

M 2014

# **AS PROTEÍNAS DO *CHECKPOINT* MITÓTICO E O CARCINOMA ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS: NÍVEIS DE EXPRESSÃO E VALOR PROGNÓSTICO**

JOSÉ HENRIQUE CARVALHO TEIXEIRA

DISSERTAÇÃO DE MESTRADO APRESENTADA

AO INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOMÉDICAS ABEL SALAZAR

DA UNIVERSIDADE DO PORTO EM

ONCOLOGIA MOLECULAR



JOSÉ HENRIQUE CARVALHO TEIXEIRA

**AS PROTEÍNAS DO *CHECKPOINT* MITÓTICO E O CARCINOMA  
ORAL DE CÉLULAS ESCAMOSAS: NÍVEIS DE EXPRESSÃO E  
VALOR PROGNÓSTICO**

Dissertação de candidatura ao grau de Mestre em Oncologia Molecular submetida ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar da Universidade do Porto.

Orientador

Doutor Hassan Bousbaa

Professor Associado da Cooperativa de Ensino Superior Politécnico e Universitário (CESPU)

Diretor do Instituto de Investigação e Formação Avançada em Ciências e Tecnologias da Saúde (IINFACTS) - CESPU

Investigador integrado no Centro de Química Medicinal da Universidade do Porto (CEQUIMED-UP)

Co-orientador

Doutor Luís Monteiro

Professor Auxiliar convidado da Cooperativa de Ensino Superior Politécnico e Universitário (CESPU)

Investigador do Instituto de Investigação e Formação Avançada em Ciências e Tecnologias da Saúde (IINFACTS) - CESPU



## PUBLICAÇÕES

No âmbito do presente trabalho foi publicado um artigo de revisão e realizada uma comunicação em forma de painel, abaixo citados:

**Teixeira, J.H.**, P.M. Silva, R.M. Reis, I.M. Moura, S. Marques, J. Fonseca, L.S. Monteiro, and H. Bousbaa. 2014. An overview of the spindle assembly checkpoint status in oral cancer. *BioMed research international*. 2014:145289. doi: 10.1155/2014/145289

**Teixeira, J.H.**, Silva, P., Garcez, F., Delgado, M.L., Barbas do Amaral, J., Lopes, C., Monteiro, L.S. and Hassan Bousbaa (2014). Evaluating the prognostic value of BubR1 and Mad2 mitotic checkpoint proteins expression in oral squamous cell carcinoma. International Conference on Microscopy and Microanalysis - XLVII Congress of the Portuguese Microscopy Society, November 2014, Oporto, Portugal.



*No fine work can be done without concentration  
and self-sacrifice and toil and doubt”.*

Max Beerbohm



## AGRADECIMENTOS

Mais uma etapa que termina e muitos são os que merecem o meu agradecimento e que tornaram possível a conclusão desta dissertação, seja pela disponibilização de meios, troca de conhecimento e palavras de amizade, incentivo e motivação.

À Universidade do Porto, na pessoa do seu Magnífico Reitor, Professor Doutor Sebastião Feyo de Azevedo, manifesto o meu reconhecimento por toda a disponibilidade e facilidades concebidas durante a realização desta dissertação de Mestrado.

Ao Instituto de Ciências Biomédicas Abel Salazar, na pessoa do seu Presidente António Sousa Pereira e à Directora do Mestrado em Oncologia, Professora Doutora Maria Berta Silva, assim como a todo o corpo docente, o meu reconhecimento pelo apoio prestado durante o ciclo de estudos.

Ao Centro Hospitalar do Porto – Hospital de Santo António, nomeadamente ao Departamento de Patologia e Serviço de Anatomia Patológica, em especial ao Professor Doutor Carlos Lopes, o meu mais sincero agradecimento pela colaboração, parceria e disponibilização da amostra para a realização do presente trabalho.

Ao Professor Doutor Fernando Oliveira Torres e ao Professor Doutor José Manuel Barbas do Amaral, um agradecimento especial pela colaboração, esclarecimentos e parceria estabelecida no decorrer deste trabalho.

À CESPU, na pessoa do seu Presidente António Manuel de Almeida dias, e em particular ao Serviço de Anatomia Patológica pela disponibilização das instalações para realização de parte do trabalho presente nesta dissertação.

Um agradecimento muito especial ao Professor Doutor Hassan Bousbaa, meu orientador, pela oportunidade que me proporcionou, por todo conhecimento transmitido, pela partilha de novas ideias, por todo o apoio e acima de tudo pela forma presente, estimulante, contagiante e dedicada como supervisionou o meu trabalho. O meu mais sincero obrigado por tudo!

Ao Professor Doutor Luís Monteiro, meu co-orientador, pela oportunidade e confiança depositada em mim e no meu trabalho, por toda a ajuda dispensada, pela troca de conhecimento, pelas palavras de incentivo e motivação, e principalmente por estar presente e encaminhar-me em todo o meu percurso académico.

À Patrícia Silva um agradecimento muito especial, pelo incondicional apoio que me prestou, por todas as conversas científicas sobre os nossos trabalhos, que em muito facilitaram a compreensão e construção da dissertação, pelo companheirismo, por todas as palavras de motivação e pela boa-disposição que incutiu em todo o trabalho desenvolvido. Obrigado por muitas vezes seres a minha força motriz e acima de tudo pela amiga que te tornaste!

À Rita Reis, pelas dúvidas esclarecidas, pelo conhecimento científico partilhado e segurança transmitida aquando a minha chegada ao grupo e laboratório.

À Fernanda Garcez, pela preciosa ajuda e disponibilidade prestada, assim como pelo sorriso com que sempre me recebeu.

Às minhas colegas de laboratório, Ana Henriques, Joana Fonseca, Sandra Marques, Patrícia Duarte e Joana Nunes, pela partilha, auxílio e camaradagem em todos os momentos desta etapa.

Ao meu núcleo de amigos, por tornarem esta etapa mais simples, por serem ouvintes dos meus desabafos, lamúrias e inseguranças, pelo alento dado e carinho demonstrado, mas acima de tudo por estarem presentes, sempre, em todos os momentos da nossa vida e percurso em comum. Chorámos, rimos e festejamos sempre com o pensamento no outro – isto é a amizade!

Por último, aos que são a minha base estrutural – a minha Família. Ao meu irmão e à Liliana pelas palavras de amizade, conforto e ajuda; às minhas princesas Inês e Íris pelas gargalhadas que me proporcionar, nos momentos de cansaço e em que simplesmente não me apetecia sorrir; Aos meus pais, por nunca questionarem as minhas escolhas e disponibilizarem tudo o que têm ao seu alcance para que prossiga e lute pelo futuro que ambiciono. Pela segurança transmitida, pelas palavras reconfortantes em todos os momentos de desânimo, por todos os ensinamentos transmitidos e por sempre se mostrarem orgulhosos pelas pequenas conquistas alcançadas. A vós devo tudo, o que sou e o que com o vosso exemplo me tornarei!

## ABSTRACT

The mitotic checkpoint is compromised in several types of cancer, being in many cases, pointed out as a possible cause for aneuploidy and carcinogenesis. This control mechanism, in normal conditions, assures the fidelity of the chromosome segregation in each cellular division, and its mechanism includes the complex constituted by BubR1, Mad2 and Bub3 which inhibit Cdc20 to activate the anaphase promoting complex/cyclosome (APC/C). This way, anaphase is prevented until all the chromosomes have established a bipolar link with the microtubules and, thus, all are aligned in the metaphase plate.

The alteration in the expression of proteins intervening in this process has been already reported in several types of cancer and has been linked to a bad prognosis factor. However, little is known about the expression of these proteins in oral squamous cell carcinoma (OSCC). Given this, with the present work, we propose to evaluate by immunohistochemistry the expression of BubR1, Mad2 and Bub3 proteins in histological samples derived from 65 OSCC patients together with the clinical-pathological meaning of this protein expression as well as its prognosis value.

Our results demonstrated increased levels of BubR1 ( $54.9 \pm 22.1$ ) and Mad2 ( $64.9 \pm 18.70$ ) expression in OSCC, comparing to normal tissue ( $8.5 \pm 1.58$ ) and ( $46.85 \pm 14.97$ ), respectively. We obtained a significant association between the expression of BubR1 and Mad2 proteins (regarding the intensity of labeling), and between these proteins (regarding the intensity and labeling index) and Ki-67 marker. Regarding the intensity of protein labeling, we obtained significant results with the size ( $p=0,040$ ) and tumor stage ( $p=0,011$ ), in the case of BubR1, and the mean patient age ( $p=0,016$ ) with Mad2 protein intensity. In the univariable analysis, patients with bigger sized tumor ( $p=0,026$ ) and more intense tumors ( $p<0,001$ ) showed lower survival rate. On the other hand, the multivariable analysis identified BubR1 intensity as a factor for independent prognosis ( $p=0,030$ ), suggesting this protein as a prognosis factor for the survival rate of OSCC patients. As to Bub3, its expression was not amenable to evaluation using our current approach.

In conclusion, our work demonstrated and characterized for the first time, the expression of Mad2 in histological OSCC patient samples using immunohistochemistry. Increased levels of Mad2 expression were observed by cytoplasmatic and nuclear staining, with high intensity and peripheral distribution in OSCC. Nevertheless this expression was not associated with patient prognosis. On the other hand, BubR1 expression, evaluated by the intensity of the labeling, is suggested as a noteworthy molecular marker for prognosis in OSCC.



## RESUMO

O *checkpoint* mitótico está comprometido em vários tipos de cancro, sendo muitas vezes apontado como uma possível causa para a aneuploidia e carcinogénese. Este mecanismo de controlo, em condições normais, assegura a fidelidade de segregação cromossómica a cada divisão celular, envolvendo o seu mecanismo de ação um complexo constituído pelas proteínas BubR1, Mad2 e Bub3 que impedem a proteína Cdc20 de ativar o complexo promotor da anafase/ciclossoma (APC/C). Desta forma, a anafase é inibida até que todos os cromossomas estabeleçam uma ligação bipolar com os microtúbulos e se encontrem alinhados na placa metafásica.

A alteração do nível de expressão das proteínas, intervenientes neste mecanismo, tem vindo a ser reportada em vários tipos de cancro, e apontada como um fator de mau prognóstico. No entanto, muito pouco é conhecido acerca da expressão destas proteínas no OSCC. Neste sentido, com o presente trabalho, propusemo-nos estudar por imunohistoquímica a expressão das proteínas BubR1, Mad2 e Bub3, em tecidos histológicos de 65 pacientes com OSCC, assim como o significado clínico-patológico e o potencial valor de prognóstico desta expressão.

Os nossos resultados revelaram um nível de expressão aumentado das proteínas BubR1 ( $54,9 \pm 22,10$ ) e Mad2 ( $64,9 \pm 18,70$ ), relativamente ao tecido normal ( $8,5 \pm 1,58$ ) e ( $46,85 \pm 14,97$ ), respetivamente. Nós obtivemos uma associação significativa entre as proteínas BubR1 e Mad2 (relativamente à intensidade de marcação), e entre estas proteínas (relativamente à intensidade e extensão de marcação) e o marcador Ki-67. No que respeita à associação da intensidade da marcação das proteínas, esta foi significativa com o tamanho ( $p=0,040$ ) e estadio do tumor ( $p=0,011$ ), no caso da proteína BubR1, e a idade média dos pacientes ( $p=0,016$ ) com a intensidade da proteína Mad2. Na análise univariada, os pacientes com tumores com uma maior extensão ( $p=0,026$ ) e intensidade ( $p<0,001$ ) mostraram uma menor taxa de sobrevivência. Por outro lado a análise multivariada identificou a intensidade da BubR1 como um fator de prognóstico independente ( $p=0,030$ ), sugerindo esta como um fator de prognóstico da sobrevida dos pacientes com OSCC. Quanto à proteína Bub3, não foi possível avaliar a sua expressão com a nossa abordagem atual.

Em conclusão, o nosso estudo demonstrou e caracterizou pela primeira vez, a expressão da proteína Mad2 em amostras histológicas de OSCC através da imunohistoquímica. A expressão aumentada da proteína Mad2 foi observada por uma marcação citoplasmática e nuclear, com uma intensidade forte e distribuição periférica no OSCC. No entanto, esta expressão não apresentou associação com o prognóstico dos

pacientes. Por outro lado, a expressão da proteína BubR1, avaliada pela intensidade da marcação, é sugerida como um potencial marcador molecular de prognóstico de OSCC.

## ÍNDICE

### I. INTRODUÇÃO

<b>1. CANCRO DA CAVIDADE ORAL: UM PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA .....</b>	<b>1</b>
1.1 OSCC: PONTO DE SITUAÇÃO EM PORTUGAL .....	3
1.2 FATORES DE RISCO .....	4
<b>2. CARCINOGENÉSE DO OSCC: ALTERAÇÕES MOLECULARES E HISTOLÓGICAS .....</b>	<b>5</b>
2.1 ALTERAÇÕES MOLECULARES .....	5
2.2 ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS .....	6
<b>3. MITOSE E MECANISMO DE CONTROLO .....</b>	<b>8</b>
3.1 MITOSE .....	8
3.2 CHECKPOINT MITÓTICO: DEFINIÇÃO, FUNÇÃO E ATIVAÇÃO .....	10
3.3 MECANISMO MOLECULAR DE AÇÃO .....	11
<b>4. EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS DO CHECKPOINT MITÓTICO NO OSCC.....</b>	<b>14</b>

### II. OBJETIVOS 19

### III. MATERIAL E MÉTODOS

<b>1. PACIENTES E SELEÇÃO DA AMOSTRA.....</b>	<b>21</b>
<b>2. PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO.....</b>	<b>22</b>
<b>3. VALIDAÇÃO DO DIAGNÓSTICO.....</b>	<b>22</b>
<b>4. IMUNOHISTOQUÍMICA.....</b>	<b>22</b>
<b>5. AVALIAÇÃO DA IMUNOHISTOQUÍMICA .....</b>	<b>24</b>
<b>6. AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DE IMAGENS.....</b>	<b>24</b>
<b>7. ANÁLISE ESTATÍSTICA .....</b>	<b>24</b>

### IV. RESULTADOS E DISCUSSÃO

<b>1. DESCRIÇÃO DA AMOSTRA EM ESTUDO .....</b>	<b>27</b>
<b>2. EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS BUBR1, MAD2, BUB3 E KI-67 NO OSCC .....</b>	<b>28</b>
2.1 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA BUBR1 .....	28
2.2 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA MAD2 .....	29
2.3 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA BUB3 .....	34
2.4 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA KI-67 .....	35
<b>3. RELAÇÃO DAS PROTEÍNAS BUBR1 E MAD2 NO OSCC .....</b>	<b>36</b>
<b>4. AS PROTEÍNAS BUBR1 E MAD2 E A SUA CORRELAÇÃO COM O MARCADOR DE PROLIFERAÇÃO KI-67.....</b>	<b>36</b>

<b>5. EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS BUBR1E MAD2 E A SUA CORRELAÇÃO COM AS CARACTERÍSTICAS CLINICO-PATOLÓGICAS NO OSCC.....</b>	<b>37</b>
<b>6. EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS BUBR1 E MAD2 E O VALOR PROGNÓSTICO NO OSCC .....</b>	<b>41</b>
<b>V. CONCLUSÕES</b>	<b>49</b>
<b>VI. PERSPETIVAS FUTURAS</b>	<b>51</b>
<b>VII. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b>	<b>53</b>

## ÍNDICE DE FIGURAS

**Figura 1 – Taxa de incidência do cancro da cavidade oral por sexo e área geográfica, estandardizada pela idade.** Fonte: (Jemal *et al.*, 2011).....3

**Figura 2 – Representação esquemática das diferentes etapas da mitose.** A cromatina duplicada na interfase condensa-se, na profase, em cromossomas definidos (a azul) e constituídos por duas cromátidas unidas pelo centrómero e tornam-se visíveis os cinetocoros (a vermelho). Na prometáfase após a quebra do invólucro nuclear inicia-se a formação e ligação dos microtúbulos, de pólos opostos, aos cinetocoros, seguido do deslocamento dos cromossomas para o plano equatorial. Os cromossomas atingem a sua condensação máxima na metafase e encontram-se todos alinhados e bi-orientados na placa equatorial. Na anafase dá-se a perda da coesão entre as cromátidas e existe a sua ascensão para os pólos. Por fim, na telofase existe a descondensação da cromatina e reorganiza-se o invólucro nuclear. Adaptado de Cheeseman *et al.*, 2008.....9

**Figura 3 – Modelos da via de sinalização do checkpoint mitótico.** (A) De acordo com o primeiro modelo, a presença de cinetocoros não ligados ou incorretamente ligados ativa o *checkpoint* (*checkpoint on*). Ao nível do cinetocoro o complexo Mad1-“*closed*”-Mad2 gera um sinal que se difunde, convertendo a “*open*”-Mad2 em “*closed*”-Mad2, que em associação com a Bub3, BubR1 e Cdc20 forma o complexo *checkpoint* mitótico (MCC). O MCC sequestra a proteína Cdc20 impedindo a ativação do complexo promotor da anafase/ciclossoma (APC/C). Quando todos os cromossomas estão corretamente ligados o MCC separa-se (*checkpoint off*) e a proteína Cdc20 está livre para ativar o APC/C e este degradar as proteínas securina e a ciclina B. Desta forma, a separase fica livre para degradar as coesinas, permitindo a separação das cromátidas irmãs, enquanto a degradação da ciclina B permite a saída da mitose. (B) De acordo com o segundo modelo, a “*closed*”-Mad2 promove uma alteração conformacional da proteína Cdc20, permitindo a sua ligação com o N-terminal da proteína BubR1, ligada à proteína Bub3, mantendo o APC/C inativo, impedindo assim o início da anafase. Uma vez formado este complexo a “*closed*”-Mad2 é libertada e volta ao citosol. Adaptado de Teixeira *et al.*, 2014. ....13

**Figura 4 - Representação esquemática do desenho experimental delineado.** .....21

**Figura 5 – Expressão das proteínas BubR1 e Mad2 na mucosa oral normal.** As proteínas BubR1 e Mad2 foram detetadas por imunohistoquímica através dos anticorpos monoclonais ratinho anti-BubR1 e ratinho anti-Mad2 e o contraste realizado com hematoxilina. (A) Marcação citoplasmática da proteína BubR1, 10x. (B) Marcação nuclear da proteína Mad2, 10x. A escala (20 µm) é indicada no canto inferior esquerdo de cada imagem.....32

**Figura 6 – Expressão das proteínas BubR1 e Mad2 no OSCC.** As proteínas BubR1 e Mad2 foram detetadas por imunohistoquímica através dos anticorpos monoclonais ratinho anti-BubR1 e ratinho anti-Mad2 e o contraste realizado com hematoxilina. (A) Marcação citoplasmática da proteína BubR1 com intensidade forte e distribuição periférica no OSCC, 10x. (B) Marcação citoplasmática e nuclear da proteína Mad2 com intensidade

forte e distribuição periférica no OSCC, 10x. A escala (20µm) é indicada no canto inferior esquerdo de cada imagem.....33

**Figura 7 – Expressão da proteína Bub3 na mucosa oral normal e no OSCC.** A proteína Bub3 foi detetada por imunohistoquímica com o anticorpo monoclonal ratinho anti-Bub3 e o contraste realizado com hematoxilina. Marcação nuclear da proteína na totalidade das células da mucosa oral normal (A), células tumorais (B) e na maioria das células constituintes do tecido adjacente com uma intensidade moderada, 10x. A escala (20µm) é indicada no canto inferior esquerdo da figura. ....34

**Figura 8 – Expressão da proteína Ki-67 no OSCC.** A proteína Ki-67 foi detetada por imunohistoquímica com o anticorpo ratinho anti-Ki-67 e o contraste realizado com hematoxilina. Expressão nuclear da proteína Ki-67 em menos de 50% (A) e mais de 50% das células tumorais (B),400x. ....35

**Figura 9 – Curva de Kaplan-Meier de acordo com a extensão da marcação da proteína BubR1.** A extensão da marcação da proteína BubR1  $\geq 75\%$  apresentou uma menor *Cancer-specific survival* dos pacientes com OSCC.....44

**Figura 10 – Curva de Kaplan-Meier de acordo com a intensidade da marcação da proteína BubR1.** A intensidade forte da marcação da proteína BubR1 apresentou uma menor *Cancer-specific survival* dos pacientes com OSCC.....45

## ÍNDICE DE TABELAS

<b>Tabela 1</b> – Expressão das proteínas do checkpoint mitótico no OSCC. Adaptado de Teixeira <i>et al.</i> , 2014. ....	16
<b>Tabela 2</b> – Anticorpos primários para a detecção imunohistoquímica das proteínas BubR1, Mad2, Bub3 e Ki-67. Informação sobre o clone, empresa de aquisição e diluições aferidas para os diferentes anticorpos. ....	23
<b>Tabela 3</b> – Características clinico-patológicas dos pacientes com OSCC em estudo (n=65). ....	27
<b>Tabela 4</b> – Análise dos parâmetros intensidade, extensão, localização e distribuição da marcação imunohistoquímica das proteínas BubR1 e Mad2 nos OSCC em estudo. ....	31
<b>Tabela 5</b> – Associação entre os parâmetros de extensão e intensidade da expressão da proteína BubR1 e as características clinico-patológicas dos pacientes com OSCC. ....	39
<b>Tabela 6</b> – Associação entre os parâmetros de extensão e intensidade da expressão da proteína Mad2 e as características clinico-patológicas dos pacientes com OSCC. ....	40
<b>Tabela 7</b> – Análise univariada da <i>cancer-specific survival</i> (CSS) e <i>recurrence-free survival</i> (RFS) a 3 anos, de acordo com as características clinico-patológicas e a expressão da BubR1 e Mad2 no OSCC. ....	43
<b>Tabela 8</b> – Análise multivariada da <i>Cancer-specific survival</i> nas variáveis, com efeito independente significativo, relativamente à idade média, modalidade terapêutica, estadió, T <i>status</i> , N <i>status</i> e intensidade de BubR1 no OSCC. ....	46
<b>Tabela 9</b> – Análise multivariada da <i>Reccurrence-free survival</i> das variáveis, com efeito independente significativo, relativamente ao género, modalidade terapêutica e N <i>status</i> no OSCC. ....	46



## LISTA DE ABREVIATURAS

µm	Micrómetro
ADN	Ácido desoxirribonucleico
APC/C	Complexo promotor da anafase/ciclossoma
Bub	<i>Budding uninhibited by benzimidazole</i>
BubR1	<i>Bub1-related protein</i>
Cdc20	<i>Cell division cycle protein 20</i>
Cdh1	Caderina 1
C-Mad2	<i>Closed-Mad2</i>
CSS	<i>Cancer-specific survival</i>
DAB	3, 3' - Diaminobenzidina
Cdks	Cinases ciclina-dependentes
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGFR	<i>Epidermal growth factor receptor</i>
H <sub>2</sub> O <sub>2</sub>	Peróxido de hidrogénio
HNC	<i>Head and neck carcinoma</i>
M	Molar
Mad	<i>Mitotic-arrest deficient</i>
MCC	Complexo do <i>checkpoint</i> mitótico
mM	Milimolar
Mps1	<i>Multipolar spindle-1</i>
°C	Grau Celsius
O-Mad2	<i>Open-Mad2</i>
OSCC	<i>Oral squamous cell carcinoma</i>
PBS	<i>Phosphate buffer saline</i>
Rb	Retinoblastoma
RFS	<i>Recurrence-free survival</i>
siRNA	<i>small interfering RNA</i>
vs	<i>Versus</i>



**CAPÍTULO I.**  
**INTRODUÇÃO**

---

O carcinoma oral de células escamosas (*oral squamous cell carcinoma*, OSCC), tipo histológico mais frequente do cancro da cavidade oral, continua a ser um problema de saúde pública. Apesar dos avanços nos meios de diagnóstico e terapêutica a taxa de sobrevivência dos pacientes não se alterou significativamente nas últimas décadas (Neville and Day, 2002; Warnakulasuriya, 2009). Neste sentido, a compreensão das vias moleculares envolvidas no processo de carcinogénese do OSCC é crucial e pode levar à descoberta de novos marcadores biológicos capazes de identificar e estratificar pacientes, de acordo com a agressividade do tumor, direcionando-os para a modalidade terapêutica mais adequada, e conduzir potencialmente ao desenvolvimento de novas terapias moleculares tendo estes marcadores como alvo.

