

UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS

DAYANA APARECIDA QUEIROZ CASTILHO

**VALOR PROGNÓSTICO DA IMUNOEXPRESSÃO DE α -SMA EM CARCINOMA
ESPINOCELULAR DE LÍNGUA E ASSOALHO BUCAL**

Alfenas/MG

2020

DAYANA APARECIDA QUEIROZ CASTILHO

**VALOR PROGNÓSTICO DA IMUNOEXPRESSÃO DE α -SMA EM CARCINOMA
ESPINOCELULAR DE LÍNGUA E ASSOALHO BUCAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Biológicas da Universidade Federal de Alfenas – UNIFAL/MG como parte dos requisitos para obtenção do título de mestre. Área de concentração: Biologia celular, molecular e estrutural das doenças agudas e crônicas.
Orientadora: Prof^a. Dra. Livia Máris Ribeiro Paranaíba.
Co-orientadora: Prof^a. Dra. Carine Ervolino de Oliveira.

Alfenas/MG

2020

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

C352v Castilho, Dayana Aparecida Queiroz .
Valor prognóstico da imunexpressão de α -SMA em carcinoma
espinocelular de língua e assoalho bucal / Dayana Aparecida Queiroz
Castilho. – Alfenas/MG, 2020.
69f. : il. --

Orientadora: Lívia Máris Ribeiro Paranaíba.
Dissertação (Mestrado em Ciências Biológicas) - Universidade Federal
de Alfenas, 2020.
Bibliografia.

1. Neoplasias bucais. 2. Biomarcador. 3. Prognóstico. I. Paranaíba, Lívia
Máris Ribeiro. II. Título.

CDD-616.5999

DAYANA APARECIDA QUEIROZ CASTILHO**VALOR PROGNÓSTICO DA IMUNOEXPRESSIONÃO DE α -SMA EM CARCINOMA ESPINOCELULAR DE LÍNGUA E ASSOALHO BUCAL**

A Banca examinadora abaixo-assinada aprova a Dissertação/Tese apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre em Ciências Biológicas pela Universidade Federal de Alfenas. Área de concentração: Biologia Celular, Molecular e Estrutural das doenças agudas e crônicas.

Aprovada em: 21 de fevereiro de 2020.

Profa. Dra. Lívia Maris Ribeiro Paranaíba
Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG

Profa. Dra. Lays Martin Sobral
Instituição: University of Colorado - EUA

Profa. Dra. Ana Luiza Dias Leite de Andrade
Instituição: Universidade Federal de Alfenas - UNIFAL-MG



Documento assinado eletronicamente por **Lívia Maris Ribeiro Paranaíba, Professor do Magistério Superior**, em 21/02/2020, às 15:14, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Ana Luiza Dias Leite de Andrade, Professor do Magistério Superior**, em 21/02/2020, às 15:15, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



Documento assinado eletronicamente por **Lays Martin Sobral, Usuário Externo**, em 21/02/2020, às 15:19, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no art. 6º, § 1º, do [Decreto nº 8.539, de 8 de outubro de 2015](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no site https://sei.unifal-mg.edu.br/sei/controlador_externo.php?acao=documento_conferir&id_orgao_acesso_externo=0, informando o código verificador **0267877** e o código CRC **374F97A6**.

AGRADECIMENTOS

O presente trabalho foi realizado com o apoio da coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

RESUMO

O carcinoma espinocelular (CEC) oral é um relevante problema de saúde pública, com taxa de sobrevida inferior a 50% em 5 anos, e não apresenta marcadores específicos capazes de predizer um prognóstico assertivo. No intuito de ampliar o conhecimento acerca dos eventos biológicos relacionados à carcinogênese oral, bem como validar o papel de marcadores que possam contribuir para o prognóstico de pacientes com esse tumor, este estudo objetivou avaliar o valor prognóstico da densidade de fibroblastos associados ao câncer (do inglês CAF - *carcinoma-associated fibroblasts*), por meio da imunomarcação da isoforma α da actina de musculatura lisa (α -SMA), tanto no fronte de invasão quanto no estroma tumoral, em 91 amostras (peças cirúrgicas) de CEC de língua e assoalho bucal diagnosticados e tratados no Hospital Bom Pastor, Varginha/MG, entre os anos de 1998 a 2012. Além disso, considerando que umas das principais alterações na 8ª edição da *American Joint Committee on Cancer (AJCC)* para estadiamento do câncer oral foi a inclusão da profundidade de invasão (*depth of invasion* - DOI) na categoria T, avaliamos a performance desta nova categoria na nossa amostra de CEC de língua e assoalho bucal relacionando com sobrevida e densidade de CAFs. Os resultados da análise clínico-epidemiológica revelaram um predomínio de pacientes do gênero masculino (74,7%), tabagistas (71,4%) e etilistas (52,7%). A maioria dos casos apresentou-se em estágio avançado III e IV (57,1%). Após 5 anos, análises de sobrevida evidenciaram que 65% dos pacientes estavam vivos e que 75% dos pacientes estavam livres de recorrência. Os resultados também revelaram que a abundante densidade de CAFs interferiu significativamente na sobrevida específica (risco de morte) de doença ($p=0,005$; OR: 3,94; IC 95%: 1,50-10,34) dos pacientes tanto no fronte de invasão quanto no estroma tumoral, resistindo ($p=0,04$) na análise multivariada de Cox após ajuste para outros fatores prognósticos. Ao analisar as diferentes classificações da AJCC (7ª e 8ª edição) quanto à categoria T, não se observou diferença significativa na análise de sobrevida e na abundância de densidade de CAFs ($p=0,36$ e $p=0,40$, respectivamente). Dessa maneira, os resultados deste estudo demonstraram que a densidade de CAFs pode ser uma ferramenta útil para determinar o prognóstico de CEC de língua e assoalho, tanto no fronte de invasão quanto no estroma tumoral. Além disso, mais estudos precisam ser encorajados para melhor avaliar a categoria T na 8ª classificação da

AJCC considerando especialmente o adequado ponto de corte do estadio T e a melhor forma de mensuração do DOI.

Palavras-chave: Neoplasias bucais. Biomarcador. Prognóstico.

ABSTRACT

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is a relevant public health problem, with a still gloomy prognosis (survival rate below 50% in 5 years) and has no specific markers capable of predicting an assertive prognosis. In order to increase the knowledge about biological events related to oral carcinogenesis, as well as to evaluate the role of markers that may contribute to the prognosis and treatment of patients with this tumor, this study aims to verify the prognostic value of carcinoma-associated fibroblast density (CAF) by immunostaining the α smooth muscle actin (α -SMA) isoform at the invasion front and tumor stroma in 91 tongue and floor OSCC samples (surgical specimens) diagnosed and treated at the Bom Pastor Hospital, Varginha / MG, from 1998 to 2012. The results of the clinical and epidemiological analysis revealed a predominance of male patients (74.7%), smokers (71.4%), and alcoholics (52.7%). Most cases were in advanced stage III and IV (57.1%). Survival analyzes showed that 65% of patients were alive and 75% of patients were free of recurrence after 5 years. The results also revealed a significant correlation between α -SMA immunostaining and patient survival rate, with abundant α -SMA expression significantly interfering with disease-specific survival (risk of death) ($p = 0.005$; OR: 3.94; 95% CI: 1.50-10.34) of patients on both invasion front and tumor stroma, resisting ($p = 0.04$) multivariate Cox analysis after adjustment for other prognostic factors. When analyzing α -SMA immunostaining and AJCC T stage classifications (7th and 8th edition), no significant difference was observed ($p = 0.36$ and $p = 0.40$), the same was observed when associating stage classifications AJCC T (7th and 8th edition) and survival ($p = 0.36$ and $p = 0.40$). Thus, the results of this study demonstrated that the density of CAFs can be a useful tool to determine the prognosis of OSCC of the tongue and floor, both in the invasion front and in the tumor stroma. In addition, further studies need to be encouraged to improve category T in the AJCC specifications (7th and 8th edition), especially considering the appropriate point for cutting the internship and the best way of measuring the DOI.

Keywords: Oral neoplasms. Biomarker. Prognosis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Imagem representativa da avaliação da profundidade de invasão (depth of invasion - DOI)..... 20
- Figura 2 - Imagem representativa com os padrões de marcação imunohistoquímica da proteína α -SMA no estroma tumoral..... 31
- Figura 3 - Imagem representativa da marcação imunohistoquímica da proteína α -SMA em frente de invasão de carcinoma espinocelular de língua 32
- Gráfico 1 - Sobrevida específica de doença em pacientes com carcinoma de língua e assoalho 36
- Gráfico 2 - Sobrevida livre de doença em pacientes com carcinoma de língua e assoalho 36
- Gráfico 3 - Sobrevida específica de doença correlacionada com imunomarcação de α -SMA em frente tumoral em pacientes com carcinoma de língua e assoalho bucal 39
- Gráfico 4 - Sobrevida específica de doença correlacionada com imunomarcação de α -SMA em estroma tumoral em pacientes com carcinoma de língua e assoalho bucal 39
- Gráfico 5 - Sobrevida livre de doença correlacionada com imunomarcação de α -SMA em estroma tumoral em pacientes..... 40
- Gráfico 6 - Sobrevida livre de doença correlacionada com imunomarcação de α -SMA em frente tumoral em pacientes com carcinoma de língua e assoalho bucal... 40

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Estadiamento TNM para o câncer oral*	19
Tabela 2 -	Modificações do sistema de estadiamento clínico (TNM) de acordo com a 8ª edição da AJCC	20
Tabela 3 -	Características clínico-patológicas dos pacientes com CEC de língua e assoalho bucal	33
Tabela 4 -	Estadiamento clínico e sistema TNM dos pacientes com carcinoma espinocelular de língua e assoalho bucal	34
Tabela 5 -	Tipo de tratamento e características anátomo-patológicas das peças cirúrgicas analisadas dos pacientes com carcinoma espinocelular de língua e assoalho bucal	35
Tabela 6 -	Análise dos parâmetros clínico-patológicos com imunomarcção de α -SMA em pacientes com carcinoma espinocelular de língua e assoalho bucal...	37
Tabela 7 -	Análise univariada para sobrevida específica de doença com parâmetros clínicos-patológicos em pacientes com carcinoma espinocelular de língua e assoalho bucal	42
Tabela 8 -	Análise univariada para sobrevida livre de doença com parâmetros clínicos-patológicos em pacientes com carcinoma espinocelular de língua e assoalho bucal	43
Tabela 9 -	Análise multivariada para sobrevida livre de doença com parâmetros clínicos-patológicos em pacientes com carcinoma espinocelular de língua e assoalho bucal	44
Tabela 10 -	Características da imunomarcção de α -SMA e análise univariada para sobrevida específica e livre de doença de pacientes com carcinoma espinocelular de língua e assoalho bucal	44
Tabela 11 -	Análise multivariada para sobrevida específica de doença com a imunomarcção de α -SMA em pacientes com carcinoma espinocelular de língua e assoalho bucal	45
Tabela 12 -	Características da imunomarcção de α -SMA e estadio T da 7ª edição da AJCC em pacientes com carcinoma espinocelular de língua e assoalho bucal	45
Tabela 13 -	Características da imunomarcção de α -SMA e estadio T da 8ª edição da AJCC em pacientes com carcinoma espinocelular de língua e assoalho bucal	46
Tabela 14 -	Análise de sobrevida específica e sobrevida livre de doença dos casos de	

	carcinoma espinocelular de língua e assoalho bucal com o estadio T da 7ª Edição da AJCC.....	46
Tabela 15 -	Análise de sobrevida específica e sobrevida livre de doença dos casos de carcinoma espinocelular de língua e assoalho bucal com o estadio T da 8ª Edição da AJCC.....	46

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AJCC	American Joint Committee on Cancer Eighth Edition Cancer Staging Manual
BCL-XL	B-cell lymphoma-extra large
CAF	Carcinoma-associated Fibroblasts
CEC	Carcinoma Espinocelular
EMT	Epithelial-mesenchymal transition
FAP	Proteína de Ativação de Fibroblastos
FGF	Fator de Crescimento Fibroblástico
HPV	Papilomavírus Humano
IARC	Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer
INCA	Instituto Nacional de Câncer
MMPs	Metaloproteinases de Matrix
PDGF	Fator de Crescimento Derivado de Plaquetas
RB	Retinoblastoma
RDP	Poder de dicotomia relativa
SDF-1	Fator 1 Derivado de Células Estromais
UICC	União Internacional Contra o Câncer
VEGF	Fator de Crescimento Endotelial Vascular
α -SMA	Isoforma α da actina de músculo liso

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	12
2	REVISÃO DE LITERATURA	13
2.1	CARCINOMA ESPINOCELULAR ORAL	13
2.2	FIBROBLASTOS ASSOCIADOS AO CARCINOMA.....	22
3	OBJETIVO.....	27
3.1	OBJETIVO GERAL.....	27
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	27
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	28
4.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS.....	28
4.2	CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS	28
4.3	ESTUDO MORFOLÓGICO	29
4.3.1	Estudo imunoistoquímica	29
4.3.2	Análise da marcação imunoistoquímica	30
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	33
5	RESULTADOS	33
6	DISCUSSÃO	47
7	CONCLUSÃO.....	52
	REFERÊNCIAS.....	53
	ANEXO - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFAL.....	64

1 INTRODUÇÃO

Carcinoma espinocelular oral (CEC) é um tumor maligno de cavidade oral que tem sua origem a partir dos queratinócitos que revestem a cavidade oral. É a neoplasia mais frequente em cavidade oral, apresenta um prognóstico desfavorável com sobrevida permanecendo entre 50 e 60% para um período de 5 anos (JERJES et al., 2010). Isso reflete um diagnóstico da doença normalmente em estágio avançado e a elevada propensão para a invasão local e a disseminação regional e à distância (WARNAKULASURIYA, 2009; PELTANOVA et al., 2019; VERED et al., 2019). A identificação de novos marcadores de prognóstico pode 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 rotina clínica, levando a utilização do tradicional 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 da busca por novos marcadores biológicos, que possam refletir melhor a diversidade biológica da doença e prever com mais acurácia a resposta do paciente as terapias utilizadas convencionalmente (DOURADO et al. 2018a). No intuito de um melhor conhecimento dos eventos biológicos relacionados à carcinogênese oral, bem como a validação de marcadores que possam contribuir para o diagnóstico e tratamento de pacientes com esse tumor, este estudo objetivou validar o valor prognóstico da densidade de fibroblastos associados ao carcinoma (do inglês CAF - *carcinoma-associated fibroblasts*), por meio da imunomarcagem da isoforma α da actina de musculatura lisa (α -SMA) no fronte de invasão e no estroma tumoral, em amostras de CEC de língua e assoalho bucal.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A revisão do presente estudo está embasada em definições e exemplos, encontrados na literatura, que denotam a importância da identificação de marcadores imunistoquímicos para melhor predizer o prognóstico do CEC oral.

