

UNIVERSIDADE TIRADENTES

CURSO DE ODONTOLOGIA

EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA QUINASE
ASSOCIADA À MORTE CELULAR (DAPK) EM CARCINOMA
EPIDERMÓIDE ORAL

Aluno: Ismário Silva de Meneses

Orientador: Dr. Prof. Ricardo Luiz Albuquerque Cavalcanti Junior

ARACAJU – SE

MAIO/2010

ISMÁRIO SILVA DE MENESES

**EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA QUINASE
ASSOCIADA À MORTE CELULAR (DAPK) EM CARCINOMA
EPIDERMÓIDE ORAL**

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado
à Coordenação do curso de Odontologia da
Universidade Tiradentes como pré-requisito
para obtenção do título de Bacharel em
Odontologia, sob a orientação do Dr. Prof.
Ricardo Luiz Albuquerque Cavalcanti Junior.

ARACAJU – SE

MAIO/2010

ISMÁRIO SILVA DE MENESES

**EXPRESSÃO IMUNOHISTOQUÍMICA DA PROTEÍNA QUINASE
ASSOCIADA À MORTE CELULAR (DAPK) EM CARCINOMA
EPIDERMÓIDE ORAL**

Aprovada em 02/06/2010

BANCA EXAMINADORA

Ricardo Luiz Albuquerque Cavalcante Junior

Orientador – Presidente da Banca

1º Examinador - UNIT

Luciana Valente Borges

2º Examinador - UNIT

Henriqui Barbosa de Almeida

AGRADECIMENTOS

“Destes ao teu filho o que lhe pediu, peço-lhe agora sabedoria, maturidade, sensibilidade e respeito para com a minha profissão”. A Ti Senhor, o meu muito obrigado por tudo e para todo sempre.

Aos meus pais, Gilmar e Josivalda, que mesmo com tantas dificuldades me deram uma educação exemplar a quem devo minha índole, caráter e honestidade. Muito obrigado!

Aos meus irmãos, João Victor, Ingrid, Itamar e Isauro, que torceram tanto para que essa hora chegasse. Obrigado pela paciência, amor e motivação.

A Karen, minha amada, que abdicou de tantas coisas para que esse projeto se concretizasse. Que muitas vezes acreditou muito mais na minha capacidade do que eu mesmo, pelo incentivo, paciência, carinho e compreensão. A quem dedico meus dias, minhas noites, meus sonhos e objetivos. Muito obrigado amor!

Aos meus familiares que aguardaram ansiosos para que esse dia chegasse. “Minha avó, tios e primos o grande dia chegou, a festa é nossa!

Aos amigos, que tanto esperaram para ganhar consultas grátis aproveitem vai ser só no primeiro mês.

Ao meu avô materno (in memoriam) que infelizmente não tive a oportunidade de conhecer. A minha avó paterna (in memoriam) que infelizmente não pode aguardar para ver a realização desse sonho.

Aos meus queridos amigos e colegas de faculdade, “gente como foi bom partilhar com vocês minhas alegrias e tristezas, como foi bom crescer e aprender com todos vocês”-. A você, meu irmãozinho Teles, meu muito obrigado por tudo. Marcelão, que prazer estudar contigo cara. Felipão, obrigado por toda ajuda nas pesquisas e foi um prazer ter contribuído em seus trabalhos também. Renata, depois te mando a conta dos tratamentos ortodônticos de seus ratos, brincadeirinha. A Ofélia, Daniel, Larissa, Ysis e a todos os colegas que iniciaram o curso comigo mas deixaram para formarem com as próximas turmas, o meu muito obrigado por tudo.

Ao prof. Ricardo, por sua vocação inequívoca, exemplo inestimável de dedicação a ciência, que me ajudou a concluir esse sonho com muito mais

ciênciа me convidando para desenvolver iniciação científica no LMBE/ITP, além da bolsa de estudo.

Aos meus afilhados Robson e Déia que conviveram e acompanharam de perto os sacrifícios e as alegrias que essa batalha me trouxe.

A família de minha esposa, que me acolheu como um filho, um irmão, um amigo. Obrigado D. Vera, Kenia, Krammer, enfim a todos os “Kodeis”.

Aos mestres que partilharam de forma impar o bem mais precioso que existe, o conhecimento, e com pitadas de experiência. Muito obrigado queridos professores.

A Nely, por sua inquestionável contribuição nos trabalhos e a todos que fazem parte do LMBE.

E por fim, mas não menos importante, aos funcionários e colaboradores que compõem o Curso de Odontologia da Universidade Tiradentes, muito obrigado pela contribuição e paciência conosco.