Nas últimas décadas, um crescente número de estudos demonstram que os defeitos ao nível do ciclo celular, nomeadamente no mecanismo de controlo da mitose – *checkpoint* mitótico, são um evento associado à aneuploidia e progressão de diferentes tipos de cancro, nomeadamente o OSCC (Chen et al., 2013a; Grabsch et al., 2003; Lira et al., 2010; Moura et al., 2014; Wassmann and Benezra, 2001; Weaver and Cleveland, 2007). Não obstante, muito pouco se sabe relativamente às alterações deste mecanismo de controlo no OSCC. Neste contexto, a presente dissertação tem como principal foco a potencial ligação entre os defeitos no *checkpoint* mitótico, nomeadamente ao nível da expressão do conjunto de proteínas intervenientes, e o OSCC, analisando o seu potencial significado clínico-patológico, nomeadamente como fatores de prognóstico.

Neste sentido, as secções seguintes visam contextualizar o presente trabalho iniciando pela descrição do cancro da cavidade oral, em particular do OSCC e a magnitude do problema a nível epidemiológico, fatores de risco associados e as alterações moleculares que estão na sua origem e progressão, com especial foco nas alterações do mecanismo de controlo da mitose, nomeadamente do nível de expressão das proteínas. Por fim, é feita uma breve revisão do conhecimento atual do valor das proteínas como marcadores biológicos da doença e a seu potencial como fator de prognóstico.

## **1. CANCRO DA CAVIDADE ORAL: UM PROBLEMA DE SAÚDE PÚBLICA**

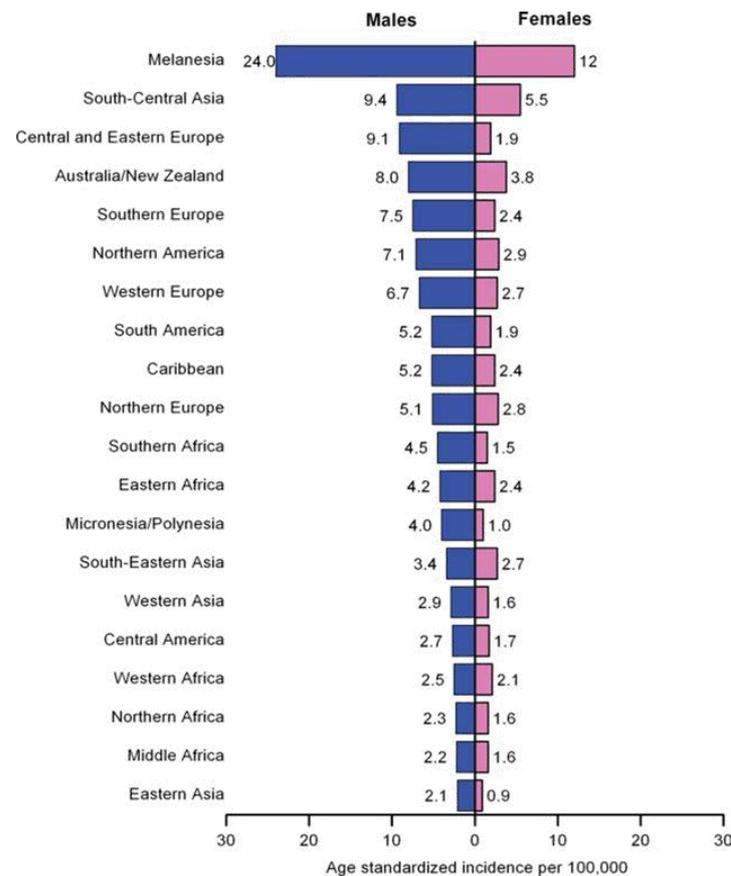
O cancro da cavidade oral, que incluiu os tumores com origem no lábio, língua, gengiva, pavimento da boca e palato (ICD-10: C00-06), representa mundialmente um grupo percentual significativo (48%) dos carcinomas da cabeça e pescoço (*head and neck carcinoma*, HNC), sendo o tipo histológico mais frequente o OSCC e o local anatómico a língua (Dobrossy, 2005; Jemal et al., 2011).

Anualmente estima-se que sejam diagnosticados 263 900 novos casos e registadas 128 000 mortes por cancro oral, tornando este, em conjunto com o cancro da faringe, o sexto tipo de cancro mais comum em todo o mundo (Ferlay *et al.*, 2010a; Jemal *et al.*, 2011). Porém, a incidência deste tipo de cancro apresenta variações relativamente à área geográfica, sexo e idade.

Ao nível geográfico a maior taxa de incidência é registada na Melanésia, seguida da Ásia (Sul e Central) e Europa (Central e Oriental) (Figura 1) (Jemal *et al.*, 2011), para ambos os sexos. Não obstante, as estimativas estatísticas mostram que dos novos casos de OSCC registados mundialmente, cerca de 170 000 dizem respeito ao homem e apenas 92 000 ao sexo feminino, evidenciando uma maior predisposição do homem em desenvolver e morrer deste tipo de cancro, com registo de 83 000 mortes (Ferlay *et al.*, 2010b). Na generalidade esta tendência mantêm-se, no entanto existem países Europeus, como é o caso da França e Itália que demonstram, nos últimos anos, um decréscimo significativo do número de casos no homem, enquanto na Hungria, mas também na Dinamarca e Roménia, denota-se um aumento da incidência no sexo feminino (Garavello *et al.*, 2010).

O maior número de casos de OSCC é registado na população adulta, na faixa etária dos 50 anos. No entanto, os países com elevada incidência apresentam um número assinalável de casos nos adultos com idade até aos 40 anos (Warnakulasuriya, 2010). Curiosamente, nos últimos anos um aumento da incidência na população jovem, inicialmente reportada na Escócia e Dinamarca, tem vindo a ser igualmente apontada em vários países Europeus assim como em diferentes estados dos Estados Unidos, possivelmente associada à alteração dos hábitos e/ou à exposição a fatores de risco por parte dos indivíduos jovens (Dobrossy, 2005; Jemal *et al.*, 2011; Warnakulasuriya, 2010).

A taxa de sobrevivência total em 5 anos estimada para o cancro da cavidade oral é cerca de 50 a 60% (Massano *et al.*, 2006; Rogers *et al.*, 2009). Esta baixa taxa de sobrevivência está principalmente associada a um diagnóstico da doença em estadios avançados, que em conjunto com a idade avançada e hábitos de risco dos pacientes mostram ser um indicador de mau prognóstico (Gomez *et al.*, 2010; Warnakulasuriya, 2010).



**Figura 1 – Taxa de incidência do cancro da cavidade oral por sexo e área geográfica, estandardizada pela idade.** Fonte: (Jemal *et al.*, 2011).

### 1.1 OSCC: PONTO DE SITUAÇÃO EM PORTUGAL

Os últimos dados estatísticos revistos em Portugal dizem respeito a um total de 9623 casos de cancro oral e orofaringe (excluindo a nasofaringe), registados entre 1998 e 2007, sendo o OSCC o tipo histológico mais frequente (81,7%), de forma semelhante ao que acontece mundialmente. O sexo masculino assinala uma maior incidência, especialmente numa faixa etária superior aos 45 anos compreendendo o sexo feminino apenas 21,4% dos casos registados. De acordo com o estudo, o cancro da cavidade oral, mais frequente na língua, evidencia um aumento em ambos os sexos, mas em especial no sexo feminino (aumento de 4,3% por ano), refletindo a alteração do padrão dos hábitos de risco, como são o caso do tabagismo e de consumo de álcool, entre sexos da população Portuguesa (Monteiro *et al.*, 2013).

## 1.2 FATORES DE RISCO

A origem do OSCC permanece em parte por esclarecer, no entanto para além do risco associado a cada indivíduo, têm surgido um diferente número de fatores que não sendo necessariamente agentes causais, evidenciam uma associação significativa, individual ou de forma combinada, com o aumento do risco de desenvolvimento deste tipo de cancro (Dobrossy, 2005).

O tabaco e o consumo de álcool são considerados os fatores com maior risco associado (Blot *et al.*, 1988). Este risco aumenta de forma dependente da dose e frequência de consumo (Morse *et al.*, 2007; Warnakulasuriya *et al.*, 2005; Znaor *et al.*, 2003). Não obstante, para além do risco individual, cada um destes fatores apresentam um efeito sinérgico, aumentando o risco em cerca de 40 vezes quando em conjunto, sendo uma elevada percentagem dos casos de OSCC registados (80%) atribuíveis ao tabagismo e consumo abusivo de álcool (Blot *et al.*, 1988; Lin *et al.*, 2011; Tanaka and Tanaka, 2011).

Adicionalmente, apesar de em menor grau de associação e em alguns casos contraditório, existem outros fatores considerados de risco no OSCC que estão ligados aos hábitos alimentares, de higiene oral e infeção pelo vírus do papiloma humano (HPV).

A dieta alimentar é reportada como um potencial fator de risco, com efeito mais significativo no OSCC relativamente a outro tipo de cancro, sendo que o consumo diário de frutas e vegetais está correlacionado com um decréscimo do risco em cerca de 50%, na ausência de historial de tabagismo e consumo de álcool excessivo, o que sugere um efeito preventivo deste fator (De Stefani *et al.*, 2009; Deshpande and Wong, 2008; Pavia *et al.*, 2006).

A baixa frequência de visitas ao médico dentista associada à falta de higiene, e por conseguinte à baixa saúde oral aumenta em 2 a 4 vezes o risco de cancro oral (Garrote *et al.*, 2001; Talamini *et al.*, 2000). O consumo de tabaco e álcool têm um efeito direto na saúde, e estão fortemente relacionados com a higiene oral, porém este fator está descrito como tendo um papel independente suportado pelo aumento do risco descrito entre indivíduos não fumadores e não consumidores de álcool (Gillison, 2007; Rosenquist *et al.*, 2005).

A incidência do cancro da cavidade oral, como dá conta as estimativas estatísticas, regista um aumento na população jovem dos Estados Unidos e em

diferentes países da Europa. Este dado tem sido, em parte, associado ao comportamento sexual e à infecção por HPV nos jovens adultos (Gillison, 2007; Jemal *et al.*, 2011). A infecção por este agente vírico é considerado um fator de risco independente, com uma prevalência de detecção superior no OSCC que em lesões pré-neoplásicas, relativamente à mucosa oral normal (Miller and Johnstone, 2001). As evidências sugerem que o número de parceiros sexuais ao longo da vida, prática de sexo oral e historial de verrugas genitais são fatores de risco importantes para o desenvolvimento de OSCC associado à presença deste agente vírico (Gillison and Lowy, 2004; Marur *et al.*, 2010). No entanto, de acordo com o reportado existe uma variação significativa no que concerne à prevalência de detecção de HPV e o risco de OSCC associado, relativamente à população alvo de estudo, tipo de amostra biológica e método de detecção (Herrero *et al.*, 2003; Marur *et al.*, 2010; Miller and Johnstone, 2001).

## **2. CARCINOGENÉSE DO OSCC: ALTERAÇÕES MOLECULARES E HISTOLÓGICAS**

O desenvolvimento do OSCC é um processo molecular e histológico complexo que compreende a transformação de células epiteliais normais em pré-neoplásicas ou potencialmente malignas, caracterizadas por uma capacidade de proliferação auto-suficiente (Scully and Bagan, 2009). Este processo envolve uma série de alterações genéticas, muitas vezes causadas pela exposição crónica a agentes de risco e/ou carcinogéneos, em associação com a predisposição individual de cada indivíduo (Califano *et al.*, 1996; Perez-Sayans *et al.*, 2009). A acumulação destas alterações cria instabilidade genómica que favorece a progressão das lesões potencialmente malignas resultando, em muito dos casos, em carcinoma (Choi and Myers, 2008; Mithani *et al.*, 2007).

### **2.1 ALTERAÇÕES MOLECULARES**

As alterações genéticas que estão na base do processo de carcinogénese oral incluem principalmente mutações ou amplificação dos oncogenes e inativação dos genes supressores tumorais, resultando na perda dos mecanismos de controlo do ciclo celular (Lippman *et al.*, 2005; Mehrotra and Yadav, 2006).

Existem vários oncogenes implicados na carcinogénese oral, tais como os recetores de fatores de crescimento epidermal (Epidermal growth factor receptor – EGFR), transdutores de sinal (família do gene *ras* – *H-ras*, *k-ras*, *N-ras*) e reguladores do ciclo celular (ciclina D), que promovem o desenvolvimento neoplásico, em consequência da destabilização dos mecanismos de controlo do ciclo e morte celular (Choi and Myers,

2008; Scully and Bagan, 2009). A expressão de EGFR (membro da família dos recetores tirosina cinase) é reportada como um marcador da transformação maligna, que está aumentada em 80 a 100% das lesões pré-malignas e malignas da cavidade oral, existindo uma associação com o seu grau de diferenciação, agressividade e promoção de metástases (Reuter *et al.*, 2007; Williams, 2000; Zimmermann *et al.*, 2006). No OSCC a família do gene *ras*, que têm um papel fundamental no controlo da transdução do sinal, através das células, de vias envolvidas no crescimento, migração e diferenciação, está frequentemente alterada. Esta alteração é considerada um eventual passo inicial na progressão maligna oral (Campo-Trapero *et al.*, 2008; Murugan *et al.*, 2012). A alteração da família das proteínas ciclina, que têm como função a normal regulação da progressão do ciclo celular, é uma característica comum nas lesões pré-malignas e no OSCC, sugerindo que a amplificação dos genes da ciclina D e B e consequente expressão aumentada das proteínas é um evento prematuro no processo de carcinogénese oral, estando a sobreexpressão de ciclina D também associada a um maior grau de agressividade do tumor. (Choi and Myers, 2008; Miyamoto *et al.*, 2003; Tsantoulis *et al.*, 2007).

Um dos eventos decisivos e mais estudados no processo de transformação maligna das células é a inativação dos genes supressores tumorais (tais como TP53 e Retinoblastoma – RB), frequentemente devido a mutações pontuais, deleções e rearranjos dos genes, conduzindo ao crescimento e divisão descontrolada e contribuindo para desenvolvimento do fenótipo maligno (Vogelstein and Kinzler, 1993; Williams, 2000). No OSCC, as mutações do gene supressor tumoral TP53 estão associadas à progressão maligna, encontrando-se presentes nas lesões pré-malignas e em 25 a 69% dos cancros da cavidade oral (Levine *et al.*, 1991; Nylander *et al.*, 2000). De forma similar, a inativação do gene RB e consequente baixa de expressão da proteína pRB é descrita em estadios precoces da doença assim como nos casos de OSCC (Koontongkaew *et al.*, 2000; Pande *et al.*, 1998).

## 2.2 ALTERAÇÕES HISTOLÓGICAS

A acumulação das alterações enunciadas, entre outras, resulta na transformação das células do epitélio escamoso estratificado da mucosa oral e promovem o desenvolvimento do OSCC.

De acordo com o modelo histológico de carcinogénese oral, existe uma progressão que pode compreender as lesões reativas do epitélio, lesões potencialmente

malignas e carcinoma *in situ*, culminando, muitas vezes, em carcinoma invasivo (Rivera and Venegas, 2014).

As lesões reativas, como é exemplo a hiperqueratose, surgem muitas vezes como resultado de irritação ou fricção contínua, por exemplo durante a mastigação nos pacientes com prótese dentária. Este tipo de lesão está associado ao espessamento epitelial, resultado de um aumento da camada de queratina, como um fenómeno de adaptação/proteção. Não obstante, este tipo de lesões raramente apresenta alterações com potencial maligno ou progride para carcinoma (Neville and Day, 2002).

Na cavidade oral, as lesões consideradas potencialmente malignas mais comuns são a leucoplasia e a eritroplasia. A leucoplasia é definida pela WHO (*World Health Organization*) como uma mancha ou placa branca que não pode ser caracterizada, clínica ou patologicamente, como qualquer outra lesão (Kramer *et al.*, 1978). De forma similar, a eritroplasia é um termo clínico para denominar uma mancha ou placa de tonalidade avermelhada excluindo qualquer processo inflamatório, apesar da aparência e tonalidade semelhantes (Kramer *et al.*, 1978). Esta lesão, comparativamente à leucoplasia, apresenta maior potencial de malignidade (Kramer *et al.*, 1978; Mashberg and Samit, 1995). Ao contrário das lesões reativas a leucoplasia e a eritroplasia estão associadas a displasia (proliferação desordenada, mas não neoplásica, com alteração do tamanho, forma e organização celular) que dependendo do grau, displasia leve, moderada ou severa, apresentam uma maior probabilidade de progredir para OSCC (Scully *et al.*, 2003; Speight, 2007). A proliferação descontrolada das células displásicas, com um aumento progressivo da atipia e pleomorfismo nuclear e celular, associada à capacidade e evasão da apoptose, replicação celular contínua, formação de novos vasos e degradação da matriz extra-celular da camada basal do epitélio, permite a promoção, invasão e metastização do OSCC (Choi and Myers, 2008; Rivera and Venegas, 2014; Speight, 2007).

As alterações moleculares e histológicas, descritas nesta secção, que compreendem o processo de carcinogénese, resultam da perturbação do equilíbrio entre a proliferação e a morte celular programada (apoptose) (Scully, 1992). Neste processo, o descontrolo na progressão do ciclo celular, e em particular na mitose, conduz a um número anormal de cromossomas (aneuploidia). Esta é uma característica comum dos tumores sólidos humanos, incluindo o cancro oral, e pode resultar, em parte, da alteração do *checkpoint* mitótico e por conseguinte da incorreta segregação cromossómica no processo de divisão celular (Holland and Cleveland, 2009; Kops *et al.*, 2005).

### 3. MITOSE E MECANISMO DE CONTROLO

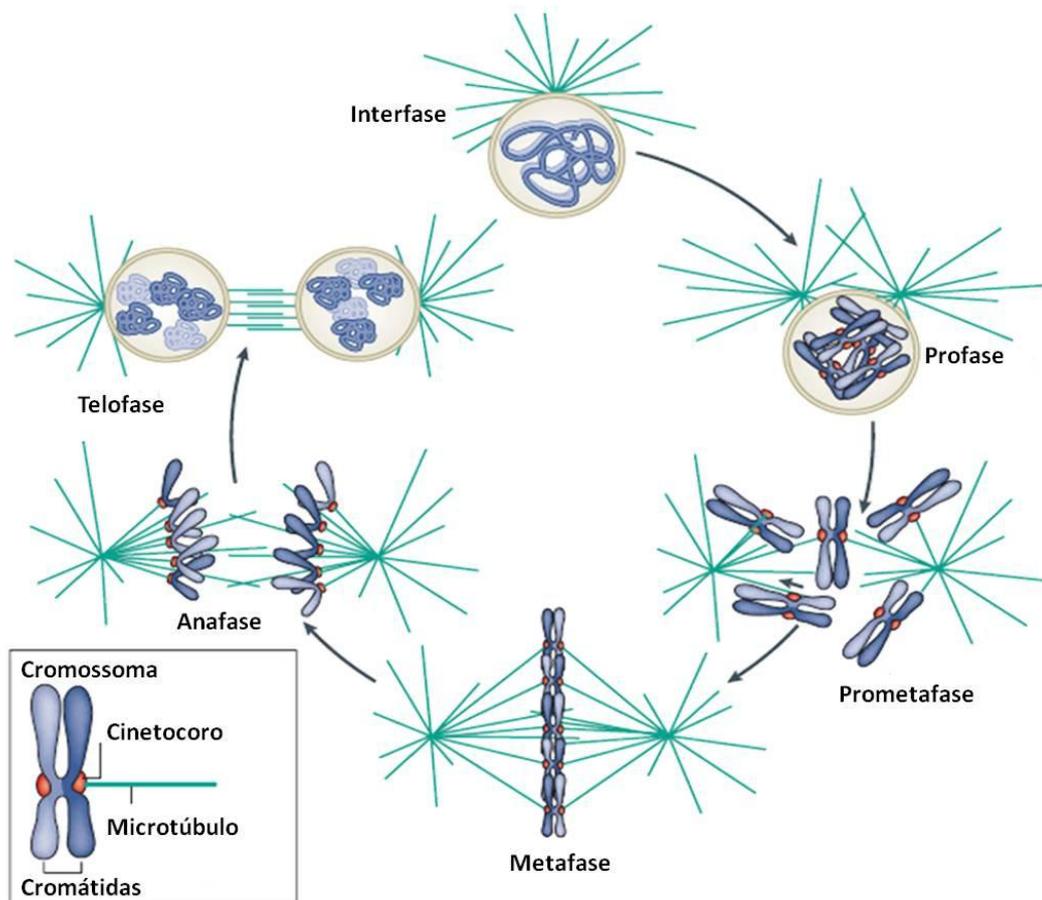
O ciclo celular consiste numa sequência complexa de eventos ordenados, responsáveis pela proliferação e divisão celular, que compreende a replicação do ADN (ácido desoxirribonucleico) e a segregação dos cromossomas de forma equitativa pelas duas células filhas resultantes do processo. Genericamente divide-se em duas fases principais: a interfase, fase de duplicação do conteúdo celular, nomeadamente do material genético, e preparação para a divisão, e a mitose, a qual será descrita em mais detalhe na secção seguinte (Vermeulen *et al.*, 2003).

