



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM FARMÁCIA

Bruna Fischer Duarte

**PADRONIZAÇÃO DE BIOMARCADORES PARA AVALIAÇÃO PROGNÓSTICA E
INVESTIGAÇÃO DE CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE INTRATUMORAIS NO
CÂNCER DE BOCA POR CITOMETRIA DE FLUXO**

Florianópolis - SC

2022

Bruna Fischer Duarte

**PADRONIZAÇÃO DE BIOMARCADORES PARA AVALIAÇÃO PROGNÓSTICA E
INVESTIGAÇÃO DE CÉLULAS DO SISTEMA IMUNE INTRATUMORAIS NO
CÂNCER DE BOCA POR CITOMETRIA DE FLUXO**

Tese submetida ao Programa de Pós-graduação em
Farmácia da Universidade Federal de Santa Catarina para
a obtenção do título de Doutor em Farmácia.
Orientador: Prof^a. Maria Cláudia Santos da Silva, Dr^a.

Florianópolis - SC

2022

Ficha de identificação da obra elaborada pelo autor, através do Programa de Geração Automática da Biblioteca Universitária da UFSC.

Duarte, Bruna Fischer

Padronização de biomarcadores para avaliação prognóstica e investigação de células do sistema imune intratumorais no câncer de boca por citometria de fluxo / Bruna Fischer Duarte ; orientador, Maria Cláudia Santos Silva, 2022.
144 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Farmácia. 2. Farmácia. 3. Câncer de boca. 4. Citometria de fluxo. 5. Marcadores prognósticos. I. Santos Silva, Maria Cláudia. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Farmácia. III. Título.

Bruna Fischer Duarte

Padronização de Biomarcadores para Avaliação Prognóstica e Investigação de Células do Sistema Imune Intratumorais no Câncer de Boca por Citometria de Fluxo

O presente trabalho em nível de doutorado foi avaliado e aprovado por banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof^a. Ana Carolina Rabello de Moraes, Dr^a.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Felipe Perozzo Daltoé, Dr.
Universidade Federal de Santa Catarina

Prof^a. Dulce Marta Schimieguel Mascarenhas Lima, Dr^a.
Universidade Federal de Sergipe

Certificamos que esta é a **versão original e final** do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de doutor em Farmácia.

Prof^a. Dr^a. Thaís Cristine Marques Sincero
Coordenador(a) do Programa

Prof. Dr.(a) Maria Cláudia Santos da Silva
Orientador(a)

Florianópolis, 2022.

AGRADECIMENTOS

Um trabalho de doutorado não se faz a duas, e nem mesmo à quatro mãos. É necessário a colaboração de muitas pessoas para este sonho se tornar realidade, e eu tive o privilégio de poder contar com pessoas incríveis nesta jornada.

Gostaria de agradecer primeiramente à minha orientadora, prof. Dra. Maria Cláudia Santos da Silva, pela oportunidade, pela confiança e pelo carinho. Os ensinamentos que me passaste carregarei por toda minha vida profissional.

Aos membros da banca examinadora da qualificação e da defesa, pela disponibilidade em avaliar esta tese e pelas contribuições que engrandeceram este trabalho.

Aos pacientes e seus familiares, por permitirem que sua experiência de vida auxilie a tantos outros.

Aos profissionais do Núcleo de Odontologia Hospitalar, em especial Prof. Dra. Liliane J. Grando e Mariah Luz Lisboa, que realizaram as coletas das amostras e pelas contribuições teóricas.

Aos cirurgiões de cabeça e pescoço, Dr. João Henrique Cunha Villela e Dr. Gustavo Phillipi de los Santos, que realizaram as coletas das peças cirúrgicas.

Aos profissionais da Unidade de Laboratório de Anatomia Patológica, em especial a Dra. Daniella Serafim Couto Vieira, que realizou as coletas das peças cirúrgicas, analisou todas as lâminas e pela amizade, incentivo e carinho. E também a Lisléia Golfetto e Manoela Lira Reis, que realizaram todas as lâminas de imuno-histoquímica.

Aos meus colegas e ex-colegas do Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias (LOEH), em especial à Laura, Íris, Lisandra, Chandra, Sandro e Douglas, que me auxiliaram com o processamento e análise das amostras. Mas principalmente pela amizade, pelas risadas, pelo ombro amigo. Sem vocês essa conquista não seria tão alegre.

Ao PGFAR, CNPq e CAPES pelas oportunidades e pelo apoio financeiro para a execução do trabalho.

À Fundação de Amparo à Pesquisa (FAPESC) pelo financiamento que possibilitou a realização deste estudo.

À minha família, em especial à minha mãe, minha filha Alice e Anderson, pelo apoio, pelo incentivo e por serem meu porto seguro. Vocês foram essenciais para que eu pudesse realizar o meu sonho. Amo vocês.

*“Não se trata do peso da pedra.
Mas de porque você a levanta”*

Hugo Girard

RESUMO

O câncer de boca é definido como o conjunto de neoplasias malignas que acometem os lábios, a cavidade oral e a orofaringe e destaca-se pelas suas altas taxas de incidência e mortalidade. Embora o diagnóstico do câncer de boca seja realizado pela análise morfológica, a investigação fenotípica desses tumores pode fornecer dados prognósticos valiosos. Todavia, a imunohistoquímica como ferramenta adicional apresenta diversas limitações técnicas. Nesse sentido, acredita-se que a utilização da análise multiparamétrica por citometria de fluxo pode oferecer excelentes possibilidades para a avaliação de marcadores de prognóstico do câncer de boca. Assim, o objetivo deste trabalho foi validar a imunofenotipagem por citometria de fluxo, como metodologia complementar para a avaliação de marcadores de prognóstico de tumores sólidos de origem epitelial de boca. Precedendo a padronização da citometria de fluxo, constatou-se a necessidade de se conhecer o perfil epidemiológico da população atendida no Hospital Universitário (HU/UFSC/EBSERH). No período de 2013 a 2018 foram diagnosticadas na Unidade de Laboratório de Anatomia Patológica do HU/UFSC/EBSERH 332 neoplasias de boca, dessas, 87,65% foram carcinomas de células escamosas. As regiões anatômicas mais acometidas foram os lábios, seguidos pela língua, amígdala e base de língua. A maioria dos tumores labiais foi diagnosticada em estádios iniciais (I e II), e aproximadamente metade dos tumores de cavidade oral e orofaringe foram diagnosticados em estádios tardios (III e IV), que geralmente estão associados a um mau prognóstico. Considerando a prevalência e a gravidade do câncer de boca na população estudada, considerou-se relevante a validação de uma nova metodologia para avaliação desses tumores. Para isso, 40 amostras de biópsia orais com suspeita de câncer de boca foram desagregadas para obtenção de uma suspensão celular e marcadas com os anticorpos pancitoqueratina, anti-p53, anti-p16. Os resultados obtidos foram comparados com a imunohistoquímica (padrão-ouro). Adicionalmente, foram avaliados o perfil inflamatório das amostras de boca e sua correlação com características clínicas e patológicas. A comparação entre os métodos para avaliação do p16 gerou valores de 81,8% de sensibilidade, 54,5% de especificidade, 64,3% de valor preditivo positivo (VPP) e 75% de valor preditivo negativo (VPN). A concordância entre os testes foi considerada “razoável” ($kappa = 0,364$). A avaliação de p53 gerou valores de 100% de sensibilidade, 33,3% de especificidade, 90,5% de VPP e 100% de VPN. A concordância entre os testes foi considerada “moderada” ($kappa = 0,463$). A análise do marcador de proliferação celular Ki-67 por citometria de fluxo mostrou-se equivalente à imunohistoquímica, com a vantagem de não apresentar viés observacional. A análise dos infiltrados imunes intratumorais mostrou-se plenamente factível com o auxílio da citometria de fluxo. Foram observadas correlações entre a presença de macrófagos, linfócitos B e linfócitos T CD4 e o grau de diferenciação dos tumores. Os resultados deste estudo mostram que a citometria de fluxo é capaz de detectar marcadores prognósticos de câncer de boca, e a sua utilização em conjunto com a análise morfológica e imunohistoquímica pode fornecer dados importantes tanto no estudo clínico de tumores sólidos, como na avaliação prognóstica de pacientes com câncer de boca.

Palavras-chave: Neoplasias bucais. Citometria de fluxo. Imunohistoquímica. Prognóstico. Biomarcadores.

ABSTRACT

Oral cancer is defined as a group of neoplasms that affect the lips, oral cavity and oropharynx and stands out due to its high incidence and mortality rates. Although the diagnosis of oral cancer is well established by morphological analysis, the phenotypic investigation of these tumors can provide valuable prognostic data. However, immunohistochemistry as an additional tool has several technical limitations, in this sense it is believed that the use of multiparametric analysis by flow cytometry can offer excellent possibilities for the prognostic markers assessment of oral cancer. Thus, the objective of this study was to validate flow cytometry immunophenotyping as a complementary methodology for the evaluation of prognostic markers of solid tumors of oral epithelial origin. Preceding the standardization of flow cytometry it was necessary to determine the epidemiological profile of the population attended at the University Hospital (HU/UFSC/EBSERH). From 2013 to 2018, 332 oral neoplasms were diagnosed at the Pathological Anatomy Laboratory Unit of the HU/UFSC/EBSERH, of which 87.65% were squamous cell carcinomas. The anatomical regions most affected were the lips, followed by the tongue, tonsils and base of tongue. Most labial tumors were diagnosed at early stages (I and II), and approximately half of oral cavity and oropharyngeal tumors were diagnosed at late stages (III and IV), which are generally associated with a poor prognosis. Considering the prevalence and severity of oral cancer in the studied population, the validation of a new methodology for evaluating these tumors was considered relevant. For this, 40 oral biopsy samples with suspected oral cancer were disaggregated to obtain a cell suspension and labeled with pan-cytokeratin, anti-p53, anti-p16 antibodies. The results obtained were compared with immunohistochemistry (gold standard). Additionally, we evaluated the inflammatory profile of the oral samples and its correlation with clinical and pathological characteristics. The method's comparison for p16 assessment yielded values of 81.8% sensitivity, 54.5% specificity, 64.3% positive predictive value (PPV) and 75% negative predictive value (NPV). Agreement test was considered "reasonable" ($\kappa = 0.364$). The p53 analysis yielded values of 100% sensitivity, 33.3% specificity, 90.5% PPV and 100% NPV. Agreement test was considered "moderate" ($\kappa = 0.463$). The analysis of the proliferation marker Ki-67 by flow cytometry proved to be equivalent to immunohistochemistry with the advantage of being free from observational bias. The analysis of intratumoral immune infiltrates proved to be feasible using flow cytometry. Correlations were observed between macrophages, B lymphocytes and CD4 T lymphocytes and tumor differentiation grade. These results show that flow cytometry is capable of detecting oral cancer prognostic markers, and its use in association with morphological and immunohistochemical analysis can provide important data both in the clinical study of solid tumors and in the prognostic evaluation of patients with oral cancer.

Keywords: Mouth neoplasms. Flow cytometry. Immunohistochemistry. Prognosis. Biomarkers.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Anatomia da boca	18
Figura 2 - Tipos de mucosa bucal.....	19
Figura 3 - Organização do genoma do Papilomavírus Humano e função dos produtos gênicos virais.	24
Figura 4 - Modelo de instabilidade genética e progressão no câncer de boca.....	27
Figura 5 - Regulação do ciclo celular no CEC de boca.....	28
Figura 6 - Principais vias moleculares do fator de crescimento epidérmico afetadas no CEC de boca.....	29
Figura 7 – Tropismo do HPV pelas estruturas linfoides da orofaringe	31
Figura 8 - Perturbação do ciclo celular mediada pelo HPV.	32
Figura 9 - Orientação funcional das células imunes no microambiente tumoral.	33
Figura 10 - Distribuição das citoqueratinas na mucosa oral normal	46
Figura 11 - Fluxograma dos resultados de busca dos casos de carcinoma de células escamosas de boca.....	52
Figura 12 - Distribuição da frequência de casos de CEC segundo a localização anatômica dos tumores	54
Figura 13 - Distribuição da frequência dos sinais e sintomas, segundo a localização anatômica do câncer.....	60
Figura 14 - Estadiamento dos tumores de lábio, cavidade oral e orofaringe, atendidos no período de 2013 à 2018.....	62
Figura 15 - Distribuição da frequência de casos de CEC quanto à gradação histológica e localização anatômica.....	63
Figura 16 - Figura ilustrativa das características morfológicas dos tumores, segundo a sua gradação histológica.	70
Figura 17 - Figura ilustrativa da avaliação da expressão dos marcadores p16 e p53 em células tumorais.	71
Figura 18 - Estratégias de análise dos linfócitos T e NKT	75
Figura 19 - Estratégias de análise dos linfócitos B e plasmócitos.....	76
Figura 20 - Estratégias de análise das células NK.....	77
Figura 21 - Estratégias de análise dos macrófagos, neutrófilos e eosinófilos.	78
Figura 22 - Estratégia de análise das células epiteliais.....	79

Figura 23 - Comparação entre células MCF-7 não marcadas (em cinza) e células marcadas com anticorpo pan-citoqueratina (em vermelho), nos volumes 1 μ L, 2 μ L e 5 μ L.	82
Figura 24 - Comparação entre leucócitos do sangue periférico não marcados (cinza) e leucócitos marcados (vermelho) com anticorpo pan-citoqueratina.	83
Figura 25 - Comparação entre células HeLa não marcadas (cinza) e células marcadas (vermelho) com anti-p16, nos volumes 10 μ L, 15 μ L e 20 μ L.	84
Figura 26 - Comparação entre células MCF-7 não marcadas (cinza) e células marcadas (vermelho) com anti-p16.	85
Figura 27 - Comparação entre células SKBR3 não marcadas (cinza) e células marcadas (vermelho) com anti-p53, nos volumes 10 μ L, 15 μ L e 20 μ L.	86
Figura 28 - Comparação entre células MCF-7 não marcadas (cinza) e células marcadas (vermelho) com anti-p53.	87
Figura 29 - Comparação dos perfis de expressão de p16 por citometria de fluxo e por imunohistoquímica em amostras com suspeita de carcinoma de boca.	90
Figura 30 - Comparação dos perfis de expressão de p53 por citometria de fluxo e por imunohistoquímica em amostras com suspeita de carcinoma de boca.	93
Figura 31 - Gráfico de Dispersão de Bland-Altman para o marcador p53.	94
Figura 32 - Comparação da expressão de Ki-67 por citometria de fluxo e por imunohistoquímica em amostras com suspeita de carcinoma de boca.	95
Figura 33 - Gráfico de Dispersão de Bland-Altman para o marcador Ki-67.	96
Figura 34 - Comparação da celularidade relativa e da viabilidade celular resultante de dissociação mecânica e por colagenase tipo II por meio da avaliação do 7AAD.	98
Figura 35 - Comparação da celularidade relativa e da viabilidade celular resultante de dissociação mecânica e por dispase II, por meio da avaliação do 7AAD.	99
Figura 36 - Comparação da expressão dos marcadores CD4 e CD8 pelos linfócitos T (em verde) entre as amostras dissociadas mecanicamente e por dispase II.	100
Figura 37 - Celularidade relativa dos leucócitos infiltrados nas amostras, de acordo com o diagnóstico.	102
Figura 38 - Celularidade relativa das amostras de acordo com o grau histológico.	103
Figura 39 - Celularidade relativa das amostras de acordo com a expressão de Ki-67.	106
Figura 40 - Celularidade relativa das amostras de acordo com a expressão de p16 (n = 27)...	107
Figura 41 - Celularidade relativa das amostras de acordo com a história prévia de tabagismo.	108
Figura 42 - Celularidade relativa das amostras de acordo com a história prévia de etilismo...	109

LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Classificação TNM dos tumores de lábio e cavidade oral.	41
Quadro 2 - Classificação TNM dos tumores de orofaringe.	42
Quadro 3 - Linhagens celulares utilizadas na validação e titulação dos anticorpos anti-p53, anti-p16 e pan-citoqueratina.	66
Quadro 4 - Painel de anticorpos utilizados para avaliação de marcadores em amostras de boca	73
Quadro 5 - Diagrama de contenção para cálculo de sensibilidade e especificidade do marcador p16	91
Quadro 6 - Diagrama de contenção para cálculo de sensibilidade e especificidade do marcador p53	92

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição dos casos de CEC de boca segundo o sexo.	55
Tabela 2 - Distribuição dos casos de CEC de boca quanto à faixa etária.....	55
Tabela 3 - Distribuição dos pacientes com CEC de boca segundo a cor da pele.	56
Tabela 4 - Distribuição dos pacientes com CEC de boca segundo história atual ou passada de tabagismo e etilismo.	57
Tabela 5 - Distribuição dos pacientes com CEC de boca de acordo com sua profissão	58
Tabela 6 - Distribuição dos pacientes com CEC de boca segundo a presença de sinais e/ou sintomas.....	59
Tabela 7 - Tempo de percepção pelos pacientes dos primeiros sintomas até o atendimento médico, em meses, segundo a localização anatômica do tumor.....	61
Tabela 8 - Distribuição dos casos de CEC de boca de acordo com o tratamento indicado pelo médico especialista.	64
Tabela 9 - Resultados das variáveis clínicas e morfológicas dos casos de carcinoma de boca.	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
APC	Aloficocianina
ATCC	<i>American Type Culture Collection</i>
BSA	Albumina sérica bovina
CAP	<i>College of American Pathologists</i>
CCP	Ambulatório de Cirurgia de Cabeça e Pescoço
CCS	Centro de Ciências da Saúde
CD	<i>Cluster of differentiation</i>
CDK	Quinase dependente de ciclina
CEC	Carcinoma de células escamosas
CECCP	Carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço
CEPON	Centro de Pesquisa Oncológica
CK	Citoqueratina
COX-2	Ciclooxigenase 2
DMEM	<i>Dulbecco's Modified Eagles's Medium</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DOI	<i>Deep of invasion</i>
EBSERH	Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares
EBV	Vírus Epstein-Barr
ECS	<i>Extracapsular spread</i>
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
EMX	Enzimas metabolizadoras de xenobióticos
FDA	<i>Food and Drug Administration</i>
FOXP3	Fator de transcrição <i>forkhead box P3</i>
HPV	Papilomavírus Humano
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
IFM	Intensidade de fluorescência média
IFN	Interferon
IHQ	Imuno-histoquímica
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer José de Alencar