2.1 CARCINOMA ESPINOCELULAR ORAL

O CEC, também denominado carcinoma de células escamosas ou carcinoma epidermoide, é uma neoplasia maligna que tem sua origem a partir dos queratinócitos que revestem a cavidade oral. É um problema altamente relevante em saúde pública e representa coletivamente o sexto câncer mais comum no mundo dentre os cânceres de todas as regiões da cavidade oral e faringe (RIVERA, 2015; ALI et al. 2017; NG et al., 2017). 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 a Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer (IARC), o câncer oral acomete a mucosa labial, mucosa bucal, assoalho da boca, rebordo alveolar e gengiva, dois terços anteriores da língua (corpo lingual), palato duro e trígono retromolar. A estimativa mundial de incidência de câncer de cavidade oral e lábios, para ambos os sexos, de todas as idades, de 2018 a 2040, é de 545.396 casos e no Brasil 18.195 casos (IARC, 2019).

Especificamente por região 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 Europeu (França), 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 et al., 2015; RIVERA, 2015). No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer (INCA) estimou 4.010 novos casos em mulheres e 11.180 em homens, para o ano de 2020. 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. 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 (INCA, 2018).

Preferencialmente, o CEC oral acomete homens brancos (homem-mulher: 2:1) após a quinta década de vida, que fumam e bebem (BARNES, 2005). Interessantemente, estudos epidemiológicos 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; ALI et al., 2017). Tais pacientes parecem fugir do “padrão típico”, já que não fazem uso de tabaco e/ ou não ingerem bebidas alcoólicas, o que reforça a sugestão de que o CEC oral representa uma entidade clínica distinta, na qual fatores genéticos, infecções virais e fatores de risco comportamentais poderiam estar envolvidos (MAJCHRZAK et al., 2014; MORAIS et al., 2017; HUSSEIN et al., 2017).

Nenhum agente ou fator carcinogênico isolado tem sido claramente definido ou aceito, porém tanto fatores extrínsecos como intrínsecos podem contribuir para o desenvolvimento da doença. Dentre os fatores ambientais, os mais associados são o fumo de tabaco e à exposição da mucosa oral ao álcool presente em mais de 90% de todos os casos de CEC oral (RIVERA, 2015). O risco de desenvolver o câncer oral é 3 vezes maior em fumantes em comparação com não fumantes (GANDINI et al., 2008; CHAPMAN et al., 2018). 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. Ainda, exposição ambiental à fumaça do tabaco (fumantes passivos) também aumenta em 87% o risco de câncer em indivíduos que nunca fumaram ativamente quando comparado a indivíduos que nunca fumaram nem foram expostos (LEE et al., 2009).

Existe uma associação entre o consumo crônico e excessivo de álcool e o desenvolvimento do câncer oral. O risco associado ao álcool é dose-dependente e todos os tipos de bebidas alcoólicas contribuem como fator de risco proporcional à concentração de etanol. A atividade carcinogênica do álcool está intimamente relacionada ao metabolismo do etanol e a produção de acetaldeído, um agente cancerígeno capaz de interferir com a síntese e reparo do DNA e de formar adutos com diferentes moléculas, comprometendo o metabolismo celular (PÖSCHL et al., 2004; SEITZ et al., 2007). O álcool é também capaz de amplificar os efeitos do tabagismo por meio da sua ação de solvente químico, aumentando a permeabilidade da mucosa e prolongando a sua exposição às substâncias cancerígenas presentes no tabaco (BOFFETTA, et al., 2006; PAI et al., 2009).

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 os outros fatores associados ao câncer oral, destaca-se a infecção pelo papilomavírus humano (HPV), principalmente associado ao carcinoma de orofaringe (particularmente afetando palato e tonsila lingual) (DALIANIS, 2014; CHI et al., 2015; ALI et al., 2017). Características demográficas revelam um perfil específico para os cânceres orais positivos para o HPV, os quais incluem pacientes jovens (abaixo dos 50 anos), do gênero masculino, com melhor estado econômico e que não fumam ou bebem (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 tonsilas palatinas, base da língua, com uma taxa de prevalência de 75% (RIVERA, 2015). A detecção de HPV é um estabelecido biomarcador de prognóstico favorável para o câncer de orofaringe localmente avançado, estando associado a idade mais jovem de início, redução dos hábitos de tabaco, aumento do risco de metástase a distância e baixa sobrevida (KANG et al., 2015; YETE et al., 2017). Os mecanismos pelos quais o HPV contribui para a carcinogênese envolvem a participação das proteínas E6 e E7 codificadas pelo vírus, que são capazes de promover a inativação das proteínas supressoras tumorais p53 e retinoblastoma (RB), levando à aceleração do ciclo celular e comprometendo os sistemas de reparo do DNA (DALIANIS, 2014).

Clinicamente, o CEC oral se apresenta, na maioria dos casos, como uma lesão ulcerada, algumas lesões podem ser leucoplásicas e/ou eritroplásicas, indolor, com área central necrótica e bordas elevadas. Pode afetar qualquer local da mucosa, mas a língua e o assoalho bucal 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, disфонia e emagrecimento são vistos nas fases tardias da doença (KOWASLKI E CARVALHO, 2000). Devido a sua arquitetura histológica com riqueza de vasos linfáticos e predominância de estrutura muscular, o CEC de língua é 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 proeminentes e figuras mitóticas típicas e 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 ceratina e disqueratose. Invasão angiolinfática e perineural são sinais adicionais de malignidade (JOHNSON et al., 2005).

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 histológica. De acordo com a OMS, os tumores podem ser avaliados de acordo com a sua semelhança com o epitélio escamoso de origem, onde considera-se bem diferenciado um tumor que é maduro o suficiente para lembrar muito bem seu tecido de origem (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 um grau 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).

O tratamento do CEC oral baseia-se em cirurgia, radioterapia e/ou quimioterapia. 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 especiais de imagem como tomografia computadorizada ou imagem de ressonância magnética, e a terceira indicação quando não há linfadenopatia evidente, mas suspeita-se de metástase oculta no pescoço em função do local anatômico do câncer primário (REGEZI et al., 2008). A radioterapia adjuvante é planejada após uma avaliação completa do exame

histopatológico do paciente. 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 total de pacientes em 8 a 10% em CEC de cabeça e pescoço avançado localmente, sendo a cisplatina o agente isolado mais ativo. A quimiorradiação é preferível para pacientes com neoplasia maligna linfonodal avançada (REGEZI et al., 2008; VEDAM, et al., 2014). A utilização do quimioterápico Cetuximabe demonstrou induzir citotoxicidade mediada por células dependentes de anticorpos aumentando a atividade de células natural killers (NK) e em um modelo de xenoenxerto murino, a combinação do anticorpo CD137 e Cetuximabe resultou em efeitos antitumorais sinérgicos e aumento da sobrevida (WILSON et al., 2011; KOHRT et al., 2014; KANG et al., 2015).

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 com sobrevida permanecendo entre 50 e 60% para um período de 5 anos (JERJES et al., 2010; KARNOV et al., 2017; NG et al., 2017; PELTANOVA et al., 2019; VERED et al., 2019). Este baixo índice de sobrevida é principalmente devido ao diagnóstico da doença normalmente em estágio avançado 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 onde estes

parâmetros recebem graduações, de T0 a T4, de N0 a N3 e de M0 a M1 (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, sendo que o estágio IV ainda possui subdivisões em IVA, IVB e IVC (Tabela 2). Quanto maior for o estágio de classificação, pior será o prognóstico (NEVILLE et al., 2016).

Quadro 1 – Estadiamento clínico (TNM) de acordo com a 7ª edição da AJCC*.

Tumor primário (T)	
TX	Não pode ser avaliado
T0	Nenhuma evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i> (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 petrigóideas 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 de International agency for research on cancer (IARC), data: 17/02/2020

Tabela 1 – Estadiamento TNM para o câncer oral*

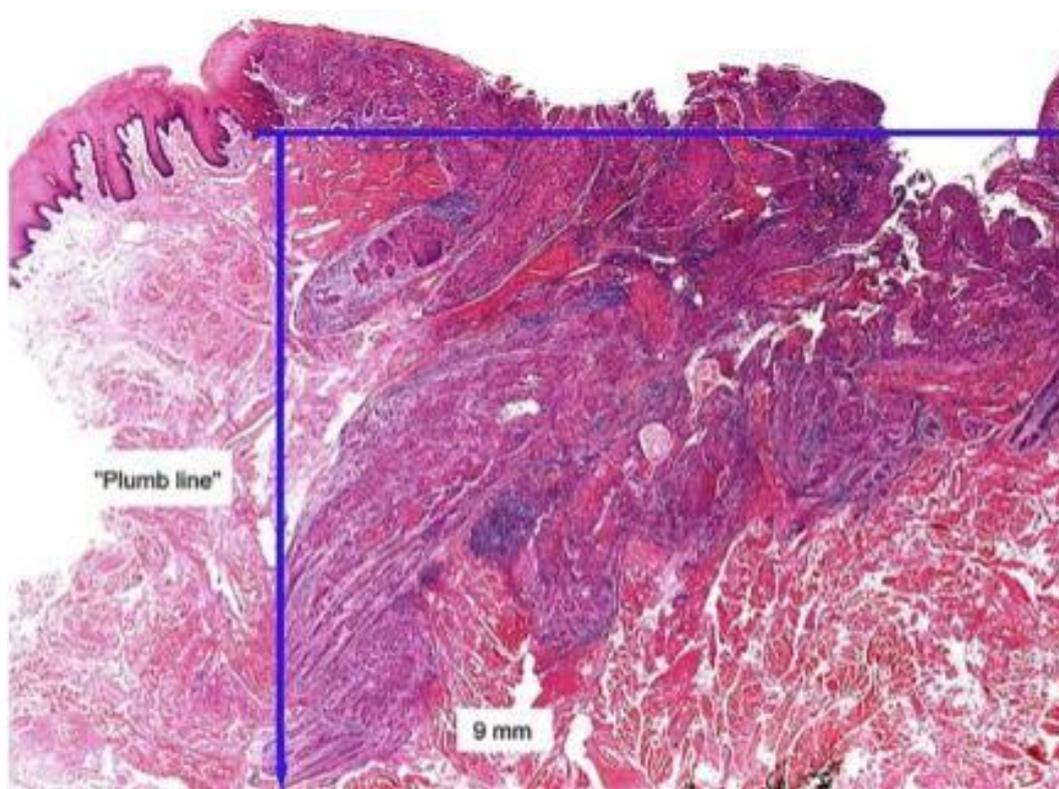
Estádios clínicos (T+N+M)			
0	Tis	N0	M0
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T3 (somente), T2 ou T1	N1	M0
IV A	T4a	N0 ou N1	M0
	T1, T2 ou T3	N2	M0
IV B	Qualquer T	N3	M0
	T4b	Qualquer N	M0
IV C	Qualquer T	Qualquer N	M1

Fonte: Modificado de International agency for research on cancer (IARC), data: 17/02/2020

A *American Joint Committee on Cancer Eighth Edition Cancer Staging Manual (AJCC)*, na seção de cabeça e pescoço, com o intuito de estabelecer claramente o comportamento biológico de tumores profundamente invasivos, porém pequenos, incorporou a profundidade de invasão (*depth of invasion – DOI*) à categoria T para câncer de cavidade oral (Tabela 3). O DOI é avaliado a partir do nível da membrana basal da mucosa normal adjacente mais próxima, onde uma “linha de prumo” é traçada deste plano até o ponto mais profundo da invasão do tumor (Figura 1). A categoria T, com a incorporação do DOI, melhora a distinção entre tumores superficiais ou exófitos e os mais invasivos. Para cada aumento de 5 mm no DOI, as categorias cT e pT aumentam um nível de acordo com o seguinte: ≤5 mm, > 5 mm

mas ≤ 10 mm e > 10 mm (AMIN et al., 2017).

Figura 1 – Imagem representativa da avaliação da profundidade de invasão (depth of invasion – DOI)



Fonte: Lydiatt et al. 2017.

Tabela 2 – Modificações do sistema de estadiamento clínico (TNM) de acordo com a 8ª edição da AJCC

Tumor primário (T)	
TX	Não pode ser avaliado
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Tumor ≤ 2 cm, ≤ 5 mm profundidade de invasão
T2	Tumor ≤ 2 cm, DOI > 5 mm e ≤ 10 mm ou tumor > 2 cm mas ≤ 4 cm e ≤ 10 mm DOI
T3	Tumor > 4 cm ou qualquer tumor > 10 mm DOI
T4	Doença local moderadamente avançada ou muito avançada

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 pterigoideas ou base de crânio; ou artéria carótida interna.

Fonte: MB et al. 2017.

No entanto, em muitos casos estes fatores são insuficientes para discriminar o comportamento biológico de tumores com o mesmo estadiamento. A desvantagem mais proeminente no uso deste sistema é a alta propensão de metástases ocultas loco-regionais. A palpação clínica para nódulos cervicais apresenta uma taxa aproximada de 30% de falsos negativos (BELLO; SOINI; SALO, 2010). Assim, evidencia-se a necessidade da pesquisa de novos marcadores moleculares, que possam refletir melhor a diversidade biológica da doença e prever com mais acurácia a resposta do paciente as terapias utilizadas convencionalmente (SHAH et al., 2011).

A taxa de sobrevida de 5 anos para o CEC oral varia de 53% a 68% se o tumor for relativamente pequeno (< 4 cm) e não tenha ocorrido metástase no momento do diagnóstico (estágios I e II), 41% quando o tumor for ≥ 4 cm sem metástase ou com metástase em um único linfonodo regional ipsilateral ≤ 3 cm (estágio 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 >3 cm e ≤ 6 cm ou um linfonodo > 6 cm (estágio IV). A grande maioria das mortes ocorre dentro dos primeiros 5 anos (NEVILLE et al., 2016). No entanto, a evolução clínica nem sempre segue estes 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 clínico TNM é um critério padrão para o manejo pós-operatório e também para predição de prognóstico atualmente.