Ass. Ismário S. Meneses

*"É melhor tentar e falhar,
que preocupar-se e ver a vida passar;
é melhor tentar, ainda que em vão,
que sentar-se fazendo nada até o final.
Eu prefiro na chuva caminhar,
que em dias tristes em casa me esconder.
Prefiro ser feliz, embora louco,
que em conformidade viver ..."*

Martin Luther King

Resumo

Tem sido demonstrado a perda da expressão da proteína quinase associada à morte celular (DAPk) em uma série de neoplasias malignas e que esta perda pode estar relacionada a um aumento no potencial metastático tumoral, mas ainda não foram observados estudos com câncer oral. O objetivo deste trabalho foi avaliar a relação entre a expressão da DAPk e a graduação histológica de malignidade tumoral em carcinoma epidermóide oral (CEO). Para tal trabalho, quarenta casos de CEO foram obtidos a partir dos arquivos do Serviço de Patologia Oral Cirúrgica do Curso de Odontologia da Universidade Tiradentes (Aracaju/SE). Os tumores selecionados foram classificados em lesões de alto ou baixo escore de acordo com os critérios de graduação histológica de malignidade. A relação entre a graduação histológica tumoral e a imunoexpressão da DAPk foi avaliada pelo teste qui-quadrado ($p<0,05$). Observou-se que onze casos (27,5%) representaram tumores de alto grau e 29 (72,5%) de baixo grau. Além disso, 92,86% dos tumores de baixo grau foram positivos para DAPk enquanto apenas 7,14% das lesões de alto grau apresentaram positividade. Esta diferença foi estatisticamente significativa ($p=0,00$). A maioria dos casos de CEO de baixo grau exibiu marcação moderada (55,2%), enquanto que os dois casos de CEO de alto grau positivos (18,2%) apresentaram marcação fraca. Destaca-se que áreas de intenso pleomorfismo e hipercromatismo nuclear se mostraram francamente negativas. Concluiu-se que a imuno-expressão da DAPk está significativamente reduzida em CEOs de alto grau, e sugere-se que tal redução pode estar relacionada à severidade da atipia citológica.

Palavras-chave: imuno-histoquímica, DAP cinase, apoptose, carcinoma de células escamosas

Death-associated protein kinase is underexpressed in high-grade oral squamous cell carcinoma

La expresión de la proteína quinase asociada a muerte celular (DAP quinase) está reduzida em carcinoma de células escamosas orales de alto grado.

Ismário Silva de Meneses ^a, Rafael Reis de Souza ^a, Verónica de Lourdes Sierpe Jeraldo^b, Danielle Rodrigues Ribeiro Cavalcante ^b, Francisco Prado Reis ^{b, c}, Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior ^{b,c}.

^a School of Dentistry, University Tiradentes, Aracaju, Sergipe, Brazil; ^b Post-Graduating Program in Health and Environment, University Tiradentes, Aracaju, Sergipe, Brazil; ^c Laboratory of Morphology and Structural Biology, Science and Technology Institute, Tiradentes University, Aracaju, Sergipe, Brazil.

Summary

An immunohistochemical analysis of 40 cases of oral squamous cell carcinoma was performed to evaluate the relationship between the expression pattern of death-associated protein kinase (DAPk) positive cells with the histological malignancy grading of these lesions. According to our results, eleven cases (27.5%) were high-grade malignancy tumours and 29 (72.5%) were low-grade ones. We found that 92.86% of the low-grade tumours were positive to anti-DAP kinase antibody whereas only 7.14% of the high-grade tumours presented positivity, and this difference was statistically significant ($p<0.01$). Sixteen (55.2%) of the low-grade carcinomas exhibited moderate immunoreactivity whereas ten cases (34.5%) showed weak staining and three cases (10.3%) were negative tumours. Immunostaining was lacking in nine (81.8%) of the high-grade carcinomas and “weak” in the two (18.2%) remaining cases. Thus, DAPk expression is significantly decreased in high-grade oral carcinomas, and evidences indicate that it might be related to the severity of cytological atypia.

Keywords: immunohistochemistry, DAP kinase, apoptosis, squamous cell carcinoma

Sumario

Fue realizado un análisis inmunohistoquímico de 40 casos de carcinoma oral de células escamosas para evaluar la relación entre el patrón de expresión de la proteína quinasa (DAPK) asociada a la muerte celular y la clasificación histológica de malignidad de estas lesiones. Según nuestros resultados, once casos (27,5%) eran tumores de alto grado de malignidad y 29 (72,5%) fueron de bajo grado. Se encontró que 92,86% de los tumores de bajo grado fueron positivos para anticuerpos anti-DAP-quinasa, mientras que sólo 7,14% de los tumores de alto grado presentaron positividad, esta diferencia fue estadísticamente significativa ($p <0,01$). Dieciséis (55,2%) de los carcinomas de bajo grado mostraron inmunorreactividad moderada mientras que diez casos (34,5%) mostraron una tinción débil y tres casos (10,3%) fueron de tumores negativos. La inmunotinción está ausente en nueve (81,8%) de los carcinomas de alto grado y "débil" en los dos (18,2%) casos restantes. De modo que, la expresión DAPK se redujo significativamente en los carcinomas orales de alto grado y las evidencias indican que podría estar relacionado con la severidad de la atipia citológica.

