

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

CATHERINE BUENO DOMINGUETI

**VALOR PROGNÓSTICO DE SISTEMAS DE GRADAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E
CARACTERIZAÇÃO DE MARCADORES EM CARCINOMA ESPINOCELULAR
ORAL**

**Alfenas/MG
2018**

CATHERINE BUENO DOMINGUETI

**VALOR PROGNÓSTICO DE SISTEMAS DE GRADAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E
CARACTERIZAÇÃO DE MARCADORES EM CARCINOMA ESPINOCELULAR
ORAL**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para
obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela
Universidade Federal de Alfenas.
Área de concentração: Biologia Molecular
Orientadora: Prof^a. Dra. Lívia Máris Ribeiro Paranaíba.
Co-orientador: Prof. Dr. Wilfredo Alejandro González
Arriagada.

**Alfenas/MG
2018**

Dados Internacionais de Catalogação-na-Publicação (CIP)
Sistema de Bibliotecas da Universidade Federal de Alfenas
Biblioteca Central - Sede

Domingueti, Catherine Bueno
D671v Valor prognóstico de sistemas de gradação histopatológica e
caracterização de marcadores em carcinoma espinocelular oral / Catherine
Bueno Domingueti. -- Alfenas/MG, 2018.
108 f. : il. --

Orientadora: Livia Máris Ribeiro Paranaíba.
Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal
de Alfenas, 2018.
Bibliografia.

1. Carcinoma de Células Escamosas. 2. Prognóstico. 3. Análise de
Sobrevida. I. Paranaíba, Livia Máris Ribeiro. II. Título.

CDD-578.2



CATHERINE BUENO DOMINGUETI

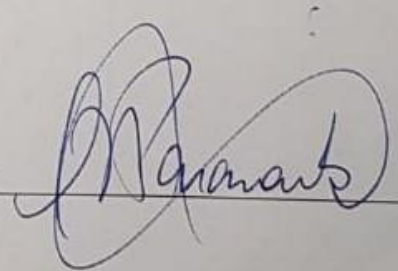
**“VALOR PROGNÓSTICO DE SISTEMAS DE GRADAÇÃO HISTOPATOLÓGICA E
CARACTERIZAÇÃO DE MARCADORES EM CARCINOMA ESPINOCELULAR ORAL”**

A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a
Dissertação apresentada como parte dos requisitos para
a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas
pela Universidade Federal de Alfenas.

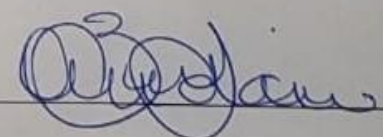
Área de concentração: Biologia Molecular

Aprovado em: 26 de julho de 2018.

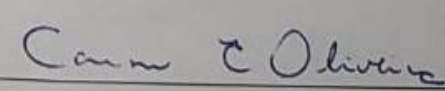
Profª. Dra. Livia Máris Ribeiro Paranaíba
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

Profª. Dra. Andreia Bufalino
Instituição: UNESP

Assinatura: 

Profª. Dra. Carine Ervolino de Oliveira
Instituição: UNIFAL-MG

Assinatura: 

*Aos meus pais, Ralph e Rosemeire,
por todo amor e incentivo, com
gratidão dedico esse trabalho.*

AGRADECIMENTOS

À Prof. Dr^a Livia Máris Ribeiro Paranaíba, minha orientadora. Agradeço por todo amor e dedicação que me conduziu para a realização dessa pesquisa. Uma pessoa de grande inteligência e dinamismo que tem muito o que ensinar e compartilhar. Deixar o Mestrado em Ciências Biológicas será mais doloroso, pois será sinônimo de deixá-la também. Tenho a esperança de continuarmos trabalhando juntas. O que levarei dela será muito mais que artigos publicados e conhecimento repassado, mas sim um carinho que aflorou apesar do curto período de tempo. Obrigada pelos sorrisos compartilhados nos momentos de descontração e alegria. Obrigada pelos conselhos, a abertura para nossas inúmeras conversas e o grande carinho e atenção que demonstrou a todos os momentos. Levarei seus ensinamentos e atitudes por toda a minha prática docente.

Ao Prof. Dr. Wilfredo Alejandro González Arriagada, meu co-orientador. Agradeço por toda a disponibilidade e dedicação com esta pesquisa. Pelo enorme conhecimento repassado em abrangentes assuntos. Por sua grande abertura para dialogar e amizade construída, foi maravilhoso conhecer algumas cidades do Chile ao lado de uma pessoa que ama sua pátria. Tenho a esperança de continuarmos trabalhando juntos.

Ao Prof. Dr. Ricardo Dela Coletta, agradeço por abrir as portas da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - FOP/UNICAMP, por estar sempre aberto para sanar as dúvidas e sugerir novidades para engrandecer o nosso trabalho.

Ao Prof. Dr. Alessandro Antônio Costa Pereira, agradeço por estar sempre disponível a ajudar em nosso trabalho, pela facilidade de comunicação e as caronas de Alfenas a Varginha que me ajudaram imensamente e serei sempre muito grata.

A Prof^a. Dr^a Carine Ervolino de Oliveira, agradeço pelos grandes conselhos e ensinamentos, por ter gentilmente aceito o convite para ser banca desse trabalho tanto na qualificação como na defesa sempre engrandecendo e trazendo novas sugestões.

Ao Prof. Masaharu e a Prof^a. Isarita e a Pró-Reitoria de Extensão da UNIFAL, agradeço por conseguirem a liberação de uma verba para a segunda viagem.

Agradeço a UNIFAL e aos funcionários que me auxiliaram na execução deste trabalho, em especial o técnico Matheus pela facilidade de comunicação. Aos técnicos Fernando e Andréia do Laboratório de Biologia Celular e Estrutural da UNIFAL pela tranquilidade para a utilização do micrótomo e coloração em HE, tudo foi possível de ser realizado no tempo estipulado graças a vocês. A Marta por suas agradáveis conversas e lanches. A Martha secretária do Programa de Pós-graduação em Ciências Biológicas agradeço, por ajudar a sanar as dúvidas em diversos momentos.

Agradeço a presença dos companheiros que conheci durante o Mestrado pela convivência, conversas, descontrações e auxílio, Ana Luísa, Letícia, Vanessa, Icaro, Yara, Valéria, Joana, Daniel, Paloma, Elda, Alexandre, Clenisvaldo, Marina, Isabella, Josiane e Patrícia. Em especial minhas amigas Ana Luísa, Letícia e Marina

que sempre tiveram um enorme carinho, atenção e paciência. Tudo seria mais difícil sem o apoio de cada uma de vocês.

Agradeço a FOP/UNICAMP, em especial a Carolina e Renato, pela moradia, carinho e atenção e a técnica Fabiana pela grande disponibilidade e ensinamento.

Agradeço a Universidade de Valparaíso- Chile, em especial aos Prof. Ricardo, Prof. Rodrigo, Prof. Rene, Prof. Miguel, Prof^a. Karina, Prof^a Marjorie e Prof^a. Issis, aos alunos Verônica, Roberto e Ivan, aos técnicos Belén, Juan, Cláudio e Paulina e dona Carmem e sua filha Carmem onde me hospedei, pelo enorme carinho em que me receberam no Chile, foi uma honra conviver e aprender com cada um de vocês.

Agradeço ao Hospital Bom Pastor de Varginha em especial ao SAME a Rose e Anelise e aos demais funcionários pelo carinho, atenção e auxílio na separação dos prontuários.

Agradeço ao Laboratórios IPD de Varginha em especial ao meu grande amigo Prof. Dr. Janini e a funcionária Patricia pelo carinho de longa data devido ao tempo de trabalho juntos e a facilidade de acesso a informações e blocos, deixando tudo sempre à disposição. As meninas da Citopatologia em que tive o prazer de caminhar junto Eliane, Karen, Giany e Aline e as da Patologia Dr^a Lyliane Pimenta e Dr^a Renata Nery, foi uma honra trabalhar e aprender com grandes profissionais.

Agradeço a todos de minha família pelo enorme carinho, meus avós, tios, tias e primos por estarem sempre aptos a ajuda e aconselhar. Gostaria de agradecer em especial minha prima Alba Oliveira, que disponibilizou seu tempo para me auxiliar em toda a estatística do meu trabalho, me auxiliando desde a rodagem

dos dados até mesmo sanando as minhas dúvidas na interpretação das análises.

Agradeço em especial a minha família maravilhosa, minha fonte de energias, minhas irmãs, Caren Bueno Domíngueti e Cathleen Bueno Domíngueti pelo grande carinho, apoio e paciência. Aos meus pais, Ralph Ponciano Domíngueti e Rosemeire Bueno Teodoro Domíngueti que sempre me motivaram e ajudaram em quais quer necessidade que obtive com muito amor e carinho.

Acima de tudo, agradeço a Deus por me guiar, iluminar e me dar tranquilidade para seguir em frente com os meus objetivos e não desanimar com as dificuldades encontradas.

“O pensamento tem poder infinito. Ele mexe com o destino, acompanha a sua vontade. Ao esperar o melhor, você cria uma expectativa positiva que detona o processo de vitória. Ser otimista é ser perseverante, é ter uma fé inabalável em uma certeza sem limites de que tudo vai dar certo. Ao nascer o sentimento de entusiasmo, o universo aplaude tal iniciativa e conspira a seu favor, colocando-o a serviço da humanidade. Você é quem escreve a história de sua vida, ao optar pelas atitudes construtivas, você cresce como ser humano e filho de Deus. Positivo atrai positivo. Alegria chama alegria! Ao exalar este estado otimista, nossa consciência desperta energias vitais que vão trabalhar na direção de suas metas. Seja incansavelmente otimista. Faz bem para o corpo, para a mente e para a alma! Seja mais paciente consigo mesmo, saiba entender suas limitações. É humano e natural viver aflições, só não é inteligente conviver com ela por muito tempo. Ao escolher com sabedoria viver sua vida com otimismo, seu coração sorri, seus olhos brilham e a humanidade agradece por você existir.” (NERUDA, 1955).

RESUMO

O carcinoma espinocelular (CEC) oral é um relevante problema de saúde pública, com um prognóstico ainda sombrio (taxa de sobrevivência reduzida inferior a 50% em 5 anos) e ainda não apresenta marcadores específicos capazes de prever seu prognóstico. No intuito de um melhor compreender os fatores prognósticos relacionados à carcinogênese oral, este estudo objetivou avaliar o valor prognóstico de sistemas de gradação histopatológica, baseado no: modelo de brotamento e profundidade de invasão (modelo BD), modelo de risco histológico (modelo HR), modelo da Organização Mundial da Saúde (OMS), relação tumor-estroma (TSR) e TSR associado ao modelo BD (TSR e MBD). Adicionalmente avaliamos a imunoexpressão de proteínas relacionadas à tumorigênese oral como: stanniocalcina 2 (STC2), pró-peptídeo N-terminal do pró-colágeno tipo I (PINP), fator eucariótico de alongação delta 1 (EFF1D), Plectina e Fascina, em 124 amostras de CEC de língua e assoalho bucal oriundas do Brasil e Chile. Os resultados em análise univariada, revelaram que margens cirúrgicas comprometidas ($p=0,05$), mostrou significância para sobrevivência específica de doença e resposta linfocitária tipo I e II ($p=0,02$) foi significativa para sobrevivência livre de doença. Em relação aos modelos observamos que escore alto dos modelos BD ($p=0,05$), da OMS ($p=0,001$) e HR ($p=0,05$) mostraram significância para sobrevivência específica de doença. Mais de cinco brotamentos no fronte de invasão ($p=0,03$; $p=0,01$), e escore alto da associação de TRS e MBD ($p=0,05$; $p=0,01$), mostraram significância para sobrevivência específica e livre de doença. Associação de TSR e MBD resistiu à análise multivariada de Cox para os sistemas de gradações histopatológicas, após ajuste para outros fatores prognósticos, considerando tanto sobrevivência específica ($p=0,03$) quanto a livre de doença ($p=0,03$). Em relação aos marcadores a alta imunoexpressão de STC2 ($p=0,05$; $p=0,02$) revelaram significância para sobrevivência específica e resistiram para sobrevivência livre de doença e mais de 50% de células marcadas no estroma com PINP ($p=0,04$) mostraram significância para sobrevivência livre de doença. Marcadores imuno-histoquímicos com TSR e MBD, em análise multivariada de Cox, os parâmetros resistentes foram margens cirúrgicas comprometidas ($p=0,03$) para sobrevivência específica de doença e sequência de tratamento multimodalidade ($p=0,02$) e alta imunoexpressão de STC2 ($p=0,04$) para sobrevivência livre de doença. A associação de TSR e MBD revelou um importante sistema de gradação histológica e tal modelo pode ser útil como auxiliar para estabelecer o prognóstico para CEC de língua e assoalho bucal. Além disso, constatou-se que STC2 e PINP a utilidade de um possível fator prognóstico para o CEC língua e assoalho bucal.

Palavras-chave: Carcinoma espinocelular oral. Brotamento. Profundidade de invasão. Marcadores. Prognóstico.

ABSTRACT

Squamous cell carcinoma (SCC) is an important public health problem, with a poor prognosis (reduced survival rate of less than 50% in 5 years) and still does not provide specific markers able to predict your prognosis. In order to better understand the prognostic factors related to oral carcinogenesis, this study aimed to evaluate the prognostic value of histopathological grading systems, based on: budding model and depth of invasion (BD model), histological risk model (HR), model of the World Health Organization (WHO), tumor-stroma ratio (TSR) TSR and associated with the model BD (TSR and MBD). Additionally we evaluated the expression of proteins related to tumorigenesis: oral stanniocalcin 2 (STC2), N-terminal pro-peptide of pro-collagen type I (PINP), eukaryotic translation elongation factor 1 delta (EFF1D), Plectin and Fascin, in 124 samples of SCC tongue and mouth floor from Brazil and Chile. The results in univariate analysis revealed that compromised surgical margins ($p=0.05$) showed significance for disease-specific survival and type I and II lymphocytic response ($p=0.02$) was significant for disease-free survival. In relation to the models we observed that high score of BD ($p=0.05$), WHO ($p=0.001$) and HR ($p=0.05$) showed significance for disease-specific survival. More than five budding the front invasion ($p=0.03$; $p=0.01$), and high score of association of TRS and MBD ($p=0.05$; $p=0.01$), showed significance for specific survival and disease-free. Association of TSR and MBD resisted the multivariate analysis of Cox for the histopathological grading systems, after adjustment for other prognostic factors, considering both specific survival ($p=0.03$) and free of disease ($p=0.03$). In relation to the high expression of markers STC2 ($p=0.05$; $p=0.02$) revealed significance to specific survival and resisted for survival, disease-free and more than 50% of marked cells in the stroma with PINP ($p=0.04$) showed significance for disease-free survival. Immunohistochemical markers with TSR and MBD in multivariate Cox analysis, the parameters were resistant surgical margins compromised ($p=0.03$) for disease-specific survival and multimodality treatment sequence ($p=0.02$) and high expression of STC2 ($p=0.04$) for disease-free survival. The association of TSR and MBD revealed an important histological grading system and such a model can be useful as an aid to establish the prognosis for SCC of tongue and mouth floor. In addition, it was noted that STC2 and PINP the usefulness of a potential prognostic factor for the SCC tongue and mouth floor.

Keywords: Squamous cell carcinoma. Budding. Depth of invasion. Markers. Prognosis.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

| | | |
|-------------|---|----|
| Figura 1 - | Fronte tumoral indicando brotamento de células neoplásicas (grupos contendo de um à cinco células)..... | 40 |
| Figura 2 - | Profundidade de invasão, mensurada da superfície até o ponto mais invasivo..... | 41 |
| Figura 3 - | Modelo HR, critério de padrão de invasão..... | 43 |
| Figura 4 - | Modelo HR, critério de resposta linfocitária..... | 44 |
| Figura 5 - | Modelo HR, critério presença e ausência de invasão perineural..... | 45 |
| Figura 6 - | Modelo da OMS..... | 46 |
| Figura 7 - | Critérios de avaliação do sistema TSR..... | 48 |
| Figura 8 - | Imunoexpressão de Fascina..... | 52 |
| Figura 9 - | Imunoexpressão de EEF1D..... | 53 |
| Figura 10 - | Imunoexpressão de STC2..... | 54 |
| Figura 11 - | Imunoexpressão de Plectina..... | 55 |
| Figura 12 - | Imunoexpressão de PINP..... | 56 |
| Figura 13- | Sobrevida específica de doença em pacientes com carcinoma espinocelular de língua e assoalho bucal..... | 62 |
| Figura 14- | Sobrevida livre de doença em pacientes com carcinoma espinocelular de língua e assoalho bucal..... | 63 |

LISTA DE TABELAS

| | | |
|------------|---|----|
| Tabela 1 - | TNM / Classificação para câncer oral*..... | 23 |
| Tabela 2 - | TNM / Estadiamento para o câncer oral*..... | 24 |
| Tabela 3 - | Modelo BD proposto por Almangush et al..... | 39 |
| Tabela 4 - | Modelo HR proposto por Brandwein-Gensler et al..... | 42 |
| Tabela 5 - | Anticorpos, diluições utilizadas e marcas..... | 49 |
| Tabela 6 - | Marcação imuno-histoquímica descrita por Dourado et al.... | 51 |
| Tabela 7 - | Marcação imuno-histoquímica descrita por Bagordakis et al..... | 51 |
| Tabela 8- | Características clínico-patológicas e análise univariada para sobrevida específica e livre de doença de pacientes com carcinoma espinocelular de língua e assoalho bucal.... | 59 |
| Tabela 9- | Parâmetros clínico-patológicas, sistemas de gradações histopatológica e análise univariada para sobrevida específica e livre de doença de pacientes com carcinoma espinocelular de língua e assoalho bucal..... | 61 |
| Tabela 10- | Característica dos marcadores imuno-histoquímicos e análise univariada para sobrevida específica e livre de doenças de pacientes com carcinoma espinocelular de língua e assoalho bucal..... | 62 |
| Tabela 11- | Análise multivariada de Cox para os sistemas de gradações histopatológicas para sobrevida específica de doença em pacientes com carcinoma espinocelular de língua e assoalho bucal..... | 64 |
| Tabela 12- | Análise multivariada de Cox para sobrevida livre de doença dos sistemas de gradações histopatológicas em pacientes com carcinoma espinocelular de língua e assoalho bucal..... | 64 |
| Tabela 13- | Análise multivariada de Cox com parâmetros clínicos-patológicos, o sistema de gradação histopatológico TSR e MBD e os marcadores imuno-histoquímicos para sobrevida específica de doença em pacientes com carcinoma espinocelular de língua e assoalho bucal..... | 64 |
| Tabela 14- | Análise multivariada de Cox para sobrevida livre de doença com parâmetros clínicos-patológicos, o sistema de gradação histopatológico TSR e MBD e os marcadores imuno-histoquímicos em pacientes com carcinoma espinocelular de língua e assoalho bucal..... | 65 |
| Tabela 15- | Análise estatística pelo método qui-quadrado dos parâmetros clínicos-patológicos com os sistemas de gradação histopatológica..... | 67 |
| Tabela 16- | Análise dos parâmetros clínicos-patológicos com os marcadores imuno-histoquímicos pelo método qui-quadrado..... | 68 |

LISTA DE ABREVIACOES E SIGLAS

| | |
|------------------|--|
| AIDS/HIV- | Síndrome da Imunodeficiência Adquirida (do inglês - <i>The human immunodeficiency vírus</i>) |
| BSA- | <i>Bovine srum albumins</i> |
| CAF- | Fibroblastos associados ao carcinoma (do inglês - <i>carcinoma associated fibroblastos</i>) |
| CBD- | Catherine Bueno Domingueti |
| CEC- | Carcinoma espinocelular |
| CEP- | Comit de tica e pesquisa |
| CI- | <i>Confidence Interval</i> |
| CID- | Classificao Internacional de Doenças para Oncologia |
| DNA- | cido desoxirribonucleico |
| eEF1- | <i>Eukaryotic elongation fator</i> |
| EEF1D- | <i>Eukaryotic translation elongation factor 1 delta</i> |
| EMT- | Transio epitelial-mesenquimal (do inglês - <i>epithelial mesenchymal transition</i>) |
| GTP- | Guanosina de trifosfato |
| HE- | Hematoxilina e eosina |
| HPV- | Papiloma vírus humano |
| HR- | <i>Hazard Ratio</i> |
| IARC- | Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer |
| INCA- | Instituto nacional do câncer |
| JG- | Josiane Gonçalves |
| Laboratório IPD- | Instituto de preveno e diagnóstica |
| LMRP- | Lívia Mris Ribeiro Paranaíba |
| MEC- | Matriz extracelular |
| MMC- | Milena Moraes de Carvalho |
| Modelo BD- | Modelo de brotamento e profundidade de invasão (do inglês - <i>budding and depth of invasion</i>) |
| Modelo MG- | Modelo de graduao maligna e margem da profundidade de invasão (do inglês - <i>malignancy grading of the deep invasive margins</i>) |
| Modelo HR- | Modelo do risco histológico (do inglês - " <i>histological risk</i> ") |
| MT- | Microambiente tumoral |
| OMS- | Organizao Mundial da Saúde (do inglês - <i>world health organization</i>) |
| PBS- | Tampão de fosfato salino |
| PI- | Padrão de invasão |
| PINP- | Pr-peptídeo N-terminal do pr-colágeno tipo I |
| PICP- | Pr-peptídeo C-terminal do colágeno tipo I |
| POP- | Procedimento Operacional Padrão |
| Rb- | Proteína do retinoblastoma |
| RNA- | cido ribonucleico |
| SED- | Sobrevida específica de doença |
| SLD- | Sobrevida livre de doença |
| SNAIL- | <i>Zinc finger E-box-binding homeobox</i> |

| | |
|--------------|--|
| STC2- | <i>Stanniocalcina 2</i> (do inglês - <i>Stanniocalcin</i>) |
| TNM- | Classificação dos Tumores Malignos |
| p53- | Proteína p53 (do inglês - <i>protein p53</i>) |
| TSR- | Relação tumor-estroma (do inglês - <i>tumor-stromal ratio</i>) |
| TSR e MBD- | TSR associado ao Modelo BD |
| UICC- | União Internacional Contra o Câncer |
| UNIFAL-MG- | Universidade Federal de Alfenas - Minas Gerais |
| UNICAMP-FOP- | Universidade Estadual de Campinas - Faculdade de Odontologia de Piracicaba |
| UV- | Ultravioleta |
| WAGA- | Wilfredo Alejandro González Arriagada |

SUMÁRIO

| | | |
|-------------|---|-----------|
| 1 | INTRODUÇÃO..... | 16 |
| 2 | REVISÃO DA LITERATURA..... | 17 |
| 2.1 | Características epidemiológicas do carcinoma espinocelular (CEC) oral..... | 17 |
| 2.2 | Características clínicas e histopatológicas do CEC oral..... | 19 |
| 2.3 | Classificação Internacional de Tumores da OMS..... | 20 |
| 2.4 | Tratamento, sobrevida e prognóstico em CEC oral..... | 21 |
| 2.5 | Sistemas de classificações histológicas..... | 25 |
| 2.5.1 | Modelo MG..... | 25 |
| 2.5.2 | Modelo HR..... | 25 |
| 2.5.3 | Modelo BD..... | 27 |
| 2.5.4 | TSR..... | 28 |
| 2.6 | Proteínas relacionadas à tumorigênese oral..... | 29 |
| 2.6.1 | Stanniocalcina 2 (STC2)..... | 29 |
| 2.6.2 | Pró-peptídeo N-terminal do pró-colágeno do tipo I (PINP)..... | 30 |
| 2.6.3 | Fator eucariótico de alongação delta 1 (EEF1D)..... | 32 |
| 2.6.4 | Fascina..... | 34 |
| 2.6.5 | Plectina..... | 34 |
| 3 | OBJETIVOS..... | 36 |
| 3.1 | Objetivo geral..... | 36 |
| 3.2 | Objetivos específicos..... | 36 |
| 4 | MATERIAL E MÉTODOS..... | 37 |
| 4.1 | Amostras..... | 37 |
| 4.2 | Coleta de dados clínico-demográficos..... | 37 |
| 4.3 | Microtomia e coloração..... | 38 |
| 4.4 | Análise histopatológica em microscopia de luz da coloração de HE..... | 38 |
| 4.5 | Avaliação do modelo BD..... | 39 |
| 4.6 | Avaliação do modelo HR..... | 42 |
| 4.7 | Avaliação da OMS..... | 45 |
| 4.8 | Avaliação do TSR e associação de TSR e MBD..... | 47 |
| 4.9 | Reação imuno-histoquímica..... | 49 |
| 4.10 | Análise histopatológica imuno-histoquímica..... | 50 |
| 4.11 | Análise estatística..... | 57 |
| 5 | RESULTADOS..... | 58 |
| 6 | DISCUSSÃO..... | 69 |
| 7 | CONCLUSÃO..... | 78 |
| | REFERÊNCIAS..... | 79 |
| | ANEXOS..... | 96 |

1 INTRODUÇÃO

Considerando que o carcinoma espinocelular (CEC) oral é o tumor maligno de cavidade oral mais frequente e que ainda apresenta um prognóstico desfavorável, permanecendo entre 50 e 60% para um período de 5 anos, e que isso reflete o diagnóstico da doença normalmente em estágio avançado e à elevada propensão para a invasão local e a disseminação regional e à distância, a identificação de novos potenciais marcadores prognóstico podem auxiliar na determinação de um prognóstico mais assertivo para o CEC oral. Vale ressaltar que várias características moleculares e histopatológicas têm sido propostas como fatores prognósticos do CEC oral, porém nenhuma ainda é utilizada na prática clínica, levando a utilização do tradicional sistema de estadiamento clínico do paciente, baseado no sistema TNM, para indicar o manejo e prognóstico do paciente. No entanto, em muitos casos esses fatores são inadequados e incapazes de discriminar o comportamento biológico de tumores com o mesmo estadiamento. Isso mostra a necessidade de buscar novos marcadores biológicos, que possam refletir melhor a diversidade biológica da doença e prever com mais acurácia a resposta do paciente às terapias utilizadas convencionalmente.

No intuito de um melhor conhecimento dos eventos biológicos relacionados à carcinogênese oral, bem como a identificação de marcadores que possam contribuir para o prognóstico e tratamento de pacientes com esse tumor, este estudo objetivou avaliar o valor prognóstico tanto de sistemas de gradação histopatológica como o modelo de brotamento e profundidade de invasão (modelo BD), modelo de risco histológico (modelo HR), modelo da Organização Mundial da Saúde (OMS), sistema relação tumor-estroma (sistema TSR) e TSR associado ao modelo BD (TSR e MBD), quanto da imunexpressão de proteínas relacionadas à tumorigênese oral como: stanniocalcina 2 (STC2), pró-peptídeo N-terminal do pró-colágeno tipo I (PINP), fator eucariótico de alongação delta 1 (EFF1D), Plectina e Fascina.

2 REVISÃO DA LITERATURA

A revisão do presente estudo está embasada em definições e exemplos, encontrados na literatura, que denotam a importância de melhorar sobrevida e avaliar prognóstico em pacientes com o carcinoma espinocelular de língua e assoalho bucal e a falta de marcadores imuno-histoquímicos para prever prognóstico.

2.1 Características epidemiológicas do carcinoma espinocelular (CEC) oral

O CEC, também denominado carcinoma de células escamosas ou carcinoma epidermoide, é uma neoplasia maligna de origem epitelial, abrangendo cerca de 4% das neoplasias malignas em todo o mundo (LINGEN et al., 2008). Por representar mais de 95% de todas as neoplasias malignas em cavidade oral, os CECs são genericamente chamados de câncer oral (BARNES, 2005).

De acordo com os últimos relatórios da Agência Internacional de Pesquisa sobre Câncer (IARC), o câncer oral (código CID-10 C00-08) que, inclui localizações como mucosa labial, mucosa bucal, assoalho da boca, rebordo alveolar e gengiva, dois terços anteriores da língua (anterior às papilas circunvaladas), palato duro e trígono-retromolar, tem uma incidência anual de mais de 300.000 casos diagnosticados e a mortalidade anual é de cerca de 145.000 mortes (CHI; DAY; NEVILLE, 2015; RIVERA, 2015). Especificamente por área geográfica, aquelas que apresentam uma elevada incidência de câncer oral são encontrados no Sul e Sudeste da Ásia (Sri Lanka, Índia, Paquistão e Taiwan), no Oeste (França) e na Europa Oriental (Hungria, Eslováquia e Eslovênia), na América Latina e no Caribe (Brasil, Uruguai e Porto Rico) e regiões do Pacífico (Papua-Nova Guiné e Melanésia) (WARNAKULASURIYA, 2009; CHI; DAY; NEVILLE, 2015; RIVERA, 2015; ALI et al., 2017). No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer (INCA), estimou 3.500 novos casos em mulheres e 11.200 em homens, para o ano de 2018. Tais valores correspondem a um risco estimado de 10,86 novos casos a cada 100 mil homens e 3,28 casos a cada 100 mil mulheres (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER, 2018). A incidência é considerada uma das mais altas do mundo, sendo o quinto tipo de câncer mais comum em homens e o décimo segundo nas mulheres.

Preferencialmente, o CEC oral acomete homens brancos (proporção homem-mulher: 2:1) após a quinta década de vida, tabagistas e etilistas (BARNES, 2005). Interessantemente, estudos epidemiológicos recentes têm sugerido que 4 a 6% dos casos de câncer oral no mundo tem ocorrido em adultos jovens, entre 18-45 anos (MAJCHRZAK et al., 2014). Tais pacientes parecem fugir do “padrão típico”, já que muitos não fazem uso de tabaco ou ingerem bebidas alcoólicas, o que indica uma entidade clínica distinta, na qual fatores genéticos, infecções virais e fatores de risco comportamentais podem estar associados (MAJCHRZAK et al., 2014; DE MORAIS et al., 2017; CHAPMAN et al., 2018).

O câncer oral é uma doença com etiologia multifatorial (RIVERA, 2015). Nenhum agente ou fator (carcinogênico) isolado tem sido claramente definido ou aceito, porém tanto fatores extrínsecos como intrínsecos podem contribuir para o desenvolvimento dessa desordem. Dentre os fatores ambientais, os mais correlacionados são o fumo de tabaco e à exposição da mucosa ao álcool presente em mais de 90% de todos os casos de CEC oral (RIVERA, 2015; ALI et al., 2017; CHAPMAN et al., 2018). O risco de desenvolver o câncer oral é 3 vezes maior em fumantes em comparação com não fumantes (GANDINI et al., 2008). Além disso, o risco de câncer oral é 35% menor em pessoas que param de fumar há quatro anos do que aqueles que continuam a fumar, e insuficiente em pessoas sem antecedentes de fumar há mais de 20 anos, quando comparados com pessoas que nunca fumaram. Um ambiente com fumaça de cigarro também é arriscado; o risco de câncer oral é 87% maior naqueles que nunca fumaram, mas foram expostos a um ambiente com fumaça de cigarro (fumante passivo) em comparação com aqueles que nunca fumaram e não foram expostos (LEE et al., 2009). A fumaça do cigarro enfraquece a imunidade na cavidade oral, promovendo a gengivite, periodontite e câncer oral (LEE; TANEJA; VASSALLO, 2012; RIVERA, 2015). Além de demonstrar efeitos genotóxicos e mutagênicos, causa diminuição do fluxo salivar, afeta a capacidade do fígado para lidar com compostos carcinogênicos tóxicos ou potencialmente tóxicos, e a sua utilização crônica está associada a uma disfunção da imunidade inata e adquirida, resultando em um aumento da susceptibilidade às infecções e às neoplasias (REIDY; MCHUGH; STASSEN, 2011; RIVERA, 2015; DE SANTIS et al., 2017). Já o álcool (etanol), pode atuar como um fator de risco tanto local como sistêmico, aumentando a permeabilidade da mucosa oral, dissolvendo lipídeos presentes no epitélio, causando a atrofia do epitélio e

interferindo na síntese e reparação do DNA. No entanto, é incerto se o álcool isoladamente pode iniciar a carcinogênese oral, embora seja bem estabelecido que o álcool em combinação com o tabaco é um fator de risco potencializado para o desenvolvimento do câncer oral. Além disso, um estudo de meta-análise e de revisão sistemática forneceu evidências de uma associação positiva entre o consumo de álcool e mortalidade por câncer do trato aerodigestivo, o qual inclui câncer oral, especialmente quando o consumo de álcool atinge indivíduos que consomem doses moderadas a altas de álcool (LI et al., 2014). Entre outros fatores, destaca-se o papilomavírus humano (HPV), principalmente associado ao carcinoma de orofaringe (particularmente afetando palato e tonsila lingual), e a radiação ultravioleta (UV) (DALIANIS, 2014; CHI; DAY; NEVILLE, 2015; ALI et al., 2017). A IARC classifica o HPV16 como causa de neoplasia maligna para cavidade oral e faríngea, e HPV18 como possivelmente causador de câncer oral. Os locais mais comuns do HPV relacionado a neoplasias malignas de cabeça e pescoço são as amígdalas e a base da língua, com uma taxa de prevalência de 75% (RIVERA, 2015). A presença de HPV é um estabelecido marcador de prognóstico favorável para o câncer de orofaringe localmente avançado (KANG; KIESS; CHUNG, 2015). Acredita-se que o mecanismo pelo qual o HPV contribui para a carcinogênese seja por meio da inibição das proteínas Rb (proteína do retinoblastoma) e p53 que leva à aceleração do ciclo celular e compromete o sistema de reparo do DNA respectivamente (DALIANIS, 2014; CHAI et al., 2015). A radiação solar, particularmente os raios ultravioletas, é a principal causa de carcinomas de pele, sendo também responsável pela etiologia dos CECs do lábio inferior. Os raios UV provocam alterações no DNA pela formação de dímeros de pirimidina e supressão imunológica. Dois mecanismos podem estar envolvidos na indução do câncer de pele e lábio inferior por raios UV: alterações no DNA pela formação de dímeros de pirimidina e supressão imunológica (COTRAN; KUMAR; ROBBINS, 2005).

2.2. Características clínicas e histopatológicas do CEC oral

Clinicamente, o CEC oral se apresenta como uma lesão ulcerada, indolor, com área central necrótica e bordas elevadas. Pode afetar qualquer local da mucosa, mas a língua e o assoalho são os locais de predileção (PIRES et al., 2013). A língua compreende de 25 a 40% dos casos de CEC oral e juntamente com o CEC

de assoalho de boca (15 a 20%) somam mais da metade dos cânceres orais excluindo aqueles que afetam os lábios. Dor, perdas dentárias, sialorréia, trismo, sangramento, disfonia e emagrecimento são vistos nas fases tardias da doença (KOWASLKI; CARVALHO, 2000).

Devido a sua arquitetura histológica com riqueza de vasos linfáticos e predominância de estrutura muscular, o CEC de língua e assoalho são os mais frequentemente associado com metástases para linfonodos do que qualquer outro sítio da cavidade oral. Seu curso clínico também é imprevisível devido à grande taxa de metástases ocultas, o que torna o seu prognóstico pior em relação a lesões similares em orofaringe, laringe, hipofaringe e outros sítios da cavidade oral (BELLO et al., 2011).

Histologicamente as lesões de CEC oral se caracterizam por uma proliferação de células epiteliais pleomórficas com núcleos hipercromáticos, nucléolos evidentes e figuras mitóticas numerosas e/ou atípicas. A proliferação epitelial frequentemente mostra um padrão invasivo ao tecido conjuntivo subjacente, formando ninhos ou ilhas de células epiteliais malignas. Observa-se também queratinização com formação variável de “pérolas”. Invasão angiolinfática e perineural são sinais adicionais de malignidade (JOHNSON et al., 2005; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017).