LCR	<i>Long control region</i>
LOEH	Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias
LOH	<i>Loss of heterozygosity</i> ou perda de heterozigosidade
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
MMP	Metaloproteinase de matriz
NCCLS	<i>National Committee for Clinical Laboratory Standards</i>
NK	<i>Natural killer</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
ORF	<i>Open reading frames</i>
PAAF	Punção aspirativa por agulha fina
PBS	<i>Phosphate buffered saline</i> ou tampão fosfato salino
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PDQ [®]	<i>Physician Data Query</i>
PE	Ficoeritrina
pRb	Proteína do Retinoblastoma
PTEN	Homólogo de fosfatase e tensina
RT	Radioterapia
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TCR	Receptor de células T
TGF	Fator de crescimento transformador
TNF	Fator de necrose tumoral
TNM	<i>Tumor, Node, Metastasis System</i>
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
ULAP	Unidade de Laboratório de Anatomia Patológica
UV	Ultravioleta
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
VEGFR	Receptor do fator de crescimento endotelial vascular
VPN	Valor preditivo negativo
VPP	Valor preditivo positivo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	CÂNCER DE BOCA	18
2.2	APRESENTAÇÃO CLÍNICA DO CEC DE BOCA	20
2.3	FATORES DE RISCO ASSOCIADOS AO CÂNCER DE BOCA.....	21
2.3.1	Tabaco.....	21
2.3.2	Álcool	22
2.3.3	Papilomavírus Humano.....	23
2.3.4	Fatores genéticos	25
2.3.5	Radiação ultravioleta (UV) e câncer de lábio.....	25
2.4	CARCINOGENESE.....	26
2.4.1	Carcinogênese dos tumores HPV-negativos	26
2.4.2	Carcinogênese dos tumores HPV-positivos	30
2.5	RESPOSTA IMUNE AO TUMOR.....	33
2.6	DIAGNÓSTICO DO CÂNCER DE BOCA	36
2.7	TRATAMENTO	38
2.8	PROGNÓSTICO DO CÂNCER DE BOCA.....	40
2.8.1	Marcadores de proliferação celular e apoptose	43
2.8.2	p16.....	44
2.8.3	Citoqueratinas.....	45
2.9	ESTUDO DOS BIOMARCADORES NO CÂNCER DE BOCA	47
3	OBJETIVOS.....	50
3.1	OBJETIVO GERAL.....	50
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	50
4	ESTUDO RETROSPECTIVO	51
4.1	MATERIAL E MÉTODOS.....	51
4.2	RESULTADOS E DISCUSSÃO	52
4.2.1	Caracterização da população do estudo	55
4.2.2	Avaliação dos fatores de risco.....	57
4.2.3	Características clínicas dos tumores	59
4.2.4	Tratamento indicado	63
4.3	CONSIDERAÇÕES FINAIS DO ESTUDO RETROSPECTIVO	65

5 ESTUDO PROSPECTIVO	66
5.1 MATERIAL E MÉTODOS.....	66
5.1.1 Padronização e titulação dos anticorpos em linhagens celulares	66
5.1.2 Seleção da amostra	68
5.1.3 Coleta e processamento das biópsias de boca.....	68
5.1.4 Aquisição das amostras e estratégias de análise	73
5.1.5 Análise estatística.....	79
5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO	81
5.2.1 Padronização dos anticorpos em linhagens celulares.....	81
5.2.2 Caracterização dos participantes do estudo.....	87
5.2.3 Validação do marcador p16.....	88
5.2.4 Validação do marcador p53.....	91
5.2.5 Validação do marcador Ki-67.....	94
5.2.6 Dissociação enzimática dos tecidos.....	96
5.2.7 Avaliação dos leucócitos intratumorais	100
6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS	110
REFERÊNCIAS	112
ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP N° 2.986.011	132
ANEXO B – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP N° 2.985.964	136
ANEXO C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO	140
ANEXO D – PRODUÇÃO CIENTÍFICA	142

1 INTRODUÇÃO

Os cânceres de boca e de orofaringe constituem um grave problema de saúde em vários países, pois além de causarem uma alta taxa de mortalidade, também são responsáveis pela perda de função fisiológica e extensa desfiguração, que podem causar complicações psicológicas e socioeconômicas para os acometidos (JITENDER *et al.*, 2016). Estima-se que em 2020 ocorreram, mundialmente, 476.125 novos casos de câncer de boca e orofaringe e 225.900 mortes (SUNG *et al.*, 2021).

No Brasil, os cânceres de boca e de orofaringe juntos representam o 5º tumor mais frequente em homens e o 13º em mulheres, e estima-se a ocorrência anual de 11.180 novos casos em homens e 4.100 em mulheres, para o triênio 2020-2022 (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2019b). No ano de 2019, os cânceres de boca e de orofaringe foram responsáveis por 6.605 óbitos, com uma taxa de mortalidade ajustada por idade de 2,87 óbitos por 100.000 habitantes (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2019a).

O carcinoma de células escamosas (CEC) é o câncer mais comum da cabeça e pescoço, e representa de 90 a 95% dos tumores que afetam a boca. Sua patogênese está associada principalmente ao uso de tabaco e álcool, exposição à radiação solar, além da infecção pelo Papilomavírus Humano (HPV) (BOSE; BROCKTON; DORT, 2013; RIVERA; VENEGAS, 2014).

A sobrevida dos pacientes com CEC de boca e de orofaringe aumentou nas últimas décadas, mas as taxas continuam em 50-60% de sobrevida em cinco anos, principalmente em razão do diagnóstico e tratamento tardio das lesões. O prognóstico para pacientes tratados precocemente é muito melhor, com taxas de sobrevida em cinco anos de até 80% (HOWLADER *et al.*, 2020; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2016; VAN DIJK *et al.*, 2016; WARNAKULASURIYA, 2009b). Além disso, a qualidade de vida dos pacientes tratados precocemente também é melhor, pois a cura pode ser alcançada com um tratamento menos complexo e menos agressivo do que o necessário para lesões avançadas (EPSTEIN; ZHANG; ROSIN, 2002; TIRELLI *et al.*, 2018).

O CEC de boca é frequentemente precedido pela presença de alterações pré-malignas assintomáticas, porém, clinicamente identificáveis na mucosa oral (NEVILLE; DAY, 2002). A detecção precoce e o diagnóstico dessas lesões potencialmente malignas pode ser um fator decisivo na redução da mortalidade, morbidade e custo do tratamento associado ao CEC (EPSTEIN; ZHANG; ROSIN, 2002).

O padrão-ouro para o diagnóstico de lesões potencialmente malignas e carcinoma é o exame oral, seguido da biópsia do tecido suspeito e do exame histopatológico (CARRERAS-TORRAS; GAY-ESCODA, 2015). A investigação de biomarcadores tornou-se relevante após ser demonstrado em diversos estudos celulares e moleculares seus resultados promissores no diagnóstico precoce, prognóstico e monitoramento do câncer de boca e de orofaringe. Os biomarcadores mais informativos e preditivos relacionados ao desenvolvimento do câncer oral até o momento são as proteínas p53, p16 e Ki-67 (SANTOSH; JONES; HARVEY, 2016; SOLOMON *et al.*, 2016; ULAGANATHAN *et al.*, 2017).

A imuno-histoquímica (IHQ) é a principal técnica utilizada para a investigação desses biomarcadores. Entretanto, existem algumas limitações na utilização da mesma, como a incapacidade em analisar a totalidade das células da amostra coletada; bem como a dificuldade em obter marcações para diversos antígenos no mesmo corte de tecido; além da morosidade da metodologia, que pode inviabilizar a liberação rápida do laudo (DABBS, 2013; SOUZA, 2017).

Diante das limitações da IHQ e da importância da detecção precoce do câncer de boca e orofaringe, observa-se a clara necessidade da implementação de metodologias capazes de auxiliar as técnicas de diagnóstico já utilizadas, possibilitando a detecção rápida e segura das células tumorais. Nesse âmbito, nos últimos anos vem crescendo o interesse na utilização da análise imunofenotípica por citometria de fluxo para avaliação de tumores sólidos (CHANG; HEDLEY, 2012; O'DONNELL; ERNST; HINGORANI, 2013).

O princípio da citometria de fluxo baseia-se na marcação de antígenos em células isoladas e suspensas em meio líquido, por meio de marcadores conjugados fluorescentes, os quais possibilitam uma análise multiparamétrica simultânea das células observadas e permitem a separação de populações celulares dependendo do padrão de expressão encontrado nas mesmas (PEDREIRA *et al.*, 2013). Entre as vantagens da citometria de fluxo, está a agilidade da análise das amostras, o que permite a liberação dos resultados em horas; a possibilidade de análise simultânea de diversos marcadores; e a análise quantitativa das células, por meio de esferas (em inglês, *beads*) padronizadas com uma quantidade conhecida de fluorescência (MCKINNON, 2018; YOUNG *et al.*, 2016).

Nesse contexto, acredita-se que a utilização da citometria de fluxo em conjunto com a morfologia e IHQ possam sobrepor as limitações individuais de cada uma das metodologias e proporcionar resultados fidedignos de forma mais rápida e eficiente, resultando em diagnósticos mais precoces e melhor acompanhamento do paciente com cânceres de boca e de orofaringe.

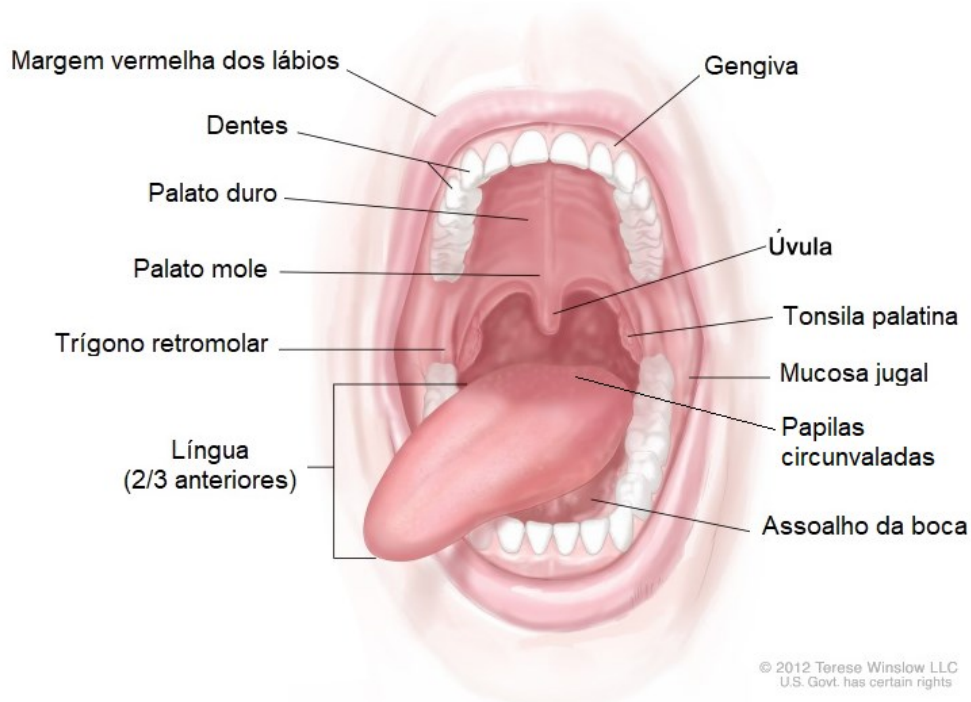
2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CÂNCER DE BOCA

O câncer de boca ou câncer oral, pode ser definido como o conjunto de neoplasias malignas que acometem os lábios, a cavidade oral e a orofaringe (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2019b; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). No entanto, apesar da orofaringe ser muitas vezes incluída na definição de câncer de boca, o alto número de casos de carcinoma de orofaringe associados ao HPV, levou à sua classificação como uma entidade separada (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017b). Neste trabalho, utilizou-se a definição de câncer de boca para os tumores que acometem a boca e a orofaringe.

Anatomicamente, a cavidade oral estende-se desde a borda vermelha dos lábios até as papilas circunvaladas da língua inferiormente e a junção do palato duro e mole superiormente, e é dividida em vários subsítios anatômicos (Figura 1) (LI; AGRAWAL; FAKHRY, 2015). A orofaringe localiza-se posteriormente à cavidade oral e estende-se desde o palato mole até o osso hióide, e inclui o terço posterior da língua (também denominado de base da língua), o palato mole, as tonsilas palatinas e a parede posterior da faringe (FOSSUM *et al.*, 2017).

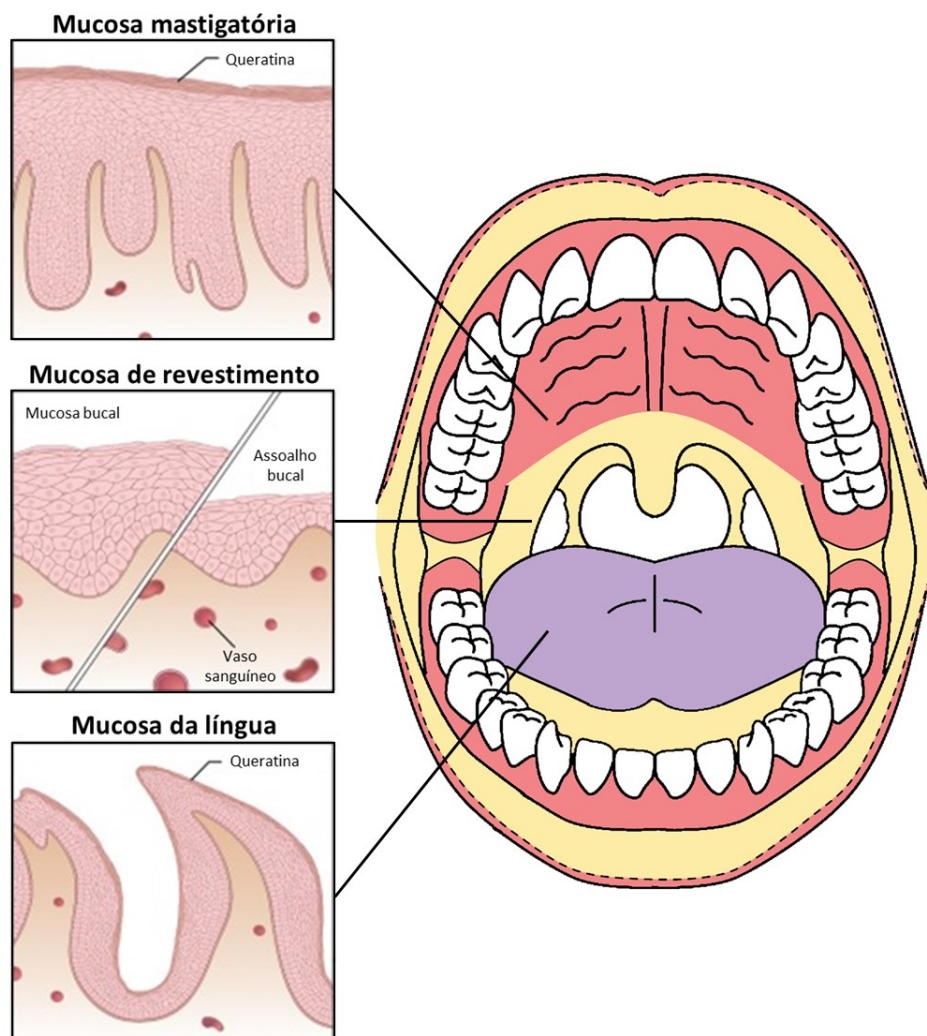
Figura 1 - Anatomia da boca



Fonte: Adaptado de PDQ® Screening and Prevention Editorial Board (2019).

A cavidade oral é revestida por um epitélio escamoso estratificado. A mucosa oral pode ser classificada em três tipos, de acordo com sua função fisiológica: mucosa de revestimento, mucosa mastigatória e mucosa especializada (Figura 2). A mucosa mastigatória recobre as áreas sujeitas à fricção durante a mastigação dos alimentos, como o palato duro e a gengiva. Nessas áreas, o epitélio é espesso e queratinizado. A mucosa de revestimento recobre as paredes da cavidade oral (mucosa jugal, mucosa alveolar e porção interna dos lábios), o ventre da língua, o assoalho da boca e o palato mole. O epitélio não é queratinizado, pois deve ser flexível e capaz de suportar o estiramento das regiões sujeitas à movimentação. A mucosa do dorso da língua oral é classificada como mucosa especializada, pois, além da sua função mecânica, ela também possui função sensorial. O epitélio é principalmente queratinizado, pois a língua é recoberta por numerosas papilas queratinizadas, embora as regiões entre as papilas não sejam queratinizadas (BERKOVITZ; HOLLAND; MOXHAM, 2017).

Figura 2 - Tipos de mucosa bucal



Fonte: Adaptado de Moutsoupoulos e Konkel (2018).

Mais de 90% dos cânceres de boca são carcinomas de células escamosas, também denominado de carcinoma espinocelular ou carcinoma epidermóide. Esse fato poderia sugerir uma doença relativamente homogênea. No entanto, o CEC de boca é notavelmente heterogêneo, e inclui várias subclassificações em relação à localização anatômica, etiologia e achados moleculares (KLUSSMANN, 2017). De acordo com as características histológicas, como: grau de queratinização, diferenciação celular e outras características morfológicas, são reconhecidas pela Organização Mundial de Saúde (OMS) as seguintes variantes do CEC de boca: carcinoma basalóide, adenoescamoso, cuniculatum, verrucoso, papilífero, acantolítico, linfoepitelial e de células fusiformes. Entretanto essas variantes são raramente encontradas, com exceção do carcinoma verrucoso, que é comum na Ásia entre mascadores de tabaco e fumantes de beedi, um tipo de cigarro indiano (WARNAKULASURIYA; MAEDA; GREENSPAN, 2020; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017a).

Além do CEC, outras neoplasias malignas também podem se desenvolver a partir do epitélio, tecido conjuntivo, glândulas salivares menores, tecido linfoide, melanócitos ou ainda metástase de um tumor distante (principalmente mama, pulmão e rim). Dentre os cânceres de células não escamosas, o carcinoma mucoepidermoide é o tipo mais comum, seguido pelo adenocarcinoma e carcinoma adenoide cístico (HIRSHBERG *et al.*, 2008; MONTERO; PATEL, 2015; PARISE JUNIOR, 2000).