Por muitos anos as pesquisas investigando a carcinogênese se concentraram nas células tumorais, especialmente em suas alterações genéticas e epigenéticas, acreditando que apenas nelas estariam as respostas e as soluções da tumorigênese. No entanto, vários estudos realizados ao longo das últimas décadas demonstram que

o microambiente tumoral exerce um papel importante para o desenvolvimento e progressão tumoral. O microambiente é formado por componentes da matriz extracelular, células imunes, células endoteliais sanguíneas e linfáticas e diferentes subtipos de fibroblastos, alguns recebendo a denominação de miofibroblastos. Todos estes componentes demonstraram ser capazes de influenciar criticamente a carcinogênese e o fenótipo maligno nas múltiplas etapas do tumor (CURRY et al., 2014; RIVERA E VENEGAS, 2014; WU et al., 2017; DOURADO et al., 2018b; HANLEY et al., 2018, PELTANOVA et al., 2019). Para controlar e erradicar as neoplasias malignas, os esforços não estão somente sobre as células malignas, mas também nas células do estroma tumoral (SHIGA et al., 2015; HONG et al., 2018; HUET et al., 2019; GIENIEC et al., 2019). De fato, a doença ocorre em um tecido altamente complexo e as células tumorais são dependentes desse meio para o seu desenvolvimento e sua progressão nos tecidos adjacentes, o que levou ao conceito do microambiente tumoral (ALBINI E SPORN, 2007).

2.2 FIBROBLASTOS ASSOCIADOS AO CARCINOMA

As interações entre células malignas e estroma têm atraído considerável atenção e evidências consistentes são acumuladas sobre esse assunto. Vários pesquisadores têm progressivamente esclarecido as origens, as características e as funções dos CAFs. Esses elementos são fibroblastos fenotipicamente alterados, que se assemelham funcionalmente aos miofibroblastos presentes durante a cicatrização de feridas (SHIGA et al., 2015). No entanto, durante a cicatrização de feridas, quando o processo é completado, a ativação de fibroblastos é diminuída (TOMASEK et al., 2002). Em contraste, os CAFs são diferenciados, e não reverterem para um fenótipo normal, não sofrem apoptose e nem são eliminados como fibroblastos normais (LI et al., 2007). Eles demonstram exercer um importante papel na progressão tumoral por apresentar grande habilidade em secretar fatores estimuladores como citocinas, fatores de crescimento, quimiocinas, hormônios, neurotransmissores, mediadores inflamatórios, proteínas de adesão e proteínas da MEC (DE WEVER et al., 2008; MARSH et al., 2011; SOBRAL et al., 2011; DOURADO et al., 2019; HUET et al., 2019; GIENIEC et al., 2019; PELTANOVA et al., 2019). Mutações em TP53 em células tumorais estão associadas com o aumento da migração de CAFs para o MT, enquanto

que TP53 não mutado inibe sua migração (LIN et al., 2013). Em um modelo animal murino, usando injeção heterotópica de células de CEC de cabeça e pescoço com fibroblastos normais ou CAFs, Wheeler e colaboradores (2014) demonstraram que os CAFs favoreceram o crescimento do tumor primário e a ocorrência de metástases linfonodais e à distância comparadas à injeção com fibroblastos normais.

Para identificar CAFs no estroma tumoral, é necessário a utilização de marcadores especiais. O mais amplamente utilizado é a isoforma α da actina de musculatura lisa (α -SMA). Após os danos aos tecidos, os fibroblastos proliferam e diferenciam-se em miofibroblastos. Esses miofibroblastos adquirem um novo perfil como a capacidade de expressar α -SMA, as fibras de estresse contráteis, e a variante EDA de *splicing* de fibronectina (SHIGA et al., 2015). Outras moléculas, tais como proteína de ativação de fibroblastos (FAP), proteína 1 específica de fibroblastos (FSP-1), receptor do fator de crescimento derivado de plaquetas α/β (PDGFR α/β) e vimentina são utilizadas para identificação de CAF ativados (KRAMAN et al., 2010; PELTANOVA et al., 2019).

Em um estudo experimental com ratos, CAFs em carcinoma de cólon promoveu metástase do tumor confirmando que eles podem estar envolvidos na capacidade de invasão de células tumorais epiteliais *in vivo*, mesmo quando a expressão de E-caderina impede a invasão de células neoplásicas em diferentes ensaios *in vitro* (DIMANCHE-BOITREL et al., 1994). Além disso, CAFs também apresentam influência na remodelação de MEC por expressar membros da família de metaloproteinases de matriz (MMPs), como MMP-2 e MMP-9, os quais degradam membrana basal e contribuem para a proliferação tumoral (STUELTEN et al., 2005; PELTANOVA et al., 2019). Estudos também mostram que CAFs afetam a angiogênese tumoral por vários mecanismos, via secreção de fator de crescimento endotelial vascular (VEGF, do inglês – *vascular endothelial growth factor*) e outros fatores angiogênicos como fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF, do inglês – *platelet-derived growth factor*), fator de crescimento fibroblástico (FGF, do inglês – *fibroblast growth factor*) e fator 1 derivado de células estromais (SDF-1, do inglês – *stromal cell-derived factor 1*) (SHIGA et al., 2015; PELTANOVA et al., 2019). Gonzalez e colaboradores (2014) descobriram que CAFs secretam lactato e piruvato como metabólitos de energia através da via glicolítica, e as células malignas podem utilizar esses metabólitos no ciclo mitocondrial TCA (ciclo de ácido tricarbóxico) (GONZALEZ et al., 2014). Pavlides e colaboradores

(2009) nomearam esse conceito de "efeito reverso de Warburg", uma vez que CAFs contribuem como fonte de energia para as células malignas.

Os CAFs desempenham um papel no desenvolvimento do tumor por meio da interação célula-célula ou conversação cruzada com células tumorais, secretando fatores de crescimento, citocinas e exossomos (Li et al., 2018). Dourado e colaboradores (2019) identificaram que vesículas extracelulares (VE) liberadas pelo CAF são os principais promotores da migração e invasão em CEC oral por meio da ativação de processos biológicos específicos, incluindo vias estruturais e de motilidade. CAF-EV revelaram uma expressão gênica modificada associada a vias metabólicas e regulação positiva de genes associados à invasão tumoral, como ROCK2, FLOT1 e FAM129B (DOURADO et al., 2019)

Vered e colaboradores (2019), em um estudo com CEC de língua, identificaram que os CAFs são uma população celular heterogênea que representa fenótipos de diferentes origens celulares ou estados celulares e que podem ser modulados de acordo com determinadas condições temporais e espaciais. Verificou-se também que os fenótipos de CAF variam nos CECs e que isso tem um impacto significativo nos resultados clínicos (VERED et al., 2019).

Pesquisas mostram que CAFs também afetam a sensibilidade de drogas por secretarem diversos fatores. Por exemplo, no CEC de cabeça e pescoço, a indução de MMP-1 por CAFs protege células de Cetuximab (anticorpo monoclonal do receptor do fator de crescimento epidérmico) (JOHANSSON et al., 2012). CAFs também protegem células de carcinoma de próstata do efeito citotóxico de Sorafenibe (inibidor de múltiplas enzimas tirosina-quinase) através da superexpressão de BCL-XL (*B-cell lymphoma-extra large*), proteína anti-apoptótica (KHARAZIHA et al., 2012). A presença de CAFs em CECs orais, particularmente na região do fronte invasivo, demonstrou promover um comportamento mais agressivo do tumor, resultando em menor sobrevida global dos pacientes (KELLERMANN et al., 2007). De modo geral, os estudos demonstram que a alta densidade de CAFs é um forte fator preditivo de prognóstico desfavorável (KELLERMANN et al., 2008; KAWASHIRI et al., 2009; VERED et al., 2010; BELLO et al., 2011; MARSH et al., 2011; FUJII et al., 2012; DING et al., 2014; LIN et al., 2017; DOURADO et al., 2018a; GRAIZEL et al., 2019; VERED et al., 2019), e sugerem ainda que a presença dessas células no estroma dos CECs orais pode influenciar na proliferação e invasão tumoral, resultando em um tumor mais

agressivo (SOBRAL et al., 2011; HINSLEY et al., 2012). No estudo de Sobral e colaboradores (2011) foi demonstrado que produtos de síntese dos miofibroblatos são capazes de modular a proliferação e invasão de linhagens celulares de CEC oral. CAFs podem superexpressar uma grande variedade de fatores, como citocinas, fatores de crescimento e quimiocinas (MMPs, TGF- β , MCT4, VEGF, HGF, IL-22) que têm papel importante na indução da deposição de MEC, na promoção da angiogênese e da transição epitélio mesênquima (*epithelial mesenchymal transition* - EMT), regulação da reprogramação metabólica e aumento da proliferação e resistência a quimioterápicos (MADAR et al., 2013; MARTINEZ-OUTSCHOORN et al., 2014), como mencionado acima de forma genérica. Os mecanismos subjacentes aos efeitos de CAFs nas neoplasias malignas ainda não estão claras. Maiores esclarecimentos desses efeitos são necessários e poderão conduzir a novos modelos terapêuticos anti-câncer contra os CAFs e as interações de estroma e células malignas.

Os biomarcadores de câncer podem ser classificados com base no estado da doença, incluindo biomarcadores preditivos, de diagnóstico e prognóstico. Desde a identificação de um biomarcador promissor até seu uso clínico, existe um longo caminho envolvendo muitos obstáculos, como estimar o número de pacientes necessários para a fase de validação estatística, entre outros (BUYSE et al., 2011; GOSHO et al., 2012). Neste contexto, uma revisão sistemática foi realizada com o objetivo de identificar um biomarcador para CEC oral, porém nenhum dos estudos apresentou moléculas validadas. Os resultados mostram biomarcadores na fase de descoberta, levando-os a chamá-los de "potenciais biomarcadores". Em outro estudo, de meta-análise e revisão sistemática, foi verificado que nenhum dos biomarcadores relatados com mais frequência podem ser recomendados como preditivos de prognóstico válido para uso clínico, demonstrando que a qualidade na condução e nos relatórios dos estudos originais é globalmente insatisfatória, o que não permite conclusões confiáveis (ALMANGUSH et al., 2017; RIVERA et al., 2017; ALMANGUSH et al., 2018a; DENG et al., 2019; MARKAROV e GORLIN, 2019).

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi verificar o valor prognóstico da densidade de CAFs, por meio da imunomarcagem de α -SMA, no fronte de invasão e no estroma tumoral, de amostras de CEC de língua e assoalho bucal, correlacionando com as variáveis clínico-patológicas, presença de metástase e sobrevida. Além disso, considerando que umas das principais alterações na 8ª edição da *American Joint*

Committee on Cancer (AJCC) para estadiamento do câncer oral foi a inclusão do DOI na categoria T, avaliamos a performance desta nova categoria na nossa amostra de CEC de língua e assoalho bucal relacionando com sobrevida e abundância de CAFs.

3 OBJETIVO

3.1 OBJETIVO GERAL

- Avaliar o valor prognóstico da densidade de CAFs, tanto no fronte de invasão quanto no estroma tumoral, em amostras de CEC de língua e assoalho bucal e avaliar o impacto da inclusão do DOI na categoria T na 8ª edição da *American Joint Committee on Cancer* considerando sobrevida e a abundância de CAFs.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Avaliar a densidade de CAFs, no estroma e fronte de invasão tumoral, por meio da imunomarcagem de α -SMA, em amostras de CEC de língua e assoalho bucal. Correlacionando com as variáveis clínico-patológicas, de recorrência, de metástase e sobrevida;
- Analisar e comparar as amostras de CEC de língua e assoalho bucal de acordo com a 7ª e 8ª edição do *American Joint Committee on Cancer* considerando a categoria T e relacionar com a sobrevida e densidade de CAFs.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

Este estudo foi cadastrado na Comissão Nacional de Ética e Pesquisa (CONEP), através da Plataforma Brasil e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Alfenas (CEP/UNIFAL-MG), (Anexo A), número 58517516.1.0000.5142, de acordo com a resolução 466/12.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DE AMOSTRAS

Foram analisadas 91 amostras de CEC com história clínica completa de pacientes tratados no 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 material do tumor emblocado em parafina suficiente para avaliação.

As informações clínicas, demográficas, de tratamento, recorrência e sobrevida foram coletadas dos prontuários médicos e as características histopatológicas, incluindo grau de diferenciação tumoral, infiltração vascular e infiltração neural foram determinadas por meio da análise de todas as lâminas coradas com hematoxilina e eosina (DOMINGUETI, 2018). Todas as recorrências foram confirmadas histopatologicamente e a sobrevida livre de doença foi determinada como o período entre o tratamento inicial e a confirmação da recorrência, enquanto que a sobrevida global foi o período entre o diagnóstico do paciente e a morte ou a última visita de acompanhamento.

Além disso, considerando que uma das principais modificações na 8ª edição do AJCC para estadiamento do câncer oral foi a inclusão do DOI na categoria T, reanalisamos as 91 amostras de CEC de língua e assoalho bucal nesta nova classificação (Tabela 3) (AMIN et al. 2017), para demonstrar a diferença no estágio T entre a 7ª e a 8ª edição da AJCC. Na 8ª edição da AJCC, T1 refere a tumores com ≤ 2 cm de diâmetro e DOI ≤ 5 mm. T2 refere a tumores com ≤ 2 cm de diâmetro e DOI

>5 mm e \leq 10 mm, ou tumores com $>$ 2 cm mas \leq 4 cm e DOI \leq 10 mm. T3 refere a tumores com $>$ 4 cm ou qualquer tumor com DOI $>$ 10 mm. T4 refere a tumores moderadamente avançados ou doença local muito avançada. De acordo com a 8ª edição da AJCC, DOI não influencia o estágio T4.