Palabras clave: inmunohistoquímica, DAP kinase, apoptosis, carcinoma de células escamosas

Introduction

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the most common malignant tumour occurring in the oral cavity. In the majority of the cases, it is diagnosed at an advanced stage and consequently present with a poor prognosis (Biazevic *et al*, 2006; Borges *et al*, 2009). In the last few years relevant advancements in the diagnosis and treatment of oral cancer has been observed. Nevertheless, despite this recent improvement, there are still many difficulties in evaluating the prognosis of OSCC. Thus, various studies attempting to establish the role of protooncogenes, antioncogenes and apoptosis-regulating genes in the tumoral progression have recently been performed in order to find more significant information to evaluate and predict the biological behavior of this neoplasm (Albuquerque Júnior *et al* 2003).

The *Death-associated protein kinase* (DAP kinase) is a 160 kDa cytoskeletal-associated calcium/calmodulin-dependent serine/threonine kinase which plays an important role in programmed cell death (Chen *et al*, 2006; Zalckvar *et al*, 2009). Overexpression of DAP kinase has been demonstrated to induce apoptosis in various cell line (Yamamoto *et al* 2002; Pelled *et al* 2002; Pulling *et al* 2004). In the other hands, research has demonstrated that DAP kinase protein expression is frequently reduced or absent in tumour cell lines (Raveh *et al* 2001; Bai *et al* 2004). In addition, low expression of this protein, particularly in response to hypermethylation, has been associated to high invasiveness or metastatic potential of malignant neoplastic cells (Simpson *et al*, 2002; Lehmann *et al* 2002; Gonzalez-Gomez *et al* 2003; Voso *et al*, 2004; Levy *et al*, 2004).

There are only few reports looking at the possible role of DAP kinase in the pathogenesis of oral or head and neck cancer (Sidransky, 2001; Rosas *et al* 2001; Ogi *et al* 2002). Thus the goal of this study is to investigate the relationship between the immunohistochemical expression of DAP kinase and the histological grading of malignancy in squamous cell carcinoma of the oral mucosa.

Material and methods

Forty cases of OSCC were retrieved from the files of the Oral Pathology Service of the School of Dentistry of the University Tiradentes (Aracaju, Brazil). Histological slides of 5 μ m thick were obtained from all the paraffin-embedded specimens. The diagnosis of the tumors was confirmed by light microscopic analysis, and subsequently graded as high or low score according to the criteria of histological malignancy grading established by Byrne *et al* (1989).

For immunohistochemical assessment, 3 μ m thick sections were prepared from formalin-fixed paraffin-embedded specimens. Immunohistochemical staining was carried out using the Labelling Streptoavidin Biotin method (LSAB) (Large Volume Detection System antipolyvalent, Dako, LSAB kit peroxidase, Dako Corporation, Capinteria, CA, USA). The sections were deparaffinized in toluene and submitted to antigen recovery by immersion of the slides in citrate buffer, 0.01M, pH 6.0 treated in microwave oven (three cycles for five minutes each at 650W). After rehydratation in phosphate buffered saline (PBS, pH 7.2), the sections were incubated with the primary antibody anti – DAP kinase (clone V55, Abgent, CA, USA, 1:50, 18h), followed by biotinylated antirabbit

immunoglobulins (Dakopatts) and finally with streptoavidin – peroxidase conjugate (Detection Kit – peroxidase/DAB, Dakopatts). The last two incubations were performed for 30 min at room temperature. The reaction was revealed with 0.03% diaminobenzidine (Sigma) in buffered solution for 12 min and then the sections were counterstained with Meyer's haematoxilin. Non-specific reactivity of the antibodies was checked by omitting the primary antibody.

Two observers evaluated all slides independently, and the immunostaining pattern of the antibody anti-DAP kinase was analyzed by light microscopy, considering the following parameters: (+++), when more than 50% of the tumour cells were labeled, (++) when 10 to 50% were positive; and (+) when less than 10% of positive cells could be seen. Carcinomas lacking immunostained cells were considered negative (-). After the immunohistochemical analysis, these data were correlated with the malignancy histological grading of the tumours. Significance was statistically determined using χ^2 statistics. A P-value < 0.05 was regarded as significant.

Results

Morphological analysis showed that eleven cases (27.5%) were high-grade malignancy tumours and twenty-nine (72.5%) were low-grade malignancy tumors (figure 2a/b). Positive cytoplasmatic immunolabelling could be verified in twenty-eight cases (70.0%) (figure 2c/d). Two (7.14%) of the twenty-eight DAP kinase-positive carcinomas were high-grade tumors whereas twenty-six (92.8%) were low-grade tumours. On the other hands, nine (75%) of the twelve DAP

kinase-negative carcinomas were high-grade tumours and three of them low-grade lesions.

Sixteen (55.2%) of the low-grade carcinomas exhibited moderate immunoreactivity, whereas ten cases (34.5%) showed weak staining. Three cases (10.3%) were negative tumours. Immunostaining was lacking in nine (81.8%) of the high-grade carcinomas and weak in the two remaining cases (18.2%) (table 1). Our results indicated an inverse relationship between DAP kinase immunoreactivity and the histological grading of tumoral malignancy ($p<0.01$). Positive staining was found in isolated cells or little cell groups within larger tumoral islands and sheets. Immunoreactivity showed to be more intense in cells adjacent to keratinization areas (diskeratotic cells and keratin pearls) (figure 2e) but extensively absent in areas of severe cytological atypia (figure 2f).