2.3 Classificação Internacional de Tumores da OMS

A avaliação histopatológica do grau em que esses tumores lembram o seu tecido de origem (epitélio escamoso) e produzem seu produto normal (ceratina) é denominado gradação. Um tumor que é maduro o suficiente para lembrar muito bem seu tecido de origem é classificado, de acordo com a Classificação Internacional de Tumores da OMS, como CECs bem diferenciado (PINDBORG et al., 1997).

Um tumor com muito pleomorfismo celular e nuclear e predominância de células imaturas, com numerosas mitoses típicas e atípicas e com pouca ou nenhuma produção de ceratina é denominado pobremente diferenciado ou anaplásico. Um tumor que apresente aparência microscópica situado em algum local entre esses dois extremos é considerado carcinoma moderadamente diferenciado (JOHNSON et al., 2005). CECs pobremente ou moderadamente diferenciados apresentam células com maior variação em tamanho e forma, mitoses

anormais e menor adesão, características que aumentam sua agressividade e tendência à metástase (KUMAR et al., 2012). No entanto, essa classificação da OMS é essencialmente histológica e limitada. Uma vez que uma neoplasia maligna é uma doença complexa, caracterizada por heterogeneidade genética. O CEC também pode ser classificado com base no seu perfil de expressão genética como "basal", "mesenquimal", "atípico" e "clássico". O subtipo atípico inclui a maior parte dos CECs HPV-positivos (KANG; KIESS; CHUNG, 2015). Tais subtipos, acrescentado à infecção pelo HPV, foram validados utilizando conjuntos de dados independentes do Atlas do Genoma do Câncer (CANCER GENOME ATLAS NETWORK, 2015; WHO, 2017).

2.4 Tratamento, sobrevida e prognóstico em CEC oral

O tratamento do CEC oral baseia-se em cirurgia, radioterapia e/ou quimioterapia. O manejo do pescoço com a realização do esvaziamento cervical pode ocorrer em 3 situações: a primeira indicação se faz para linfadenopatia cervical palpável, a segunda quando há linfadenopatia positiva evidenciada por exames de imagem como tomografia computadorizada ou ressonância magnética, e a terceira indicação quando não há linfadenopatia evidente, mas suspeita-se de metástase cervical oculta em função do local anatômico do câncer primário (REGEZI; SCIUBBA, 2017). A radioterapia adjuvante é planejada após uma avaliação completa do exame histopatológico da peça cirúrgica. As indicações gerais para a administração pós-operatória da radioterapia incluem: margens positivas do tecido mole, mais do que um linfonodo positivo sem invasão extracapsular, um ou mais linfonodo com invasão extracapsular, invasão óssea pelo câncer com margens ósseas negativas, invasão perineural no espécime e a presença de doença imunossupressora com morbidade, como HIV/AIDS. A quimioterapia concomitante à radioterapia mostrou melhora na sobrevida de pacientes em 8 a 10% em CEC de cabeça e pescoço avançado localmente, sendo a cisplatina o quimioterápico de escolha. A quimiorradiação é preferível para pacientes com neoplasia maligna linfonodal avançada (REGEZI; SCIUBBA, 2017; VEDAM; BOAZ; SRINATARAJAN, 2014; CHEN et al., 2016).

Apesar dos avanços nas pesquisas e opções de tratamento, principalmente na investigação de novas drogas quimioterápicas, o prognóstico dos pacientes com

CEC oral se manteve praticamente estático nas últimas décadas, permanecendo entre 50 e 60% para um período de 5 anos (JERJES et al., 2010; AGGARWAL et al., 2014; CHEN et al., 2016). Esse baixo índice de sobrevida é principalmente devido ao diagnóstico tardio e à elevada propensão para a invasão local e a disseminação regional e à distância (WARNAKULASURIYA, 2009). Várias características moleculares e histopatológicas têm sido propostas como fatores prognósticos do CEC oral, porém nenhuma ainda é utilizada na rotina clínica, levando a utilização do tradicional estadiamento clínico do paciente, baseado no sistema TNM, para indicar o manejo e prognóstico do paciente. O sistema foi desenvolvido pela União Internacional Contra o Câncer (UICC) e é denominado de sistema TNM de Classificação dos Tumores Malignos. A letra T representa o tamanho e as características do tumor primário, N as características dos linfonodos das cadeias de drenagem linfática do órgão em que o tumor se localiza e M a presença ou ausência de metástases à distância.

O estadiamento TNM varia para cada forma específica de câncer, mas existem princípios gerais aonde estes parâmetros recebem graduações, geralmente de T0 a T4, de N0 a N3 e de M0 a M1, como demonstrado na tabela 1. Uma lesão *in situ* é classificada como Tis, e com o aumento no tamanho do tumor a classificação varia de T1 a T4. Uma vez determinado os três parâmetros, seus valores são registrados conjuntamente a fim de determinar o estágio adequado. As categorias de estadiamento clínico TNM variam de estágio I a IV, como demonstrado na tabela 2, sendo que o estágio IV ainda possui subdivisões em IVA, IVB e IVC. Quanto maior for o estágio de classificação, pior será o prognóstico (NEVILLE et al., 2016).

No entanto, em muitos casos esses fatores são inadequados e incapazes de discriminar o comportamento biológico de tumores com o mesmo estadiamento. Isto mostra a necessidade de buscar novos marcadores biológicos, que possam refletir melhor a diversidade biológica da doença e prever com mais acurácia a resposta do paciente às terapias utilizadas convencionalmente (SHAH et al., 2011). A desvantagem mais proeminente no uso desse sistema é a limitação quanto a identificação de metástases ocultas loco-regionais. A palpação clínica para linfonodos cervicais apresenta uma taxa aproximada de 30% de falsos negativos (BELLO; SOINI; SALO, 2010).

Tabela 1 - TNM / Classificação para câncer oral*

| Tumor primário (T) | |
|----------------------------------|---|
| TX | Não pode ser avaliado |
| T0 | Nenhuma evidência de tumor primário |
| Tis | Carcinoma in situ (CIS) |
| T1 | Tumor com 2 cm ou menos em seu maior diâmetro |
| T2 | Tumor com mais de 2 cm mas não mais do que 4 cm em seu maior diâmetro |
| T3 | Tumor com mais de 4 cm em seu maior diâmetro |
| T4a | Doença local moderadamente avançada. Lábio: Tumor invade cortical óssea, nervo alveolar inferior, assoalho de boca ou pele (mento ou nariz). Cavidade oral: Tumor invade cortical óssea, musculatura profunda / extrínseca da língua (genioglosso, hipoglosso, palatoglosso e estiloglosso), seio maxilar ou pele da face. |
| T4b | Doença local muito avançada. Lábio e cavidade oral: Tumor invade espaço mastigatório, placas petrígoideas ou base de crânio; ou artéria carótida interna. |
| Linfonodos regionais (N) | |
| NX | Não pode ser avaliado |
| N0 | Nenhum linfonodo regional metastático |
| N1 | Metástase em um único linfonodo ipsilateral, 3 cm ou menos em seu maior diâmetro |
| N2 | Metástase como especificada em: N2a, 2b, 2c (veja abaixo) |
| N2a | Metástase em um único linfonodo ipsilateral, maior do que 3 cm mas não mais do que 6 cm em seu maior diâmetro |
| N2b | Metástase em múltiplos linfonodos ipsilaterais, nenhum maior do que 6 cm em seu maior diâmetro |
| N2c | Metástase em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum maior do que 6 cm em seu maior diâmetro |
| N3 | Metástase em um linfonodo maior do que 6 cm em seu maior diâmetro |
| Metástase à distância (M) | |
| MX | Metástase à distância não pode ser avaliada |
| M0 | Nenhuma metástase à distância |

Fonte: Modificado do grupo de rastreamento da IARC (International agency for research on cancer) (<http://screening.iarc.fr/atlasoralclassiftnm.php>)

Tabela 2 - TNM / Estadiamento para o câncer oral*

| Estádios clínicos (T+N+M) | | | |
|----------------------------------|------------------------|------------|----|
| 0 | Tis | N0 | M0 |
| I | T1 | N0 | M0 |
| II | T2 | N0 | M0 |
| III | T3 (somente), T2 ou T1 | N1 | M0 |
| IV A | T4a | N0 ou N1 | M0 |
| IV B | T1, T2 ou T3 | N2 | M0 |
| | Qualquer T | N3 | M0 |
| IV C | T4b | Qualquer N | M0 |
| | Qualquer T | Qualquer N | M1 |

Fonte: *Modificado do grupo de rastreamento da IARC (International agency for research on cancer) (<http://screening.iarc.fr/atlasoralclassifnm.php>)

A taxa de sobrevida de 5 anos para o carcinoma oral varia de 53% a 68% se o tumor for relativamente pequeno (< 4cm) e não tenha ocorrido metástase no momento do diagnóstico (estádios I e II), 41% quando o tumor for \geq 4cm sem metástase ou com metástase em um único linfonodo regional ipsilateral \leq 3cm (estádio III) e somente 27% quando o tumor tiver invadido estruturas adjacentes, tiver metastatizado para um sítio distante ou estiver associado a metástase regional para múltiplos linfonodos, para um único linfonodo ipsilateral > 3cm e \leq 6cm ou um linfonodo > 6cm (estádio IV). A grande maioria das mortes ocorre dentro dos primeiros 5 anos (NEVILLE et al., 2016).

No entanto, a evolução clínica nem sempre segue esses parâmetros, indicando que outros fatores relacionados ao paciente ou às características biológicas do tumor podem ser relevantes (NEVILLE et al., 2016). A gradação histopatológica detalhada da peça cirúrgica, aliada ao sistema de estadiamento TNM é um critério padrão para o manejo pós-operatório e também para predição de prognóstico atualmente. No entanto, a classificação tradicional dos CECs orais, descrita inicialmente por Broders em 1920 e adotada pela OMS em 1997 (BARNES, 2005) é controversa e muitos autores reconhecem que essa classificação microscópica isoladamente apresenta uma baixa correlação com a evolução e a resposta ao tratamento (WOOLGAR-JULIA, 2006). Esse sistema, como descrito

acima, levou em conta o grau de queratinização do tumor, os níveis de celularidade e pleomorfismo nuclear, além da presença de atividade mitótica (BARNES, 2005).

2.5 Sistemas de classificações histológicas

Segundo Almangush et al. (2014), os sistemas de avaliação criados até o presente não são úteis para prever o prognóstico dos pacientes com CEC oral em estádios iniciais, constituindo modelos com baixa reprodutibilidade para o uso clínico ou não mostram significância prognóstica, particularmente para os tumores de língua e assoalho. Ainda diversos estudos apontam que muitos dos modelos propostos apresentam muita subjetividade e ausência de características importantes relacionadas à tumorigênese, como o padrão de invasão, e o mais importante, a falta de correlação com a evolução do tumor e com as respostas aos tratamentos instituídos para o CEC oral (ALMANGUSH et al., 2014; RODRIGUES et al., 2014; SAWAZAKI-CALONE et al., 2015).

2.5.1 Modelo MG

Bryne et al. (1992), propuseram o modelo MG (modelo de gradação maligna e margens profundas de invasão – do inglês *maligancy grading of the deep invasive margins*). Os autores basearam-se no sistema de Anneroth e o modificaram diminuindo os critérios morfológicos, removendo a avaliação do número de mitoses e avaliando apenas o fronte tumoral nas áreas mais invasivas (BRYNE et al., 1989).

2.5.2 Modelo HR

Brandwein-Gensler et al. (2005), em um estudo com uma amostra de 292 pacientes com CEC oral propuseram um escore de risco altamente prognóstico para recidiva e sobrevivência. O modelo, denominado modelo de risco histológico (modelo HR), compreende um sistema baseado na pontuação de três níveis de parâmetros histopatológicos consistindo em pior padrão de invasão, infiltrado linfocitário e invasão perineural. O padrão de invasão (PI) foi examinado na interface tumor/hospedeiro. Os estudos subsequentes tentando validar esse modelo proposto, foram divergentes e apresentaram metodologias diferentes (BRANDWEIN-GENSLER et al., 2010; VERED et al., 2010; LINDENBLATT et al., 2012;

ALMANGUSH et al., 2014; LI et al., 2013; RODRIGUES et al., 2014; SAWAZAKI-CALONE et al., 2015). Brandwein-Gensler et al. (2010), Vered et al. (2010), Lindenblatt et al. (2012) e Li et al. (2013) apontaram esse modelo como bom para prever o comportamento e prognóstico de CEC oral, no entanto esses estudos mesclam CECs de diferentes localizações de boca e estadiamento de T1 a T4, o que complica a interpretação dos resultados. Por outro lado, Almangush et al. (2014), Rodrigues et al. (2014) e Sawazaki-Calone et al. (2015) não identificaram correlação entre o risco histológico e a sobrevida dos pacientes com CEC oral utilizando o modelo proposto. Muito provavelmente, além dos fatores indicados acima esses resultados divergentes refletem a falta de homogeneização das amostras, como também a falta de reprodutibilidade dos três parâmetros considerados no modelo HR, o que pode dificultar a interpretação dos dados. Por exemplo, considerando o parâmetro pior PI, estudos demonstram que tumores formados por pequenas ilhas de células são mais agressivos e com pior prognóstico que tumores com grandes ilhas (BRYNE; JENSSEN; BOYSEN, 1995). Interessantemente, esse parâmetro, além de ocorrer muito frequentemente, o pior PI tipo IV, caracterizado pela presença de ilhas tumorais contendo menos que 15 células no fronte de invasão, é de longe, o PI mais comum em CEC oral, mesmo em estádios iniciais, o que torna a distinção do comportamento tumoral baseada nesse aspecto muito limitada (RODRIGUES et al., 2014; ALAEDDINI; ETEMAD-MOGHADAM, 2016). Considerando a resposta linfocitária do hospedeiro, tumores com escasso ou ausência de infiltrado inflamatório são classificados como de alto risco para recorrência locoregional e sobrevida curta.

Atualmente, um importante dilema existe sobre o papel da resposta imune e inflamatória ao tumor, com ambos efeitos pró-tumoral e antitumoral (IMURA et al., 2005; ESSA et al., 2014; MURPHY et al., 2014; SANTOS et al., 2017; SÁNCHEZ-ROMERO et al., 2018).

Assim, uma suposição de que a alta densidade de linfócitos seja uma característica morfológica a favor de um tumor de baixo risco com um bom prognóstico parece equivocada, uma vez que existe uma clara evidência de que as células imunes e inflamatórias podem evocar tanto a promoção tumoral quanto o efeito anti-tumoral, dependendo do contexto e dos tipos celulares envolvidos (RODRIGUES et al., 2014; SANTOS et al., 2017; SÁNCHEZ-ROMERO et al., 2018). Já o quesito invasão perineural, não há evidências consistentes do efeito no

crescimento tumoral e na sua disseminação, com apenas um estudo mostrando significância no prognóstico em CEC oral (TAI et al., 2012).

2.5.3 Modelo BD

Almangush et al. (2014), desenvolveram um promissor sistema histopatológico, denominado modelo BD, com dois parâmetros: (B) brotamento tumoral (do inglês - *tumor budding*) e (D) profundidade de invasão (do inglês - *depth of invasion*), que visa identificar aqueles pacientes com casos agressivos de CEC oral em estádios iniciais (estádios I e II), os quais poderiam ser beneficiados por um tratamento com diferentes abordagens (ALMANGUSH et al., 2015). Definiu-se como brotamento tumoral a presença de uma única célula ou conjunto com menos de cinco células malignas no fronte de invasão (ALMANGUSH et al., 2014).

As pesquisas mostram que essa variável reflete a atividade biológica tumoral e têm sido consistentemente reconhecida como um fator prognóstico reprodutível, independente e significativo (LUGLI; KARAMITOPOULOU; ZLOBEC, 2012; TERRAMOTO et al., 2013; JUNIOR et al., 2014; ARORA et al., 2017; LEÃO et al., 2017; JUNIOR et al., 2017; SHIMIZU et al., 2018; HONG-KYOUNG-OK et al., 2018). Interessantemente, o brotamento tumoral tem sido sugerido como sendo um sinal de transição epitélio mesênquima (EMT) de células neoplásicas, refletindo o poder de crescimento invasivo de carcinomas de língua (WANG et al., 2011; SHIMIZU et al., 2018), mama (LIANG et al., 2013) e colorretal (PRALL, 2007). Já a profundidade de invasão consistiu na medida da superfície tumoral até o ponto mais profundo de invasão. Alguns estudos apontam que essa variável representa um indicador do potencial maligno do CEC de língua (JERJES et al., 2010) e possui valor prognóstico importante para tumores em estágios iniciais (LIN et al., 2011; GANLY et al., 2013). Diante dos resultados encontrados, Almangush et al. (2014) sugeriram que tal método era promissor para selecionar aqueles casos iniciais de CEC de língua que são de alto risco para recorrência e/ou para disseminação à distância que subsequentemente levariam à morte pela doença. Diante dessa discussão, evidencia-se a necessidade de reavaliar e validar a efetividade na predição do prognóstico desses pacientes com CEC oral em estádios iniciais, já que esse modelo proposto é relativamente recente, prático e com um promissor valor preditivo. Interessantemente, um estudo avaliando a associação de quatro

diferentes sistemas de gradação histopatológica (sistema de gradação adotado pela OMS, modelo MG, modelo HR e o modelo BD) com parâmetros clínico-patológico e evolução de 113 casos de CEC oral, demonstrou que apenas o modelo BD mostrou um importante valor preditivo para pacientes com CEC oral em diferentes estágios (SAWAZAKI-CALONE et al., 2015), ratificando o valor prognóstico desse novo sistema de classificação histopatológica. Tal resultado vem sendo confirmado nos últimos anos por vários trabalhos (XIE et al., 2015; STRIEDER et al., 2016; ALMANGUSH et al., 2017; SEKI et al., 2017; BRENNAN et al., 2017; SHIMIZU et al., 2018; HONG-KYOUNG-OK et al., 2018).

2.5.4 TSR

Pesquisas vêm demonstrando que o crescimento do tumor é dependente do estroma circundante ao tumor, (microambiente tumoral - MT), apresentando importância fundamental na progressão do tumor (TOMASEK et al., 2002; ALBIN; SPORN, 2007; LI; FAN; HOUGHTON, 2007; DE WEVER et al., 2008; MARSH et al., 2011; SOBRAL et al., 2011; LIANG, 2011; LIN et al., 2013; ROMMEL et al., 2013; WHEELER et al., 2014; MATHIAS; GOPAL; SIMPSON, 2013; CURRY et al., 2014; RIVERA; VENEGAS, 2014; ELMUSRATI et al., 2017). Dessa maneira, Almangush et al. (2018) analisou a relação entre tumor-estroma (TSR – do inglês *tumour-stromal ratio*) em 311 pacientes procurando áreas ricas em estroma próximo ao fronte tumoral, mas com células neoplásicas nos quatro lados do campo observado e classificando, como: pobre de estroma (< 50%) ou rico em estroma (\geq 50%). O estudo mostrou que pacientes com tumor rico em estroma obtiveram um pior prognóstico do que pacientes com estroma pobre. Alguns trabalhos utilizaram o TSR para predizer prognósticos em vários tumores, como nasofaríngeo (ZHANG et al., 2014), esôfago (WANG et al., 2012), colón (HYNES et al., 2017) e mama (VANGANGELT et al., 2017) e encontraram que tumores ricos em estroma foram associados com mau prognóstico e maior risco de recidiva, sendo um sistema promissor para previsão e realização de tratamentos sob medida para pacientes com câncer. Além disso, o estudo correlacionou o TRS com o modelo BD (TSR e MBD), fornecendo uma estimativa interessante para o prognóstico de pacientes com CEC oral em fase inicial.

2.6 Proteínas relacionadas à tumorigênese oral

De forma inédita, pesquisas do laboratório do Dr Ricardo Della Coletta identificaram, através da análise do secretoma de fibroblastos associados ao CEC oral, proteínas superexpressas por fibroblastos associados ao carcinoma (CAFs) envolvidas na organização e remodelação da matriz extracelular e no metabolismo do colágeno. Dentre as proteínas mais expressas está STC2 (stanniocalcina 2), um hormônio glicoprotéico expresso em uma variedade de tecidos para regular a homeostase dos íons de cálcio e fosfato. Associadamente, os resultados demonstraram que o colágeno tipo I, o principal componente do tecido conjuntivo, também foi associado com vários processos biológicos superexpressos em CAFs, como a expressão de PINP foi significativamente correlacionada com a presença de CAFs no fronte tumoral e a taxa de sobrevida foi significativamente menor em pacientes com CEC oral. Tais resultados sugerem que CAF é a principal célula produtora de colágeno tipo I, e além disso, ratifica o valor do secretoma de CAFs para o microambiente de CECs orais. A pesquisa ainda sugere novos potenciais alvos terapêuticos como a STC2 e, que PINP pode ser um promissor marcador prognóstico para o CEC oral (BAGORDAKIS et al., 2016). Além disso, em outro trabalho do mesmo grupo Flores et al. (2016), identificou-se, através de microdissecção a laser associada à proteômica baseada em espectrometria de massas, que a proteína EEF1D foi considerada um potencial biomarcador para o CEC oral e, ainda, foi validada por western-blot e imuno-histoquímica podendo futuramente ser indicada também para validação em estudos translacionais. Em outro trabalho prévio, Rodrigues et al. (2017), identificou as proteínas fascina e plectina são marcadores prognóstico independente para sobrevida global e sobrevida específica da doença em pacientes com CEC oral e revelaram que fascina é capaz de regular eventos importantes para o desenvolvimento e progressão do CEC oral. Dessa forma, as proteínas selecionadas para investigação partiram desses trabalhos. A seguir serão apresentadas tais proteínas relacionadas à tumorigênese.

2.6.1 Stanniocalcina 2 (STC2)

STC2 (membro da família STC) é um hormônio glicoprotéico expresso em uma variedade de tecidos para regular a homeostase dos íons de cálcio e fosfato. A

proteína pode desempenhar um papel na homeostase do cálcio/fosfato celular e no metabolismo celular. Superexpressão de STC2 em camundongos resultou em restrição de crescimento pré e pós-natal, redução de crescimento ósseo e músculo esquelética, e organomegalia. Curiosamente, a expressão desregulada de STC2 em vários tipos de câncer, entre eles o renal, de próstata, colo-retal, mama e ovariano, foi demonstrada por alguns estudos anteriores e sua expressão foi correlacionada com um prognóstico ruim (LAW et al., 2008; TAMURA et al., 2009; LAW; WONG, 2010; HOU et al., 2015; ZHANG; GUAN; PENG, 2015). Hou et al. (2015) mostraram que STC2 pode inibir EMT pelo menos parcialmente através da sinalização mediada por Claudina/PKC em células humanas de câncer de mama, sugerindo que essa proteína possa ser explorada como um biomarcador para metástase e alvo terapêutico para o câncer de mama. Em câncer cervical, o carcinoma mais comum do aparelho reprodutor feminino, Wang et al. (2015), identificaram que STC2 pode regular a atividade de sinalização da via de MAPK, promovendo a proliferação celular e ainda a resistência à cisplatina em células malignas. Com resultados não muito distintos, Na et al. (2015), partindo da análise de secretoma de cultura primária de carcinoma de pulmão, evidenciaram que STC2 pode ser um potencial biomarcador para câncer de pulmão e que apresenta uma importante função na metástase e progressão dessa neoplasia maligna. Arigami et al. (2013), utilizando amostras de sangue de 93 pacientes com câncer de estômago, encontraram que a alta expressão de STC2 está significativamente associada à sobrevida reduzida dos pacientes com câncer de estômago e que STC2 pode ser um potencial marcador molecular sanguíneo para prever progressão tumoral por monitoramento de células tumorais circulantes. Recentemente, Bagordakis et al. (2016), através de análise do secretoma dos CAFs, identificaram que a superexpressão de STC2 também pode estar associada a maior capacidade das células tumorais se tornarem mais invasivas e pró-metastática. Excetuando Bagordakis et al. (2016), que representa o grupo de estudo do Dr. Ricardo Della Coletta, ainda não há estudos de STC2 em CEC oral.

2.6.2 Pró-peptídeo N-terminal do pró-colágeno do tipo I (PINP)

Como mencionado acima, Bagordakis et al. (2016) identificaram, através da análise do secretoma de fibroblastos associados ao CEC oral, proteínas superexpressas por CAFs envolvidas na organização e remodelação da matriz

extracelular e no metabolismo do colágeno. Além de STC2, os resultados demonstraram que o colágeno tipo I, o principal componente do tecido conjuntivo, também foi associado com vários processos biológicos superexpressos em CAFs, como a expressão de PINP foi significativamente correlacionada com a presença de CAFs no fronte tumoral e a taxa de sobrevida foi significativamente menor em pacientes com CEC oral. Tais resultados sugerem que CAF é a principal célula produtora de colágeno tipo I, e além disso, ratifica o valor do secretoma de CAFs para o microambiente de CECs orais. A pesquisa ainda sugere o potencial terapêutico representado por STC2 e, que PINP pode ser um promissor marcador prognóstico para o CEC oral.

Considerando PINP, a família de proteínas de colágeno são as proteínas mais presentes no corpo humano. O colágeno tipo I é responsável por mais de 50% do total de colágenos e está presente no tecido conjuntivo frouxo, pele e órgãos internos e mais abundante nos ossos no qual constitui mais de 90% da matriz orgânica (NIMNI, 1983). O colágeno tipo I é sintetizado como um precursor, pró-colágeno tipo I, com domínios pró-peptídeos nas duas extremidades, os quais são clivados enzimaticamente após sua secreção para a MEC antes de tornar-se fibras de colágeno. Após a clivagem do pró-colágeno, do PINP e o pró-peptídeo C-terminal do colágeno tipo I (PICP) são liberados na circulação, onde podem ser analisados por ensaios enzimáticos (JENSEN et al., 1998; BRANDT et al., 1999). A quantidade de PINP e PICP que entra na circulação são marcadores diretos da síntese de colágeno tipo I (ORUM et al., 1996; BAGORDAKIS et al., 2016).

Estudos imuno-histoquímicos demonstraram síntese e deposição aumentada do PINP sérico no feto comparado ao adulto (TORNEHAVE et al., 1989; RASMUSSEN et al., 1989) e na cicatrização de feridas (RASMUSSEN et al., 1992). Salo et al. (2013) demonstraram que os CAFs também secretam vários tipos de colágeno, os quais podem promover o crescimento tumoral, invasão e disseminação. Interessantemente, a produção de PINP foi associada com um prognóstico ruim em pacientes com CEC de língua (SALO et al., 2013). Em tumores de mama, os níveis de PINP também foram associados a um pior prognóstico (MARIN et al., 2011), assim como em tumores de ovário (SIMOJOKI et al., 2003). As células malignas estão envolvidas num processo de remodelação da matriz incluindo a destruição e degradação da matriz e a indução da formação de novo de MEC pré-existente. Curiosamente, McCloskey et al. (2010), investigando o uso de clodronato

para prevenção de osteoporose e perda óssea em mulheres tratadas pelo câncer de mama, identificaram que variações precoces nos níveis de PINP estão associados com alterações na densidade óssea mineral e, provavelmente, no desenvolvimento precoce de metástases ósseas, supondo a participação de PINP na tumorigênese.

2.6.3 Fator eucariótico de alongação delta 1 (EEF1D)

Flores et al. (2016) identificaram, a superexpressão de uma subunidade proteica chamada EFF1D (do inglês, *Eukaryotic translation elongation factor 1 delta*) em CEC oral e observaram que essa subunidade tem participação direta no processo de proliferação celular e indução de fenótipo EMT (incluindo invasão celular), muito provavelmente através de vias de expressão de fatores de transcrição como o SNAIL, SNAIL1 (do inglês, Zinc finger E-box-binding homeobox 1) e SNAIL2 (do inglês, Zinc finger E-box-binding homeobox 2), que tiveram sua expressão reduzida em células silenciadas por EEF1D. Tais evidências suportam que o EEF1D possa ser um crítico indutor de proliferação e que possa ter um importante papel na mediação de EMT nas células de CEC oral. Uma vez que EMT mostra uma justa associação com invasão e metástase nas neoplasias malignas, um completo entendimento dos mecanismos moleculares pelos quais as células tumorais evocam nesse processo é fundamental para o aprimoramento da terapia anti-câncer.

EFF1D é um membro delta da família eEF1 (do inglês, *eukaryotic elongation factor*) a qual representa um complexo de proteínas enzimáticas não ribossômicas que, na sua forma ligada a GTP, medeiam síntese de proteínas através do recrutamento de moléculas de RNAt-aminoacil ao ribossomo (COCQUYT et al., 2009). Proteínas eEF1 também estão relacionadas a outras funções celulares, incluindo a exportação nuclear de RNAt, reconhecimento de proteínas danificadas e ativação do sistema de degradação via ubiquitina-proteossomo, apoptose e regulação de senescência, além de propagação viral (SASIKUMAR; PEREZ; KINZY, 2012). Especificamente, a subunidade EFF1D funciona como fator de troca do nucleotídeo guanina. É relatado que após a infecção por HIV-1, a subunidade delta interage com HIV-1 *tat*, uma proteína regulatória que melhora drasticamente a eficiência da transcrição viral. Esta interação resulta na repressão da tradução de proteínas das células hospedeiras e reforça a tradução de proteínas virais (ROTGER et al., 2011). Curiosamente, uma vertente crescente de evidências sugere que a

regulação positiva de proteínas eEF1, particularmente a subunidade alfa (EEF1A), pode ser necessária para o controle de comportamentos celulares durante a tumorigênese (LECLERCQ; MORETTI; PITSON, 2011). Além disso, alguns estudos sugeriram que EEF1D pode desempenhar um papel em certas neoplasias malignas (SHUDA et al., 2000; OGAWA; UTSUNOMIYA; MIMORI, 2004; DE BORTOLI et al., 2006; KAITSUKA; MATSUSHITA, 2015). A superexpressão de EEF1D já foi previamente associada a alguns tumores malignos, incluindo carcinoma hepático (SHUDA et al., 2000), carcinoma de esôfago (OGAWA; UTSUNOMIYA; MIMORI, 2004), carcinoma de pulmão (LIU et al., 2014), meduloblastoma (DE BORTOLI et al., 2006) e carcinoma renal (KAITSUKA; MATSUSHITA, 2015). Associadamente, os estudos sugerem que EEF1D pode funcionar como um proto-oncogene quando superexpresso (JOSEPH et al., 2002; LEI; CHEN; WU, 2002). Além disso, os estudos evidenciam que alterações na expressão de EEF1D podem resultar na susceptibilidade à transformação e à aquisição de propriedades oncogênicas. Embora o papel de cada uma das subunidades individuais do complexo EEF1 não tenha sido claramente demonstrado, a expressão das subunidades de EEF1 está desequilibrada em alguns tumores, indicando que os componentes do complexo EEF1 podem executar funções individuais e relevantes em neoplasias malignas (VEREMIEVA et al., 2011).

Vale destacar que Flores et al. (2016), em um estudo prévio, avaliando potenciais marcadores para o CEC oral, utilizando microdissecção à laser, associada à proteômica baseada em espectrometria de massas, identificou inicialmente 2.529 proteínas, e dessas, 107 se mostraram mais expressas no CEC oral o EEF1D foi a proteína indicada para validação por ter apresentado reprodutibilidade de expressão entre as amostras de CEC oral, alta significância estatística, expressão aumentada em CEC oral e porque a sua função biológica ainda não havia sido investigada para essas neoplasia. Os resultados de ensaios de validação confirmaram uma maior expressão de EEF1D em CEC oral e considerou a proteína um potencial biomarcador para o CEC oral podendo futuramente ser indicada também para validação em estudos translacionais. Além de EEF1D, às proteínas fascina e plectina, apresentaram resultados promissores nas amostras de CEC oral, necessitando de mais estudos que confirmem o potencial dessas proteínas como marcadores para essa neoplasia maligna de boca.

2.6.4 Fascina

Fascina é uma proteína de ligação ao citoesqueleto associada à motilidade celular e migração celular tanto em condições neoplásicas quanto em situações normais (YAMAKITA et al., 1996; ADAMS; SCHWARTZ, 2000; ADAMS, 2004; KUREISHY et al., 2002; OSMANAGIS-MYERS et al., 2006; HASHIMOTO; PARSON; ADAMS, 2007; CHEN et al., 2010; JANSEN et al., 2011; TÜRMER et al., 2015). A expressão de fascina é baixa ou ausente em células epiteliais normais, mas é superexpressa em tumores associados com prognóstico ruim (MA; MACHESKY, 2014). Vários estudos revelaram uma correlação positiva entre a expressão de fascina e displasias (SHIMAMURA et al., 2011) e neoplasias malignas de pulmão (GHEBEH et al., 2014; GROTHEY et al., 2000; YODER, et al., 2005), colón (HASHIMOTO et al., 2006; PUPPA et al., 2007; VIGNJEVIC et al., 2007; ADAMS, 2015), gástrico (HASHIMOTO et al., 2004), bexiga (BI et al., 2013), mama (AL-ALWAN et al. 2011), renal (TONG et al., 2005), esofágico (XUE et al., 2006; ZHANG et al., 2006; XIE et al., 2010), laringe (GAO et al., 2012) e boca (ALAM et al., 2012; MA; MACHESKY, 2014; RODRIGUES et al., 2017; ROUSTRAY et al., 2017). Curiosamente, a superexpressão de fascina no carcinoma primário tem sido correlacionada à metástase linfonodal e/ou à distância, além de diminuição da sobrevida global (ZIGEUNER et al., 2006; LEE et al., 2007; PUPPA et al., 2007; ALAM et al., 2012). Associadamente, os estudos apontam que fascina pode representar um potencial alvo molecular para a intervenção terapêutica e um importante regulador de metástase no microambiente tumoral, além de um preditor de prognóstico (CHEN et al., 2007; ROUSTRAY et al., 2017). Especificamente em CEC oral, alta expressão de fascina foi associada com agressividade, regulação de EMT e invasão (CHEN et al., 2007; RODRIGUES et al., 2017). Portanto, estudos explorando essas proteínas associada ao citoesqueleto têm sido encorajados para melhor elucidar seu papel na tumorigênese oral.

2.6.5 Plectina

Plectina é uma proteína importante para a manutenção da arquitetura, integridade e morfologia celular ao se ligar a proteínas do citoesqueleto (WICHE, 1998; WINTER; WICHE, 2013; HARRYMAN et al., 2016). Ela está localizada na

superfície intracelular da membrana citoplasmática, nos sítios de fixação dos filamentos intermediários, microtúbulos e microfilamentos e forma uma rede citoplasmática e nuclear que fornece às células uma resistência mecânica (WICHE; WINTER, 2011; CASTAÑÓN et al., 2013; WALKO; CASTANÓN; WICHE, 2015; FRANKE et al., 2015; HARRYMAN et al., 2016). A plectina também participa da polimerização de fibrilas de fibronectina enquanto ocorre a adesão fibrilar, e da regulação de invasão e migração celular através da ativação de quinase ERK1/2 (OSMANAGIC-MYERS et al., 2006; REZNICZEK; WALKO; WICHE, 2010; RIKARDESEN et al., 2015; KATADA et al., 2012). Sua participação, nos mecanismos de ação e a regulação da plectina em neoplasias malignas ainda permanece incerto, mesmo com alguns estudos indicando a superexpressão da proteína em tumores malignos, localizados em cólon (LEE et al., 2004), pele (RAYMOND et al., 2007; CASTANÓN et al., 2013), pâncreas (BAUSCH et al., 2009; BAUSCH et al., 2011; YU et al., 2012; KONKALMATT et al., 2013; CHEN et al., 2018), fígado (CHENG et al., 2015; CHEN et al., 2018), esôfago (PAWAR et al., 2011; HU et al., 2015) e cabeça e pescoço (TAKKUNEN et al., 2010; SUTOH-YONEYAMA et al., 2014; CHAUDHARI et al., 2017). Katada et al. (2012), mostraram que plectina está correlacionada com proliferação, migração, invasão e pior prognóstico em CEC de cabeça e pescoço. Rikardsen et al. (2015), encontraram que a baixa expressão de plectina favorece um melhor prognóstico somente para pacientes com CEC oral não metastáticos. A escassos estudos relacionado à plectina, evidencia a necessidade de trabalhos explorando esta proteína na tumorigênese oral para que o seu papel possa ser esclarecido.