4.3 ESTUDO MORFOLÓGICO

4.3.1 Estudo imunoistoquímica

Todas as reações de imunoistoquímica foram realizadas no Laboratório de Anatomopatologia da UNIFAL-MG. Para reação imunoistoquímica cortes de 3 μ m de espessura foram desparafinizados, hidratados em soluções com concentrações decrescentes de etanol (100%, 90%, 70% e 50%) e lavados. O procedimento para a recuperação antigênica foi realizado em solução aquosa de 10 mM de ácido cítrico, pH 6,0 e panela de pressão elétrica por 15 min após o início da pressão. Após o resfriamento do material, a inativação da peroxidase endógena foi realizada com a incubação com peróxido de hidrogênio (20 volumes) por 25 min. Após lavagem em solução salina tamponada com fosfato pH 7,4 (PBS), os cortes foram incubados com o anticorpo primário anti- α -SMA (Monoclonal Mouse Anti-Human Smooth Muscle Actin, Dako, EUA) (tabela 2) na diluição de 1:400 em câmara úmida por 18 h à 4°C. Após a incubação do anticorpo primário, as amostras foram incubadas no sistema de visualização *ENVISION*[™] (Dako, Denmark) durante 30 minutos à 36°C em estufa. A revelação foi realizada em solução contendo 3,3-diaminobenzidina (*Liquid DAB + Substrate*, Dako, EUA) à temperatura ambiente durante 1 min. A contra coloração foi realizada com hematoxilina de Carrazi durante 3 min. O processo foi finalizado com desidratação, diafanização e montagem da lâmina.

Quadro 2 - Anticorpo e diluição

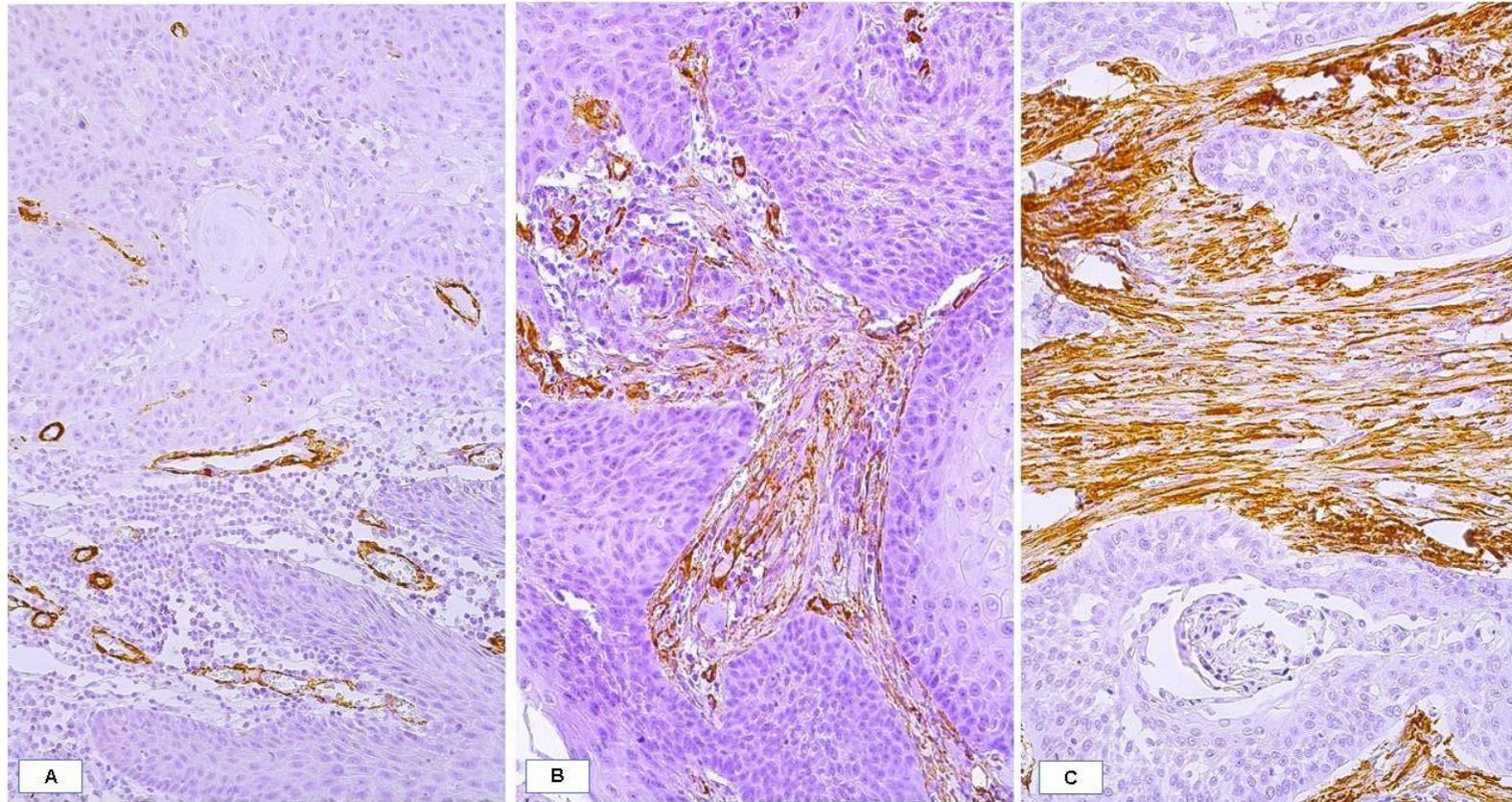
Anticorpo	Diluição	Fabricante
Monoclonal Mouse Anti-Human Smooth Muscle Actin	1:400	Dako Denmark A/S

Fonte: Dako Denmark A/S

4.3.2 Análise da marcação imunoistoquímica

A análise da marcação imunoistoquímica da proteína α -SMA foi realizada de forma semi-quantitativa. Toda a área do espécime foi verificada por dois examinadores previamente calibrados através de microscópio óptico (Leica DM500, Wetzlar, Germany). As células que exibiram coloração acastanhada e granular no citoplasma foram consideradas positivas. Os escores foram atribuídos de acordo com a densidade de CAFs identificados na região de frente e estroma tumoral (Figura 1 e 2). Para a quantificação da imunomarcação, os escores foram os seguintes: 0- negativo; 1- < 50% escasso; e 2- > 51% abundante (BAGORDAKIS et al., 2016).

Figura 2 - Imagem representativa com os padrões de marcação imunoistoquímica da proteína α -SMA no estroma tumoral



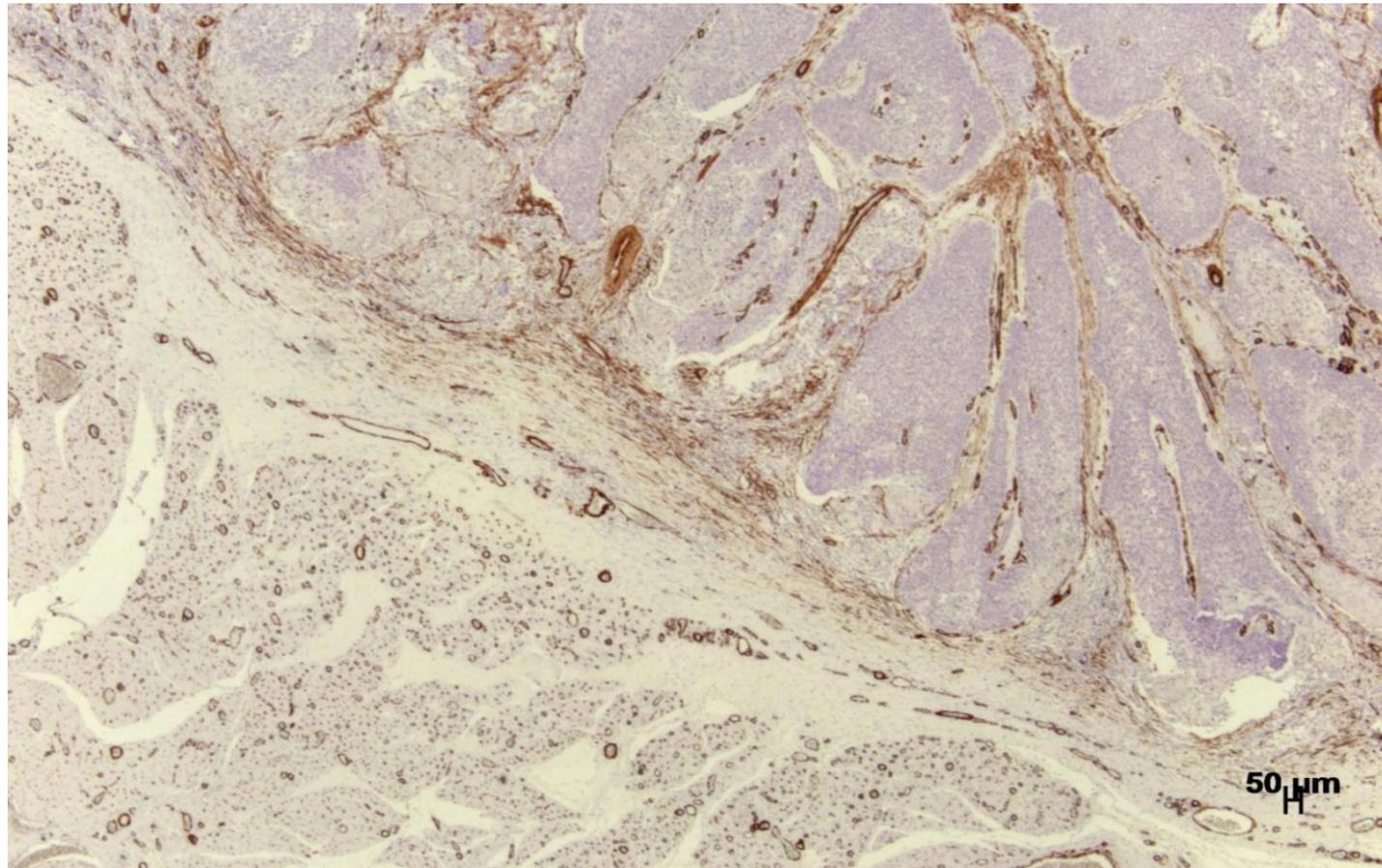
Fonte: da autora

Legenda: (A) A reação de controle negativo foi realizada por omissão do anticorpo primário.

(B) citoplasma das células tumorais apresentando baixa expressão da proteína α -SMA.

(C) citoplasma das células tumorais apresentando alta expressão da proteína α -SMA.

Figura 3 - Imagem representativa da marcação imunoistoquímica da proteína α -SMA em frente de invasão de carcinoma espinocelular de língua



Fonte: da autora

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

A análise estatística foi realizada por meio do software de estatística MedCalc (versão 17.8.1). O nível de significância empregado foi de 5% ($p < 0,05$). Realizou-se o teste estatístico do qui-quadrado, tanto para as características clínico-patológicas, estadio T (7ª e 8ª edição da AJCC) como para o marcador α -SMA. 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 e marcador imunistoquímicos. Para a análise estatística realizamos a união dos escores 0- negativo e 1- < 50% escasso versus escore 2- > 51% abundante.

5 RESULTADOS

Dos 91 pacientes com CEC de língua e assoalho bucal, 45 (49,5%) apresentavam idade acima da quinta década de vida, e a mediana de idade foi de 61,8 anos (variação de 45 a 88 anos). O gênero masculino foi predominante entre os casos, representando 68 casos (74,7%). A maioria desses pacientes era tabagista (n: 65; 71,4%) ou etilista (n: 48; 52,74%), e os que fumavam e bebiam conjuntamente eram 48 (52,74%) (Tabela 5).

Tabela 3 - Características clínico-patológicas dos pacientes com CEC de língua e assoalho bucal

Características	Nº de pacientes	%
Idade		
>61	45	49,50
≤61	46	50,50
Gênero		
Masculino	68	74,73
Feminino	23	25,27
Hábito de Fumar		
Não	9	9,89
Sim	65	71,43
Hábito de beber		
Não	19	20,88
Sim	48	52,75

Fonte: da autora.

A maioria dos pacientes (n: 52; 57,1%) apresentava estadiamento clínico III e IV, e 36 casos (39,5%) foram classificados entre estadiamentos I e II (Tabela 6). Em relação ao sistema TNM, de acordo com a sétima edição, a maior prevalência (n: 38; 70,3%) era de tumores T1 (tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão) e T2 (tumores entre 2cm e 4cm) (Tabela 6), seguido dos tumores T3 e T4 (n: 16; 29,7%). Considerando a oitava edição, a maior prevalência (n: 40; 75%) era de tumores T1 (Tumor ≤2 cm, ≤5 mm profundidade de invasão) e T2 (Tumor ≤2 cm, DOI> 5 mm e ≤10 mm ou tumor> 2 cm mas ≤4 cm e ≤10 mm) (Tabela 6), seguido dos tumores T3 e T4 (n: 13; 25%). Quanto ao comprometimento linfonodal, a maioria dos pacientes (n: 23; 25,27%) apresentou comprometimento positivo.

Tabela 4 - Estadiamento clínico e sistema TNM dos pacientes com carcinoma espinocelular de língua e assoalho bucal

Características	Nº de pacientes	%
Estadiamento clínico		
I/II	36	39,56
III/IV	52	57,14
Estádio T (7ª Edição da AJCC)		
T1+T2	38	70,3
T3+T4	16	29,7
Estádio T (8ª Edição da AJCC)		
T1+T2	40	75,0
T3+T4	13	25,0
Linfonodos comprometidos		
Não	17	18,68
Sim	23	25,27

Fonte: da autora.

A maioria das peças cirúrgicas avaliadas apresentou margens livres (n: 41, 45%), presença de invasão vascular (n: 58, 63,7%) e presença de invasão perineural (n: 49, 53,8%) (Tabela 7). Quanto ao tratamento estabelecido para os pacientes, 10 (11%) realizaram apenas cirurgia, 38 (41,7%) associaram cirurgia e radioterapia e 41 (45%) se submeteram à cirurgia, radioterapia e a quimioterapia (Tabela 7).