#### 3.1 MITOSE

A mitose é uma etapa do ciclo celular, onde ocorre a divisão nuclear e citoplasmática dando assim, uma célula, origem a duas células-filhas geneticamente idênticas. É um processo progressivo classicamente subdividido em diferentes etapas (Figura 2) (Nigg, 2001): (1) a profase, caracterizada pela condensação da cromatina, em cromossomas definidos e constituídos por duas moléculas de ADN iguais unidas pelo centrómero, onde pela ligação de proteínas específicas se forma um complexo proteico especializado – cinetocoro – local onde se estabelecerá a ligação com os microtúbulos do fuso (Cheeseman and Desai, 2008). O invólucro nuclear inicia a sua desintegração gradual e em simultâneo inicia-se a formação do fuso mitótico à medida que os centróssomas, que constituem, nos eucariotas, o maior centro organizador de microtúbulos, migram em direção oposta para os pólos da célula (Doxsey *et al.*, 2005; Nigg, 2001); (2) na prometáfase continua a condensação dos cromossomas, tornando-se distintas as cromátidas, e os cinetocoros visíveis de cada um dos lados do centrómero. Ocorre a completa desintegração do invólucro nuclear e em simultâneo inicia-se a ligação dos microtúbulos de pólos opostos aos cinetocoros, seguido do processo de deslocamento dos cromossomas para o plano equatorial (Cheeseman and Desai, 2008; Zimmerman and Doxsey, 2000); (3) na metafase é concluída a formação do fuso mitótico e os cromossomas, que atingem a condensação máxima, encontram-se todos alinhados e bi-orientados na placa equatorial; (4) na anáfase A, após a perda de coesão entre as cromátidas, estas deslocam-se para os pólos, através da ação exercida pelos microtúbulos; (5) na anáfase B, os pólos do fuso afastam-se cada vez mais, por alongamento da célula, tornando a distância entre os centróssomas maior (Nigg, 2001); (6) a telófase caracteriza-se pela reorganização do invólucro nuclear em volta dos cromossomas que se encontram nos pólos, inicia-se, progressivamente, a sua descondensação e os microtúbulos do fuso despolidimerizam. Por fim, acontece a divisão

do citoplasma (citocinese) promovida pela contração progressiva de um anel contráctil de actina e miosina, que culmina na separação das duas células-filhas (Azevedo, 1999)

Os vários eventos descritos devem acontecer de forma sequencial, coordenada e precisa o que implica um controlo rigoroso. A transição entre as fases do ciclo celular é dependente das ciclinas e das proteínas cinases ciclina-dependentes (Cdks) de cada fase (Murray, 2004). Na mitose a Cdk predominante é a Cdk1 que forma um complexo com as ciclinas mitóticas A e B que promovem o início e progressão da mitose, respetivamente (Sullivan and Morgan, 2007).



**Figura 2 – Representação esquemática das diferentes etapas da mitose.** A cromatina duplicada na interfase condensa-se, na profase, em cromossomas definidos (a azul) e constituídos por duas cromátidas unidas pelo centrómero e tornam-se visíveis os cinetocoros (a vermelho). Na prometáfase após a quebra do invólucro nuclear inicia-se a formação e ligação dos microtúbulos, de pólos opostos, aos cinetocoros, seguido do deslocamento dos cromossomas para o plano equatorial. Os cromossomas atingem a sua condensação máxima na metafase e encontram-se todos alinhados e bi-orientados na placa equatorial. Na anafase dá-se a perda da coesão entre as cromátidas e existe a sua ascensão para os pólos. Por fim, na telofase existe a descondensação da cromatina e reorganiza-se o invólucro nuclear. Adaptado de Cheeseman *et al.*, 2008.

Para além da regulação por intermédio dos complexos ciclina-Cdks, a mitose, e em particular a correta e equitativa divisão do material genético pelas células-filhas, é assegurada por um mecanismo de controlo celular complexo, designado por *checkpoint* mitótico, que será descrito em mais detalhe nas secções seguintes (May and Hardwick, 2006; Wells, 1996).

### 3.2 CHECKPOINT MITÓTICO: DEFINIÇÃO, FUNÇÃO E ATIVAÇÃO

O *checkpoint* mitótico é um sofisticado mecanismo de vigilância, presente nas células eucariotas, que atua na transição de metafase para anafase. A ativação deste ponto de controlo evita a separação prematura das cromátidas irmãs até ao momento em que todos os cromossomas se encontrem corretamente ligados aos microtúbulos do fuso mitótico e alinhados na placa metafásica (congressão), permitindo assim assegurar uma correta segregação cromossómica durante a anafase (Logarinho and Bousbaa, 2008; Musacchio and Salmon, 2007). Este mecanismo de controlo da mitose consiste numa cascata de sinalização, ativada aquando da entrada da célula no processo de divisão celular.

Relativamente ao sinal chave que desencadeia a ativação do *checkpoint* mitótico existem dois modelos ideológicos diferentes (revistos por Silva *et al.*, 2011): (1) o modelo de ligação, que estabelece que o mecanismo de controlo deteta o nível de ocupação e o estado da ligação cinetocoro-microtúbulos e (2) o modelo de tensão, que assume a ausência de tensão entre os cinetocoros irmãos como o sinal chave para ativação do *checkpoint* mitótico. Ambos apresentam evidências que os apoiam. O primeiro modelo é apoiado por um trabalho que demonstra não existir a paragem em metafase, mesmo quando efetuada a ablação, por laser, do último cinetocoro não ligado, não estando, porém, o outro cinetocoro irmão ligado sob tensão (Rieder *et al.*, 1995). Contrariamente, estudos desenvolvidos em leveduras, sustentam o modelo de tensão, uma vez que os cinetocoros ligados aos microtúbulos, mas com ausência de tensão, não satisfazem o mecanismo de controlo, permanecendo o *checkpoint* mitótico ativo (Stern and Murray, 2001).

Neste sentido, uma vez que a ligação cinetocoro-microtúbulos fornece a força necessária para gerar tensão entre os cinetocoros irmãos, e a tensão, por sua vez, é necessária para promover ligações cinetocoro-microtúbulos estáveis, foi colocada a hipótese da existência de um “*checkpoint* patrocinado” (King and Nicklas, 2000; Zhou *et al.*, 2002). Assim, de acordo com este modelo existem moléculas específicas capazes de fazer a distinção entre a ausência de ligação cinetocoro-microtúbulos (por exemplo a

proteína Mad2) ou de tensão entre cinetocoros (como são exemplos as proteínas BubR1 e Bub1), e que estão na base do sinal inibidor da progressão da anafase (Gorbsky and Ricketts, 1993; Logarinho et al., 2004; Waters et al., 1998).

### 3.3 MECANISMO MOLECULAR DE AÇÃO

A via molecular de ação do *checkpoint* mitótico, que promove um sinal inibitório e impede a separação das cromátidas de forma precoce, envolve a intervenção de diversas proteínas, as quais podem ser divididas em dois grupos: (1) as proteínas *core* do mecanismo de controlo - Bub1, Bub3, Mad1, Mad2, BubR1 (Mad3 nas leveduras), Mps1 e (2) as proteínas associadas à ligação, à regulação do complexo promotor da anafase/ciclossoma - APC/C (anaphase promoting complex/cyclosome), aos mecanismos de correção e de silenciamento do *checkpoint* mitótico que monitorizam a progressão no ciclo celular, em associação com o primeiro grupo de proteínas (Cheeseman and Desai, 2008; Khodjakov and Rieder, 2009).

A família Bub (*budding uninhibited by benzimidazole*, Bub1-3), Mad (*mitotic arrest deficiente*, Mad1-3) e a proteína Mps1 (*monopolar spindle 1*) foram inicialmente identificadas em leveduras incapazes de atrasar a saída de mitose, na exposição a drogas anti-mitóticas (nocodazole e benzimidazole) que afetam a dinâmica dos microtúbulos (Bharadwaj and Yu, 2004; Winey and Huneycutt, 2002). A proteína Mps1, descrita inicialmente como uma proteína do centrossoma, associada apenas à formação das ligações bipolares do fuso mitótico é considerada também como parte integrante do *checkpoint* mitótico (Winey and Huneycutt, 2002). Posteriormente homólogos destas proteínas, com elevada semelhança de sequência e funcionalidade foram identificados em organismos superiores, incluindo os mamíferos (Yu, 2002).

O complexo APC/C, considerado o alvo final do *checkpoint* mitótico, é uma ligase de ubiquitina E3 que promove a degradação, pelo encaminhamento para a subunidade 26S do proteossoma, de várias proteínas reguladoras da mitose, como são o caso da securina e a ciclina B. A degradação da securina permite a ativação da protease separase, que por sua vez, cliva as coesinas, responsáveis por manter unidas as cromátidas irmãs, permitindo a sua separação e ascensão aos pólos opostos do fuso mitótico. Por outro lado, a degradação da ciclina B promove a inativação da Cdk1 e consequentemente conduz à saída da mitose (Musacchio and Salmon, 2007). A regulação da atividade do APC/C está a cargo das proteínas acessórias Cdc20 e Cdh1, que são responsáveis pela interação com os substratos e os encaminham para o APC/C para serem ubiquitinizados e, posteriormente, degradados (May and Hardwick, 2006).

Os cinetocoros livres (Figura 3 A) ou incorretamente ligados aos microtúbulos atuam como catalisadores para a formação do complexo do checkpoint mitótico (MCC), constituído pelas proteínas Mad2, BubR1 e Bub3 (McCurdy *et al.*, 2008). Este complexo sequestra a proteína Cdc20, um ativador do complexo APC/C, prevenindo a degradação das proteínas securina e ciclina B, mantendo, desta forma, as coesinas entre as cromátidas intactas e a saída da mitose inibida, respetivamente. (Kramer *et al.*, 1978; Sudakin *et al.*, 2001).

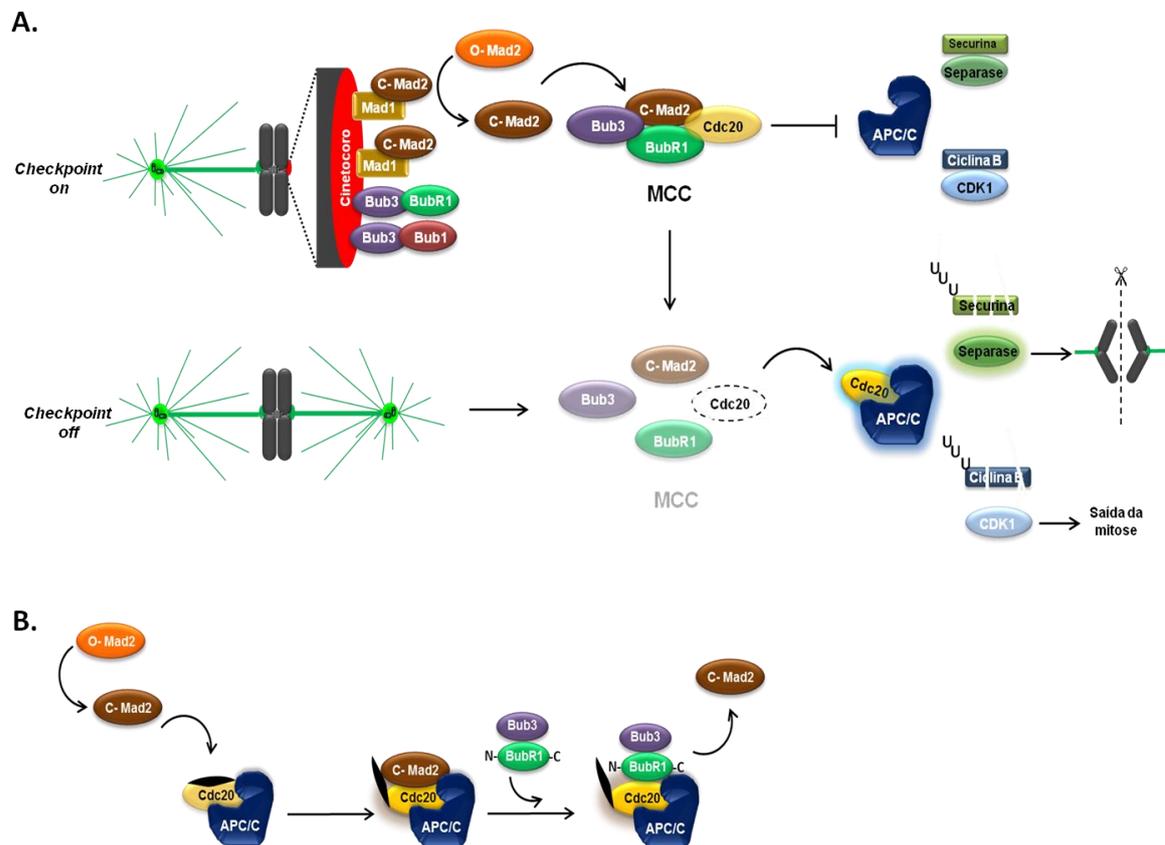
A existência de um único cinetocoro livre é suficiente para ativar o checkpoint mitótico e desencadear uma paragem em mitose (Rieder *et al.*, 1995). Com base num modelo associado à proteína Mad2, denominado de “*Mad2-Template*”, esta é a responsável pela difusão do sinal inibidor da mitose, proveniente dos cinetocoros, para o citosol (De Antoni *et al.*, 2005). De acordo com este modelo, a proteína Mad2 pode adotar duas formas conformacionais: “*open*”-Mad2 (O-Mad2) e “*closed*”-Mad2 (C-Mad2) (De Antoni *et al.*, 2005; Luo and Yu, 2008; Skinner *et al.*, 2008). Desta forma, nos cinetocoros livres, a C-Mad2, que se encontra constitutivamente ligada à proteína Mad1, atua como um recetor para a O-Mad2 citosólica transformando-a em C-Mad2, que estabelece, por sua vez, ligação com a proteína Cdc20 (Figura 3 A). Este complexo (C-Mad2/Cdc20) abandona o cinetocoro e atua como um equivalente estrutural da Mad2/Mad1, convertendo, no citosol, mais O-Mad2 em C-Mad2/Cdc20 produzindo uma amplificação do sinal (De Antoni *et al.*, 2005; Yu, 2006).

Mais recentemente foi reportado um modelo em que a C-Mad2 promove uma mudança conformacional da proteína Cdc20 permitindo a sua ligação com o N-terminal da proteína BubR1, ligada à proteína Bub3, inibindo a atividade do APC/C e, por conseguinte, o início da anafase (Figura 3 B) (Han *et al.*, 2013).

Para um *checkpoint* mitótico eficiente são também necessárias as cinases Bub1, Mps1 e Aurora B. A proteína Bub1, que forma um complexo constitutivo com a proteína Bub3 (Brady and Hardwick, 2000), é necessária para o recrutamento das proteínas BubR1, Mad1 e Mad2 para o cinetocoro (Johnson *et al.*, 2004). Adicionalmente, a proteína Bub1, através da fosforilação da Cdc20, contribui também para a inibição do APC/C (Kang *et al.*, 2008; Tang *et al.*, 2004). O recrutamento das proteínas Mad1 e Mad2 também é dependente da Mps1, que por sua vez, é necessária para a ativação da proteína Aurora B (Abrieu *et al.*, 2001; Jelluma *et al.*, 2010). Esta proteína é parte integrante do *chromosomal passenger complex* e tem um papel importante na correção das ligações cinetocoro-microtúbulos aberrantes (Ruchaud *et al.*, 2007). Neste processo, que envolve a fosforilação do substrato, a proteína Aurora B deteta e destabiliza as

ligações aberrantes, permitindo uma nova orientação e alinhamento dos cromossomas, evitando, desta forma, a aneuploidia (DeLuca *et al.*, 2011; Silva *et al.*, 2011; Tanaka *et al.*, 2002). Para além desta funcionalidade, a Aurora B desempenha também um importante papel no recrutamento das proteínas BubR1 e Mad2 para o cinetocoro (Ditchfield *et al.*, 2003).

Quando o último cromossoma está alinhado na placa metafásica e ligado de forma bipolar, o sinal inibidor deixa de ser produzido, em consequência do silenciamento do *checkpoint* mitótico (Figura 3 A, *checkpoint off*), o que permite a progressão da mitose. Este silenciamento implica a separação do MCC, ficando a proteína Cdc20 livre para ativar o APC/C, que induz a ubiquitinação e posterior degradação da securina e ciclina B no proteossoma, conduzindo assim à separação das cromátidas irmãs e saída da mitose, respetivamente (Sudakin *et al.*, 2001).



**Figura 3 – Modelos da via de sinalização do checkpoint mitótico.** (A) De acordo com o primeiro modelo, a presença de cinetocoros não ligados ou incorretamente ligados ativa o *checkpoint* (*checkpoint on*). Ao nível do cinetocoro o complexo Mad1-“closed”-Mad2 gera um sinal que se difunde, convertendo a “open”-Mad2 em “closed”-Mad2, que em associação com a Bub3, BubR1 e Cdc20 forma o complexo *checkpoint* mitótico (MCC). O MCC sequestra a proteína Cdc20 impedindo a ativação do complexo promotor da anáfase/ciclossoma (APC/C). Quando todos os cromossomas estão corretamente ligados o MCC separa-se (*checkpoint off*) e a proteína Cdc20 está livre para ativar o APC/C e este degradar as proteínas securina e a ciclina B. Desta forma, a separase fica livre para degradar as coesinas, permitindo a separação das cromátidas irmãs, enquanto a degradação da ciclina B permite a saída da mitose. (B) De acordo com o segundo

modelo, a “*closed*”-Mad2 promove uma alteração conformacional da proteína Cdc20, permitindo a sua ligação com o N-terminal da proteína BubR1, ligada à proteína Bub3, mantendo o APC/C inativo, impedindo assim o início da anáfase. Uma vez formado este complexo a “*closed*”-Mad2 é libertada e volta ao citosol. Adaptado de Teixeira *et al.*, 2014.

#### 4. EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS DO *CHECKPOINT* MITÓTICO NO OSCC

As alterações ao nível do *checkpoint* mitótico têm sido alvo de estudo em diferentes tipos de cancro, e associadas ao processo de tumorigénese. Não obstante, até ao momento existe um número limitado de publicações científicas que abordam esta temática no OSCC.

Tendo em conta os componentes *core* do *checkpoint* mitótico descritos (Mad1, Mad2, Bub1, BubR1, Bub3 e Mps1), assim como o principal alvo do *checkpoint* mitótico - Cdc20), e a proteína Aurora B somente estão reportadas alterações ao nível da expressão da Cdc20, Mad2, BubR1 e Aurora B (Tabela 1).

Os estudos que visam as alterações ao nível da Cdc20, apesar das diferentes abordagens usadas, revelam uma sobreexpressão da proteína no OSCC tanto em linhas celulares como em amostras histológicas (Mondal *et al.*, 2007; Moura *et al.*, 2013; Thirthagiri *et al.*, 2007). Esta alteração está associada a um *checkpoint* mitótico deficiente, demonstrado pela incapacidade de paragem no ciclo, mesmo após incubação com nocodazole (utilizado para ativar o *checkpoint* mitótico pela despolimerização dos microtúbulos) e decréscimo dos níveis de ciclina B que evidenciam a promoção prematura da anáfase, e conseqüentemente à incorreta segregação dos cromossomas conduzindo a fenótipos aberrantes, como a aneuploidia (Mondal *et al.*, 2007). De forma similar, um estudo desenvolvido em linhas celulares com defeitos ao nível da p53 e p16, estabelece a associação entre a sobreexpressão de Cdc20 e um ineficiente *checkpoint* mitótico, avaliado pelo índice mitótico. No mesmo estudo, todas as linhas celulares de OSCC, demonstraram baixos níveis de expressão de Mad2, independentemente da integridade do *checkpoint* mitótico (Thirthagiri *et al.*, 2007). Mais recentemente, e do ponto de vista clínico, o significado da expressão da Cdc20 foi avaliado em amostras histológicas de OSCC. Esta proteína demonstra ser um potencial marcador para categorizar pacientes de alto risco, e a sua sobreexpressão encontra-se associada a uma menor sobrevida dos pacientes. Estas evidências sugerem o nível de expressão da Cdc20 como um potencial fator de prognóstico nos casos de OSCC (Moura *et al.*, 2013).

Relativamente à proteína BubR1, as evidências de uma sobreexpressão no OSCC, são concordantes nos diferentes estudos disponíveis. Esta sobreexpressão foi também observada em lesões potencialmente malignas, apesar de em menor grandeza

que no OSCC, relativamente à mucosa oral normal, o que sugere que esta alteração é, possivelmente, um evento precoce na carcinogênese do OSCC (Hsieh *et al.*, 2010). Curiosamente, níveis aumentados da proteína BubR1 estão correlacionados com uma maior prevalência de HPV, o que indica uma possível interação entre a proteína e o vírus no carcinoma oral (Lira *et al.*, 2010). O mesmo estudo indicia, também, que a sobreexpressão da proteína BubR1 está relacionada com tempos de sobrevida mais curtos dos pacientes. Contrariamente, um trabalho semelhante evidencia uma associação entre a sobreexpressão da proteína BubR1 e períodos mais longos de sobrevivência dos pacientes com OSCC, assim como com estadios tumorais menos avançados e um período livre de recidiva mais curto (Rizzardi *et al.*, 2011).

A proteína Aurora B, assim como as proteínas Cdc20 e a BubR1, apresentam uma expressão aumentada no OSCC. Estes níveis de expressão apresentam uma correlação com o grau histológico de diferenciação, nomeadamente em tumores pouco diferenciados, e metástases nos nódulos linfáticos, sugerindo um papel na progressão tumoral e portanto um alvo a ter em conta no diagnóstico e terapêutica (Qi *et al.*, 2007). Um estudo semelhante, desenvolvido na população de Taiwan, demonstrou que a expressão aumentada da proteína Aurora B apresenta uma associação com o tamanho e com o avançado estadio tumoral, evidenciando um pior prognóstico (Chen *et al.*, 2013b), resultados concordantes com os observados por outros autores, sustentando o valor desta proteína como fator de prognóstico e marcador de agressividade nos casos de OSCC (Chen *et al.*, 2013b; Pannone *et al.*, 2011).

Tendo em conta as evidências, existe uma tendência de expressão aumentada das proteínas do *checkpoint* Cdc20, BubR1 e Aurora B no carcinoma oral de células escamosas, exceto no que diz respeito à proteína Mad2. No entanto, permanece até ao momento, de acordo com o nosso conhecimento, o total desconhecimento do nível de expressão das restantes proteínas intervenientes no *checkpoint* mitótico, assim como a sua expressão no coletivo, e o seu possível papel na progressão do cancro oral de células escamosas.

**Tabela 1** – Expressão das proteínas do checkpoint mitótico no OSCC. Adaptado de Teixeira *et al.*, 2014.

Proteínas do <i>checkpoint</i> mitótico	Amostra	Nível de expressão	Referência
Cdc20	Linhas celulares de OSCC (7 de 10)	Sobreexpressão	(Mondal <i>et al.</i> , 2007)
	HNSCC (7 dos 10 casos)		
	Linhas celulares de OSCC (2 de 7)	Sobreexpressão	(Thirthagiri <i>et al.</i> , 2007)
	OSCC (37 dos 65 casos)	Sobreexpressão	(Moura <i>et al.</i> , 2013)
Mad2	Linhas celulares de OSCC (7 de 7)	Subexpressão	(Thirthagiri <i>et al.</i> , 2007)
BubR1	OSCC (43 dos 43 casos)	Sobreexpressão	(Hsieh <i>et al.</i> , 2010)
	LO <sup>PM</sup> (75 dos 77 casos)		
	OSCC <sup>IS</sup> (15 dos 20 casos)	Sobreexpressão	(Lira <i>et al.</i> , 2010)
	OSCC <sup>SM</sup> (19 dos 27 casos)		
	OSCC <sup>CM</sup> (18 dos 23 casos)		
	NL cervicais (15 dos 23 casos)	Subexpressão	
	LO <sup>NM</sup> (16 dos 16 casos)		
OSCC (11 dos 49 casos)	Sobreexpressão	(Rizzardì <i>et al.</i> , 2011)	
Aurora B	Linhas celulares de OSCC (7 de 7)	Sobreexpressão	(Pannone <i>et al.</i> , 2011)
	OSCC (71 de 101)		
	OSCC (40 dos 40 casos)	Sobreexpressão	(Qi <i>et al.</i> , 2007)
	OSCC (162 dos 215 casos)	Sobreexpressão	(Chen <i>et al.</i> , 2013b)

LO<sup>PM</sup>, lesões orais potencialmente malignas; OSCCIS, OSCC *in situ*; OSCCSM, OSCC invasivo sem metástases; OSCCCM, OSCC invasivo com metástases; NL, nódulos linfáticos; LONM; lesões orais não malignas.