Dessa forma, o objetivo deste estudo é avaliar o valor prognóstico do sistema de gradação histopatológica proposto por Almangush et al. (2014), denominado modelo BD e correlaciona-lo com outros quatro sistemas de gradação histopatológica descritos na literatura, além de determinar imunoexpressão de proteínas relacionadas à tumorigênese oral como PINP, STC2, EEF1D, Plectina e Fascina no prognóstico de CEC de língua e assoalho bucal.

3 OBJETIVOS

Diante do que foi exposto e na necessidade de se encontrar um sistema de classificação histopatológica e marcadores imuno-histoquímicos que prediz prognóstico em pacientes com CEC de língua e assoalho bucal, as finalidades dessa dissertação estão fundamentadas nos seguintes objetivos.

3.1 Objetivo geral

Avaliar o valor prognóstico tanto de sistemas de gradações histopatológicas, quanto da imunexpressão de proteínas relacionadas à tumorigênese oral em amostras de CEC de língua e assoalho bucal.

3.2 Objetivos específicos

Avaliar o valor prognóstico de sistemas de gradação histopatológica, tais como: modelo de brotamento e profundidade de invasão (modelo BD), modelo de risco histológico (modelo HR), modelo da Organização Mundial da Saúde (OMS), sistema relação tumor-estroma (sistema TSR) e TSR associado ao modelo BD, em amostras de carcinoma espinocelular de língua e assoalho bucal.

Determinar o valor da marcação imuno-histoquímica das proteínas: PINP (Pró-peptídeo N-terminal do pró-colágeno tipo I), STC2 (Stanniocalcina 2), EEF1D (Fator de alongamento de tradução eucariótica 1 delta), Fascina e Plectina no prognóstico de carcinoma espinocelular de língua e assoalho bucal.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Para cumprimento dos objetivos propostos para este trabalho, foram realizados diferentes métodos que serão discutidos em sequência.

4.1 Amostras

Em uma avaliação epidemiológica inicial foram analisados mais de 195 casos de CEC oral (excluindo lábios) do Hospital Bom Pastor de Varginha, MG, entre os anos de 1998 a 2013. Os critérios de inclusão escolhidos para este trabalho foram: (1) Pacientes com diagnóstico de CEC oral tratados nesse hospital; (2) Tratamento cirúrgico realizado de acordo com procedimento padrão e consistindo em ressecção do tumor primário; (3) Dados clínico-patológicos e o material do tumor emblocado em parafina suficiente para avaliação. Os pacientes que contemplavam os critérios de inclusão somam 121 casos de CEC oral. Também foram avaliados 44 pacientes com CEC oral do Hospital Carlos Van Buren de Valparaíso – Chile, sob os mesmos critérios de inclusão.

4.2 Coleta de dados clínico-demográficos

Os dados demográficos (idade e gênero), hábitos (de fumar e consumo de álcool), clínicos (tempo de queixa, local do tumor e estágio clínico, comprometimento linfonodal, recidiva, metástase, tratamento realizados, sobrevida específica e sobrevida livre da doença) foi coletada dos prontuários em ficha apropriada (Anexo A). A descrição da recidiva loco-regional da doença foi discriminada por meio dos registros clínicos se essa foi local (no sítio do tumor primário), regional (no sítio da metástase cervical) ou a distância.

A sobrevida livre de doença (SLD), foi mensurada em meses, do dia da cirurgia até o primeiro evento patológico documentado (tanto recidiva loco-regional como primeira metástase à distância) ou a data da última proervação (*follow-up*). A sobrevida específica de doença (SED), foi medida também em meses, mas do dia da cirurgia até o óbito ou última data da proervação, indiferente ao *status* da doença.

Este trabalho foi aprovado pelos Comitês de Ética em Pesquisa (CEP) da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG); Universidade Estadual de

Campinas – Faculdade de Odontologia de Piracicaba (UNICAMP-FOP) e Universidade de Valparaíso - Chile (Anexo B, C e D).

4.3 Microtomia e coloração

Os blocos de CEC oral analisados foram gentilmente cedidos pelo Laboratório IPD (Instituto de Prevenção e Diagnóstica) de Varginha-MG, responsável pela análise anatomopatológica de todas as amostras do Hospital Bom Pastor de Varginha-MG. As peças cirúrgicas foram processadas no laboratório de Patologia do Departamento de Patologia e Parasitologia da UNIFAL-MG. Os cortes e as colorações, realizadas para a primeira análise histopatológica, foram cortes com 5 µm de espessura de todos os blocos de parafina de cada paciente. Em seguida, foram corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE).

O preparo das lâminas e coloração de HE referente às amostras dos pacientes com CEC oral do Hospital Carlos Van Buren de Valparaíso – Chile foram processadas pelo professor Wilfredo Alejandro González Arriagada.

4.4 Análise histopatológica em microscopia de luz da coloração de HE

Todas as análises foram realizadas com auxílio microscópio óptico AxioCam ICc3 (Zeiss, Alemanha) e a captura de imagens utilizando-se o programa AxioVision (Zeiss, Alemanha).

A análise dos cortes corados em HE de Varginha – Brasil, foi realizada em microscopia de luz por 2 avaliadores CBD (Catherine Bueno Domingueti) e LMRP (Lívia Máris Ribeiro Paranaíba), onde foram selecionadas duas lâminas que melhor representassem o fronte de invasão (considerado como a porção de tecido conjuntivo entre as células tumorais mais invasivas e o tecido normal adjacente) e a melhor extensão de profundidade tumoral. As amostras de Valparaíso – Chile, passaram pelo mesmo critério de observação e foram separadas por WAGA (Wilfredo Alejandro González Arriagada) além de realizar todas as leituras das lâminas seguindo os critérios propostos e quando apresentou dúvidas foram encaminhadas fotografias para a discussão com CBD e LMR.

4.5 Avaliação do modelo BD

A análise dos cortes, foi realizada pela captura de imagens, para avaliar o modelo BD. As capturas de imagens foram realizadas nos aumentos de 2,5x para profundidade de invasão e objetiva de 40x para o número de brotamentos. A leitura das lâminas foi realizada de modo independente por 2 avaliadores CBD, MMC (Milena Moraes de Carvalho) após o seu período de calibração e casos onde houve discordância, a lâmina foi reavaliada por CBD, MMC e LMRP. A análise histopatológica seguiu os critérios publicados por Almangush et al. (2014), que avalia duas características histopatológicas: brotamento tumoral (B, do inglês - *budding*) são grupamentos de até 5 células neoplásicas presentes no fronte de invasão, como demonstrado na figura 1 e profundidade de invasão (D, do inglês - *depth of invasion*) que é medida da superfície do tumor até o fronte de invasão, figura 2. Classificamos essas duas características histopatológicas de acordo com os escores 0 (baixo risco), 1 (risco intermediário) e 2 (alto risco), descrito na tabela 3. Para análise estatística realizamos a união de baixo risco e risco intermediário (1) versus alto risco (2).

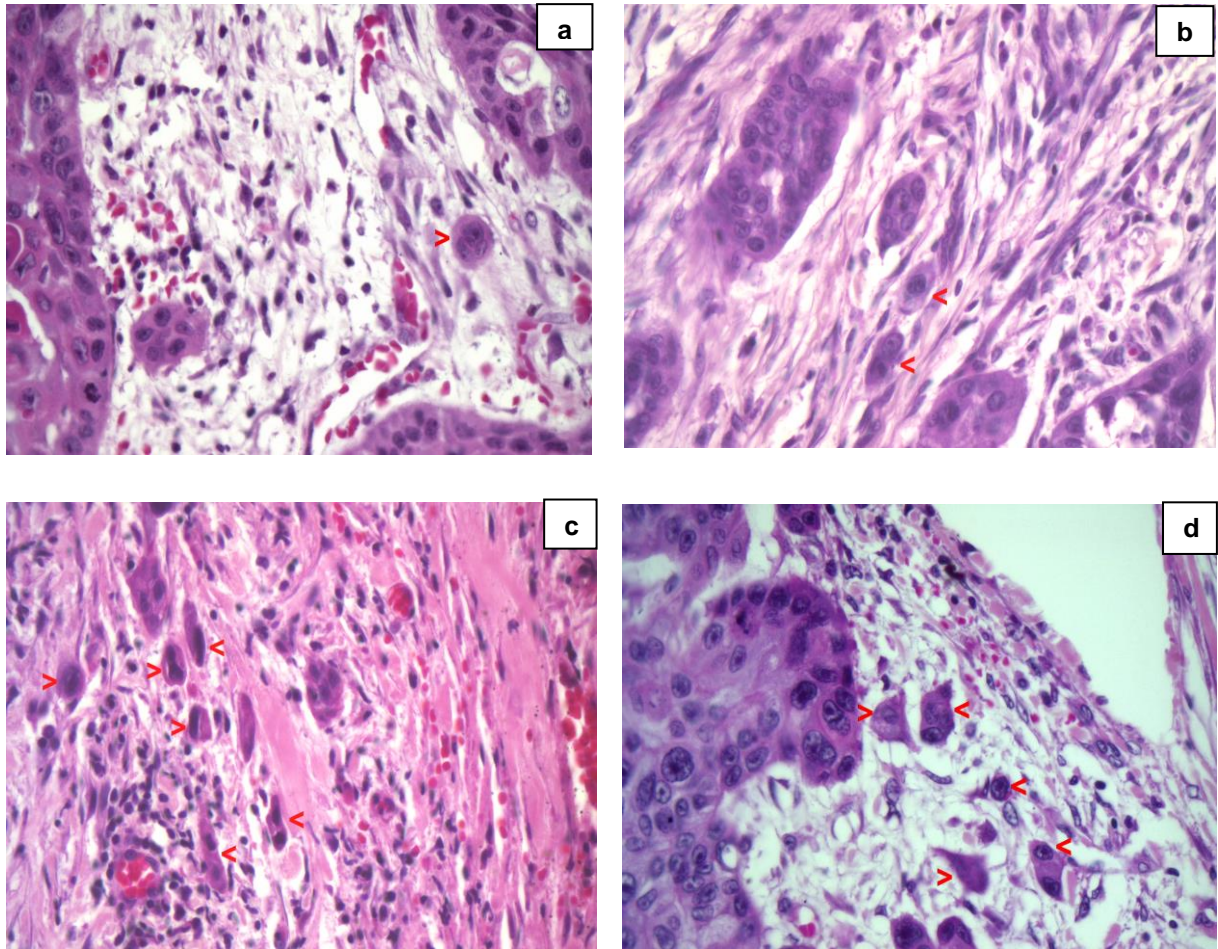
Tabela 3- Modelo BD proposto por Almangush et al.

| Modelo BD* | |
|-------------------|--|
| Escores BD | Descrição histológica |
| 0 | A) Tumor com < 4mm de profundidade de invasão e < 5 B) O tumor não invade estrutura vital subjacente. |
| 1 | A) Tumor com ≥ 4mm de profundidade de invasão e < 5 brotamentos no fronte de invasão. B) Tumor superficial (<4 mm), mas com alta atividade de brotamento no fronte de invasão (≥ 5 brotos). |
| 2 | A) Tumor com ≥4 mm de profundidade de invasão e com alta atividade de brotamento no fronte de invasão (≥ 5 B) Tumor, ocasionalmente, mostra invasão vascular e/ou |

Fonte: ALMANGUSH et al., 2014.

Nota: Modelo BD avalia duas características, brotamento no fronte de invasão (tumor budding) e profundidade de invasão (depth of invasion).

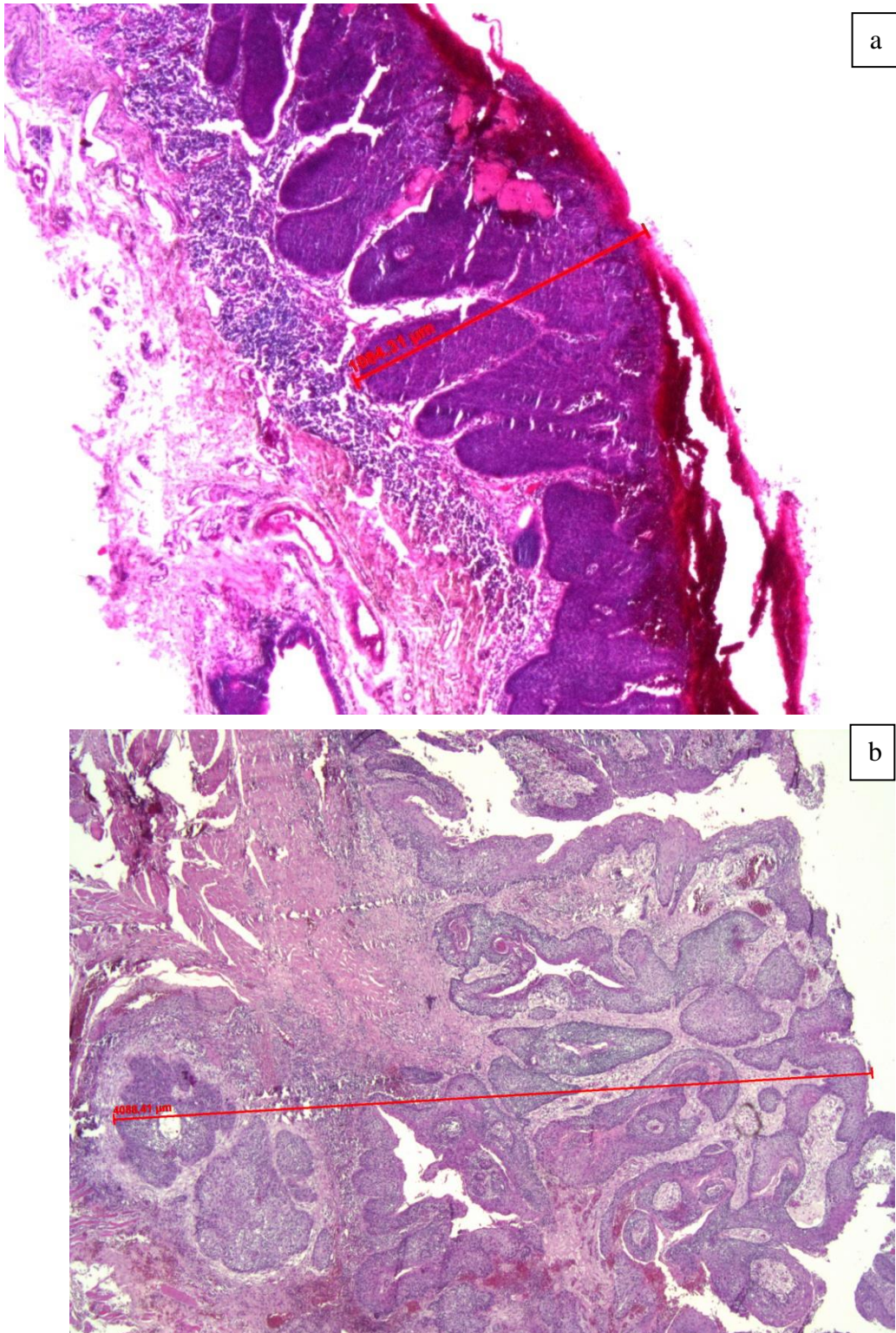
Figura 1- Fronte tumoral indicando brotamento de células neoplásicas (grupos contendo de um à cinco células).



Legenda: As setas vermelhas apontam:
 a) um brotamento no fronte de invasão,
 b) dois brotamentos no fronte de invasão,
 c) seis brotamentos de células neoplásicas;
 d) cinco brotamentos de células neoplásicas,
 Todos em objetiva de 40x.

Fonte: Da autora.

Figura 2 - Profundidade de invasão, mensurada da superfície até o ponto mais invasivo.



Legenda: Em vermelho a régua mostra valores para figura:
a) 1,08mm (< 4mm) de profundidade e
b) 4,08mm (\geq 4mm) profundidade de invasão.
Todas em objetiva de 2,5x.

Fonte: Da autora.

4.6 Avaliação do modelo HR

Para treinamento e calibração de 2 avaliadores CBD e JG (Josiane Gonçalves), a análise dos cortes foi realizada por microscopia de luz. A leitura das lâminas foi realizada de modo independente por 2 avaliadores CBD e JG, e em casos de discordância as lâminas foram reavaliadas por 3 avaliadores CBD, JG e LMRP.

A análise histopatológica para avaliar o modelo HR seguiu os critérios publicados por Brandwein-Gensler et al. (2005), que avalia três características histopatológicas: padrão de invasão, demonstrado nas figuras 3, resposta linfocitária na figuras 4 e presença de invasão perineural figura 5. A tabela 4 revela a classificação dessas três características histopatológicas de acordo com os escores 0 (baixo risco), 1 a 2 (risco intermediário) e 3 a 9 (alto risco). Para análise estatística realizou-se a união de baixo risco e risco intermediário (1) versus alto risco (2).

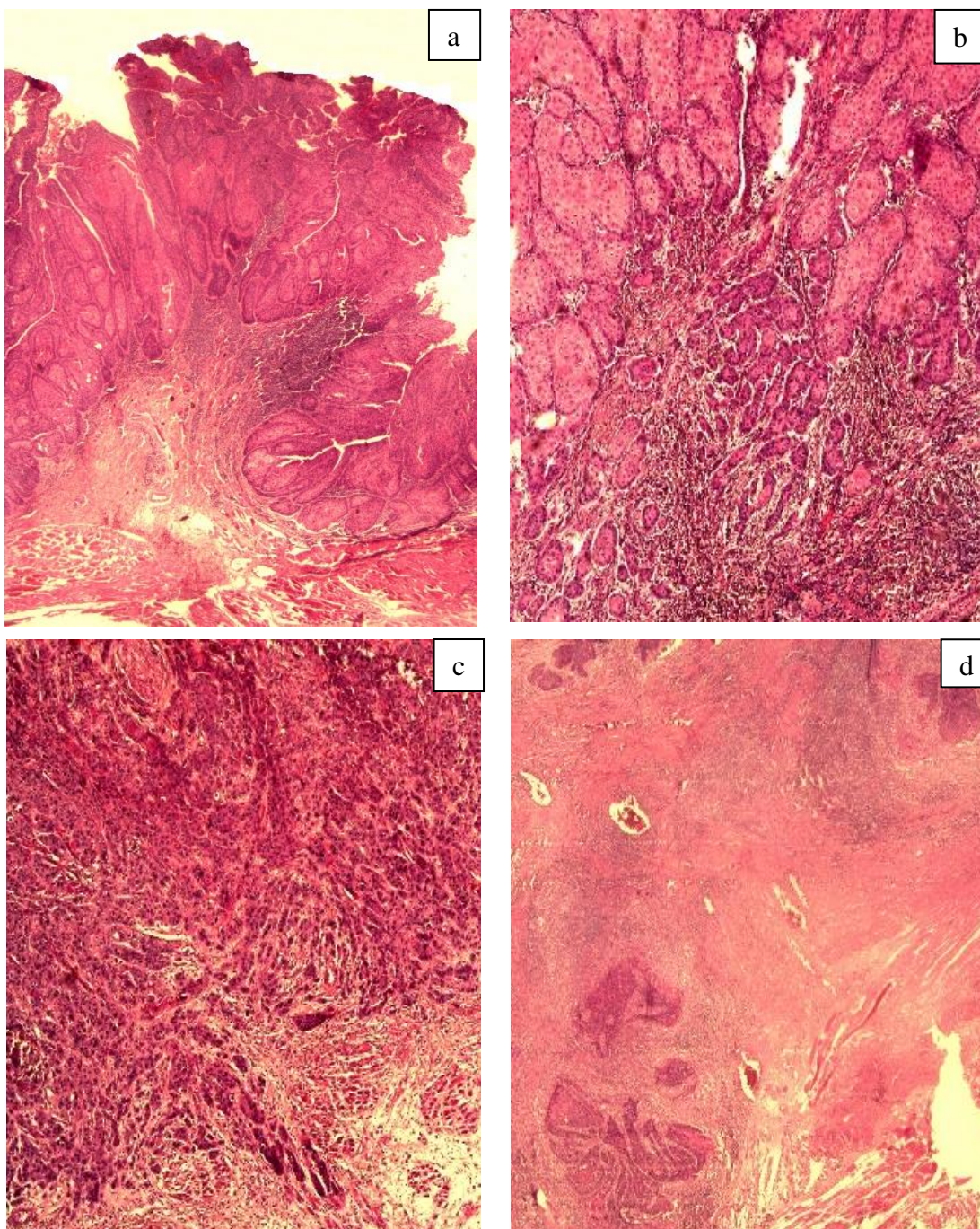
Tabela 4- Modelo HR proposto por Brandwein-Gensler et al.

| Modelo HR* | | |
|---|---|---|
| 1. Padrão de invasão: | 2. Resposta linfocitária: | 3. Presença de invasão perineural: |
| Tipo 0: | | Ausente (0). |
| Tipo I: Tumor compacto (0). | Infiltrado contínuo e denso no fronte do tumor (0). | Nervos menores que 1mm de diâmetro (1). |
| Tipo II: Grandes ilhas (0). | Infiltrado linfocitário descontínuo (1). | Nervos maiores que 1mm de diâmetro (3). |
| Tipo III: Ilhas tumorais invasivas com mais de 15 células (0). | Resposta linfocitária limitada ou ausente (3). | |
| Tipo IV: Ilhas tumorais invasivas com menos de 15 células (1). | | |
| Tipo V: Tumor satélite, células à 1mm no fronte da invasão (3). | | |
| Baixo risco (0) / Risco intermediário (1-2) / Alto risco (3-9) | | |

Fonte: BRANDWEIN-GENSLER et al., 2005.

Nota: Modelo HR (risco histológico).

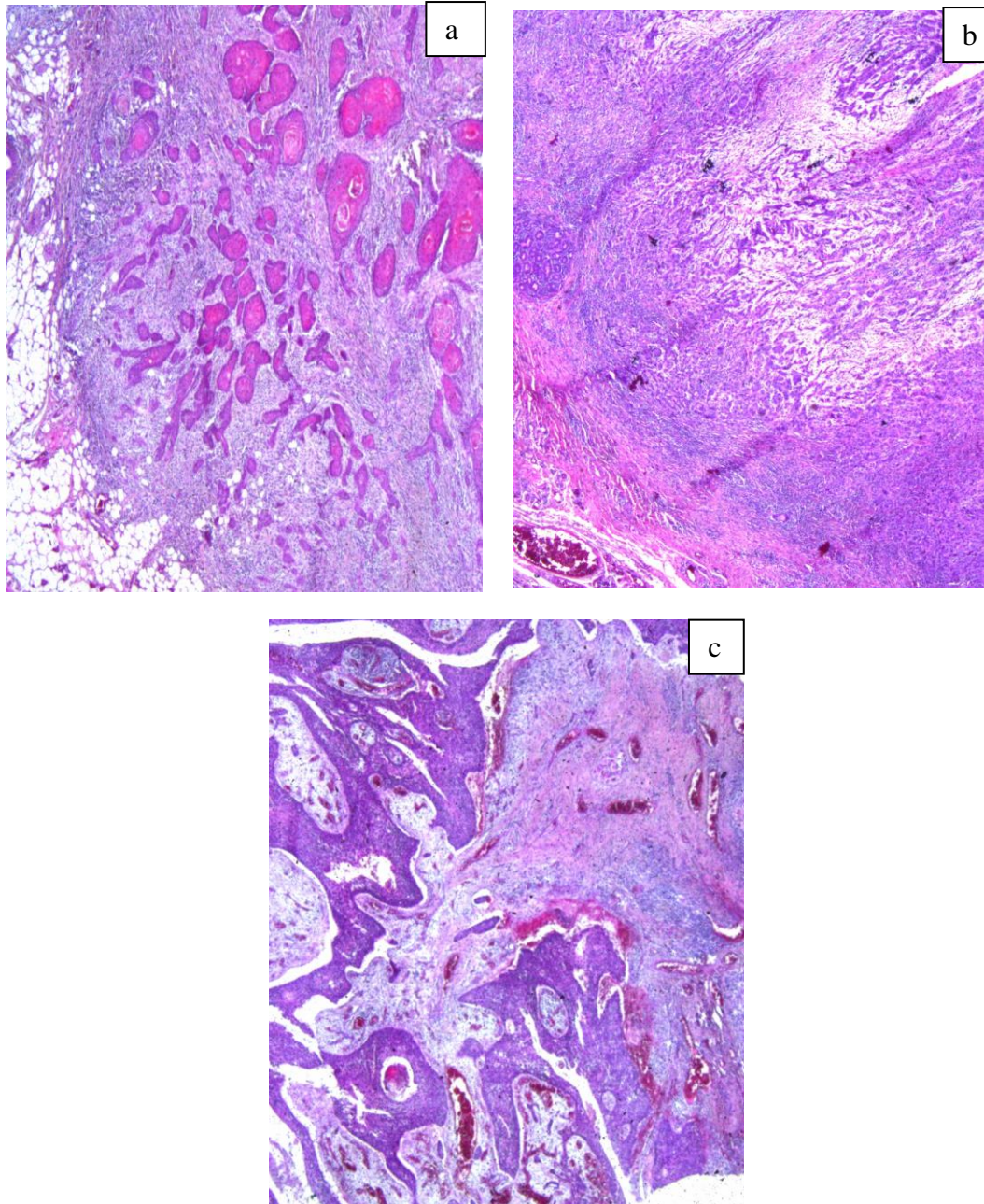
Figura 3- Modelo HR, critério de padrão de invasão.



Legenda: a) Tipo I e II revela tumor compacto e/ou com grandes ilhas;
b) Tipo III revela ilhas tumorais invasivas com mais de 15 células;
c) Tipo IV demonstrando ilhas tumorais invasivas com menos de 15 células e
d) Tipo V revelando tumor satélite, células localizadas 1mm do fronte de invasão. Todas em objetiva de 2,5x.

Fonte: Da autora.

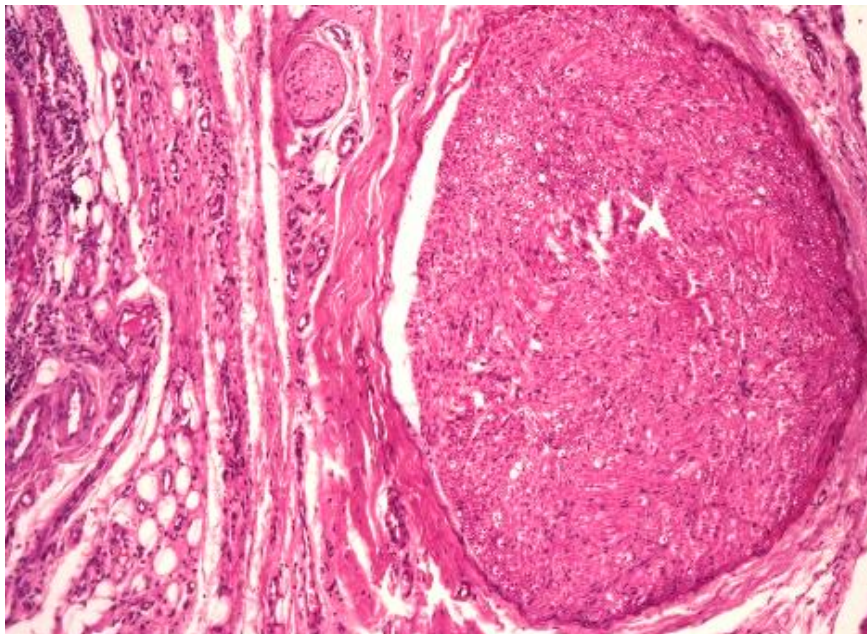
Figura 4- Modelo HR, critério de resposta linfocitária.



Legenda: a) Tipo I apresenta um infiltrado contínuo e denso no fronte do tumor;
b) Tipo II apresenta um infiltrado linfocitário descontínuo e
c) Tipo III apresenta uma resposta linfocitária escassa ou ausente.
Todas em objetiva de 2,5x.

Fonte: Da autora.

Figura 5- Modelo HR, critério presença ou ausência de invasão perineural.



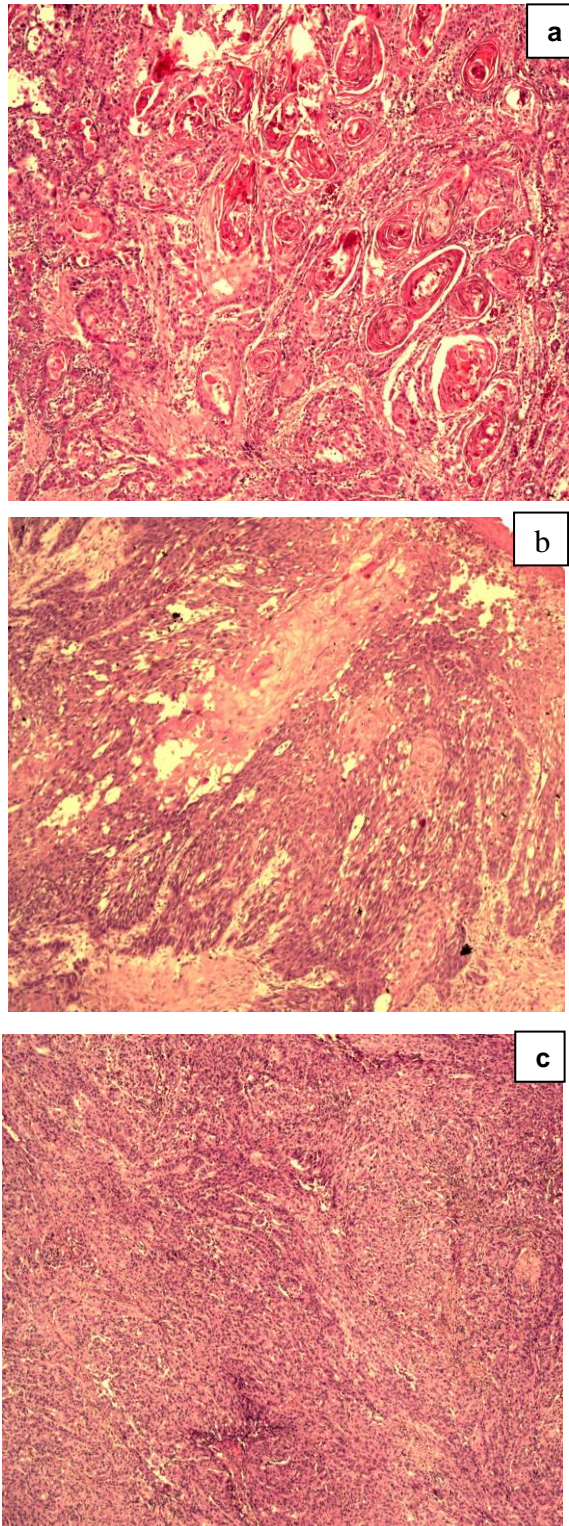
Legenda: Nervos maiores e menores que 1mm de diâmetro, em objetivas 10x.

Fonte: Da autora.

4.7 Avaliação da OMS

A análise histopatológica para avaliar a classificação internacional de tumores da OMS seguiu os critérios publicados por Barnes et al. (2005), que avalia os graus de queratinização do tumor (bem diferenciado, moderadamente diferenciado, pobremente diferenciado nas figuras 6 e indiferenciado), os níveis de pleomorfismo celular e nuclear e a presença de atividade mitótica. Essa avaliação foi coletada dos laudos histopatológicos dos pacientes de Varginha – Brasil (ANEXO A). Os pacientes que não apresentavam a avaliação da OMS no laudo, foi realizada por CBD e os já presentes, foram realizadas as confirmações de leitura (releitura), com o intuito de estabelecer o mesmo padrão de visualização. Para análise estatística realizamos a união de bem diferenciado e moderadamente diferenciado (1) versus pobremente diferenciado (2).

Figura 6- Modelo da OMS.



Legenda: Classificado como:
a) Bem diferenciado,
b) Moderadamente diferenciado e
c) Pobremente diferenciado.
Todas em objetivas de 5x.

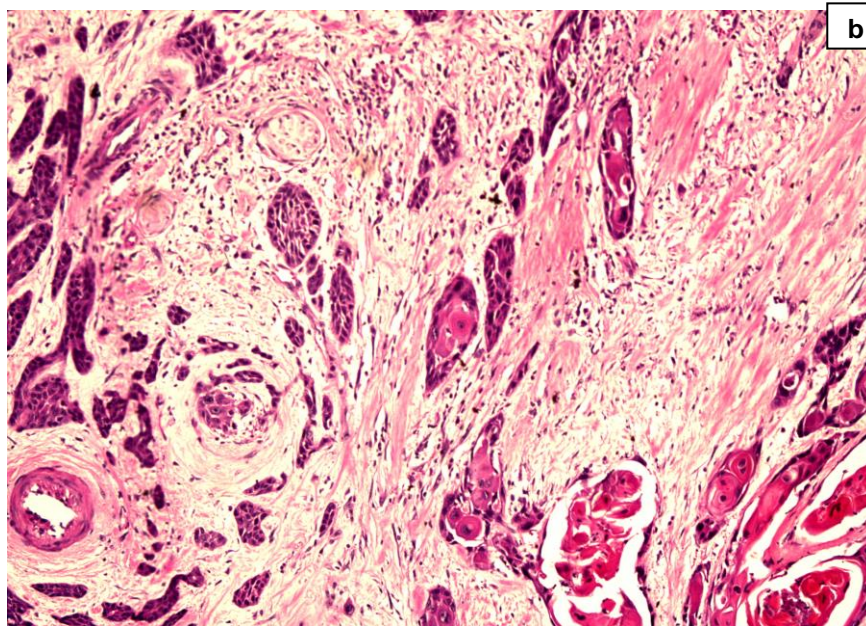
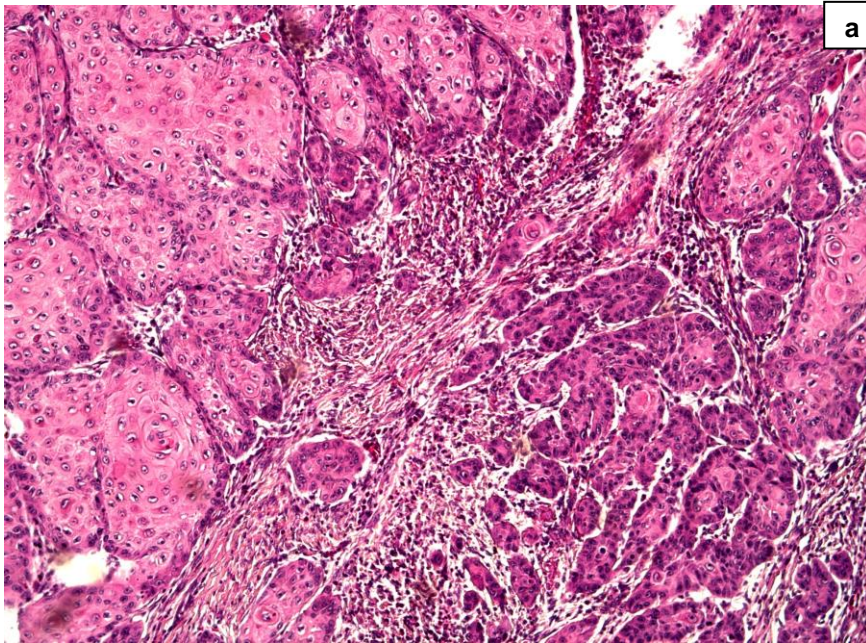
Fonte: Da autora.