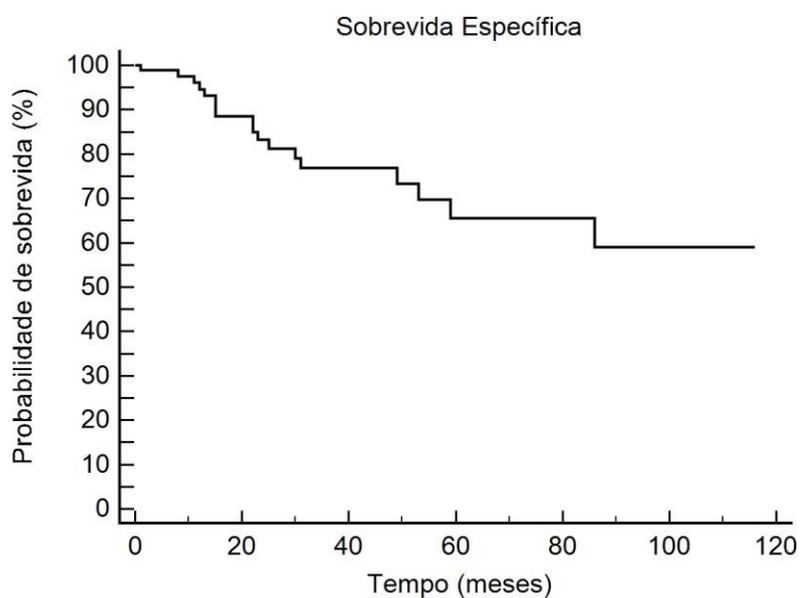
Tabela 5 - Tipo de tratamento e características anátomo-patológicas das peças cirúrgicas analisadas dos pacientes com carcinoma espinocelular de língua e assoalho bucal

Características	Nº de pacientes	%
Tratamento		
Cirurgia	10	10,98
Cirurgia + RTX	38	41,76
Cirurgia + RTX + QTX	41	45,0
Margens cirúrgicas		
Livres	41	45,05
Comprometidas	9	9,89
Invasão vascular		
Não	9	9,89
Sim	58	63,74
Invasão perineural		
Não	42	46,15
Sim	49	53,85
RTX: Radioterapia, QTX: Quimioterapia		

Fonte: da autora.

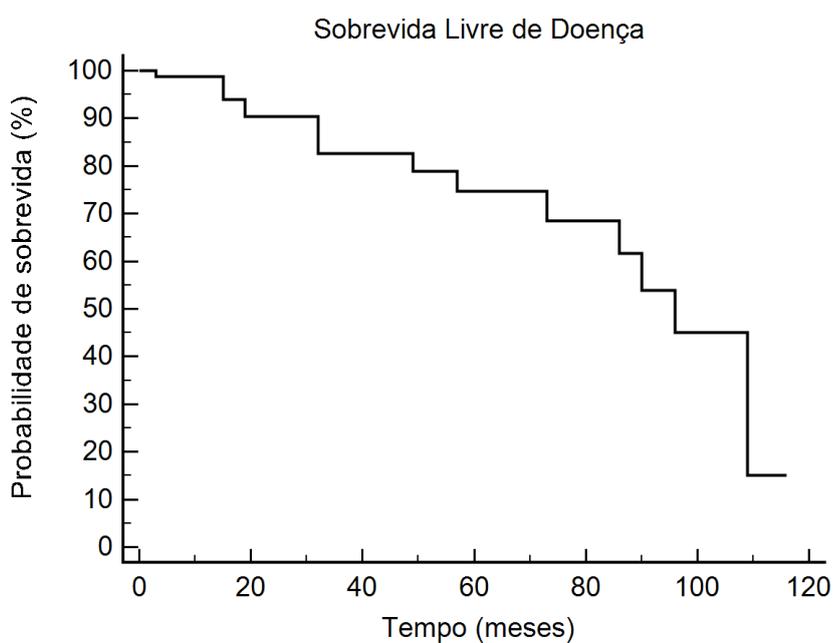
Dos 91 pacientes analisados, pode-se observar que em 60 meses (5 anos) aproximadamente 65% dos pacientes estavam vivos (Gráfico 1) e 75% dos pacientes estavam livres de recorrência (Gráfico 2). A sobrevida específica foi medida em meses e avaliada entre o dia inicial do tratamento cirúrgico até a data de óbito ou última informação do paciente. A análise de sobrevida livre da doença também foi realizada em meses e avaliada entre o dia inicial do tratamento cirúrgico até a data de recidiva ou a última informação do paciente.

Gráfico 1 - Sobrevida específica de doença em pacientes com carcinoma de língua e assoalho



Fonte: da autora.

Gráfico 2 - Sobrevida livre de doença em pacientes com carcinoma de língua e assoalho



Fonte: da autora.

As associações entre a marcação imunoistoquímica de α -SMA e as características clínicas e patológicas são mostradas na Tabela 8. Uma significativa correlação entre a marcação de α -SMA e a intensidade do infiltrado inflamatório foi observada ($p= 0,03$).

Tabela 6 - Análise dos parâmetros clínico-patológicos com imunomarcção de α -SMA em pacientes com carcinoma espinocelular de língua e assoalho bucal

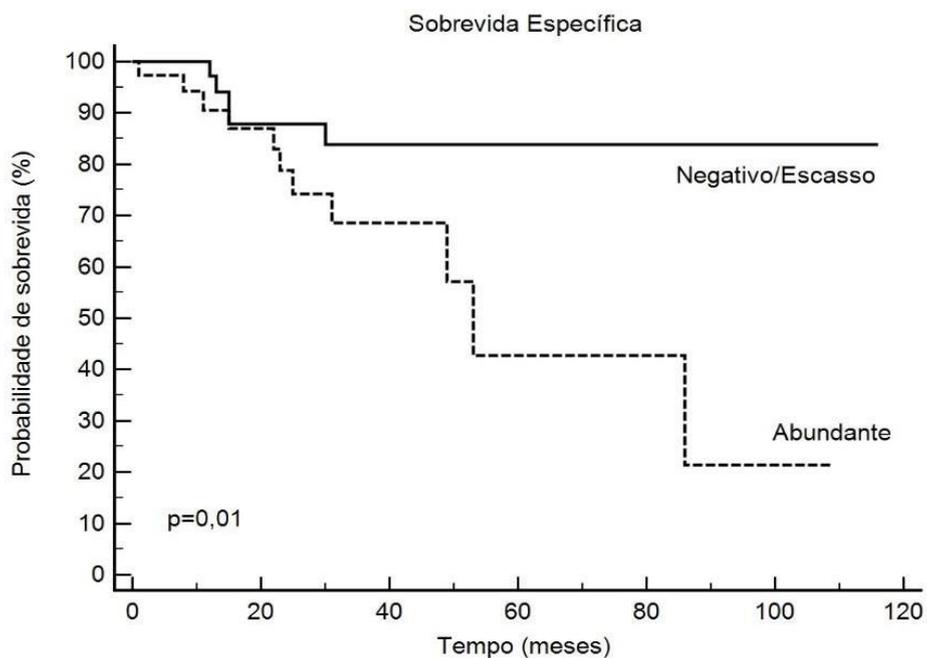
Parâmetros	α -SMA		P valor
	Nº de pacientes (%)	Abundante Nº de pacientes (%)	
Idade			
< 61 anos	22 (55,0)	21 (46,7)	0,44
≥ 61 anos	18 (45,0)	24 (53,3)	
Gênero			
Masculino	30 (75,0)	34 (75,6)	0,95
Feminino	10 (25,0)	11 (24,4)	
Hábito de fumar			
Não	4 (12,5)	4 (11,1)	0,86
Sim	28 (87,5)	32 (88,9)	
Hábito de beber			
Não	10 (34,5)	8 (24,2)	0,38
Sim	19 (65,5)	25 (75,8)	
Estadiamento clínico			
I+II	18 (47,4)	15 (34,1)	0,22
III+IV	20 (52,6)	29 (65,9)	
Sequência de tratamento			
Cirurgia	5 (13,1)	3 (6,6)	0,56
Cirurgia + RxT	15 (39,5)	21 (46,7)	
Cirurgia + RxT + Quimio	18 (47,4)	21 (46,7)	
Margens cirúrgicas			
Livres	17 (50,0)	19 (50)	1,00
Comprometidas	17 (50,0)	19 (50)	
Recidiva/metástase			
Não	27 (71,1)	38 (88,4)	0,22
Sim	11 (28,9)	5 (11,6)	

Invasão perineural			
Não	11 (50,0)	15 (39,5)	
Sim	11 (50,0)	23 (60,5)	0,43
Intensidade do infiltrado inflamatório			
Escassa	12 (30,0)	10 (22,2)	0,03
Moderada	20 (50,0)	33 (73,3)	
Abundante	8 (20,0)	2 (4,4)	
Classificação da OMS			
Bem diferenciado	7 (17,5)	6 (13,3)	0,31
Moderado diferenciado	28 (70,0)	37 (82,2)	
Pobre diferenciado	5 (12,5)	2 (4,5)	

Fonte: da autora.

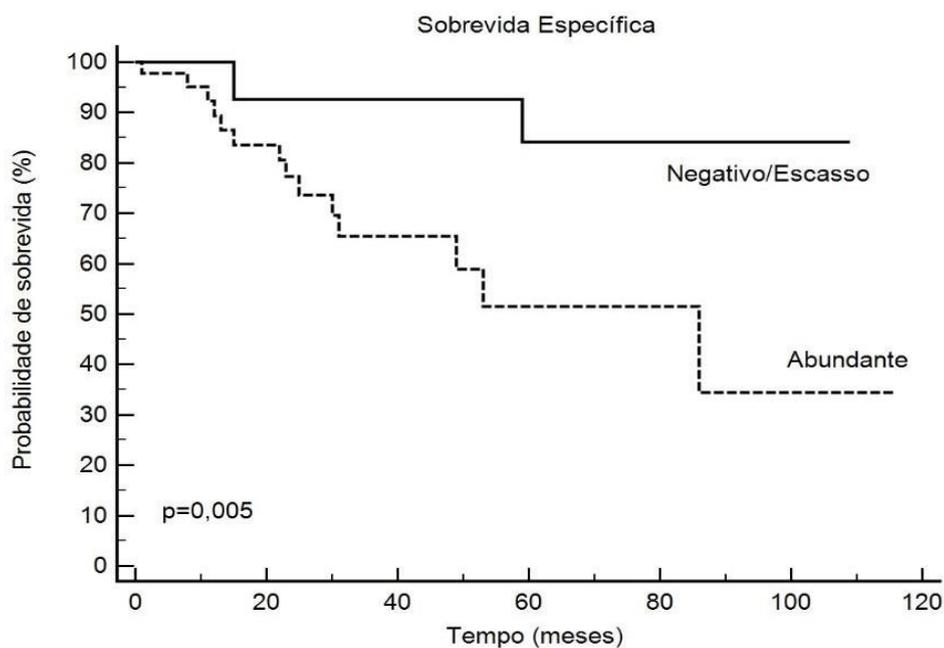
De acordo com as curvas de sobrevida construídas com base no método de Kaplan-Meier, sobrevida específica de doença correlacionada com imunomarcção de α -SMA na frente de invasão e no estroma tumoral (Gráfico 3 e 4), mostrou significância em ambos ($p=0,01$ e $p=0,005$, respectivamente). Em 60 meses, observou-se que na frente de invasão a sobrevida específica foi de aproximadamente 43% e no estroma tumoral aproximadamente 50%. A sobrevida livre de doenças também foi correlacionada com a imunomarcção de α -SMA na frente de invasão e no estroma tumoral (Gráfico 5 e 6), porém não houve correlação significativa. Observou-se que na frente de invasão, em 60 meses, aproximadamente 65% dos pacientes estariam livres de recorrência e que no estroma tumoral, aproximadamente 75% dos pacientes estariam livres de recorrência.

Gráfico 3 - Sobrevida específica de doença correlacionada com imunomarcção de α -SMA em frente tumoral em pacientes com carcinoma de língua e assoalho bucal



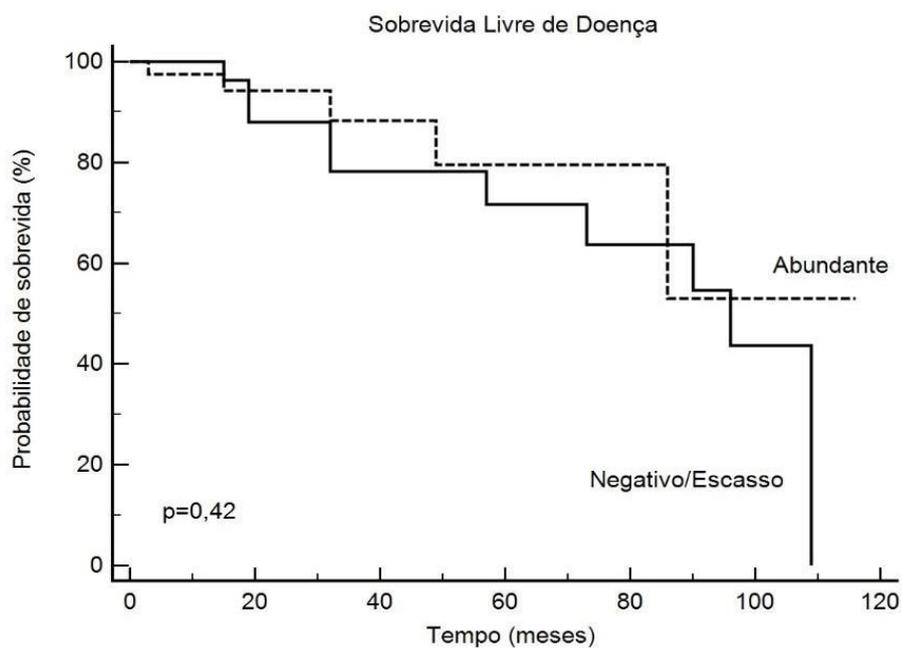
Fonte: da autora.