**CAPÍTULO II.**  
**OBJETIVOS**

---

Ao nível mundial o OSCC representa um dos tumores da cabeça e pescoço mais frequentes e permanece com uma taxa de sobrevida total aos 5 anos baixa, o que o torna um problema de saúde pública. Neste sentido, torna-se imperativo desenvolver métodos de detecção precoce e diferenciar pacientes com maior risco de recorrência ou progressão da doença.

Várias são as alterações genéticas reportadas, nomeadamente nos genes supressores tumorais e oncogenes, não obstante o modelo molecular de carcinogénese oral ainda não está totalmente esclarecido. Neste sentido, é crucial o entendimento da base molecular do OSCC para esclarecimento do processo de progressão, mas principalmente para identificar novos marcadores biológicos que perspetivem o diagnóstico e desenvolvimento de novas e potenciais intervenções terapêuticas.

Uma característica comum de vários tipos de cancro, incluindo o OSCC, é a aneuploidia, principalmente definida como o número anormal de cromossomas. Uma das potenciais causas apontadas, para tal, é a existência de defeitos ao nível do mecanismo de controlo da mitose, o *checkpoint* mitótico, que controla a correta divisão dos cromossomas na mitose. A BubR1, Mad2 e Bub3 são proteínas intervenientes no *checkpoint* mitótico e constituem o MCC, que impede a proteína Cdc20 de ativar o APC/C, inibindo, portanto, a saída prematura da mitose perante uma incorreta orientação e ligação dos cromossomas, aos microtúbulos do fuso mitótico.

Até ao momento, apenas as proteínas BubR1 e Cdc20 foram alvo de estudo, em amostras histológicas de OSCC, não existindo portanto nenhum trabalho que reporte o nível de expressão das proteínas Mad2 e Bub3 neste tipo de tumor.

Desta forma, a presente dissertação tem como foco principal determinar o significado clínico da expressão das proteínas BubR1, Mad2 e Bub3 no OSCC, procurando responder aos objetivos específicos estabelecidos: (1) analisar a expressão das proteínas em amostras histológicas de OSCC, em comparação com tecido normal da mucosa oral; (2) verificar a relação da expressão das proteínas entre si; (3) avaliar a relação da expressão das proteínas com o grau de proliferação dos tumores; (4) estudar a relação do nível de expressão das proteínas com as características clinico-patológicas do grupo de pacientes em estudo e (5) avaliar o potencial das proteínas como marcadores de prognóstico.

**CAPÍTULO III.**  
**MATERIAL E MÉTODOS**

---

No sentido de responder aos objetivos propostos, o presente trabalho foi planeado de acordo com o desenho experimental abaixo esquematizado.

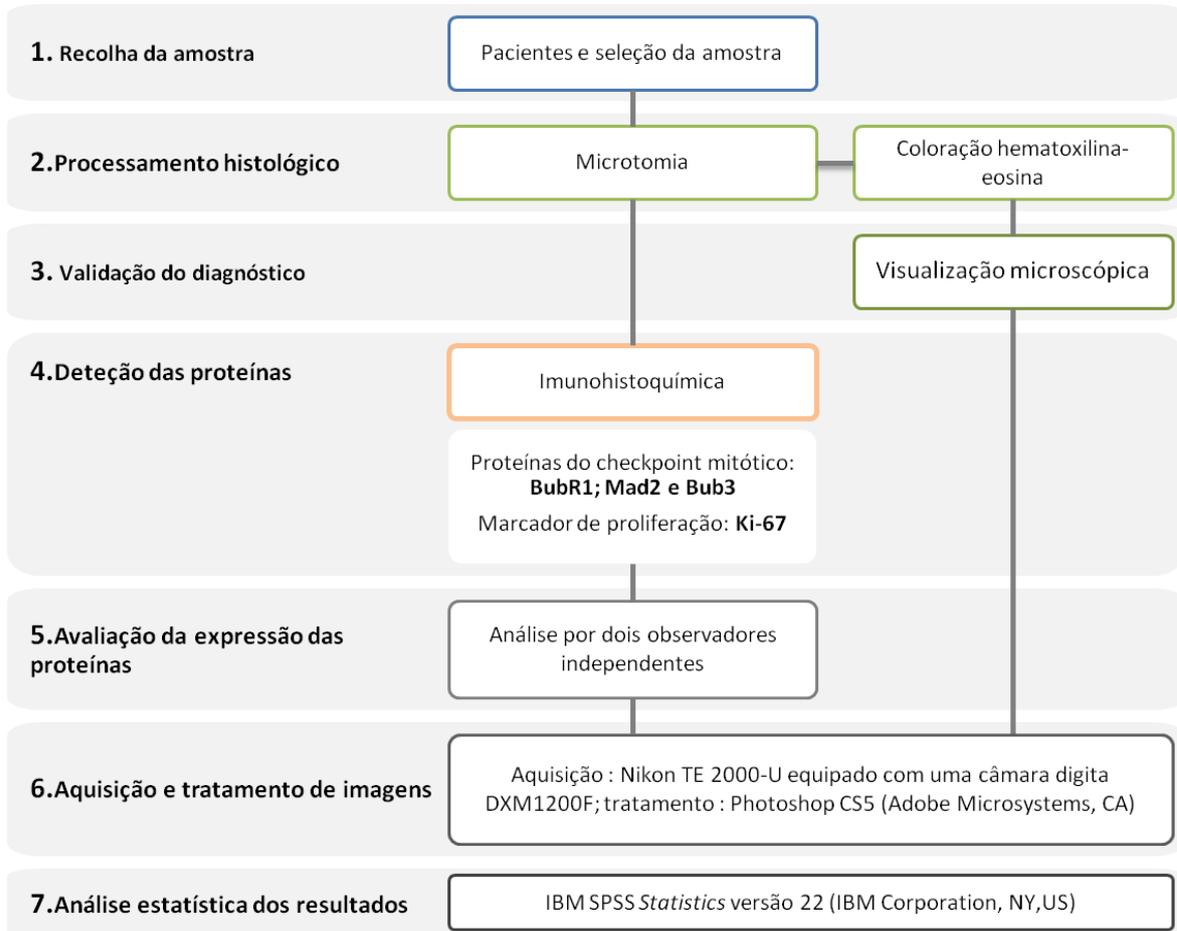


Figura 4 - Representação esquemática do desenho experimental delineado.

## 1. PACIENTES E SELEÇÃO DA AMOSTRA

Neste estudo retrospectivo foram recolhidos um total de 65 amostras de tecido fixado e incluído em parafina, de pacientes diagnosticados com carcinoma oral de células escamosas no Centro Hospitalar do Porto – Hospital de Santo António (CHP), Porto, Portugal, entre o ano de 2000 e 2006.

A autorização para o desenvolvimento do estudo foi concedida pelo Comité de Ética Institucional do CHP, assim como a informação detalhada relativa a cada caso clínico (género; idade; hábitos de consumo de álcool e tabaco; localização (lábio, pavimento da boca, língua, mucosa jugal, retromolar, palato duro e gengiva), tamanho (T1-T4) estadio (I-IV) e grau do tumor; N *status* (N0, N1, N2, e N3); margens *status* (com tumor, tumor próximo, e sem tumor); permeação perineural; invasão linfática e

modalidade terapêutica (cirurgia, cirurgia e radioterapia, quimioterapia e outros, e tratamento de suporte) foi disponibilizada pelo banco de dados de registo da mesma instituição. Os tumores foram reclassificados de acordo com a 7ª edição da classificação dos tumores malignos do *American Joint Committee on Cancer* (Edge and Compton, 2010).

## 2. PROCESSAMENTO HISTOLÓGICO

Os blocos de parafina de cada caso foram seccionados com uma espessura de 3 µm num micrótomo rotativo manual (Finesse 325, Thermo Scientific), e os cortes estendidos em lâminas adesivadas (StarFrost, Waldemar Knittel). De seguida as lâminas foram colocadas numa estufa a 37°C, durante cerca de 12 horas, para a secagem e total adesão do corte à superfície da lâmina. Uma lâmina de cada caso foi corada pela coloração de hematoxilina-eosina (HE), para confirmação do diagnóstico inicial, e as restantes armazenadas para a realização da técnica de imunohistoquímica.

## 3. VALIDAÇÃO DO DIAGNÓSTICO

Uma lâmina da coloração HE, de todos os casos em análise, foi avaliada, por um patologista experiente, para confirmação do diagnóstico inicial. O grau de diferenciação dos casos de OSCC foi reclassificado de acordo com a classificação da *World Health Organization* (2005) em bem diferenciado (G1), moderadamente diferenciado (G2) e pouco diferenciado (G3) (Barnes *et al.*, 2005). A invasão linfática e permeação perineural foram classificadas como presente ou ausente.

## 4. IMUNOHISTOQUÍMICA

No sentido de avaliar os níveis de expressão das proteínas do *checkpoint* mitótico BubR1, Mad2, Bub3 e o marcador biológico de proliferação Ki-67 nas amostras de OSCC realizou-se a técnica de imunohistoquímica.

As secções histológicas foram desparafinadas em xilol e hidratadas numa série decrescente de álcoois (100%,70% e 50%) e água destilada. Posteriormente procedeu-se à recuperação antigénica com tampão EDTA (pH9,0) durante 30 minutos em banho-maria a 98°C. Após o arrefecimento, durante 20 minutos à temperatura ambiente, as lâminas foram lavadas duas vezes em tampão fosfato salino 1x (*phosphate buffered saline*, PBS – 1,37M NaCl, 27 mM KCl, 100mM Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 18 mM KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, pH 7,4) durante 5 minutos cada, e de seguida neutralizou-se a atividade endógena das

peroxidases com 0,3% de peróxido de hidrogénio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>), em metanol, durante 5 minutos. Posteriormente lavaram-se as lâminas duas vezes em PBS, durante 5 minutos cada, e foram incubadas em tampão tris-salino com 0,4% de caseína para reduzir as ligações inespecíficas do anticorpo primário, assim como do polímero. De seguida, removeu-se o excesso da solução de bloqueio e incubaram-se as amostras com o anticorpo primário durante 1h, em câmara húmida à temperatura ambiente, de acordo com as diluições ótimas aferidas (Tabela 2). Subsequentemente procedeu-se à lavagem, por duas vezes, durante 5 minutos cada, com PBS, e incubaram-se as secções com o anticorpo pós-primário (IgG de coelho anti-ratinho), durante 30 minutos. Posteriormente efetuou-se a lavagem duas vezes em PBS, durante 5 minutos cada, e incubou-se com o polímero. Após os 30 minutos de incubação, lavou-se as secções duas vezes com PBS, durante 5 minutos cada, e os produtos da reação com a peroxidase foram evidenciados utilizando 3,3' – diaminobenzidina (DAB) como cromogénio. Os cortes histológicos foram contrastados com hematoxilina durante 30 segundos e lavados em água corrente durante 5 minutos. Por fim, procedeu-se à desidratação, numa série crescente de álcoois (50%, 70% e 100%), seguida da diafanização em xilol e aplicação da lamela com o meio de montagem resinoso Histofluid (Marienfeld, Laboratory Glassware). Para a realização da técnica de imunohistoquímica recorreu-se à utilização de um kit comercial, de acordo com as instruções do fabricante (Sistema de deteção de polímero Novolink™ Novocastra, Leica Biosystems Newcastle Ltd, Newcastle upon Tyne, UK).

Em cada série de imunohistoquímica foram usados como controlo normal e negativo, cortes histológicos de mucosa oral normal e a omissão do anticorpo primário, respetivamente.

**Tabela 2** – Anticorpos primários para a deteção imunohistoquímica das proteínas BubR1, Mad2, Bub3 e Ki-67. Informação sobre o clone, empresa de aquisição e diluições aferidas para os diferentes anticorpos.

Anticorpo primário	Clone	Recuperação antigénica	Diluição <sup>a</sup>	Empresa
Ratinho anti-BubR1	9/BUBR1	1mM tampão EDTA (pH9,0)	1:150	BD Biosciences, USA
Ratinho anti-Mad2	Mad2/48		1:75	
Ratinho anti-Bub3 <sup>b</sup>	31/Bub3		1:350	
Ratinho anti-Ki-67	MIB1		1:10	Dako, Denmark

<sup>a</sup>Diluição em IHC diluente (Novocastra); <sup>b</sup>Relativamente a este anticorpo foi igualmente testada a recuperação antigénica com tampão citrato (pH6,0) e as diluições 1:150, 1:250 e 1:450.

## 5. AVALIAÇÃO DA IMUNOHISTOQUÍMICA

A expressão das proteínas em estudo foi avaliada por dois observadores independentes, sem conhecimento prévio relativo às características clínico-patológicas dos pacientes. Os casos discordantes foram revistos pelos observadores e estabelecido um consenso.

Na avaliação da imunohistoquímica das proteínas BubR1, Mad2 e Bub3 foram considerados os seguintes parâmetros da marcação: intensidade, extensão, localização e distribuição. A intensidade foi classificada em ausente, leve, moderada e forte. A extensão da marcação foi avaliada pela percentagem média de células marcadas. Para tal, por cada caso de OSCC, foram avaliados dez campos distintos com a objetiva de 40x (microscópio ótico Olympus CX21). Segundo a estimativa da média de células marcadas a extensão foi classificada em 5 grupos: 0-9%, 10-24%, 25-49%, 50-74% e 75-100%. A localização celular, da marcação imunohistoquímica de cada proteína, foi classificada em citoplasmática, nuclear, citoplasmática e nuclear, e citoplasmática e membranar. Relativamente à distribuição nos tumores a marcação foi classificada em homogénea, periférica e central.

Na avaliação da proteína Ki-67 foi considerada a percentagem de núcleos marcados (em semelhança ao descrito para as proteínas BubR1, Mad2 e Bub3) para determinar o *status* de proliferação do tumor. Assim os OSCC foram classificados em dois grupos: pouco proliferativos (marcação de 0-49% das células tumorais) e muito proliferativos (marcação de 50 % ou mais células tumorais) (Carlos de Vicente *et al.*, 2002).

## 6. AQUISIÇÃO E TRATAMENTO DE IMAGENS

As imagens da marcação imunohistoquímica foram adquiridas num microscópio invertido Nikon TE 2000-U equipado com uma câmara digital DXM1200F, através do programa Nikon ACT-1. O tratamento final das imagens (brilho e contraste) foi ajustado no Photoshop CS5 (Adobe Microsystems, CA).

## 7. ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados foram estatisticamente analisados através do programa IBM SPSS *Statistics* versão 22 (IBM Corporation, NY,US).

A diferença da extensão da marcação das proteínas BubR1 e Mad2 entre os casos de OSCC e a mucosa oral normal foi avaliada pelo teste ANOVA. As associações entre as diferentes características clínico-patológicas e os níveis de expressão das proteínas BubR1 e Mad2 foram analisadas pelo teste *Chi-square*. A correlação entre as proteínas BubR1 e Mad2, assim como a correlação de ambas com a proteína Ki-67 foi igualmente avaliada pelo teste *Chi-square*. A *Cancer-specific survival* (CSS) foi definida como o intervalo de tempo (meses) entre o tratamento primário e a morte por OSCC ou até ao momento do último *follow-up*, e a *Recurrence-free survival* (RFS) definida como o intervalo de tempo (meses) entre o tratamento primário e a recorrência do OSCC. A CSS e a RFS foram estimadas pelo método de *Kaplan-Meier* e o efeito de prognóstico foi avaliado pelo teste *log-rank*. Os *Hazard ratios* (HR), com intervalo de confiança (IC) de 95%, foram estimados através da análise multivariada pelo modelo *Cox regression*, para analisar o efeito independente das variáveis em análise. Valores de  $p < 0,05$  foram considerados estatisticamente significativos.

**CAPÍTULO IV.**  
**RESULTADOS E DISCUSSÃO**

---

## 1. DESCRIÇÃO DA AMOSTRA EM ESTUDO

O estudo retrospectivo apresentado incluiu um grupo de 65 pacientes com OSCC, registados no período de 2000-2006 no Hospital Santo António, Porto. Do total dos casos, 47 (72,3%) são do sexo masculino e 18 (27,7%) do sexo feminino, com idade média de  $61,57 \pm 14,9$  anos, tendo o paciente mais novo, no momento de diagnóstico, 25 e o mais velho 96 anos. A localização mais frequente da lesão foi observada na língua (24 casos), histologicamente bem diferenciada (39 casos) e sem ocorrência de metástases à distância. Esta caracterização é similar à descrita em trabalhos anteriormente publicados no OSCC, nomeadamente no que respeita ao maior número de casos registados no sexo masculino (Carvalho *et al.*, 2004; Ghoshal *et al.*, 2006), à idade média dos pacientes (Rizzardi *et al.*, 2011) e à língua, como local de maior ocorrência, refletindo assim a situação reportada nos dados epidemiológicos divulgados mundialmente (Jemal *et al.*, 2011; Warnakulasuriya, 2010). Do total de pacientes em estudo 50,0% apresentavam hábitos de consumo de tabaco e álcool, amplamente considerados como os fatores com maior risco associado ao cancro oral (Blot *et al.*, 1988). A informação detalhada das características clinico-patológicas, referentes à amostra em análise, encontra-se discriminada na Tabela 3.

**Tabela 3** – Características clinico-patológicas dos pacientes com OSCC em estudo (n=65).

Características clinico-patológicas	Grupo	N (%)
<b>Género</b>	Feminino	18 (27,7%)
	Masculino	47 (72,3%)
<b>Idade</b>	<62 anos	32 (49,2%)
	≥62 anos	33 (50,8%)
<b>Hábitos<sup>a</sup></b>	Sem hábitos	14 (24,1%)
	Álcool	5 (8,6%)
	Tabaco	10 (17,2%)
	Álcool e tabaco	29 (50,0%)
<b>Localização</b>	Lábio	6 (9,2%)
	Pavimento da boca	7 (10,8%)
	Língua	24 (36,9%)
	Mucosa jugal	3 (4,6%)
	Retromolar	11 (16,9%)
	Palato duro	8 (12,3%)
	Gengiva	6 (9,2%)
<b>Tamanho tumor</b>	T1	18 (27,7%)
	T2	29 (44,6%)
	T3	2 (3,1%)
	T4	16 (24,6%)
<b>N status</b>	N0	38 (58,5%)
	N1	11 (16,9%)
	N2	14 (21,5%)
	N3	2 (3,1%)
<b>Estadio</b>	I	13 (20,0%)
	II	21 (32,3%)
	III	9 (13,8%)
	IV	22 (33,8%)

<b>Modalidade terapêutica</b>	CG	29 (44,6%)
	CG e RT	18 (27,7%)
	QT e outros	13 (20,0%)
	Tratamento suporte	5 (7,7%)
<b>Grau tumor</b>	G1	39 (60,0%)
	G2	23 (35,4%)
	G3	3 (4,6%)
<b>Margem<sup>b</sup></b>	Sem tumor	28 (54,9%)
	Próximas	13 (25,5%)
	Com tumor	10 (19,6%)
<b>Invasão perineural</b>	Ausência	58 (89,2%)
	Presença	7 (10,8%)
<b>Invasão linfática</b>	Ausência	61 (93,8%)
	Presença	4 (6,2%)

CG, cirurgia; RT, radioterapia; QT, quimioterapia. <sup>a</sup> Não avaliável em 7 casos. <sup>b</sup> Não avaliável em 14 casos.

## 2. EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS BUBR1, MAD2, BUB3 E KI-67 NO OSCC

A alteração da expressão de proteínas envolvidas no mecanismo do checkpoint mitótico está associada a diversos tipos de tumores sólidos, nomeadamente ao OSCC (Teixeira et al., 2014). Uma sobreexpressão da proteína BubR1 foi previamente descrita em amostras de pacientes com OSCC e, apesar de em menor grau, em lesões pré-neoplásicas orais sugerindo esta alteração como um evento precoce na carcinogénese do OSCC (Hsieh et al., 2010). Este nível de expressão foi associado a uma menor sobrevivência dos pacientes em lesões malignas orais (Lira et al., 2010), e apontado como um potencial marcador de prognóstico neste tipo de tumor (Rizzardi et al., 2011). Por outro lado, não existem estudos que reportem a expressão das proteínas Mad2 e Bub3, em amostras histológicas de OSCC, justificando a originalidade e a relevância do presente estudo. Em semelhança com a proteína BubR1, as proteínas Mad2 e Bub3 são intervenientes chave na ativação do mecanismo do checkpoint mitótico, assegurando a correta segregação cromossômica e, conseqüentemente, evitando o aparecimento de uma população de células aneuplóides, característica comum na maior parte dos tumores (Holland and Cleveland, 2009; Kops et al., 2004).

### 2.1 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA BUBR1

Dos 65 casos em estudo, 2 foram excluídos da análise por perda do tecido no decorrer do processamento histológico. Nos restantes 63, assim como em todos os casos de tecido normal (n=10), observou-se a existência de marcação para a proteína BubR1. Este fato mostra concordância com o anteriormente descrito (Borum-Auensen et al., 2007), mas contraria um estudo recentemente publicado no qual nenhum do tecido oral normal apresentou marcação da proteína (Hsieh et al., 2010). No nosso estudo, a percentagem média de células marcadas (extensão da marcação) foi de  $8,5 \pm 1,58$  e

54,9±22,1 no controlo e nos casos de OSCC respetivamente, evidenciando assim uma percentagem significativamente superior ( $p<0,001$ ) de células marcadas no OSCC relativamente ao tecido normal, tal como reportado por outros autores (Chen et al., 2013a; Hsieh et al., 2010; Lira et al., 2010; Liu et al., 2009; Rizzardi et al., 2011). A marcação imunohistoquímica da proteína BubR1 foi descrita anteriormente por outros autores em tecido normal, nas células epiteliais da camada basal e parabasal, e no OSCC com um padrão característico predominantemente citoplasmático (Borum-Auensen et al., 2007; Rizzardi et al., 2011). O mesmo foi observado por nós na mucosa oral normal (Figura 5 A) e em 95,2% (n=60) dos casos de OSCC. Relativamente à intensidade da marcação, 47,6% (n=30) dos casos apresentaram o nível de intensidade mais elevado (forte) enquanto que o controlo normal apresenta uma intensidade leve a moderada (Tabela 4 e Figura 6 A).

A extensão da marcação nos casos de OSCC, definida como a percentagem média de células tumorais marcadas, foi categorizada em 5 grupos (0-9%, 10-24%, 25-49%, 50-74% e 75-100%), em que 38,1% (n=24) dos casos apresentou uma extensão da marcação compreendida entre 25-49% (Tabela 4 e Figura 6 A). É de salientar que em nenhum dos casos se verificou uma extensão inferior a 9%. Curiosamente um estudo imunohistoquímico da expressão da BubR1 em lesões potencialmente malignas e no OSCC mostrou, apenas nas primeiras uma extensão de marcação inferior a 10%, enquanto os casos de OSCC, independentemente do grau de diferenciação, apresentaram uma extensão da marcação elevada (91-100%) (Hsieh et al., 2010). Por último, e relativamente à distribuição da marcação, observou-se, na maioria dos casos (82,5%), um padrão heterogéneo, evidente na periferia do tumor (Figura 6 A) de acordo com o reportado por outros autores (Rizzardi et al., 2011).