Discussion

Various studies have demonstrated that DAPk gene transcription is involved in apoptosis phenomenon and therefore it may play a relevant role in suppressing oncogenic transformation (Raveh *et al* 2001; Gonzales-Gomez *et al* 2003; Bai *et al* 2004). DAPk protein downregulates the expression of integrins, and consequently blocks cellular adhesion, the reby activating a particular pathway of apoptosis known as *anoikis* (Wang *et al* 2002). Nevertheless, the capacity to promote apoptosis through DAPk pathway is frequently lost in anoikis-resistant cells, resulting in anchorage independence, a hallmark of malignant tumour cells closely associated to metastasis (Frisch & Screamton 2001). Loss of DAP kinase RNAm and protein expression was found

in human cancer, often as a result of silencing by DNA hypermethylation (Lehmann *et al* 2002; Simpson *et al* 2002; Pulling *et al* 2004). In addition, DAPk appears to be underexpressed in metastatic cell lines (Lehmann *et al* 2002; Simpson *et al* 2002; Pulling *et al* 2004).

We investigated the relationship between the immunohistochemical expression of DAPk and the histological grading of malignancy in forty cases of squamous cell carcinoma of the oral mucosa. According to our results, the intensity of the immunohistochemical expression of DAPk is inversely proportional to the histological malignancy grading of oral squamous cell carcinoma. This theory is supported by the fact that immunoreactivity was more intense in cells adjacent to keratinizatinized areas, hallmarks of well-differentiated tumors, but lacked in areas of severe cytological atypia. Likewise, loss of DAPk expression has been reported in a wide range of tumour types (Raveh *et al* 2001; Lehmann *et al* 2002; Simpson *et al* 2002; Bai *et al* 2004). Surprisingly, three cases of low-grade tumours failed in expressing DAPk. However, it must be emphasized that all those tumors presented marked cytological atypia and minimum keratinization, despite they were classified as low-grade tumors. Thus, these findings seems to point at a link between the phenomenon of “dedifferentiation” and loss of DAPk expression in OSCC. Nevertheless, the mechanism responsible for silencing DAPk gene is not completely clear yet. It has been suggested that hypermethylation of CpG islands (segments of DNA within the gene promoter characterized by extensive repetition of residues of cytosine followed by residues of guanine) might suppress gene transcription (Lehmann *et al* 2002, Gonzalez-Gomez *et al* 2003; Pulling *et al* 2004), but its role in the carcinogenesis of oral carcinoma still

keeps unknown. In addition, the relationship between loss of DAK expression and worse overall survival prognosis was recently demonstrated in breast cancer (Levy *et al* 2004) but further investigations are necessary to assess the role of DAPk in evaluating the survival rates and prognosis of carcinomas of the oral mucosa.

In conclusion, we have found that DAPk expression was significantly decreased in high-grade oral carcinomas, which means that this expression might correlate with the histological malignancy grading of these tumour.

References

- Albuquerque Jr, R.L.C.; Miguel, M.C.C.; Costa, A.L.L. & Souza, L.B. Correlation of C-erbB-2 S-100 expression with the malignancy grading and anatomical site in oral squamous cell carcinoma. *Int. J. Exp. Path.* 84, 259-265, 2003.
- Bai, T.; Tanaka, T.; Yukawa, K.; Maeda, M. & Umesaki, N. Reduced expression of death associated protein kinase in human uterine and ovarian carcinoma cells. *Oncol. Rep.* 11, 661-665, 2004.
- Biazevic, M.G.H.; Castellanos, R.A.; Antunes, J.L.F. & Michel-Crosato, E. Trends in oral cancer mortality in the city of São Paulo, Brazil, 1980-2002. *Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro*, 22(10):2105-2114, out, 2006.
- Borges, F.T.; Garbin, C.A.S.; Carvalhosa, A.A.; Castro, P.H.S. & Hidalgo, L.R.C. Oral cancer epidemiology in a public laboratory in Mato Grosso State, Brazil. *Cad. Saúde Pública, Rio de Janeiro*, 24(9):1977-1982, set, 2009.

Bryne R.; Koppang H.S.; Lilleng R.; Stene T.; Bang G. & Dabelsteen E. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broder's grading in oral squamous cell carcinoma. *J. Oral Pathol. Med.* 18, 432-437, 1989.

Chen, Ruey-Hwa.; Wang, Won-Jing.; & Kuo, Jean-Cheng. The tumor suppressor DAP-kinase links cell adhesion and cytoskeleton reorganization to cell death regulation *Journal of Biomedical Science*, 13: 193–199, 2006.

Frisch S.M. & Scream R.A. Anoikis mechanisms. *Curr. Opin. Cell Biol.* 13, 555-562, 2001.

Gonzalez-Gomez P.; Bello M.J.; Alonso M.E.; Lomas J.; Arjona D.; Amiñoso C.; Campos J.M.; Isla A.; Gutierrez M. & Rey. J.A. Frequent death- associated protein-kinase promoter hypermethylation in brain metastases of solid tumors. *Oncol. Rep.* 10, 1031-1033, 2003.

