Claudina -3		Marcação			
		Tipo de neoplasia	-	+	Total
		NIAG terço inferior	29 (100%)	0	29 (100%)
		CESI frente de invasão	28 (100%)	0	28 (100%)
		Total	57 (100%)	0	57 (100%)
		qui-quadrado = NA			
		Valor mínimo qui-quadrado = NA			
		p = NA			

	Marcação			
	Tipo de neoplasia	-	+	Total
	NIAG terço inferior	29 (100%)	0	29 (100%)
	CEI periferia tumoral	19 (100%)	0	19 (100%)
	Total	48 (100%)	0	48 (100%)
	qui-quadrado = NA			
	Valor mínimo qui-quadrado = NA			
	p = NA			
	Marcação			
	Tipo de neoplasia	-	+	Total
CESI fronte de invasão	28 (100%)	0	28 (100%)	
CEI periferia tumoral	19 (100%)	0	19 (100%)	
Total	47 (100%)	0	47 (100%)	
qui-quadrado = NA				
Valor mínimo qui-quadrado = NA				
p = NA				
Claudina-5	Claudina-5			
	Marcação			
	Tipo de neoplasia	-	+	Total
	NIBG terço inferior	2 (8,3%)	22 (91,7%)	24 (100%)
	NIAG terço inferior	0	29 (100%)	29 (100%)
	Total	2 (3,8%)	51 (96,2%)	53 (100%)
	qui-quadrado = 2,511			
	Valor mínimo qui-quadrado = 0,91			
	p = 0,113 / Teste de Fisher = 0,200			
	Marcação			
	Tipo de neoplasia	-	+	Total
	NIBG terço inferior	2 (8,3%)	22 (91,7%)	24 (100%)
	CESI fronte de invasão	0	28 (100%)	28 (100%)
	Total	2 (3,8%)	50 (96,2%)	52 (100%)
	qui-quadrado = 2,427			
	Valor mínimo qui-quadrado = 0,92			
	p = 0,119 / Teste de Fisher = 0,208			
Marcação				
Tipo de neoplasia	-	+	Total	
NIBG terço inferior	2 (8,3%)	22 (91,7%)	24 (100%)	
CEI periferia tumoral	1 (5,3%)	18 (94,7%)	19 (100%)	
Total	3 (7,0%)	40 (93%)	43 (100%)	
qui-quadrado = 0,154				
Valor mínimo qui-quadrado = 1,33				
p = 0,695 / Teste de Fisher = 1,000				

Claudina-5	Marcação		
	Tipo de neoplasia	-	+
	NIAG terço inferior	0	29 (100%)
	CESI frente de invasão	0	28 (100%)
	Total	0	57 (100%)
	qui-quadrado = NA		
	Valor mínimo qui-quadrado = NA		
	p = NA		
	Marcação		
	Tipo de neoplasia	-	+
	NIAG terço inferior	0	29 (100%)
	CEI periferia tumoral	1 (5,3%)	18 (94,7%)
	Total	1 (5,3%)	47 (97,9%)
	qui-quadrado = 1,559		
	Valor mínimo qui-quadrado = 0,40		
	p = 0,212 / Teste de Fisher = 0,396		
	Marcação		
Tipo de neoplasia	-	+	
CESI frente de invasão	0	28 (100%)	
CEI periferia tumoral	1 (5,3%)	18 (94,7%)	
Total	1 (2,1%)	46 (97,9%)	
chi-quadrado = 1,506			
Valor mínimo qui-quadrado = 0,40			
p = 0,220 / Teste de Fisher = 0,404			
Claudina-7	Claudina-7		
	Marcação		
	Tipo de neoplasia	-	+
	NIBG terço inferior	15 (62,5%)	9 (37,5%)
	NIAG terço inferior	27 (93,1%)	2 (6,9%)
	Total	42 (79,2%)	11 (20,8%)
	qui-quadrado = 7,478		
	Valor mínimo qui-quadrado = 4,98		
	p = 0,006 / Teste de Fisher = 0,015		
	Marcação		
	Tipo de neoplasia	-	+
	NIBG terço inferior	15 (62,5%)	9 (37,5%)
	CESI frente de invasão	25 (89,3%)	3 (10,7%)
	Total	40 (76,9%)	12 (23,1%)
	qui-quadrado = 5,223		
	Valor mínimo qui-quadrado = 5,54		
	p = 0,022		