## 2.2 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA MAD2

A avaliação imunohistoquímica da expressão da proteína Mad2, foi possível apenas em 54 dos 65 casos inicialmente recolhidos (Tabela 3), uma vez que os restantes 11 casos foram excluídos por perda do tecido durante o procedimento e/ou inexistência de áreas tumorais.

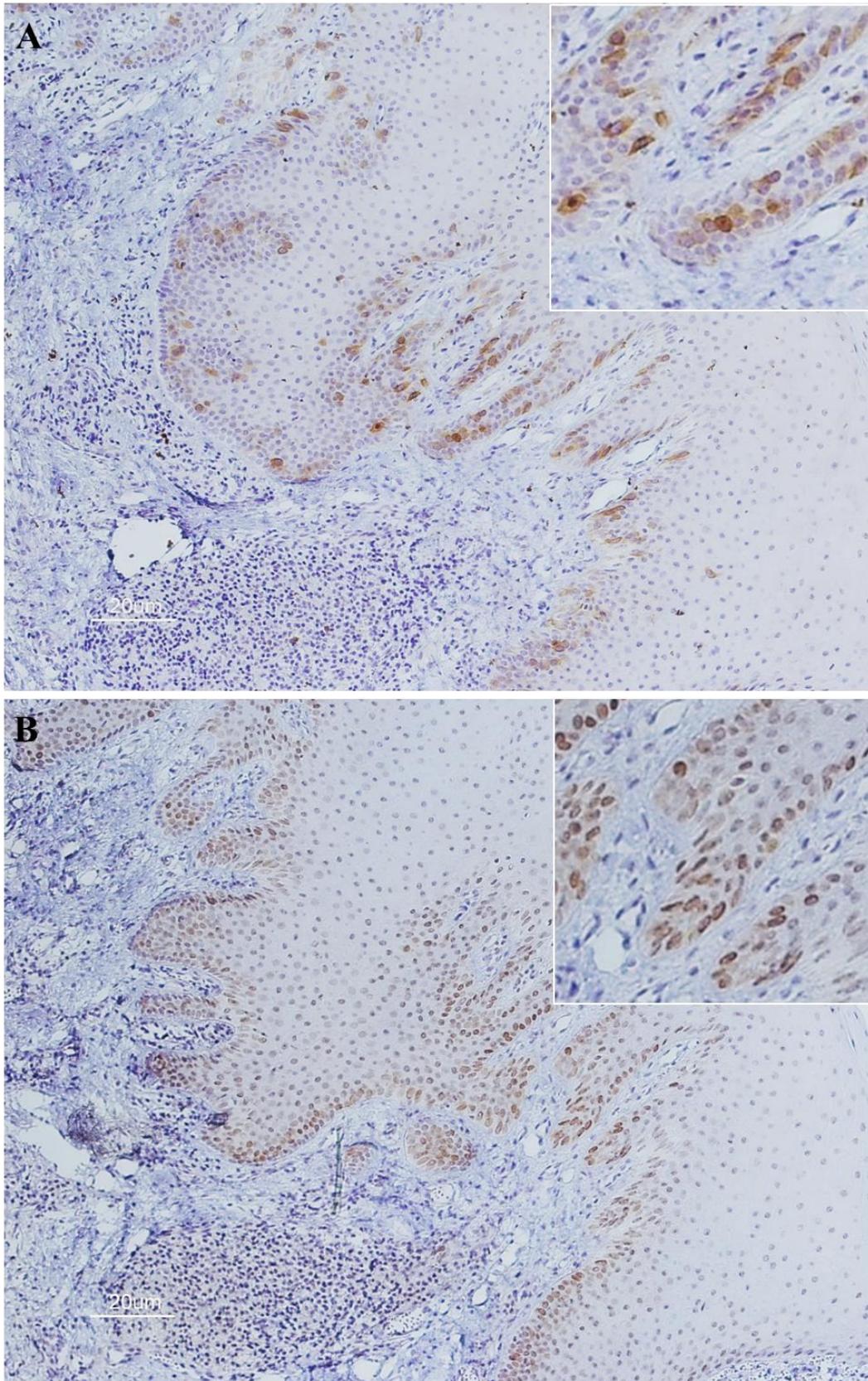
Em semelhança ao constatado para a proteína BubR1, a Mad2 foi observada em todos os casos de tecido normal e tumoral com uma percentagem de células marcadas de 46,85±14,97 e 64,90±18,70 ( $p=0,017$ ), respetivamente, evidenciando um maior número de células marcadas nos OSCC, comparativamente ao encontrado nos tecidos

normais, como demonstrado por outros autores em diferentes tipos de tumores (Li et al., 2003; Yu et al., 2010)

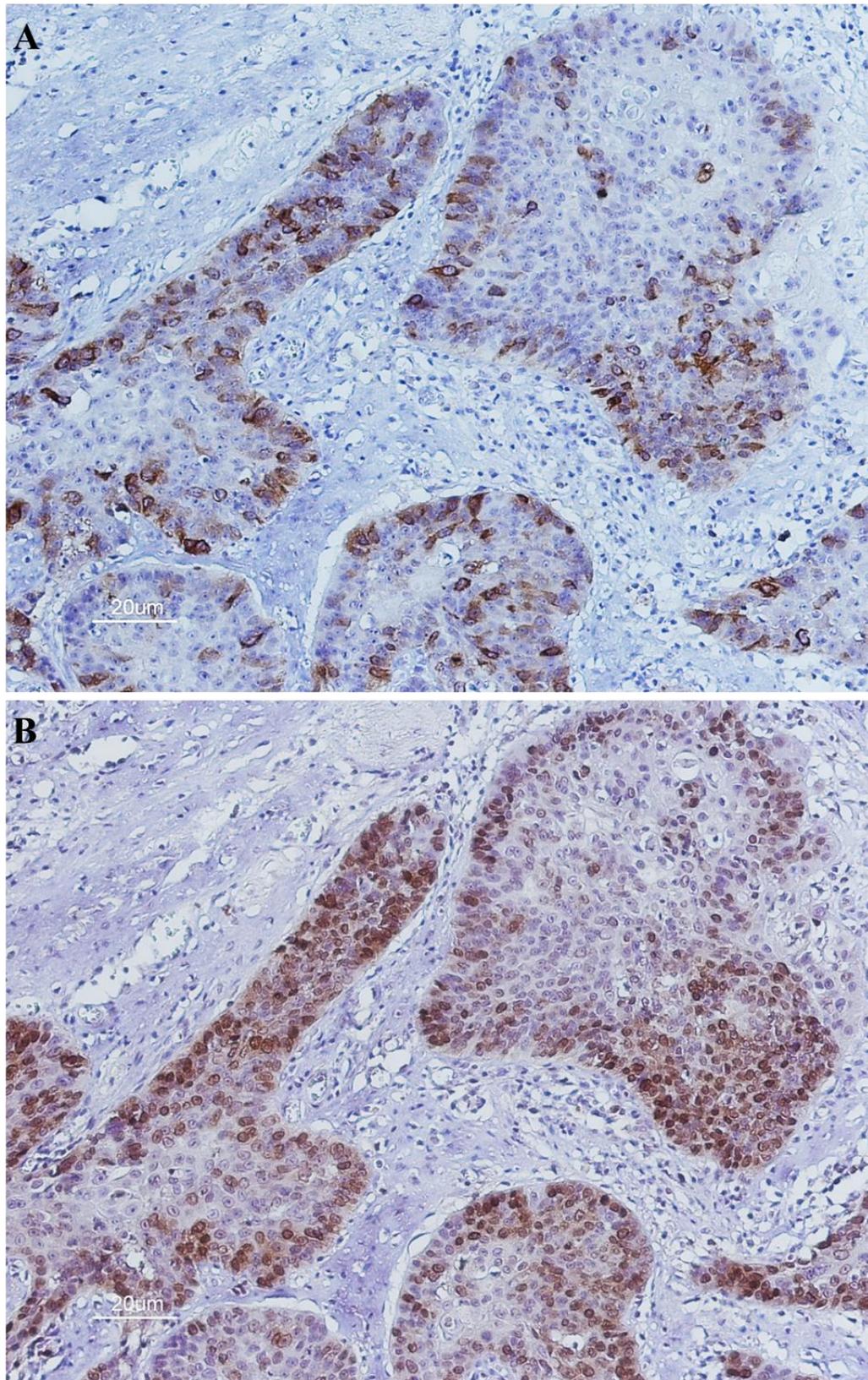
A localização celular da marcação da proteína Mad2 está descrita como unicamente nuclear na mucosa oral, assim como noutros tipos de tecidos normais (Borum-Auensen et al., 2007; Pati et al., 2004). Não obstante em tecidos tumorais, como são exemplo o adenocarcinoma do colon, estômago e mama evidenciam uma marcação desta proteína do *checkpoint* mitótico localizada no citoplasma (Li and Zhang, 2004; Pati et al., 2004; Tanaka et al., 2001) Por outro lado, no adenocarcinoma do pâncreas e no carcinoma de células escamosas da pele, a localização da marcação da proteína Mad2 foi descrita no núcleo das células, em semelhança ao encontrado no tecido normal (Borum-Auensen et al., 2007). No nosso estudo, a marcação da proteína Mad2, no tecido normal, mostrou-se predominantemente nuclear e em semelhança à proteína BubR1 localizada nas camadas basal e parabasal do epitélio (Figura 5 B). No OSCC a marcação da proteína Mad2 foi observada simultaneamente no citoplasma e núcleo em 61,1% (n=33) dos casos (Tabela 4 e Figura 6 B). Recentemente, o mesmo padrão de localização foi reportado no carcinoma do ovário e no cancro do estômago (Park et al., 2013; Wang et al., 2009). Tendo em conta a intensidade da marcação, no nosso estudo, verificou-se que em 42,6% (n=23) dos casos a intensidade era forte, apresentando a mucosa oral normal uma marcação de intensidade leve. Relativamente à extensão da marcação, 40,7% (n=22) dos casos apresentaram uma extensão no intervalo de 50-74% de células tumorais marcadas. O padrão da marcação da proteína Mad2, em semelhança ao reportado para a proteína BubR1, revelou-se heterogéneo em 87,0% (n=47) dos casos e com uma distribuição igualmente periférica (Tabela 4 e Figura 6 B)

**Tabela 4** – Análise dos parâmetros intensidade, extensão, localização e distribuição da marcação imunohistoquímica das proteínas BubR1 e Mad2 nos OSCC em estudo.

Parâmetro	BubR1	Mad2
	N (%)	N (%)
<b>Total de casos</b>	63 (100%)	54 (100%)
<b>Intensidade</b>		
Ausente	0 (0,0%)	0 (0,0%)
Leve	6 (9,5%)	13 (24,1%)
Moderada	27 (42,9%)	18 (33,3%)
Forte	30 (47,6%)	23 (42,6%)
<b>Extensão</b>		
0 – 9%	0 (0,0%)	1 (1,9%)
10 – 24%	7 (11,1%)	1 (1,9%)
25 – 49%	24 (38,1%)	12 (22,2%)
50 – 74%	20 (31,7%)	22 (40,7%)
75 – 100%	12 (19,0%)	18 (33,3%)
<b>Localização</b>		
Citoplasmática	60 (95,2%)	1 (1,9%)
Nuclear	0 (0,0%)	20 (37,0%)
Citoplasmática e nuclear	1 (1,6%)	33 (61,1%)
Citoplasmática e membranar	2 (3,2%)	0 (0,0%)
<b>Distribuição</b>		
Periférica	52 (82,5%)	47 (87,0%)
Central	0 (0,0%)	1 (1,9%)
Homogénea	11 (17,5%)	6 (11,1%)



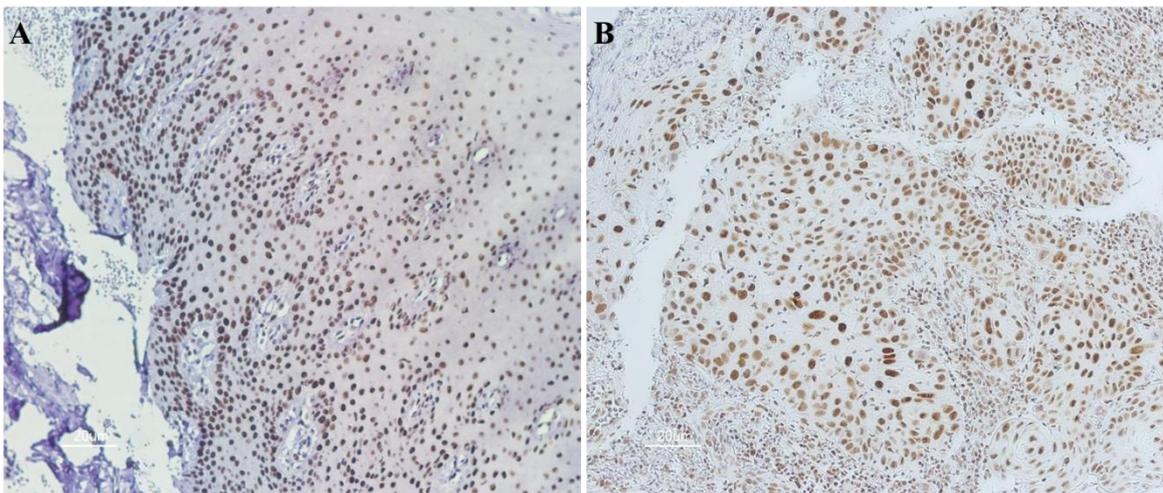
**Figura 5 – Expressão das proteínas BubR1 e Mad2 na mucosa oral normal.** As proteínas BubR1 e Mad2 foram detetadas por imunohistoquímica através dos anticorpos monoclonais ratinho anti-BubR1 e ratinho anti-Mad2 e o contraste realizado com hematoxilina. (A) Marcação citoplasmática da proteína BubR1, 10x. (B) Marcação nuclear da proteína Mad2, 10x. A escala (20 µm) é indicada no canto inferior esquerdo de cada imagem.



**Figura 6 – Expressão das proteínas BubR1 e Mad2 no OSCC.** As proteínas BubR1 e Mad2 foram detetadas por imunohistoquímica através dos anticorpos monoclonais ratinho anti-BubR1 e ratinho anti-Mad2 e o contraste realizado com hematoxilina. (A) Marcação citoplasmática da proteína BubR1 com intensidade forte e distribuição periférica no OSCC, 10x. (B) Marcação citoplasmática e nuclear da proteína Mad2 com intensidade forte e distribuição periférica no OSCC, 10x. A escala (20µm) é indicada no canto inferior esquerdo de cada imagem.

### 2.3 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA BUB3

Relativamente à proteína Bub3 e aquando da visualização das lâminas ao microscópio verificou-se a existência de marcação nuclear, de intensidade moderada, praticamente em todas as células tumorais e no tecido adjacente (Figura 7B). Esta observação, numa primeira análise, sugeriu uma possível inespecificidade do anticorpo utilizado e/ou carência de otimização das condições ideais. Desta forma, foram testadas diferentes recuperações antigénicas assim como várias diluições do anticorpo primário (ver material e métodos). Curiosamente, em todas as condições testadas, não se observou nenhuma alteração no padrão de marcação inicial, persistindo esta em praticamente todas as células. Assim, a análise relativa ao parâmetro extensão mostrou-se inexecutável, não sendo possível fazer distinção entre os casos assim como destes relativamente ao tecido normal da mucosa oral (Figura 7A). À luz do conhecimento atual não existe nenhum estudo acerca da expressão da proteína Bub3 em tecidos histológicos, com recurso à imunohistoquímica, no OSCC ou mesmo nouro tipo de tumor. Assim, na ausência de suporte bibliográfico que sustentasse os resultados obtidos e na impossibilidade de realizar um estudo estatístico, que estabelecesse uma correlação entre a expressão da proteína Bub3 e o OSCC, considerou-se adequado não avançar com esta abordagem.

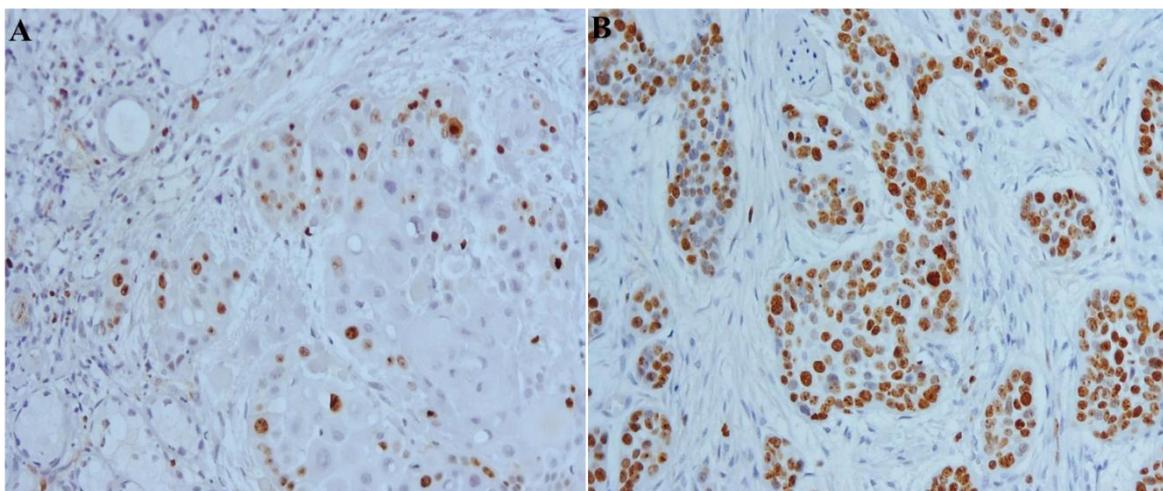


**Figura 7 – Expressão da proteína Bub3 na mucosa oral normal e no OSCC.** A proteína Bub3 foi detetada por imunohistoquímica com o anticorpo monoclonal ratinho anti-Bub3 e o contraste realizado com hematoxilina. Marcação nuclear da proteína na totalidade das células da mucosa oral normal (A), células tumorais (B) e na maioria das células constituintes do tecido adjacente com uma intensidade moderada, 10x. A escala (20 $\mu$ m) é indicada no canto inferior esquerdo da figura.

## 2.4 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DA PROTEÍNA KI-67

Adicionalmente às proteínas envolvidas no *checkpoint* mitótico, estudamos a expressão da proteína Ki-67 nos casos de OSCC disponíveis para análise. Esta é uma proteína nuclear expressa em todas as fases do ciclo celular com a exceção da fase G0 (van Diest et al., 1998), caracterizada por ser um estadió de quiescência. A expressão da proteína é variável, sendo máxima nas fases G2 e mitose seguida de rápida degradação após a conclusão da divisão celular (Li et al., 1995). Esta característica diferencial torna a expressão da proteína Ki-67 um excelente indicador da proliferação celular (Carlos de Vicente et al., 2002).

Neste sentido, realizamos o estudo imunohistoquímico da expressão desta proteína nos casos de OSCC disponíveis (n=62) para avaliar a sua capacidade proliferativa, de acordo com os critérios estabelecidos (ver material e métodos). A expressão nuclear da proteína Ki-67 foi detetada em todos os casos de OSCC, apresentando 50% (n=31) uma marcação compreendida entre 0-49% e os restantes casos uma marcação entre 50-100% das células tumorais, sendo de acordo com esta expressão classificados como pouco (Figura 8 A) ou muito proliferativos (Figura 8 B), respetivamente.



**Figura 8 – Expressão da proteína Ki-67 no OSCC.** A proteína Ki-67 foi detetada por imunohistoquímica com o anticorpo rato anti-Ki-67 e o contraste realizado com hematoxilina. Expressão nuclear da proteína Ki-67 em menos de 50% (A) e mais de 50% das células tumorais (B), 400x.

Após avaliação e caracterização da expressão das proteínas do *checkpoint* mitótico em análise e adicionalmente da proteína Ki-67, por motivos de representação estatística e tendo em conta a extensão da marcação obtida, a expressão das proteínas

BubR1 e Mad2 foi categorizada da seguinte forma: extensão de marcação  $\leq 74\%$ , nos casos de OSCC com uma percentagem de células marcadas compreendida entre 0 e 74%, e  $\geq 75\%$ , entre 75 e 100% de células positivamente marcadas. Pelas mesmas razões, a intensidade avaliada em ambas as proteínas foi agrupada em leve/moderada e forte.

### 3. RELAÇÃO DAS PROTEÍNAS BUBR1 E MAD2 NO OSCC

No mecanismo molecular de ação do *checkpoint* mitótico as proteínas Mad2 e BubR1, na presença de cinetocoros livres, formam em conjunto com a proteína Bub3 o complexo do checkpoint mitótico (McCurdy et al., 2008). Este é responsável pela inibição da proteína Cdc20 e por consequência do complexo promotor da anafase, não permitindo assim a separação das cromátidas irmãs (Kramer et al., 1978; Sudakin et al., 2001). Assim, e tendo em conta a relação de funcionalidade entre as proteínas BubR1 e Mad2 no mecanismo de controlo da mitose, o grupo estudou em que medida existia também uma relação na expressão destas duas proteínas por imunohistoquímica no OSCC.

Dos 52 casos disponíveis para avaliar uma associação entre a expressão das duas proteínas BubR1 e Mad2, verificou-se apenas significância estatística relativamente à intensidade da marcação de ambas as proteínas. Desta forma, dos 26 casos de OSCC que apresentaram uma intensidade forte da proteína BubR1, 66,7% (n=14) exibiram também a mesma intensidade de marcação para a proteína Mad2 ( $p=0,048$ ). Esta associação não se mostrou significativa num estudo semelhante realizado no carcinoma das glândulas salivares (Hannisdal et al., 2010). Recentemente, num trabalho de avaliação da expressão das proteínas BubR1 e Mad2 no cancro do ovário, foi reportada a associação entre a expressão destas proteínas e em particular relativamente à intensidade de marcação de ambas (McGrogan et al., 2014), em semelhança ao por nós constatado.

### 4. AS PROTEÍNAS BUBR1 E MAD2 E A SUA CORRELAÇÃO COM O MARCADOR DE PROLIFERAÇÃO KI-67

A extensão e a intensidade da marcação das proteínas BubR1 e Mad2 apresentaram uma associação significativa com a expressão do marcador Ki-67. Assim, e relativamente à proteína BubR1 os casos em que se registou uma intensidade forte apresentaram também uma maior expressão ( $\geq 50\%$  de células marcadas) da proteína Ki-67 ( $p=0,002$ ), assim como os casos com extensão da marcação da proteína BubR1  $\geq 75\%$  apresentaram uma maior expressão da proteína Ki-67 ( $p=0,001$ ). Por outro, a

mesma associação com a expressão do marcador Ki-67 foi observada relativamente à intensidade ( $p=0,035$ ) e extensão da marcação da proteína Mad2 ( $p=0.005$ ).

Relativamente ao OSCC apenas existe um estudo que analisou a relação entre a expressão da proteína BubR1 e o índice de marcação da proteína Ki-67, mas não foi observada uma associação significativa entre a expressão das duas proteínas (Rizzardi et al., 2011). Contrariamente, esta associação foi já descrita noutros tipos de cancro (Grabsch et al., 2003; McGrogan et al., 2014; Yamamoto et al., 2007). A proteína BubR1 apresenta a sua expressão máxima nas fases G2 e Mitose (Davenport et al., 1999), em semelhança ao que acontece com a proteína Ki-67 (Li et al., 1995). Esta evidência pode, em parte, explicar que o aumento da expressão da BubR1 seja observada nas células mitóticas anormais e ainda uma possível razão pela qual está associada com o aumento da proliferação celular indicada pelo índice do ki-67 (Yamamoto et al., 2007).