4.8 Avaliação do TSR e associação de TSR e MBD

A análise dos cortes foi realizada por microscopia de luz para treinamento e calibração de 2 avaliadores CBD e JG. A leitura das lâminas foi realizada de modo independente por 2 avaliadores CBD e JG, e em casos de discordância as lâminas foram reavaliadas por 3 avaliadores CBD, JG e LMRP. A análise histopatológica para avaliar o TSR, seguiu os critérios publicados por Almangush et al. (2018), que avaliaram 2 critérios: estroma pobre (<50%) ou estroma rico (\geq 50%), demonstrado na figura 7.

A associação das leituras do método de avaliação do TSR com o modelo BD, seguiu os critérios proposto por Almangush et al. (2018), onde escore 0 (baixo risco) são os três parâmetros (brotamento do tumor, profundidade de invasão e TSR) apresentando abaixo dos pontos de corte, ou seja, <5 brotamentos, <4 mm de profundidade e <50 % estroma; escore 1 (risco intermediário) apenas um dos parâmetros excedendo o ponto de corte; escore 2 (alto risco) dois dos marcadores excederam o ponto de corte; escore 3 (extremamente alto risco) todos os parâmetros excedendo o ponto de corte. Dessa maneira, os casos com escore 0 foram considerados de baixo risco (1); escore 1 ou 2 foram considerados de risco intermediário (2) e escore 3 de alto risco (3). Para análise estatística realizamos a união de baixo risco e risco intermediário (1) versus alto risco (2).

Figura 7- Critérios de avaliação do sistema TSR.



Legenda: a) Estroma pobre (<50%);
b) Estroma rico (≥50%) no fronte tumoral.
Todas em objetiva de 5x.

Fonte: Da autora.

4.9 Reação imuno-histoquímica

Para a reação de imuno-histoquímica foram realizados cortes com 3 µm de espessura da pré-seleção dos blocos referentes as lâminas que melhor representaram o fronte de invasão. Os cortes foram aderidos às lâminas silanizadas e em seguida para melhor fixação dos fragmentos, as mesmas permaneceram em estufa à 60°C *overnight*. Os cortes histológicos foram diafanizados em três sequências de Histological Clearing Agent / Histo-Clear (National diagnostic), por 5 minutos cada em temperatura ambiente, hidratados em concentrações decrescentes de álcool (100%, 90% e 70%) e posteriormente lavados em água destilada por 5 minutos.

Os anticorpos referentes a tabela 5, após o período de padronização foi estabelecido o procedimento operacional padrão (POP). O procedimento inicial de recuperação antigênica foi realizado através da imersão das lâminas em solução *target retrieval solution* diluição 1:50 com água destilada (Dako) em vaporeira à 95°C por 20 minutos. Após 20 minutos em temperatura ambiente para esfriamento, os cortes foram lavados em *wash buffer* (Dako) e a atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com *bperoxidase-blocking reagent* (Dako) por 5 minutos seguindo por *wash buffer*. Em seguida, os cortes foram incubados *overnight* à 4-8°C em câmara úmida com o anticorpo primário descritos na tabela 5, diluído com solução tamponada de fosfato salino (PBS).

Tabela 5- Anticorpos, diluições utilizadas e marcas.

| Anticorpos | Diluições | Marca |
|--------------------------------------|------------------|-----------------------------------|
| Anti-Fascina <i>Mouse</i> Monoclonal | 1: 1000 | Abcam Inc, USA |
| Anti-Plectina <i>Goat</i> Policlonal | 1: 100 | Santa Cruz Biotechnology Inc, USA |
| Anti-STC2 <i>Rabbit</i> Policlonal | 1: 100 | Invitrogen Inc, USA |
| Anti-EEF1D <i>Rabbit</i> Policlonal | 1: 2500 | Sigma–Aldrich Inc, USA |
| Anti-PINP <i>Rabbit</i> Policlonal | 1: 5000 | Caseiro |

Fonte: Da autora.

No dia seguinte, as lâminas foram lavadas com *wash buffer* por 5 min e nos cortes foram adicionados o *linker* (Dako) por 15 minutos, seguindo por *wash buffer* e incubados com a enzima HRP (Dako) por 30 minutos, após foram lavadas duas vezes com *wash buffer*, seguindo por revelação com *substrate working solution*, diluição 20:1000 de *substrate buffer* e *DAB + Chromogen* (Dako). Ao final, as

lâminas foram lavadas com *wash buffer* em seguida por água destilada por 5 minutos, contra-coradas com hematoxilina de *Harris* por 20 segundos, lavadas em água corrente por 5 minutos, lavadas em água destilada e montadas com *Fluoromount-GTM* (Electron Microscopy Sciences).

O protocolo utilizado para o anticorpo Plectina (*goat*, policlonal, diluição 1:100, da marca Santa Cruz Biotechnology Inc, USA), iniciou também com a recuperação antigênica onde as lâminas ficaram imersas no solução tamponada de citrato (10mM – pH 6.0) em vaporeira à 95°C por 15 minutos. Após 15 minutos em temperatura ambiente para esfriamento, os cortes foram lavados em PBS e a atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com *peroxidase-blocking reagent* (Dako) por 5 minutos seguindo por lavagem PBS de 10 minutos. A seguir foi adicionado sobre cada corte BSA (*bovine serum albumins* – SIGMA-ALDRICH) à 37°C por 10 minutos e os cortes foram incubados em câmara úmida por 16 horas à 4°C com o anticorpo primário Plectina, diluído com PBS. No dia seguinte, foram lavadas com PBS e nos cortes foram adicionados Donkey Anti-goat (Biotin - Abcam – ab6884) por 30 minutos à 37°C, seguindo por duas lavagens com PBS de 10 minutos cada e incubados com Avidim peroxidase conjugate (Biotin - Abcam – ab59653) por 15 minutos à 37°C, após foi realizado duas trocas de PBS. Para a revelação utilizamos o *substrate working solution*, diluição 20:1000 (Dako). Ao final, as lâminas foram lavadas com PBS por 5 minutos e em seguida por água destilada, contra-coradas com hematoxilina por 20 segundos, lavadas em água corrente por 5 minutos, lavadas em água destilada e montadas com *Fluoromount-GTM*. Vale ressaltar que os experimentos de imuno-histoquímica foram realizados na Universidade de Valparaíso (Chile), no laboratório do professor WAGA.

4.10 Análise histopatológica imuno-histoquímica

A realização da leitura e calibração das lâminas de imuno-histoquímica foi realizada pelos avaliadores CBD e WAGA com auxílio de microscopia de luz sob o microscópio óptico Leica DM500, e a captura de imagens (objetiva 20x) utilizando-se o programa Leica LAS EZ (três campos). As pontuações foram atribuídas de acordo com a porcentagem de células tumorais positivas e a intensidade da coloração. Para: Fascina (Figuras 8), EEF1D (Figuras 9), STC2 (Figuras 10), Plectina (Figura 11) e PINP (Figura 12) foram avaliadas as porcentagens de células tumorais

positivas, os escores foram os seguintes: 0- negativo; 1- <25%; 2- 26%-50%; e 3- > 51%. Para intensidade, os escores foram os seguintes: 0- negativo; 1- fraco; 2- moderado e 3- forte. As pontuações finais foram calculadas de acordo com a soma da porcentagem de células positivas e a intensidade da coloração e para análise estatística, as amostras foram categorizadas em dois grupos. A baixa expressão (1) foi definida como um escore final <4 pontos e alta expressão (2) foi definida como um escore final ≥ 4 , como descrito por Dourado et al. (2018), demonstrado na tabela 6. O escore para PINP no estroma foi avaliado da seguinte forma: as células estromais marcadas foram classificadas como negativo se 0% das células estromais fossem marcadas com PINP, escassos se 1% a 50% fossem PINP positivos e abundantes se > 50% das células estromais fossem PINP positivos (Figuras 12), como descrito por Bagordakis et al. (2016), descrito na tabela 7.

Tabela 6- Marcação imuno-histoquímica descrita por Dourado et al.

| Marcação imuno-histoquímica | |
|---|--------------------------------|
| Porcentagem de células marcadas | Intensidade da marcação |
| Negativo (0) | Negativo (0) |
| <25% (1) | Fraco (1) |
| 26% - 50% (2) | Moderado (2) |
| >51% (3) | Forte (3) |
| Baixa expressão 1-3 (<4) / Alta expressão 4-6 (≥ 4) | |

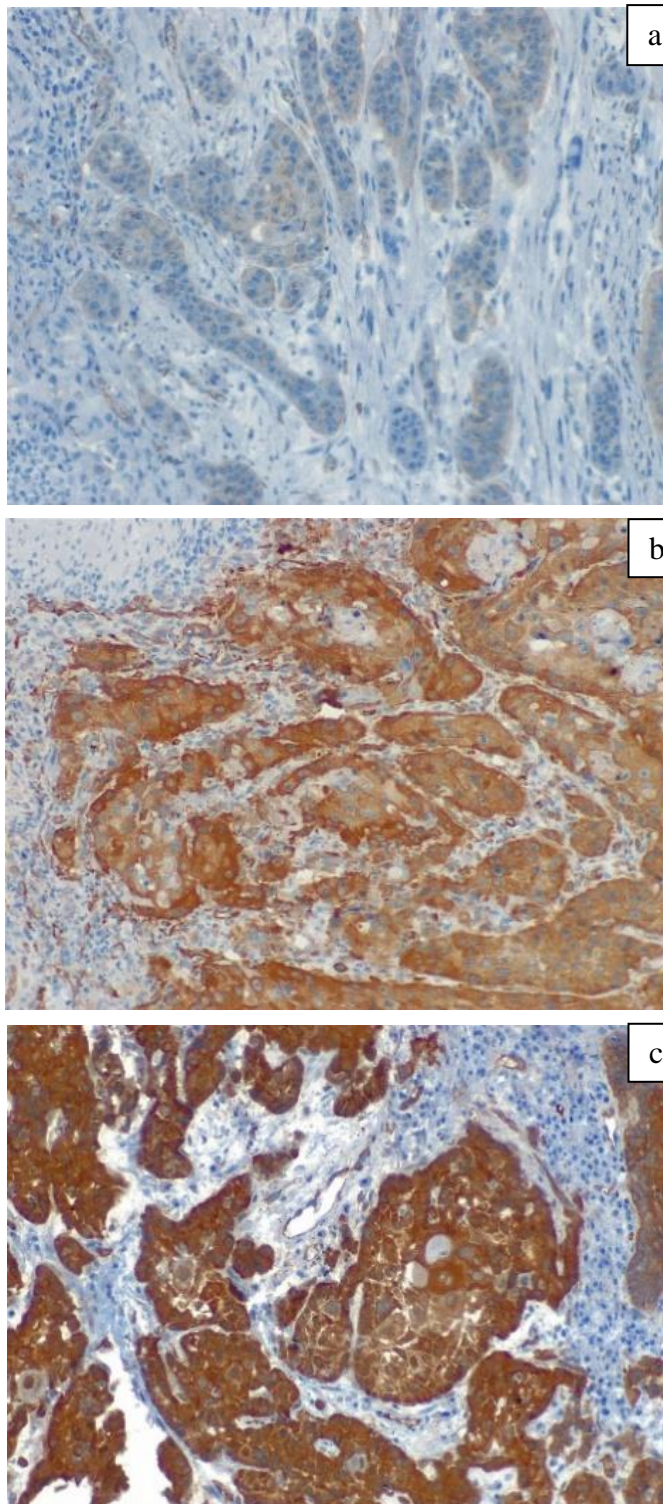
Fonte: DOURADO et al., 2018.

Tabela 7- Marcação imuno-histoquímica descrita por Bagordakis et al.

| Marcação imuno-histoquímica |
|------------------------------------|
| Negativo (0%) |
| Escasso (1% a 50%) |
| Abundante (> 50%) |

Fonte: BAGORDAKIS et al., 2016.

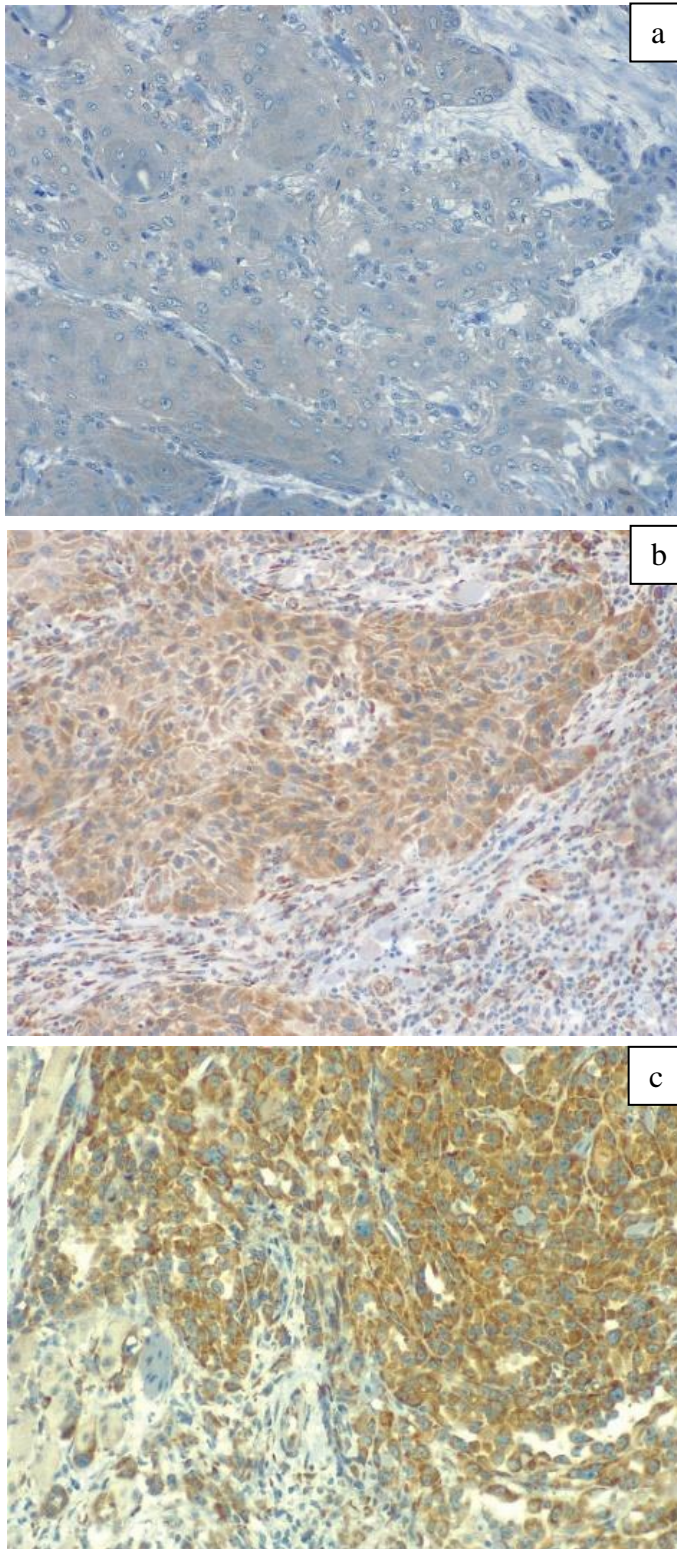
Figura 8- Imunoexpressão de Fascina.



Legenda: Intensidade de marcação:
a) Baixo;
b) Moderado
c) Forte.
Todas em objetiva de 20x.

Fonte: Da autora.

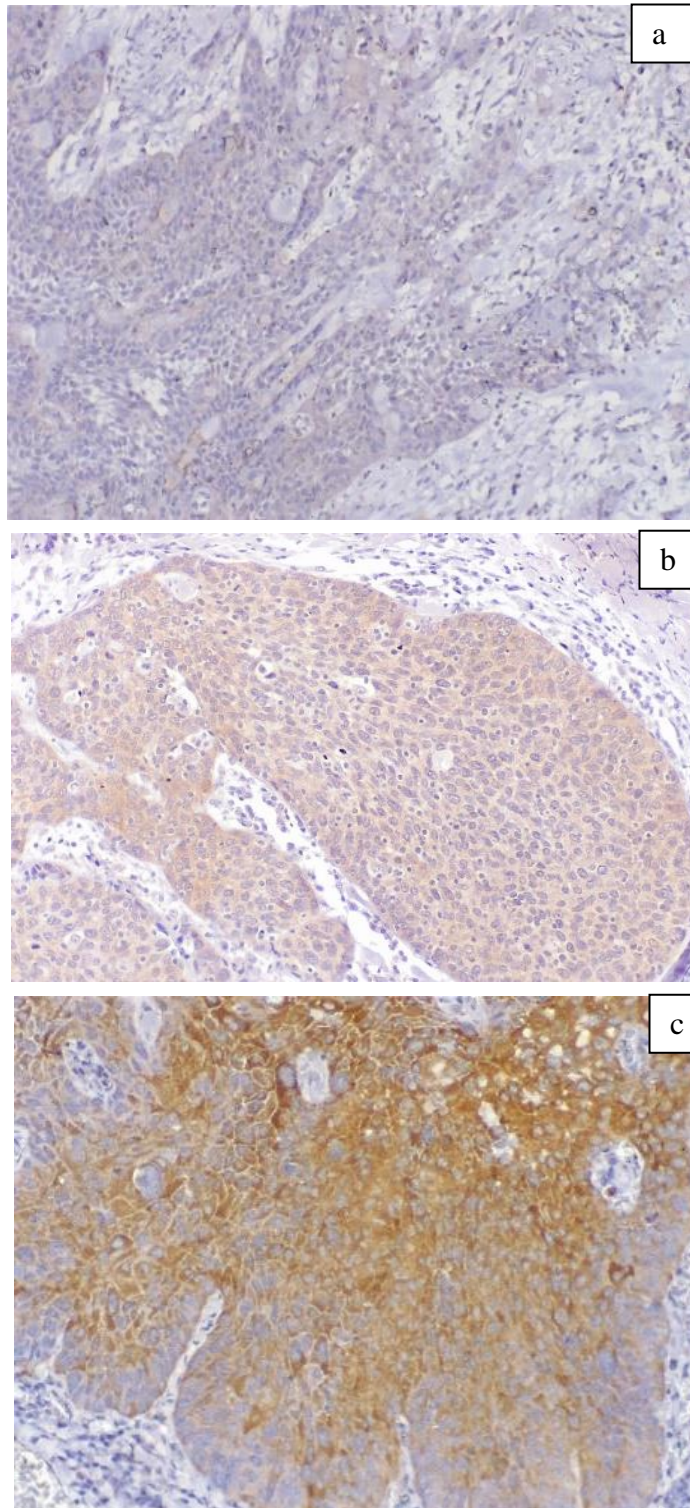
Figura 9- Imunoexpressão de EEF1D



Legenda: Intensidade de marcação:
a) Baixo;
b) Moderado
c) Forte.
Todas em objetiva de 20x.

Fonte: Da autora.

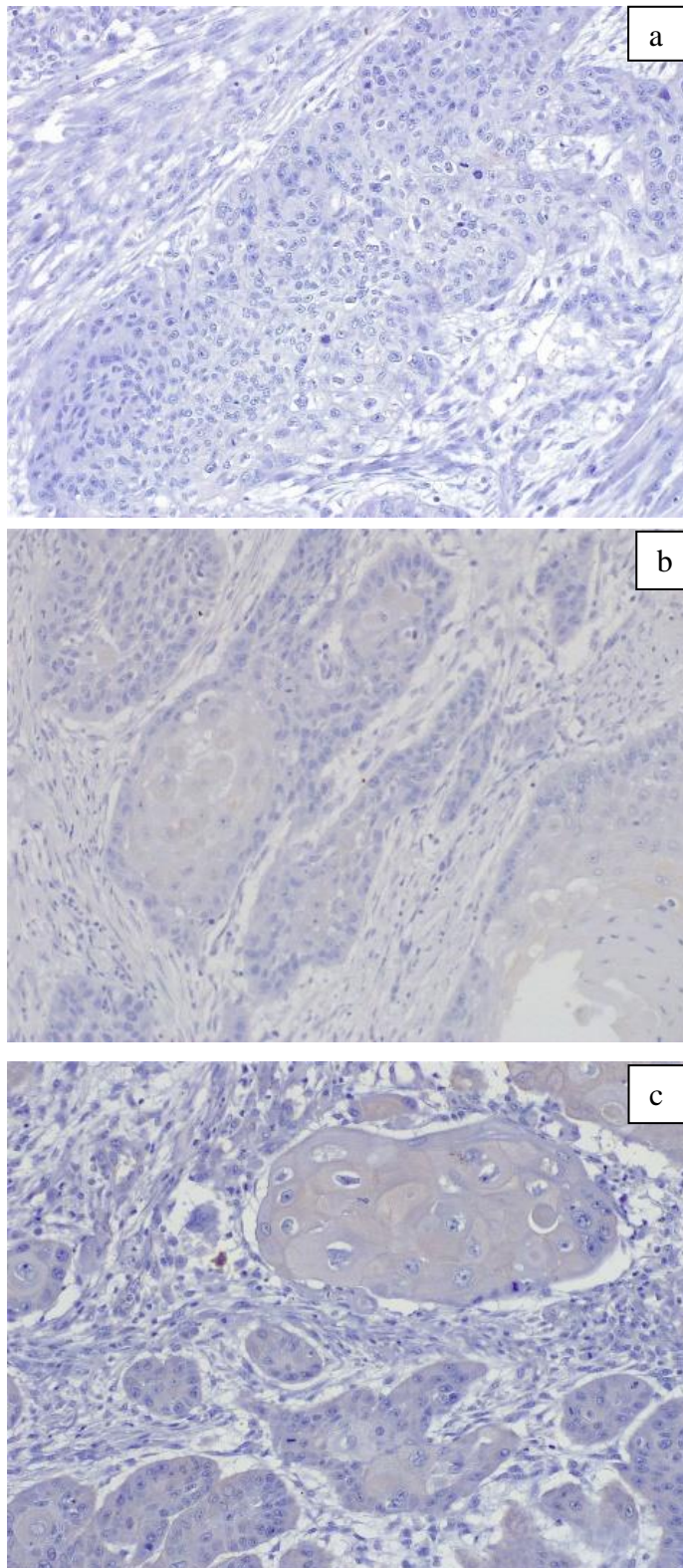
Figura 10- Imunoexpressão de STC2.



Legenda: Intensidade de marcação:
a) Baixo;
b) Moderado
c) Forte.
Todas em objetiva de 20x.

Fonte: Da autora.

Figura 11- Imunoexpressão de Plectina



Legenda: Intensidade de marcação:

a) Negativo

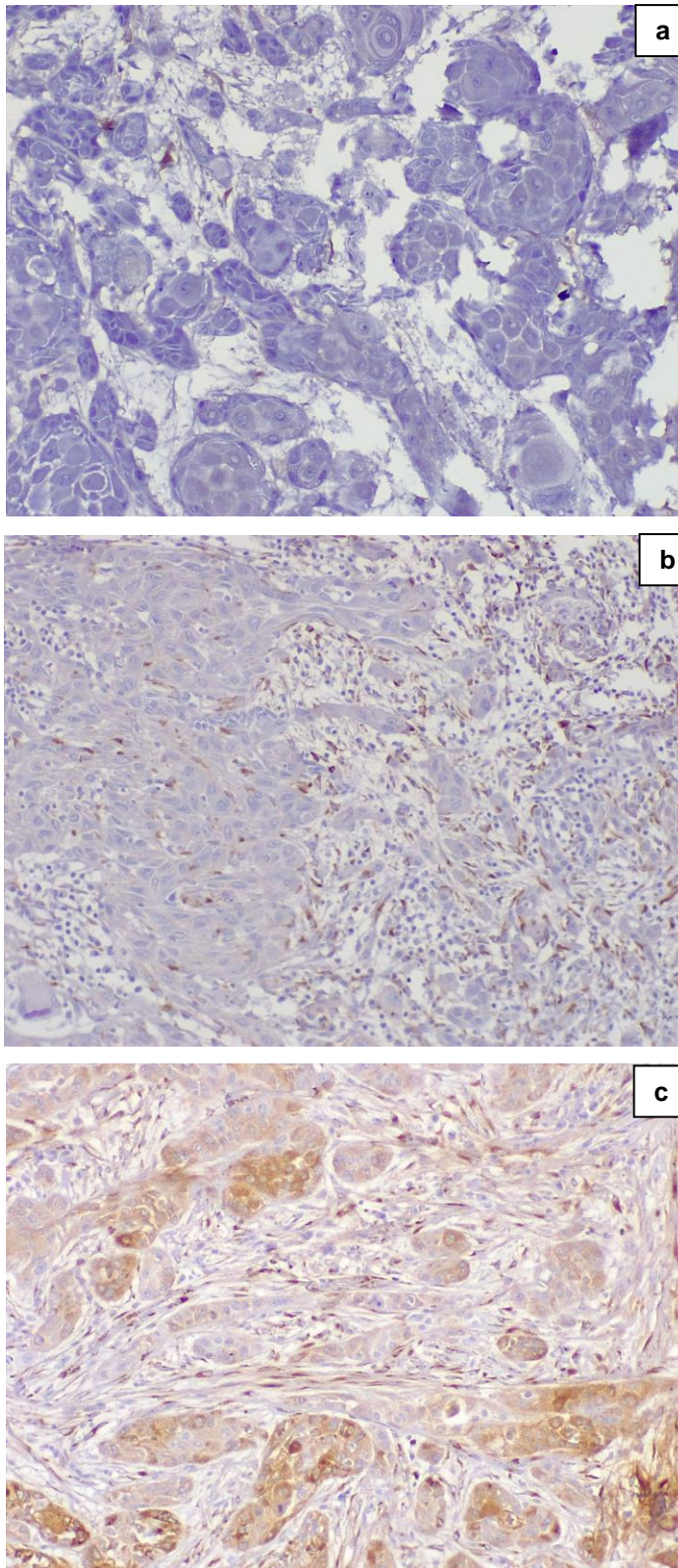
b) Baixo

c) Moderado

Todas em objetiva de 20x.

Fonte: Da autora.

Figura 12- Imunoexpressão de PINP.



Legenda: Intensidade de marcação / Marcação de células estromais:
a) Negativo / Negativo
b) Baixa / 1-50%
c) Moderada / >50% células do estroma
Todas em objetiva de 20x

Fonte: Da autora.

4.11 Análise estatística

As informações clínicas adquiridas dos prontuários dos pacientes foram inicialmente, transferidas para a ficha padronizada (ANEXO A) e, em seguida, tanto os dados clínicos quanto as análises microscópicas foram armazenadas em planilhas no *Microsoft Excel* (2013) formando um banco de dados. A análise estatística foi realizada por meio do *software* de estatística *MedCalc* (versão 17.8.1). O valor de significância atribuído $p=0,05$. Realizou-se análises estatística qui-quadrado, tanto para os sistemas de gradação histopatológica como para os marcadores. As curvas de sobrevida foram construídas com base no método de Kaplan-Meier e comparadas com o teste Log-rank. Para a análise multivariada, foi utilizado o modelo de riscos proporcionais de Cox (método *stepwise*), incluindo os parâmetros clínicos patológicos, sistemas de gradação histopatológica e marcadores imuno-histoquímicos.

5 RESULTADOS

Dos 121 pacientes com CEC oral do Hospital Bom Pastor de Varginha – Brasil que contemplavam os critérios de inclusão e dos 44 pacientes da Universidade Valparaíso – Chile, selecionamos apenas as topografias de língua e assoalho bucal. Dessa maneira obteve-se 98 pacientes (79%) de Varginha – Brasil e 26 de Valparaíso – Chile (21%), totalizando um grupo de 124 pacientes com CEC de língua e assoalho bucal.

Desses 124 pacientes avaliados, a idade mediana foi de 62 anos. De acordo com os aspectos epidemiológicos 66,1% dos pacientes eram do gênero masculino (n=82). Tabagista (n=83; 66,9%) e etilista (n=61; 49,2%). Os pacientes que fumavam e bebiam conjuntamente eram 48,4% (n=60) e a localização estudada foi a língua (n=91; 73,4%), seguida de assoalho bucal (n=33; 26,6%) (Tabela 8).

Em relação ao sistema TNM, a maior prevalência (n=76; 61,3%) foi de tumores T1 e T2. Desses 76 pacientes, 55 (44,4%) foram T2. Quanto aos tumores T3 e T4 (n=44; 35,5%), 23 pacientes foram T4 (18,5%). Em relação à variante N, a maior prevalência foi de N0 com 68 pacientes (54,8%), seguido por 24 pacientes (19,3%) com N1, 22 pacientes (17,7%) com N2, três pacientes (2,4%) com NX e três pacientes (2,4%) com N3. Em relação à variante M, foi observada uma maior prevalência (67 pacientes; 54,0%) de M0, seguida de MX (n=51; 41,1%).

Ao analisar o estadiamento clínico, a associação dos estadiamento III e IV se mostrou mais prevalente (n=72; 58,0%) em relação a associação dos estadiamentos de níveis I e II (n=48; 38,7%). De acordo com a associação do estadiamento III e IV, o estadiamento clínico que mostrou mais frequente entre esta associação foi de nível IV com 34,7% (n=43). E estadiamento clínico em análise univariada mostrou uma tendência (p=0,07) para sobrevida específica de doença (Tabela 8).

A maioria das peças cirúrgicas avaliadas apresentaram margens livres (n=61, 49,2%), presença de invasão vascular (n=60, 48,4%) e invasão perineural (n=66, 53,2%) (Tabela 8). Quanto ao tratamento estabelecido para os pacientes, 24 (19,3%) realizaram apenas cirurgia, 43 (34,7%) associaram cirurgia e radioterapia e 52 (41,9%) se submeteram à cirurgia, radioterapia e à quimioterapia (Tabela 8).

Tabela 8 - Características clínico-patológicas e análise univariada para sobrevida específica e livre de doença de pacientes com carcinoma espinocelular de língua e assoalho bucal.

| Parâmetros | Número de pacientes (%) | Sobrevida específica de doença | | Sobrevida livre de doença | |
|-----------------------------------|-------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------|--------------------------------|
| | | % em 5 anos | HR (95% CI) / p valor | % em 5 anos | HR (95% CI) / p valor |
| Local de amostras | | | | | |
| Varginha- Brasil | 98 (79,0) | 63,5 | Referência | 72,2 | Referência |
| Valparaíso- Chile | 26 (21,0) | 63,3 | 1,57 (0,70-3,53) / 0,19 | 73,1 | 0,81 (0,33-1,95) / 0,64 |
| Idade | | | | | |
| ≤62 anos | 63 (50,8) | 51,4 | Referência | 66,5 | Referência |
| >62 anos | 61 (49,2) | 75,1 | 0,88 (0,43-1,82) / 0,73 | 77,0 | 0,99 (0,43-2,27) / 0,99 |
| Gênero | | | | | |
| Masculino | 82 (66,1) | 64,4 | Referência | 75,6 | Referência |
| Feminino | 42 (33,9) | 67,0 | 1,11 (0,52-2,37) / 0,77 | 67,6 | 0,81 (0,35-1,91) / 0,64 |
| Hábito de fumar | | | | | |
| Não | 17 (13,7) | 52,3 | Referência | 57,3 | Referência |
| Sim | 83 (66,9) | 68,4 | 0,74 (0,27-2,00) / 0,50 | 77,5 | 0,67 (0,22-2,09) / 0,43 |
| Hábito de beber | | | | | |
| Não | 32 (25,8) | 64,9 | Referência | 58,8 | Referência |
| Sim | 61 (49,2) | 63,2 | 1,36 (0,60-3,03) / 0,45 | 79,9 | 0,78 (0,31-1,92) / 0,57 |
| Localização | | | | | |
| Língua | 91 (73,4) | 64,9 | Referência | 75,7 | Referência |
| Assoalho bucal | 33 (26,6) | 72,2 | 0,70 (0,31-1,58) / 0,42 | 70,6 | 1,03 (0,40- 2,62) / 0,94 |
| Estadiamento Clínico | | | | | |
| I / II | 48 (38,7) | 79,2 | Referência | 67,5 | Referência |
| III / IV | 72 (58,0) | 58,3 | 2,07 (0,99-4,31) / 0,07 | 78,3 | 0,66 (0,29-1,46) / 0,29 |
| Sequência de tratamento | | | | | |
| Cirurgia | 24 (19,3) | 82,8 | Referência | 71,2 | Referência |
| Cirurgia / RT | 43 (34,7) | 67,0 | 1,14 (0,42-3,13) | 85,1 | 0,75 (0,25-2,29) |
| Cirurgia / RT / QT | 52 (41,9) | 58,3 | 1,32 (0,50-3,46) / 0,84 | 66,8 | 1,67 (0,56-5,00) / 0,19 |
| Margens cirúrgicas | | | | | |
| Livres | 61 (49,2) | 78,6 | Referência | 76,4 | Referência |
| Comprometidas | 42 (33,9) | 50,1 | 2,13 (0,87-5,20) / 0,05 | 57,1 | 1,58 (0,61-4,05) / 0,27 |
| Comprometimento linfonodal | | | | | |
| Não | 65 (52,4) | 79,0 | Referência | 78,0 | Referência |
| Sim | 56 (45,2) | 51,6 | 1,94 (0,93-4,06) / 0,07 | 67,7 | 1,54 (0,68-3,51) / 0,26 |
| Invasão vascular | | | | | |
| Não | 13 (10,5) | 32,1 | Referência | 50,0 | Referência |
| Sim | 60 (48,4) | 61,6 | 0,57 (0,15-2,18) / 0,32 | 71,5 | 1,82 (0,36-9,08) / 0,54 |
| Invasão perineural | | | | | |
| Não | 58 (46,8) | 74,4 | Referência | 68,5 | Referência |
| Sim | 66 (53,2) | 58,6 | 1,31 (0,63-2,68) / 0,46 | 76,9 | 0,92 (0,41-2,06) / 0,83 |
| Resposta linfocitária | | | | | |
| Tipo I / II | 94 (75,8) | 70,3 | Referência | 79,4 | Referência |
| Tipo III | 30 (24,2) | 50,1 | 2,01 (0,82-4,95) / 0,06 | 54,4 | 2,44 (0,94-6,36) / 0,02 |
| Padrão de invasão | | | | | |
| Tipo I / II / III / IV | 111 (89,5) | 66,1 | Referência | 72,2 | Referência |
| Tipo V | 13 (10,5) | 62,5 | 0,95 (0,29-3,07) / 0,93 | 78,6 | 0,92 (0,22-3,74) / 0,91 |

Fonte: Da autora.

Nota: (RT) radioterapia, (QT) quimioterapia, (HR) *hazard ratio* e (CI) *confidence interval*.