Lehmann U.; Celikkaya G.; Hasemeier B.; Länger F. & Kreipe H. Promoter Hypermethylation of the Death – Associated Protein Kinase Gene in Breast Cancer is Associated with the Invasive Lobular Subtype. *Clin. Cancer Res.* 62, 6634-6638, 2002.

Lévy D.; Plu-Bureau G.; Decroix Y.; Hugol D.; Rostène W.; Kimchi A. & Gompel A. Death – Associated Protein Kinase Loss of Expression is a New Marker for Breast Cancer Prognosis. *Clin. Cancer Res.* 10, 3124-3130, 2004.

Ogi K.; Toyota M.; Ohe-Toyota M.; Tanaka N.; Noguchi M.; Sonoda T.; Kohama G.; Tokino T. Aberrant methylation of multiple genes and clinicopathological features in oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 8, 3164-3171, 2002.

Pelled D.; Raveh T.; Riebeling C.; Fridkin M.; Berissi H.; Futerman A.H. & Kimchi A. Death-associated protein (DAP) kinase plays a central role in ceramide-induced apoptosis in cultured hippocampal neurons. *J. Biol. Chem.* 277, 1957-1961, 2002.

Pulling L.C.; Vuillemenot B.R.; Hutt J.A. & Devereux T.R. Aberrant Promoter Hypermethylation of Death-Associated Protein Kinase is Early frequent in Murine Lung Tumors Induced by Cigarette Smoke and Tabacco Carcinogens. *Cancer Res.* 64, 3844-3848, 2004.

Raveh T. & Kimchi A. DAP Kinase: a pro-apoptotic gene that functions as a tumor supressor. *Exp. Cell Bes.* 264, 185-192, 2001.

Rosas, S.L.B.; Koch, W.; Carvalho, M.G.C.; Wu, L.; Califano, J.; Westra.; W, J. J.; Sidransky, D. Promoter Hypermethylation Patterns of p16, MGMT and DAP-kinase in Tumors and Saliva of Head and Neck Cancer Patients. *Cancer Research.* 2001; 61(3):939-42, 2001.

Sidransky, D. Promoter hypermethylation patterns of p16, O⁶-methylguanine-DNA-methyltranspherase, and death-associated protein kinase in tumours and saliva of head and neck cancer patients. *Cancer Res.* 61, 939-942, 2001.

Simpson, D.J.; Clayton, R.N. & Farrel, W.E. Preferential loss of Death Associated Protein Kinase expression in invasive pituitary tumours is associated with either CpG island methylation or homozygous deletion. *Oncogene.* 21, 1217-1224, 2002.

Voso, M.T.; Scardocci, A.; Guidi, F.; Zini, G.; Dimario, A.; Pagano, L.; Hohaus, S. & Leone, G. Aberrant methylation of DAP- Kinase in therapy – related acute myeloid leukemia and myelodys plastic syndromes. *Blood*. 103, 698-700, 2004.

Wang, J.; Kuo, J.C.; Yao, C.C. & Chen, R.H. DAP – Kinase induces apoptosis by suppressing integrin activity and disrupting matrix survival signals. *J. Cell Biol.* 159, 169-179, 2002.

Yamamoto, M.; Hioki, T.; Ishii, T.; Nakajima, S. & Uchino, S. DAP Kinase activity is critical for C2 – ceramide – induced apoptosis in PC12 cells. *Eur. J. Biochem.* 269, 139-147, 2002.

Zalckvar, E.; Berissi, H.; Mizrachy, I.; Idelchuk, Y.; Koren, I.; Eisenstein, M.; Sabanay, H.; Pinkas-Kramarski, R.; & Kimchi, A. DAP-kinase-mediated phosphorylation on the BH3 domain of beclin 1 promotes dissociation of beclin 1 from Bcl-XL and induction of autophagy. *EMBO reports VOL 10 NO 3 scientific report*, 2009.

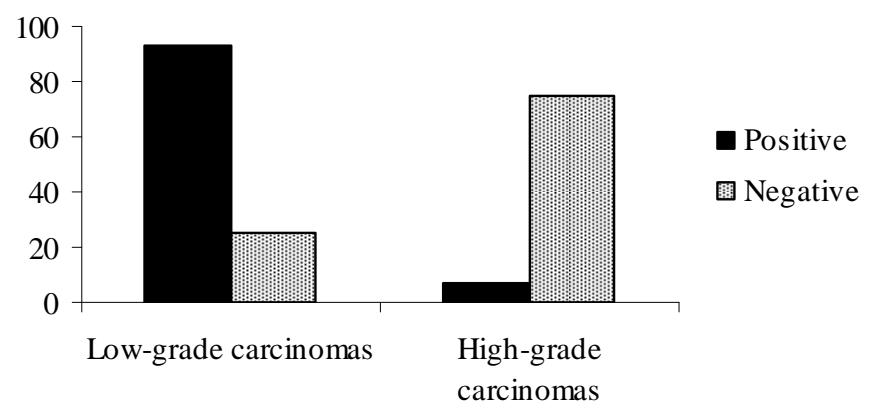


Figure 1. Expression of death-associated protein kinase correlated with the histological malignancy grading of oral squamous cell carcinoma low and high grade.