2.2 APRESENTAÇÃO CLÍNICA DO CEC DE BOCA

O CEC de boca em estádios precoces é frequentemente assintomático, e o seu diagnóstico depende exclusivamente do reconhecimento de lesões malignas e pré-malignas (FARAH *et al.*, 2017).

Uma variedade de lesões tem sido associada ao desenvolvimento do CEC, entre as mais comuns, estão a leucoplasia e a eritroplasia, que se apresentam como placas brancas e vermelhas, respectivamente. A transformação maligna dessas lesões ocorre ao longo dos anos, durante os quais a lesão pode ser acompanhada e tratada, o que preveniria o desenvolvimento do câncer de boca (WARNAKULASURIYA, 2020). A OMS define o termo como “desordem potencialmente maligna”, pois essas lesões têm um potencial aumentado de transformação maligna, mas nem todas se transformam em câncer (WARNAKULASURIYA *et al.*, 2020; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017a).

Clinicamente, o CEC pode se manifestar na forma de um nódulo endurecido ou úlcera que não cicatriza, de coloração branca ou eritematosa, que persiste por mais de 3 semanas. Com

a invasão local do câncer podem surgir dor, sangramentos, aumento da motilidade dos dentes, dificuldade para usar dentaduras, disfagia, disartria, odinofagia, otite, trismo, perda de peso e desenvolvimento de massa cervical (HUBER; TANTIWONGKOSI, 2014; NEVILLE; DAY, 2002).

O câncer de lábio é frequentemente precedido pela queilite actínica, uma desordem potencialmente maligna, caracterizada por secura do lábio, fissuras, atrofia e áreas eritematosas e/ou leucoplásicas. A manifestação clínica do carcinoma epidermóide de lábio inclui a presença de úlceras e crostas, que, em estádios avançados, podem se tornar dolorosas e exsudativas (SILVA *et al.*, 2020).

2.3 FATORES DE RISCO ASSOCIADOS AO CÂNCER DE BOCA

A etiologia do câncer de boca é multifatorial. Os principais fatores de risco associados ao desenvolvimento do câncer de boca são o uso de tabaco (em suas várias formas) e o consumo de bebidas alcoólicas. No entanto, muitos pacientes são diagnosticados com câncer de boca, apesar de se absterem de ambas as substâncias. Nesses casos, fatores como a infecção pelo HPV, o hábito de mascar bétel/noz de areca, exposição à radiação solar, imunossupressão ou suscetibilidade genética podem desempenhar o papel causal (KUMAR *et al.*, 2016).

2.3.1 Tabaco

O consumo de tabaco continua a prevalecer como o mais importante fator de risco para o câncer, e as doenças neoplásicas causadas pelo fumo incluem cânceres de pulmão, cavidade oral, faringe, laringe, esôfago, bexiga, rim, pélvis e pâncreas (KUMAR *et al.*, 2016).

Foi demonstrado em diversos estudos que o uso do tabaco, em suas várias formas (cigarros, cachimbos, tabaco sem fumaça, narguilé) eleva o risco de desenvolver câncer de boca (SINGH; CHATURVEDI, 2018). Estudos epidemiológicos mostram que o risco de desenvolver câncer de boca é de cinco a nove vezes maior para fumantes do que para não fumantes, e esse risco pode aumentar até 17 vezes para indivíduos que fumam 80 ou mais cigarros por dia (NEVILLE; DAY, 2002). O uso de tabaco sem fumaça eleva de quatro a oito vezes o risco para desenvolvimento de câncer de boca (ASTHANA; VOHRA; LABANI, 2019).

O narguilé, também conhecido como cachimbo d'água, shisha ou hookah, é uma forma de consumo de tabaco que é utilizada tradicionalmente nas regiões asiática e oriental do Mediterrâneo, mas que se tornou muito popular, na década de 90, em diversos países ocidentais,

principalmente entre os jovens. A fumaça produzida pelo narguilé contém vários agentes cancerígenos e tóxicos e pesquisas indicam que os efeitos nocivos do narguilé são semelhantes aos dos cigarros, com um aumento de quatro vezes no risco para o desenvolvimento do câncer de boca (PATIL *et al.*, 2019).

Em 2003, foi inventado o cigarro eletrônico, um dispositivo que gera um aerossol inalável aquecendo uma solução que contém glicerina e/ou propilenoglicol e vários sabores artificiais (com ou sem nicotina). Esse dispositivo foi introduzido como uma alternativa mais benigna para o uso de cigarros. No entanto, recentemente foi demonstrado que o mesmo pode levar a danos ao DNA *in vitro* e possivelmente a um maior risco para o desenvolvimento do câncer de boca (FLACH; MANIAM; MANICKAVASAGAM, 2019).

Os carcinógenos mais importantes gerados pelo uso do tabaco são os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos e as nitrosaminas específicas do tabaco. Muitos desses compostos são capazes de causar transformações celulares apenas após a sua metabolização e ativação por enzimas metabolizadoras de xenobióticos (EMX), como o citocromo p450, localizadas principalmente no fígado e na mucosa do trato aerodigestivo superior. Essas nitrosaminas e seus metabólitos se ligam covalentemente ao DNA de células-tronco de queratinócitos, levando a mutações críticas de genes envolvidos na replicação do DNA. O dano genético consequente afeta diversos cromossomos e genes, e o acúmulo dessas alterações levam à transformação maligna (KUMAR *et al.*, 2016; NAGARAJ *et al.*, 2006; SCULLY; FIELD; TANZAWA, 2000).

2.3.2 Álcool

O consumo de álcool foi identificado como um fator de risco importante para cânceres do trato aerodigestivo superior, em particular, tumores da cavidade oral, faringe, laringe, esôfago e fígado. O papel do álcool como um fator independente na carcinogênese oral ainda não está claro, entretanto, em estudos controlados para o tabagismo, consumidores moderados a excessivos demonstraram ter um risco três a nove vezes maior de desenvolver câncer de boca, e quando associado ao tabaco esse risco é 30 vezes maior (CARRERAS-TORRAS; GAY-ESCODA, 2015; KUMAR *et al.*, 2016; NEVILLE; DAY, 2002). Em países desenvolvidos, aproximadamente 75% dos cânceres de lábio, cavidade oral e faringe são atribuíveis ao tabagismo e ao consumo de álcool (SHIELD *et al.*, 2017).

O metabolismo do etanol pela enzima álcool desidrogenase produz acetaldeído, em uma primeira etapa, que é citotóxico e resulta na produção de radicais livres e hidroxilação de

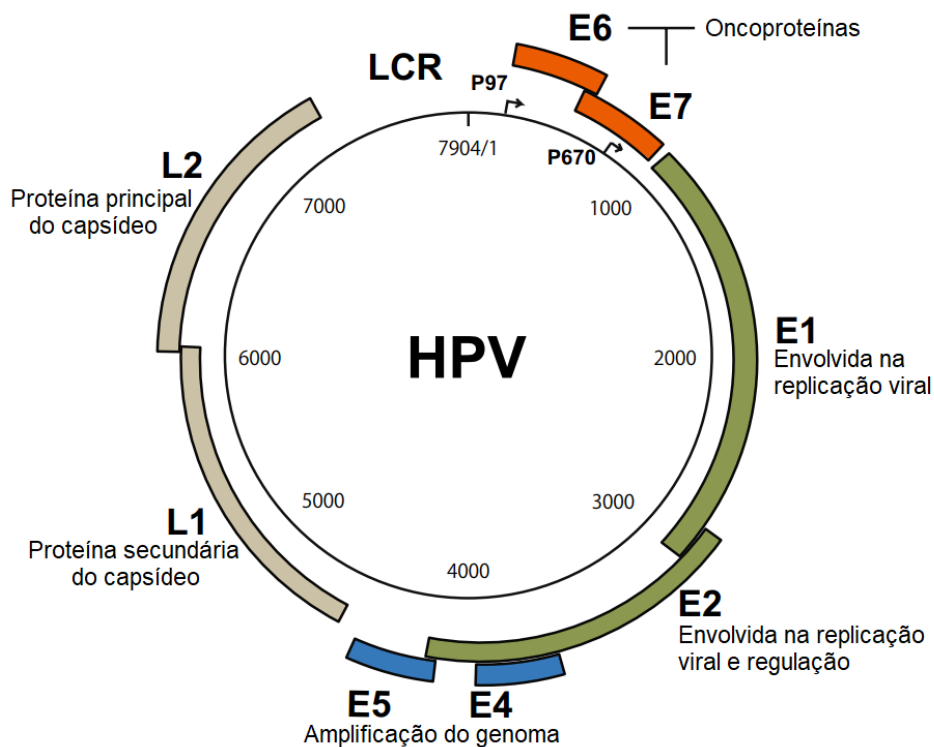
bases de DNA (SCULLY; FIELD; TANZAWA, 2000). O consumo de álcool também potencializa acentuadamente os efeitos carcinogênicos do tabaco. Já foi demonstrado que o álcool pode causar atrofia do epitélio oral, levando a um aumento da permeabilidade da mucosa oral e maior penetração de carcinógenos (WIGHT; OGDEN, 1998). Além disso, o álcool induz o citocromo p450 2E1, uma das principais EMX envolvidas no metabolismo e ativação de nitrosaminas associadas ao tabaco (MESKAR *et al.*, 2001).

2.3.3 Papilomavírus Humano

Os Papilomavírus Humanos (HPVs) são os vírus mais frequentemente implicados na carcinogênese oral. São pequenos vírus de DNA, não envelopados, icosaédricos, que mostram um tropismo para o epitélio escamoso (MOODY; LAIMINS, 2010).

O genoma do HPV tem aproximadamente 8000 pares de bases de comprimento e possui oito regiões codificadoras de proteínas, conhecidas como *open reading frames* (ORF), que permitem a replicação do genoma viral e a montagem de partículas virais; e uma região não codificadora, referida como *long control region* (LCR), necessária para a replicação normal do vírus e o controle da expressão gênica (Figura 3). As ORF são organizadas em região *early* (E), composta pelos genes E1, E2, E4, E5, E6, E7, e região *late* (L), composta pelos genes L1 e L2. Os produtos virais E1 e E2 medeiam diretamente a replicação do genoma viral, enquanto que E4 e E5 são proteínas acessórias que coordenam a amplificação do genoma viral; já E6 e E7 são as principais oncoproteínas virais, as quais bloqueiam a divisão normal da célula hospedeira, como será discutido adiante. Os genes tardios L1 e L2 codificam proteínas do capsídeo viral necessárias para os estágios finais da montagem do vírion e medeiam a entrada viral em futuras células hospedeiras (FARAJI *et al.*, 2017; SANO; ORIDATE, 2016).

Figura 3 - Organização do genoma do Papilomavírus Humano e função dos produtos gênicos virais.



Fonte: Adaptado de Sano e Oridate (2016).

Nota: O genoma do HPV é dividido em uma região não codificadora, denominada *Long Control Region* (LCR); e oito regiões codificadoras de proteínas, organizadas em região *early*, que codifica os produtos virais E1-E7 e a região *late*, que codifica os produtos virais L1 e L2.

Atualmente, mais de 150 genótipos de HPVs são descritos com base na sequência do genoma viral, e podem ser classificados, segundo o risco que conferem ao desenvolvimento de lesões neoplásicas, em HPV de alto e de baixo risco (BOUVARD *et al.*, 2009; SANO; ORIDATE, 2016).

O papel do HPV no CEC de boca tem sido estudado desde a década de 1980, e pelo menos 10 tipos de HPV de alto risco (HPV16, 18, 31, 33, 45, 51, 52, 56, 58 e 59) já foram isolados de tumores de cabeça e pescoço. E assim como no câncer cervical, o HPV16 representa a principal causa viral do câncer de boca, seguido pelos tipos 18 e 33 (FARAJI *et al.*, 2017; LEEMANS; BRAAKHUIS; BRAKENHOFF, 2011; YETE; D'SOUZA; SARANATH, 2018).

Entre os cânceres de boca, os tumores de orofaringe, especificamente os de tonsila e base da língua, mostram maior associação com a infecção por HPV. Um aumento acentuado na incidência do câncer de orofaringe atribuíveis ao HPV tem sido observado nos últimos anos, provavelmente como resultado de mudanças no comportamento sexual, pois o HPV é transmitido sexualmente, e comportamentos sexuais como a prática de sexo oral e ter múltiplos parceiros estão relacionados a uma maior exposição oral ao HPV. Estima-se, atualmente, que

aproximadamente 70% dos CEC de orofaringe sejam causados por infecção pelo HPV (DRAKE *et al.*, 2021; RETTIG; D'SOUZA, 2015; SANO; ORIDATE, 2016; VAN DYNE *et al.*, 2018).

2.3.4 Fatores genéticos

Embora a maioria dos casos de CEC de boca seja induzida por carcinógenos ou infecções virais, uma pequena fração dos casos é de natureza genética. Várias síndromes causadas por defeitos genéticos hereditários têm sido associadas ao desenvolvimento do câncer de boca (CONWAY; PURKAYASTHA; CHESTNUTT, 2018; RIAZ *et al.*, 2014). A mais caracterizada é a anemia de Fanconi, um distúrbio genético autossômico recessivo raro dos genes de reparo do DNA, que leva a defeitos de reparo das ligações cruzadas do DNA. A anemia de Fanconi está associada a malformações esqueléticas congênitas, à insuficiência da medula óssea e a um maior risco de desenvolver leucemias e tumores sólidos, incluindo o câncer de cabeça e pescoço, sendo o carcinoma de células escamosas oral o tipo mais comum (DEL CORSO *et al.*, 2016; WARNAKULASURIYA *et al.*, 2020).

Algumas variantes genéticas de enzimas associadas ao metabolismo do álcool, de vias de reparo do DNA e de genes envolvidos no metabolismo da nicotina também já foram associadas a um maior risco de câncer de boca. Acredita-se que os polimorfismos genéticos nas EMX influenciam fortemente as respostas biológicas do indivíduo a carcinógenos. Assim, certos genótipos de EMX podem aumentar a suscetibilidade individual aos efeitos do tabaco e álcool, por meio do metabolismo carcinogênico errôneo, o que leva ao aumento da exposição ao carcinógeno e maior predisposição ao câncer de boca (KUMAR *et al.*, 2016; SCULLY; BAGAN, 2009; WALKER; BOEY; MCDONALD, 2003).

2.3.5 Radiação ultravioleta (UV) e câncer de lábio

Devido à sua localização anatômica, o câncer de lábio compartilha algumas características com os tumores de pele. O câncer de lábio acomete principalmente pessoas idosas, do sexo masculino e caucasianos, particularmente em locais de clima quente. O principal fator de risco para o desenvolvimento de tumores labiais é a exposição crônica à radiação UV do sol, portanto, é particularmente comum em pessoas que são expostas de forma prolongada ou repetida à luz solar, como pescadores, fazendeiros e praticantes de windsurf (NEVILLE; DAY, 2002; SCULLY; BAGAN, 2009; SHIELD *et al.*, 2017).

A radiação UV leva à transformação maligna dos queratinócitos pela ação dos raios UVA e UVB. Os raios UVB induzem ligações covalentes aberrantes entre as bases nucleicas, gerando produtos mutagênicos. Enquanto os raios UVA levam à formação de espécies reativas de oxigênio, que causam indiretamente danos aos ácidos nucleicos (FARAH *et al.*, 2017).

2.4 CARCINOGENESE

Em geral, os cânceres emergem do acúmulo de alterações genéticas e anomalias epigenéticas que permitem que as células cancerosas sobrevivam, proliferem e se disseminem para outras partes do corpo (HANAHAAN; WEINBERG, 2011). A célula de origem do CEC é o queratinócito oral, que após uma série de mudanças genéticas, as quais podem ser espontâneas ou induzidas por agentes mutagênicos, adquire um fenótipo maligno, caracterizado pela capacidade de proliferar de forma descontrolada, o que pode resultar em câncer. A maioria dos agentes mutagênicos da cavidade oral são agentes químicos (tabaco e álcool), físicos (radiação) e infecciosos (HPV) que podem causar mutações pontuais, deleções, inserções e rearranjos nos genes (ACHA *et al.*, 2005; SCULLY; BAGAN, 2009).

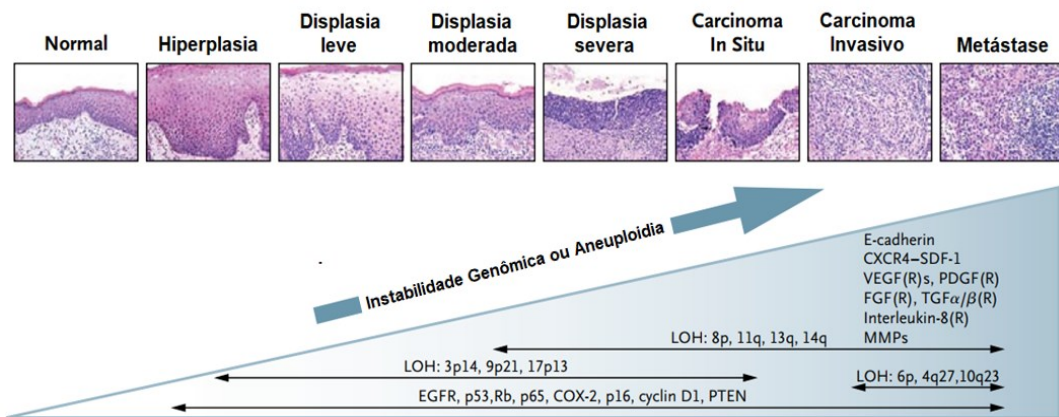
Em 2015, o Atlas do Genoma do Câncer publicou dados genômicos de 279 cânceres de cabeça e pescoço (CECCP), incluindo os tumores HPV-positivos e HPV-negativos, e demonstrou uma heterogeneidade acentuada de anormalidades moleculares presentes no CECCP, com mutações associadas principalmente a genes supressores tumorais no controle do ciclo celular, proliferação e sobrevivência celular e sinalização WNT- β -catenina (CANCER GENOME ATLAS NETWORK, 2015; LEEMANS; SNIJDERS; BRAKENHOFF, 2018). Talvez a descoberta mais notável tenha sido a identificação de perfis moleculares, vias de carcinogênese e prognóstico distintos entre os carcinomas HPV-positivos e HPV-negativos (MORRIS; TRAYNOR; HARARI, 2016).