De acordo com o nosso conhecimento, não existe até ao momento nenhum trabalho que aborde a associação entre as proteínas Mad2 e Ki-67 em amostras de OSCC. Não obstante, esta associação já foi descrita em amostras histológicas de outros tipos de tumor (Borum-Auensen et al., 2007; McGrogan et al., 2014). Os nossos resultados demonstram, de igual forma, a existência de uma associação significativa entre a intensidade e extensão da marcação da proteína Mad2 e a expressão do marcador de proliferação Ki-67.

Estes resultados sugerem que as proteínas BubR1 e Mad2 parecem estar associadas com a proliferação e progressão do OSCC, o que é concordante com a hipótese de estarem envolvidas no processo de carcinogénese.

## **5. EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS BUBR1 E MAD2 E A SUA CORRELAÇÃO COM AS CARACTERÍSTICAS CLINICO-PATOLÓGICAS NO OSCC**

Na tentativa de explorar o significado clinico-patológico da expressão das proteínas BubR1 e Mad2 foi realizada uma análise de possível associação, recorrendo ao teste *Chi-square*. Para tal avaliou-se a relação entre extensão e intensidade da marcação com as características clinico-patológicas, nomeadamente género, idade, hábitos, localização e tamanho do tumor, N *status*, estadio, modalidade terapêutica, grau do tumor, margens, permeação perineural e invasão linfática (Tabela 5 e 6).

Relativamente à extensão da marcação das proteínas BubR1 e Mad2, não se verificou associação significativa ( $p=0,05$ ) com as diferentes características clinico-patológicas em análise (Tabela 5 e 6). Por outro lado, a intensidade da marcação da

proteína BubR1 mostrou estar associada ao tamanho ( $p=0,040$ ) e estadió ( $p=0,011$ ) do tumor, sugerindo que os casos com estádios mais avançados (III e IV) e de maior dimensão (T4) apresentam uma intensidade mais forte da marcação da proteína, relativamente aos casos de estadió e dimensão menores (Tabela 5). Estes resultados indiciam que, de alguma forma, a alteração da expressão da proteína BubR1 está envolvida no processo de carcinogénese, nomeadamente no crescimento e progressão deste tipo de tumores. Um outro estudo mostrou uma associação significativa entre a expressão da proteína BubR1, avaliada pela percentagem de células marcadas, com o estadió do OSCC, mas neste caso a maior percentagem de células marcadas foi observada nos tumores com estadió menos avançados (Rizzardi et al., 2011). Contrariamente, no carcinoma da bexiga e hepático, o aumento da expressão da proteína BubR1 apresentou uma associação significativa com os estádios mais avançados, assim como com a dimensão dos tumores (Liu et al., 2009; Yamamoto et al., 2007).

No que diz respeito à marcação da proteína Mad2, a intensidade apenas apresentou uma associação significativa com a idade média dos pacientes ( $p=0,016$ ), mostrando os tumores, dos pacientes com idade inferior a 62 anos, uma intensidade forte relativamente ao outro grupo etário em análise (Tabela 6). Até ao momento não existem outros estudos sobre a expressão da proteína Mad2 no OSCC, no entanto noutros tipos de tumor o nível aumentado de expressão desta proteína encontra-se, muitas vezes, associado com a dimensão e grau de diferenciação do tumor, sugerindo esta alteração como um fator significativo na progressão tumoral (Kato et al., 2011; Wang et al., 2009). No nosso estudo, a intensidade da marcação da proteína Mad2 não apresentou associação com a dimensão ou estadió, contrariamente ao observado para a proteína BubR1, nem como grau de diferenciação ou o N *status*. Uma das hipóteses por nós colocada para a inexistência de associação entre estes parâmetros e a expressão da proteína Mad2, como evidenciado noutros tipos de tumor, pode dever-se fato de existir um menor número de casos disponíveis para análise ( $n=54$ ).

**Tabela 5** – Associação entre os parâmetros de extensão e intensidade da expressão da proteína BubR1 e as características clínico-patológicas dos pacientes com OSCC.

Fator	N (%)	Extensão		BubR1			
		≤74% N(%)	≥75% N(%)	Valor p <sup>c</sup>	Intensidade		Valor p <sup>c</sup>
					Leve/moderado N(%)	Forte N(%)	
<b>Total de casos</b>	63(100%)	51(81,0%)	12(19,0%)		33(52,4%)	30(47,6%)	
<b>Gênero</b>							
Feminino	17(27,0%)	13(76,5%)	4(23,5%)	NS	11(64,7%)	6(35,3%)	NS
Masculino	46(73,0%)	38(82,6%)	8(17,4%)		22(47,8%)	24(52,2%)	
<b>Idade</b>							
<62 anos	30(47,6%)	23(76,7%)	7(23,3%)	NS	14(46,7%)	16(53,3%)	NS
≥62 anos	33(52,4%)	28(84,8%)	5(15,2%)		19(57,6%)	14(42,4%)	
<b>Hábitos<sup>a</sup></b>							
Sem hábitos	13(23,2%)	10(76,9%)	3(23,1%)	NS	10(76,9%)	3(23,1%)	NS
Álcool	4(7,1%)	3(75,0%)	1(25,0%)		3(75,0%)	1(25,0%)	
Tabaco	10(17,9%)	7(70,0%)	3(30,0%)		2(20,0%)	8(80,0%)	
Álcool e tabaco	29(51,8%)	24(82,8%)	5(17,2%)		14(48,3%)	15(51,7%)	
<b>Localização</b>							
Lábio	6(9,5%)	6(100%)	0(0,0%)	NS	5(83,3%)	1(16,7%)	NS
Pavimento da boca	7(11,1%)	6(85,7%)	1(14,3%)		2(28,6%)	5(71,4%)	
Língua	24(38,1%)	15(62,5%)	9(37,5%)		12(50,0%)	12(50,0%)	
Mucosa jugal	3(4,8%)	3(100%)	0(0,0%)		3(100%)	0(0,0%)	
Retromolar	11(17,5%)	10(90,9%)	1(9,1%)		5(45,5%)	6(54,5%)	
Palato duro	6(9,5%)	6(100%)	0(0,0%)		5(83,3%)	1(16,7%)	
Gengiva	6(9,5%)	5(83,3%)	1(16,7%)		1(16,7%)	5(83,3%)	
<b>Tamanho tumor</b>							
T1	18(28,6%)	14(77,8%)	4(22,2%)	NS	13(72,2%)	5(27,8%)	0,040
T2	29(46,0%)	25(86,2%)	4(13,8%)		16(55,2%)	13(44,8%)	
T3	2(3,2%)	2(100%)	0(0,0%)		1(50,0%)	1(50,0%)	
T4	14(22,2%)	10(71,4%)	4(28,6%)		3(21,4%)	11(78,6%)	
<b>N status</b>							
N0	38(60,3%)	33(86,8%)	5(13,2%)	NS	25(65,8%)	13(34,2%)	NS
N1	10(15,9%)	7(70,0%)	3(30,0%)		4(40,0%)	6(60,0%)	
N2	14(22,2%)	11(78,6%)	3(21,4%)		4(28,6%)	10(71,4%)	
N3	1(1,6%)	0(0,0%)	1(100%)		0(0,0%)	1(100%)	
<b>Estadio</b>							
I	13(20,6%)	12(92,3%)	1(7,7%)	NS	10(76,9%)	3(23,1%)	0,011
II	21(33,3%)	19(90,5%)	2(9,5%)		14(66,7%)	7(33,3%)	
III	9(14,3%)	6(66,7%)	3(33,3%)		4(44,4%)	5(55,6%)	
IV	20(31,7%)	14(70,0%)	6(30,0%)		5(25,0%)	15(75,0%)	
<b>Tratamento</b>							
CG	29(46,6%)	24(82,8%)	5(17,2%)	NS	20(69,0%)	9(31,0%)	NS
CG e RT	18(28,6%)	14(77,8%)	4(22,2%)		8(44,4%)	10(55,6%)	
QT e outros	11(17,5%)	10(90,9%)	1(9,1%)		4(36,4%)	7(63,6%)	
Tratamento suporte	5(7,9%)	3(60,0%)	2(40,0%)		1(20,0%)	4(80,0%)	
<b>Grau tumor</b>							
G1	39(61,9%)	35(89,7%)	4(10,3%)	NS	26(66,7%)	13(33,3%)	NS
G2	22(34,9%)	15(68,2%)	7(31,8%)		7(31,8%)	15(68,2%)	
G3	2(3,2%)	1(50,0%)	1(50,0%)		0(0,0%)	2(100%)	
<b>Margem<sup>b</sup></b>							
Sem tumor	27(55,1%)	22(81,5%)	5(18,5%)	NS	14(51,9%)	13(48,1%)	NS
Próximas	13(26,5%)	11(84,6%)	2(15,4%)		8(61,5%)	5(38,5%)	
Com tumor	9(18,4%)	9(100%)	0(0,0%)		6(66,7%)	3(33,3%)	
<b>Permeação perineural</b>							
Ausência	56(88,9%)	45(80,4%)	11(19,6%)	NS	30(53,6%)	26(46,4%)	NS
Presença	7(11,1%)	6(11,8%)	1(8,3%)		3(42,9%)	4(57,1%)	
<b>Invasão linfática</b>							
Ausência	59(93,7%)	48(81,4%)	11(18,6%)	NS	32(54,2%)	27(45,8%)	NS
Presença	4(6,3%)	3(75,0%)	1(25,0%)		1(25,0%)	3(75,0%)	

CG, cirurgia; RT, radioterapia; QT, quimioterapia; NS, estatisticamente não significativo. <sup>a</sup> Não avaliável em 7 casos; <sup>b</sup> Não avaliável em 14 casos; <sup>c</sup> *Chi-square test*.

**Tabela 6** – Associação entre os parâmetros de extensão e intensidade da expressão da proteína Mad2 e as características clínico-patológicas dos pacientes com OSCC.

Fator	N (%)	Extensão		Mad2			
		≤74% N(%)	≥75% N(%)	Valor p <sup>c</sup>	Leve/moderado N(%)	Forte N(%)	Valor p <sup>c</sup>
<b>Total de casos</b>	54(100%)	36(66,7%)	18 (33,3%)		31(57,4%)	23(42,6%)	
<b>Gênero</b>							
Feminino	14(25,9%)	8(57,1%)	6(42,9%)	NS	9(64,3%)	5(35,7%)	NS
Masculino	40(74,1%)	28(70,0%)	12(30,0%)		22(55,0%)	18(45,0%)	
<b>Idade</b>							
<62 anos	25(46,3%)	17(68,0%)	8(32,0%)	NS	10(40,0%)	15(60,0%)	0,016
≥62 anos	29(53,7%)	19(65,5%)	10(34,5%)		21(72,4%)	8(27,6%)	
<b>Hábitos<sup>a</sup></b>							
Sem hábitos	12(24,5%)	7(58,3%)	5(41,7%)	NS	8(66,7%)	4(33,3%)	NS
Álcool	5(10,2%)	1(20,0%)	4(80,0%)		4(80,0%)	1(20,0%)	
Tabaco	9(18,4%)	6(66,7%)	3(33,3%)		5(55,6%)	4(44,4%)	
Álcool + tabaco	23(46,9%)	17(73,9%)	6(26,1%)		11(47,8%)	12(52,2%)	
<b>Localização</b>							
Lábio	6(11,1%)	3(50,0%)	3(50,0%)	NS	4(66,7%)	2(33,3%)	NS
Pavimento da boca	6(11,1%)	5(83,3%)	1(16,7%)		3(50,0%)	3(50,0%)	
Língua	19(35,2%)	14(73,7%)	5(26,3%)		10(52,6%)	9(47,9%)	
Mucosa jugal	3(5,6%)	1(33,3%)	2(66,7%)		2(66,7%)	1(33,3%)	
Retromolar	7(13,0%)	5(71,4%)	2(28,6%)		4(57,1%)	3(42,9%)	
Palato duro	8(14,8%)	5(62,5%)	3(37,5%)		4(50,0%)	4(50,0%)	
Gengiva	5(9,3%)	3(60,0%)	2(40,0%)		4(80,0%)	1(20,0%)	
<b>Tamanho tumor</b>							
T1	14(25,9%)	11(78,6%)	3(21,4%)	NS	9(64,3%)	5(35,7%)	NS
T2	24(44,4%)	17(70,8%)	7(29,2%)		17(70,8%)	7(29,2%)	
T3	2(3,7%)	1(50,0%)	1(50,0%)		1(50,0%)	1(50,0%)	
T4	14(25,9%)	7(50,0%)	7(50,0%)		4(28,6%)	10(71,4%)	
<b>N status</b>							
N0	32(59,3%)	22(68,8%)	10(31,3%)	NS	21(65,6%)	11(34,4%)	NS
N1	9(16,7%)	8(88,9%)	1(11,1%)		5(55,6%)	4(44,4%)	
N2	11(20,4%)	6(54,5%)	5(45,5%)		5(45,5%)	6(54,5%)	
N3	2(3,7%)	0(0,0%)	2(100%)		0(0,0%)	2(100%)	
<b>Estadio</b>							
I	10(18,5%)	8(80,0%)	2(20,0%)	NS	7(70,0%)	3(30,0%)	NS
II	18(33,3%)	13(72,2%)	5(27,8%)		13(72,2%)	5(27,8%)	
III	8 (14,8%)	6(75,0%)	2(25,0%)		5(62,5%)	3(37,5%)	
IV	18(33,3%)	9(50,0%)	9(50,0%)		6(33,3%)	12(66,7%)	
<b>Tratamento</b>							
CG	23(42,6%)	19(82,6%)	4(17,4%)	NS	16(69,6%)	7(30,4%)	NS
CG+RT	16(29,6%)	9(56,3%)	7(43,8%)		11(68,8%)	5(31,3%)	
QT e outros	11(20,4%)	5(45,5%)	6(54,5%)		1(9,1%)	10(90,9%)	
Suporte	4(7,4%)	3(75,0%)	1(25,5%)		3(75,0%)	1(25,0%)	
<b>Grau tumor</b>							
G1	31(57,4%)	22(71,0%)	9(29,0%)	NS	19(61,3%)	12(38,7%)	NS
G2	20(37,0%)	14(70,0%)	6(30,0%)		11(55,0%)	9(45,0%)	
G3	3(5,6%)	0(0,0%)	3(100%)		1(33,3%)	2(66,7%)	
<b>Margem<sup>b</sup></b>							
Sem tumor	24(57,1%)	16(66,7%)	8(33,3%)	NS	14(58,3%)	10(41,7%)	NS
Próximas	10(23,8%)	8(80,0%)	2(20,0%)		6(60,0%)	4(40,0%)	
Com tumor	8(19,0%)	6(75,0%)	2(25,0%)		6(75,0%)	2(25,0%)	
<b>Permeação perineural</b>							
ausência	47(87,0%)	30(63,8%)	17(36,2%)	NS	27(57,4%)	20(42,6%)	NS
presença	7(13,0%)	6(85,7%)	1(14,3%)		4(57,1%)	3(42,9%)	
<b>Invasão linfática</b>							
ausência	51(94,4%)	33(64,7%)	18(35,3%)	NS	31(60,8%)	20(39,2%)	NS
presença	3 (5,6%)	3(8,3%)	0(0,0%)		0(0,0%)	3(13,0%)	

CG, cirurgia; RT, radioterapia; QT, quimioterapia; RQT, radioquimioterapia; NS, estatisticamente não significativo.<sup>a</sup> Não avaliável em 5 casos.<sup>b</sup> Não avaliável em 12 casos.<sup>c</sup> *Chi-square test*.

## 6. EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS BUBR1 E MAD2 E O VALOR PROGNÓSTICO NO OSCC

No sentido de conhecer o significado clínico da expressão das proteínas BubR1 e Mad2, estudamos a sua correlação e das restantes características clinico-patológicas, com a *Cancer-Specific Survival* (CSS) ou *Recurrence-Free Survival* (RFS), de forma a verificar o seu potencial como marcadores de prognóstico no OSCC.

No período total de *follow-up* dos pacientes em estudo, 58,5% (n=38) permaneceram vivos sem OSCC e 41,5% (n=27) morreram em consequência do tumor. O período médio de *follow-up*, para todos os pacientes, foi de 37,13±29,41 meses (mínimo 1 e máximo 125 meses), sendo a CSS a 3 anos dos pacientes com OSCC de 61,0% e a RFS de 49,9%.

Para estudar a influência das variáveis clinico-patológicas e a expressão das proteínas BubR1 e Mad2, na sobrevida dos pacientes com OSCC foi realizada uma análise univariada usando o método *Kaplan-Meier* e o teste *log-rank*. Nesta análise as variáveis idade média ( $p=0,018$ ), tamanho do tumor ( $p<0,001$ ), N *status* ( $p<0,001$ ), estadio ( $p<0,001$ ), modalidade terapêutica ( $p<0,001$ ) e a expressão da proteína BubR1, avaliada pela extensão ( $p=0,026$ ) e intensidade ( $p<0,001$ ) mostraram associação estatisticamente significativa com a CSS (Tabela 7, Figura 9 e 10).

Os pacientes com idade média  $\geq 62$  apresentaram uma maior sobrevivência aos 3 anos de *follow-up*. Por outro lado, os pacientes com tumores de dimensão T4 e estadio III e IV apresentaram uma menor sobrevivência relativamente aos pacientes com tumores de menor dimensão e de estádios menos avançados, respetivamente, assim como reportado por outros autores (Gonzalez-Moles et al., 2002; Lo et al., 2003; Munoz Guerra et al., 2003). Na interpretação dos resultados relativos às características clinico-patológicas N *status* e modalidade terapêutica deve ser considerado o fato da amostra ser maioritariamente constituída por casos que não apresentam metástases ganglionares (N0) ou que o tratamento efetuado foi a cirurgia, o que pode, de certa forma, influenciar a associação e conclusões a retirar sobre a CSS. Não obstante, no que diz respeito à modalidade terapêutica foram os pacientes sujeitos apenas a tratamento de suporte que apresentaram uma menor sobrevivência. Relativamente às metástases ganglionares os pacientes com N1 e N2 apresentaram uma menor CSS. Na literatura, a existência de nódulos linfáticos metastisados é considerado um fator de prognóstico importante e está associado a uma menor sobrevida dos pacientes com o OSCC (Massano et al., 2006).

Tendo em conta expressão da proteína BubR1, os pacientes com OSCC que evidenciaram uma extensão de marcação  $\geq 75\%$  apresentaram uma menor sobrevivência, sendo que aos 3 anos de acompanhamento clínico apenas 41,7% dos indivíduos se encontravam vivos (Tabela 7 e Figura 9). Da mesma forma, os pacientes com tumores que evidenciaram uma intensidade forte da marcação da proteína BubR1 apresentaram uma menor sobrevivência, permanecendo vivos apenas (40,1%) dos pacientes (Tabela 7 e Figura 10). Estes resultados são similares aos já descritos no OSCC (Lira et al., 2010). Um outro estudo indicia que a sobreexpressão da proteína BubR1 está associada a um período mais longo de sobrevivência, mas não apresentou significância estatística (Rizzardi et al., 2011). Noutros tipos de tumor a expressão aumentada da proteína BubR1 encontra-se associada a uma menor CSS (Hannisdal et al., 2010; Liu et al., 2009).

No nosso estudo a expressão da proteína Mad2 não mostrou qualquer associação significativa com a CSS, mesmo considerando a intensidade e extensão da marcação. Apesar de não existir nenhum estudo sobre a expressão imunohistoquímica desta proteína no OSCC, noutros tipos de cancro a sua sobreexpressão tem vindo a ser associada à curta sobrevida dos pacientes (Kato et al., 2011; Yu et al., 2010; Zhang et al., 2008).

Assim como demonstrado na tabela 7, observamos uma associação significativa apenas entre a RFS e o género ( $p=0,005$ ), N *status* ( $p=0,004$ ) e modalidade terapêutica ( $p=0,012$ ). Desta forma, existiu uma maior percentagem de pacientes vivos e sem recidiva no sexo masculino (54,8%) do que do sexo feminino (33,3%). No entanto é necessário ter em conta que esta diferença pode dever-se a uma amostra maioritariamente constituída por homens, género em que é mais frequente a ocorrência deste tipo de tumor (Ferlay et al., 2010b). Relativamente ao N *status*, foi registada uma maior sobrevivência sem recidiva da doença nos pacientes que apresentaram N3, nos quais não se registou nenhum evento (recidiva). A modalidade terapêutica que apresentou uma pior sobrevida dos pacientes foi a quimioterapia e outros, evidenciando a cirurgia de remoção do tumor uma melhor sobrevida associada.

Relativamente à expressão das proteínas do *checkpoint* em estudo não foi demonstrada qualquer associação com a RFS ( $p>0,05$ ). Um outro estudo, desenvolvido em amostras histológicas de OSCC, e em semelhança aos nossos resultados, não apresentou uma associação significativa da expressão da proteína BubR1 com a sobrevivência dos pacientes sem recidiva em análise (Rizzardi et al., 2011). No cancro do ovário, a expressão positiva da proteína BubR1 foi considerada como um marcador de prognóstico para a RFS, evidenciando uma menor sobrevivência dos pacientes,

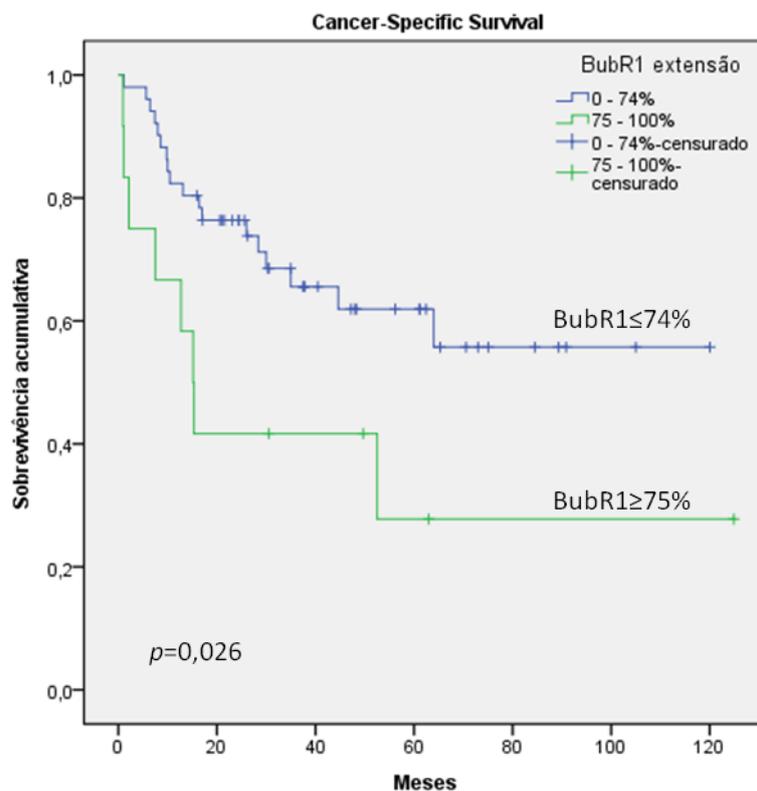
relativamente aos pacientes cujos tumores apresentaram uma marcação negativa (Lee et al., 2009). Também no carcinoma do ovário, mas neste caso relativamente à expressão da proteína Mad2, foi evidenciada uma associação entre a intensidade da sua marcação e uma menor RFS (McGrogan et al., 2014).

