



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ**  
**FACULDADE DE FARMÁCIA, ODONTOLOGIA E ENFERMAGEM**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**THAÍS TORRES BARROS DUTRA**

**PAPEL DAS PROTOCADERINAS NA CARCINOGENESE HUMANA: REVISÃO  
SISTEMÁTICA COM META-ANÁLISE E ESTUDO IMUNOMOLECULAR EM  
CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAL**

**FORTALEZA**  
**2021**

THAÍS TORRES BARROS DUTRA

**PAPEL DAS PROTOCADERINAS NA CARCINOGENESE HUMANA: REVISÃO  
SISTEMÁTICA COM META-ANÁLISE E ESTUDO IMUNOMOLECULAR EM  
CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como um dos requisitos para obtenção do título de doutora em Odontologia. Área de Concentração: Clínica Odontológica.

Orientadora: Prof<sup>fa</sup>. Dr<sup>a</sup> Karuza Maria Alves Pereira.

Coorientadora: Prof<sup>fa</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristiana L. Miranda Furtado.

**FORTALEZA  
2021**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação  
Universidade Federal do Ceará  
Biblioteca Universitária  
Gerada automaticamente pelo módulo Catalog, mediante os dados fornecidos pelo(a) autor(a)

---

- D978p Dutra, Thaís Torres Barros.  
Papel das protocaderinas na carcinogênese humana: : revisão sistemática com meta-análise e estudo imunomolecular em carcinoma de células escamosas oral / Thaís Torres Barros Dutra. – 2021.  
116 f. : il. color.
- Tese (doutorado) – Universidade Federal do Ceará, Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Fortaleza, 2021.  
Orientação: Profa. Dra. Karuza Maria Alves Pereira.  
Coorientação: Profa. Dra. Cristiana Libardi Miranda Furtado.
1. Carcinogênese. 2. Carcinoma de Células Escamosas. 3. Epigenética. 4. Metilação. I. Título.  
CDD 617.6
-

THAÍS TORRES BARROS DUTRA

**PAPEL DAS PROTOCADERINAS NA CARCINOGENESE HUMANA: REVISÃO  
SISTEMÁTICA COM META-ANÁLISE E ESTUDO IMUNOMOLECULAR EM  
CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAL**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Farmácia, Odontologia e Enfermagem da Universidade Federal do Ceará, como um dos requisitos para obtenção do título de doutora em Odontologia. Área de Concentração: Clínica Odontológica.

Orientadora: Prof<sup>fa</sup>. Dr<sup>a</sup> Karuza Maria Alves Pereira

Coorientadora: Prof<sup>fa</sup>. Dr<sup>a</sup>. Cristiana L. Miranda Furtado

Aprovada em: 26/07/2021

**BANCA EXAMINADORA**

---

Prof<sup>fa</sup>. Dr<sup>a</sup>. Karuza Maria Alves Pereira (Orientadora)  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Fábio Wildson Gurgel Costa  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof. Dr. Filipe Nobre Chaves  
Universidade Federal do Ceará (UFC)

---

Prof<sup>fa</sup>. Dr<sup>a</sup>. Simone Souza Lobão Veras Barros  
Universidade Federal do Piauí (UFPI)

---

Prof<sup>fa</sup>. Dr<sup>a</sup> Roberta Barroso Cavalcante  
Universidade de Fortaleza (UNIFOR)

A conclusão desta etapa da minha formação não poderia ter sido concretizada sem a ajuda dos meus pais, Dóris e Assis, do meu irmão, Durvalino Neto e do meu marido, Lucas, que me apoiaram com amor até que alcançasse este sonho. Por essa razão, gostaria de dedicar e reconhecer a vocês minha imensa gratidão e sempre amor.

## AGRADECIMENTOS

A Deus, por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades.

Aos meus pais, Dóris Sandra Torres Barros e Francisco de Assis Lopes Dutra, que dedicaram, cuidaram e doaram incondicionalmente seu sangue e suor em forma de amor e trabalho por mim e por meu irmão, despertando e alimentando a sede pelo conhecimento e a importância deste em minha vida. E ao meu irmão Durvalino da Silva Barros Neto, pelo companheirismo e apoio. Amo vocês!

Ao meu marido, Lucas Lopes Araújo Sousa, que é a pessoa que a vida escolheu para ser meu companheiro nas horas boas e ruins. Nos momentos mais difíceis, que não foram raros nesses últimos anos, sempre me fazendo acreditar que chegaria ao final desta difícil, porém gratificante, etapa.