2.4.1 Carcinogênese dos tumores HPV-negativos

O CEC de boca progride desde alterações pré-malignas até a doença invasiva. Acredita-se que a evolução e a progressão desse câncer resultam de múltiplas alterações graduais das vias celulares e moleculares (HADDAD; SHIN, 2008). Na década de 1990, foi demonstrado que o número de alterações genéticas presente nessas lesões pré-malignas se correlaciona com a gravidade das alterações displásicas (Figura 4). As alterações genéticas precoces e mais frequentes na carcinogênese oral são as perdas de heterozigose nos braços

curtos dos cromossomos 3p, 9p e 17p, enquanto as alterações nos cromossomos 11q, 4q e 8p, dentre outros, foram identificadas em estágios tardios da progressão tumoral (LEEMANS; SNIJDERS; BRAKENHOFF, 2018).

Figura 4 - Modelo de instabilidade genética e progressão no câncer de boca



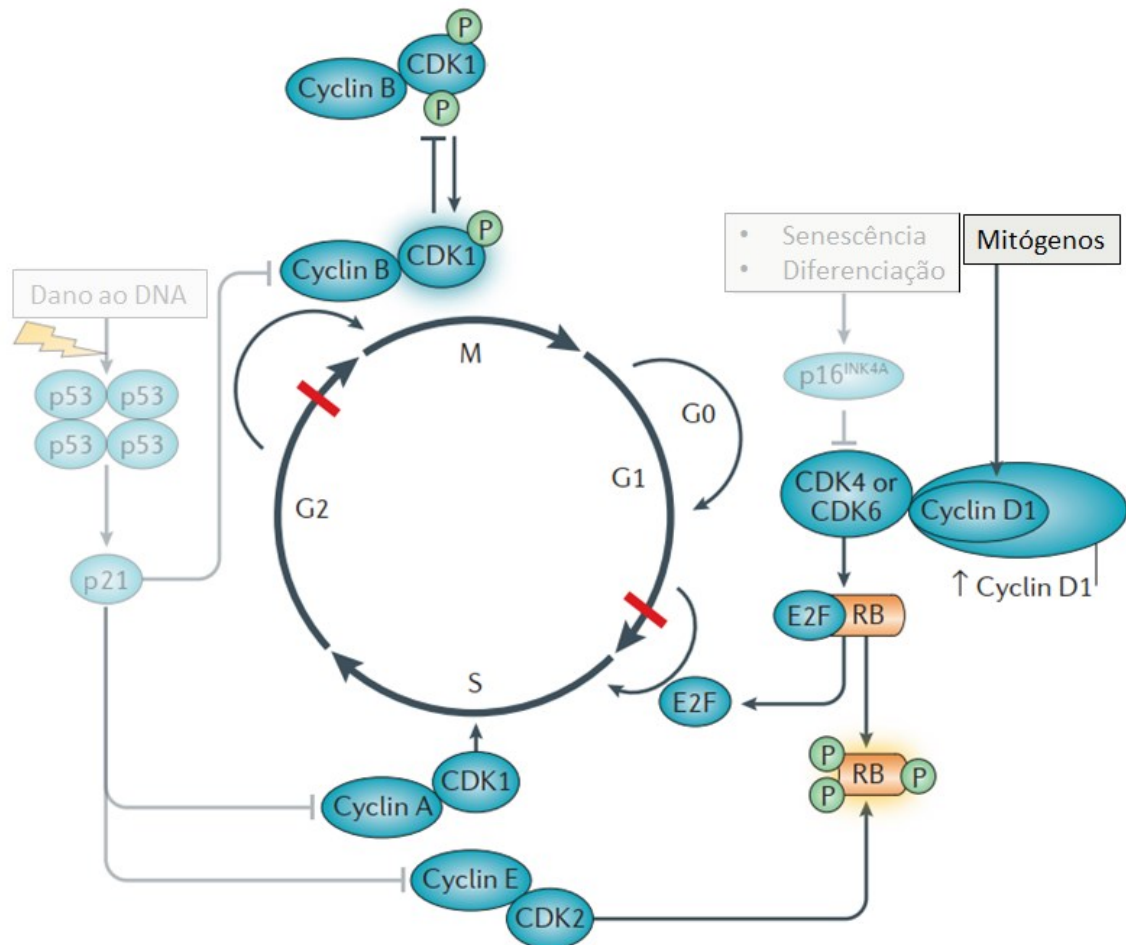
Fonte: Adaptado de Haddad e Shin (2008).

Nota: O câncer de boca se instala de forma progressiva, as alterações genéticas se iniciam nas células normais e evoluem até carcinoma invasivo e metástase. Diversas alterações genéticas foram identificadas em cada um desses estágios patológicos, incluindo a perda de heterozigosidade (LOH, do inglês *loss of heterozygosity*) de certos cromossomos (3p14, 9p21, 17p13, 8p, 11q, 13q, 14q, 6p, 4q27 e 10q23) e amplificação, deleção ou ainda alterações na regulação de certos oncogenes ou genes supressores de tumor, como o receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), p53, Rb, p65, ciclooxygenase 2 (COX-2), p16, ciclina D1 e o homólogo de fosfatase e tensina (PTEN).

Uma das principais funções celulares frequentemente alterada nas células cancerígenas para superar a senescência e obter um potencial replicativo ilimitado é a regulação do ciclo celular (LEEMANS; BRAAKHUIS; BRAKENHOFF, 2011).

O gene supressor de tumores CDKN2A (localizado no cromossomo 9p21) codifica a proteína p16^{INK4a}, um inibidor de quinases dependentes de ciclinas (CDK), e é um dos genes frequentemente mutado no CEC de boca. A perda de p16^{INK4a}, combinada com a amplificação da ciclina D1 em 11q13 (CCND1), também observada no CEC de boca, contribui para a replicação de DNA descontrolada (Figura 5). Normalmente, essa replicação de DNA descontrolada leva a danos no DNA e ativação da p53, a qual atua como um supressor de tumor e induz a parada do ciclo celular, e, dessa forma, permite que a célula realize o reparo do DNA ou, se o dano estiver além do reparo, induz a apoptose. Entretanto, o gene TP53 (localizado no cromossomo 17p13) também é frequentemente inativado nos tumores de boca e, em conjunto com alterações genéticas de CCND1 e CDKN2A, causam a imortalização celular (GUO; CALIFANO, 2015; LEEMANS; SNIJDERS; BRAKENHOFF, 2018).

Figura 5 - Regulação do ciclo celular no CEC de boca.



Fonte: Adaptado de Leemans, Snijders e Brakenhoff (2018).

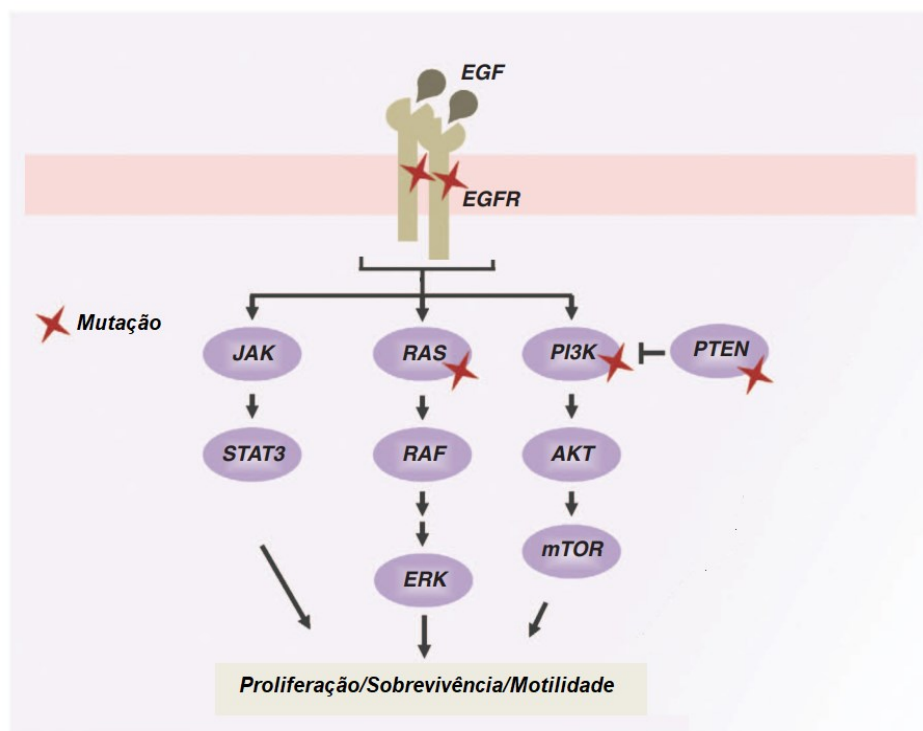
Nota: O ciclo celular possui dois *checkpoints* (indicados pelas barras vermelhas) que são regulados por complexos de ciclinas e quinases dependentes de ciclinas (CDK). O primeiro *checkpoint*, na fase G1-S, é regulado pelo fator de transcrição E2F e pela proteína do retinoblastoma (RB ou pRb), e o segundo *checkpoint*, em G2-M, é regulado pelo complexo ciclina B-CDK1. A atividade dos complexos ciclina-CDK é regulada por inibidores, tais como p16^{INK4A} ou p53/p21. Os genes que codificam p16^{INK4A} e p53 são geralmente inativados no CEC de boca (indicados pelas cores sombreadas), enquanto a expressão da ciclina D1 é amplificada nesses tumores. Dessa forma, o checkpoint em G1-S é geralmente ignorado, e leva à entrada não programada na fase S, e na ausência de p53 ativa, não ocorre a parada do ciclo celular na fase G2-M para permitir o reparo do DNA, que, em conjunto com outras alterações gênicas, leva à replicação celular descontrolada e tumorigênese.

Além dessas proteínas que atuam no próprio ciclo celular, genes de vários receptores de fatores de crescimento podem desempenhar um papel no desenvolvimento do câncer de boca (LEEMANS; SNIJDERS; BRAKENHOFF, 2018). O receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) é parte da família de receptores de tirosina quinases HER/erbB, e um dos alvos primários de alterações no câncer de boca. Quando ativado pela ligação ao seu fator de crescimento, o EGFR forma um dímero e leva à ativação de diversas cascatas de sinalização, que incluem as vias RAS/RAF/MAPK, PI3K/AKT/mTOR e JAK/STAT, as quais são importantes reguladores da proliferação, invasão, angiogênese e metástase (Figura 6). O EGFR é um oncogene bem descrito no câncer de boca, e sua superexpressão é observada em cerca de

90% dos tumores, e já foi correlacionada com aumento da recidiva local e pior sobrevida global (GUO; CALIFANO, 2015; RIAZ *et al.*, 2014).

A via PI3K é uma das vias de sinalização mais comumente ativadas no câncer e pode ser ativada de três formas no câncer de boca, como seguem: pelos receptores tirosina quinase, como o EGFR; pelas mutações, aproximadamente 20% dos tumores têm mutações na subunidade catalítica de PI3K (codificada pelo gene PIK3CA); e pela perda do seu regulador negativo PTEN. A ativação de PI3K leva à subsequente ativação da AKT (Figura 6), um dos principais efetores da sinalização PI3K, que desempenha importantes papéis reguladores nos processos celulares, incluindo sobrevivência, proliferação e diferenciação celular (BOSE; BROCKTON; DORT, 2013; RIAZ *et al.*, 2014).

Figura 6 - Principais vias moleculares do fator de crescimento epidérmico afetadas no CEC de boca.



Fonte: Adaptado de Suh *et al.* (2014).

Nota: Quando um ligante extracelular se liga ao receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR), ocorre a sua dimerização, que desencadeia uma cascata de fosforilação que vai ativar a sinalização das vias RAS/ERK, PI3K/AKT e JAK/STAT. Marcado em vermelho estão as possíveis mutações que ocorrem no CEC de boca. A ativação aberrante dessas vias favorece a tumorigênese, pois promovem a sobrevivência, a proliferação e a motilidade das células neoplásicas.

Outra via que está envolvida na carcinogênese oral, é a via de sinalização Wnt/ β -catenina, que é fundamental no controle da proliferação celular, sobrevivência celular, diferenciação e orientação da via celular. Vários componentes da via Wnt, como ligantes e

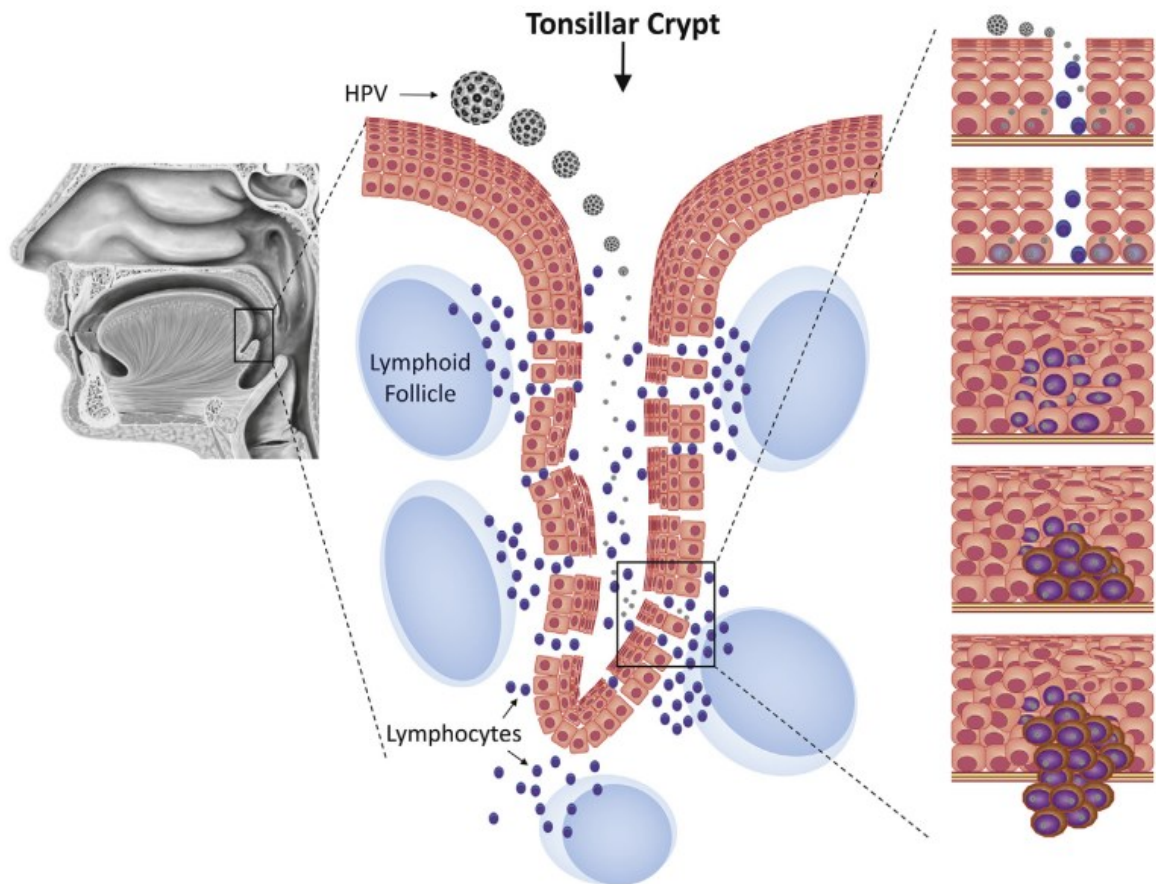
inibidores de Wnt, receptores de membrana e mediadores intracelulares são frequentemente alterados em neoplasias humanas por meio de alterações genéticas ou epigenéticas, o que leva à desregulação da sinalização Wnt e ao aumento da atividade nuclear da β -catenina e subsequente transcrição de genes alvo, tais como ciclina D1, c-Myc, metaloproteinases de matriz 1 e 7, fator de crescimento endotelial, entre outros, os quais atuam direta ou indiretamente na carcinogênese e progressão tumoral (ALAMOUD; KUKURUZINSKA, 2018; AMINUDDIN; NG, 2016; LEEMANS; SNIJDERS; BRAKENHOFF, 2018; SHIAH; SHIEH; CHANG, 2016).

Em decorrência dos recentes estudos moleculares, foram descobertas dezenas de genes que podem estar relacionados à carcinogênese oral. Dependendo da ferramenta de análise aplicada, são indicados entre 50 e 100 genes substancialmente mutados nos cânceres de cabeça e pescoço, incluindo os tumores de boca. No entanto, muitas dessas mutações aparecem com frequências muito baixas e ainda não estão funcionalmente ligados à carcinogênese (CANCER GENOME ATLAS NETWORK, 2015; LEEMANS; SNIJDERS; BRAKENHOFF, 2018).

2.4.2 Carcinogênese dos tumores HPV-positivos

O HPV infecta queratinócitos progenitores localizados na camada basal de epitélios escamosos estratificados e, para tanto, necessita acesso à membrana basal epitelial. A exposição contínua da cavidade oral a vários agentes pode causar abrasões, tornando o epitélio oral susceptível à infecção por HPV. Na orofaringe, a infecção pelo HPV pode ocorrer na ausência de abrasão epitelial. As tonsilas palatina, lingual, tubária e adenoide são estruturas linfoides coletivamente conhecidas como anel tonsilar de Waldeyer. Essas estruturas possuem um epitélio escamoso reticulado especializado, que contém uma membrana basal fenestrada que permite a passagem das células imunes. Essas fenestrações, provavelmente, fornecem ao HPV acesso aos queratinócitos basais na ausência de ruptura epitelial traumática (Figura 7). Isso poderia explicar a tendência do HPV em causar CEC nas tonsilas palatinas e linguais (FARAJI *et al.*, 2017; YETE; D'SOUZA; SARANATH, 2018).