**Tabela 7** – Análise univariada da *cancer-specific survival* (CSS) e *recurrence-free survival* (RFS) a 3 anos, de acordo com as características clínico-patológicas e a expressão da BubR1 e Mad2 no OSCC.

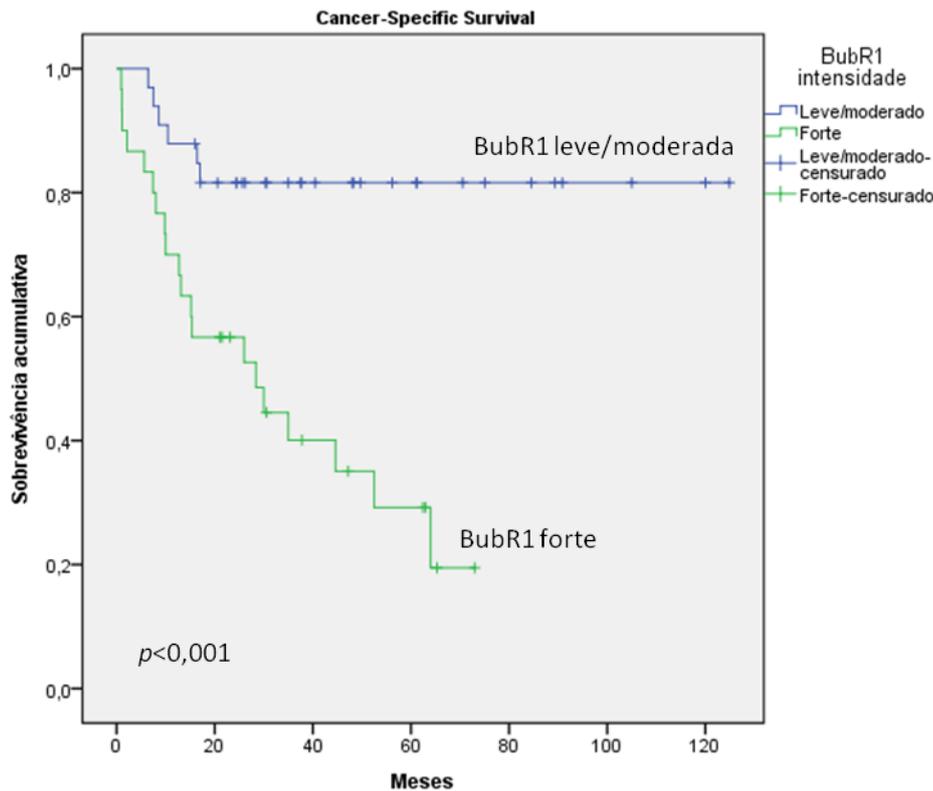
Fator	N	Morte	CSS <sup>a</sup>	Valor <i>p</i> <sup>b</sup>	N <sup>c</sup>	Recorrência	RFS <sup>a</sup>	Valor <i>p</i> <sup>b</sup>
<b>Género</b>								
Feminino	18	8	60,6	NS	15	11	33,3	0,005
Masculino	47	19	61,2		40	16	54,8	
<b>Idade</b>								
<62 anos	32	18	42,1	0,018	24	14	34,2	NS
≥62 anos	33	9	78,8		31	13	59,9	
<b>Hábitos<sup>a</sup></b>								
Sem hábitos	14	6	56,3	NS	12	8	33,3	NS
Álcool	5	1	100		5	1	80,0	
Tabaco	10	3	70,0		9	3	66,7	
Álcool + tabaco	29	16	46,6		23	13	31,0	
<b>Localização</b>								
Lábio	6	1	83,3	NS	6	1	83,3	NS
Pavimento da boca	7	4	71,4		7	6	14,3	
Língua	24	9	66,7		20	8	65,0	
Mucosa jugal	3	0	100		3	1	66,7	
Retromolar	11	6	31,2		8	4	37,5	
Palato duro	8	3	60,0		7	4	42,9	
Gengiva	6	4	33,3		4	3	25,0	
<b>Tamanho tumor</b>								
T1	18	3	88,5	<0,001	18	8	60,0	NS
T2	29	10	67,9		28	13	45,1	
T3	2	1	50,0		1	0	100	
T4	16	13	15,6		8	6	25,0	
<b>N status</b>								
N0	38	9	81,6	<0,001	35	13	63,5	0,004
N1	11	6	23,9		9	6	20,8	
N2	14	11	21,4		10	8	30,0	
N3	2	1	50,0		1	0	100	
<b>Estadio</b>								
I	13	1	90,9	<0,001	13	5	68,4	NS
II	21	6	76,2		20	8	57,8	
III	9	4	41,5		8	4	40,0	
IV	22	16	26,9		14	10	23,8	
<b>Tratamento</b>								
CG	29	4	93,1	<0,001	29	9	70,4	0,012
CG e RT	18	9	52,5		18	13	23,8	
QT e outros	13	9	23,9		8	5	33,3	
Suporte	5	5	0,0		-	-	-	
<b>Grau tumor</b>								
G1	39	12	69,3	NS	34	15	55,6	NS
G2	23	13	46,2		18	10	41,7	
G3	3	2	66,7		3	2	33,3	
<b>Margem<sup>d</sup></b>								
Sem tumor	28	8	81,0	NS	26	8	67,9	NS
Próximas	13	5	59,3		13	8	35,9	
Com tumor	10	5	43,8		9	6	22,2	
<b>Invasão perineural</b>								
Ausência	58	23	63,1	NS	48	22	52,2	NS

Presença	7	4	42,9		7	5	28,6	
<b>Invasão linfática</b>								
Ausência	61	26	60,3	NS	51	26	47,9	NS
Presença	4	1	75,0		4	1	75,0	
<b>BubR1<sup>e</sup></b>								
≤74%	51	18	65,6	0,026	45	22	48,4	NS
≥75%	12	8	41,7		9	5	44,4	
Leve/moderado	33	6	81,6	<0,001	32	14	59,4	NS
Forte	30	20	40,1		22	13	32,7	
<b>Mad2<sup>f</sup></b>								
≤74%	36	15	60,0	NS	30	16	48,4	NS
≥75%	18	9	61,1		15	7	50,0	
Leve/moderado	31	12	66,4	NS	27	13	49,7	NS
Forte	23	12	51,4		18	10	47,1	

CG, cirurgia; RT, radioterapia; QT, quimioterapia; NS, estatisticamente não significativo;<sup>a</sup> Percentagem de casos sem o evento até aos 3 anos de follow-up (*Kaplan-Meier* estimativa da probabilidade de sobrevivência);<sup>b</sup> *Log-rank test*; <sup>c</sup> Pacientes com persistência da doença foram excluídos; <sup>d</sup> Informação não disponível para todos os pacientes; <sup>e</sup> n=63; <sup>f</sup> n=54.



**Figura 9 – Curva de *Kaplan-Meier* de acordo com a extensão da marcação da proteína BubR1.** A extensão da marcação da proteína BubR1 ≥75% apresentou uma menor *Cancer-specific survival* dos pacientes com OSCC.



**Figura 10 – Curva de Kaplan-Meier de acordo com a intensidade da marcação da proteína BubR1.** A intensidade forte da marcação da proteína BubR1 apresentou uma menor *Cancer-specific survival* dos pacientes com OSCC.

As variáveis que obtiveram valor significativo na análise univariada foram incluídas numa análise multivariada pelo método de *Cox regression* de forma a avaliar o seu valor de prognóstico independente. Desta forma, foi encontrado um valor de pronóstico independente para as variáveis modalidade terapêutica, N *status* e intensidade da marcação da proteína BubR1, relativamente à CSS (Tabela 8). De acordo com a análise multivariada relativamente à RFS apenas o género dos pacientes evidenciou significado estatístico independente na sobrevivência livre de recidiva (Tabela 9). No entanto, nesta interpretação deve ser considerado o fato da amostra ser constituída maioritariamente por pacientes do sexo masculino o que pode, de alguma forma, influenciar esta observação.

Os resultados obtidos, na análise multivariada, sugerem que a intensidade da proteína BubR1 pode ser considerada um fator independente de prognóstico. Assim, os casos de OSCC que apresentaram uma intensidade forte (HR 2,903, IC 95% 1,109-7,600,  $p=0,030$ ) mostraram uma menor sobrevida dos pacientes, e portanto um pior prognóstico com um HR associado de 2,903. O único estudo, no OSCC, que demonstrou

uma menor sobrevivência dos pacientes, nos casos em que existia uma sobreexpressão da proteína BubR1, não o evidenciou de forma independente (Lira et al., 2010). Desta forma, o nosso trabalho, segundo o nosso conhecimento, é o primeiro a avançar que a intensidade da marcação da proteína BubR1 tem um valor independente como prognóstico, relativo à sobrevivência dos pacientes com OSCC.

No que diz respeito à proteína do checkpoint mitótico Mad2, não se verificou tanto na análise univariada, como multivariada, um valor significativo da sua expressão relativamente ao prognóstico dos pacientes. Não obstante, como referenciado previamente, o menor número de casos avaliados para esta proteína poderá ser uma limitação relativa a esta análise.

**Tabela 8** – Análise multivariada da *Cancer-specific survival* nas variáveis, com efeito independente significativo, relativamente à idade média, modalidade terapêutica, estadió, T *status*, N *status* e intensidade de BubR1 no OSCC.

Variáveis <sup>a</sup>	Valor p	HR	IC 95%
<b>Idade média</b>	0,953	1,031	0,378-2,814
<b>Modalidade terapêutica</b>	0,001	3,125	1,636-5,969
<b>Estadió</b>	0,213	0,560	0,225-1,395
<b>T <i>status</i></b>	0,178	1,468	0,839-2,570
<b>N <i>status</i></b>	0,014	2,955	1,246-7,006
<b>Intensidade BubR1</b>	0,030	2,903	1,109-7,600

HR, *Hazard ratio*; IC, intervalo de confiança para o HR.

<sup>a</sup> Variáveis incluídas na análise multivariada *Cox regression*: idade média, <62 anos vs ≥62 anos (referência categórica); modalidade terapêutica (variável ordinal); estadió (variável ordinal); T *status* (variável ordinal); N *status* (variável ordinal); e intensidade BubR1, leve/moderada vs forte (referência categórica).

**Tabela 9** – Análise multivariada da *Reccurrence-free survival* das variáveis, com efeito independente significativo, relativamente ao género, modalidade terapêutica e N *status* no OSCC.

Variáveis <sup>a</sup>	Valor p	HR	95% IC
<b>Género<sup>c</sup></b>	0,003	0,284	0,126-0,643
<b>Modalidade terapêutica</b>	0,088	1,657	0,928-2,958
<b>N <i>status</i><sup>f</sup></b>	0,235	1,324	0,833-2,103

HR, *Hazard ratio*; IC, intervalo de confiança para o HR.

<sup>a</sup> Variáveis incluídas na análise multivariada *Cox regression*: género, feminino vs masculino (referência categórica); modalidade terapêutica (variável ordinal) e N *status* (variável ordinal).



**CAPÍTULO V.**  
**CONCLUSÕES**

---

A alteração do nível de expressão das proteínas, intervenientes no *checkpoint* mitótico, tem vindo a ser reportada em vários tipos de cancro, e associada a um mau prognóstico. No entanto, muito pouco se sabe acerca da expressão das proteínas do *checkpoint* mitótico no carcinoma oral de células escamosas (OSCC). Nesse intuito, com este trabalho, propusemo-nos estudar a expressão das proteínas BubR1, Mad2 e Bub3 e associação com as características clínico-patológicas, de forma a avaliar o seu valor como fator de prognóstico em pacientes com OSCC.

Os nossos resultados evidenciaram: (1) um nível de expressão aumentado das proteínas BubR1 e Mad2 no OSCC, relativamente às amostras de tecido da mucosa oral normal; (2) uma associação entre a expressão das proteínas BubR1 e Mad2, relativamente à intensidade da marcação, nos casos em análise; (3) uma associação significativa entre a expressão das proteínas BubR1 e Mad2 e o marcador de proliferação Ki-67; (4) a associação da intensidade da marcação das proteínas BubR1 e Mad2 com a dimensão e o estadio do tumor, e a idade média dos pacientes, respetivamente; e (5) um valor independente de prognóstico da intensidade da marcação da proteína BubR1, relativa à sobrevivência dos pacientes com OSCC. Não obstante, os resultados obtidos não permitiram caracterizar e analisar a expressão da proteína Bub3.

Em conclusão, o nosso estudo demonstrou e caracterizou pela primeira vez a expressão da proteína Mad2 no OSCC. A expressão desta proteína, assim como a da BubR1, mostrou uma associação com a expressão do marcador Ki-67, o que sugere o envolvimento destas proteínas do *checkpoint* mitótico na proliferação e progressão do OSCC.

A expressão da proteína Mad2, na análise univariada e multivariada, não evidenciou um valor significativo no prognóstico dos pacientes. Por outro lado, os resultados obtidos sugerem, pela primeira vez, a expressão da proteína BubR1, avaliada pelo parâmetro intensidade, como um marcador independente de prognóstico da sobrevida nos pacientes com OSCC. Este dado é relevante, uma vez que demonstra um potencial valor da proteína BubR1 como marcador molecular, para identificar grupos de alto risco no OSCC.

**CAPÍTULO VI.**  
**PERSPETIVAS FUTURAS**

---

Tendo em conta os resultados obtidos e discutidos na presente dissertação, em amostras histológicas de pacientes com OSCC, e abordagens anteriores realizadas pelo grupo, o projeto foi direcionado para o estudo do valor das proteínas do *checkpoint* mitótico como alvo terapêutico recorrendo a siRNAs (small interfering RNA) e moléculas inibidoras. Os ensaios foram desenvolvidos numa linha humana derivada do carcinoma escamoso da língua – SCC25. Adicionalmente, e segundo a influência na viabilidade celular causada pela depleção ou inibição das proteínas do *checkpoint*, iniciamos um estudo para avaliar se existe um efeito sinérgico, quando combinados o uso destas moléculas e o taxol – uma das drogas amplamente usadas no tratamento quimioterápico de vários tipos de cancro. Estes resultados são ainda preliminares e continuam a ser explorados pelo grupo de trabalho, razão pela qual não constam da presente dissertação. Adicionalmente, este estudo funcional será alargado a outro tipo de proteínas intervenientes no controlo da mitose, tendo em conta a especificidade de funções que exercem no mesmo.

Para além da continuidade desta abordagem científica, é nossa pretensão alargar o estudo imunohistoquímico do nível de expressão a outras proteínas do *checkpoint*, e adicionalmente em amostras histológicas de lesões pré-neoplásicas da cavidade oral, no sentido de conhecer qual a relação entre a sua expressão e o processo de carcinogénese do OSCC. Ainda a este nível, o grupo perspectiva retomar o estudo imunohistoquímico da proteína Bub3 no OSCC, de forma a caracterizar a sua marcação e nível de expressão.

**CAPÍTULO VII.**  
**REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

---

- Abrieu, A., L. Magnaghi-Jaulin, J.A. Kahana, M. Peter, A. Castro, S. Vigneron, T. Lorca, D.W. Cleveland, and J.C. Labbe. 2001. Mps1 is a kinetochore-associated kinase essential for the vertebrate mitotic checkpoint. *Cell*. 106:83-93.
- Azevedo, Carlos. 1999. *Biologia Celular e Molecular*. 3ª edição. Lidel-Edições Técnicas, Lisboa, pp. 367-389.
- Barnes, L., Everson, J.W, Reichart, P., Sidransky, D. 2005. World health organization classification of tumours: pathology and genetics of head and neck tumours. IARC Press: Lyon, France, pp. 164-175.
- Bharadwaj, R., and H. Yu. 2004. The spindle checkpoint, aneuploidy, and cancer. *Oncogene*. 23:2016-2027.
- Blot, W.J., J.K. McLaughlin, D.M. Winn, D.F. Austin, R.S. Greenberg, S. Preston-Martin, L. Bernstein, J.B. Schoenberg, A. Stemhagen, and J.F. Fraumeni, Jr. 1988. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. *Cancer research*. 48:3282-3287.
- Brady, D.M., and K.G. Hardwick. 2000. Complex formation between Mad1p, Bub1p and Bub3p is crucial for spindle checkpoint function. *Current biology : CB*. 10:675-678.
- Burum-Auensen, E., P.M. De Angelis, A.R. Schjolberg, K.L. Kravik, M. Aure, and O.P. Clausen. 2007. Subcellular localization of the spindle proteins Aurora A, Mad2, and BUBR1 assessed by immunohistochemistry. *The journal of histochemistry and cytochemistry : official journal of the Histochemistry Society*. 55:477-486.
- Califano, J., P. van der Riet, W. Westra, H. Nawroz, G. Clayman, S. Piantadosi, R. Corio, D. Lee, B. Greenberg, W. Koch, and D. Sidransky. 1996. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer research*. 56:2488-2492.
- Campo-Trapero, J., J. Cano-Sanchez, B. Palacios-Sanchez, J.J. Sanchez-Gutierrez, M.A. Gonzalez-Moles, and A. Bascones-Martinez. 2008. Update on molecular pathology in oral cancer and precancer. *Anticancer research*. 28:1197-1205.
- Carlos de Vicente, J., A. Herrero-Zapatero, M.F. Fresno, and J.S. Lopez-Arranz. 2002. Expression of cyclin D1 and Ki-67 in squamous cell carcinoma of the oral cavity: clinicopathological and prognostic significance. *Oral oncology*. 38:301-308.
- Carvalho, A.L., B. Singh, R.H. Spiro, L.P. Kowalski, and J.P. Shah. 2004. Cancer of the oral cavity: a comparison between institutions in a developing and a developed nation. *Head & neck*. 26:31-38.
- Cheeseman, I.M., and A. Desai. 2008. Molecular architecture of the kinetochore-microtubule interface. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 9:33-46.
- Chen, F., G. Yang, and B. Xia. 2013a. Increased expression of the spindle checkpoint protein BubR1 is associated with high cell proliferation in primary gastrointestinal diffuse large B cell lymphoma. *Cell biochemistry and biophysics*. 66:747-752.
- Chen, J.H., K.T. Yeh, Y.M. Yang, J.G. Chang, H.E. Lee, and S.Y. Hung. 2013b. High expressions of histone methylation- and phosphorylation-related proteins are associated with prognosis of oral squamous cell carcinoma in male population of Taiwan. *Med Oncol*. 30:513.

- Choi, S., and J.N. Myers. 2008. Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy. *Journal of dental research*. 87:14-32.
- Davenport, J.W., E.R. Fernandes, L.D. Harris, G.A. Neale, and R. Goorha. 1999. The mouse mitotic checkpoint gene bub1b, a novel bub1 family member, is expressed in a cell cycle-dependent manner. *Genomics*. 55:113-117.
- De Antoni, A., C.G. Pearson, D. Cimini, J.C. Canman, V. Sala, L. Nezi, M. Mapelli, L. Sironi, M. Faretta, E.D. Salmon, and A. Musacchio. 2005. The Mad1/Mad2 complex as a template for Mad2 activation in the spindle assembly checkpoint. *Current biology : CB*. 15:214-225.
- De Stefani, E., H. Deneo-Pellegrini, P. Boffetta, A.L. Ronco, D. Aune, G. Acosta, M. Mendilaharsu, P. Brennan, and G. Ferro. 2009. Dietary patterns and risk of cancer: a factor analysis in Uruguay. *International journal of cancer. Journal international du cancer*. 124:1391-1397.
- DeLuca, K.F., S.M. Lens, and J.G. DeLuca. 2011. Temporal changes in Hec1 phosphorylation control kinetochore-microtubule attachment stability during mitosis. *Journal of cell science*. 124:622-634.
- Deshpande, A.M., and D.T. Wong. 2008. Molecular mechanisms of head and neck cancer. *Expert review of anticancer therapy*. 8:799-809.
- Ditchfield, C., V.L. Johnson, A. Tighe, R. Ellston, C. Haworth, T. Johnson, A. Mortlock, N. Keen, and S.S. Taylor. 2003. Aurora B couples chromosome alignment with anaphase by targeting BubR1, Mad2, and Cenp-E to kinetochores. *The Journal of cell biology*. 161:267-280.
- Dobrossy, L. 2005. Epidemiology of head and neck cancer: magnitude of the problem. *Cancer metastasis reviews*. 24:9-17.
- Doxsey, S., D. McCollum, and W. Theurkauf. 2005. Centrosomes in cellular regulation. *Annual review of cell and developmental biology*. 21:411-434.
- Edge, S.B., and C.C. Compton. 2010. The American Joint Committee on Cancer: the 7th edition of the AJCC cancer staging manual and the future of TNM. *Annals of surgical oncology*. 17:1471-1474.
- Ferlay, J., D.M. Parkin, and E. Steliarova-Foucher. 2010a. Estimates of cancer incidence and mortality in Europe in 2008. *Eur J Cancer*. 46:765-781.
- Ferlay, J., H.R. Shin, F. Bray, D. Forman, C. Mathers, and D.M. Parkin. 2010b. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *International journal of cancer. Journal international du cancer*. 127:2893-2917.
- Garavello, W., P. Bertuccio, F. Levi, F. Lucchini, C. Bosetti, M. Malvezzi, E. Negri, and C. La Vecchia. 2010. The oral cancer epidemic in central and eastern Europe. *International journal of cancer. Journal international du cancer*. 127:160-171.
- Garrote, L.F., R. Herrero, R.M. Reyes, S. Vaccarella, J.L. Anta, L. Ferbeyre, N. Munoz, and S. Franceschi. 2001. Risk factors for cancer of the oral cavity and oro-pharynx in Cuba. *British journal of cancer*. 85:46-54.
- Ghoshal, S., I. Mallick, N. Panda, and S.C. Sharma. 2006. Carcinoma of the buccal mucosa: analysis of clinical presentation, outcome and prognostic factors. *Oral oncology*. 42:533-539.