Aos meus avós, Maria da Conceição Torres Barros e Durvalino da Silva Barros (*in memoriam*), pelo carinho e pela dedicação durante minha vida. Aos meus tios e tias, pela torcida e pelo apoio ao longo desses anos. Em especial, quero agradecer à tia Linéia, minha madrinha, amiga e colega de profissão, por sempre acreditar que eu podia ir além. Obrigada por nunca me fazer desistir!

Aos meus primos(as) e amigos(as), em especial, Lília, Lêda e Marihama, companheiras de uma jornada de vida, obrigada pelos momentos de diversão e, principalmente, por entenderem minha ausência e distância.

À Universidade Federal do Piauí - UFPI por minha formação, tudo que sou profissionalmente devo a esta instituição, que me deu as bases para o crescimento científico e da qual hoje faço parte como servidora. Na oportunidade, tenho que agradecer ao professor e sempre amigo, Rosendo, por me convencer a continuar os estudos após a graduação e sempre me induzindo a pensar criticamente.

Aos colegas de pós-graduação, sempre dispostos a ajudar e dar ânimo para seguir essa jornada. Aqui quero ressaltar meus “irmãos patológicos”, Éalber, Khalil, Carol e Denis, pelo acolhimento em minha chegada e por serem um grande apoio em todos os momentos. Também preciso agradecer imensamente às minhas queridas amigas Sthefane e Thâmara, companheiras de pesquisa e estudo, com vocês a jornada foi mais leve e divertida.

Ao Laboratório de Patologia Bucal da Universidade Federal do Ceará (UFC) e ao Laboratório de Histopatologia do Núcleo de Pesquisas e Desenvolvimento de Medicamentos (NPDM), na pessoa da Profa. Dra. Ana Paula e dos professores Mário Mota e Fabrício Bitu, pelos ensinamentos muito importantes para mim e para a minha vida profissional.

Ao Laboratório de Oncologia Experimental (LOE) do NPDM, na pessoa da Profa. Dra. Claudia do Ó e todos que fazem parte dele, pelo apoio operacional para realização de parte dos experimentos. Em especial, quero agradecer ao Renan, ao Daniel e à Sarah, pela gentileza com que me recepcionaram, sempre solícitos e dedicados a ajudar.

Agradeço à Profa. Dra. Karuza Maria Alves Pereira, minha orientadora, pela paciência e pelos ensinamentos compartilhados, também pelo exemplo de professora, de companheirismo e de dedicação. À Profa. Dra. Cristiana Furtado, pela gentileza em todos os momentos da execução desta pesquisa. Aos demais professores da banca, Prof. Dr. Fábio, Prof. Dr. Filipe Nobre, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Roberta Cavalcante, Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Simone Barros e Prof. Dr. Gustavo Godoy, pelo aceite em participar deste momento especial e por contribuir significativamente com o crescimento deste trabalho.

Estendo meus agradecimentos aos funcionários da UFC e do NPDM, Alceu, Débora e Rui, pela disponibilidade e ajuda sempre que possível.

Agradeço à Fundação de Amparo à Pesquisa do Ceará - FUNCAP, pelo apoio financeiro e, principalmente, pelo interesse neste estudo. À UFC, na pessoa de seu Magnífico Reitor Prof. Dr. José Cândido Lustosa Bittencourt de Albuquerque e Vice-Reitor Prof. Dr. José Glauco Lobo Filho, ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia, coordenado pela Profa. Dra. Cristiane Sá Roriz Fonteles. À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001, pelo apoio financeiro que permitiu subsidiar parte deste doutorado.

Que todos os nossos esforços estejam sempre focados no desafio à impossibilidade.  
Todas as grandes conquistas humanas vieram daquilo que parecia impossível.  
(Charles Chaplin).