Figura 7 – Tropismo do HPV pelas estruturas linfoides da orofaringe

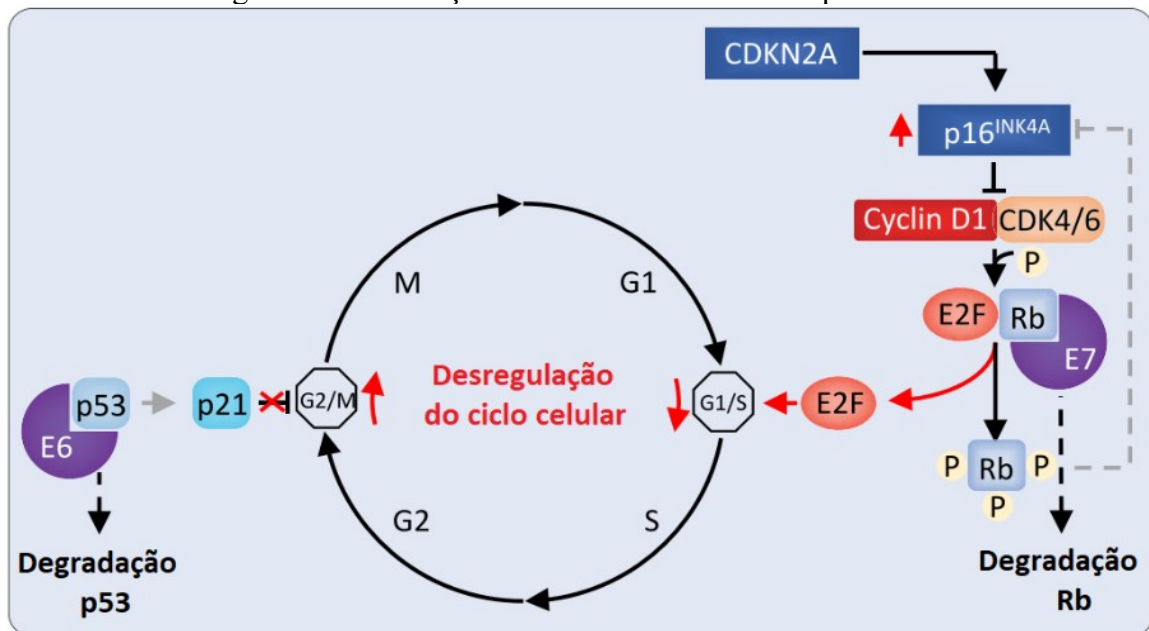


Fonte: FARAJI *et al.* (2017).

Nota: Na orofaringe, o HPV acessa os queratinócitos basais por meio de fenestrações no epitélio reticulado das criptas tonsilares. A infecção do epitélio tonsilar resulta em diferenciação aberrante de células basais, displasia, carcinoma in situ e, finalmente, carcinoma invasivo.

O HPV medeia a oncogênese por meio dos produtos dos oncogenes virais E6 e E7, que interagem com várias proteínas celulares (Figura 8). As melhores interações caracterizadas são com a proteína do retinoblastoma (pRb) e p53, que são moléculas centrais no controle do ciclo celular. A ligação de E7 à pRb libera o fator de transcrição E2F, que desencadeia a expressão de proteínas necessárias para a replicação do DNA. Essa indução não programada da fase S do ciclo celular normalmente levaria à apoptose pela ação da p53, no entanto, a oncoproteína E6 do HPV se liga à p53, levando à sua degradação proteolítica. Como consequência, a dependência do controle do ciclo celular é abolida e a diferenciação normal dos queratinócitos é retardada (BOSE; BROCKTON; DORT, 2013; MUÑOZ *et al.*, 2006; YETE; D'SOUZA; SARANATH, 2018).

Figura 8 - Perturbação do ciclo celular mediada pelo HPV.



Fonte: Adaptado de Faraji *et al.* (2017).

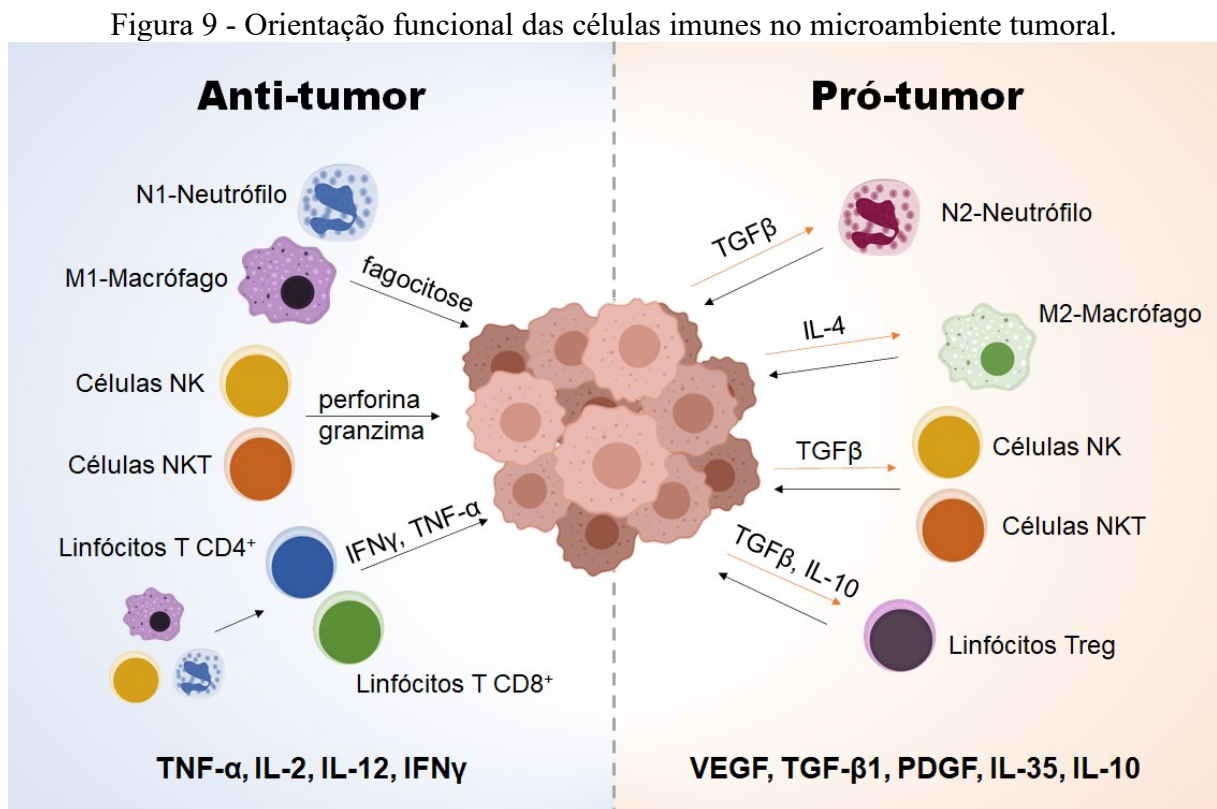
Nota: A oncoproteína E7 do HPV liga-se à proteína do retinoblastoma (pRb), que a direciona para a degradação, resultando na translocação nuclear do E2F e na progressão do ciclo celular para a fase S. Além disso, a degradação de Rb, resulta em perda da regulação negativa de Rb sobre o regulador do ciclo celular p16^{INK4A} e na superexpressão de p16^{INK4A}. A oncoproteína E6 do HPV se liga à p53, o que leva à sua degradação, resultando na perda da regulação do *checkpoint* G2/M e na proliferação celular descontrolada.

A perda do cromossomo 9p21 e as mutações do TP53 são frequentemente encontradas em estágios precursos do câncer e podem levar à imortalização das células epiteliais. No carcinoma HPV-positivo, essas mesmas vias também são as primeiras a serem inativadas pelos oncogenes virais. No entanto, mutações em TP53 e CDKN2A geralmente não são observadas em tumores HPV-positivos e acredita-se que as alterações genéticas que levam à inativação da p53 e p16^{INK4a} em tumores HPV-negativos são funcionalmente equivalentes à ligação e inativação de p53 e pRb por E6 e E7 em tumores HPV-positivos (LEEMANS; BRAAKHUIS; BRAKENHOFF, 2011; LEEMANS; SNIJDERS; BRAKENHOFF, 2018).

A atividade constante das proteínas virais E6 e E7 leva ao aumento da instabilidade genômica, ao acúmulo de mutações em oncogenes, perda adicional do controle do crescimento celular e à transformação maligna. No entanto, não é suficiente para a progressão para o câncer, sugerindo que existem outros fatores, como alterações genéticas e epigenéticas, associadas ao desenvolvimento do carcinoma de células escamosas (MOODY; LAIMINS, 2010; SANO; ORIDATE, 2016). As vias frequentemente afetadas em cânceres HPV-positivos envolvem a sinalização PI3K, diferenciação celular e morte celular (MES; LEEMANS; BRAKENHOFF, 2016).

2.5 RESPOSTA IMUNE AO TUMOR

Uma etapa crítica durante os estágios iniciais da carcinogênese é a evasão/supressão do sistema imunológico do hospedeiro, que pode ser alcançada por meio da inibição das células imunes que antagonizam os tumores ou por estimulação das células. A orientação funcional das células imunes no microambiente tumoral está ilustrada na Figura 9 (LEI *et al.*, 2020; QUAIL; JOYCE, 2013).



Fonte: Baseado em Giraldo *et al.* (2019) e Hinshaw & Shevde (2019).

A resposta imune pode ser dividida em imunidade inata e imunidade adaptativa. A resposta inata compreende todos os elementos que fornecem a primeira linha de imunidade, pouco específica, mas que também desempenham um papel crucial na iniciação e subsequente ativação do sistema imune adaptativo. Fazem parte da imunidade inata as células polimorfonucleares (ou granulócitos), macrófagos e células *natural killers* (NK). Os granulócitos e macrófagos geralmente iniciam a resposta inflamatória ao tumor por meio do reconhecimento de padrões moleculares das células tumorais. Essas células são altamente plásticas e podem apresentar-se em diferentes estados de polarização, e exibir uma orientação

funcional pró ou antitumoral (GIRALDO *et al.*, 2019; PELTANOVA; RAUDENSKA; MASARIK, 2019).

Os neutrófilos são os granulócitos mais abundantes no microambiente tumoral e podem apresentar-se na forma de dois estados de polarização. O fenótipo N1 (supressor de tumor) que expressa citocinas imunoativadoras e antitumorais, como o fator de necrose tumoral (TNF- α) e interleucina 12 (IL-12). O fenótipo N2 (promotor de tumor) expressa fatores promotores de angiogênese e invasão, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e metaloproteinases da matriz (MMP8 e 9); e citocinas imunossupressoras, como o fator de crescimento transformador (TGF- β 1) (GIRALDO *et al.*, 2019; HINSHAW; SHEVDE, 2019).

Da mesma forma que os neutrófilos, os macrófagos M1 produzem citocinas pró-inflamatórias (como IL-12, IL-23 e TNF- α) que potencializam a resposta imune antitumoral, e os macrófagos M2, expressam moléculas imunomoduladoras (como TGF- β 1) implicadas na supressão da imunovigilância contra células tumorais, na angiogênese e no remodelamento da matriz para promover a progressão tumoral e metástase (GIRALDO *et al.*, 2019; LEI *et al.*, 2020). Nos últimos anos, acreditava-se que os macrófagos associados aos tumores consistiam em uma grande subpopulação de macrófagos M2, no entanto, essas células são capazes de adotar uma grande variedade de estados de ativação entre M1 e M2, compartilhando certas propriedades de cada fenótipo (PELTANOVA; RAUDENSKA; MASARIK, 2019).

As células NK também são um subconjunto importante de células que medeiam a resposta imune inata no câncer. Essas células podem ser classificadas em dois subconjuntos, dependendo dos níveis de expressão dos marcadores de superfície CD16 e CD56. A subpopulação CD56[±] CD16⁺⁺ é responsável pelas funções citotóxicas, como a indução da apoptose e a citotoxicidade mediada pela liberação de perforina e granzima. Essas células são extremamente eficientes na eliminação de células malignas circulantes e na prevenção de metástases tumorais, no entanto, no microambiente tumoral as células malignas empregam diversos mecanismos para evitar a destruição por NKs, incluindo revestir-se com colágeno e utilizar plaquetas como escudo para evitar a detecção pelas células NK (HINSHAW; SHEVDE, 2019; LEI *et al.*, 2020; PELTANOVA; RAUDENSKA; MASARIK, 2019). A subpopulação CD56⁺⁺ CD16[±] se localiza principalmente em tecidos linfoides, órgãos sólidos saudáveis, como fígado, rim e glândulas suprarrenais, e também em vários tipos de tumores sólidos. Essas células apresentam alta atividade secretora e produzem uma variedade de citocinas, como interferon γ (IFN- γ), TNF, IL-5, IL-10 e IL-13. Alguns estudos recentes fornecem evidências de que essas células CD56⁺⁺ CD16[±] podem apresentar atividade pró-angiogênica em tumores sólidos (RADOMSKA-LEŚNIEWSKA; BIAŁOSZEWSKA; KAMIŃSKI, 2021).

As células NKT são um subconjunto de células T que coexpressam marcadores de linhagem NK (CD56), no entanto, o seu receptor de células T (TCR) reconhece lipídios em vez de peptídeos. Essas células fazem uma interface entre os sistemas imunes inato e adaptativo. Assim como os linfócitos T, essas células precisam ser ativadas para exercer a sua função e, da mesma forma que as células NK, respondem rapidamente à estimulação antigênica, produzindo várias citocinas. As células NKT podem ser subclassificadas de acordo com os seus TCRs em tipo I e tipo II. As células NKT tipo I apresentam um TCR recombinante restrito (ou invariante) e exercem importante atividade antitumoral. Já as células NKT tipo II expressam um TCR variante e suprimem a atividade antitumoral (BAE *et al.*, 2019; HINSHAW; SHEVDE, 2019; TERABE; BERZOFSKY, 2018).

A imunidade adaptativa compreende todas as células que constroem uma resposta imune antígeno-específica, e incluem os linfócitos T e os linfócitos B. As células T são divididas em células T CD4⁺ (células T auxiliares ou T *helper*) e células T CD8⁺ (células T citotóxicas). Após a sua ativação, as células T citotóxicas reconhecem antígenos específicos nas células tumorais e levam à sua destruição via indução da apoptose e liberação de IFN- γ e TNF α , os quais induzem a citotoxicidade (ARNETH, 2020; WANG *et al.*, 2017). Os linfócitos T auxiliares coordenam todos os elementos celulares da resposta imune e possuem várias orientações funcionais. As células Th1 potencializam a resposta imune celular, mediante a liberação de IL-2, TNF α e IFN- γ . Células Th2 suportam a resposta imune mediada por anticorpos, por meio da produção de IL-4, IL-5 e IL-13. As células Th17, por outro lado, produzem IL-17A, IL-17F, IL-21 e IL-22, que promovem o crescimento do tumor ao favorecer a inflamação do tecido (GIRALDO *et al.*, 2019). As células T regulatórias (Treg) compreendem um subconjunto de células T caracterizadas pela expressão dos marcadores CD4, CD25 e fator de transcrição *forkhead box P3* (FOXP3). Essas células desempenham um papel fundamental para a manutenção da homeostase imunológica e tolerância periférica, por meio da supressão das células imunes efetoras. Por outro lado, ao suprimir a resposta das células efetoras no microambiente tumoral, as células Treg podem contribuir para o desenvolvimento do câncer (LEI *et al.*, 2020; PELTANOVA; RAUDENSKA; MASARIK, 2019).

Os linfócitos B são células especializadas na produção de anticorpos, mas também atuam como células apresentadoras de antígenos na ativação dos linfócitos T. No entanto, o seu papel na resposta imune contra o câncer permanece controverso. Por um lado, sabe-se que os anticorpos produzidos pelos linfócitos B podem opsonizar células tumorais, ativar a cascata de complemento e contribuir para a destruição das células malignas mediada por células NK. Em contrapartida, foi demonstrado em diversos estudos que as células B podem estar associadas ao

processo de promoção do escape imunológico e desenvolvimento de resistência ao tratamento (ARNETH, 2020; GIRALDO *et al.*, 2019). Assim como os linfócitos T, foram detectados subtipos imunossupressores de células B, denominadas células B reguladoras (Breg). Esta heterogeneidade na função das células B pode explicar a falta de consenso em relação ao seu envolvimento no câncer (HADLER-OLSEN; WIRSING, 2019).

As células imunes podem ser encontradas, em proporções variadas, na maioria, senão em todas as lesões neoplásicas. É amplamente aceito que exista uma interação entre a resposta imune e os processos de desenvolvimento e progressão tumorais e já foi comprovado que o estudo dessas células no microambiente tumoral fornece valores prognósticos em vários tipos de câncer (BRUNI; ANGELL; GALON, 2020; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

2.6 DIAGNÓSTICO DO CÂNCER DE BOCA

A detecção precoce do câncer de boca é uma das formas mais eficientes de reduzir a alta mortalidade por essa doença e, além disso, pode minimizar a morbidade da doença e seu tratamento, que está associado a uma grave perda de função fisiológica, desfiguração, depressão e má qualidade de vida (MEHROTRA; GUPTA, 2011). Entretanto, apesar do fácil autoexame e exame físico, os pacientes quando procuram assistência odontológica ou médica, geralmente, apresentam doença em estágio avançado (MONTERO; PATEL, 2015).

Em geral, se uma lesão na mucosa oral não cicatrizar dentro de três semanas, um tumor maligno ou alguma outra condição séria deve ser investigado (RIVERA, 2015). O método padrão-ouro para avaliar se a lesão é benigna ou maligna, é a realização do exame oral convencional, seguido de biópsia e análise histopatológica de lesões suspeitas (ULAGANATHAN *et al.*, 2017).

Na avaliação inicial, coletam-se informações sobre o início da lesão, duração, sintomas associados, fatores de risco, história familiar e comorbidades. O exame físico auxilia na determinação do estadiamento clínico e no planejamento da cirurgia e reconstrução. O exame oral convencional envolve a inspeção visual e palpação dos tecidos intra e extraorais e pescoço, e permite avaliar de forma precisa a extensão da doença, a terceira dimensão do tumor, a presença de invasão óssea e a ruptura da pele (CHINN; MYERS, 2015; MONTERO; PATEL, 2015).

Embora o exame oral convencional possa ser eficaz como teste de triagem, a capacidade de discriminar visualmente se uma determinada lesão é benigna ou maligna é ruim. Em comparação com o exame histopatológico, o exame oral convencional apresentou 93% de

sensibilidade, mas apenas 31% de especificidade para a identificação de displasia ou carcinoma (EPSTEIN *et al.*, 2012; PATEL *et al.*, 2011; YANG *et al.*, 2018).