Gráfico 4 - Sobrevida específica de doença correlacionada com imunomarcção de α -SMA em estroma tumoral em pacientes com carcinoma de língua e assoalho bucal



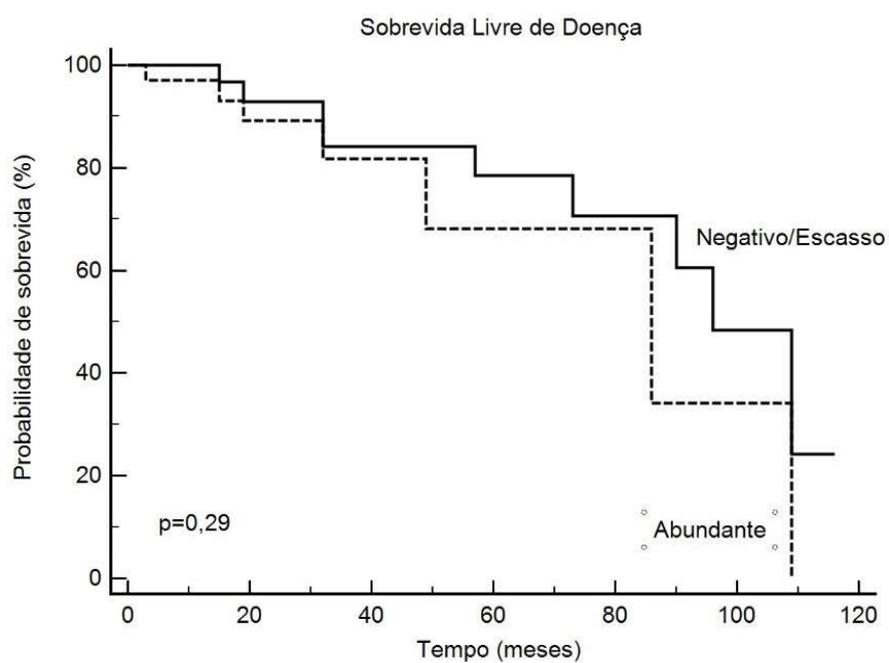
Fonte: da autora.

Gráfico 5 - Sobrevida livre de doença correlacionada com imunomarcção de α -SMA em estroma tumoral em pacientes



Fonte: da autora.

Gráfico 6 - Sobrevida livre de doença correlacionada com imunomarcção de α -SMA em frente tumoral em pacientes com carcinoma de língua e assoalho bucal



Fonte: da autora

Considerado os parâmetros clínico-patológico indicados na Tabela 9, nenhum parâmetro clínico-patológico correlacionou significativamente com sobrevida específica de doença. No entanto, margens cirúrgicas mostrou uma tendência à significância ($p=0,07$) para sobrevida específica de doença. Já na Tabela 10, sequência de tratamento correlacionou significativamente com sobrevida livre de doença ($p=0,02$), e este resultado permaneceu ($p=0,009$) na análise multivariada de Cox após ajuste para outros fatores prognósticos (Tabela 11).

Tabela 7 - Análise univariada para sobrevida específica de doença com parâmetros clínicos-patológicos em pacientes com carcinoma espinocelular de língua e assoalho bucal

Parâmetros	Sobrevida específica			P valor
	Nº de pacientes (%)	% em 5 anos	HR (95% CI)	
Idade				
< 61 anos	44 (50,0)	80,8	Referência	0,20
≥ 61 anos	44 (50,0)	40,4	1,85 (0,71 – 4,82)	
Gênero				
Masculino	66 (75,0)	67,3	Referência	0,87
Feminino	22 (25,0)	58,6	1,10 (0,35 – 3,50)	
Hábito de fumar				
Não	9 (12,3)	41,7	Referência	0,60
Sim	64 (87,7)	69,9	0,63 (0,11 – 3,62)	
Hábito de beber				
Não	19 (28,8)	63,5	Referência	0,74
Sim	47 (71,2)	67,5	1,23 (0,36 – 4,14)	
Estadiamento clínico				
I+II	36 (41,4)	83,5	Referência	0,20
III+IV	51 (58,6)	56,1	1,87 (0,71 – 4,90)	
Sequência de tratamento				
Cirurgia	10 (11,36)	-	Referência	0,42
Cirurgia + RxT	37 (42,04)	69,6	1,31 (0,50 – 3,42)	
Cirurgia + RxT + QT	41 (46,6)	55,1		
Margens cirúrgicas				
Livres	39 (52,0)	77,7	Referência	0,07
Comprometidas	36 (48,0)	56,4	2,64 (0,91 – 7,63)	
Invasão perineural				
Não	25 (47,7)	67,5	Referência	0,62
Sim	35 (58,3)	58,3	0,76 (0,26 – 2,22)	
Resposta linfocitária				
Escassa	21 (23,8)	68,8	Referência	0,78
Moderada	56 (63,6)	62,1	1,15 (0,40 – 3,27)	
Abundante	11 (12,6)	80,0		

Fonte: da autora.

Tabela 8 - Análise univariada para sobrevida livre de doença com parâmetros clínicos-patológicos em pacientes com carcinoma espinocelular de língua e assoalho bucal

Parâmetros	Sobrevida livre de doença			P valor
	Nº de pacientes (%)	% em 5 anos	HR (95% CI)	
Idade				
< 61 anos	44 (50,0)	80,2	Referência	0,62
≥ 61 anos	44 (50,0)	62,6	0,77 (0,26 – 2,24)	0,90
Gênero				
Masculino	66 (75,0)	78,8	Referência	0,19
Feminino	22 (25,0)	51,3	1,08 (0,28 – 4,06)	
Hábito de fumar				
Não	9 (12,3)	55,6	Referência	0,33
Sim	64 (87,7)	78,6	0,22 (0,02 – 2,11)	
Hábito de beber				
Não	19 (28,8)	52,7	Referência	0,33
Sim	47 (71,2)	80,8	0,49 (0,12 – 2,02)	
Estadiamento Clínico				
I+II	36 (41,4)	66,0	Referência	0,30
III+IV	51(58,6)	82,9	0,58 (0,21 – 1,62)	
Sequência de tratamento				
Cirurgia	10 (11,4)	80,0	Referência	0,02
Cirurgia + RxT	37 (42,0)	87,4	0,43 (0,05 – 3, 87)	
Cirurgia + RxT + QT	41 (46,6)	63,9		
Margens cirúrgicas				
Livres	39 (52,0)	77,6	Referência	0,29
Comprometidas	36 (48,0)	63,1	1,81 (0,60 – 5,42)	
Invasão perineural				
Não	25 (41,7)	78,4	Referência	0,90
Sim	35 (58,3)	78,2	0,90 (0,21 – 3,81)	
Resposta linfocitária				
Escassa	21 (23,9)	69,5	Referência	0,33
Moderada	56 (63,6)	85,6	0,50 (0,18 – 1,37)	
Abundante	11 (12,5)	37,5		

Fonte: da autora.

Tabela 9 - Análise multivariada para sobrevida livre de doença com parâmetros clínicos-patológicos em pacientes com carcinoma espinocelular de língua e assoalho bucal

Parâmetros	Sobrevida livre de doença	P valor
	HR (95% CI)	
Sequência de tratamento	Referência	
Cirurgia	8,75 (1,70 – 44,99)	0,009
Cirurgia + RxT		
Cirurgia + RxT + QT		

Fonte: da autora.

Ao analisar a imunopressão de α -SMA em relação à sobrevida dos pacientes, observou-se que a abundante expressão de α -SMA interferiu significativamente na sobrevida específica (risco de morte) de doença ($p=0,005$; OR: 3,94; IC 95%: 1,50-10,34) dos pacientes (Tabela 12), e ainda este resultado permaneceu ($p=0,044$) na análise multivariada de Cox após ajuste para outros fatores prognósticos (Tabela 13). Considerando a sobrevida em 5 anos, 51,5% dos pacientes que apresentaram expressão abundante de α -SMA sobreviveram, e 84,2% dos pacientes sobreviveram quando apresentavam tumores com escassa ou negativa expressão de α -SMA, tendo um risco de morte de 3,94 vezes quando os pacientes apresentavam abundante expressão do marcador.

Tabela 10 - Características da imunomarcagem de α -SMA e análise univariada para sobrevida específica e livre de doença de pacientes com carcinoma espinocelular de língua e assoalho bucal

Parâmetros	Sobrevida específica de doença	P valor	Sobrevida livre de doença	P valor
	HR (95% CI)		HR (95% CI)	
Alfa-SMA	Referência		Referência	
Negativo/Escasso	3,94 (1,50 – 10,34)	0,005	0,64 (0,22 – 1,90)	0,42
Abundante				

Fonte: da autora.

Tabela 11 - Análise multivariada para sobrevida específica de doença com a imunomarcção de α -SMA em pacientes com carcinoma espinocelular de língua e assoalho bucal

Parâmetros	Sobrevida específica		P valor
	HR (95% CI)		
Alfa-SMA	Referência		0,04
Negativo/Escasso	5,26 (1,03 – 26,71)		
Abundante			

Fonte: da autora.

Ao analisar se a imunoeexpressão de α -SMA estava relacionada às diferentes classificações de estadios T da AJCC (7ª e 8ª edição), observou-se que não houve diferença significativa (Tabelas 14 e 15). O mesmo resultado foi encontrado quando se avaliou as diferentes classificações de estadios T da AJCC (7ª e 8ª edição) e sobrevida (Tabelas 16 e 17).

Tabela 12 - Características da imunomarcção de α -SMA e estadios T da 7ª edição da AJCC em pacientes com carcinoma espinocelular de língua e assoalho bucal

7ª edição AJCC	Nº de pacientes (%)		P valor
	Negativo/Escasso	Abundante	
T1	8 (27,6)	4 (17,4)	0,36
T2	12 (41,4)	12 (52,2)	
T3	6 (20,7)	2 (8,7)	
T4	3 (10,3)	5 (21,7)	
T1/T2	20 (69,0)	16 (69,6)	0,96
T3/T4	9 (31,0)	7 (30,4)	

Fonte: da autora.

Tabela 13 - Características da imunomarcção de α -SMA e estadio T da 8ª edição da AJCC em pacientes com carcinoma espinocelular de língua e assoalho bucal

8ª edição AJCC	Nº de pacientes		P valor
	Negativo/Escasso	Abundante	
T1	5 (17,2)	1(4,6)	0,40
T2	18 (62,2)	14 (63,6)	
T3	3 (10,3)	2 (9,1)	
T4	3 (10,3)	5 (22,7)	
T1/T2	23 (79,3)	15 (68,2)	0,37
T3/T4	6 (20,7)	7 (31,8)	

Fonte: da autora.

Tabela 14 - Análise de sobrevida específica e sobrevida livre de doença dos casos de carcinoma espinocelular de língua e assoalho bucal com o estadio T da 7ª Edição da AJCC

Parâmetros	Sobrevida específica de doença	P valor	Sobrevida livre de doença	P valor
	HR (95% CI)		HR (95% CI)	
T1/T2	1,85 (0,38 - 8,92)	0,44	0,49 (0,098 - 2,44)	0,38
T3/T4	0,54 (0,11 - 2,60)		2,04 (0,41 - 10,22)	

Fonte: da autora.

Tabela 15 - Análise de sobrevida específica e sobrevida livre de doença dos casos de carcinoma espinocelular de língua e assoalho bucal com o estadio T da 8ª Edição da AJCC

Parâmetros	Sobrevida específica de doença	P valor	Sobrevida livre de doença	P valor
	HR (95% CI)		HR (95% CI)	
T1/T2	1,68 (0,35 - 8,17)	0,52	0,42 (0,09 - 1,96)	0,27
T3/T4	0,59 (0,12 - 2,87)		2,37 (0,51 - 11,01)	

Fonte: da autora.

6 DISCUSSÃO

Várias dificuldades são identificadas no planejamento do tratamento mais assertivo 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 que é pacientes com tumores em localização anatômicas e estadiamentos semelhantes serem 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 indo a óbito em pouco tempo devido à recidivas, metástases regionais ou à distância (JERJES et al., 2010; KURIAKOSE, 2017). Em virtude dessas dificuldades, grandes esforços estão sendo direcionados para a identificação de características e marcadores tumorais visando auxiliar a determinação de um plano de tratamento individualizado, bem como, na predição do prognóstico dos pacientes com CEC oral. Neste contexto, várias características moleculares e histopatológicas têm sido propostas como fatores prognósticos do CEC oral, porém nenhum marcador está em uso na rotina clínica (WARNAKULASURIYA, 2009; JERJES et al., 2010; ALMANGUSH et al., 2017; RIVERA et al., 2017; KURIAKOSE, 2017, DOURADO et al., 2018a; GRAIZEL et al., 2019). Assim, buscando validar o valor prognóstico de um marcador tumoral, avaliamos a presença de CAFs, no estroma e frente de invasão tumoral, correlacionando a densidade celular com as variáveis clínico-patológicas, de recorrência, de metástase e de sobrevida.

Corroborando estudos anteriores (RIVERA, 2015; DE SANTIS, et al., 2017), nossos resultados demonstraram que a maioria dos pacientes eram do gênero masculino, acima de 60 anos de idade, tabagistas e etilistas. 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, et al., 2007; RIVERA, 2015; DE SANTIS, et al., 2017). 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 de acordo com Aguiar, et al. (2007). Rodrigues, et al., (2014) relacionaram o fumo do tabaco como fator prognóstico independente para sobrevida global e sobrevida específica para o CEC oral.

Os locais anatômicos mais comuns para a apresentação do câncer oral são a língua (borda ventral-lateral, 40% dos casos) e o assoalho de boca (30% dos casos) (RIVERA, 2015). Pesquisas evidenciam que o CEC nestes locais apresenta maior capacidade de invasão e disseminação, além de apresentar uma tumorigênese provavelmente diferente dos outros locais da cavidade oral (SATHYAN et al., 2006; VERED et al., 2010).

Independentemente da acessibilidade da cavidade oral durante o exame clínico, o câncer oral geralmente é diagnosticado em estádios avançados em países subdesenvolvidos, como o Brasil, e os motivos mais prováveis para este fato são o diagnóstico tardio ou errado inicial e a falta de conhecimento do paciente ou do profissional que trata, o que, evidentemente, diminui a sobrevida (MARKOPOULOS, 2012; RIVERA; 2015). O estadiamento clínico tardio (III e IV) esteve presente em 57,14% dos pacientes analisados neste estudo e em relação ao sistema TNM, a prevalência foi de tumores T1 e T2 (63,74%).

Considerando a sobrevida dos pacientes, observou-se que em 60 meses, aproximadamente, 65% dos pacientes estavam vivos e 75% dos pacientes estavam livres de recorrência. 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; NG et al., 2017). As taxas de sobrevida de 5 anos para o CEC oral no Brasil variam de 35% a 85% para os tumores em estadio 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 pacientes estão sendo tratados com modalidades terapêuticas associadas como mostram os nossos resultados (45% dos pacientes tratados com cirurgia associado a radioterapia e quimioterapia), e a sequência de tratamento revelou significância à análise univariada e multivariada de Cox ($p= 0,02$ e $p= 0,009$, respectivamente) para sobrevida livre de doença, após ajuste para outros fatores prognósticos e/ou as margens cirúrgicas podem estar mais amplas como nossos resultados mostraram uma tendência à significância ($p=0,07$) com sobrevida específica de doença.