Após 5 anos, 60,5% dos pacientes (n=75) estavam vivos, sendo que 26,6% não apresentavam evidência da doença (n=33) e 33,8% com a doença (n=42), 14 foram perdidos de vista (11,3%). Quanto aos óbitos, 31 pacientes (25,0%) morreram depois de, em média, 26,6 meses. Trinta pacientes (24,2%) morreram devido ao tumor e um (0,8%) morreu por outras causas. Dos 124 pacientes, 80 (64,5%) realizaram esvaziamento linfonodal, mas apenas 56 (45,2%) deles apresentando

comprometimento dos linfonodos e em análise univariada observa-se uma tendência ($p=0,07$) para sobrevida específica de doença (Tabela 8). Desses 56 pacientes com comprometimento linfonodal, 47 (37,9%) revelaram alta imunoexpressão de Fascina, 37 (29,8%) de EEF1D e 33 (26,6%) de STC2. Os pacientes que demonstraram baixa imunoexpressão foram 51 (41,1%) para Plectina, 41 (33,1%) para PINP tumor e 46 (37,1%) para PINP no estroma. Considerando a variável profundidade de invasão, a maioria das amostras ($n=97$; 78,2%) foi acima de 4mm, e ao analisar números de brotamentos, verificou-se que 63 delas (50,8%) apresentaram menos de 5 brotamentos no fronte de invasão. O escore mais prevalente foi o de baixo risco e risco intermediário ($n=73$; 58,9%), seguido do alto risco, ($n=51$; 41,1%) (Tabela 9). Ao correlacionar estadiamento clínico com os escore do modelo BD, observamos que dos 48 pacientes (38,7%) com estadiamento iniciais (I e II), 16,1% apresentaram ($n=20$) um escore alto do modelo BD.

A avaliação dos resultados com base na classificação internacional de tumores da OMS, revelou que a maioria das peças cirúrgicas foram classificadas como bem diferenciadas e moderadamente diferenciadas ($n=116$; 93,5%), dessa associação a maioria moderadamente diferenciados (66,9%; $n=83$), apenas 6,5% foram classificados como pobremente diferenciados ($n=8$) (Tabela 9).

A leitura das lâminas revelou que a maioria dos pacientes apresentaram com <50% de estroma ($n=83$; 66,9%), seguido de 33,1% dos pacientes com $\geq 50\%$ de estroma ($n=41$). A associação do TSR e MBD revelou que a maioria dos pacientes 78,2% apresentaram escores ($n=97$) de baixo risco e risco intermediário, seguido de alto risco ($n=27$; 21,8%). Da associação dos escores de baixo risco e risco intermediários observou-se que o risco intermediário foi o mais prevalente com 72,6% ($n=90$) (Tabela 9).

Considerando as variáveis do modelo HR observou-se que 89,5% ($n=111$) apresentam o padrão de invasão (tipo I / II / III / IV), 75,8% dos pacientes ($n=94$) apresentaram resposta linfocitária (tipo I /II) e 53,2% ($n=66$) apresentaram presença de invasão perineural, revelando que a maioria dos pacientes ($n=103$; 83,1%) apresentou o escore de baixo risco e risco intermediário, sendo o mais prevalente o baixo risco (65,3%; $n=81$), 16,9% dos pacientes com alto risco ($n=21$) (Tabela 8 e 9).

Tabela 9 – Parâmetros clínicos-patológicos, sistemas de gradações histopatológicas e análise univariada para sobrevida específica e livre de doença de pacientes com carcinoma espinocelular de língua e assoalho bucal.

| Parâmetros | Número de pacientes (%) | Sobrevida específica de doença | | Sobrevida livre de doença | |
|--------------------------------|-------------------------|--------------------------------|----------------------------------|---------------------------|--------------------------------|
| | | % em 5 anos | HR (95% CI) / p valor | % em 5 anos | HR (95% CI) / p valor |
| Modelo HR | | | | | |
| Baixo / Intermediário | 103 (83,1) | 67,8 | Referência | 74,5 | Referência |
| Alto | 21 (16,9) | 53,5 | 2,16 (0,78-5,99) / 0,05 | 66,2 | 1,65 (0,51-5,31) / 0,29 |
| Profundidade de invasão | | | | | |
| < 4 mm | 27 (21,8) | 78,0 | Referência | 68,1 | Referência |
| ≥ 4 mm | 97 (78,2) | 62,6 | 1,39 (0,58-3,31) / 0,49 | 75,0 | 0,74 (0,27-2,02) / 0,51 |
| Brotamento tumoral | | | | | |
| < 5 | 63 (50,8) | 78,1 | Referência | 82,3 | Referência |
| ≥ 5 | 61 (49,2) | 51,7 | 2,10 (1,02-4,35) / 0,03 | 60,8 | 2,51 (1,09-5,79) / 0,01 |
| Modelo BD | | | | | |
| Baixo / Intermediário | 73 (58,9) | 73,5 | Referência | 78,1 | Referência |
| Alto | 51 (41,1) | 50,8 | 1,88 (0,88-3,99) / 0,05 | 63,5 | 1,82 (0,77-4,31) / 0,12 |
| Modelo da OMS | | | | | |
| Bem / Moderadamente | 116 (93,5) | 68,4 | Referência | 74,0 | Referência |
| Pobremente diferenciado | 8 (6,5) | 0,0 | 4,76 (0,60-37-26) / 0,001 | 50,0 | 2,58 (0,11-59,59) / 0,32 |
| TSR | | | | | |
| Estroma pobre | 83 (66,9) | 65,6 | Referência | 74,2 | Referência |
| Estroma rico | 41 (33,1) | 64,2 | 1,46 (0,68-3,10) / 0,29 | 73,9 | 1,10 (0,47-2,55) / 0,80 |
| TSR e MBD | | | | | |
| Baixo / Intermediário | 97 (78,2) | 68,2 | Referência | 77,6 | Referência |
| Alto | 27 (21,8) | 55,3 | 2,09 (0,80-5,41) / 0,05 | 56,4 | 2,70 (0,89-8,13) / 0,01 |

Fonte: Da autora.

Nota: (HR) *hazard ratio* e (CI) *confidence interval*.

Na análise dos marcadores imuno-histoquímicos, observou-se que os marcadores com alta expressão foram: Fascina (84,7%; n=105); EEF1D (62,9%; n=78) e STC2 (55,6%; n=69). No entanto, tanto Plectina (84,7%; n=105) quanto PINP no tumor (75%; n=93) mostraram baixa expressão. A segunda análise do marcador PINP foi realizada referente ao estroma, revelando que na maioria dos pacientes houve uma presença de >50% (83,1%; n=103) de marcação no estroma (Tabela 10).

Dos 124 pacientes analisados, o tempo médio de acompanhamento foi de 90 meses, variando de 1 a 136 meses, para a sobrevida específica de doença e de 91 meses, variando de 1 a 136 meses, para sobrevida livre de doença. Adicionalmente, pode-se observar que em 60 meses (5 anos) aproximadamente 68% dos pacientes estão vivos (Figura 13) e em 60 meses (5 anos) aproximadamente, 73% dos pacientes estavam livres de recorrência (Figura 14).

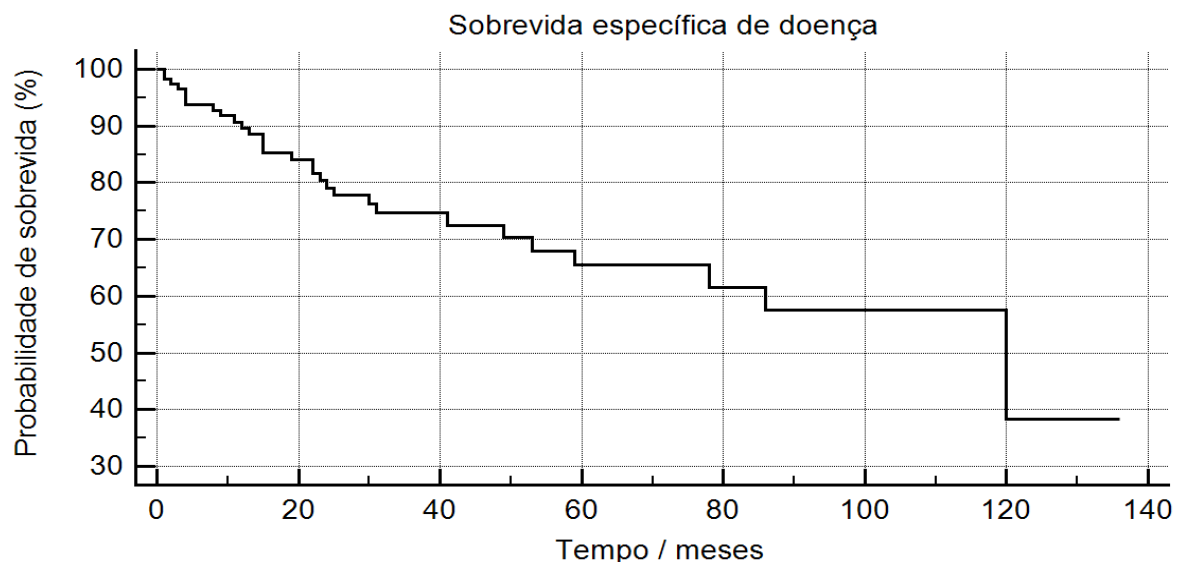
Tabela 10- Características dos marcadores imuno-histoquímicos e análise univariada para sobrevida específica e livre de doença de pacientes com carcinoma espinocelular de língua e assoalho bucal.

| Parâmetros | Número de pacientes (%) | Sobrevida específica de doença | | Sobrevida livre de doença | |
|-----------------------|-------------------------|--------------------------------|--------------------------------|---------------------------|---------------------------------|
| | | % em 5 anos | HR (95% CI) / p valor | % em 5 anos | HR (95% CI) / p valor |
| Fascina | | | | | |
| Baixa expressão | 15 (12,1) | 40,4 | Referência | 92,3 | Referência |
| Alta expressão | 105 (84,7) | 69,7 | 0,51 (0,18-1,47) / 0,11 | 70,8 | 0,93 (0,26-3,24) / 0,91 |
| EEF1D | | | | | |
| Baixa expressão | 41 (33,1) | 77,1 | Referência | 77,9 | Referência |
| Alta expressão | 78 (62,9) | 58,1 | 1,55 (0,73-3,29) / 0,28 | 72,0 | 0,87 (0,37-2,04) / 0,74 |
| STC2 | | | | | |
| Baixa expressão | 29 (23,4) | 89,5 | Referência | 100,0 | Referência |
| Alta expressão | 69 (55,6) | 47,6 | 3,09 (1,21-7,85) / 0,05 | 57,2 | 2,97 (1,17-7,52) / 0,02 |
| Plectina | | | | | |
| Baixa expressão | 105 (84,7) | 64,4 | Referência | 76,1 | Referência |
| Alta expressão | 15 (12,1) | 74,5 | 0,84 (0,27-2,60) / 0,78 | 57,1 | 0,68 (0,19-2,39) / 0,60 |
| PINP (tumor) | | | | | |
| Baixa expressão | 93 (75,0) | 65,3 | Referência | 79,8 | Referência |
| Alta expressão | 24 (19,4) | 58,3 | 1,04 (0,44-2,48) / 0,91 | 61,5 | 1,73 (0,68-4,36) / 0,18 |
| PINP (estroma) | | | | | |
| > 50% | 103 (83,1) | 64,4 | Referência | 76,4 | Referência |
| 1 a 50% | 8 (6,5) | 68,6 | 1,28 (0,25-6,38) | 40,0 | 3,79 (0,44-32,78) / 0,04 |
| 0% | 6 (4,8) | 75,0 | 1,19 (0,13-10,31) / 0,92 | 100,0 | NA |

Fonte: Da autora.

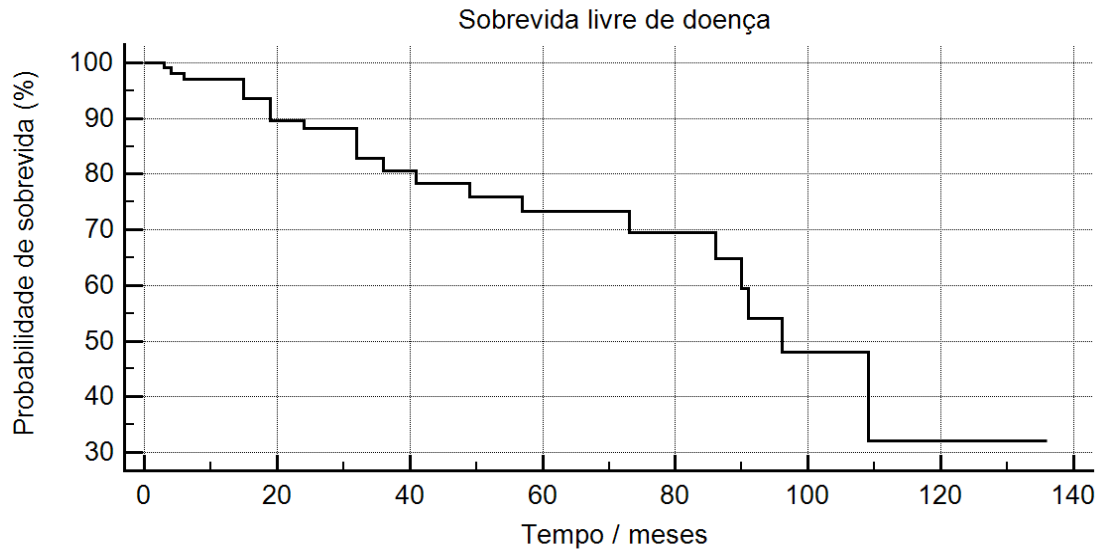
Nota: (HR) *hazard ratio* e (CI) *confidence interval*.

Figura 13 – Sobrevida específica de doença em pacientes com carcinoma espinocelular de língua e assoalho bucal.



Fonte: Da autora.

Figura 14- Sobrevida livre de doença em pacientes com carcinoma espinocelular de língua e assoalho bucal.



Fonte: Da autora.

Considerado os parâmetros clínico-patológicos indicados na Tabela 8, 9 e 10 em análise univariada, observou-se que, margens cirúrgicas comprometidas ($p=0,05$), mais de 5 brotamentos tumorais no fronte de invasão ($p=0,03$), escore alto do modelo BD ($p=0,05$), tumores pobremente diferenciados ($p=0,001$), escore alto de TSR e MBD ($p=0,05$) e escore alto do modelo HR ($p=0,05$) correlacionaram significativamente com pior prognóstico considerando sobrevida específica da doença. Já os indicadores, mais que 5 brotamentos tumorais no fronte de invasão ($p=0,01$), escore alto de TRS e MBD ($p=0,01$) e resposta linfocitária escassa ou ausente ($p=0,02$) influenciaram significativamente a sobrevida livre de doença favorecendo um pior prognóstico.

O escore alto de TSR e MBD resistiu à análise multivariada de Cox para os sistemas de gradações histopatológicas, após ajuste para outros fatores prognósticos, considerando tanto a sobrevida específica ($p=0,03$) quanto a livre de doença ($p=0,03$). Embora a classificação da OMS tenha revelado significância para sobrevida específica de doença, observamos que o grupo analisado (93,5% das amostras foram classificadas como bem ou moderadamente diferenciada e apenas 6,5% como pobremente diferenciado) não foi homogêneo para interpretações estatísticas em análise multivariada (Tabela 11 e 12).

Tabela 11- Análise multivariada de Cox para os sistemas de gradações histopatológicas para sobrevida específica de doença em pacientes com carcinoma espinocelular de língua e assoalho bucal.

| Parâmetros | Sobrevida específica de doença | |
|-----------------------|--------------------------------|-------------|
| | HR (95% CI) | p valor |
| TSR e MBD | | |
| Baixo / Intermediário | Referência | |
| Alto | 2,61 (1,07-6,36) | 0,03 |

Fonte: Da autora.

Nota: (HR) *hazard ratio* e (CI) *confidence interval*.

Tabela 12- Análise multivariada de Cox para sobrevida livre de doença dos sistemas de gradações histopatológicas em pacientes com carcinoma espinocelular de língua e assoalho bucal.

| Parâmetros | Sobrevida livre de doença | |
|-----------------------|---------------------------|-------------|
| | HR (95% CI) | p valor |
| TSR e MBD | | |
| Baixo / Intermediário | Referência | |
| Alto | 2,59 (1,09-6,18) | 0,03 |

Fonte: Da autora.

Nota: (HR) *hazard ratio* e (CI) *confidence interval*.

Ao analisar os marcadores imuno-histoquímicos em relação à sobrevida dos pacientes, observou-se que a alta expressão de STC2 interferiu significativamente na sobrevida específica ($p=0,05$) e na livre de doença ($p=0,02$) dos pacientes (Tabela 10). No entanto, na análise multivariada de Cox, os parâmetros resistentes foram margens cirúrgicas comprometidas ($p=0,03$) para sobrevida específica de doença e tratamento com multimodalidades (cirurgia, radioterapia e quimioterapia) ($p=0,02$) e alta expressão de STC2 ($p=0,04$) para sobrevida livre de doença (Tabela 13 e 14).

Tabela 13- Análise multivariada de Cox com parâmetros clínicos-patológicos, o sistema de gradação histopatológico TSR e MBD e os marcadores imuno-histoquímicos para sobrevida específica de doença em pacientes com carcinoma espinocelular de língua e assoalho bucal.

| Parâmetros | Sobrevida específica de doença | |
|---------------------------|--------------------------------|-------------|
| | HR (95% CI) | p valor |
| Margens cirúrgicas | | |
| Livres | Referência | |
| Comprometidas | 3,15 (1,06-9,35) | 0,03 |

Fonte: Da autora.

Nota: (HR) *hazard ratio* e (CI) *confidence interval*.

Tabela 14- Análise multivariada de Cox para sobrevida livre de doença com parâmetros clínicos-patológicos, o sistema de gradação histopatológico TSR e MBD e os marcadores imuno-histoquímicos em pacientes com carcinoma espinocelular de língua e assoalho bucal.

| Parâmetros | Sobrevida livre de doença | |
|--------------------------------|---------------------------|-------------|
| | HR (95% CI) | p valor |
| Sequência de tratamento | | |
| Cirurgia | Referência | |
| Cirurgia / RT | | 0,02 |
| Cirurgia / RT / QT | 3,28 (1,15-9,34) | |
| STC2 | | |
| Baixa expressão | Referência | |
| Alta expressão | 3,42 (1,04-11,22) | 0,04 |

Fonte: Da autora.

Nota: (RT) radioterapia, (QT) quimioterapia, (HR) *hazard ratio* e (CI) *confidence interval*.

A análise de qui-quadrado foi realizada entre os sistemas de gradações histopatológicas e expressões imuno-histoquímica dos marcadores, para avaliar a correlação entre eles (Tabela 15 e 16).

As associações dos sistemas de gradação histopatológicas com as características clínicas e patológicas são mostradas na Tabela 15. Uma significativa correlação entre modelo BD e sequência de tratamento ($p=0,03$), invasão perineural ($p=0,03$), profundidade de invasão ($p=0,0001$) e brotamento tumoral ($p=0,0001$) foi observada neste estudo. Nenhum parâmetro foi correlacionado com a classificação da OMS. Considerando o sistema TSR, hábito de beber ($p=0,01$), margens cirúrgicas ($p=0,03$), invasão perineural ($p=0,0005$), brotamento tumoral ($p=0,002$) e padrão de invasão ($p=0,02$) foram correlacionados significativamente. Para o modelo HR, hábito de fumar ($p=0,02$), estadiamento clínico ($p=0,03$), invasão perineural ($p=0,005$), resposta linfocitária ($p=0,0001$) e padrão de invasão ($p=0,0001$) foram significativos. Por fim, o modelo associado TSR e MBD correlacionou significativamente com invasão perineural ($p=0,01$), profundidade de invasão ($p=0,002$), brotamento tumoral ($p=0,0001$) e padrão de invasão ($p=0,02$).

As associações entre as expressões imuno-histoquímicas dos marcadores e as características clínicas e patológicas são mostradas na Tabela 16. Uma significativa correlação entre a imunoexpressão de Fascina e gênero ($p=0,01$) e invasão perineural ($p=0,03$) foram observadas. Para EEF1D, identificou-se que sequência de tratamento ($p=0,01$) e resposta linfocitária ($p=0,005$) foram significantes. STC2 mostrou a significância com invasão perineural ($p=0,02$), resposta linfocitária ($p=0,03$), profundidade de invasão ($p=0,03$) e padrão de invasão

($p=0,03$) revelaram significância. Em relação a plectina, apenas gênero ($p= 0,004$) e brotamento tumoral ($p=0,05$) mostraram significância. PINP (tumor), sequência de tratamento ($p=0,02$) e recidiva e/ou metástase ($p=0,01$) foram significantes. PINP (estroma), estadiamento clínico ($p=0,01$), comprometimento linfonodal ($p=0,03$) e profundidade de invasão ($p=0,0002$) foram significativos.

Tabela 15 - Análise estatística pelo método qui-quadrado dos parâmetros clínico-patológicos com os sistemas de gradação histopatológica.

| Parâmetros | Modelo BD | | p valor | Modelo da OMS | | p valor | TSR | | p valor | Modelo HR | | p valor | TSR e MBD | | p valor |
|-----------------------------------|----------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|---------------|
| | Baixo / Inter. | Alto risco | | Bem / Mod. | Pobremente | | Estroma pobre | Estroma rico | | Leve / Mod. | Abundante | | Leve / Mod. | Abundante | |
| | Nº de | Nº de | | Nº de | Nº de | | Nº de | Nº de | | Nº de | Nº de | | Nº de | Nº de | |
| | pacientes (%) | pacientes (%) | | pacientes (%) | pacientes (%) | | pacientes (%) | pacientes (%) | | pacientes (%) | pacientes (%) | | pacientes (%) | pacientes (%) | |
| Idade | | | | | | | | | | | | | | | |
| ≤62 anos | 34 (46,6) | 29 (56,9) | 0,26 | 60 (51,7) | 3 (37,5) | 0,43 | 47 (51,1) | 16 (50,0) | 0,91 | 55 (53,4) | 8 (38,1) | 0,20 | 48 (49,5) | 15 (55,6) | 0,57 |
| >62 anos | 39 (53,4) | 22 (43,1) | | 56 (48,3) | 5 (62,5) | | 45 (48,9) | 16 (50,0) | | 48 (46,6) | 13 (61,9) | | 49 (50,5) | 12 (44,4) | |
| Gênero | | | | | | | | | | | | | | | |
| Masculino | 46 (63,0) | 36 (70,6) | 0,38 | 77 (66,4) | 5 (62,5) | 0,82 | 65 (70,7) | 17 (53,1) | 0,07 | 68 (66,0) | 14 (66,7) | 0,95 | 65 (67,0) | 17 (63,0) | 0,69 |
| Feminino | 27 (37,0) | 15 (29,4) | | 39 (33,6) | 3 (37,5) | | 27 (29,3) | 15 (46,9) | | 35 (34,0) | 7 (33,3) | | 32 (33,0) | 10 (37,0) | |
| Hábito de fumar | | | | | | | | | | | | | | | |
| Não | 12 (20,7) | 5 (11,9) | 0,25 | 16 (17,2) | 1 (14,3) | 0,84 | 10 (14,1) | 7 (24,1) | 0,22 | 17 (21,0) | 0 (0,0) | 0,02 | 14 (18,4) | 3 (12,5) | 0,50 |
| Sim | 46 (79,3) | 37 (88,1) | | 77 (82,8) | 6 (85,7) | | 61 (85,9) | 22 (75,9) | | 64 (79,0) | 19 (100,0) | | 62 (81,6) | 21 (87,5) | |
| Hábito de beber | | | | | | | | | | | | | | | |
| Não | 21 (39,6) | 11 (27,5) | 0,22 | 29 (33,7) | 3 (42,9) | 0,62 | 17 (26,2) | 15 (53,6) | 0,01 | 26 (34,7) | 6 (33,3) | 0,91 | 24 (34,3) | 8 (34,8) | 0,96 |
| Sim | 32 (60,4) | 29 (72,5) | | 57 (66,3) | 4 (57,1) | | 48 (73,8) | 13 (46,4) | | 49 (65,3) | 12 (66,7) | | 46 (65,7) | 15 (65,2) | |
| Localização | | | | | | | | | | | | | | | |
| Língua | 54 (74,0) | 37 (72,5) | 0,86 | 85 (73,3) | 6 (75,0) | 0,91 | 70 (76,1) | 21 (65,6) | 0,25 | 77 (74,8) | 14 (66,7) | 0,44 | 71 (73,2) | 20 (74,1) | 0,92 |
| Assoalho bucal | 19 (26,0) | 14 (27,5) | | 31 (26,7) | 2 (25,0) | | 22 (23,9) | 11 (34,4) | | 26 (25,2) | 7 (33,3) | | 26 (26,8) | 7 (25,9) | |
| Estadiamento Clínico | | | | | | | | | | | | | | | |
| I / II | 28 (40,0) | 20 (40,0) | 1,00 | 45 (39,8) | 3 (42,9) | 0,87 | 37 (42,0) | 11 (34,4) | 0,45 | 44 (44,4) | 4 (19,0) | 0,03 | 36 (38,7) | 12 (44,4) | 0,59 |
| III / IV | 42 (60,0) | 30 (60,0) | | 68 (60,2) | 4 (57,1) | | 51 (58,0) | 21 (65,6) | | 55 (55,6) | 17 (81,0) | | 57 (61,3) | 15 (55,6) | |
| Sequência de tratamento | | | | | | | | | | | | | | | |
| Cirurgia | 20 (28,2) | 4 (8,3) | 0,03 | 23 (20,5) | 1 (14,3) | 0,75 | 18 (20,5) | 6 (19,4) | 0,94 | 20 (20,4) | 4 (19,0) | 0,65 | 22 (23,7) | 2 (7,7) | 0,18 |
| Cirurgia / RT | 28 (39,4) | 15 (31,2) | | 41 (36,6) | 2 (28,6) | | 31 (35,2) | 12 (38,7) | | 37 (37,8) | 6 (28,6) | | 33 (35,5) | 10 (38,5) | |
| Cirurgia / RT / QT | 23 (32,4) | 29 (60,4) | | 48 (42,9) | 4 (57,1) | | 39 (44,3) | 13 (41,9) | | 41 (41,8) | 11 (52,4) | | 38 (40,9) | 14 (53,8) | |
| Margens cirúrgicas | | | | | | | | | | | | | | | |
| Livres | 38 (65,5) | 23 (51,1) | 0,14 | 60 (61,2) | 1 (20,0) | 0,06 | 49 (65,3) | 12 (42,9) | 0,03 | 55 (61,8) | 6 (42,9) | 0,18 | 50 (62,5) | 11 (47,8) | 0,20 |
| Comprometidas | 20 (34,5) | 22 (48,9) | | 38 (38,8) | 4 (80,0) | | 26 (34,7) | 16 (57,1) | | 34 (38,2) | 8 (57,1) | | 30 (37,5) | 12 (52,2) | |
| Comprometimento linfonodal | | | | | | | | | | | | | | | |
| Não | 43 (59,7) | 22 (44,9) | 0,10 | 62 (54,4) | 3 (42,9) | 0,55 | 47 (52,8) | 18 (56,2) | 0,73 | 56 (56,0) | 9 (42,9) | 0,27 | 49 (52,1) | 16 (59,3) | 0,51 |
| Sim | 29 (40,3) | 27 (55,1) | | 52 (45,6) | 4 (57,1) | | 42 (47,2) | 14 (43,7) | | 44 (44,0) | 12 (57,1) | | 45 (47,9) | 11 (40,7) | |
| Recidiva / Metástase | | | | | | | | | | | | | | | |
| Não | 58 (81,7) | 35 (76,1) | 0,46 | 88 (79,3) | 5 (83,3) | 0,81 | 66 (76,7) | 27 (87,1) | 0,22 | 77 (80,2) | 16 (76,2) | 0,68 | 75 (82,4) | 18 (69,2) | 0,14 |
| Sim | 13 (18,3) | 11 (23,9) | | 23 (20,7) | 1 (16,7) | | 20 (23,3) | 4 (12,9) | | 19 (19,8) | 5 (23,8) | | 16 (17,6) | 8 (30,8) | |
| Invasão perineural | | | | | | | | | | | | | | | |
| Não | 40 (54,8) | 18 (35,3) | 0,03 | 54 (46,6) | 4 (50,0) | 0,85 | 48 (57,8) | 10 (24,4) | 0,0005 | 54 (52,4) | 4 (19,0) | 0,005 | 51 (52,6) | 7 (25,9) | 0,01 |
| Sim | 33 (45,2) | 33 (64,7) | | 62 (53,4) | 4 (50,0) | | 35 (42,2) | 31 (75,6) | | 49 (47,6) | 17 (81,0) | | 46 (47,4) | 20 (74,1) | |
| Invasão vascular | | | | | | | | | | | | | | | |
| Não | 5 (12,8) | 8 (23,5) | 0,23 | 11 (16,4) | 2 (33,3) | 0,30 | 10 (17,9) | 3 (17,6) | 0,98 | 12 (17,6) | 1 (20,0) | 0,89 | 11 (19,0) | 2 (13,3) | 0,61 |
| Sim | 34 (87,2) | 26 (76,5) | | 56 (83,6) | 4 (66,7) | | 46 (82,1) | 14 (82,4) | | 56 (82,4) | 4 (80,0) | | 47 (81,0) | 13 (86,7) | |
| Resposta linfocitária | | | | | | | | | | | | | | | |
| Tipo I / II | 58 (79,5) | 36 (70,6) | 0,25 | 89 (76,7) | 5 (62,5) | 0,36 | 64 (77,1) | 30 (73,2) | 0,63 | 85 (82,5) | 9 (42,9) | 0,0001 | 75 (77,3) | 19 (70,4) | 0,45 |
| Tipo III | 15 (20,5) | 15 (29,4) | | 27 (23,3) | 3 (37,5) | | 19 (22,9) | 11 (26,8) | | 18 (17,5) | 12 (57,1) | | 22 (22,7) | 8 (29,6) | |
| Profundidade de invasão | | | | | | | | | | | | | | | |
| < 4 mm | 27 (37,0) | 0 (0,0) | 0,0001 | 24 (20,7) | 3 (37,5) | 0,26 | 22 (26,5) | 5 (12,2) | 0,07 | 24 (23,3) | 3 (14,3) | 0,36 | 27 (27,8) | 0 (0,0) | 0,002 |
| ≥ 4 mm | 46 (63,0) | 51 (100,0) | | 92 (79,3) | 5 (62,5) | | 61 (73,5) | 36 (87,8) | | 79 (76,7) | 18 (85,7) | | 70 (72,2) | 27 (100,0) | |
| Brotamento tumoral | | | | | | | | | | | | | | | |
| < 5 | 63 (86,3) | 0 (0,0) | 0,0001 | 59 (50,9) | 4 (50,0) | 0,96 | 50 (60,2) | 13 (31,7) | 0,002 | 51 (49,5) | 12 (57,1) | 0,52 | 63 (64,9) | 0 (0,0) | 0,0001 |
| ≥ 5 | 10 (13,7) | 51 (100,0) | | 57 (49,1) | 4 (50,0) | | 33 (39,8) | 28 (68,3) | | 52 (50,5) | 9 (42,9) | | 34 (35,1) | 27 (100,0) | |
| Padrão de invasão | | | | | | | | | | | | | | | |
| Tipo I / II / III / IV | 68 (93,2) | 43 (84,3) | 0,11 | 103 (88,8) | 8 (100,0) | 0,31 | 78 (94,0) | 33 (80,5) | 0,02 | 98 (95,1) | 13 (61,9) | 0,0001 | 90 (92,8) | 21 (77,8) | 0,02 |
| Tipo V | 5 (6,8) | 8 (15,7) | | 13 (11,2) | 0 (0,0) | | 5 (6,0) | 8 (19,5) | | 5 (4,9) | 8 (38,1) | | 7 (7,2) | 6 (22,2) | |

Fonte: Da autora.

Nota: (RT) radioterapia, (QT) quimioterapia, (HR) hazard ratio e (CI) confidence interval.