## RESUMO

**Introdução:** Entender a participação e o real papel das protocaderinas (PCDH) é fundamental para melhor compreensão da carcinogênese, principalmente da carcinogênese oral e, possivelmente, identificar novos marcadores preditivos para Displasia Epitelial Oral (DEO) e Carcinoma de Células Escamosas Oral (CCEO), proporcionando o melhor entendimento do curso clínico dessas lesões. Até o momento, não existem trabalhos que tenham realizado investigação semelhante. **Objetivo:** A presente tese apresenta dois capítulos, cujos objetivos principais são: sumarizar a evidência científica sobre o perfil de metilação das *PCDH* na carcinogênese de neoplasias malignas humanas (capítulo 1) e investigar o perfil imunomolecular de *PCDH10* na carcinogênese oral (capítulo 2). **Métodos:** No capítulo 1, uma Revisão Sistemática (RS) com meta-análise foi conduzida de acordo com a lista de verificação do PRISMA e a busca foi realizada nas bases de dados LILACS, PubMed, Science Direct, Scopus e Web of Science, de forma manual e sem restrição de data ou idioma. No capítulo 2, estudo imunomolecular foi realizado em CCEO, DEO e Mucosa Oral Normal (MON). Análise imunohistoquímica com anticorpos para PCDH10, 5-metilcitosina (5-mC) e 5-hidroximetilcitosina (5-hmC) foi realizada de forma quantitativa, com contagem do número de células imunomarcadas e em seguida foram categorizados pelo escore do percentual de células imunomarcadas (0 a 3), e qualitativa por meio de avaliação subjetiva com base na intensidade de marcação (0 = ausente; 1 = leve; 2 = moderado; 3 = intenso). Além disso, foi realizada análise da sublocalização celular da imunoposição de PCDH10 e foi obtido histoescor, no qual os níveis de imunoposição foram categorizados como negativa (0), baixa (1 a 4) e alta (5 a 12). A análise de metilação de *PCDH10* foi realizada utilizando DNA genômico digerido (HpaII e MspI) e não digerido amplificado no sistema de reação em cadeia da polimerase em tempo real (RT-PCR) em casos de CCEO (n=7), DEO (n=5) e MON (n= 8). **Resultados:** Na RS, foram selecionados 41 artigos dos quais 26 foram utilizados na meta-análise. Observou-se que as PCDH mais estudadas na literatura foram: PCDH10, PCDH17 e PCDH8, sendo a associação entre metilação e os cânceres estudados de 26,08 (CI95% 15,42 – 44,13). No estudo imunomolecular, um total de 48 casos (18 de CCEO, 20 de DEO e 10 de MON) foram submetidos a análise imunohistoquímica. Observou-se perda de imunomarcagem membranar de PCDH10 no CCEO; baixa imunoposição nuclear e citoplasmática em MON, DEO e CCEO (p<0,001). Evidenciou-se também maior imunopositividade para 5-mC em comparação ao 5-hmC, ocorrendo redução na imunomarcagem de MON para DEO e CCEO. A imunoposição de 5-mC foi alta (p<0,001), mostrando células marcadas no CCEO (p <0,001). Em

contrapartida, para 5-hmC, houve maior imunomarcação em DEO ( $p=0,001$ ). O perfil de metilação de *PCDH10* foi diferente entre os grupos, tendo as DEO maior status de metilação ( $p<0,001$ ). **Conclusão:** A metilação de *PCDHs* é um importante evento epigenético na carcinogênese de diferentes neoplasias malignas e a metilação de *PCDH10* pode atuar como mecanismo regulatório na carcinogênese oral. Ademais, pode-se inferir que a perda de 5-hmC pode ser um possível preditor de progressão em DEO.

**Palavras-chaves:** Carcinogênese; Carcinoma de Células Escamosas; Epigenética; Metilação.

## ABSTRACT

**Introduction:** Understanding the participation and real role of protocadherins (PCDH) is essential for a better understanding of carcinogenesis, especially oral carcinogenesis, and possibly to identify new predictive markers for Oral Epithelial Dysplasia (OED) and Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC), providing a better understanding of the clinical course of these injuries. So far, there are no works that have carried out similar research. **Objective:** This thesis has two chapters, whose main objectives are: to summarize the scientific evidence on the methylation profile of PCDHs in the carcinogenesis of human malignancies (chapter 1) and to investigate the immunomolecular profile of PCDH10 in oral carcinogenesis (chapter 2). **Methods:** In chapter 1, a Systematic Review (SR) with meta-analysis was conducted according to the PRISMA checklist and the search was performed in LILACS, PubMed, Science Direct, Scopus and Web of Science databases, from manually and without restriction of date or language. In chapter 2, an immunomolecular study was performed by means of immunohistochemical evaluation, with antibodies to PCDH10, 5-methylcytosine (5-mC) and 5-hydroxymethylcytosine (5-hmC) in OSCC, OED and Normal Oral Mucosa (NOM). The immunoexpression analysis was performed quantitatively, counting the number of immunomarked cells and then categorized by the score of the percentage of immunomarked cells (0 to 3), and qualitatively through subjective assessment based on staining intensity (0 = absent; 1 = mild; 2 = moderate; 3 = intense). A histoscore was obtained and immunoexpression levels were categorized as negative (0), low (1 to 4), and high (histoscore 5 to 12). The methylation analysis of PCDH10 was performed using digested (HpaII and MspI) and undigested genomic DNA amplified in the real-time polymerase chain reaction system (RT-PCR) in cases of OSCC, OED and NOM. **Results:** In SR, 41 articles were selected, of which 26 were used in the meta-analysis. The most studied PCDH in the literature were: PCDH10, PCDH17 and PCDH8, with an association between methylation and studied cancers of 26.08 (95%CI 15.42 – 44.13). In the immunomolecular study, a total of 48 cases (18 of CCEO, 20 of DEO and 10 of MON) were submitted to immunohistochemical analysis. Loss of PCDH10 membrane marking was observed in OSCC; low nuclear and cytoplasmic immunoexpression in OSCC, OED and NOM ( $p < 0.001$ ). There was also greater immunopositivity for 5-mC compared to 5-hmC, with a reduction in the intensity of NOM labeling for OED and OSCC. The immunoexpression of 5-mC was high ( $p < 0.001$ ), showing cells marked in the OSCC ( $p < 0.001$ ). On the other hand, for 5-hmC, there was greater immunostaining in OED ( $p = 0.001$ ). The methylation profile of PCDH10 was different between groups, with the OED having a