Rivera (2017) em um estudo de revisão sistemática, não identificou nenhum marcador prognóstico associado ao CEC oral. Em contraste, os componentes do microambiente tumoral (por exemplo, células inflamatórias, células endoteliais e células estromais) tem mostrado uma importante contribuição para a progressão do

tumor, com relevante impacto na sobrevida dos pacientes (DAYAN et al. 2012; HANLEY et al, 2018; DOURADO et al. 2018a; GRAIZEL et al., 2019; PELTANOVA et al., 2019). Mais especificamente, os CAFs representam um dos componentes mais dominantes do microambiente tumoral presente em todos os estágios da progressão e ainda, produzem uma grande diversidade de fatores moleculares que reforçam a proliferação das células tumorais, remodelam a estrutura da MEC, alteram as propriedades metabólicas das células tumorais, reprogramam a resposta imune antitumoral, facilitam o processo metastático e influenciam a resistência à terapia e, se não bastassem, estão relacionados ao prognóstico ruim em vários tipos de câncer, incluindo o CEC oral (KELLERMANN et al., 2007; KELLERMANN et al., 2008; KAWASHIRI et al., 2009; VERED et al., 2010; BELLO et al., 2011; MARSH et al., 2011; DAYAN et al., 2012; KALLURI, 2016; LIU et al. 2016; MEZAWA e ORIMO, 2016; BAGORDAKIS et al., 2016; PARAJULI et al., 2017; DOURADO et al., 2018a; DOURADO et al., 2018b; HANLEY et al., 2018; GRAIZEL et al., 2019; HUET et al., 2019; PELTANOVA et al, 2019; VERED et al., 2019). No entanto, apesar das evidências demonstrarem o papel pro-tumorigênico dos CAFs, os dados especificando seu valor prognóstico ainda são limitados na carcinogênese oral.

Com o propósito de avaliar o valor prognóstico de CAFs em estroma tumoral e frente de invasão em amostras de CEC exclusivamente de língua e assoalho bucal, este trabalho correlacionou a imunomarcção de α -SMA com as características clinico-patológicas dos pacientes afetados pela neoplasia maligna. Observou-se que a intensidade do infiltrado inflamatório ($p=0,03$) foi correlacionada significativamente com imunomarcção de α -SMA, evidenciando que intensidade moderada do infiltrado inflamatório está correlacionada com abundante expressão de α -SMA. Evidências científicas mostram que células imunes e inflamatórias podem ter efeitos pro-tumorais e parece que a composição do infiltrado inflamatório no microambiente tumoral é mais importante do que a abundância de células no estroma tumoral (VERED et al., 2010; SALO et al, 2014; IMURA et al., 2005; ESSA et al., 2014; CHAUDHARY et al, 2014; MURPHY et al., 2014; SANTOS et al., 2017). Dayan et al. (2012) caracterizaram o infiltrado inflamatório de 64 casos de CEC de língua mostrando que a densidade de CAFs foi inversamente correlacionada com a intensidade do infiltrado inflamatório, porém houve correlação positiva com um infiltrado inflamatório mais pro-tumorigênico e anti-inflamatório composto por células T reguladoras, macrófagos associados a

tumor e potencialmente células imunes indutoras de células T regulatórias (DAYAN et al., 2012).

Em relação à sobrevida dos pacientes, foi significativa a correlação entre o risco aumentado de morte (sobrevida específica de doença) ($p=0,005$ para estroma tumoral e $p=0,01$ para frente tumoral) e a abundância da expressão de α -SMA, persistindo a significância na análise multivariada de Cox ($p= 0,04$). Considerando a sobrevida em 5 anos, 51,5% dos pacientes que apresentaram expressão abundante de α -SMA em estroma tumoral e 45% dos pacientes que apresentaram expressão abundante de α -SMA em frente tumoral, sobreviveram. Em relação a pacientes com tumores com escassa ou negativa expressão de α -SMA em estroma tumoral e frente de invasão, 84,2% e 85% dos pacientes sobreviveram, respectivamente. O risco de morte aumentou para 3,94 vezes quando houve abundante expressão do marcador. Consolidando os resultados obtidos neste estudo, trabalhos presentes na literatura descrevem a associação significativa entre a densidade de CAFs e diminuição da sobrevida geral e ainda confirmam que a presença de CAFs é um marcador prognóstico significativo para sobrevida geral (BELLO et al., 2011; VERED et al., 2010; MARSH et al., 2011; DAYAN et al., 2012; DING et al., 2014; LI et al., 2015; LUKSIC et al., 2015; DOURADO et al., 2018a). Em 2019, Graizel et al., em uma revisão sistemática e meta-análise, verificaram que pacientes com alta densidade de CAFs apresentaram um risco significativamente maior de morrer da doença do que aqueles com baixa densidade de CAFs, considerando assim como um forte fator prognóstico negativo para os pacientes com CEC oral. Além disso, os autores sugeriram que um ponto de corte clinicamente validado para a densidade de CAFs poderia servir como uma ferramenta confiável de prognóstico.

Um dos principais objetivos da classificação TNM é fornecer aos clínicos informação a respeito do prognóstico eficiente para distinguir pacientes de baixo risco, que serão tratados com cirurgia exclusiva, de pacientes com alto risco, que receberão além de cirurgia com esvaziamento cervical, tratamento complementar com radio e/ou quimioterapia. A mais recente classificação da AJCC (8ª edição) incorporou o DOI no estadio T com o objetivo de aumentar o poder prognóstico do sistema TNM (AMIN et al., 2017). Neste trabalho analisamos o efeito desta modificação em 52 amostras de CEC de língua e assoalho bucal. Identificamos que metade dos casos classificados como T1 e T3 de acordo com a 7ª edição da AJCC se tornaram T2 na 8ª edição da

AJCC e com isso não houve interferência em sobrevida e na relação com a abundância dos CAFs. O que poderia justificar esta migração para T2 seria o intervalo extenso entre 5mm e 10mm de DOI proposto para T2 na 8ª edição da AJCC. Por isso vários estudos na literatura investigam novos pontos de corte, como por exemplo de 2mm a 4mm para T2, a fim de minimizar este intervalo e melhorar a definição da estratificação de prognóstico com esta nova classificação incorporando o DOI (ALMANGUSH et al., 2018b). Vários estudos recentes tem avaliado o valor prognóstico do DOI e relatado consistentes resultados como um parâmetro promissor de prognóstico para CEC oral (MELCHERS et al., 2012; MELKANE et al., 2012; PIAZZA et al., 2014; ALMANGUSH et al., 2015; XIE et al., 2015; ALMANGUSH et al. 2018b; VUITY et al., 2018; BOEVE et al., 2019).

Vale ressaltar que o DOI tem sido um fator prognóstico independente para casos pT1/T2, mas não tem discriminado o risco em pacientes com doença pT3/T4 (MATOS et al., 2017; ALMANGUSH et al., 2018a; VUITY et al., 2018). Embora o ponto de corte tenha variado neste estudos, o valor de 4mm tem sido bastante utilizado e sugerido como um ponto de corte ideal em estudos de meta análises de CEC oral (HUANG et al., 2009). Ainda ressaltamos a dificuldade de avaliar com acurácia o DOI através de imagem em casos de CEC oral extensos o que representou uma limitação da nossa análise uma vez que 41 casos foram descartados por conta desta condição. Em suma nossos resultados demonstraram que a abundância de CAFs, tanto no estroma quanto no fronte de invasão tumoral, foi associada com pior sobrevida específica de pacientes com CEC de língua e assoalho bucal, sugerindo seu potencial marcador para a predição prognóstica. Além disso, mais estudos precisam ser encorajados para melhor definir o ponto de corte do estadio T da 8ª edição da AJCC afim de potencializar a discriminação dos casos de CEC oral, e para melhor forma de incorporar e mensurar o DOI, através de exames de imagem, no pré-operatório para que se torne útil no planejamento terapêutico.

7 CONCLUSÃO

Destaca-se que a abundância de CAFs, tanto no estroma quanto no fronte de invasão tumoral, foi associada com pior sobrevida específica de pacientes com CEC de língua e assoalho bucal, sugerindo seu potencial papel como marcador para a predição prognóstica. Além disso, mais estudos precisam ser encorajados para melhor definir o ponto de corte do estadio T da 8ª edição da AJCC afim de potencializar a discriminação dos casos de CEC oral, e para melhor forma de incorporar e mensurar o DOI, através de exames de imagem, no pré-operatório para que se torne útil no planejamento terapêutico.

REFERÊNCIAS

ALBINI, A.; SPORN, M.B. The tumour microenvironment as a target for chemoprevention. **Nat. Rev. Cancer**, v. 7, p. 139-47, 2007.

ALI, J., et al. Genetic etiology of oral cancer. **Oral Oncology**, v.70, p.23–28, 2017.

ALMANGUSH A. et al. A simple novel prognostic model for early stage oral tongue cancer. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 44, p. 143–150, 2015.

ALMANGUSH, A. et al. Tumour budding in oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis. **British journal of cancer**, v.118, p. 577–586, 2018.

ALMANGUSH, A. et al. Small oral tongue cancers (≤ 4 cm in diameter) with clinically negative neck: from the 7th to the 8th edition of the American Joint Committee on Cancer. **Virchows Archiv**, v. 473, p.481–487, 2018.

ANATÔMICAS, Regiões. Carcinoma epidermóide da cabeça e pescoço. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, p. 361-76, 2001.

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. **Tumor Biol.**, v. 37, p. 9045–9057, 2016.

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

BELLO, I. O.; SOINI, Y.; SALO, T. Prognostic evaluation of oral tongue cancer: means, markers and perspectives (I). **Oral oncology**, v. 46, n. 9, p. 630–5, Sept, 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, 2011.

BOEVE, K, et al. Addition of tumour infiltration depth and extranodal extension improves the prognostic value of the pathological TNM classification for early-stage oral squamous cell carcinoma. **Histopathology**, v.75, p. 329– 337, 2019.

BOFFETTA, P. et al. “The burden of cancer attributable to alcohol drinking.

International Journal of Cancer, v.11, p. 884-7, 2006.

BUYSE, M. et al. Integrating biomarkers in clinical trials. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 11:2, p. 171-182, 2011.

CANCER GENOME ATLAS NETWORK. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. **Nature**, v. 29, n. 517, (7536) p. 576-82, Jan. 2015.

CHAPMAN, S. et al. Cigarette smoke extract induces oral squamous cell carcinoma cell invasion in a receptor for advanced glycation end-products-dependent manner. **Eur J Oral Sci.**, v. 126, p: 33 – 40, 2017.

CHAUDHARY, B. et al. Phenotypic alterations, clinical impact and therapeutic potential of regulatory T cells in cancer. **Expert. Opin. Biol. Ther.**, v 14, p. 931-45, 2014.

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. 401-21, Sep-Oct. 2015.

CONTRAN; KUMAR; ROBBINS. **Patologia-bases patológicas das doenças**, 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005.

CURRY, J.M. et al. Tumor microenvironment in head and neck squamous cell carcinoma. **Semin. Oncol.**, v. 41, n. 2, p. 217-34, 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. 1799-805, 2014.

DAYAN D. et al. Molecular crosstalk between cancer cells and tumor microenvironment components suggests potential targets for new therapeutic approaches in mobile tongue cancer. **Cancer Med**, v. 1, p: 128 -40, 2012.

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 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, Nov, 2008.

DENG, W. Overexpression of MMPs functions as a prognostic biomarker for oral cancer patients: a systematic review and meta-analysis. **Oral Health Prev Dent**, n. 6, p. 505-514, Dec, 2019.

DIMANCHE-BOITREL, M.T. et al. In vivo and in vitro invasiveness of a rat coloncancer cell line maintaining e-cadherin expression: an enhancing role of tumor-associated myofibroblasts. **Int. Journal Cancer**, v. 56, p. 512–521, 1994.

DING, L.; et al. α -Smooth muscle actin-positive myofibroblasts, in association with epithelial-mesenchymal transition and lymphogenesis, is a critical prognostic parameter in patients with oral tongue squamous cell carcinoma. **Journal Oral Pathology Med.**, v. 43, n. 5, p. 335-43, May. 2014.

DOMINGUETTI, C.B. Avaliação do modelo de profundidade e brotamento tumoral em carcinoma espinocelular oral e caracterização de marcadores como fator prognóstico, 2018.

DOURADO, M. R. et al. Prognostic value of the immunohistochemical detection of cancer-associated fibroblasts in oral cancer: a systematic review and meta-analysis. **J Oral Pathology Medicine**, v. 47, p. 443- 453, 2018.

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.

DOURADO, M.R. et al. Extracellular vesicles derived from cancer-associated fibroblasts induce the migration and invasion of oral squamous cell carcinoma. **Journal of Extracellular Vesicles**, v. 8:1, 1578525, 2019.

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- 875, sep. 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.

ESTIMATIVA 2018: Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: **Instituto Nacional de Câncer**, Rio de Janeiro, v. 41, 2018.

FUJII, N. et al. Cancer-associated fibroblasts and CD163-positive macrophages in oral squamous cell carcinoma: their clinicopathological and prognostic significance. **Journal Oral Pathology Med.**, v. 41, n. 6, p. 444-51, July, 2012.

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

GONZALES, C.D. et al. Autophagy, warburg, and warburg reverse effects in human cancer. **Biomed. Res. Int.**, 2014.

GOSHO, M. et al. Study designs and statistical analyses for biomarker research. **Sensors**, v, 12, p. 8966-8986, 2012.

GRAIZEL, D. et al. Oral cancer-associated fibroblasts predict poor survival: Systematic review and meta-analysis. **Oral Dis.**, June, 2019.

HANLEY, J.C. et al. Targeting the myofibroblastic cancer-associated fibroblast phenotype through inhibition of NOX4. **Journal of the National Cancer Institute**, V. 110, n. 1, p: 109-120, Jan. 2018.

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

HONG, K. 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.

HUET, E. et al. Stroma in normal and cancer wound healing. **FEBS J.**, Apr. 2019.

HUSSEIN, A.A. et al. Global incidence of oral and oropharynx cancer in patients younger than 45 years versus older patients: a systematic review. **Eur J Cancer**, v. 82, p 115-127, sep. 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.