Tabela 16 - Análise dos parâmetros clínico-patológicos com os marcadores imuno-histoquímicos pelo método qui-quadrado.

| Parâmetros | Fascina | | P valor | EEF1D | | P valor | STC2 | | P valor | Plectina | | P valor | PINP (tumor) | | P valor | PINP (estroma) | | | P valor | | |
|-----------------------------------|-----------------|-----------------|-------------|-----------------|-----------------|--------------|-----------------|-----------------|-------------|-----------------|-----------------|--------------|-----------------|-----------------|-------------|-----------------|-----------------|---------------------|---------------|---------------------|---------------------|
| | Baixa expressão | Alta expressão | | Baixa expressão | Alta expressão | | Baixa expressão | Alta expressão | | Baixa expressão | Alta expressão | | Baixa expressão | Alta expressão | | Baixa expressão | Alta expressão | >50% | | 1 a 50% | 0% |
| | Nº de pacientes | Nº de pacientes | | Nº de pacientes | Nº de pacientes | | Nº de pacientes | Nº de pacientes | | Nº de pacientes | Nº de pacientes | | Nº de pacientes | Nº de pacientes | | Nº de pacientes | Nº de pacientes | Nº de pacientes (%) | | Nº de pacientes (%) | Nº de pacientes (%) |
| | (%) | (%) | | (%) | (%) | | (%) | (%) | | (%) | (%) | | (%) | (%) | | (%) | (%) | | | | |
| Idade | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| ≤62 anos | 11 (73,3) | 51 (48,6) | 0,07 | 20 (48,8) | 42 (53,8) | 0,60 | 12 (41,4) | 42 (60,9) | 0,07 | 51 (48,6) | 11 (73,3) | 0,07 | 47 (50,5) | 14 (58,3) | 0,49 | 52 (50,5) | 6 (75,0) | 3 (50,0) | 0,40 | | |
| >62 anos | 4 (26,7) | 54 (51,4) | | 21 (51,2) | 36 (46,2) | | 17 (58,6) | 27 (39,1) | | 54 (51,4) | 4 (26,7) | | 46 (49,5) | 10 (41,7) | | 51 (49,5) | 2 (25,0) | 3 (50,0) | | | |
| Gênero | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Masculino | 14 (93,3) | 66 (62,9) | 0,01 | 29 (70,7) | 51 (65,4) | 0,55 | 19 (65,5) | 52 (75,4) | 0,32 | 74 (70,5) | 5 (33,3) | 0,004 | 62 (66,7) | 16 (66,7) | 1,00 | 67 (65,0) | 6 (75,0) | 5 (83,3) | 0,57 | | |
| Feminino | 1 (6,7) | 39 (37,1) | | 12 (29,3) | 27 (34,6) | | 10 (34,5) | 17 (24,6) | | 31 (29,5) | 10 (66,7) | | 31 (33,3) | 8 (33,3) | | 62 (66,7) | 8 (33,3) | 36 (35,0) | | 2 (25,0) | 1 (16,7) |
| Hábito de fumar | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Não | 2 (15,4) | 13 (15,5) | 0,99 | 7 (20,6) | 7 (11,3) | 0,21 | 5 (20,8) | 6 (11,3) | 0,27 | 15 (17,6) | 1 (8,3) | 0,41 | 12 (16,2) | 2 (10,0) | 0,49 | 13 (15,3) | 1 (16,7) | 0 (0,0) | 0,69 | | |
| Sim | 11 (84,6) | 71 (84,5) | | 27 (79,4) | 55 (88,7) | | 19 (79,2) | 47 (88,7) | | 70 (82,4) | 11 (91,7) | | 62 (83,8) | 18 (90,0) | | 62 (83,8) | 18 (90,0) | 71 (84,5) | | 5 (83,3) | 4 (100,0) |
| Hábito de beber | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Não | 2 (20,0) | 28 (35,0) | 0,34 | 10 (33,3) | 20 (33,9) | 0,95 | 7 (33,3) | 14 (28,5) | 0,69 | 27 (34,6) | 4 (33,3) | 0,93 | 24 (34,8) | 5 (26,3) | 0,48 | 28 (35,4) | 1 (20,0) | 0 (0,0) | 0,27 | | |
| Sim | 8 (80,0) | 52 (65,0) | | 20 (66,7) | 39 (66,1) | | 14 (66,7) | 35 (71,4) | | 51 (65,4) | 8 (66,7) | | 45 (65,2) | 14 (73,7) | | 45 (65,2) | 14 (73,7) | 51 (64,6) | | 4 (80,0) | 4 (100,0) |
| Localização | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Língua | 10 (66,7) | 77 (73,3) | 0,59 | 30 (73,2) | 56 (71,8) | 0,87 | 24 (82,8) | 49 (71,0) | 0,22 | 74 (70,5) | 13 (86,7) | 0,19 | 68 (73,1) | 18 (75,0) | 0,85 | 78 (75,7) | 5 (62,5) | 3 (50,0) | 0,29 | | |
| Assoalho bucal | 5 (33,3) | 28 (26,7) | | 11 (26,8) | 22 (28,2) | | 5 (17,2) | 20 (29,0) | | 31 (29,5) | 2 (13,3) | | 25 (26,9) | 6 (25,0) | | 25 (26,9) | 6 (25,0) | 25 (24,3) | | 3 (37,5) | 3 (50,0) |
| Estadiamento Clínico | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| I / II | 6 (42,9) | 40 (39,2) | 0,79 | 16 (39,0) | 30 (40,5) | 0,87 | 15 (51,4) | 25 (38,5) | 0,23 | 38 (37,6) | 9 (60,0) | 0,10 | 35 (39,3) | 10 (41,7) | 0,83 | 39 (39,4) | 6 (75,0) | 0 (0,0) | 0,01 | | |
| III / IV | 8 (57,1) | 62 (60,8) | | 25 (61,0) | 44 (59,5) | | 14 (48,3) | 40 (61,5) | | 63 (62,4) | 6 (40,0) | | 54 (60,7) | 14 (58,3) | | 60 (60,6) | 2 (25,0) | 6 (100,0) | | | |
| Sequência de tratamento | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Cirurgia | 3 (20,0) | 18 (18,0) | 0,93 | 7 (17,1) | 14 (19,2) | 0,01 | 3 (10,7) | 9 (13,8) | 0,82 | 18 (18,0) | 4 (26,7) | 0,72 | 19 (21,3) | 0 (0,0) | 0,02 | 14 (14,3) | 4 (50,0) | 1 (16,7) | 0,12 | | |
| Cirurgia / RT | 6 (40,0) | 37 (37,0) | | 22 (53,7) | 20 (27,4) | | 13 (46,4) | 26 (40,0) | | 37 (37,0) | 5 (33,3) | | 35 (39,3) | 8 (34,8) | | 40 (40,8) | 1 (12,5) | 2 (33,3) | | | |
| Cirurgia / RT / QT | 6 (40,0) | 45 (45,0) | | 12 (29,3) | 39 (53,4) | | 12 (42,9) | 30 (46,2) | | 45 (45,0) | 6 (40,0) | | 35 (39,3) | 15 (65,2) | | 44 (44,9) | 3 (37,5) | 3 (50,0) | | | |
| Margens cirúrgicas | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Livres | 9 (69,2) | 50 (56,8) | 0,39 | 19 (54,3) | 39 (60,0) | 0,58 | 14 (53,8) | 30 (51,7) | 0,85 | 53 (59,6) | 7 (58,3) | 0,93 | 47 (58,7) | 10 (55,6) | 0,80 | 52 (59,8) | 2 (28,6) | 3 (75,0) | 0,21 | | |
| Comprometidas | 4 (30,8) | 38 (43,2) | | 16 (45,7) | 26 (40,0) | | 12 (46,2) | 28 (48,3) | | 36 (40,4) | 5 (41,7) | | 33 (41,2) | 8 (44,4) | | 33 (41,2) | 8 (44,4) | 35 (40,2) | | 5 (71,4) | 1 (25,0) |
| Comprometimento linfonodal | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Não | 6 (40,0) | 55 (53,9) | 0,31 | 21 (52,5) | 39 (51,3) | 0,90 | 17 (58,6) | 33 (50,0) | 0,44 | 51 (50,0) | 11 (73,3) | 0,09 | 49 (54,4) | 10 (41,7) | 0,26 | 54 (54,0) | 5 (62,5) | 0 (0,0) | 0,03 | | |
| Sim | 9 (60,0) | 47 (46,1) | | 19 (47,5) | 37 (48,7) | | 12 (41,4) | 33 (50,0) | | 51 (50,0) | 4 (26,7) | | 41 (45,6) | 14 (58,3) | | 41 (45,6) | 14 (58,3) | 46 (46,0) | | 3 (37,5) | 6 (100,0) |
| Recidiva / Metástase | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Não | 12 (80,0) | 78 (79,6) | 0,97 | 31 (77,5) | 58 (80,6) | 0,70 | 24 (85,7) | 49 (77,8) | 0,38 | 78 (78,8) | 12 (85,7) | 0,54 | 74 (85,1) | 14 (60,9) | 0,01 | 78 (80,4) | 4 (57,1) | 6 (100,0) | 0,14 | | |
| Sim | 3 (20,0) | 20 (20,4) | | 9 (22,5) | 14 (19,4) | | 4 (14,3) | 14 (22,2) | | 21 (21,2) | 2 (14,3) | | 13 (14,9) | 9 (39,1) | | 13 (14,9) | 9 (39,1) | 19 (19,6) | | 3 (42,9) | 0 (0,0) |
| Invasão perineural | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Não | 3 (20,0) | 51 (48,6) | 0,03 | 19 (46,3) | 34 (43,6) | 0,77 | 8 (27,6) | 36 (52,2) | 0,02 | 47 (44,8) | 8 (53,3) | 0,53 | 44 (47,3) | 9 (37,5) | 0,39 | 46 (44,7) | 6 (75,0) | 1 (16,7) | 0,08 | | |
| Sim | 12 (80,0) | 54 (51,4) | | 22 (53,7) | 44 (56,4) | | 21 (72,4) | 33 (47,8) | | 58 (55,2) | 7 (46,7) | | 49 (52,7) | 15 (62,5) | | 57 (55,3) | 2 (25,0) | 5 (83,3) | | | |
| Invasão vascular | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Não | 0 (0,0) | 13 (20,3) | 0,13 | 4 (15,4) | 9 (19,1) | 0,68 | 2 (9,1) | 11 (21,6) | 0,20 | 12 (18,5) | 1 (12,5) | 0,67 | 11 (20,0) | 2 (11,8) | 0,44 | 13 (20,6) | 0 (0,0) | 0 (0,0) | 0,32 | | |
| Sim | 9 (100,0) | 51 (79,7) | | 22 (84,6) | 38 (80,9) | | 20 (90,9) | 40 (78,4) | | 53 (81,5) | 7 (87,5) | | 44 (80,0) | 15 (88,2) | | 50 (79,4) | 4 (100,0) | 5 (100,0) | | | |
| Resposta linfocitária | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Tipo I / II | 11 (73,3) | 83 (79,0) | 0,61 | 38 (92,7) | 55 (70,5) | 0,005 | 27 (93,1) | 51 (73,9) | 0,03 | 81 (77,1) | 12 (80,0) | 0,80 | 75 (80,6) | 17 (70,8) | 0,29 | 79 (76,7) | 7 (87,5) | 6 (100,0) | 0,32 | | |
| Tipo III | 4 (26,7) | 22 (21,0) | | 3 (7,3) | 23 (29,5) | | 2 (6,9) | 18 (26,1) | | 24 (22,9) | 3 (20,0) | | 18 (19,4) | 7 (29,2) | | 24 (23,3) | 1 (12,5) | 0 (0,0) | | | |
| Profundidade de invasão | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| < 4 mm | 1 (6,7) | 23 (21,9) | 0,16 | 6 (14,6) | 18 (23,1) | 0,27 | 2 (6,9) | 18 (26,1) | 0,03 | 21 (20,0) | 4 (26,7) | 0,55 | 19 (20,4) | 5 (20,8) | 0,96 | 16 (15,5) | 6 (75,0) | 2 (33,3) | 0,0002 | | |
| ≥ 4 mm | 14 (93,3) | 82 (78,1) | | 35 (85,4) | 60 (76,9) | | 27 (93,1) | 51 (73,9) | | 84 (80,0) | 11 (73,3) | | 74 (79,6) | 19 (79,2) | | 87 (84,5) | 2 (25,0) | 4 (66,7) | | | |
| Brotamento tumoral | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| < 5 | 7 (46,7) | 52 (49,5) | 0,83 | 19 (46,3) | 39 (50,0) | 0,70 | 15 (51,7) | 28 (40,6) | 0,31 | 56 (53,3) | 4 (26,7) | 0,05 | 49 (52,7) | 9 (37,5) | 0,18 | 53 (51,5) | 4 (50,0) | 1 (16,7) | 0,25 | | |
| ≥ 5 | 8 (53,3) | 53 (50,5) | | 22 (53,7) | 39 (50,0) | | 14 (48,3) | 41 (59,4) | | 49 (46,7) | 11 (73,3) | | 44 (47,3) | 15 (62,5) | | 50 (48,5) | 4 (50,0) | 5 (83,3) | | | |
| Padrão de invasão | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | | |
| Tipo I / II / III / IV | 12 (80,0) | 95 (90,5) | 0,22 | 36 (87,8) | 70 (89,7) | 0,74 | 29 (100,0) | 59 (85,5) | 0,03 | 95 (90,5) | 13 (86,7) | 0,64 | 82 (88,2) | 23 (95,8) | 0,27 | 93 (90,3) | 7 (87,5) | 5 (83,3) | 0,84 | | |
| Tipo V | 3 (20,0) | 10 (9,5) | | 5 (12,2) | 8 (10,3) | | 0 (0,0) | 10 (14,5) | | 10 (9,5) | 2 (13,3) | | 11 (11,8) | 1 (4,2) | | 10 (9,7) | 1 (12,5) | 1 (16,7) | | | |

Fonte: Da autora.

Nota: (RT) radioterapia, (QT) quimioterapia, (HR) hazard ratio e (CI) confidence interval.

6 DISCUSSÃO

A maioria das características epidemiológicas dos pacientes analisados neste trabalho foram similares aos descritos na literatura. CEC oral é normalmente uma doença que afeta homens, entre a quinta e sexta década de vida, que fumam e bebem por longos períodos (DE SANTIS et al., 2017; RIVERA, 2015). Neste trabalho, 66,1% eram homens, com mediana de idade de 62 anos ao diagnóstico, que fumavam e bebiam em 48,4% dos casos. O consumo de tabaco e álcool são associados não somente como fatores de riscos para o desenvolvimento do CEC oral, mas também como um dos principais fatores que interferem no prognóstico da doença (DE AGUIAR; KOWALSKI; DE ALMEIDA, 2007; DE SANTIS et al., 2017; RIVERA, 2015; CHAPMAN et al., 2018). O consumo de álcool foi significativamente associado com o decréscimo na sobrevida de pacientes com CEC de língua em estágio III/IV e com maior chance de recidiva local precoce no trabalho de Aguiar, Kowalski e de Almeida (2007). Rodrigues et al. (2014), relacionaram o fumo do tabaco como fator prognóstico independente para sobrevida global e sobrevida específica para o CEC oral.

As topografias analisadas neste estudo foram língua (73,4%) e assoalho de boca (26,6%), uma vez que essas localizações refletem uma provável tumorigênese diferenciada em relação a outras localizações orais. CEC de língua e assoalho apresentam uma maior facilidade de invasão muito provavelmente direcionada a rica vascularização da região (RIVERA, 2015; ALMANGUSH et al., 2018). Independentemente da acessibilidade da cavidade oral durante o exame clínico, o câncer oral geralmente é diagnosticado em estádios avançados e os motivos mais prováveis para o fato são os erros ou atrasos no diagnóstico inicial e a falta de conhecimento do paciente e/ou do profissional que o trata, o que, evidentemente, diminui a chance de sobrevida (MARKOPOULOS, 2012; RIVERA, 2015). O estadiamento clínico tardio (III e IV) esteve presente em 58% dos pacientes aqui analisados. Considerando os parâmetros anatomo-patológicos dos espécimes avaliados, 56 pacientes (45,2%) apresentavam linfonodos comprometidos, a maioria das peças cirúrgicas avaliadas apresentou margens livres (49,2%), presença de invasão vascular (48,4%) e presença de invasão perineural (53,2%). Interessantemente, pacientes com invasão perineural e vascular apresentaram

linfonodos positivos, estadiamento IV e escore do modelo BD alto. Isso ratifica que o modelo BD pode ser um promissor modelo histopatológico na identificação de tumores agressivos o que poderia favorecer um tratamento mais individualizado e com múltiplas modalidades.

Após 5 anos de seguimento, a taxa de sobrevida foi de 60,5% e a maioria dos pacientes foi estadiada em III/IV. Curiosamente, esses dados diferem da literatura que aponta uma sobrevida geral de 50% ou menos após 5 anos (RODRIGUES et al., 2014; RIVERA, 2015; NEVILLE et al., 2016). As taxas de sobrevida de 5 anos para o CEC oral no Brasil variam de 35% a 85% para os tumores em estágio I, 26 a 77% para os tumores em estadio II, 10 a 50% em estadio III e de 0 a 26% em estadio IV (ANATÔMICA, 2001). O que poderia justificar tais dados é que os pacientes estão sendo tratados com modalidades terapêuticas associadas como mostram os nossos resultados em que 41,9% dos pacientes foram tratados com cirurgia associada à radioterapia e à quimioterapia, e ainda se observou que a sequência de tratamento revelou significância para sobrevida livre de doença. Associadamente, especula-se que as margens cirúrgicas mais amplas possam estar sendo reconsideradas pelos cirurgiões durante o tratamento, o que poderia ser um bom indicador já que os nossos resultados demonstraram significância na análise multivariada de Cox ($p=0,03$) para sobrevida específica de doença.

A invasão perineural é uma variável que correlacionou significativamente com modelo BD ($p=0,03$), modelo HR ($p=0,005$), TSR ($p=0,0005$) e TSR e MBD ($p=0,01$). Essa variável, que representa envolvimento de ninhos de células tumorais no espaço perineural, tem sido associada ao aumento da recorrência local e metástases regionais (DUNN; MORGAN; BEER, 2009; CAVALCANTE, 2015). Dunn, Morgan e Beer (2009), afirmaram que a invasão perineural se correlaciona com altas taxas de recorrência, comportamento agressivo e baixa sobrevida. Ainda esses autores destacaram que uma neoplasia que ganha capacidade de invadir o perineuro encontra um trajeto de baixa resistência relativamente protegido das defesas do hospedeiro, o que facilita a propagação do tumor ao longo do nervo, podendo atingir diversas regiões do organismo. A invasão perineural é um processo lento, e quanto mais cedo diagnosticada melhor será o prognóstico para o paciente (CAVALCANTE, 2015). Interessantemente, nossos resultados mostraram que pacientes com invasão perineural e vascular apresentaram linfonodos positivos,

estadiamento IV e escore do modelo BD alto. Isso ratifica que o modelo BD pode ser um promissor modelo histopatológico na identificação de tumores agressivos o que poderia favorecer um tratamento mais individualizado e com múltiplas modalidades.

Várias dificuldades são identificadas no planejamento de um tratamento mais adequado para o CEC oral, o qual ainda se baseia principalmente na localização e no estadiamento clínico do tumor. Tal constatação reforça um grave obstáculo enfrentado na oncologia clínica, onde pacientes com tumores em sítios e estadiamentos semelhantes são tratados da mesma forma, sem levar em conta a atividade biológica tumoral. É consenso, que grandes variações existem na resposta ao tratamento e ao prognóstico, com alguns pacientes apresentando sobrevida prolongada e outros morrendo em pouco tempo devido à recidivas, metástases regionais ou à distância (JERJES et al., 2010; KURIAKOSE, 2017). Em virtude dessas dificuldades, grandes esforços têm sido feitos para identificar características biológicas tumorais que auxiliem no diagnóstico mais acurado, na melhor determinação do tratamento e, conseqüentemente, na melhor definição do prognóstico de pacientes com CEC oral. A este respeito, várias características moleculares e histopatológicas têm sido propostas como fatores prognósticos do CEC oral, porém nenhuma ainda é utilizada na rotina clínica ou indicada para melhorar o planejamento terapêutico e o prognóstico de pacientes com CEC oral (WARNAKULASURIYA, 2009; JERJES et al., 2010; KURIAKOSE, 2017).

Vários pesquisadores, ao longo dos anos, apresentaram propostas de gradação histológica com intuito de correlacioná-las melhor com o prognóstico do CEC oral (ANNEROTH; BATSAKIS; LUNA, 1987; BRYNE et al., 1992; BRANDWEIN-GENSLER et al., 2010; BARNES, 2005) no entanto, tais propostas criadas até o presente não são úteis para predizer o prognóstico dos pacientes com CEC oral em estádios iniciais, constituindo modelos com baixa reprodutibilidade para o uso clínico ou não mostram significância prognóstica, particularmente para os tumores de língua e assoalho bucal. O sistema mais recente foi proposto por Almangush et al. (2014), que avalia dois parâmetros em espécimes cirúrgicos: brotamento e profundidade tumoral (denominado modelo BD), que visa identificar aqueles pacientes com casos agressivos de CEC oral, principalmente, em estágios iniciais (estádios I e II), os quais poderiam ser beneficiados por um tratamento com múltiplas modalidades. Tal modelo proposto é relativamente recente, prático, objetivo e com um promissor valor preditivo já que vários trabalhos subsequentes

demonstraram essa aplicabilidade para pacientes com CEC oral em diferentes estágios, ratificando que esse novo sistema de classificação histopatológica possa ser uma possível ferramenta de valor prognóstico (SAWAZAKI-CALONE et al., 2015; XIE et al., 2015; STRIEDER et al., 2016; ALMANGUSH et al., 2017; ARORA et al., 2017; SEKI et al., 2017; BRENNAN et al., 2017; LEÃO et al., 2017; JUNIOR et al., 2017; SHIMIZU et al., 2018).

Considerando os dois parâmetros histopatológicos avaliados no modelo BD (profundidade de invasão e brotamentos), vale ressaltar que esses indicadores têm sido considerados preditores individuais de prognóstico para pacientes com CEC oral (WANG et al., 2015; GANLY et al., 2013, SAWAZAKI-CALONE et al., 2015). A profundidade tumoral, medida a partir da superfície do tumor até o ponto mais profundo da invasão, foi apontada como preditor para a metástase linfonodal (CHAROENRAT; ARJHANSIRI; KITSUKJIT, 2006; GANLY et al., 2013, SAWAZAKI-CALONE et al., 2015), refletindo a agressividade do crescimento tumoral por alcançar as estruturas linfo-vasculares subjacentes (HUANG et al., 2010). No entanto, os nossos resultados não demonstraram correlação entre profundidade e sobrevida global (sobrevida específica $p=0,49$ e sobrevida livre $p=0,51$). Mas constatou-se que pacientes com tumores de espessura superior a 4mm, apresentavam presença de invasão perineural e vascular, e independentemente, são preditores do envolvimento do comprometimento linfonodal, ou seja, dos linfonodos cervicais. Nossos resultados demonstraram que a presença de invasão perineural (5 anos; 58,6%) foi associada a uma baixa taxa de sobrevida específica de doença, enquanto a ausência de invasão perineural (74,4%) do tumor foi associada a uma taxa de sobrevida específica de doença para o mesmo período de 5 anos. Dessa maneira, sugerimos que a invasão perineural é uma variável importante para os pacientes com CEC de língua e assoalho e devem ser mencionadas em um laudo de diagnóstico patológico.

Já o brotamento tumoral, as células neoplásicas únicas ou grupamentos de até cinco células no estroma da região de frente tumoral, representa fenótipos importantes de malignidade: a falta de coesão celular e a capacidade de invasão ativa. Tal parâmetro tem sido demonstrado ser um marcador prognóstico valioso para neoplasias malignas de cólon e reto (UENO et al., 2014), esôfago (TERRAMOTO et al., 2013), pulmão (YAMAGUCHI et al., 2010), laringe (SARIOGLU et al., 2010) e língua (WANG et al., 2015; ALMANGUSH et al., 2014; SAWAZAKI-

CALONE et al., 2015; ARORA et al., 2017; PETERS; PHILLIPS; MURRAH, 2017). Interessantemente, em nossos resultados, o brotamento correlacionou significativamente com sobrevida específica ($p=0,03$) e livre de doença ($p=0,01$), confirmando assim que este parâmetro pode ser um preditivo de prognóstico para CEC oral. Nossas amostras obtiveram a maior prevalência de tumores com profundidade de invasão maior ou igual a 4mm (78,2%) e menor que 5 brotamentos no fronte de invasão (50,8%), conseqüentemente o escore 1 e 2, de baixo risco e risco intermediário (58,9%) foi o mais frequente. Almangush et al. (2014), sugeriram que os CECs de língua clinicamente iniciais (T1 e T2) de 4 mm ou mais profundos, ou com um padrão de crescimento com brotamentos, devam ser considerados como tumores de alto risco que requerem tratamento de multimodalidade. Adicionalmente, os nossos resultados mostraram, que pacientes em estágio iniciais estão correlacionados com um escore alto do modelo BD, ratificando que o modelo BD pode ser promissor na identificação de pacientes com maior risco de óbito em fase precoce com os parâmetros altos do modelo BD.

Além disso, o modelo BD apresentou associação com a sequência de tratamento ($p=0,03$) e com a invasão perineural ($p=0,03$). Quanto maior a complexidade do tratamento realizado (ex: cirurgia, radio e quimioterapia), mais alto o escore do modelo BD, ratificando que o modelo BD tem um alto poder de identificar casos mais agressivos e/ou com estadiamentos mais avançados. A invasão perineural é um fator significativo e preditor independente para recorrência local e metástases à distância, além de estar associada a menor sobrevida global em pacientes com CEC oral (BRANDWEIN-GENLER et al., 2005; GARZINO-DEMO et al., 2006; FAGAN et al., 2008; ARORA et al., 2017). Nossos resultados indicam que pacientes com escore alto do modelo BD terão maior probabilidade de invasão perineural, favorecendo a associação entre modelo BD e sobrevida.

Considerando os resultados do nosso trabalho que contrastou o modelo BD com outros sistemas de classificação histopatológicas, foi demonstrado que o brotamento, em análise univariada, correlacionou significativamente com risco de morte e com o risco de recorrência ($p=0,03$ e $p=0,01$, respectivamente) e o modelo BD correlacionou significativamente com risco de morte ($p=0,05$). Curiosamente, quando o modelo BD foi associado com o TSR (TSR e MBD), foi observada uma significativa correlação com risco de morte e com o risco de recorrência ($p=0,05$ e $p=0,01$, respectivamente), e ainda tais resultados resistiram para sobrevida

específica ($p=0,03$) e livre de doença ($p=0,03$) na análise multivariada de Cox após ajuste para outros fatores prognósticos. Tanto TSR quanto o modelo BD são métodos simples de avaliar, utilizando apenas lâminas coradas em HE, e juntos têm demonstrado um valor importante para prever o prognóstico de CEC oral (ALMANGUSH et al., 2018). Dessa forma, ratificou-se a influência do modelo BD em prever prognóstico para pacientes com CEC de língua e assoalho bucal.

O modelo HR revelou uma associação significativa ($p=0,05$) com sobrevida específica de doença, mas não persistiu ao ajuste da análise multivariada de Cox. Este sistema de gradação histopatológica foi proposto por Brandwein-Gensler et al. (2005), como um sistema para determinar a necessidade de terapia pós-operatória e o prognóstico de pacientes com CEC oral (BRANDWEIN-GENSER et al., 2005). Embora alguns estudos tenham confirmado seu valor preditivo (BRANDWEIN-GENSLER et al., 2010; VERED et al., 2010; LI et al., 2013; LINDENBLATT et al., 2012; SINHA et al., 2013), outros mostraram uma falta de correlação do modelo HR com características clínicas patológicas para o CEC oral (ALMANGUSH et al., 2014; RODRIGUES et al., 2014). Rodrigues et al. (2014), mostraram que este modelo histológico não foi um bom indicador de prognóstico, enfatizando que os três parâmetros utilizados apresentam falta de consistência para prever prognóstico em CEC oral, principalmente a resposta linfocitária, considerando que a resposta linfocitária é considerada uma tentativa do organismo de eliminar células tumorais (efeito antitumoral) (HANAHAN; WEINBERG, 2011; SÁNCHEZ-ROMERO et al., 2018). Entretanto, evidências mostram que células imunes e inflamatórias podem ter efeitos protumorais (SALO et al., 2014; IMURA et al., 2005; ESSA et al., 2014; CHAUDHARY et al., 2014; MURPHY et al., 2014; SANTOS et al., 2017). Dessa forma, parece que a composição do infiltrado inflamatório no microambiente tumoral é mais importante do que a abundância avaliada no modelo HR (SAWAZAKI-CALONE et al., 2015).

Embora neste estudo observou-se uma correlação significativa entre a classificação da OMS e sobrevida específica de doença na análise univariada, destacamos que o grupo analisado (93,5% das amostras foram classificadas como bem ou moderadamente diferenciada e apenas 6,5% como pobremente diferenciado) não foi homogêneo para interpretações estatísticas em análise multivariada. Sugerimos que muito provavelmente os valores significantes podem estar correlacionados a esta diferença na amostra. Além disso, de acordo com a

literatura, a aplicação da classificação da OMS para predizer o prognóstico para pacientes com CEC oral tem sido alvo de muitas críticas ao longo dos anos (ANNEROTH; BATSAKIS; LUNA, 1987; BRYNE et al., 1989; WEIJERS et al., 2009; SAWAZAKI-CALONE et al., 2015; ALMANGUSH et al., 2018). Especificamente, as críticas sobressaem na subjetividade da análise das amostras, na ausência de avaliação de importantes características relacionadas à tumorigênese e na fraca correlação com o resultado e a resposta ao tratamento desses pacientes (ALMANGUSH et al., 2018). Acompanhando os resultados da literatura, sugerimos que a classificação da OMS não é um sistema de gradação histopatológico apropriado para pacientes com CEC oral, por fraca associação com o prognóstico do paciente e não auxilia na definição de tratamento mais adequado.

O intenso esforço pela busca de marcadores que consigam servir como alvos terapêuticos para novas drogas, além de contribuir na escolha da melhor opção de tratamento ou na predição do prognóstico são essenciais para modificar este cenário associado ao CEC oral em relação ao prognóstico ruim. Alguns estudos demonstraram que células estromais no microambiente tumoral, como por exemplo linfócitos, macrófagos, fibroblastos ativados e células endoteliais vêm sendo demonstrado, um grande poder de influência sobre a agressividade das células cancerígenas, devido a indução de invasão e metástase (HANAHAN; COUSSENS, 2012; SÁNCHEZ-ROMERO et al., 2018; SANTOS et al., 2017; SHIGA et al., 2015; ALBINI; SPORN, 2007; PRALL, 2007; LIANG, 2011; WANG et al., 2011; LIANG, 2013, CURRY et al., 2014). Neste estudo, observou-se que a expressão de STC2 e PINP apresentaram associação com a taxa de sobrevida dos pacientes com CEC de língua e assoalho bucal. No entanto, nenhuma correlação foi observada para fascina, plectina e EEF1D.

A expressão de STC2 em células tumorais, revelou significância para sobrevida específica de doença ($p=0,05$) e para sobrevida livre de doença ($p=0,02$) e tais resultados resistiram à análise multivariada de Cox ($p=0,04$) para sobrevida livre de doença após ajuste para outros fatores prognósticos. Ainda, avaliando STC2 com parâmetros clínico-patológicos, observou-se significância com invasão perineural ($p=0,02$), resposta linfocitária ($p=0,03$), profundidade de invasão ($p=0,03$) e padrão de invasão ($p=0,03$). Alguns estudos demonstraram que a expressão de STC2 foi correlacionada com um pior prognóstico para neoplasias malignas de rim, próstata, colo-retal, mama, estômago e ovário (BOURAS et al., 2002; CHANG; JELLINEK;

REDDEL, 2003; LAW et al., 2008; LAW; WONG, 2010; TAMURA et al., 2009; HOU et al., 2015). Arigami et al. (2013), demonstrando que uma alta expressão de STC2 foi significativamente correlacionada com idade, profundidade de invasão tumoral, metástase linfonodal, estágio e invasão vascular em câncer de estômago. A taxa de sobrevida de 5 anos foi significativamente menor em pacientes com alta expressão de STC2 em comparação com pacientes com baixa expressão de STC2. Atualmente o primeiro trabalho que avaliou STC2 em CEC oral foi o de Bagordakis et al. (2016), que identificou que a superexpressão de STC2 também pode estar associada a maior capacidade das células tumorais se tornarem mais invasivas e pró-metastáticas, através da análise do secretoma de fibroblastos associados ao CEC oral (CAFs). Nosso trabalho representa o primeiro na literatura a identificar um significativo valor prognóstico de STC2 em CEC de língua e assoalho bucal. Dessa forma, o STC2 é uma proteína superexpressa no secretoma de CAFs em CEC oral, pode permitir que as células de CEC de língua e assoalho bucal se tornem mais invasivas e pró-metastática.

Adicionalmente, identificamos que a expressão de PINP no estroma apresentou significância ($p=0,04$) para sobrevida livre de doença. O teste de qui-quadrado nos mostra que existe correlação entre os parâmetros: estadiamento clínico ($p=0,01$), comprometimento linfonodal ($p=0,03$) e profundidade de invasão ($p=0,0002$) revelando que a diferença na quantidade de células estromais interfere no resultado. A positividade nas células estromais e tumorais e a intensidade foi menor em células tumorais (PINP tumor) em comparação às células estromais (PINP estroma). Resultados descritos previamente revelaram que os CAFs expressam uma diversidade de proteínas reguladas que controlam os processos metabólicos do colágeno (BAGORDAKIS et al., 2016).

O colágeno tipo I e seus peptídeos bioativos derivados da maturação do pro-colágeno, do secretoma CAF está correlacionado a um estroma invasivo em células tumorais de ovário, cólon e mama (KENNY et al., 2007; HAN et al., 2015; TANG et al., 2015). O colágeno tipo I está correlacionado com diversos processos biológicos superexpressos em CAF e as marcações imuno-histoquímicas de colágeno tipo I (PINP) está correlacionada com uma sobrevida específica e livre de doença baixa em pacientes com CEC oral. Importante mencionar que Bagordakis et al. (2016), relataram a existência de uma grande correlação entre a expressão do PINP e a densidade dos CAFs observada no fronte tumoral, sugerindo que os CAFs são as

principais células produtoras de colágeno do tipo I. Observamos nossos resultados, que pacientes com $\geq 50\%$ de células no estroma tem uma maior probabilidade de apresentar estadiamento clínico avançado, o que difere de pacientes com 1 a 50% de células no estroma apresentam uma maior probabilidade de apresentar estadiamento clínico iniciais. Quando analisamos o segundo parâmetro comprometimento linfonodal temos que pessoas com $\geq 50\%$ de células no estroma apresentam maior probabilidade da presença de comprometimento linfonodal do que as pessoas com 1 a 50% de célula no estroma. Ainda Bagordakis et al. (2016), confirmaram que a abundante presença de CAFs no estroma tumoral, entre as ilhas de células tumorais ou no fronte invasivo, é significativamente correlacionada com o pior prognóstico para pacientes com CEC oral. Kellermann et al. (2007), demonstraram que a presença de CAFs em CEC oral em região do fronte invasivo, revela um comportamento mais agressivo ao tumor, ocasionando em menor sobrevida global destes pacientes. Vários trabalhos apresentados na literatura, confirmam o nosso resultado, mostrando que a alta densidade de CAFs é um fator preditivo de prognóstico desfavorável, e que os CAFs no estroma de CEC orais, podem favorecer na proliferação e invasão tumoral, ocasionando um tumor mais agressivo, constatando que a progressão do câncer é o resultado de um complexo diálogo entre as células tumorais e o estroma (KAWASHIRI et al., 2009; VERED et al., 2010; BELLO et al., 2011; MARSH et al., 2011; SOBRAL et al., 2011; HINSLEY et al., 2012).

Em suma, nossos achados indicam que os sistemas de gradação histopatológica TSR e MBD, revelaram um forte modelo prognóstico para pacientes com CEC de língua e assoalho bucal e também identificamos novos potenciais marcadores prognósticos como PINP e STC2 também significativamente associados ao prognóstico desses pacientes.

7 CONCLUSÃO

A associação dos sistemas de gradação histopatológico TSR e MBD apresentou a melhor correlação com a evolução da doença e sobrevida específica e livre de doença, portanto, a melhor performance como ferramenta prognóstica pós-operatória de CECs de língua e assoalho bucal.

TSR e MBD são métodos simples de avaliar, utilizando as lâminas de rotina em coloração de HE na peça cirúrgica.

CECs de língua e assoalho bucal agressivos apresentam alta expressão de STC2 e PINP (estroma).

A expressão de STC2 associou-se a sobrevida específica e livre de doença em pacientes com CEC de língua e assoalho bucal.

A expressão de PINP no estroma foi associada com uma pobre sobrevida livre de doença em pacientes com CEC de língua e assoalho bucal.

A expressão de STC2 e PINP revelaram ser úteis para predizer o prognóstico para pacientes com CEC de língua e assoalho bucal.

REFERÊNCIAS

ADAMS, J. C.; SCHWARTZ, M. A. Stimulation of fascin spikes by thrombospondin-1 is mediated by the GTPases Rac and Cdc42. **Journal of Cell Biology**, v. 150, n. 4, p. 807–822, 2000.

ADAMS, J. C. Roles of fascin in cell adhesion and motility. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 16, n. 5, p. 590–596, 2004.

ADAMS, J. C. Fascin-1 as a biomarker and prospective therapeutic target in colorectal cancer. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 15, n. 1, p. 41–48, 2015.

AGGARWAL, S. et al. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in patients with oral squamous cell carcinoma and its clinical significance. **Clinica Chimica Acta**, v. 436, p. 35–40, 2014.

ALAEDDINI, M.; ETEMAD-MOGHADAM, S. Correlation between invasion mode and the histologic risk assessment model in oral squamous cell carcinoma. **Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 20, n. 4, p. 353–358, 9 Dec. 2016.

AL-ALWAN, M. et al. Fascin is a key regulator of breast cancer invasion that acts via the modification of metastasis-associated molecules. **PLoS ONE**, v. 6, n. 11, 2011.

ALAM, H. et al. Fascin overexpression promotes neoplastic progression in oral squamous cell carcinoma. **BMC Cancer**, v. 12, n. 1, p. 32, 2012.

ALBINI, A.; SPORN, M.B. The tumour microenvironment as a target for chemoprevention. **Nat. Ver. Cancer**, v. 7, p. 139-147, 2007.

ALI, Johar et al. Genetic etiology of oral cancer. **Oral oncology**, v. 70, p. 23-28, 2017.

ALI, A. M. S. et al. Correlation of human papillomavirus infection and clinical parameters with five-year survival in oral squamous cell carcinoma. **The Journal of Laryngology e Otology**, v. 1, p. 8-15, 2017.

ALMANGUSH, A. et al. Depth of invasion, tumor budding, and worst pattern of invasion: Prognostic indicators in early-stage oral tongue cancer. **Head Neck**, v. 36, n. 6, p. 811-818, 2014.