A biópsia é uma técnica invasiva e está associada a morbidade, custos e também com diversas limitações técnicas. Para correta realização do procedimento, a biópsia deve ser feita por um especialista habilitado, que deve selecionar a área da lesão com maior probabilidade de conter displasia ou carcinoma, cuja presença e o grau podem variar ao longo da lesão. Erros de amostragem podem levar ao subdiagnóstico ou a um diagnóstico errôneo, particularmente em casos de lesões grandes, heterogêneas ou multifocais. Outras limitações da técnica incluem a necessidade de se realizar várias etapas para preparar a amostra de biópsia para a avaliação morfológica, e também é necessário um patologista treinado para realizar a avaliação histopatológica (YANG *et al.*, 2018). A análise histopatológica depende da classificação morfológica da displasia, que requer a avaliação de vários fatores subjetivos e, portanto, envolve altos índices de variância inter e intraobservador, mesmo entre especialistas (JAYARAJ *et al.*, 2015; SPEIGHT *et al.*, 2015). Como exemplo, nos estudos de Abbey *et al.* (1995), Karabulut *et al.* (1995) e Brothwell *et al.* (2003), a concordância interobservador variou de 35,8% a 69,0% dos casos, enquanto a concordância intraobservador variou de 30 a 87%.

As classificações histopatológicas para o CEC de boca surgiram na tentativa de explicar o comportamento biológico discrepante de tumores com características clínicas semelhantes. A classificação histopatológica proposta pela OMS baseia-se no grau de diferenciação celular e permite a classificação dos carcinomas em: *i*) bem diferenciados, quando a arquitetura do tecido se assemelha ao epitélio escamoso normal; *ii*) moderadamente diferenciados, quando há certo grau de pleomorfismo nuclear, atividade mitótica e pouca queratinização; *iii*) pouco diferenciados, quando há predomínio de células imaturas, atividade mitótica intensa e mínima queratinização. Entretanto, essa classificação é essencialmente histológica e extremamente limitada, e correlaciona-se pobremente com o prognóstico do paciente (LOURENÇO *et al.*, 2007; RIVERA, 2015; WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2017a).

A realização de exames de imagem é essencial no pré-operatório para avaliar a extensão do tumor, metástases nos linfonodos cervicais e infiltração tumoral em grandes vasos. Dentre as técnicas de imagens, a tomografia computadorizada e a ressonância magnética são as mais utilizadas (KESHAVARZI *et al.*, 2017).

2.7 TRATAMENTO

O tratamento do câncer de boca inclui a cirurgia, radioterapia, quimioterapia ou uma combinação dessas alternativas, e requer uma abordagem multidisciplinar com cirurgiões, radioterapeutas, médicos oncologistas, radiologistas, fonoaudiólogos, dentistas, patologistas nutricionistas, entre outros. A escolha do tratamento depende não apenas da localização, tamanho e estadio do tumor primário; mas também das comorbidades apresentadas pelo paciente, estado nutricional e os desejos do paciente de enfrentar a terapia (DE FELICE *et al.*, 2019; JOHNSON *et al.*, 2020; PFISTER *et al.*, 2020). Um grande desafio no tratamento de qualquer câncer é obter uma alta taxa de cura, preservando estruturas vitais e função. Isso é especialmente verdadeiro para os cânceres de boca que possuem uma anatomia complexa, onde estruturas e funções principais são afetadas tanto pelo câncer quanto pelo seu tratamento. A preservação de órgãos deve ser levada em conta e deve ser avaliada com todas as abordagens de tratamento (HADDAD; SHIN, 2008).

O tratamento do câncer de cavidade oral é geralmente cirúrgico. Embora a radioterapia também possa ser utilizada com eficácia semelhante no tratamento desses tumores, ela é geralmente reservada para aqueles pacientes que não podem se submeter à cirurgia ou como terapia adjuvante para doença avançada, devido aos elevados riscos de osteorradionecrose associados às altas doses de radiação necessárias no tratamento radioterápico primário (BRASIL, 2015; CHINN; MYERS, 2015).

Para o tratamento do câncer de orofaringe recomenda-se ressecção cirúrgica ou radioterapia. Tanto a cirurgia quanto a radioterapia podem resultar em comprometimento funcional significativo, com prejuízo da função oral, fala e deglutição, logo é importante analisar em cada caso as possíveis sequelas do tratamento. A vantagem do tratamento cirúrgico é a menor duração do tratamento; pois requer uma única intervenção, enquanto a radioterapia exige de seis a sete semanas de terapia. Novas técnicas cirúrgicas, como a cirurgia robótica, bem como técnicas reconstrutivas aprimoradas, ampliaram as indicações de tratamento cirúrgico primário e aumentaram a probabilidade de preservação da função fisiológica, enquanto avanços nas técnicas de radioterapia, como a radioterapia modulada por intensidade e guiada por imagem, podem reduzir a morbidade do tratamento (BRASIL, 2015; CRAMER *et al.*, 2019; GENDEN *et al.*, 2010; JOHNSON *et al.*, 2020).

A terapia sistêmica com agentes quimioterápicos é indicada em tumores avançados, onde há um risco maior de metástases para outras partes do corpo. Pode ser usada em combinação com a radioterapia, quando a cirurgia não é indicada (radioquimioterapia

definitiva) e em pacientes com doença recorrente/persistente após ressecção cirúrgica (radioquimioterapia adjuvante); ou ainda na forma de quimioterapia de indução, antes do tratamento definitivo (CRAMER *et al.*, 2019; PFISTER *et al.*, 2020). O esquema terapêutico padrão inclui um fármaco baseado em platina (cisplatina ou carboplatina), em monoterapia ou associado a outros agentes antineoplásicos. No entanto, devido aos efeitos tóxicos substanciais associados aos derivados da platina, seu uso geralmente é reservado para pacientes não idosos e que não apresentam doenças coexistentes importantes. Nos demais casos, o tratamento deve ser realizado com radioterapia isolada ou associada com um agente sensibilizante à radiação, como a fluoruracila, o paclitaxel, a mitomicina C ou a gemcitabina (BRASIL, 2015; CHOW, 2020).

Considerando que o tratamento quimiorradioterápico do câncer de boca está associado a morbidade e a toxicidade substanciais e que a doença recorrente e metastática é geralmente incurável, a pesquisa de terapias direcionadas tem sido objeto de grande interesse clínico. Terapias direcionadas incluem geralmente anticorpos e pequenas moléculas destinadas a atingir uma molécula ou via bem definida, resultando na inibição do crescimento ou destruição do tumor. Devido a essa especificidade, as terapias direcionadas podem causar menos efeitos tóxicos comparados aos agentes citotóxicos convencionais (MANDAL *et al.*, 2016; MORRIS; TRAYNOR; HARARI, 2016). A principal terapia alvo atualmente disponível para CEC de boca é o cetuximabe, um anticorpo monoclonal dirigido ao EGFR, cujo mecanismo de ação leva à inibição da função do receptor, mediação da resposta imune antígeno-específica e consequente morte celular. O seu uso foi aprovado pela FDA (do inglês *Food and Drug Administration*) como um agente sensibilizante à radiação, utilizado de forma isolada ou em combinação com a quimioterapia, para o tratamento de pacientes com doença avançada, recorrente ou metastática, especialmente naqueles em que há preocupação com a toxicidade da quimioterapia à base de platina (CRAMER *et al.*, 2019; JOHNSON *et al.*, 2020; MOSKOVITZ *et al.*, 2017).

Mais recentemente, novas terapias direcionadas foram desenvolvidas e mostraram resultados promissores em ensaios clínicos de fase II e III, mas ainda não foram aprovados para uso em cânceres de boca. As terapias alvo mais estudadas incluem: outros anticorpos monoclonais para EGFR, inibidores da tirosina quinase do EGFR, inibidores do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), inibidores do receptor do VEGF (VEGFR) e inibidores da via PI3K/AKT/mTOR (JOHNSON *et al.*, 2020; KOZAKIEWICZ; GRZYBOWSKA-SZATKOWSKA, 2018; SUH *et al.*, 2014).

Como já descrito anteriormente, o CEC de boca é um grupo de tumores altamente heterogêneo. É provável que sua conduta mude em um futuro próximo, passando do tratamento como uma doença única para a adaptação da terapia com base nas características do paciente e do tumor. E o aumento da compreensão da biologia molecular, e a identificação de marcadores moleculares, que estão relacionados com a resposta ao tratamento utilizado, ajudará a personalizar o tratamento do câncer de boca no futuro (KOZAKIEWICZ; GRZYBOWSKA-SZATKOWSKA, 2018; SUH *et al.*, 2014).

2.8 PROGNÓSTICO DO CÂNCER DE BOCA

A sobrevida do paciente com CEC é predita principalmente pelo local anatômico acometido, estadiamento no momento do diagnóstico e status do HPV. Diversas características patológicas são consideradas como indicadores prognósticos para o CEC de boca e incluem a presença de metástase em linfonodos cervicais, a profundidade de invasão do tumor primário, as margens positivas de ressecção cirúrgica, a invasão perineural e a invasão extracapsular nodal. No CEC de boca, a presença de metástase cervical é o fator prognóstico mais importante, e a presença e o número de linfonodos cervicais histologicamente envolvidos predizem o risco de metástases distantes subsequentes e recorrência local. Pacientes com linfonodos cervicais histologicamente negativos têm uma taxa de sobrevida em 5 anos de 75%, enquanto os pacientes com pelo menos um linfonodo histologicamente positivo, apresentam uma sobrevida de 49%. A disseminação extracapsular em linfonodos cervicais está associada a uma redução de 50% na sobrevida entre pacientes com metástases linfonodais, constituindo um parâmetro importante no planejamento do tratamento adjuvante após cirurgia primária (KADEMANI *et al.*, 2005; RETTIG; D'SOUZA, 2015; TAGHAVI; YAZDI, 2015; WALKER; BOEY; MCDONALD, 2003).

O estadiamento do CEC de boca é realizado com o uso do sistema de classificação TNM do *American Joint of Committee on Cancer* (AJCC), o qual se baseia na avaliação clínica do tamanho do tumor (T), comprometimento dos linfonodos regionais (N) e metástases à distância (M). Quando a ressecção cirúrgica do tumor é realizada, o estadiamento patológico (pTNM), derivado da análise histológica do tumor ressecado e/ou dos linfonodos regionais, é útil na seleção da terapia adjuvante pós-operatória e para estimar o prognóstico (KREPPEL *et al.*, 2016; RIVERA, 2015).

A oitava edição da classificação TNM trouxe algumas mudanças na classificação de tumores de cavidade oral (Quadro 1) e orofaringe (Quadro 2), com a inclusão de outras

características patológicas que são consideradas indicadores prognósticos, como a avaliação de invasão extracapsular nos linfonodos, a profundidade de invasão tumoral (para os tumores da cavidade oral), e um sistema de estadiamento diferente para os tumores da orofaringe positivos para p16^{INK4A}, que é usado como um marcador indireto do HPV. Entretanto, ainda é necessária uma validação adicional dessa nova classificação, e sua aplicação clínica requer cautela (DENARO; RUSSI; MERLANO, 2018; LYDIATT *et al.*, 2017).

Quadro 1 - Classificação TNM dos tumores de lábio e cavidade oral.

T – Tumor Primário			
TX	O tumor primário não pode ser avaliado		
Tis	Carcinoma in situ		
T1	Tumor ≤ 2 cm e DOI ≤ 5 mm		
T2	Tumor ≤ 2 cm e DOI > 5 mm e ≤ 10 mm ou tumor > 2 cm e ≤ 4 cm e DOI ≤ 10 mm		
T3	Tumor > 4 cm ou qualquer tumor com DOI > 10 mm		
T4a	Tumor de Lábio: invade cortical óssea, nervo alveolar inferior, assoalho da boca, ou pele da face (queixo ou nariz) Tumor da Cavidade oral: invade cortical óssea, músculos profundos/extrínsecos da língua (genioglosso, hioglosso, palatoglosso e estiloglosso), seios maxilares ou pele da face		
T4b	Tumor que invade o espaço mastigador, lâminas pterigóides ou base do crânio ou envolve artéria carótida interna		
N – Linfonodos Regionais			
NX	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados		
N0	Ausência de metástase em linfonodos regionais		
N1	Metástase em um único linfonodo homolateral, ≤ 3 cm, sem ECS.		
N2a	Metástase em um único linfonodo, ≤ 3 cm, com ECS, ou em um único linfonodo, > 3 cm e ≤ 6 cm, sem ECS.		
N2b	Metástase em linfonodos homolaterais múltiplos, ≤ 6 cm, sem ECS.		
N2c	Metástase em linfonodos bilaterais ou contralaterais, ≤ 6 cm, sem ECS.		
N3a	Metástase em qualquer linfonodo > 6 cm, sem ECS.		
N3b	Metástase em um único linfonodo > 3 cm, com ECS; ou qualquer metástase em linfonodos múltiplos com ECS.		
M – Metástase à distância			
MX	A presença de metástase à distância não pode ser avaliada		
M0	Ausência de metástase à distância		
M1	Metástase à distância		
Estadios clínicos (T+N+M)			
I	T1, T2	N0, N1	M0
II	T1, T2	N2	M0
	T3	N0, N1, N2	M0
III	T4	Qualquer N	M0
	Qualquer T	N3	M0
IV	Qualquer T	Qualquer N	M1

Fonte: Adaptado de AJCC Cancer Staging Manual, 8ª ed. (AMIN; EDGE, 2017).

Nota: DOI (do inglês *deep of invasion*) – profundidade de invasão; ECS (do inglês *Extracapsular spread*) – invasão extracapsular.

Quadro 2 - Classificação TNM dos tumores de orofaringe.

T – Tumor Primário			
TX	O tumor primário não pode ser avaliado		
Tis*	Carcinoma in situ		
T1	Tumor ≤ 2 cm		
T2	Tumor > 2 cm e ≤ 4 cm		
T3	Tumor > 4 cm ou extensão até superfície lingual da epiglote		
T4a	Tumor invade a laringe, músculo extrínseco da língua, pterigoideo medial, palato duro ou mandíbula.		
T4b*	Tumor invade o músculo pterigoideo lateral, lâminas pterigóides, nasofaringe lateral, base do crânio ou envolve a artéria carótida.		
N – Linfonodos Regionais			
NX	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados		
N0	Ausência de metástase em linfonodos regionais		
N1	p16+ Metástase em um único linfonodo homolateral, ≤ 3 cm, sem ECS. p16- Metástase em um ou mais linfonodos homolaterais, ≤ 6 cm.		
N2	p16+ Metástase em linfonodos bilaterais ou contralaterais, ≤ 6 cm, sem ECS.		
N2a	p16- Metástase em um único linfonodo, ≤ 3 cm, com ECS, ou em um único linfonodo, > 3 cm e ≤ 6 cm, sem ECS.		
N2b	p16- Metástase em linfonodos homolaterais múltiplos, ≤ 6 cm, sem ECS.		
N2c	p16- Metástase em linfonodos bilaterais ou contralaterais, ≤ 6 cm, sem ECS.		
N3	p16+ Metástase em qualquer linfonodo > 6 cm.		
N3a	p16- Metástase em qualquer linfonodo > 6 cm, sem ECS.		
N3b	p16- Metástase em um único linfonodo > 3 cm, com ECS; ou qualquer metástase em linfonodos múltiplos com ECS.		
M – Metástase à distância			
MX	A presença de metástase à distância não pode ser avaliada		
M0	Ausência de metástase à distância		
M1	Metástase à distância		
Estadios clínicos TNM (Tumores p16^{INK4A} positivos)			
I	T1, T2	N0, N1	M0
II	T1, T2	N2	M0
	T3	N0, N1, N2	M0
III	T4	Qualquer N	M0
	Qualquer T	N3	M0
IV	Qualquer T	Qualquer N	M1
Estadios clínicos TNM (Tumores p16^{INK4A} negativos)			
I	T1	N0	M0
II	T2	N0	M0
III	T3	N0	M0
	T1, T2, T3	N1	M0
IVa	T4a	N0, N1	M0
	T1, T2, T3, T4a	N2a,b,c	M0
IVb	T4b	Qualquer N	M0
	Qualquer T	N3a,b	M0
IVc	Qualquer T	Qualquer N	M1

Fonte: Adaptado de AJCC Cancer Staging Manual, 8ª ed. (AMIN; EDGE, 2017).

Nota: *As categorias Tis e T4b foram removidas da classificação dos tumores de orofaringe p16^{INK4A} positivos; p16+ Apenas para os tumores de orofaringe p16^{INK4A} positivos; p16- Apenas para os tumores de orofaringe p16^{INK4A} negativos.

O sistema TNM é o sistema de prognóstico mais amplamente aceito para estadiamento dos tumores, por ser uma ferramenta simples, relativamente precisa, objetiva e pela facilidade de uso. No entanto, tem se mostrado insuficiente para predizer com precisão a agressividade do tumor ou para selecionar modalidades de tratamento de forma individual (BLATT *et al.*, 2017; WALKER; BOEY; MCDONALD, 2003). Pacientes com estadios clínicos e histopatológicos

semelhantes exibem diferentes comportamentos clínicos, com variados graus de potencial invasivo e metastático, diferentes respostas ao tratamento e até diferentes desfechos. Assim, analisar a morfologia da célula tumoral ou o grau de queratinização oferece uma visão mínima sobre o comportamento do tumor (SOLOMON *et al.*, 2016).

Avanços moleculares na pesquisa do câncer de boca revelaram que alterações moleculares podem desempenhar um papel crucial na progressão do CEC de boca, e o estudo dessas moléculas biológicas, ou biomarcadores, envolvidas na carcinogênese poderia fornecer dados diagnósticos valiosos (SANTOSH; JONES; HARVEY, 2016). Além disso, a investigação de alterações fenotípicas em células de CEC de boca pode ter um valor prognóstico estratégico, e atenção especial tem sido recentemente focada no uso de potenciais biomarcadores moleculares como preditores confiáveis de agressividade tumoral, que poderiam ser úteis na seleção de pacientes que se beneficiariam de terapia adjuvante intensiva (OLIVEIRA; RIBEIRO-SILVA, 2011).

Um biomarcador de câncer pode ser uma molécula secretada por uma célula tumoral ou uma resposta específica do corpo à presença de câncer. Podem ser usados para avaliação do paciente em vários contextos clínicos, como estimar risco de doença, rastreamento de cânceres primários ocultos, distinguir achados benignos de malignos ou um tipo de malignidade de outro, determinar o prognóstico, monitorar o status da doença, detectar a recorrência, ou ainda determinar a resposta à terapia (RIVERA *et al.*, 2017; SANTOSH; JONES; HARVEY, 2016).