International Agency for Research on Cancer. International Association of Cancer Registries. **Incidência futura de câncer e a carga de mortalidade em todo o mundo a partir das estimativas atuais em 2018 até 2040**, [s. l: s. n.], 2015.

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

JOHANSSON, A.C. et al. Cancer-associated fibroblasts induce matrix metalloproteinase-mediated cetuximab resistance in head and neck squamous cell carcinoma cells. **Mol. Cancer Res.**, v. 10, p. 1158–1168, 2012.

JOHNSON, N. W.; JAYASEKARA, P.; AMARASINGHE, A. A. H. K. Squamous cell carcinoma and precursor lesions of the oral cavity: epidemiology and aetiology. **Periodontology 2000**, v. 57, n. 1, p. 19–37, Oct, 2011.

JOHNSON, N.; et al. Squamous cell carcinoma. In: Barnes L, Evenson JW, Reichart P, Sidransky. World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics: **Head and Neck Tumors**, IARC Press: Lyon 2005.

KALLURI R, Z. M. Fibroblasts in cancer. **Nat Rev Cancer**, v.6, p. 392–401, 2006.

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.

KARNOV, K. K. S. et al. Increasing incidence and survival in oral cancer: a nationwide Danish study from 1980 to 2014. **Acta Oncologica**, v. 56, n. p, p: 1204-1209, 2014.

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. Mutual paracrine effects of oral squamous cell carcinoma cells and normal oral fibroblasts: induction of fibroblast to myofibroblast transdifferentiation and modulation of tumor cell proliferation. **Oral Oncol.**, v. 44, n. 5, p. 509-517, 2008.

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. 849-53, Dec. 2007.

KOVRT, H. E. et al. Targeting CD137 enhances the efficacy of cetuximab. **J. Clin. Invest.**, v.124, p. 2668–2682, 2014.

KHARAZIHA, P. et al. Targeting of distinct signaling cascades and cancer associated fibroblasts define the efficacy of sorafenib against prostate cancer cells. **Cell Death Dis.**, v. 3, ed. 262, 2012.

KOWALSKI, L.P.; CARVALHO, A.L. Natural history of untreated head and neck cancer. **European Journal of Cancer**, v. 36, n. 8, p. 1032–7, 2000.

KRAMAN, M.; et al. Suppression of antitumor immunity by stromal cells expressing fibroblast activation protein-alpha. **Science**, v. 330, p. 827–830, 2010.

KUMAR M. et al. Oral cancer: etiology and risk factors: a review. **J Can Res Ther**, v. 12, n. 2, p: 458-63, June, 2016.

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. **Springer**, 2017.

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. 3353-61, Dec. 2009.

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. Alcohol drinking and upper aerodigestive tract cancer mortality: a systematic review and meta-analysis. **Oral Oncol.**, v. 50, n. 4, p. 269-75, Apr. 2014.

LI, Y. et al. Cancer-associated fibroblasts contribute to oral cancer cells proliferation and metastasis via exosome-mediated paracrine miR-34a-5p. **EbioMed.**, sept. 2018.

LYDIATT, W.M., et al. Head and neck cancers—major changes in the American Joint Committee on cancer eighth edition cancer staging manual. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v.67, p.122-137, 2017.

LIN, N. et al. Significance of oral cancer-associated fibroblasts in angiogenesis, lymphangiogenesis, and tumor invasion in oral squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med.**, n. 46, p:21–30, May, 2017.

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. 1817–23, 2013.

LIU L; LIU L; YAO HH, et al. Stromal myofibroblasts are associated with poor prognosis in solid cancers: a meta-analysis of published studies. **PloS One**, v. 11, p. e0159947, 2016.

MADAR, S. et al. Mutant p53 attenuates the anti-tumorigenic activity of fibroblast-secreted interferon beta. **Trends in Mol. Med.**, v. 19, p. 447-453, 2013.

MATOS, L. L.. External validation of the AJCC Cancer Staging Manual, 8th edition, in an independent cohort of oral cancer patients. **Oral Oncology**, v.71, p. 47-53, 2017.

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.

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. 470-81, Mar. 2011.

MARTINEZ-OUTSCHOORN, E. U; LISANTI, M.P.; SOTGLIA F. et al. Catabolic cancer-associated fibroblasts transfer energy and biomass to anabolic cancer cells, fueling tumor growth. **Seminars in Cancer Biology**, v.25, p:47–60, 2014.

MB, Amin et al. Ed. Manual de estadiamento do câncer AJCC. 8th ed. **Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, p 93-99, Mar, 2017.

MELCHERS L.J. et al. Tumour infiltration depth P4 mm is an indication for an elective neck dissection in pT1cN0 oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol.**, v. 48, p. 337–42, 2012.

MELKANE A.E. et al. Sentinel node biopsy in early oral squamous cells carcinomas: A 10-yers experience. **The Laryngoscope**, v. 122, p. 1782-1788, 2012.

MEZAWA Y, ORIMO A. The roles of tumor - and metastasis -promoting carcinoma - associated fibroblasts in human carcinomas. **Cell Tissue Res**, v. 365, p: 675 -89, 2016.

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

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

NG, J. H., et al. Changing epidemiology of oral squamous cell carcinoma of the tongue: a global study. **Head & Neck**, v .39, n. 2, p:297–304, 2016.

ORIMO, A.; WEINBERG, R.A. Heterogeneity of stromal fibroblasts in tumors. **Cancer Biol.**, v. 6, p. 618–619, Ther. 2007.

PAI, S.I. e WESTRA, W.H. Molecular pathology of head and neck cancer: implications for diagnosis, prognosis, and treatment. **Annu Rev Pathol.**, v. 4, p. 49-70, 2009.

PARAJULI H, et al. Integrin $\alpha 11$ is overexpressed by tumour stroma of head and neck squamous cell carcinoma and correlates positively with alpha smooth muscle actin expression. **J Oral Pathol Med**, v. 46, p. 267-75, 2017.

PAVLIDES, S. et al. The reverse warburg effect: aerobic glycolysis in câncer associated fibroblasts and the tumor stroma. **Cell Cycle**, v. 8, p. 3984–4001, 2009.

PELTANOVA, B. et al. Effect of tumor microenvironment on pathogenesis of the head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review. **Molecular Cancer**, v. 18, n. 1, p. NA, Jan. 2020.

PIAZZA C. et al. Is it time to incorporate 'depth of infiltration' in the T staging of oral tongue and floor of mouth cancer? **Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg.**, v. 22, p 81-9, Apr 2014.

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**, New York; 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. 460-7, Sep-Oct. 2013.

PÖSCHL, G. e SEITZ, H. K. **Alcohol and cancer**, Alcohol and alcoholism, v. 39, p. 155-165, May 2004.

REGEZI, J.A.; SCIUBBA, J.J. Oral pathology-clinical pathologic correlations. 5. ed. Rio de Janeiro: **Elsevier**, 2008.

RIVERA, C. and 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. 11884-94, Sep. 2015.

RIVERA, C. et al. Prognostic biomarkers in oral squamous cell carcinoma: A systematic review. **Oral Oncology**, v. 72, p. 37-47, Sep. 2017.

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.

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.

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

SATHYAN, K. M. et al. Influence of single nucleotide polymorphisms in H-Ras and cyclin D1 genes on oral câncer susceptibility. **Oral Oncology**, v.42, n.6, p. 607-613, 2006.

SEITZ, H. K., STICKEL, F. Molecular mechanisms of alcohol-mediated carcinogenesis. **Nature Reviews Cancer**, v. 7, p. 599–612, 2007.

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. 2443-58, Dec. 2015.

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.

STUELTEN, C.H.; et al. Breast cancer cells induce stromal fibroblasts to express MMP-9 via secretion of TNF- α and TGF- β . **Journal Cell Sci.**, v. 118, p. 2143–2153, 2005.

TIRELLI, G. et al. Prognosis of oral cancer: a comparison of the staging systems given in the 7th and 8th editions of the American Joint Committee on Cancer Staging Manual. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 56, p. 8-13, 2018.

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

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. Tumor-host histopathologic variables, stromal myofibroblasts and risk score, are significantly associated with recurrent disease in tongue cancer. **Cancer Sci.**, v. 101, n. 1, p. 274-80, Jan. 2010.

VUITY, D. et al. Is the 8th edition of the Union for International Cancer Control staging of oral cancer good enough? **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 56, p. 272-277, 2018.

XIE, N. et al. Decreased miR-320a promotes invasion and metastasis of tumor budding cells in tongue squamous cell carcinoma. **Oncotarget**, v. 7, p. 65744– 65757, 2015.

WANG K, et al. Breast cancer cells alter the dynamics of stromal fibronectin-collagen interactions. **Matrix Biol**, v. 60–61, p. 86–95, 2017.

WARNAKULASURIYA, S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. **Oral Oncol.**, v. 45, n. 4-5, p. 309-16, Apr-May. 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. 385-92, Mar 2014.

WILSON, N. S. et al. An Fcγ receptor-dependent mechanism drives antibody-mediated targetreceptor signaling in cancer cells. **Cancer Cell**, v.19, p101–113, 2011.

WIKBERG, M.L. et al. High intratumoral expression of fibroblast activation protein (FAP) in colon cancer is associated with poorer patient prognosis. **Tumour Biol.**, v. 34, p. 1013–1020, 2013.

WU, J., et al. The role of tumor microenvironment in collective tumor cell invasion. **Future Oncology**, v.13, n.11, p. 991–1002, 2017.

YETE, S.; D'Souza, W.; Saranath, D. High-risk human papillomavirus in oral cancer: clinical implications. **Oncology**, v. 94, n. 3, p: 133–141, 2017.

ANEXO - Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa da UNIFAL

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
ALFENAS



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Validação do modelo BD em carcinomas espinocelular e caracterização de marcadores como fator prognóstico

Pesquisador: LIVIA MARISS RIBEIRO PARANAIBA

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 58517516.1.0000.5142

Instituição Proponente: UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - UNIFAL-MG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.774.045

Apresentação do Projeto:

Trata-se de pedido de emenda a projeto Individual de pesquisa, previamente aprovado por este Comitê em 21/02/2017. Não há conflito de Interesse declarado e o projeto conta com financiamento próprio do pesquisador.

Objetivo da Pesquisa:

O projeto se propõe a estudar amostras de carcinoma espinocelular (CEC) oral armazenadas no laboratório de Patologia Bucal da Universidade Federal de Alfenas (Unifal-MG), obtidas de casos diagnosticados entre os anos de 1996 a 2010. Nestas amostras, os pesquisadores pretendem identificar possíveis marcadores e características tumorais que possam funcionar como preditores do prognóstico do CEC.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os autores sinalizam risco mínimo para a execução da pesquisa, uma vez que a mesma se desenvolverá em amostras de tecidos já coletadas e em dados secundários (prontuários). Como benefícios, este projeto pretende ampliar e melhorar o conhecimento dos eventos genéticos e biológicos relacionados à carcinogênese oral, identificando biomarcadores que possam contribuir na determinação de um diagnóstico e um tratamento individualizado de pacientes com esse tumor. Os benefícios da pesquisa superam os riscos apontados.

Endereço: Rua Gabriel Monteiro de Silva, 700
 Bairro: centro CEP: 37.130-001
 UF: MG Município: ALFENAS
 Telefone: (35)3701-9153 Fax: (35)3701-9153 E-mail: comite.etica@unifal-mg.edu.br

Continuação do Parecer 2.774.045

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa tem relevância clínica, e, como mencionado acima, já foi previamente avaliada e aprovada por este Comitê de Ética em Pesquisa. O pedido de emenda visa adicionar a análise de mais dois marcadores imunistoquímicos (KI-67 e pan-citoqueratina) para avaliação do potencial dos mesmos na predição do prognóstico de CEC. Por se tratar de um pedido de emenda, o projeto já se encontra em fase de execução e tem término previsto para 31/07/2019, restando um período compatível de cerca de 1 ano para a execução dos novos objetivos propostos. Como as amostras já foram coletadas, esse pedido de aditivo não implica em qualquer limitação ética para o desenvolvimento do projeto.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

- a. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) – não se aplica
- b. Termo de Assentimento (TA) – não se aplica
- c. Termo de Assentimento Esclarecido (TAE) – não se aplica
- d. Termo de Compromisso para Utilização de Dados e Prontuários (TCUD) – presente e adequado
- e. Termo de Anuência Institucional (TAI) – presente e adequado
- f. Folha de rosto - presente e adequada
- g. Projeto de pesquisa completo e detalhado - presente e adequado
- h. Outro (Termo de dispensa de apresentação do TCLE) – presente e adequado

Recomendações:

Não há.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Recomenda-se a aprovação da emenda ao 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 Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_114808_6_E1.pdf	05/07/2018 16:31:44		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura	CEC_2018.pdf	05/07/2018 16:21:42	LIVIA MARIS RIBEIRO	Aceito

Endereço: Rua Gabriel Monteiro de Silva, 700
 Bairro: centro CEP: 37.130-001
 UF: MG Município: ALFENAS
 Telefone: (35)3701-9153 Fax: (35)3701-9153 E-mail: comite.etica@unifal-mg.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
ALFENAS



Continuação do Parecer: 2.774.045

Investigador	CEC_2018.pdf	05/07/2018 16:21:42	LIVIA MARIS RIBEIRO	Acelto
Outros	EMENDA_PROJETO_PESQUISA.docx	30/05/2018 11:59:59	LIVIA MARIS RIBEIRO	Acelto
Outros	TCUD.pdf	21/12/2016 16:03:32	LIVIA MARIS RIBEIRO	Acelto
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Dispensa_TCLE.pdf	29/11/2016 12:31:05	LIVIA MARIS RIBEIRO PARANAIBA	Acelto
Folha de Rosto	Folha_de_rosto_ass.PDF	09/08/2016 15:34:01	LIVIA MARIS RIBEIRO	Acelto
Outros	Termo_de_compromisso.jpg	09/08/2016 10:32:22	LIVIA MARIS RIBEIRO	Acelto

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

ALFENAS, 17 de Julho de 2018

Assinado por:
Murilo César do Nascimento
(Coordenador)

Endereço: Rua Gabriel Monteiro de Silva, 700
Bairro: centro CEP: 37.130-001
UF: MG Município: ALFENAS
Telefone: (35)3701-9153 Fax: (35)3701-9153 E-mail: comite.etica@unifal-mg.edu.br