ALMANGUSH, A. et al. A simple novel prognostic model for early stage oral tongue cancer. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 44, n. 2, p. 143-150, Feb. 2015.

ALMANGUSH, A. et al. Evaluation of the budding and depth of invasion (BD) model in oral tongue cancer biopsies. **Virchows Archiv.**, p. 1–6, 2017.

ALMANGUSH, A. et al. Prognostic impact of tumour-stroma ratio in early-stage oral tongue cancers. **Histopathology**, p. 0–3, 2018.

ANATÔMICAS, Regiões. Carcinoma epidermóide da cabeça e pescoço. **Revista Brasileira de Cancerologia**, n. 47, v.4, p. 361-376, 2001.

ANNERTH, G.; BATSAKIS, J.; LUNA, M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. **Scand. Journal Dent. Res.**, v. 95, n. 3, p. 229-249, 1987.

ARIGAMI, Takaaki et al. Clinical significance of stanniocalcin 2 expression as a predictor of tumor progression in gastric cancer. **Oncology reports**, v. 30, n. 6, p. 2838-2844, 2013.

ARORA, A. et al. Development of a New Outcome Prediction Model in Early-stage Squamous Cell Carcinoma of the Oral Cavity Based on Histopathologic. **Am. Journal Surgical Pathol.**, v. 41, n. 7, p. 950–960, 2017.

BAGORDAKIS, E. et al. Secretome profiling of oral squamous cell carcinoma-associated fibroblasts reveals organization and disassembly of extracellular matrix and collagen metabolic process signatures. **Tumour Biol.**, v. 13, Jan. 2016.

BARNES, L. Organization WH and Cancer IAfRo. **Pathology and genetics of head and neck tumours**, World Health Organization. 2005.

BAUSCH, D. et al. Plectin-1 is a Biomarker of Malignant Pancreatic Intraductal Papillary Mucinous Neoplasms. **Journal of Gastrointestinal Surgery**, v. 13, n. 11, p. 1948–1954, 17 Nov. 2009.

BAUSCH, D. et al. Plectin-1 as a Novel Biomarker for Pancreatic Cancer. **Clinical Cancer Research**, v. 17, n. 2, p. 302–309, 15 Jan. 2011.

BELLO, I. O.; SOINI, Y.; SALO, T. Prognostic evaluation of oral tongue cancer: means, markers and perspectives (II). **Oral Oncol.**, v. 46, p. 636-643, 2010.

BELLO, I. O. et al. Cancer-associated fibroblasts, a parameter of the tumor microenvironment, overcomes carcinoma-associated parameters in the prognosis of patients with mobile tongue cancer. **Oral Oncol.**, v. 47, n. 1, p. 33-8, Jan. 2011.

BI, J. B. et al. The role of fascin in migration and invasion of urothelial carcinoma of the bladder. **Urologia Internationalis**, v. 91, n. 2, p. 227–235, 2013.

BRANDWEIN-GENSLER, M. et al. Oral squamous cell carcinoma: histologic risk assessment, but not margin status, is strongly predictive of local disease-free and overall survival. **Am. Journal Surgical Pathol.**, v. 29, n. 2, p. 167–178, Feb. 2005.

BRANDWEIN-GENSLER, M. et al. Validation of the histologic risk model in a new cohort of patients with head and neck squamous cell carcinoma. **Am. Journal Surgical Pathol.**, v. 34, p. 676-688, 2010.

BRANDT, J. et al. Thermal instability of the trimeric structure of the N-terminal propeptide of human procollagen type I in relation to assay technology. **Clin. Chem.**, v. 45, p. 47–53, 1999.

BRENNAN, P. A. et al. An update on the latest evidence for managing the clinically negative neck (cN0) in oral squamous cell carcinoma. **Oral Diseases**, v. 23, n. 3, p. 287–291, 2017.

BRYNE, M. et al. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas. **Journal Oral Pathol. Med.**, v. 18, p.432-437, 1989.

BRYNE, M. et al. MG grading system of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. **Journal Pathol.**, v. 166, p. 375-381, 1992.

BRYNE, M.; JENSSEN, N.; BOYSEN, M. Histologic grading in the deep invasive front of T1 and T2 glottic squamous cell carcinomas has high prognostic value. **Virchows Arch.**, v. 427, n. 3, p. 277-281, 1995.

BOURAS, T. et al. Stanniocalcin 2 is an estrogen-responsive gene coexpressed with the estrogen receptor in human breast cancer. **Cancer Res.**, v. 62, n. 5, p. 1289-1295, 2002.

CANCER GENOME ATLAS NETWORK. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. **Nature**, v. 29, n. 517, (7536) p. 576-582, Jan. 2015.

CASTAÑÓN, M. J. et al. Plectin-intermediate filament partnership in skin, skeletal muscle, and peripheral nerve. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 140, n. 1, p. 33–53, 2013.

CAVALCANTE, W. S. **Invasão neoplásica perineural e vascular de carcinomas de células escamosas orais: estudo clinicopatológico e imunoistoquímico.** 2013. 107f. Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica) – Universidade Federal do Espírito Santo, Vitória, 2015.

CHAI, R. C. et al. Current trends in the etiology and diagnosis of HPV-related head and neck cancers. **Cancer Med.**, v. 4, n. 4, p. 596-607, Apr. 2015.

CHANG, A. C.; JELLINEK, D. A.; REDDEL, R. R. Mammalian stanniocalcins and cancer. **Endocr. Relat. Cancer.**, v. 10, n. 3, p. 359-373, 2003.

CHAPMAN, S. et al. Cigarette smoke extract induces oral squamous cell carcinoma cell invasion in a receptor for advanced glycation end-products-dependent manner. **European Journal of Oral Sciences**, v. 126, n. 1, p. 33–40, 2018.

CHAROENRAT, P.; ARJHANSIRI, K.; KITSUKJIT, W. Anatomic variations of the oral cancer in 200 patients done by angiography. **Journal Med. Assoc. Thai.**, v. 3, p. 161-168, Sept. 2006.

- CHAUDHARY, B. et al. Phenotypic alterations, clinical impact and therapeutic potential of regulatory T cells in cancer. **Expert. Opin. Biol. Ther.**, v 14, p. 931-945, 2014.
- CHAUDHARI, P. R. et al. Hemidesmosomal linker proteins regulate cell motility, invasion and tumorigenicity in oral squamous cell carcinoma derived cells. **Experimental Cell Research**, v. 360, n. 2, p. 125–137, 2017.
- CHEN, L. et al. Migrastatin analogues target fascin to block tumour metastasis. **Nature**, v. 464, n. 7291, p. 1062–1066, 15 Apr. 2010.
- CHEN, S. F. et al. Expression of fascin in oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas has prognostic significance - A tissue microarray study of 129 cases. **Histopathology**, v. 51, n. 2, p. 173–183, 2007.
- CHEN, S. et al. Sam68 reduces cisplatin-induced apoptosis in tongue carcinoma. **Journal of Experimental and Clinical Cancer Research**, v. 35, n. 1, p. 1–9, 2016.
- CHEN, X. et al. Plectin-1 Targeted Dual-modality Nanoparticles for Pancreatic Cancer Imaging. **EBioMedicine**, v. 30, p. 129–137, 2018.
- CHENG, C. C. et al. Transient knockdown-mediated deficiency in plectin alters hepatocellular motility in association with activated FAK and Rac1-GTPase. **Cancer Cell International**, v. 15, n. 1, p. 1–7, 2015.
- CHENG, C. C. et al. Plectin deficiency in liver cancer cells promotes cell migration and sensitivity to sorafenib treatment. **Cell Adhesion & Migration**, v. 12, n. 1, p. 19–27, 2018.
- CHI, A. C.; DAY, T. A.; NEVILLE, B. W. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma--an update. **CA. Cancer Journal Clin.**, v. 65, n. 5, p. 401-421, Sept-Oct. 2015.
- COCQUYT, E. et al. Gain and loss of elongation factor genes in green algae. **BMC Evol. Biol.**, v.12; p. 9-39, 2009.
- COTRAN, R. S.; KUMAR, V.; ROBBINS, S. L. **Patologia: bases patológicas das doenças**. Rio de Janeiro, 2005.
- CURRY, J. M. et al. Tumor Microenvironment in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. **Semin. Oncol.**, v. 41, n. 2, p. 217-234, Apr. 2014.
- DALIANIS T. Human papillomavirus and orop-haryngeal cancer, the epidemics, and significance of additional clinical biomarkers for prediction of response to therapy (Review). **Int. Journal Oncol.**, v. 44, p. 1799-1805, 2014.
- DE AGUIAR, A. F. C.; KOWALSKI, L. P.; DE ALMEIDA, O. P. Clinicopathological and immunohistochemical evaluation of oral squamous cell carcinoma in patients with early local recurrence. **Oral oncology**, v. 43, n. 6, p. 593–601, July 2007.

DE BORTOLI, M. et al. Medulloblastoma outcome is adversely associated with overexpression of EEF1D, RPL30, and RPS20 on the long arm of chromosome 8. **BMC Cancer**, n. 6, p. 223, 2006.

DE MORAIS, E. F. et al. Prognostic Factors of Oral Squamous Cell Carcinoma in Young Patients: A Systematic Review. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 75, n. 7, p. 1555–1566, 2017.

DE SANTIS, S. et al. Oropharyngeal squamous cell carcinoma and HPV. Systematic review on overall management. **Journal of Stomatology, Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 118, n. 2, p. 103–108, 2017.

DE WEVER, O. et al. Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. **Int. Journal Cancer**, v. 123, n. 10, p. 2229-2238, 2008.

DOURADO, M. R. et al. Clinicopathologic significance of ROCK2 expression in oral squamous cell carcinomas. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 47, n. 2, p. 121–127, 2018.

DUNN, M.; MORGAN, M. B.; BEER, T. W. Perineural invasion: identification, significance, and a standardized definition. **Dermatol. Surg.**, v. 35, n. 2, p. 214-221, 2009.

ELMUSRATI, A. A. et al. Cancer-associated fibroblasts promote bone invasion in oral squamous cell carcinoma. **British journal of cancer**, v. 117, n. 6, p. 867, 2017.

ESSA, A. A. M. et al. Keratin pearl degradation in oral squamous cell carcinoma: Reciprocal roles of neutrophils and macrophages. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 43, n. 10, p. 778–784, 2014.

FAGAN, B. J. et al. An outline of the history of head and neck oncology. **Oral Oncology**, v. 44, n. 1, p. 2–9, 2008.

FLORES, I. L. et al. EEF1D modulates proliferation and epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma. **Clinical Science**, v. 130, n. 10, p. 785–799, 2016

FRANKE, W. W. et al. Striatins as plaque molecules of zonulae adhaerentes in simple epithelia, of tessellate junctions in stratified epithelia, of cardiac composite junctions and of various size classes of lateral adherens junctions in cultures of epithelia- and carcinoma-der. **Cell and Tissue Research**, v. 359, n. 3, p. 779–797, 2015.

GANDINI, S. et al. Tobacco smoking and cancer: a meta-analysis. **Int. Journal Cancer**, v. 122, p. 155-64, 2008.

GANLY, I. et al. Long-term regional control and survival in patients with "low-risk," early stage oral tongue cancer managed by partial glossectomy and neck dissection without postoperative radiation: the importance of tumor thickness. **Cancer**, v. 119, n. 6, p. 1168-1176, 2013.

GAO, W. et al. Fascin-1, Ezrin and Paxillin Contribute to the Malignant Progression and Are Predictors of Clinical Prognosis in Laryngeal Squamous Cell Carcinoma. **PLoS ONE**, v. 7, n. 11, 2012.

GARZINO-DEMO, P. et al. Clinicopathological parameters and outcome of 245 patients operated for oral squamous cell carcinoma. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 34, n. 6, p. 344–350, 2006.

GHEBEH, H. et al. Fascin is involved in the chemotherapeutic resistance of breast cancer cells predominantly via the PI3K/Akt pathway. **British Journal of Cancer**, v. 111, n. 8, p. 1552–1561, 2014.

GROTHEY, Axel et al. C-erbB-2/HER-2 upregulates fascin, an actin-bundling protein associated with cell motility, in human breast cancer cell lines. **Oncogene**, v. 19, n. 42, p. 4864, 2000.

HAN, Y. et al. Molecular mechanism underlying the tumor-promoting functions of carcinoma-associated fibroblasts. **Tumour Biol.**, v. 36, p. 1385-1394, 2015.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell.**, v.144, p. 646-74, 2011.

HANAHAN, D.; COUSSENS, L. M. Accessories to the crime: functions of cells recruited to the tumor microenvironment. **Cancer Cell**, v. 21, p. 309-322, 2012.

HARRYMAN, W. L. et al. Laminin-binding integrin gene copy number alterations in distinct epithelial-type cancers. **American Journal of Translational Research**, v. 8, n. 2, p. 940–954, 2016.

HASHIMOTO, Y. et al. The prognostic relevance of fascin expression in human gastric carcinoma. **Oncology**, v. 67, n. 3–4, p. 262–270, 2004.

HASHIMOTO, Y. et al. Prognostic significance of fascin expression in advanced colorectal cancer: An immunohistochemical study of colorectal adenomas and adenocarcinomas. **BMC Cancer**, v. 6, p. 1–11, 2006.

HASHIMOTO, Y.; PARSONS, M.; ADAMS, J. C. Dual actin-bundling and protein kinase C-binding activities of fascin regulate carcinoma cell migration downstream of Rac and contribute to metastasis. **Molecular biology of the cell**, v. 18, n. 11, p. 4591–4602, Nov. 2007.

HINSLEY, E. E. et al. Endothelin-1 stimulates oral fibroblasts to promote oral cancer invasion. **Life Sci.**, v. 15, n. 91, p. 13-14, 557-561, 2012.

HOU, Jing et al. Stanniocalcin 2 suppresses breast cancer cell migration and invasion via the PKC/claudin-1-mediated signaling. **PloS one**, v. 10, n. 4, p. e0122179, Apr. 2015.

HONG, Kyoung-Ok et al. Tumor budding is associated with poor prognosis of oral

squamous cell carcinoma and histologically represents an epithelial–mesenchymal transition process. **Human Pathology**, 2018.

HU, L. et al. Germline copy number loss of UGT2B28 and gain of PLEC contribute to increased human esophageal squamous cell carcinoma risk in Southwest China. **American Journal of Cancer Research**, v. 5, n. 10, p. 3056–3071, 2015.

HUANG, T. Y. et al. Predictors of locoregional recurrence in early stage oral cavity cancer with free surgical margins. **Oral Oncology**, v. 46, n. 1, p. 49–55, 2010.

HYNES, S. O. et al. Back to the future: routine morphological assessment of the tumour microenvironment is prognostic in stage II/III colon cancer in a large population-based study. **Histopathology**, v. 71, n. 1, p. 12–26, 2017.

IMURA, J. et al. Endometrial adenosquamous carcinoma with osteoclast-like giant cells: Immunohistochemistry and histogenesis. **Apmis.**, v. 113, n. 2, p. 140–144, 2005.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER (INCA). Saúde MD. Estimativa 2018: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: **Instituto Nacional de Câncer**, v. 41, 2018.

JANSEN, S. et al. Mechanism of actin filament bundling by fascin. **Journal of Biological Chemistry**, v. 286, n. 34, p. 30087–30096, 2011.

JENSEN, C. H. et al. Quantification of the N-terminal propeptide of human procollagen type I (PINP): comparison of ELISA and RIA with respect to different molecular forms. **Clin. Chim. Acta.**, v. 269, p. 31–41, 1998.

JERJES, W. et al. Clinicopathological parameters, recurrence, locoregional and distant metastasis in 115 T1-T2 oral squamous cell carcinoma patients. **Head and Neck Oncology**, v. 20, n. 2, p. 9, Apr. 2010.

JOHNSON, N. et al. Squamous cell carcinoma. In: BARNES, L.; EVENSON, J. W.; REICHAERT, P.; SIDRANSKY. **Pathology and Genetics: head and neck tumors**. Lyon: IARC Press, 2005.

JOSEPH, P. et al. Oncogenic potential of mouse translation elongation factor-1 delta, a novel cadmium-responsive proto-oncogene. **Journal Biological Chem.**, n. 277, p. 6131–6136, 2002.

JUNIOR, H. M. et al. Laminin-5 gamma 2 chain expression is associated with intensity of tumor budding and density of stromal myofibroblasts in oral squamous cell carcinoma. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 43, n. 3, p. 199–204, 2014.

JUNIOR, H. M. et al. Cell proliferation is associated with intensity of tumor budding in oral squamous cell carcinoma. **Journal of neurochemistry**, v. 140, n. 6, p. 874–888, 24 Mar. 2017.

KAITSUKA, T.; MATSUSHITA, M. Regulation of translation factor EEF1D gene function by alternative splicing. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 16, n. 2, p. 3970–3979, 2015.

KANG, H.; KIESS, A.; CHUNG, C. H. Emerging biomarkers in head and neck cancer in the era of genomics. **Nat. Rev. Clin. Oncol.**, v. 12, n. 1, p. 11-26, Jan. 2015.

KATADA, K. et al. Plectin promotes migration and invasion of cancer cells and is a novel prognostic marker for head and neck squamous cell carcinoma. **Journal of Proteomics**, v. 75, n. 6, p. 1803–1815, 2012.

KAWASHIRI, S. et al. Significance of stromal desmoplasia and myofibroblast appearance at the invasive front in squamous cell carcinoma of the oral cavity. **Head Neck**, v. 31, n. 10, p. 1346-53, Oct. 2009.

KELLERMANN, M. G. et al. Myofibroblasts in the stroma of oral squamous cell carcinoma are associated with poor prognosis. **Histopathology**, v. 51, n. 6, p. 849-853, Dec. 2007.

KENNY, H. A. et al. Use of a novel 3D culture model to elucidate the role of mesothelial cells, fibroblasts and extra-cellular matrices on adhesion and invasion of ovarian cancer cells to the omentum. **Int. Journal Cancer**, v. 121, p. 1463-1472, 2007.

KONKALMATT, P. R. et al. Plectin-1 targeted AAV vector for the molecular imaging of pancreatic cancer. **Frontiers in oncology**, v. 3, p. 84, 2013.

KUMAR, K. et al. Synchronous oral squamous cell carcinomas with unusual histopathological feature. **Journal Oral Maxillofac. Pathol.**, v. 16, n. 3, p. 420-424, Sept. 2012.

KURIAKOSE, M. A. **Contemporary oral oncology biology, epidemiology, etiology and prevention**. Department of Head and Neck, Plastic and Reconstructive Surgery Roswell Park Cancer Institute Buffalo USA. [s.l]: Springer, 2017.

KUREISHY, N. et al. Fascins, and their roles in cell structure and function. **BioEssays**, v. 24, n. 4, p. 350–361, 2002.

LAW, A. Y. et al. Epigenetic and HIF-1 regulation of stanniocalcin-2 expression in human cancer cells. **Exp. Cell Res.**, v. 314, n. 8, p. 1823-1830, May 2008.

LAW, A. Y.; WONG, C. K. Stanniocalcin-2 is a HIF-1 target gene that promotes cell proliferation in hypoxia. **Exp. Cell Res.**, v. 316, n. 3, p. 466-476, Feb. 2010.

LEÃO, P. L. R. et al. Reproducibility, repeatability, and level of difficulty of two methods for tumor budding evaluation in oral squamous cell carcinoma. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 46, n. 10, p. 949–955, 2017.

LECLERCQ, T. M.; MORETTI, P. A.; PITSON, S. M. Guanine nucleotides regulate sphingosine kinase 1 activation by eukaryotic elongation factor 1A and provide a mechanism for eEF1A-associated oncogenesis. **Oncogene**, n. 30, p. 372-378, 2011.

LEE, K. Y. et al. An early evaluation of malignant tendency with plectin expression in human colorectal adenoma and adenocarcinoma. **Journal of medicine**, v. 35, n. 1-6, p. 141-149, 2004.

LEE, Y. C. et al. Active and involuntary tobacco smoking and upper aerodigestive tract cancer risks in a multicenter case-control study. **Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.**, v. 18, n. 12, p. 3353-3361, Dec. 2009.

LEE, T. K. et al. Fascin over-expression is associated with aggressiveness of oral squamous cell carcinoma. **Cancer Letters**, v. 254, n. 2, p. 308-315, 2007.

LEE, J.; TANEJA, V.; VASSALLO, R. Cigarette smoking and inflammation: cellular and molecular mechanisms. **Journal Dent. Res.**, v. 91, p. 142-149, 2012.

LEI, Y. X.; CHEN, J. K.; WU, Z. L. Blocking the translation elongation factor-1 delta with its antisense mRNA results in a significant reversal of its oncogenic potential. **Teratog. Carcinog. Mutagen.**, n. 22, p. 377-383, 2002.

LI, H.; FAN, X.; HOUGHTON, J. Tumor microenvironment: The role of the tumor stroma in cancer. **Journal Cell. Biochem.**, v. 101, p. 805-815, 2007.

LI, Y. et al. Validation of the risk model: high-risk classification and tumor pattern of invasion predict outcome for patients with low-stage oral cavity squamous cell carcinoma. **Head Neck Pathol.**, v. 7, p. 211-223, 2013.

LI, Y. et al. Alcohol drinking and upper aerodigestive tract cancer mortality: a systematic review and meta-analysis. **Oral Oncol.**, v. 50, n. 4, p. 269-275, Apr. 2014.

LIANG, X. EMT: new signals from the invasive front. **Oral Oncol.**, v. 47, n. 8, p. 686-687, Aug. 2011.

LIANG, F. et al. The prognostic value of tumor budding in invasive breast cancer. **Pathology Res. Pract.**, v. 5, n. 209, p. 269-275, 2013.

LIN, M. J. et al. Prophylactic neck dissection in early oral tongue squamous cell carcinoma 2.1 to 4.0 mm depth. **Otolaryngol Head Neck Surg.**, v. 144, n. 4, p. 542-548, Apr. 2011.

LIN, S. Y. et al. P53 regulates the migration of mesenchymal stromal cells in response to the tumor micro-environment through both CXCL12 -dependent and -independent mechanisms. **Int. Journal Oncol.**, v. 43, p. 1817-1823, 2013.

LINDENBLATT, R. et al. Oral squamous cell carcinoma grading systems - Analysis of the best survival predictor. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 41, n. 1, p. 34-39, 2012.

LINGEN, M. W. et al. Critical evaluation of diagnostic aids for the detection of oral cancer. **Oral Oncol.**, v. 44, n. 1, p. 10-22, Jan. 2008.

LIU, H. et al. Lentivirus-mediated silencing of SCIN inhibits proliferation of human lung carcinoma cells. **Gene**, v. 554, n. 1, p. 32–39, 2014.

LUGLI, A.; KARAMITOPOULOU, E.; ZLOBEC, I. Tumour budding: a promising parameter in colorectal cancer. **Br. Journal Cancer**, v. 106, n. 11, p. 1713-1717, May 2012.

MA, Y.; MACHESKY, L. M. Fascin1 in carcinomas: Its regulation and prognostic value. **International Journal of Cancer**, v. 137, n. 11, p. 2534–2544, 2014.

MAJCHRZAK, E. et al. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma in young adults: a review of the Literature. **Radiol. Oncol.**, v. 48, n. 1, p. 1-10, Jan. 2014.

MARIN, L. et al. Comparison of total and intact aminoterminal propeptide of type I procollagen assays in patients with breast cancer with or without bone metastases. **Annals of clinical biochemistry**, v. 48, n. 5, p. 447-451, 2011.

MARKOPOULOS, A. K. Current aspects on oral squamous cell carcinoma. **Open Dent Journal**, v. 6, p. 126-130, 2012

MARSH, D. et al. Stromal features are predictive of disease mortality in oral cancer patients. **Journal Pathol.**, v. 223, n. 4, p. 470-481, Mar. 2011.

MATHIAS, R. A.; GOPAL, S. K.; SIMPSON, R. J. Contribution of cells undergoing epithelial-mesenchymal transition to the tumour microenvironment. **Journal of Proteomics**, v. 78, p. 545–557, 2013.

MCCLOSKEY, E. et al. Effect of oral clodronate on bone mass, bone turnover and subsequent metastases in women with primary breastcancer. **Eur. Journal Cancer**, v. 46, n. 3, p. 558-565, Feb. 2010.

MURPHY, K. et al. **Imunobiologia de Janeway**. São Paulo: Artmed; 2014.

NA, S. S. et al. Stanniocalcin-2 (STC2): A potential lung cancer biomarker promotes lung cancer metastasis and progression. **Biochim. Biophys Acta.**, v. 1854, n. 6, p. 668-676, June 2015.

NEVILLE, B. W. et al. **Patologia oral & maxilofacial**, 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2016.

NERUDA, Pablo. **Viajes**. Nascimento, 1955.

NIMNI, M. E. Collagen: structure, function and metabolism in normal and fibrotic tissues. **Semin. Arthritis Rheum.**, v. 13, p. 1–86, 1983.

OGAWA, K.; UTSUNOMIYA, T.; MIMORI, K. Clinical significance of elongation factor-1 delta mRNA expression in oesophageal carcinoma. **Br. Journal Cancer**, n. 91, p. 282-286, 2004.

ORUM, O. et al. Procollagen type I N-terminal propeptide (PINP) as an indicator of type I collagen metabolism: ELISA development, reference interval, and hypovitaminosis D induced hyperparathyroidism. **Bone**, v. 19, n. 2, p. 157-163, Aug. 1996.

OSMANAGIC-MYERS, S. et al. Plectin-controlled keratin cytoarchitecture affects MAP kinases involved in cellular stress response and migration. **Journal of Cell Biology**, v. 174, n. 4, p. 557–568, 2006.

PAWAR, H. et al. Quantitative tissue proteomics of esophageal squamous cell carcinoma for novel biomarker discovery. **Cancer Biology & Therapy**, v. 12, n. 6, p. 510–522, 2011

PETERS, T. M.; PHILLIPS, C.; MURRAH, V. A. Is Oral Biopsy Associated With Change in Tobacco or Alcohol Use? **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 75, n. 10, p. 2117–2126, 2017.

PINDBORG, J. et al. **WHO international histological classification of tumours histological typing of cancer and pre-cancer of the oral mucosa**. New York: Springer-Verlag, 1997.

PIRES, F. R. et al. Oral squamous cell carcinoma: clinicopathological features from 346 cases from a single Oral Pathology service during an 8-year period. **Journal Appl. Oral Sci.**, v. 21, n. 5, p. 460-467, Sept-Oct. 2013.

PRALL, F. Tumour budding in colorectal carcinoma. **Histopathology**, v. 9, n. 50, p. 151–162, 2007.

PUPPA, G. et al. Independent prognostic value of fascin immunoreactivity in stage III-IV colonic adenocarcinoma. **British Journal of Cancer**, v. 96, n. 7, p. 1118–1126, 2007.

RASMUSSEN, H. B. et al. Foetal antigen 2 (FA2) in relation to wound healing and fibroblast proliferation. **Br. Journal Dermatol.**, v. 126, n. 2, p. 148-153, Feb. 1992.

RASMUSSEN, H. B. et al. Localization of foetal antigen 2 (FA-2) in fetal and adult human skin. **Br. Journal Dermatol.**, v. 121, p. 433–442, 1989.

RAYMOND, K. et al. Dual Role of $\alpha 6\beta 4$ Integrin in Epidermal Tumor Growth: Tumor-suppressive Versus Tumor-promoting Function. **Molecular Biology of the Cell**, v. 18, n. 11, p. 4210–4221, Nov. 2007.

REGEZI, J. A.; SCIUBBA, J. J. **Oral pathology-clinical pathologic correlations**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2017.

REIDY, J.; MCHUGH, E.; STASSEN, L. F. A review of the relationship between alcohol and oral cancer. **Surgeon**, v. 9, n. 5, p. 278-283, Oct. 2011.

REZNICZEK, G. A.; WALKO, G.; WICHE, G. Plectin Gene Defects Lead to Various Forms of Epidermolysis Bullosa Simplex. **Dermatologic Clinics**, v. 28, n. 1, p. 33–41, 2010.

RIKARDBSEN, O. G. et al. Plectin as a prognostic marker in non-metastatic oral squamous cell carcinoma. **BMC Oral Health**, v. 15, n. 1, p. 1–8, 2015.

RIVERA, C.; VENEGAS, B. Histological and molecular aspects of oral squamous cell carcinoma (Review). **Oncol Lett.**, v. 8, p. 7-11, 2014.

RIVERA, C. Essentials of oral cancer. **Int. Journal Clin. Exp. Pathol.**, v. 8, n. 9, p. 11884-11894, Sept. 2015.

RODRIGUES, P. C. **Análise dos efeitos biológicos associados a fascina e plectina no carcinoma espinocelular oral**. 2015.129f. Dissertação (Doutorado em Estomatopatologia) Faculdade de Odontologia de Piracicaba, Universidade Estadual de Campinas, Piracicaba, 2015.

RODRIGUES, P. C. et al. Clinicopathological prognostic factors of oral tongue squamous cell carcinoma: a retrospective study of 202 cases. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 43, n. 7, p. 795–801, 2014.

RODRIGUES, P. C. et al. Fascin promotes migration and invasion and is a prognostic marker for oral squamous cell carcinoma. **Oncotarget**, v. 8, n. 43, p. 74736–74754, 2017.

ROMMEL, A. et al. Contribution of cells undergoing epithelial–mesenchymal transition to the tumour microenvironment. **Journal Proteomics**, v. 78, p. 545-557, Jan. 2013.

ROTGER, M. et al. Comparative transcriptomics of extreme phenotypes of human HIV-1 infection and SIV infection in sooty mangabey and rhesus macaque. **Journal Clinical Invest.**, v. 6, n. 121, p. 2391-4000, 2011.

ROUTRAY, S. et al. Establishing Fascin over-expression as a strategic regulator of neoplastic aggression and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma tumor microenvironment. **Annals of diagnostic pathology**, v. 30, p. 36–41, Oct. 2017.

SALO, S. et al. Human bone marrow mesenchymal stem cells induce collagen production and tongue cancer invasion. **PLoS One**, v. 8, n. 10, p. e77692, Oct. 2013.

SALO, T. et al. Insights into the role of components of the tumor microenvironment in oral carcinoma call for new therapeutic approaches. **Experimental Cell Research**, v. 325, p. 58-64, 2014.

SÁNCHEZ-ROMERO, C. et al. Unusual Multinucleated Giant Cell Reaction in a Tongue Squamous Cell Carcinoma: Histopathological and Immunohistochemical Features. **Head and neck pathology**, p. 1-7, 2018.

SANTOS, H. et al. Multinucleated giant cell reaction in lower lip squamous cell carcinoma: a clinical, morphological and immunohistochemical study. **ARNP Journal of Engineering and Applied Sciences**, v. 12, n. 10, p. 3218–3221, 2017.

SARIOGLU, S. et al. Tumor budding as a prognostic marker in laryngeal carcinoma. **Pathology Research and Practice**, v. 206, n. 2, p. 88–92, 2010.

SASIKUMAR, A. N.; PEREZ, W. B.; KINZY, T. G. The many roles of the eukaryotic elongation factor 1 complex. **Wiley Interdiscip. Rev. RNA**, v.3, p. 543-555, 2012.

SAWAZAKI-CALONE, I. et al. The prognostic value of histopathological grading systems in oral squamous cell carcinomas. **Oral Diseases**, v. 21, p. 755–776, 2015.

SEKI, M. et al. Tumour budding evaluated in biopsy specimens is a useful predictor of prognosis in patients with cN0 early stage oral squamous cell carcinoma. **Histopathology**, v. 70, n. 6, p. 869–879, 2017.

SHAH, F. D. et al. A review on salivary genomics and proteomics biomarkers in oral cancer. **Indian Journal Clin. Biochem.**, v. 26, n. 4, p. 326-334, 2011.

SHIGA, K. et al. Cancer-Associated Fibroblasts: Their Characteristics and Their Roles in Tumor Growth. **Cancers (Basel)**, v. 7, n. 4, p. 2443-2458, Dec. 2015.

SHIMAMURA, Y. et al. Immunohistochemical Analysis of Oral Dysplasia: Diagnostic Assessment by Fascin and Podoplanin Expression. **Acta Histochemica Et Cytochemica**, v. 44, n. 6, p. 239–245, 2011.

SHIMIZU, S. et al. Tumor budding is an independent prognostic marker in early stage oral squamous cell carcinoma: With special reference to the mode of invasion and worst pattern of invasion. **PLoS ONE**, v. 13, n. 4, p. 1–16, 2018.

SHUDA, M. et al. Enhanced expression of translation factor mRNAs in hepatocellular carcinoma. **Anticancer Res.**, n. 20, p. 2489-2494, 2000.

SIMOJOKI, M. et al. Discrepant expression of carboxy- and aminoterminal propeptides of type I procollagen predicts poor clinical outcome in epithelial ovarian cancer. **Gynecol. Oncol.**, v. 88, n. 3, p. 358-362, Mar. 2003.

SINHA, P. et al. Histologic and systemic prognosticators for local control and survival in margin negative transoral laser microsurgery-treated oral cavity squamous cell carcinoma. **Head Neck**, 2013.

SOBRAL, L. M. et al. Smad7 blocks transforming growth factor- β 1-induced gingival fibroblast-myofibroblast transition via inhibitory regulation of Smad2 and connective tissue growth factor. **Journal Periodontol.**, v. 82, n. 4, p. 642-651, 2011.

STRIEDER, L. et al. Comparative analysis of three histologic grading methods for squamous cell carcinoma of the lip. **Oral diseases**, v. 23, n. 1, p. 120-125, 2017.

SUTOH-YONEYAMA, M. et al. Vimentin intermediate filament and plectin provide a scaffold for invadopodia, facilitating cancer cell invasion and extravasation for metastasis. **European Journal of Cell Biology**, v. 93, n. 4, p. 157–169, 2014.

TAI, S. K. et al. Risks and clinical implications of perineural invasion in T1-2 oral tongue squamous cell carcinoma. **Head Neck**, v. 34, n. 7, p. 994-1001, 2012.

TANG, D. et al. Cancer-associated fibroblasts promote angiogenesis in gastric cancer through galectin-1 expression. **Tumour Biol.**, doi: 10.1007/s13277-015-3942-9, 2015.

TAKKUNEN, M. et al. Podosome-like structures of non-invasive carcinoma cells are replaced in epithelial-mesenchymal transition by actin comet-embedded invadopodia. **Journal of Cellular and Molecular Medicine**, v. 14, n. 6 B, p. 1569–1593, 2010.

TAMURA, K. et al. Stanniocalcin 2 overexpression in castration-resistant prostate cancer and aggressive prostate cancer. **Cancer Sci.**, v. 100, n. 5, p. 914-919, May 2009.

TERRAMOTO, H. et al. Tumor budding as a useful prognostic marker in T1-stage squamous cell carcinoma of the esophagus. **Journal Surg. Oncol.**, v. 108, n. 1, p. 42-46, July 2013.

TOMASEK, J. J. et al. Myofibroblasts and mechano-regulation of connective tissue remodelling. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 3, p. 349–363, 2002.

TONG, G. X. et al. Fascin-1 expression in papillary and invasive urothelial carcinomas of the urinary bladder. **Human Pathology**, v. 36, n. 7, p. 741–746, 2005.

TORNEHAVE, D. et al. Two fetal antigens (FA-1 and FA-2) and endometrial proteins (PP12 and PP14) isolated from amniotic fluid: localization in the fetus and adult female genital tract. **Eur. Journal Obstet. Gynecol. Reprod. Biol.**, v. 30, p. 221–232, 1989.