Table 1. Relationship among histological malignancy grading of the oral squamous cells carcinomas and the intensity of the immunostaining.

Histological malignancy grading	Intensity of immunostaining			Total
	++	+	-	
n (%)	n (%)	n (%)		
Low-grade tumours	16 (55.2)	10 (34.5)	3 (10.3)	29 (72.5)
High-grade tumours	-	2 (18.2)	9 (81.8)	11 (27.5)
Total	16 (40)	12 (30)	12 (30)	40 (100)

(++) moderate, (+) weak, (-) negative or absent

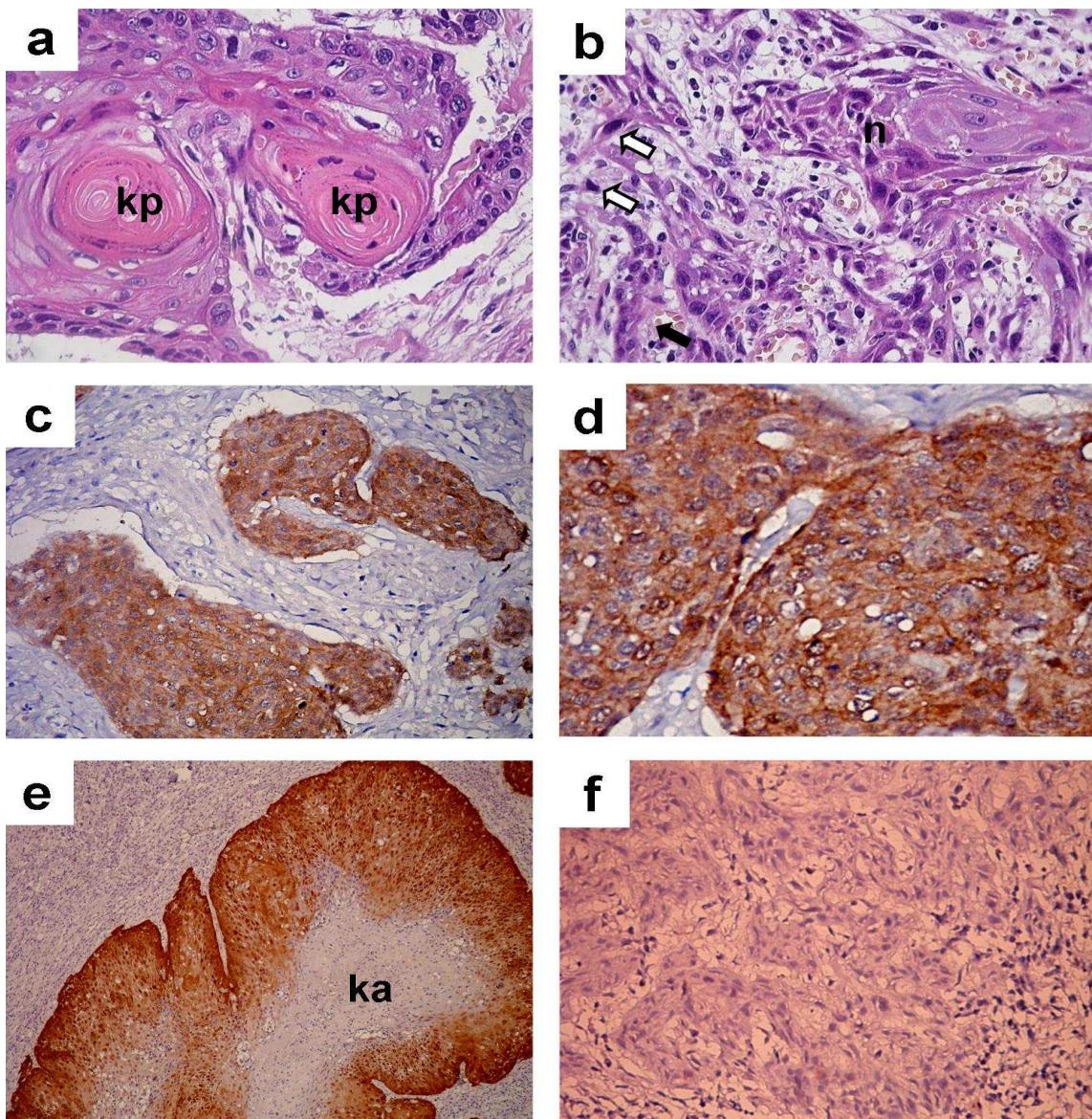


Figure 2. (a) Low-grade squamous cells carcinoma presenting islands of well-differentiated epithelial cells and keratin pearls (kp) (HE, 400x). (b) High-grade squamous cells carcinoma exhibiting small nests (n) and thin strings (dark arrow) of poorly differentiated pleomorphic epithelial cells, as well as isolated tumoral atypical cells (empty arrows) (HE, 400x). (c) Strong immunohistochemical positivity for DAP kinase in the cytoplasm of tumoral cells in a low-grade squamous cells carcinoma (LSAB, 200x). (d) Cytoplasmatic pattern of DAPk immunostaining (LSAB, 400x). (e) Low-grade DAPk-positive tumor showing failure of immunostaining in keratinization areas (ka) (LSAB, 100x). (f) Lack of immunostaining in tumoral cells of a high-grade squamous cells carcinoma (LSAB, 400x).