higher methylation status ( $p < 0.001$ ). **Conclusion:** *PCDH* methylation is an important epigenetic event in the carcinogenesis of different malignant neoplasms and *PCDH10* methylation can act as a regulatory mechanism in oral carcinogenesis. Furthermore, it can be suggested that the loss of 5-hmC may be a predictor of progression in OED.

**Keywords:** Carcinogenesis; Squamous Cell Carcinoma; Epigenetics; Methylation.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 -	Processo de metilação do DNA e suas repercussões.	26
Figura 2.2 -	Reação de oxidação de 5-mC para promover a desmetilação do DNA.	28
Figura 2.3 -	Estrutura da molécula de PCDH10.	33
Figura 2.4 -	<i>PCDH10</i> atuando na via de sinalização PI3K/AKT	35
Figura 4.1.1 -	<i>Flow Diagramo f PRISMA's Adapted Literature Search and Selection Criteria</i> (Fluxograma dos critérios de seleção e pesquisa de literatura adaptados do PRISMA).	40
Figura 4.1.2 -	<i>Distribution of the Types of PCGHs Studies among the Categories of Neoplasms (n=41)</i> (Distribuição dos tipos de estudos de PCDHs entre as categorias de neoplasias (n = 41)).	41
Figura 4.1.3 -	<i>Methylation Profile in Human Malignant Neoplasm (n=26)</i> (Perfil de metilação em neoplasias malignas humanas (n = 26)).	41
Figura 4.1.4 -	<i>Methylation Profile in Human Malignant Neoplasm (n=26) Categorized by Group</i> (Perfil de metilação em neoplasias malignas humanas (n = 26) categorizado por grupo).	45
Figura 4.2.1 -	Painel imunohistoquímico de PCDH10, 5-mC e 5-hmC em displasia epitelial e no carcinoma de células escamosas orais. Fotomicrografias exibindo os padrões de imunexpressão de anti-PCDH10, anti-5mC e anti 5-hmC, LSAB, 400x. MON: Mucosa Oral Normal; DEO: Displasia epitelial oral; CCEO: Carcinoma de Células Escamosas Oral.	78

Figura 4.2.2 - Modelo de correlação entre metilação de *PCDH10* e 79  
imunexpressão da proteína PCDH-10, 5-mC e 5-hmC em  
displasia epitelial e no carcinoma de células escamosas orais.  
Os retângulos representam as variáveis de estudo (medidas).  
Setas contínuas representam correlações direta e setas  
pontilhadas correlação inversa. Os números adjacentes às setas  
são os coeficientes de correlação de Spearman e os *p-valores*.  
MON: Mucosa Oral Normal; DEO: Displasia epitelial oral;  
CCEO: Carcinoma de Células Escamosas Oral.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1.4 - <i>Summary of Descriptive Characteristics of the Included Studies (n=41)</i> (Resumo das características descritivas dos estudos incluídos (n = 41)).	42
Tabela 4.1.5 - <i>Summary of Risk Assessment of Bias in Individual Studies (n=26)</i> (Resumo da avaliação de risco de viés em estudos individuais (n = 26)).	45
Tabela 4.2.1 - Distribuição por sexo dos grupos (CCEO, DEO e MON) (n = 48).	74
Tabela 4.2.2 - Média das células imunomarcadas na membrana, no citoplasma e no núcleo da displasia epitelial e no carcinoma de células escamosas orais (n = 48).	75
Tabela 4.2.3 - Perfil de Imunoexpressão de PCDH10, 5-mC e 5-hmC na membrana, no citoplasma e no núcleo da displasia epitelial e no carcinoma de células escamosas orais.	76
Tabela 4.2.4 - Perfil global de metilação e hidroximetilação em CCEO, DEO e MON por imunohistoquímica.	77