TÜRMEK, K. et al. FASCIN and alpha-actinin can regulate the conformation of actin filaments. **Biochimica et Biophysica Acta - General Subjects**, v. 1850, n. 9, p. 1855–1861, 2015.

UENO, H. et al. Histologic categorization of fibrotic cancer stroma in the primary tumor is an independent prognostic index in resectable colorectal liver metastasis. **Am. Journal Surg Pathol.**, v. 38, p. 1380-1386, 2014.

VANGANGELT, K. M. H. et al. Prognostic value of tumor–stroma ratio combined with the immune status of tumors in invasive breast carcinoma. **Breast Cancer Research and Treatment**, n. 123456789, p. 1–12, 2017.

VEDAM, V. K. V.; BOAZ, K.; SRINATARAJAN, K. Prognostic efficacy of nuclear morphometry at invasive front of oral squamous cell carcinoma: An image analysis microscopic study. **Analytical Cellular Pathology**, v. 2014, 2014.

VERED, M. et al. Oral tongue squamous cell carcinoma: recurrent disease is associated with histopathologic risk score and young age. **Journal Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 136, p. 1039-1048, 2010.

VEREMIEVA, M. et al. Unbalanced expression of the translation complex eEF1 subunits in human cardioesophageal carcinoma. **Eur. Journal Clinical Invest.**, n. 41, p. 269-276, 2011.

VIGNJEVIC, D. et al. Fascin, a novel target of β -catenin-TCF signaling, is expressed at the invasive front of human colon cancer. **Cancer Research**, v. 67, n. 14, p. 6844–6853, 2007.

WALKO, G.; CASTAÑÓN, M. J.; WICHE, G. Molecular architecture and function of the hemidesmosome. **Cell and Tissue Research**, v. 360, n. 2, p. 363–378, 9 May 2015.

WANG, C. et al. Tumor budding correlates with poor prognosis and epithelial–mesenchymal transition in tongue squamous cell carcinoma. **Journal Oral Pathol. Med.**, v. 7, n. 40, p. 545-551, 2011.

WANG, K. et al. Tumor-stroma ratio is an independent predictor for survival in esophageal squamous cell carcinoma. **Journal of Thoracic Oncology**, v. 7, n. 9, p. 1457–1461, 2012.

WANG, Y. et al. Stanniocalcin 2 promotes cell proliferation and cisplatin resistance in cervical cancer. **Biochem. Biophys Res. Commun.**, v. 466, n. 3, p. 362-368, Oct. 2015.

WARNAKULASURIYA, S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. **Oral Oncol.**, v. 45, n. 4-5, p. 309-136, Apr-May 2009.

WEIJERS, M. et al. Malignancy grading is no better than conventional histopathological grading in small squamous cell carcinoma of tongue and floor of mouth: retrospective study in 128 patients. **Journal Oral Pathol. Med.**, v.38, p. 343-347, 2009.

WHEELER, S. E. et al. Enhancement of head and neck squamous cell carcinoma proliferation, invasion, and metastasis by tumor-associated fibroblasts in preclinical models. **Head Neck**, v. 36, n. 3, p. 385-392, Mar. 2014.

WICHE, G. Role of plectin in cytoskeleton organization and dynamics. **Journal of cell science**, v. 111, p. 2477–2486, 1998.

WICHE, G.; WINTER, L. Plectin isoforms as organizers of intermediate filament cytoarchitecture. **BioArchitecture**, v. 1, n. 1, p. 14–20, 2011.

WINTER, L.; WICHE, G. The many faces of plectin and plectinopathies: Pathology and mechanisms. **Acta Neuropathologica**, v. 125, n. 1, p. 77–93, 2013.

WOOLGAR-JULIA, A. Histopathological prognosticators in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Oral oncology**, v. 42, n. 3, p. 229–239, 2006.

WORLD HEALTH ORGANIZATION (WHO). **Who report on the global tobacco epidemic, 2017: Monitoring tobacco use and prevention policies**. Geneva: WHO, 2017.

YAMAGUCHI, Yoko et al. Histopathologic features of the tumor budding in adenocarcinoma of the lung: tumor budding as an index to predict the potential aggressiveness. **Journal of thoracic oncology**, v. 5, n. 9, p. 1361-1368, 2010.

YAMAKITA, Y. et al. Phosphorylation of human fascin inhibits its actin binding and bundling activities. **Journal of Biological Chemistry**, v. 271, n. 21, p. 12632–12638, 1996.

YODER, B. J. et al. The expression of fascin, an actin-bundling motility protein, correlates with hormone receptor-negative breast cancer and a more aggressive clinical course. **Clinical Cancer Research**, v. 11, n. 1, p. 186–192, 2005.

YU, P. T. et al. The RON-receptor regulates pancreatic cancer cell migration through phosphorylation-dependent breakdown of the hemidesmosome. **International Journal of Cancer**, v. 131, n. 8, p. 1744–1754, 15 Oct. 2012.

XIE, J. J. et al. Involvement of CYR61 and CTGF in the fascin-mediated proliferation and invasiveness of esophageal squamous cell carcinomas cells. **American Journal of Pathology**, v. 176, n. 2, p. 939–951, 2010.

XIE, N. et al. Tumor budding correlates with occult cervical lymph node metastasis and poor prognosis in clinical early-stage tongue squamous cell carcinoma. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 44, n. 4, p. 266–272, 2015.

XUE, L. et al. Tissue microarray analysis reveals a tight correlation between protein expression pattern and progression of esophageal squamous cell carcinoma. **BMC Cancer**, v. 6, n. 1, p. 296, 2006.

ZHANG, C.; GUAN, Z.; PENG, J. The correlation between stanniocalcin 2 expression and prognosis in laryngeal squamous cell cancer. **Lin Chung Er Bi Yan Hou Tou Jing Wai Ke Za Zhi.**, v. 29, n. 2, p. 102-107, Jan. 2015.

ZHANG, X. L. et al. The tumor-stroma ratio is an independent predictor for survival in nasopharyngeal cancer. **Oncology Research and Treatment**, v. 37, n. 9, p. 480–484, 2014.

ZHANG, H. et al. Fascin is a potential biomarker for early-stage oesophageal squamous cell carcinoma. **Journal of Clinical Pathology**, v. 59, n. 9, p. 958–964, 2006.

ZIGEUNER, R. et al. Biologic significance of fascin expression in clear cell renal cell carcinoma: Systematic analysis of primary and metastatic tumor tissues using a tissue microarray technique. **Urology**, v. 68, n. 3, p. 518–522, 2006.

ANEXOS

ANEXO A- Ficha padronizada para dados clínicos epidemiológicos.

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS

FICHA PARA ESTUDO DE CECS ORAIS

1. I.D | | | | |
2. Registro Hospitalar..... | | | | |
3. Bloco AP nº: _____
4. Data de Nascimento..... | | | / | | | / | | |
5. Sexo: Masculino (1) Feminino (2)..... | |
6. Cor: Branco (1) Pardo (2) Preto (3)..... | |
7. Profissão: _____
8. Antecedentes familiares: Positivo (+) Negativo (-) Sem Informação (SI)..... | |
9. Fuma: Não(0) Sim (1) Sem informação (2)..... | |
Quanto (maços/dia): _____ Tempo (anos): _____ Tipo: _____
10. Bebe: Não(0) Sim(1) Sem informações (2)..... | |
Tipo de bebida: _____ Quanto (doses/dia): _____
11. Tempo de queixa (meses)..... | | | | |
12. Tratamento prévio. Não (0), Cirurgia (1), RxT (2), Químico (3) | | | | |
13. Localização: | | e | |
Lábio (1), Língua (2), Assoalho Bucal (3), Rebordo alveolar (4), Gengiva (5),
Bochecha (6), Palato mole (7), Palato duro (8), Outra (9):.....
14. T1(1) T2(2) T3(3) T4(4) TX(5)..... | |
15. N0(1) N1(2) N2a(3) N2b(4) N2c(5) N3(6) NX(7)..... | |
16. M0(1) M1(2) MX(3)..... | |
17. Data do início do tratamento..... | | | / | | | / | | |
18. Metástase no diagnóstico..... | |
M0(0) Pulmão(1) Osso(3) Fígado(4) Outros(5) _____
19. Sequência de tratamento..... | | | | |
Não(0) Cirurgia(1) RXT(2) QT(3)
20. Data da cirurgia (Admissão): | | | / | | | / | | |
21. Margens cirúrgicas: Livres(1) Comprometidas(2) | |
22. Data do início da RXT: | | | / | | | / | | |
23. Dose de radiação no tumor..... cGy c
região..... cGy..... cGy/áreas/dias dias
24. Data do início da quimioterapia: | | | / | | | / | | |
25. Quimioterápico utilizado: _____
26. Comprometimento linfonodal: (0) Não (1) Sim..... | |
27. Total dissecado..... | | | Esquerdo / | | | Direito
Número comprometido..... | | | Esquerdo / | | | Direito
28. Data da metástase ou recidiva: | | | / | | | / | | |
29. Recidiva/Metástase: Não(0) Local(1) Linfonodo(2) Distância(3)..... | |
30. Linfonodo: Não(0) Ipsilateral(1) Contra-lateral(2)..... | |
31. Distância: M0(0) Pulmão(1) Osso(2) Fígado(3) Outros(4): _____ . | |
32. Segundo tumor primário: Não (0) Sim (1) | |
Data: | | / | | / | | Nome/localização: _____
33. Data da última informação: | | | / | | | / | | |
34. Data do óbito: | | | / | | | / | | |
35. Situação da última informação: | |
Vivo sem doença(1) Vivo com doença(2) Morto pela doença(3) Morto durante
o tratamento(4) Morto por outra causa(5) Perdido de vista(6) Sem informação da
doença (7)
36. Graduação Histológica..... | |

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS
INSTITUTO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS**

Bem-Dif.(1) Moderadamente-Dif.(2) Poblemente-Dif.(3) Indiferenciado(4)

37. Infiltração vascular: Não(0) Sim(1).....
38. Infiltração nervosa: Não(0) Sim(1).....
39. Infiltração linfática: Não(0) Sim(1).....
40. Infiltração capsular: Não(0)...Sim(1).....
41. Número de Brotamentos.....
42. Profundidade de invasão.....

ANEXO B– Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFAL

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
ALFENAS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Validação do modelo BD e análise de marcadores originados de fibroblastos associados ao carcinoma espinocelular oral

Pesquisador: LIVIA MARIS RIBEIRO PARANAIBA

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 54284116.4.0000.5142

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - UNIFAL-MG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.775.304

Apresentação do Projeto:

O Projeto aborda uma pesquisa independente da pesquisadora proponente em colaboração com a Faculdade de Odontologia de Piracicaba - Unicamp, aos cuidados do Professor Ricardo Della Coletta. Todo projeto será desenvolvido com os materiais disponíveis dos laboratórios em questão, não havendo a necessidade de um custeio por qualquer órgão de fomento. A pesquisa possui um caráter relevante, pois biomarcadores são de suma importância para melhor diagnóstico e prognóstico da patologia em questão:

Carcinoma espinocelular (CEC).

Objetivo da Pesquisa:

Verificar o valor prognóstico do sistema de gradação histopatológica proposto por Almagush et al. (2014).

Determinar o valor da marcação imuno-histoquímica das proteínas alfa-SMA, PINP e STC2 no prognóstico de CEC oral.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O estudo não oferece risco.

Endereço: Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700

Bairro: centro

CEP: 37.130-000

UF: MG

Município: ALFENAS

Telefone: (35)3299-1318

Fax: (35)3299-1318

E-mail: comite.etica@unifal-mg.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
ALFENAS



Continuação do Parecer: 1.775.304

Este projeto amplia e melhora o conhecimento dos eventos genéticos e biológicos relacionados à carcinogênese oral, bem como a identificação de

biomarcadores que possam contribuir na determinação de um diagnóstico e um tratamento individualizado de pacientes com esse tumor. Através dessas investigações os pacientes com câncer oral poderão ter uma taxa de sobrevida total aumentada.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa pode apresentar resultados promissores na busca de novas soluções ao diagnóstico e tratamento no desenvolvimento de Carcinoma espinocelular. Metodologia está adequada, referencial teórico bem apresentado e atualizado e o cronograma está coerente com a demanda do projeto.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Folha de Rosto: Ok

Pedido de Inscrição do TCLE: Presente e Adequado

Termo de Compromisso do Hospital Bom Pastor: Presente e Adequado

TCUD do Laboratório de Patologia Bucal da Universidade Federal de Alfenas, assim como do Hospital Bom Pastor: Presente e Adequado.

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Recomendo Aprovação do Projeto

Considerações Finais a critério do CEP:

O colegiado do CEP acata o parecer do relator.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|----------------|-----------------------------|------------|-------|----------|
| Informações | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_P | 15/09/2016 | | Aceito |

Endereço: Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700
Bairro: centro **CEP:** 37.130-000
UF: MG **Município:** ALFENAS
Telefone: (35)3299-1318 **Fax:** (35)3299-1318 **E-mail:** comite.etica@unifal-mg.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
ALFENAS



Continuação do Parecer: 1.775.304

| | | | | |
|---|------------------------------------|------------------------|-------------------------------------|--------|
| Básicas do Projeto | ETO_681353.pdf | 12:40:46 | | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE_ADEQUADO.pdf | 15/09/2016 12:40:20 | LIVIA MARIS RIBEIRO PARANAIBA | Aceito |
| Outros | AutorizacaoeanuenciadoHospital.pdf | 30/08/2016 15:37:35 | LIVIA MARIS RIBEIRO | Aceito |
| Outros | Termodecompromisso.jpg | 09/08/2016 14:25:51 | LIVIA MARIS RIBEIRO | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | Projeto_PlataformaB.pdf | 17/03/2016 10:35:13 | LIVIA MARIS RIBEIRO PARANAIBA | Aceito |
| Folha de Rosto | Folhaderostook.pdf | 17/03/2016 10:31:40 | LIVIA MARIS RIBEIRO | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | Termosassinadosok.pdf | 17/03/2016 10:03:25 | LIVIA MARIS RIBEIRO PARANAIBA | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ALFENAS, 13 de Outubro de 2016

Assinado por:
Marcela Filié Haddad
(Coordenador)

Endereço: Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700

Bairro: centro

CEP: 37.130-000

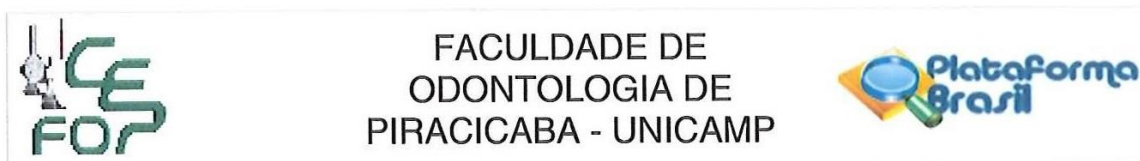
UF: MG

Município: ALFENAS

Telefone: (35)3299-1318

Fax: (35)3299-1318

E-mail: comite.etica@unifal-mg.edu.br

ANEXO C– Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UNICAMP**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

Elaborado pela Instituição Coparticipante

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Validação do modelo BD e análise de marcadores originados de fibroblastos associados ao carcinoma espinocelular oral

Pesquisador: LIVIA MARIS RIBEIRO PARANAIBA

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 54284116.4.3001.5418

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - UNIFAL-MG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.839.967

Apresentação do Projeto:

Trata-se de estudo laboratorial, baseado em arquivo, em co-participação entre a Universidade Federal de Alfenas-MG (Unifal-MG) e a Faculdade de Odontologia de Piracicaba – Unicamp. O objetivo será verificar o valor prognóstico do sistema de gradação histopatológica denominado Modelo BD (brotamento e profundidade de invasão) e a imunexpressão da proteína relacionada aos fibroblastos associados ao carcinoma (do inglês CAF - carcinoma-associated fibroblasts), a isoforma da actina de musculatura lisa (-SMA), além de outras que demonstram papel importante na tumorigênese de carcinoma espinocelular (CEC) oral, como o pró-peptídeo N-terminal do pró-colágeno tipo I (PINP) e a stanniocalcin 2 (STC2). A escolha dessas proteínas se baseou em estudos prévios do laboratório do Dr. Ricardo Della Coletta que identificou a superexpressão dessas proteínas, que são envolvidas na organização e remodelação da matriz extracelular e no metabolismo do colágeno, no secretoma de CAFs. Tais proteínas podem representar novos potenciais alvos terapêuticos e/ou marcadores de prognóstico para o CEC oral. Nas informações gerais do projeto de pesquisa os pesquisadores declaram que a amostra do estudo será composta por 180 casos de CEC oral do laboratório de Patologia Bucal da Universidade Federal de Alfenas, Unifal-MG, e do Hospital Bom Pastor de Varginha, MG, diagnosticados entre os anos de 1998 a 2010. Os critérios de inclusão serão: (1) Pacientes que apresentaram CEC oral diagnosticados no

Endereço: Av.Limeira 901 Caixa Postal 52

Bairro: Areião

CEP: 13.414-903

UF: SP

Município: PIRACICABA

Telefone: (19)2106-5349

Fax: (19)2106-5349

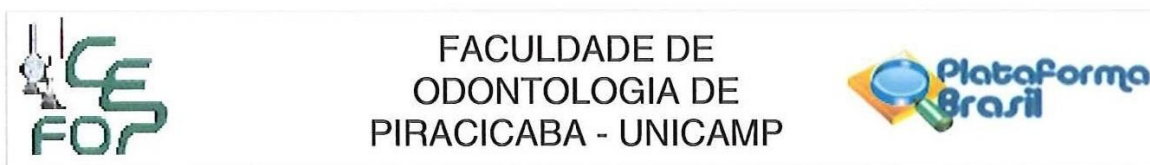
E-mail: cep@fop.unicamp.br



Continuação do Parecer: 1.839.967

laboratório de Patologia Bucal da Unifal-MG e que foram tratados no Hospital Bom Pastor de Varginha entre 1998 a 2010 sem tratamento antineoplásico prévio à biópsia; (2) Pacientes com diagnóstico de CEC oral do Hospital Bom Pastor e tratados nesse hospital; (3) Tratamento cirúrgico realizado de acordo com procedimento padrão e consistindo em ressecção do tumor primário; (4) Dados clinicopatológicos completos e o material do tumor embocado em parafina suficiente para avaliação. A fim de aumentar o número de amostras e melhor caracterizar o padrão de expressão de alfa-SMA, PINP e STC2, a análise imuno-histoquímica também será realizada em uma série de amostras que caracterizam CEC em desenvolvimento, contendo 70 leucoplasias orais, dos quais 20 serão histologicamente classificadas como displasia epitelial leve, 20 de displasia moderada, 20 de displasia severa, e 10 carcinomas in situ. 50 amostras de hiperplasia fibrosa oral também serão analisadas como grupo controle. Tais amostras (n=120) serão selecionadas do arquivo de biópsias provenientes do laboratório de Patologia Bucal da Unifal-MG. Os dados demográficos (idade, gênero e raça), hábitos nocivos (hábito de fumar e consumo de álcool), clínicos (tempo de queixa, local do tumor e estágio clínico, comprometimento linfonodal, recidiva, metástase, tratamento realizados, sobrevida global e sobrevida livre da doença) serão coletados dos prontuários em ficha apropriada. Na descrição da recidiva locoregional da doença será discriminada por meio dos registros clínicos se essa foi local (no sítio do tumor primário), regional (no sítio da metástase cervical) ou a distância. A sobrevida livre da doença será mensurada em dias, do dia inicial da cirurgia até o primeiro evento patológico documentado (tanto recidiva loco-regional como primeira metástase à distância) ou última proervação (follow-up) com classificação de livre da doença. A sobrevida global será medida em dias, do dia inicial da cirurgia até o óbito ou última proervação, indiferente ao status da doença. Serão realizados cortes histológicos com 4 mm de espessura dos blocos contendo o fronte de invasão (considerado como a porção de tecido conjuntivo entre as células tumorais mais invasivas e o tecido normal adjacente) e serão corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina. A análise dos cortes será realizada em microscopia de luz. A leitura das lâminas será realizada de modo independente por dois avaliadores e, casos onde houver discordância, a lâmina será reavaliada. A análise histopatológica seguirá os critérios publicado por Almangush et al. (2014) que avalia duas características histopatológicas: brotamento tumoral (B) e profundidade de invasão (D). As reações de imuno-histoquímica serão realizadas com a técnica da estreptavidina-biotina-peroxidase (Kellermann et al., 2007). Nas reações imunoistoquímicas as lâminas serão contra-coradas com hematoxilina de Carazzi. Controles negativos serão sempre realizados. Seguindo os critérios utilizados por Kellermann et al. (2007), a porcentagem de células positivas para alfa-SMA, PINP e STC2 será determinada após

Endereço: Av.Limeira 901 Caixa Postal 52
Bairro: Areião **CEP:** 13.414-903
UF: SP **Município:** PIRACICABA
Telefone: (19)2106-5349 **Fax:** (19)2106-5349 **E-mail:** cep@fop.unicamp.br



Continuação do Parecer: 1.839.967

contagem de 1000 células de cada lâmina, em aumento de 400x por um sistema de análise de imagem. Os anticorpos primários, as especificações e as titulações empregadas serão utilizados de acordo com os fabricantes. A análise estatística será realizada por meio de testes paramétricos e não paramétricos por meio do software de estatística SPSS (SPSS® para Windows 15.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Curvas de sobrevivência de Kaplan-Meier serão utilizadas quando apropriadas. O cronograma de execução da pesquisa prevê 24 meses para conclusão do estudo. Pendência 1 (atendida): Em sua resposta de 24/11/2016, os pesquisadores esclareceram que se pretende iniciar a avaliação dos casos com cerca de 200 casos de CEC oral previamente diagnosticados no laboratório de Patologia Bucal da Unifal-MG, e do Hospital Bom Pastor de Varginha MG, entre os anos de 1998 a 2010, mas que possivelmente serão perdidos diversos casos por material inadequado, falta de dados, etc. e que o número final de casos deve ficar em cerca de 150. Pendência 2 (atendida): Em sua resposta de 24/11/2016, os pesquisadores esclareceram que não será executada qualquer etapa no FOP, que o Prof Ricardo Della Coletta atuará em consultoria, mas não serão utilizados equipamentos ou casos da FOP.

Objetivo da Pesquisa:

Verificar o valor prognóstico do sistema de gradação histopatológica denominado Modelo BD (brotamento e profundidade de invasão) e a imunexpressão da proteína relacionada aos fibroblastos associados ao carcinoma (do inglês CAF - carcinoma-associated fibroblasts), a isoforma da actina de musculatura lisa (-SMA), além de outras que demonstram papel importante na tumorigênese de CEC oral, como o pró-peptídeo N-terminal do pró-colágeno tipo I (PINP) e a stanniocalcin 2 (STC2).

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

De acordo com o parecer CEP da UNIFAL-MG, o projeto amplia e melhora o conhecimento dos eventos genéticos e biológicos relacionados à carcinogênese oral, bem como a identificação de biomarcadores que possam contribuir na determinação de um diagnóstico e um tratamento individualizado de pacientes com esse tumor. Através dessas investigações os pacientes com câncer oral poderão ter uma taxa de sobrevivência total aumentada. Pendência 3 (atendida): Em sua resposta de 24/11/2016, os pesquisadores esclareceram que não há risco previsto pela participação na pesquisa, assim como não há benefício direto previsto. A pesquisa utilizará dados secundários, como prontuários e blocos de peças cirúrgicas em parafina e poderá ser benéfica a futuros pacientes diagnosticados com CEC oral pela identificação de biomarcadores que contribuam na determinação de um diagnóstico mais assertivo e um tratamento individualizado para o CEC oral.

Endereço: Av.Limeira 901 Caixa Postal 52

Bairro: Areião

CEP: 13.414-903

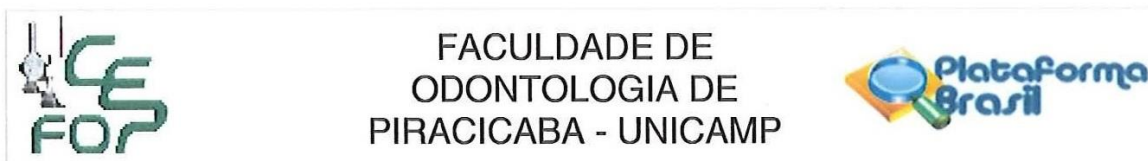
UF: SP

Município: PIRACICABA

Telefone: (19)2106-5349

Fax: (19)2106-5349

E-mail: cep@fop.unicamp.br



Continuação do Parecer: 1.839.967

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

De acordo com o CEP da UNIFAL-MG, a pesquisa pode apresentar resultados promissores na busca de novas soluções ao diagnóstico e tratamento no desenvolvimento de Carcinoma espinocelular. Metodologia está adequada, referencial teórico bem apresentado e atualizado e o cronograma está coerente com a demanda do projeto. Pendência 4 (atendida): Em sua resposta de 24/11/16 os pesquisadores informaram A) descrição das medidas para proteção ou minimização dos desconfortos e riscos previsíveis: Como o projeto utilizará dados secundários, os pesquisadores declararam que não haverá riscos e/ou desconfortos aos pacientes; B) descrição das medidas de monitoramento da coleta de dados e proteção à confidencialidade: Os pesquisadores declararam que o monitoramento da coleta de dados será feito pela coordenadora da pesquisa, Profa. Dra. Lívia Máris Ribeiro Paranaíba, que assumirá toda e qualquer responsabilidade pelas coletas das informações necessários ao projeto; A confidencialidade da pesquisa será garantida com sigilo absoluto de todos os dados confidenciais envolvidos na pesquisa; C) previsão de ressarcimento de gastos: os pesquisadores declararam que como o projeto utilizará apenas dados secundários, não haverá gastos relacionados aos pacientes; D) previsão de indenização e/ou reparação de danos: os pesquisadores declararam que como não terão contato direto com pacientes, por utilizar apenas dados secundários, não haverá previsão de indenização e/ou reparação de danos; E) critérios para suspender ou encerrar a pesquisa: os pesquisadores declararam que a pesquisa somente será suspensa ou encerrada caso não tenham acesso aos blocos de parafina.

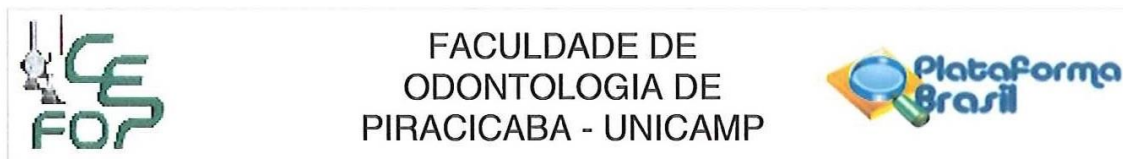
Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foram apresentadas a FR. O orçamento financeiro consta na PB e no projeto de pesquisa e está adequado. Os pesquisadores apresentaram a justificativa para não aplicação do TCLE. Os pesquisadores apresentaram o Termo de Compromisso do Hospital Bom Pastor e um Termo de Compromisso do Laboratório de Patologia Bucal da Universidade Federal de Alfenas autorizando o uso dos arquivos (prontuários clínicos e biópsias, respectivamente). As declarações dos pesquisadores e da instituição foram apresentadas. Pendência 5 (atendida): Em sua resposta de 24/11/16 os pesquisadores responderam à pendência (vide resposta pendência 1). Pendência 6 (atendida): Em sua resposta de 24/11/16 os pesquisadores responderam à pendência (vide resposta pendência 2).

Recomendações:

1- Após a aprovação os pesquisadores devem atentar para a necessidade de envio de relatórios parciais de atividades (no mínimo um a cada 12 meses) e do relatório final de atividades (ao término da pesquisa). 2- Reforça-se necessidade de registro dos eventuais materiais biológicos

Endereço: Av.Limeira 901 Caixa Postal 52
 Bairro: Areião CEP: 13.414-903
 UF: SP Município: PIRACICABA
 Telefone: (19)2106-5349 Fax: (19)2106-5349 E-mail: cep@fop.unicamp.br



Continuação do Parecer: 1.839.967

coletados que venham a ser estocados para uso em pesquisas futuras na forma de Biorrepositórios ou Biobancos e com registro desta intenção no TCLE assinado pelo participante. 3- Destaca-se que o parecer consubstanciado é o documento oficial de aprovação do sistema CEP/CONEP e os certificados emitidos pela secretaria do CEP-FOP, a pedido, após a aprovação final do protocolo, só têm valor simbólico e devem ser evitados. 4- Intercorrências ou eventos adversos devem ser relatados ao CEP por meio da PB. 5- Eventuais mudanças pretendidas no protocolo devem ser comunicadas como emendas ao CEP por meio da PB. 6- O parecer do CEP-FOP é fortemente baseado nos textos do protocolo encaminhado pelos pesquisadores e pode inclusive conter trechos transcritos literalmente do projeto ou de outras partes do protocolo. Trata-se, ainda assim, de uma interpretação do protocolo e, caso algum trecho do parecer não corresponda ao que efetivamente foi proposto no projeto, os pesquisadores devem se manifestar sobre esta discrepância. A não manifestação dos pesquisadores será interpretada como concordância com a fidedignidade do texto do parecer no tocante à proposta do protocolo. 7- Pesquisas com dentes doados por profissionais de saúde ainda são toleradas em hipótese pelo CEP-FOP, mas os pesquisadores devem estar cientes de que esta solução dista do ideal ético de consulta direta ao participante por meio de TCLE específico da pesquisa ou da obtenção dos dentes a partir de um biobanco de dentes e que estas últimas situações deveriam ser escolhidas em substituição à primeira.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências por resolver (vide texto acima).

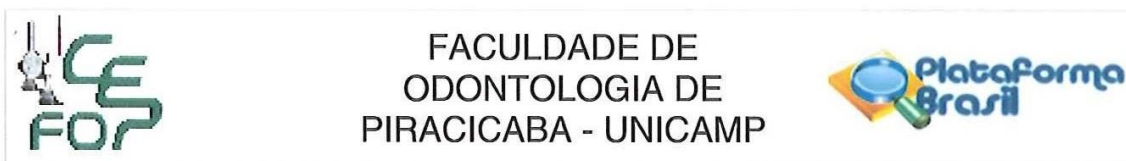
Considerações Finais a critério do CEP:

Parecer de aprovação de Co-Participação emitido "ad referendum" conforme autorização do Comitê na reunião de 06/04/2016. Será submetido para homologação na reunião de 14/12/2016.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

| Tipo Documento | Arquivo | Postagem | Autor | Situação |
|---|--|------------------------|-------------------------------|----------|
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_681353.pdf | 15/09/2016 12:40:46 | | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE_ADEQUADO.pdf | 15/09/2016 12:40:20 | LIVIA MARIS RIBEIRO PARANAIBA | Aceito |
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_681353.pdf | 30/08/2016 15:37:59 | | Aceito |

Endereço: Av.Limeira 901 Caixa Postal 52
 Bairro: Areião CEP: 13.414-903
 UF: SP Município: PIRACICABA
 Telefone: (19)2106-5349 Fax: (19)2106-5349 E-mail: cep@fop.unicamp.br



FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DE
PIRACICABA - UNICAMP

Continuação do Parecer: 1.839.967

| | | | | |
|---|--|------------------------|-------------------------------------|--------|
| Outros | AutorizacaoeenuenciadoHospital.pdf | 30/08/2016 15:37:35 | LIVIA MARIS RIBEIRO | Aceito |
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_681353.pdf | 09/08/2016 15:42:15 | | Aceito |
| Outros | Termodecompromisso.jpg | 09/08/2016 14:25:51 | LIVIA MARIS RIBEIRO | Aceito |
| Informações Básicas do Projeto | PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_681353.pdf | 17/03/2016 10:35:45 | | Aceito |
| Projeto Detalhado / Brochura Investigador | Projeto_PlataformaB.pdf | 17/03/2016 10:35:13 | LIVIA MARIS RIBEIRO PARANAIBA | Aceito |
| Folha de Rosto | Folhaderostook.pdf | 17/03/2016 10:31:40 | LIVIA MARIS RIBEIRO | Aceito |
| Declaração de Instituição e Infraestrutura | Termosassinadosok.pdf | 17/03/2016 10:03:25 | LIVIA MARIS RIBEIRO PARANAIBA | Aceito |
| TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência | TCLE.doc | 16/03/2016 16:53:49 | LIVIA MARIS RIBEIRO PARANAIBA | Aceito |

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

PIRACICABA, 28 de Novembro de 2016

Assinado por:
jacks jorge junior
(Coordenador)

Endereço: Av.Limeira 901 Caixa Postal 52
Bairro: Areião **CEP:** 13.414-903
UF: SP **Município:** PIRACICABA
Telefone: (19)2106-5349 **Fax:** (19)2106-5349 **E-mail:** cep@fop.unicamp.br

ANEXO D– Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade de Valparaíso



ACTA DE EVALUACIÓN BIOÉTICA N° 19
CB 051-14

El Comité Institucional de Bioética de la Investigación con Seres Humanos de la Universidad de Valparaíso en su sesión del 18 de Diciembre de 2014 declara haber evaluado el proyecto denominado **“Valor pronóstico de la expresión de microRNA y su asociación con quimioquinas y vías moleculares involucradas en la metástasis regional de carcinoma escamo celular oral”**, del investigador Sr. Wilfredo González Arriagada, adscrito a la Facultad de Odontología de Universidad de Valparaíso.

- I. Para su evaluación el Comité de Bioética revisó los siguientes antecedentes:
 - a. Protocolo de Investigación
 - b. Autorización de la institución clínica donde el estudio se llevará a cabo (Jefe de Servicio de Anatomía Patológica del Hospital Carlos van Buren)
 - c. Carta del investigador en respuesta a observaciones del Comité
 - d. Comunicación escrita y verbal del investigador respecto de la Aprobación del Comité de Ética del Hospital van Buren para utilización de muestras de archivo (pendiente entrega del certificado)

- II. En la valoración bioética del proyecto, se consideraron los siguientes aspectos vinculados con :
 - a. Valor científico: El estudio busca responder interrogantes que son de interés a temas disciplinares.
 - b. Validez científica: el diseño metodológico corresponde a los objetivos generales del estudio
 - c. Balance Riesgos y Beneficios: No ofrece riesgos. Resguarda conservación del material diagnóstico de archivo
 - d. Selección Justa de sujetos: La selección responde a los objetivos del estudio.
 - e. Consentimiento Informado: Está justificado suficientemente el no incluirlo, dada antigüedad de los casos y anonimización de las muestras.(se cuenta con autorización del servicio clínico correspondiente (sólo falta el documento oficial del Comité de Ética del Hospital)



Dirección de Investigación
Comité Institucional de Bioética de la
Investigación con Seres Humanos

- f. Respeto por los sujetos: Se cumple desde la selección de los sujetos y de las debidas garantías de anonimidad y conservación del material diagnóstico archivado
- g. Conflicto de Interés: No existen conflictos de interés.

III. Ante la inexistencia de aspectos inadecuados, revisados de acuerdo a los postulados de la Declaración de Helsinki, las Pautas Éticas para la Investigación Biomédica en Seres Humanos vigentes (CIOMS, 2002) y Guía de Buenas Prácticas Clínicas, se **APRUEBA**, por un plazo de un año y condicionado a la entrega del certificado del Comité de Ética del Hospital Carlos van Buren antes del inicio de la ejecución del proyecto, el protocolo de investigación identificado en esta acta.

IV. Firma el acta en representación del Comité



Liliana Contreras Alarcón
Presidenta CIBISH

Valparaíso, 18 de Diciembre de 2014.