ANEXO I

PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP)

UNIVERSIDADE TIRADENTES

Parecer Consustanciado de Projeto de Pesquisa

Título do Projeto: Expressão imuno-histoquímica da proteína DAP quinase associada a morte celular (DAPK) em carcinoma epidermóide oral

Pesquisador Responsável Prof. Dr. Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Júnior

Data da Versão 10/09/2009

Cadastro 250909

Data do Parecer 28/09/2009

Grupo e Área Temática III - Projeto fora das áreas temáticas especiais

Objetivos do Projeto

Geral - Identificar a existência de uma possível correlação entre a expressão imuno-histoquímica da proteína DAP quinase e a graduação histológica tumoral do carcinoma epidermóide oral.

ESPECÍFICOS:

- Identificar o perfil de marcação imuno-histoquímica da proteína DAP quinase em carcinomas epidermóides orais, categorizando este perfil de acordo com os critérios estabelecidos pelo AFIP (Armed Force Institute of Pathology)vide material e métodos.
- Correlacionar o perfil de marcação imuno-histoquímica da proteína DAP quinase em carcinomas epidermóides orais com a graduação histológica tumoral, de acordo com o sistema proposto por Anneroth, Batsakis & Luna (1987).
- Trazer novas informações que venham subsidiar o melhor entendimento da carcinogênese e, por consequência, do comportamento biológico tumoral do carcinoma epidermóide oral, no afã de possibilitar uma melhor avaliação do comportamento biológico e prognóstico desta neoplasia.

Sumário do Projeto

Até o momento não foram realizados estudos associando a DAP quinase a lesões orais. Assim propomos-nos a investigar a existência de uma possível correlação entre a expressão imuno-histoquímica da supramencionada proteína e a graduação histológica tumoral do carcinoma epidermóide oral. Deve ser destacado que dentre as neoplasias malignas com sede nos tecidos orais, o carcinoma epidermóide oral (neoplasia maligna oriunda do epitélio pavimentoso estratificado de revestimento da mucosa) ocupa um merecido destaque, posto que representa cerca de 90% de todos os cânceres das estruturas orais e aproximadamente 38% daqueles de cabeça e pescoço. Além disso, apresenta, mesmo nos dias atuais, um elevado grau de morbidade e mortalidade (SCHÜTZ, 1997). Pretende-se, a partir deste estudo, trazer novas informações que venham subsidiar a avaliação do comportamento biológico e prognóstico desta neoplasia.

Itens Metodológicos e Éticos	Situação
Título	Adequado
Autores	Adequados
Local de Origem na Instituição	Adequado
Projeto elaborado por patrocinador	Não
Aprovação no país de origem	Não necessita
Local de Realização	Própria instituição
Outras instituições envolvidas	Não
Condições para realização	Adequadas

Comentários sobre os itens de Identificação

Introdução	Adequada
------------	----------

Comentários sobre a Introdução

Objetivos	Adequados
-----------	-----------

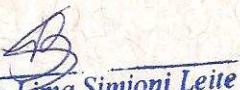
Comentários sobre os Objetivos

Pacientes e Métodos	
---------------------	--

Delineamento

Comentário

Página 1-2


Bárbara Lima Simioni Leite
Coord. Comitê de Ética em Pesquisa
Universidade Tiradentes

Tamanho de amostra	Total 40 Local 40
Cálculo do tamanho da amostra	Adequado
Participantes pertencentes a grupos especiais	Não
Seleção equitativa dos indivíduos participantes	Não se aplica
Critérios de inclusão e exclusão	Adequados
Relação risco- benefício	Não se aplica
Uso de placebo	Não utiliza
Período de suspensão de uso de drogas (wash out)	Não utiliza
Monitoramento da segurança e dados	Adequado
Avaliação dos dados	Adequada - quantitativa
Privacidade e confidencialidade	Adequada
Termo de Consentimento	Não se aplica
Adequação às Normas e Diretrizes	Sim

Comentários sobre os itens de Pacientes e Métodos

Cronograma	Adequado
Data de início prevista	
Data de término prevista	
Orçamento	Comentário
Fonte de financiamento externa	Não

Comentários sobre o Cronograma e o Orçamento
Cronograma adequado, pois evidencia que o início da pesquisa ocorrerá subsequentemente ao parecer favorável do Comitê de Ética.

Referências Bibliográficas	Adequadas
Comentários sobre as Referências Bibliográficas	

Recomendação

Aprovar

Comentários Gerais sobre o Projeto

Pesquisa sugere ser de alta relevância para a comunidade científica e população de maneira geral por estudar mais um campo para o estudo do comportamento biológico e prognóstico do carcinoma epidermóide oral, câncer de alta prevalência e expressiva mortalidade, refletindo no controle loco-regional da doença, sobrevida e qualidade de vida dos pacientes, sendo considerado aprovado em seus aspectos éticos.