Nas últimas décadas, mais de cem biomarcadores moleculares foram introduzidos como potenciais ferramentas de prognóstico para o carcinoma de boca, entre eles os mais relatados são: p53, Ki-67, p16 e VEGF (ALMANGUSH *et al.*, 2017). Desses, os marcadores p53, Ki-67 e p16 foram selecionados para o presente estudo, e serão discutidos a seguir.

2.8.1 Marcadores de proliferação celular e apoptose

Em geral, a transformação maligna é decorrente de um desequilíbrio entre a proliferação celular e a apoptose, que leva a uma sinalização proliferativa sustentada. O Ki-67 e o p53 são os marcadores tumorais mais utilizados para o estudo da proliferação celular e apoptose (BLATT *et al.*, 2017; RIVERA; VENEGAS, 2014).

O Ki-67 é uma proteína altamente expressa em células em proliferação celular, mas ausente em células em repouso. Esta característica tornou o Ki-67 um importante marcador de proliferação celular, utilizado clinicamente para a classificação e avaliação prognóstica de vários tipos de câncer. No entanto, só recentemente a função dessa proteína foi esclarecida. O

Ki-67 é uma proteína altamente carregada, com propriedades surfactantes, que recobre a superfície dos cromossomos mitóticos, promovendo a individualização dos cromossomos após a quebra do envelope nuclear. Além disso, o Ki-67 facilita a fixação do cromossomo ao fuso mitótico e a mobilidade individual dos mesmos (BATTY; GERLICH, 2019; UXA *et al.*, 2021). Durante a interfase, o Ki-67 se localiza na periferia nucleolar, e auxilia na organização da heterocromatina. Sua expressão já é detectável no início de G1, como pontos homoganeamente distribuídos, até se localizar apenas no nucléolo (DIAS *et al.*, 2021; SUN; KAUFMAN, 2018).

A proliferação celular está intimamente relacionada à recorrência do tumor, e em diversos estudos já foi demonstrada a relevância do Ki-67 no prognóstico de cânceres, como o câncer de mama, de pulmão e de próstata. Embora o papel do Ki-67 no prognóstico de pacientes com CEC de boca seja estudado há duas décadas, sua aplicação ainda é controversa (GALVIS *et al.*, 2018; SCHOLZEN; GERDES, 2000; XIE *et al.*, 2016). No estudo de Jing e colaboradores (2019), a expressão de Ki-67 aumentou com a progressão da displasia na mucosa oral. Além disso, pacientes com alta expressão de Ki-67 tiveram um pior desfecho clínico, mais tumores pouco diferenciados, aumento da metástase em linfonodos e pior sobrevida.

A proteína p53 é um fator de transcrição que tem um papel vital na regulação dos genes responsáveis pela parada do ciclo celular, senescência e apoptose. O TP53 é o gene mais comumente mutado no CEC de boca, são observadas mutações em até 80% dos casos. Além disso, estima-se que a perda da função da p53 ocorra em mais de 90% dos CEC por perda de heterozigossidade, interação com a oncoproteína viral E6 do HPV ou aumento da expressão de MDM2, que promove a degradação de p53 (KANG; KIESS; CHUNG, 2015). Em tecidos normais, a proteína p53 tem uma meia-vida curta e é expressa em pequenas quantidades e, por isso, normalmente é indetectável. Por outro lado, a proteína p53 mutante tem meia-vida prolongada e pode se acumular nos núcleos das células e, dessa forma, é detectável utilizando-se colorações específicas. A mutação da proteína p53 é considerada um evento precoce na carcinogênese do CEC de boca e sua expressão merece atenção especial para detecção precoce do câncer (ULAGANATHAN *et al.*, 2017).

2.8.2 p16

Apesar de vários biomarcadores terem sido introduzidos como potenciais ferramentas prognósticas para o CEC de boca, apenas alguns biomarcadores foram validados com sucesso para a prática clínica. Desses, apenas o status de HPV tem uma utilidade clínica comprovada (RIVERA *et al.*, 2017).

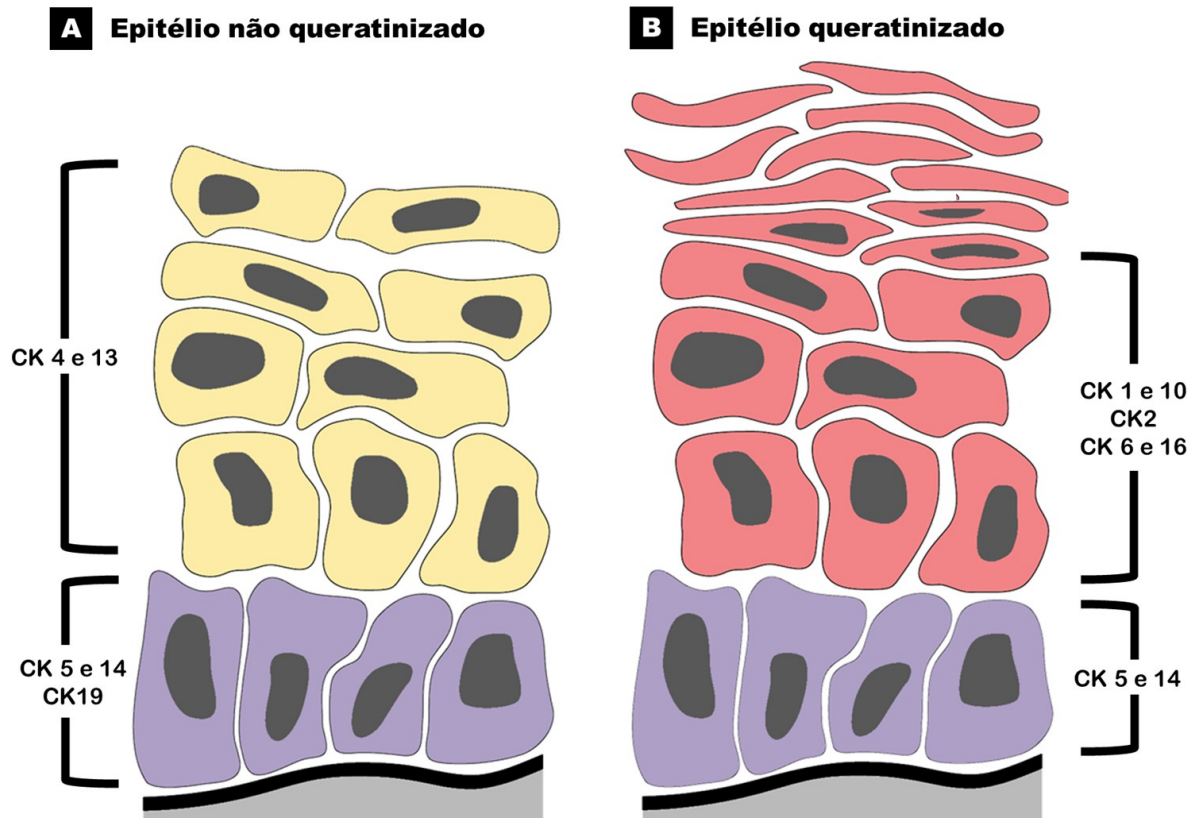
O câncer de orofaringe relacionado ao HPV possui prognóstico significativamente melhor, com melhor resposta ao tratamento e uma sobrevida 50% maior, em comparação aos tumores HPV-negativos, o que levou a comunidade médica a implementar um novo sistema de estadiamento dedicado a essa doença emergente (MIRGHANI; BLANCHARD, 2018; RETTIG; D’SOUZA, 2015). No entanto, as diretrizes para o teste de HPV ainda não foram estabelecidas e, portanto, diferem em cada país. Os testes disponíveis incluem detecção do DNA ou RNA do HPV por meio de reação em cadeia da polimerase (PCR) ou hibridização *in situ* (ISH), ensaios séricos e salivares e imunomarcação para proteína p16 (KATO *et al.*, 2020).

A proteína p16, também conhecida como p16^{INK4a}, é um inibidor de CDK membro da família INK4, que atua no controle do ciclo celular. Em células normais, a proteína p16 é expressa em baixas concentrações. No entanto, a degradação da pRb pela oncoproteína E7 do HPV, leva à perda do *feedback* negativo que pRb exerce sobre p16, o que leva à superexpressão dessa proteína (Figura 8) (FARAJI *et al.*, 2017; SRITIPPHO; CHOTJUMLONG; IAMAROON, 2015). Na 8ª edição do sistema TNM para CEC de cabeça e pescoço, a imunomarcação de p16^{INK4A} foi incluída como um marcador indireto para o status do HPV em tumores de orofaringe, devido ao baixo custo, alta sensibilidade, execução simples e disponibilidade quase universal. No entanto, tem uma especificidade significativamente menor em comparação com a detecção do DNA do HPV por PCR (padrão-ouro) (KATO *et al.*, 2020; LYDIATT *et al.*, 2017).

2.8.3 Citoqueratinas

As citoqueratinas (CKs) são ferramentas particularmente úteis no diagnóstico oncológico. As CKs são proteínas do filamento intermediário presentes no citoplasma de células epiteliais que ajudam a manter o citoesqueleto da célula. Mais de 20 CKs já foram descritas e sua expressão varia de acordo com a linhagem epitelial, localização e grau de diferenciação. Epitélios estratificados, como os da cavidade oral, expressam CK5 e 14 na sua camada basal e dependendo do estado de diferenciação e queratinização do epitélio, as camadas superiores expressam CK1 e 10 ou CK4 e 13 (Figura 10). Vários locais na cavidade oral humana mostram diferentes graus de diferenciação e queratinização (Figura 2) e, conseqüentemente, a expressão de CK varia. Por exemplo, a mucosa bucal, que é um epitélio não queratinizado, expressa o par CK4 e 13, enquanto a gengiva e o palato duro que são epitélios queratinizados expressam CK1 e 10 (GROEGER; MEYLE, 2019; UPASANI; VAIDYA; BHISEY, 2004).

Figura 10 - Distribuição das citoqueratinas na mucosa oral normal



Fonte: Adaptado de Roche (2021) e Presland e Dale (2000).

Nota: Em roxo: camada basal; Em amarelo: camadas suprabasais do epitélio não queratinizado; Em vermelho: camadas suprabasais do epitélio queratinizado.

Além dessas, outras CKs podem ser expressas de forma variável no epitélio. A CK19, geralmente presente em epitélios simples, também pode ser encontrada na camada basal dos epitélios escamosos não queratinizados. Nas camadas suprabasais do epitélio do palato duro e gengiva podem ser expressas as CK2, 6 e 16 (BERKOVITZ; HOLLAND; MOXHAM, 2017; DEPONDT *et al.*, 1999).

Durante a transformação de células normais em células malignas, os padrões de citoqueratina são geralmente mantidos, e essa propriedade permitiu que as citoqueratinas fossem aplicadas como marcadores de diagnóstico. Nos casos em que o diagnóstico permanece obscuro com base na apresentação clínica e histopatologia convencional, como carcinomas pouco diferenciados ou disseminados em vários órgãos e metástases de tumor primário com localização desconhecida, a determinação da CK é especialmente valiosa para a correta identificação do tumor e posterior seleção do tratamento mais apropriado (KARANTZA, 2011).

Apesar da constância de certas queratinas durante a transformação maligna das células, existem diferenças significativas entre os perfis de CKs dos epitélios escamosos normais e

malignos, e o estudo dessas alterações pode ser valioso no diagnóstico precoce de cânceres de boca (BRYNE, 1991; MORGAN *et al.*, 1987).

Duas alterações principais foram relatadas na expressão de CKs em amostras de CEC oral. A primeira é uma alteração nas CKs de diferenciação (CK1 e 10 e CK4 e 13). Ao contrário do epitélio normal, as células neoplásicas de tumores bem e moderadamente diferenciados frequentemente coexpressam ambos os conjuntos de queratinas de diferenciação. A presença desses marcadores também parece diminuir de forma diretamente proporcional ao grau de diferenciação dos tumores, sendo pouco ou mesmo não expressos em tumores pouco diferenciados (BLOOR; SEDDON; MORGAN, 2001; MORGAN; SU, 1994; SAFADI *et al.*, 2019).

A segunda alteração de CKs encontrada no CEC oral é a expressão anômala de CKs do epitélio simples. As CKs 8 e 18 normalmente são expressas em epitélios não escamosos, no entanto, também foram detectadas em vários graus de displasia oral e estão associadas a um prognóstico desfavorável em pacientes com CEC oral, pois parecem ter um papel ativo na invasão e metástase de células cancerígenas (DEPONDY *et al.*, 1999; FROHWITTER *et al.*, 2016; MORGAN; SU, 1994; REIBEL, 2003). A expressão aberrante de CK19 também já foi relacionada a um maior estadiamento TNM e menores taxas de sobrevida em pacientes com CEC (SAFADI *et al.*, 2019).

2.9 ESTUDO DOS BIOMARCADORES NO CÂNCER DE BOCA

Embora o valor clínico da análise histopatológica esteja bem estabelecido e na maioria dos casos o diagnóstico possa ser elucidado de maneira confiável, nas últimas décadas foi demonstrado que a imunofenotipagem de células tumorais é muito útil para o diagnóstico, classificação, avaliação prognóstica, detecção de doença residual em certas neoplasias malignas, e ainda pode ajudar a identificar pacientes que provavelmente se beneficiarão de estratégias de imunoterapia e/ou radioquimioterapia (GRIMM *et al.*, 2016; LEERS; NAP, 2002).

A IHQ é uma ferramenta globalmente disponível que complementa a análise histopatológica e citológica, e se baseia no reconhecimento de antígenos específicos em tecidos ou células por anticorpos. A principal vantagem da identificação de biomarcadores prognósticos por IHQ é o estabelecimento de uma associação direta entre a morfologia e esses biomarcadores, o que pode auxiliar na determinação de sua relevância funcional (OLIVEIRA; RIBEIRO-SILVA, 2011).

Todavia, a IHQ como uma ferramenta adicional à análise morfológica nem sempre é satisfatória e apresenta diversas limitações. A IHQ é um procedimento moroso que envolve várias etapas, como seleção, fixação, processamento e coloração do tecido. A interpretação dos resultados é realizada pela avaliação da presença, do padrão e da intensidade de produtos cromogênicos depositados no tecido, e, portanto, a credibilidade dos resultados pode ser problemática devido à sua natureza subjetiva (DABBS, 2013; KWON *et al.*, 2015). Além disso, tumores sólidos consistem em uma mistura de células estromais normais, inflamatórias e malignas. Utilizando a IHQ, é difícil discriminar entre células positivas para uma proteína e células negativas entremeadas. Ademais, esse método é adequado para análise qualitativa de proteínas, todavia, devido à natureza heterogênea dos cânceres, análises quantitativas de biomarcadores são importantes para entender melhor e diagnosticar o câncer (CORVER; CORNELISSE, 2002; KWON *et al.*, 2015; LEERS; NAP, 2002). Outra desvantagem da IHQ é que apenas um número limitado de antígenos pode ser corado em uma única seção de tecido, devido à baixa disponibilidade de conjugados para sua detecção (VAN DEN BRAND *et al.*, 2014).

Com a maior compreensão da biologia molecular do câncer e a descoberta de novos biomarcadores, surgiu uma demanda por novas tecnologias ou ensaios que possam ser usados para análise de múltiplos biomarcadores simultaneamente, bem como a sua análise quantitativa, tanto para o estudo dos cânceres, como para o seu diagnóstico (KWON *et al.*, 2015).

Enquanto a IHQ e as técnicas relacionadas lidam principalmente com a identificação qualitativa das características fenotípicas celulares, a citometria de fluxo é uma metodologia pela qual é possível detectar simultaneamente múltiplos parâmetros de inúmeras células, o que permite a identificação e a caracterização de um subconjunto particular de células de interesse dentro de preparações de amostras heterogêneas (JAHAN-TIGH *et al.*, 2012; LEERS; NAP, 2002).

A imunofenotipagem por citometria de fluxo já está bem estabelecida para o diagnóstico de neoplasias hematológicas em líquidos corporais, sangue, medula óssea e tecidos, como baço e linfonodo, os quais podem ser facilmente desagregados por dissociação mecânica ou enzimática e ressuspensos em meio líquido (DONNENBERG; DONNENBERG, 2011). A crescente aceitação da citometria de fluxo dentro da patologia se deve à sua relativa facilidade de uso e ao grande número de células e parâmetros que podem ser avaliados em minutos (VIRGO; GIBBS, 2012). Como desvantagem, ao romper os tecidos para obtenção da suspensão de células, perde-se as informações sobre a arquitetura do tecido (JAHAN-TIGH *et al.*, 2012).

Nesse sentido, acredita-se que a utilização da análise multiparamétrica por citometria de fluxo em conjunto com a análise morfológica pode oferecer excelentes possibilidades para o estudo da heterogeneidade intratumoral e para a quantificação de parâmetros biológicos em tumores sólidos e, assim, aumentar a cobertura diagnóstica, classificação e avaliação prognóstica dos pacientes portadores de neoplasias, além de fornecer um diagnóstico de forma mais rápida (LEERS; NAP, 2002).

Antes de padronizar a citometria de fluxo para avaliação dos biomarcadores de prognóstico do câncer de boca, foi necessário realizar um estudo epidemiológico retrospectivo, com o objetivo de avaliar a prevalência do carcinoma de células escamosas de boca na população a ser estudada. Para facilitar o entendimento, as seções materiais e métodos e resultados e discussão foram divididas em estudo retrospectivo e estudo prospectivo.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Padronizar a imunofenotipagem por citometria de fluxo como metodologia complementar para avaliação de marcadores de prognóstico em tumores sólidos de origem epitelial de boca.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Investigar a incidência do câncer de boca e caracterizar o perfil epidemiológico dos pacientes com câncer de boca diagnosticados na Unidade de Laboratório de Anatomia Patológica (ULAP) do HU-UFSC entre 2013 e 2018.
- Estabelecer um painel de anticorpos monoclonais capaz de diferenciar as células neoplásicas das populações normais;
- Padronizar e validar a imunofenotipagem por citometria de fluxo para a identificação dos marcadores do câncer de boca;
- Analisar o fenótipo das células presentes em todas as amostras de biópsias com suspeita de câncer de boca encaminhadas ao Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias (LOEH);
- Comparar os resultados da imunofenotipagem com aqueles obtidos na avaliação morfológica e imuno-histoquímica (padrão ouro);
- Investigar os subtipos de leucócitos infiltrados no tumor e sua associação com características clínicas e patológicas dos carcinomas de boca.