		Marcação		
	Tipo de neoplasia	-	+	Total
	NIBG terço inferior	15 (62,5%)	9 (37,5%)	24 (100%)
	CEI periferia tumoral	19 (100%)	0	19 (100%)
	Total	34 (79,1%)	9 (20,9%)	43 (100%)
	qui-quadrado = 9,011			
	Valor mínimo qui-quadrado = 3,98			
	p = 0,003 / Teste de Fisher = 0,002			
		Marcação		
	Tipo de neoplasia	-	+	Total
	NIAG terço inferior	27 (93,1%)	2 (6,9%)	29 (100%)
	CESI fronte de invasão	25 (89,3%)	3 (10,7%)	28 (100%)
	Total	52 (91,2%)	5 (8,8%)	57 (100%)
	qui-quadrado = 0,259			
	Valor mínimo qui-quadrado = 2,46			
	p = 0,610 / Teste de Fisher = 0,670			
		Marcação		
	Tipo de neoplasia	-	+	Total
	NIAG terço inferior	27 (93,1%)	2 (6,9%)	29 (100%)
	CEI periferia tumoral	19 (100%)	0	19 (100%)
	Total	46 (95,8%)	2 (4,2%)	48 (100%)
	qui-quadrado = 1,367			
	Valor mínimo qui-quadrado = 0,79			
	p = 0,242 / Teste de Fisher = 0,512			
		Marcação		
	Tipo de neoplasia	-	+	Total
	CESI fronte de invasão	25 (89,3%)	3 (10,7%)	28 (100%)
	CEI periferia tumoral	19 (100%)	0	19 (100%)
	Total	44 (93,6%)	3 (6,4%)	47 (100%)
	qui-quadrado = 2,175			
	Valor mínimo qui-quadrado = 1,21			
	p = 0,140 / Teste de Fisher = 0,262			
Claudina-11	Claudina-11			
		Marcação		
	Tipo de neoplasia	-	+	Total
	NIBG terço inferior	2 (8,3%)	22 (91,7%)	24 (100%)
	NIAG terço inferior	6 (20,7%)	23 (79,3%)	29 (100%)
	Total	8 (15,1%)	45 (84,9%)	53 (100%)
	chi-quadrado = 1,564			
	Valor mínimo qui-quadrado = 3,62			
	p = 0,211 / Teste de Fisher = 0,269			

	Marcação		
	Tipo de neoplasia	-	+
	NIBG terço inferior	2 (8,3%)	22 (91,7%)
	CESI frente de invasão	19 (67,9%)	9 (32,1%)
	Total	21 (40,4%)	31 (59,6%)
	chi-quadrado = 19,018		
	Valor mínimo qui-quadrado = 9,69		
	p = 0,000 / Teste de Fisher = 0,000		
	Marcação		
	Tipo de neoplasia	-	+
NIBG terço inferior	2 (8,3%)	22 (91,7%)	
CEI periferia tumoral	15 (78,9%)	4 (21,1%)	
Total	17 (39,5%)	26 (60,5%)	
chi-quadrado = 22,120			
Valor mínimo qui-quadrado = 7,51			
p = 0,000			
Claudina -11	Marcação		
	Tipo de neoplasia	-	+
	NIAG terço inferior	6 (20,7%)	23 (79,3%)
	CESI frente de invasão	19 (67,9%)	9 (32,1%)
	Total	25 (43,9%)	32 (56,1%)
	chi-quadrado = 12,871		
	Valor mínimo qui-quadrado = 12,28		
	p = 0,000		
	Marcação		
	Tipo de neoplasia	-	+
NIAG terço inferior	6 (20,7%)	23 (79,3%)	
CEI periferia tumoral	15 (78,9%)	4 (21,1%)	
Total	21 (43,8%)	27 (56,3%)	
chi-quadrado = 15,831			
Valor mínimo qui-quadrado = 8,31			
p = 0,000			
Marcação			
Tipo de neoplasia	-	+	
CESI frente de invasão	19 (67,9%)	9 (32,1%)	
CEI periferia tumoral	15 (78,9%)	4 (21,1%)	
Total	34 (72,3%)	13 (27,7%)	
chi-quadrado = 0,696			
Valor mínimo qui-quadrado = 5,26			
p = 0,404 / Teste de Fisher = 0,515			

Legendas:

NIBG: neoplasia intraepitelial de baixo grau;

NIAG: neoplasia intraepitelial de alto grau;

CESI: carcinoma epidermóide superficialmente invasivo;

CEI: carcinoma epidermóide invasivo;

Sinal (-): ausência de marcação;

Sinal (+): positividade de marcação;

Teste qui-quadrado de Pearson

Valor mínimo qui-quadrado / Valor mínimo esperado para o teste;

Valor do teste qui-quadrado de Pearson = NA (não aplicável);

Valor de $p < 0,05$ estatisticamente significativo;

Valor de $p = NA$ (não aplicável);

Valor do Teste Exato de Fischer $p < 0,05$ estatisticamente significativo.