Bárbara Lima Simioni Leite
Coord. Comitê de Ética em Pesquisa
Universidade Tiradentes

ANEXO II

NORMAS PARA PUBLICAÇÃO NA REVISTA

INTERNATIONAL JOURNAL OF MORPHOLOGY



INSTRUÇÕES AOS AUTORES

- [Escopo e política](#)
- [Forma e preparação do manuscritos](#)
- [Envio de manuscritos](#)

Escopo e política

Aceitam-se artigos inéditos, escritos em espanhol ou inglês. Em carta ao Editor, assinada por todos os autores, deverá ser indicado explícitamente, que o manuscrito foi lido e aprovado pelos autores, cumpre com os requisitos de autoria e que não foi publicado ou enviado, simultaneamente, a outra revista.

Os trabalhos deverão ser enviados em triplicado e uma cópia em disquete 3 1/2 , acompanhado de três conjuntos de ilustrações. Estes serão submetidos à apreciação do Comitê Editor e Conselho Científico. A revisão será realizada por dois acessores, membros do Comitê Editorial e/ou Conselho Científico, e acessores "ad hoc" especialistas na área do trabalho. Os especialistas no tema (chilenos ou estrangeiros) resolverão se o trabalho pode: a) ser publicado; b) publicado com modificações ou c) recusado.

Cópia das apreciações serão enviadas ao autor principal.

Forma preparação do manuscrito

DE FORMA

Os trabalhos devem vir digitados (Word PC ou MacIntosh) em papel carta e em espaço duplo, com margens laterais de 2.5 cm, e no máximo 12 páginas (incluindo texto, ilustrações e Referências Bibliográficas). Cada trabalho deverá apresentar:

- **Página de título:** título e subtítulo se for necessário , com versão em inglês (se for escrito em inglês, com tradução para o espanhol), o(os) nome(s) do(s) autor(es) e local do trabalho; se for subvencionado, indicar o patrocinador e número do processo em nota de rodapé.
- **Resumo:** (estruturado) em espanhol, no máximo 300 palavras. Palavras-chave deverão ser incluídas e traduzidas do "Medical Subject Headings" do Index Medicus.
- **Texto:** Introdução, Material e Método, Resultados e Discussão.
- **Tabelas e Ilustrações:** Tabelas numeradas com algoritmos romanos e ilustrações com algoritmos arábicos, deverão vir em folhas separadas do texto. As tabelas precisam de título e as ilustrações de legendas devem vir em folhas separadas.
- **Reproduções das ilustrações:** só podem ser feitas com desenhos de boa qualidade a traço sem legendas, ou cópias

fotográficas em branco e preto ou coloridas. Toda documentação fotográfica deverá conter no verso o número correspondente à legenda e indicações da posição correta, escrito levemente com lápis para não estragar o material. Se for necessário utilizar letras, números ou símbolos transferíveis.

- **Resumo em inglês** - palavras-chave em inglês (ou espanhol, se o trabalho for escrito em inglês).
- **Agradecimentos.**
- **Referências bibliográficas:** Devem vir em ordem alfabética, pelo sobrenome dos autores, de acordo com as Normas Técnicas da Revista. Todos os autores devem aparecer nas Referências Bibliográficas. No texto, se tiver mais de dois autores, colocar "et al.", após o primeiro nome, seguido do ano de publicação entre parêntese, somente na primeira citação. Os nomes dos autores deverão vir em letra minúscula tanto no Texto como nas Referências Bibliográficas. O ano deverá vir repetido em cada citação se o autor tiver mais de um trabalho mencionado.

Exemplos:

Rodríguez, A.; Rojas, M.A.; Montenegro, M.A. & Regadera, J. Expresión de filamentos intermedios durante el desarrollo embrionario de cerdo (*Sus scrofa*) y Bovino. *Rev. Chile. Anat.*, 18 (2):237-44, 2000.

Rodrigues, H. Técnicas anatômicas. 2. ed. Vitória-ES, Arte Visual, 1998.

- **Nomenclatura:** A nomenclatura usada deve estar de acordo com a última edição da Terminologia Anatômica, Nômina Anatômica Veterinária ou Nômina Anatômica Avium. Os termos em latim podem ser traduzidos para o idioma vernáculo (espanhol ou inglês).

Envío de manuscritos

Toda correspondencia debe ser digida a:

- **Dr. Mariano del Sol**
Editor
International Journal of Morphology
Universidad de La Frontera
Facultad de Medicina
Casilla 54-D
Temuco-Chile
Fax: (56-45) 284343
mdelsol@ufro.cl

[\[Sobre esta revista\]](#) [\[Corpo editorial\]](#) [\[Assinaturas\]](#)

©
2010 *Universidad de La
Frontera
Facultad de Medicina*

**Casilla 54-D
Temuco - Chile
Tel.: (56-45) 325571
Fax: (56-45) 325600**

eMail
ijmorpho@ufro.cl