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

5-caC	5-carboxicitosina
5-fC	5-formilcitosina
5-hmC	5-hidroximetilcitosina
5-mC	5-metilcitosina
AFP	Do inglês <i>alpha-fetoprotein</i>
AKT	Do inglês <i>Protein Kinase B</i>
BC	Do inglês <i>Bladder câncer</i> (câncer de bexiga)
BER	Via de reparo por excisão de bases
CCE	Carcinoma De Células Escamosas
CCECP	Carcinomas De Células Escamosas De Cabeça E Pescoço
CCEO	Carcinoma De Células Escamosas Oral
CH3	Radical metil
CRC	Do inglês <i>colorectal câncer</i> (câncer colorretal)
DEO	Displasia Epitelial Oral
DNA	Do inglês <i>deoxyribonucleic acid</i> (ácido desoxirribonucleico)
DNMTs	Enzimas DNA metiltransferases
DPM	Desordem Potencialmente Maligna
GC	Do inglês <i>Gastric cancer</i> (câncer gástrico)
GIT	Do inglês <i>Tract gastrointestinal</i> (trato gastrointestinal)
HFC	Do inglês <i>Hypopharyngeal carcinoma</i> (carcinoma de hipofaringe)
HPV	Do inglês <i>Human Papiloma Virus</i> (Papiloma vírus humano)
IDH	Índice De Desenvolvimento Humano
IMBC	Do inglês <i>invasive muscle bladder cancer</i> (câncer de bexiga músculo invasivo)



INCA	Instituto Nacional de Câncer
LO	Leucoplasia oral
LSAB	Do inglês <i>Labeled streptavidin biotin</i>
Nap1	Do inglês <i>Nck-associated protein 1</i>
NFC	Do inglês <i>Nasopharyngeal carcinoma</i> (carcinoma de nasofaringe)
NIMBC	Do inglês <i>noninvasive muscle bladder cancer</i> (câncer de bexiga músculo não-invasivo)
OC	Do inglês <i>Ovarian cancer</i> (câncer de ovário)
OMS	Organização Mundial da Saúde
p53	Proteína de tumor
PC	Do inglês <i>Prostate cancer</i> (câncer de próstata)
PCDH	Protocaderinas
PI3K	Do inglês <i>phosphatidylinositol-3-Kinase</i>
PIP3	Do inglês <i>phosphatidylinositol-4,5-bisphosphate</i>
pRb	Do inglês <i>retinoblastoma protein</i>
PRISMA	Do inglês <i>Preferred Reporting Items for Systematic Reviews and Meta-Analyse</i>
PROSPERO	Do inglês <i>International Prospective Register of Systematic Reviews</i>
RC	Do inglês <i>Renal carcinoma</i> (carcinoma renal)
RNA	Do inglês <i>ribonucleic acid</i> (ácido ribonucleico)
SPSS	Do inglês <i>Statistical Package for the Social Science software version</i>
TDG	Do inglês <i>Timina-DNA Glicosilase</i>
TET	Transposição dez-onze
H/E	Hematoxilina/Eosina

## SUMÁRIO

<b>1. INTRODUÇÃO GERAL .....</b>	<b>19</b>
<b>2. REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>22</b>
2.1. <i>Carcinoma de Células Escamosas Oral e Desordens Potencialmente Malignas .....</i>	<i>22</i>
2.2. <i>Metilação do DNA.....</i>	<i>26</i>
2.3. <i>Reversão da metilação do DNA por hidroxilação (hidroximetilação).....</i>	<i>28</i>
2. 5. <i>PCDH10 estrutura e função.....</i>	<i>32</i>
<b>3. PROPOSIÇÃO.....</b>	<b>36</b>
3.1 <i>Geral:.....</i>	<i>36</i>
3.2 <i>Específicas:.....</i>	<i>36</i>
<b>4. CAPÍTULOS.....</b>	<b>37</b>
4.1 <i>Capítulo 1 - Do protocadherins show prognostic value in the carcinogenesis of human malignant neoplasms? Systematic review and meta-analysis .....</i>	<i>38</i>
4.2 <i>Capítulo 2 - Metilação de PCDH10 como mecanismo regulatório na carcinogênese oral: estudo imunohistoquímico e biomolecular.....</i>	<i>50</i>
<b>5. CONCLUSÃO GERAL .....</b>	<b>80</b>
<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>81</b>
<b>ANEXOS.....</b>	<b>94</b>