- Gillison, M.L. 2007. Current topics in the epidemiology of oral cavity and oropharyngeal cancers. *Head & neck*. 29:779-792.
- Gillison, M.L., and D.R. Lowy. 2004. A causal role for human papillomavirus in head and neck cancer. *Lancet*. 363:1488-1489.
- Gomez, I., S. Warnakulasuriya, P.I. Varela-Centelles, P. Lopez-Jornet, M. Suarez-Cunqueiro, P. Diz-Dios, and J. Seoane. 2010. Is early diagnosis of oral cancer a feasible objective? Who is to blame for diagnostic delay? *Oral diseases*. 16:333-342.
- Gonzalez-Moles, M.A., F. Esteban, A. Rodriguez-Archilla, I. Ruiz-Avila, and S. Gonzalez-Moles. 2002. Importance of tumour thickness measurement in prognosis of tongue cancer. *Oral oncology*. 38:394-397.
- Gorbsky, G.J., and W.A. Ricketts. 1993. Differential expression of a phosphoepitope at the kinetochores of moving chromosomes. *The Journal of cell biology*. 122:1311-1321.
- Grabsch, H., S. Takeno, W.J. Parsons, N. Pomjanski, A. Boecking, H.E. Gabbert, and W. Mueller. 2003. Overexpression of the mitotic checkpoint genes BUB1, BUBR1, and BUB3 in gastric cancer--association with tumour cell proliferation. *The Journal of pathology*. 200:16-22.
- Han, J.S., A.J. Holland, D. Fachinetti, A. Kulukian, B. Cetin, and D.W. Cleveland. 2013. Catalytic assembly of the mitotic checkpoint inhibitor BubR1-Cdc20 by a Mad2-induced functional switch in Cdc20. *Molecular cell*. 51:92-104.
- Hannisdal, K., E. Burum-Auensen, A. Schjolberg, P.M. De Angelis, and O.P. Clausen. 2010. Correlation between reduced expression of the spindle checkpoint protein BubR1 and bad prognosis in tonsillar carcinomas. *Head & neck*. 32:1354-1362.
- Herrero, R., X. Castellsague, M. Pawlita, J. Lissowska, F. Kee, P. Balaram, T. Rajkumar, H. Sridhar, B. Rose, J. Pintos, L. Fernandez, A. Idris, M.J. Sanchez, A. Nieto, R. Talamini, A. Tavani, F.X. Bosch, U. Reidel, P.J. Snijders, C.J. Meijer, R. Viscidi, N. Munoz, and S. Franceschi. 2003. Human papillomavirus and oral cancer: the International Agency for Research on Cancer multicenter study. *Journal of the National Cancer Institute*. 95:1772-1783.
- Holland, A.J., and D.W. Cleveland. 2009. Boveri revisited: chromosomal instability, aneuploidy and tumorigenesis. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 10:478-487.
- Hsieh, P.C., Y.K. Chen, K.B. Tsai, T.Y. Shieh, Y.Y. Chang, J.G. Chang, H.L. Wu, and S.F. Lin. 2010. Expression of BUBR1 in human oral potentially malignant disorders and squamous cell carcinoma. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 109:257-267.
- Jelluma, N., T.B. Dansen, T. Sliedrecht, N.P. Kwiatkowski, and G.J. Kops. 2010. Release of Mps1 from kinetochores is crucial for timely anaphase onset. *The Journal of cell biology*. 191:281-290.
- Jemal, A., F. Bray, M.M. Center, J. Ferlay, E. Ward, and D. Forman. 2011. Global cancer statistics. *CA: a cancer journal for clinicians*. 61:69-90.
- Johnson, V.L., M.I. Scott, S.V. Holt, D. Hussein, and S.S. Taylor. 2004. Bub1 is required for kinetochore localization of BubR1, Cenp-E, Cenp-F and Mad2, and chromosome congression. *Journal of cell science*. 117:1577-1589.

- Kang, J., M. Yang, B. Li, W. Qi, C. Zhang, K.M. Shokat, D.R. Tomchick, M. Machius, and H. Yu. 2008. Structure and substrate recruitment of the human spindle checkpoint kinase Bub1. *Molecular cell*. 32:394-405.
- Kato, T., Y. Daigo, M. Aragaki, K. Ishikawa, M. Sato, S. Kondo, and M. Kaji. 2011. Overexpression of MAD2 predicts clinical outcome in primary lung cancer patients. *Lung Cancer*. 74:124-131.
- Khodjakov, A., and C.L. Rieder. 2009. The nature of cell-cycle checkpoints: facts and fallacies. *Journal of biology*. 8:88.
- King, J.M., and R.B. Nicklas. 2000. Tension on chromosomes increases the number of kinetochore microtubules but only within limits. *Journal of cell science*. 113 Pt 21:3815-3823.
- Koontongkaew, S., L. Chareonkitkajorn, A. Chanvitan, M. Leelakriangsak, and P. Amornphimoltham. 2000. Alterations of p53, pRb, cyclin D(1) and cdk4 in human oral and pharyngeal squamous cell carcinomas. *Oral oncology*. 36:334-339.
- Kops, G.J., D.R. Foltz, and D.W. Cleveland. 2004. Lethality to human cancer cells through massive chromosome loss by inhibition of the mitotic checkpoint. *Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America*. 101:8699-8704.
- Kops, G.J., B.A. Weaver, and D.W. Cleveland. 2005. On the road to cancer: aneuploidy and the mitotic checkpoint. *Nature reviews. Cancer*. 5:773-785.
- Kramer, I.R., R.B. Lucas, J.J. Pindborg, and L.H. Sobin. 1978. Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. *Oral surgery, oral medicine, and oral pathology*. 46:518-539.
- Lee, Y.K., E. Choi, M.A. Kim, P.G. Park, N.H. Park, and H. Lee. 2009. BubR1 as a prognostic marker for recurrence-free survival rates in epithelial ovarian cancers. *British journal of cancer*. 101:504-510.
- Levine, A.J., J. Momand, and C.A. Finlay. 1991. The p53 tumour suppressor gene. *Nature*. 351:453-456.
- Li, G.Q., H. Li, and H.F. Zhang. 2003. Mad2 and p53 expression profiles in colorectal cancer and its clinical significance. *World journal of gastroenterology : WJG*. 9:1972-1975.
- Li, G.Q., and H.F. Zhang. 2004. Mad2 and p27 expression profiles in colorectal cancer and its clinical significance. *World journal of gastroenterology : WJG*. 10:3218-3220.
- Li, T.J., R.M. Browne, and J.B. Matthews. 1995. Epithelial cell proliferation in odontogenic keratocysts: a comparative immunocytochemical study of Ki67 in simple, recurrent and basal cell naevus syndrome (BCNS)-associated lesions. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 24:221-226.
- Lin, W.J., R.S. Jiang, S.H. Wu, F.J. Chen, and S.A. Liu. 2011. Smoking, alcohol, and betel quid and oral cancer: a prospective cohort study. *Journal of oncology*. 2011:525976.

- Lippman, S.M., J. Sudbo, and W.K. Hong. 2005. Oral cancer prevention and the evolution of molecular-targeted drug development. *Journal of clinical oncology : official journal of the American Society of Clinical Oncology*. 23:346-356.
- Lira, R.C., F.A. Miranda, M.C. Guimaraes, R.T. Simoes, E.A. Donadi, C.P. Soares, and E.G. Soares. 2010. BUBR1 expression in benign oral lesions and squamous cell carcinomas: correlation with human papillomavirus. *Oncol Rep*. 23:1027-1036.
- Liu, A.W., J. Cai, X.L. Zhao, A.M. Xu, H.Q. Fu, H. Nian, and S.H. Zhang. 2009. The clinicopathological significance of BUBR1 overexpression in hepatocellular carcinoma. *Journal of clinical pathology*. 62:1003-1008.
- Lo, W.L., S.Y. Kao, L.Y. Chi, Y.K. Wong, and R.C. Chang. 2003. Outcomes of oral squamous cell carcinoma in Taiwan after surgical therapy: factors affecting survival. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 61:751-758.
- Logarinho, E., and H. Bousbaa. 2008. Kinetochore-microtubule interactions "in check" by Bub1, Bub3 and BubR1: The dual task of attaching and signalling. *Cell Cycle*. 7:1763-1768.
- Logarinho, E., H. Bousbaa, J.M. Dias, C. Lopes, I. Amorim, A. Antunes-Martins, and C.E. Sunkel. 2004. Different spindle checkpoint proteins monitor microtubule attachment and tension at kinetochores in Drosophila cells. *Journal of cell science*. 117:1757-1771.
- Luo, X., and H. Yu. 2008. Protein metamorphosis: the two-state behavior of Mad2. *Structure*. 16:1616-1625.
- Marur, S., G. D'Souza, W.H. Westra, and A.A. Forastiere. 2010. HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. *The Lancet. Oncology*. 11:781-789.
- Mashberg, A., and A. Samit. 1995. Early diagnosis of asymptomatic oral and oropharyngeal squamous cancers. *CA: a cancer journal for clinicians*. 45:328-351.
- Massano, J., F.S. Regateiro, G. Januario, and A. Ferreira. 2006. Oral squamous cell carcinoma: review of prognostic and predictive factors. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 102:67-76.
- May, K.M., and K.G. Hardwick. 2006. The spindle checkpoint. *Journal of cell science*. 119:4139-4142.
- McCurdy, J.D., J.S. McElroy, D.A. Kopsell, C.E. Sams, and J.C. Sorochan. 2008. Effects of mesotrione on perennial ryegrass (*Lolium perenne* L.) carotenoid concentrations under varying environmental conditions. *Journal of agricultural and food chemistry*. 56:9133-9139.
- McGrogan, B., S. Phelan, P. Fitzpatrick, A. Maguire, M. Prencipe, D. Brennan, E. Doyle, A. O'Grady, E. Kay, F. Furlong, and A. McCann. 2014. Spindle assembly checkpoint protein expression correlates with cellular proliferation and shorter time to recurrence in ovarian cancer. *Human pathology*. 45:1509-1519.
- Mehrotra, R., and S. Yadav. 2006. Oral squamous cell carcinoma: etiology, pathogenesis and prognostic value of genomic alterations. *Indian journal of cancer*. 43:60-66.

- Miller, C.S., and B.M. Johnstone. 2001. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 91:622-635.
- Mithani, S.K., W.K. Mydlarz, F.L. Grumbine, I.M. Smith, and J.A. Califano. 2007. Molecular genetics of premalignant oral lesions. *Oral diseases*. 13:126-133.
- Miyamoto, R., N. Uzawa, S. Nagaoka, Y. Hirata, and T. Amagasa. 2003. Prognostic significance of cyclin D1 amplification and overexpression in oral squamous cell carcinomas. *Oral oncology*. 39:610-618.
- Mondal, G., S. Sengupta, C.K. Panda, S.M. Gollin, W.S. Saunders, and S. Roychoudhury. 2007. Overexpression of Cdc20 leads to impairment of the spindle assembly checkpoint and aneuploidization in oral cancer. *Carcinogenesis*. 28:81-92.
- Monteiro, L.S., L. Antunes, M.J. Bento, and S. Wamakulasuriya. 2013. Incidence rates and trends of lip, oral and oro-pharyngeal cancers in Portugal. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 42:345-351.
- Morse, D.E., W.J. Psoter, D. Cleveland, D. Cohen, M. Mohit-Tabatabai, D.L. Kosis, and E. Eisenberg. 2007. Smoking and drinking in relation to oral cancer and oral epithelial dysplasia. *Cancer causes & control : CCC*. 18:919-929.
- Moura, I.M., M.L. Delgado, P.M. Silva, C.A. Lopes, J.B. do Amaral, L.S. Monteiro, and H. Bousbaa. 2013. High CDC20 expression is associated with poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*.
- Moura, I.M., M.L. Delgado, P.M. Silva, C.A. Lopes, J.B. do Amaral, L.S. Monteiro, and H. Bousbaa. 2014. High CDC20 expression is associated with poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 43:225-231.
- Munoz Guerra, M.F., L. Naval Gias, F.R. Campo, and J.S. Perez. 2003. Marginal and segmental mandibulectomy in patients with oral cancer: a statistical analysis of 106 cases. *Journal of oral and maxillofacial surgery : official journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*. 61:1289-1296.
- Murray, A.W. 2004. Recycling the cell cycle: cyclins revisited. *Cell*. 116:221-234.
- Murugan, A.K., A.K. Munirajan, and N. Tsuchida. 2012. Ras oncogenes in oral cancer: the past 20 years. *Oral oncology*. 48:383-392.
- Musacchio, A., and E.D. Salmon. 2007. The spindle-assembly checkpoint in space and time. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 8:379-393.
- Neville, B.W., and T.A. Day. 2002. Oral cancer and precancerous lesions. *CA: a cancer journal for clinicians*. 52:195-215.
- Nigg, E.A. 2001. Mitotic kinases as regulators of cell division and its checkpoints. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 2:21-32.
- Nylander, K., E. Dabelsteen, and P.A. Hall. 2000. The p53 molecule and its prognostic role in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Journal of oral pathology*

- & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology. 29:413-425.
- Pande, P., M. Mathur, N.K. Shukla, and R. Ralhan. 1998. pRb and p16 protein alterations in human oral tumorigenesis. *Oral oncology*. 34:396-403.
- Pannone, G., S.A. Hindi, A. Santoro, F. Sanguedolce, C. Rubini, R.I. Cincione, S. De Maria, S. Tortorella, R. Rocchetti, S. Cagiano, C. Pedicillo, R. Serpico, L. Lo Muzio, and P. Bufo. 2011. Aurora B expression as a prognostic indicator and possible therapeutic target in oral squamous cell carcinoma. *International journal of immunopathology and pharmacology*. 24:79-88.
- Park, P.E., J.Y. Jeong, S.Z. Kim, and J.Y. Park. 2013. MAD2 Expression in Ovarian Carcinoma: Different Expression Patterns and Levels among Various Types of Ovarian Carcinoma and Its Prognostic Significance in High-Grade Serous Carcinoma. *Korean journal of pathology*. 47:418-425.
- Pati, D., B.R. Haddad, A. Haegele, H. Thompson, F.S. Kittrell, A. Shepard, C. Montagna, N. Zhang, G. Ge, S.K. Otta, M. McCarthy, R.L. Ullrich, and D. Medina. 2004. Hormone-induced chromosomal instability in p53-null mammary epithelium. *Cancer research*. 64:5608-5616.
- Pavia, M., C. Pileggi, C.G. Nobile, and I.F. Angelillo. 2006. Association between fruit and vegetable consumption and oral cancer: a meta-analysis of observational studies. *The American journal of clinical nutrition*. 83:1126-1134.
- Perez-Sayans, M., J.M. Somoza-Martin, F. Barros-Angueira, M.D. Reboiras-Lopez, J.M. Gandara Rey, and A. Garcia-Garcia. 2009. Genetic and molecular alterations associated with oral squamous cell cancer (Review). *Oncology reports*. 22:1277-1282.
- Qi, G., I. Ogawa, Y. Kudo, M. Miyauchi, B.S. Siriwardena, F. Shimamoto, M. Tatsuka, and T. Takata. 2007. Aurora-B expression and its correlation with cell proliferation and metastasis in oral cancer. *Virchows Archiv : an international journal of pathology*. 450:297-302.
- Reuter, C.W., M.A. Morgan, and A. Eckardt. 2007. Targeting EGF-receptor-signalling in squamous cell carcinomas of the head and neck. *British journal of cancer*. 96:408-416.
- Rieder, C.L., R.W. Cole, A. Khodjakov, and G. Sluder. 1995. The checkpoint delaying anaphase in response to chromosome monoorientation is mediated by an inhibitory signal produced by unattached kinetochores. *The Journal of cell biology*. 130:941-948.
- Rivera, C., and B. Venegas. 2014. Histological and molecular aspects of oral squamous cell carcinoma (Review). *Oncology letters*. 8:7-11.
- Rizzardi, C., L. Torelli, E. Barresi, M. Schneider, V. Canzonieri, M. Biasotto, R. Di Lenarda, and M. Melato. 2011. BUBR1 expression in oral squamous cell carcinoma and its relationship to tumor stage and survival. *Head Neck*. 33:727-733.
- Rogers, S.N., J.S. Brown, J.A. Woolgar, D. Lowe, P. Magennis, R.J. Shaw, D. Sutton, D. Errington, and D. Vaughan. 2009. Survival following primary surgery for oral cancer. *Oral oncology*. 45:201-211.

- Rosenquist, K., J. Wennerberg, E.B. Schildt, A. Bladstrom, B. Goran Hansson, and G. Andersson. 2005. Oral status, oral infections and some lifestyle factors as risk factors for oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. A population-based case-control study in southern Sweden. *Acta oto-laryngologica*. 125:1327-1336.
- Ruchaud, S., M. Carmena, and W.C. Earnshaw. 2007. The chromosomal passenger complex: one for all and all for one. *Cell*. 131:230-231.
- Scully, C. 1992. Oncogenes, onco-suppressors, carcinogenesis and oral cancer. *British dental journal*. 173:53-59.
- Scully, C., and J. Bagan. 2009. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. *Oral diseases*. 15:388-399.
- Scully, C., J. Sudbo, and P.M. Speight. 2003. Progress in determining the malignant potential of oral lesions. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 32:251-256.
- Silva, P., J. Barbosa, A.V. Nascimento, J. Faria, R. Reis, and H. Bousbaa. 2011. Monitoring the fidelity of mitotic chromosome segregation by the spindle assembly checkpoint. *Cell proliferation*. 44:391-400.
- Skinner, J.J., S. Wood, J. Shorter, S.W. Englander, and B.E. Black. 2008. The Mad2 partial unfolding model: regulating mitosis through Mad2 conformational switching. *The Journal of cell biology*. 183:761-768.
- Speight, P.M. 2007. Update on oral epithelial dysplasia and progression to cancer. *Head and neck pathology*. 1:61-66.
- Stern, B.M., and A.W. Murray. 2001. Lack of tension at kinetochores activates the spindle checkpoint in budding yeast. *Current biology : CB*. 11:1462-1467.
- Sudakin, V., G.K. Chan, and T.J. Yen. 2001. Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *The Journal of cell biology*. 154:925-936.
- Sullivan, M., and D.O. Morgan. 2007. Finishing mitosis, one step at a time. *Nature reviews. Molecular cell biology*. 8:894-903.
- Talamini, R., S. Vaccarella, F. Barbone, A. Tavani, C. La Vecchia, R. Herrero, N. Munoz, and S. Franceschi. 2000. Oral hygiene, dentition, sexual habits and risk of oral cancer. *British journal of cancer*. 83:1238-1242.
- Tanaka, K., J. Nishioka, K. Kato, A. Nakamura, T. Mouri, C. Miki, M. Kusunoki, and T. Nobori. 2001. Mitotic checkpoint protein hsMAD2 as a marker predicting liver metastasis of human gastric cancers. *Japanese journal of cancer research : Gann*. 92:952-958.
- Tanaka, T., and M. Tanaka. 2011. Oral carcinogenesis and oral cancer chemoprevention: a review. *Pathology research international*. 2011:431246.
- Tanaka, T.U., N. Rachidi, C. Janke, G. Pereira, M. Galova, E. Schiebel, M.J. Stark, and K. Nasmyth. 2002. Evidence that the Ipl1-Sli15 (Aurora kinase-INCENP) complex promotes chromosome bi-orientation by altering kinetochore-spindle pole connections. *Cell*. 108:317-329.

- Tang, Z., H. Shu, D. Oncel, S. Chen, and H. Yu. 2004. Phosphorylation of Cdc20 by Bub1 provides a catalytic mechanism for APC/C inhibition by the spindle checkpoint. *Molecular cell*. 16:387-397.
- Teixeira, J.H., P.M. Silva, R.M. Reis, I.M. Moura, S. Marques, J. Fonseca, L.S. Monteiro, and H. Bousbaa. 2014. An overview of the spindle assembly checkpoint status in oral cancer. *BioMed research international*. 2014:145289.
- Thirthagiri, E., C.M. Robinson, S. Huntley, M. Davies, L.F. Yap, S.S. Prime, and I.C. Paterson. 2007. Spindle assembly checkpoint and centrosome abnormalities in oral cancer. *Cancer letters*. 258:276-285.
- Tsantoulis, P.K., N.G. Kastrinakis, A.D. Tourvas, G. Laskaris, and V.G. Gorgoulis. 2007. Advances in the biology of oral cancer. *Oral oncology*. 43:523-534.
- van Diest, P.J., G. Brugal, and J.P. Baak. 1998. Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value. *Journal of clinical pathology*. 51:716-724.
- Vermeulen, K., D.R. Van Bockstaele, and Z.N. Berneman. 2003. The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer. *Cell proliferation*. 36:131-149.
- Vogelstein, B., and K.W. Kinzler. 1993. The multistep nature of cancer. *Trends in genetics : TIG*. 9:138-141.
- Wang, L., F. Yin, Y. Du, W. Du, B. Chen, Y. Zhang, K. Wu, J. Ding, J. Liu, and D. Fan. 2009. MAD2 as a key component of mitotic checkpoint: A probable prognostic factor for gastric cancer. *American journal of clinical pathology*. 131:793-801.
- Warnakulasuriya, S. 2009. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral oncology*. 45:309-316.
- Warnakulasuriya, S. 2010. Living with oral cancer: epidemiology with particular reference to prevalence and life-style changes that influence survival. *Oral oncology*. 46:407-410.
- Warnakulasuriya, S., G. Sutherland, and C. Scully. 2005. Tobacco, oral cancer, and treatment of dependence. *Oral oncology*. 41:244-260.
- Wassmann, K., and R. Benezra. 2001. Mitotic checkpoints: from yeast to cancer. *Current opinion in genetics & development*. 11:83-90.
- Waters, J.C., R.H. Chen, A.W. Murray, and E.D. Salmon. 1998. Localization of Mad2 to kinetochores depends on microtubule attachment, not tension. *The Journal of cell biology*. 141:1181-1191.
- Weaver, B.A., and D.W. Cleveland. 2007. Aneuploidy: instigator and inhibitor of tumorigenesis. *Cancer research*. 67:10103-10105.
- Wells, W.A. 1996. The spindle-assembly checkpoint: aiming for a perfect mitosis, every time. *Trends in cell biology*. 6:228-234.
- Williams, H.K. 2000. Molecular pathogenesis of oral squamous carcinoma. *Molecular pathology : MP*. 53:165-172.
- Winey, M., and B.J. Huneycutt. 2002. Centrosomes and checkpoints: the MPS1 family of kinases. *Oncogene*. 21:6161-6169.

- Yamamoto, Y., H. Matsuyama, Y. Chochi, M. Okuda, S. Kawauchi, R. Inoue, T. Furuya, A. Oga, K. Naito, and K. Sasaki. 2007. Overexpression of BUBR1 is associated with chromosomal instability in bladder cancer. *Cancer genetics and cytogenetics*. 174:42-47.
- Yu, H. 2002. Regulation of APC-Cdc20 by the spindle checkpoint. *Current opinion in cell biology*. 14:706-714.
- Yu, H. 2006. Structural activation of Mad2 in the mitotic spindle checkpoint: the two-state Mad2 model versus the Mad2 template model. *The Journal of cell biology*. 173:153-157.
- Yu, L., W.C. Guo, S.H. Zhao, J. Tang, and J.L. Chen. 2010. Mitotic arrest defective protein 2 expression abnormality and its clinicopathologic significance in human osteosarcoma. *APMIS : acta pathologica, microbiologica, et immunologica Scandinavica*. 118:222-229.
- Zhang, S.H., A.M. Xu, X.F. Chen, D.H. Li, M.P. Sun, and Y.J. Wang. 2008. Clinicopathologic significance of mitotic arrest defective protein 2 overexpression in hepatocellular carcinoma. *Human pathology*. 39:1827-1834.
- Zhou, J., J. Yao, and H.C. Joshi. 2002. Attachment and tension in the spindle assembly checkpoint. *Journal of cell science*. 115:3547-3555.
- Zimmerman, W., and S.J. Doxsey. 2000. Construction of centrosomes and spindle poles by molecular motor-driven assembly of protein particles. *Traffic*. 1:927-934.
- Zimmermann, M., A. Zouhair, D. Azria, and M. Ozsahin. 2006. The epidermal growth factor receptor (EGFR) in head and neck cancer: its role and treatment implications. *Radiat Oncol*. 1:11.
- Znaor, A., P. Brennan, V. Gajalakshmi, A. Mathew, V. Shanta, C. Varghese, and P. Boffetta. 2003. Independent and combined effects of tobacco smoking, chewing and alcohol drinking on the risk of oral, pharyngeal and esophageal cancers in Indian men. *International journal of cancer. Journal international du cancer*. 105:681-686.