4 ESTUDO RETROSPECTIVO

4.1 MATERIAL E MÉTODOS

Foi realizado um estudo retrospectivo e transversal por meio da análise dos laudos anatomopatológicos dos pacientes diagnosticados com câncer de boca na Unidade de Laboratório de Anatomia Patológica (ULAP) do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU/UFSC/EBSERH), em Florianópolis, Santa Catarina, entre o período de janeiro de 2013 a dezembro de 2018. Nestes laudos, foram selecionados os pacientes que tiveram diagnóstico de CEC de boca. As seguintes variáveis foram obtidas do prontuário dos pacientes: serviço de atendimento, tempo para entrega dos laudos, município de procedência, sexo, cor da pele, idade, profissão, uso de tabaco, consumo de bebidas alcoólicas, localização anatômica, presença de sinais e sintomas, tempo de evolução, grau histológico, estadiamento e tratamento indicado.

Os dados foram tabulados com auxílio de planilhas do programa Microsoft Excel[®]. Para análise descritiva, foram geradas as frequências absolutas e relativas das variáveis. Alguns prontuários não possuíam todas as informações para as variáveis pesquisadas, assim, as frequências relativas das variáveis estadiamento e grau histológico foram calculadas a partir do número de informações contidas em cada variável. Para testar as diferenças entre os grupos, utilizou-se o teste do qui-quadrado, com nível de significância de 95%. O programa estatístico utilizado foi o software SPSS versão 17.0 (Chicago, IL, EUA).

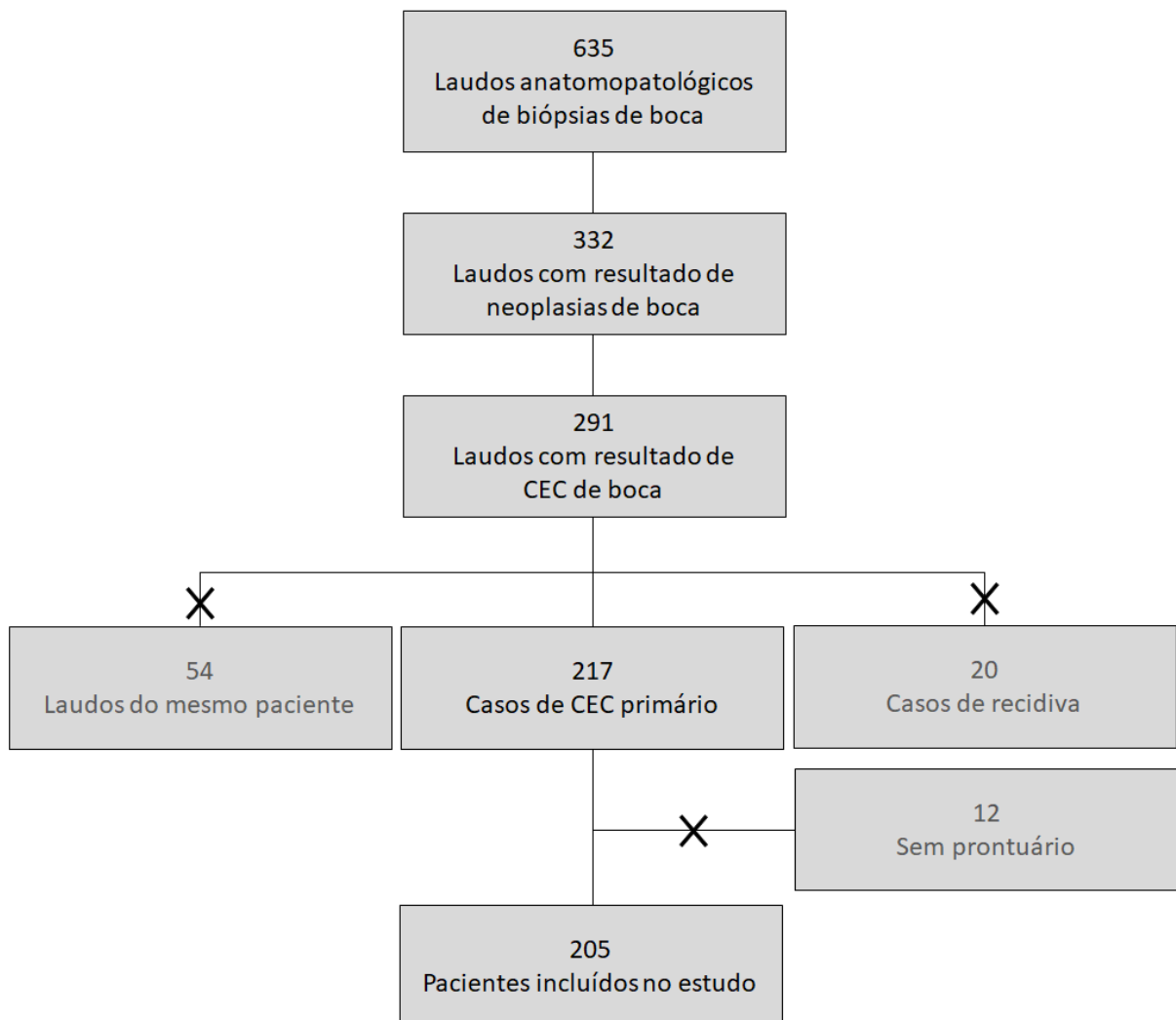
O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina, parecer nº 2.986.011, CAAE: 2079213.0.0000.0121 (Anexo A).

4.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

No período de janeiro de 2013 a dezembro de 2018 foram recebidas na ULAP do HU/UFSC/EBSERH um total de 635 solicitações de biópsias de boca para investigação de lesões malignas e não malignas, das quais 332 (52,3% do total de solicitações) receberam laudo de neoplasia (Figura 11).

Das 332 neoplasias descritas, 291 (87,7%) eram do tipo carcinoma de células escamosas. A partir dessas solicitações, foram identificados 217 indivíduos que receberam diagnóstico de carcinoma epidermoide de boca na ULAP. Desses 217 casos, 12 prontuários não estavam disponíveis para pesquisa e, conseqüentemente, foram excluídos. Assim, 205 indivíduos foram incluídos neste estudo (Figura 11).

Figura 11 - Fluxograma dos resultados de busca dos casos de carcinoma de células escamosas de boca.



Fonte: A autora.

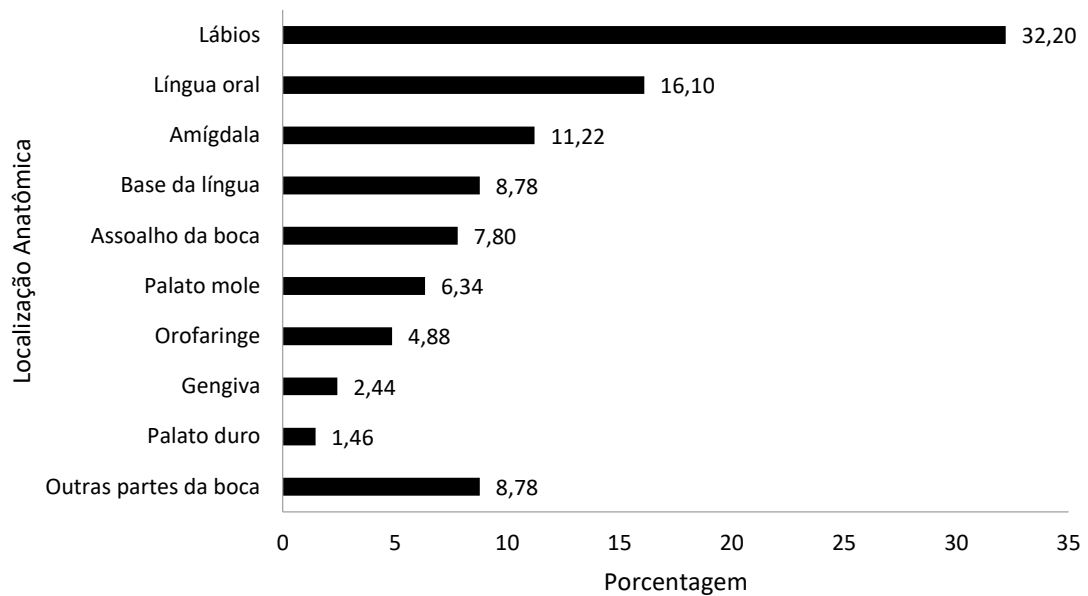
As requisições eram provenientes dos seguintes serviços de atendimento: Cirurgia de Cabeça e Pescoço (51,2%), Odontologia e Estomatologia (24,9%), Dermatologia (10,7%), Cirurgia Plástica (9,3%) e outros (3,9%). Os resultados da avaliação do tempo para entrega dos laudos variaram de 0 a 58 dias, com uma mediana de 12 dias e uma média de 13 ± 9 dias.

Os participantes do estudo eram provenientes de 51 municípios do estado de Santa Catarina. Desses, 164 (80%) eram oriundos da macrorregião da Grande Florianópolis e 41 (20%) de outras regiões do estado.

Na Figura 12, observa-se a distribuição da frequência de casos de CEC segundo a região anatômica acometida. Os lábios foram a região mais acometida pelo CEC de boca, contabilizando 32,19% dos casos, seguidos pela língua oral (16,10%), amígdala ou tonsila palatina (11,22%), base da língua (8,78%) e assoalho da boca (7,80%).

Na literatura, a distribuição dos casos de CEC segundo a sua localização anatômica difere muito, dependendo da população estudada. Dentre as regiões da cavidade oral, são observados mais frequentemente CEC na língua, seguida pelo assoalho bucal; e, na orofaringe, as regiões anatômicas mais acometidas são as amígdalas e base da língua (BONFANTE *et al.*, 2014; CANCELA *et al.*, 2010; DEDIVITIS *et al.*, 2004; MCILWAIN *et al.*, 2014; VAN DIJK *et al.*, 2016; WEATHERSPOON *et al.*, 2015). Para o câncer de lábio, foram encontradas frequências de 2,3% até 20% (ANDRADE; SANTOS; OLIVEIRA, 2015; AQUINO *et al.*, 2015; LE CAMPION *et al.*, 2016; MORO *et al.*, 2018; SANTOS *et al.*, 2009; TEIXEIRA *et al.*, 2009; VOLKWEIS *et al.*, 2014). Uma das justificativas para esses resultados discrepantes é que os tumores de lábios, principalmente em estádios mais precoces, são acompanhados por cirurgias plásticas, portanto não possuem tanta representatividade em unidades de estomatologia e oncologia (ANJOS HORA *et al.*, 2003; DEDIVITIS *et al.*, 2004). No presente estudo, 63,64% dos pacientes com câncer de lábio foram atendidos nos serviços de Dermatologia e Cirurgia Plástica. Adicionalmente, essa alta prevalência de tumores labiais na população estudada pode estar relacionada ao fato do estudo ter sido conduzido em um país tropical, e em uma região com um grande número de indivíduos caucasianos, os quais são mais suscetíveis aos raios UV (SILVA *et al.*, 2020).

Figura 12 - Distribuição da frequência de casos de CEC segundo a localização anatômica dos tumores



Nota: Outras partes incluem região retromolar, região mandibular, região maxilar, mucosa jugal e partes não especificadas da boca. CEC – carcinoma de células escamosas.

Diversos estudos já demonstraram que a localização anatômica do tumor é um fator prognóstico importante do câncer de boca. Tumores localizados na língua e assoalho da boca, que possuem uma rica vascularização sanguínea e linfática, podem metastizar mais facilmente em comparação com tumores localizados em outras regiões anatômicas e, conseqüentemente, possuem um pior prognóstico (SHIELD *et al.*, 2017; WALKER; BOEY; MCDONALD, 2003). Já os tumores de lábio são bem menos agressivos e apresentam um dos melhores prognósticos, com uma sobrevida em 5 anos de aproximadamente 90%. Em razão disso, alguns autores sugerem que câncer labial deveria ser considerado um câncer distinto, em vez de ser incluído em outras formas de câncer intraoral (BATISTA *et al.*, 2010; DE ANGELIS *et al.*, 2014; WARNAKULASURIYA, 2009b).

Considerando que o câncer de boca pode apresentar diferentes características clínicas, dependendo do sítio anatômico acometido, que refletem sobre o seu comportamento biológico, prognóstico e tratamento (FURNESS *et al.*, 2010; MOORE; PIERCE; WILSON, 2000; OLIVEIRA-NETO *et al.*, 2012), no presente estudo optou-se pela avaliação dos tumores de boca subdivididos em três grupos, segundo a sua localização anatômica: tumores do lábio, tumores da cavidade oral e tumores da orofaringe.

4.2.1 Caracterização da população do estudo

Dos 205 indivíduos analisados, 163 (79,51%) eram do sexo masculino e 42 (20,49%) do sexo feminino (Tabela 1). Esse predomínio do sexo masculino foi observado nos três grupos analisados, com relações masculino/feminino (M:F) de 3,1:1 no grupo tumores de lábio; 3,2:1 no grupo tumores da cavidade oral; e de 7:1 no grupo tumores de orofaringe.

Tabela 1 - Distribuição dos casos de CEC de boca segundo o sexo.

Sexo	Tumores de lábio n (%)	Tumores da cavidade oral n (%)	Tumores de orofaringe n (%)	TOTAL n (%)
Masculino	50 (75,76)	57 (76,00)	56 (87,5)	163 (79,51)
Feminino	16 (24,24)	18 (24,00)	8 (12,5)	42 (20,49)
TOTAL	66 (100)	75 (100)	64 (100)	205 (100)

Nota: CEC – carcinoma de células escamosas. Não houve diferenças estatísticas entre os grupos.

A idade dos indivíduos com câncer de boca variou de 24 a 92 anos, com idade mediana de 56 anos. As idades medianas dos grupos tumores de lábio, cavidade oral e orofaringe foram muito semelhantes, como seguem: 56 anos (24-92 anos), 57 anos (31-80 anos) e 58 anos (44-81 anos), respectivamente. Na Tabela 2, verifica-se a frequência relativa e absoluta dos participantes da pesquisa quanto à faixa etária. Observa-se uma elevação na ocorrência de câncer de cavidade oral e orofaringe a partir da quarta década de vida, sendo a faixa etária de 51 a 60 anos mais acometida.

Tabela 2 - Distribuição dos casos de CEC de boca quanto à faixa etária.

Faixa etária (em anos)	Tumores de lábio n (%)	Tumores da cavidade oral n (%)	Tumores de orofaringe n (%)	TOTAL n (%)
0 – 40	10 (15,15)	3 (4,00)	-	13 (6,34)
41 – 50	11 (16,67)	18 (24,00)	14 (21,88)	43 (20,98)
51 – 60	20 (30,30)	26 (34,67)	27 (42,19)	73 (35,61)
61 – 70	14 (21,21)	22 (29,33)	17 (26,56)	53 (25,85)
71 – 80	7 (10,61)	6 (8,00)	5 (7,81)	18 (8,78)
81 ou mais	4 (6,06)	-	1 (1,56)	5 (2,44)
TOTAL	66 (100)	75 (100)	64 (100)	205 (100)

Nota: CEC – carcinoma de células escamosas. Não houve diferenças estatísticas entre os grupos.

O perfil epidemiológico dos indivíduos com CEC de boca observado no presente estudo foi semelhante ao descrito por outros autores (BONFANTE *et al.*, 2014; KFOURI *et al.*, 2018; RIBEIRO *et al.*, 2015; SIEGEL; MILLER; JEMAL, 2017; SOUSA *et al.*, 2016; VAN DIJK *et al.*, 2016; VOLKWEIS *et al.*, 2014). O carcinoma epidermóide de boca ocorre mais

comumente em homens na quinta, sexta e sétima décadas de vida. No entanto, em países com alta incidência, como é o caso do Brasil, muitos casos são relatados antes dos 40 anos (WARNAKULASURIYA, 2009b).

O predomínio de CEC de boca em homens é atribuível aos maiores índices de abuso de substâncias entre os homens, particularmente o uso de tabaco (RETTIG; D'SOUZA, 2015; WARNAKULASURIYA, 2009b). Adicionalmente, a relação M:F bem mais elevada em tumores de orofaringe pode estar relacionada a outro fator de risco, a infecção pelo Papilomavírus Humano, visto que a região genital feminina possui uma carga viral de HPV muito maior do que a masculina, o que favorece a infecção oral pelo HPV em homens que praticam sexo oral em mulheres (MARUR *et al.*, 2010). Além disso, em outro estudo foi demonstrado um maior número de parceiros sexuais entre os homens, em comparação com as mulheres, o que é um fator de risco para infecção pelo HPV e, ainda, homens apresentam uma menor taxa de depuração do vírus e, portanto, são mais suscetíveis à infecção persistente (D'SOUZA *et al.*, 2016).

Em relação à cor de pele, na amostra analisada, a maioria dos indivíduos com tumores de lábio, cavidade oral e orofaringe eram brancos (Tabela 3). A prevalência de CEC, segundo a cor da pele, difere substancialmente dependendo da região geográfica de origem do estudo. Nas regiões Norte e Nordeste do Brasil, a cor preta/parda é a mais referida (ANDRADE; SANTOS; OLIVEIRA, 2015; AQUINO *et al.*, 2015; LE CAMPION *et al.*, 2016; SANTOS *et al.*, 2009) e nas regiões Centro-Oeste e Sul, a cor branca foi a mais referida (MORO *et al.*, 2018; OLIVEIRA-NETO *et al.*, 2012; SOUZA; SAKAE; GUEDES, 2008). A região Sul do Brasil é a que possui os menores índices de pessoas com cor de pele preta ou parda e, portanto, justificaria o maior número de indivíduos brancos no presente estudo (IBGE, 2016).

Tabela 3 - Distribuição dos pacientes com CEC de boca segundo a cor da pele.

Cor da pele	Tumores de lábio n (%)	Tumores da cavidade oral n (%)	Tumores de orofaringe n (%)	TOTAL n (%)
Branco	61 (92,42)	69 (92,00)	57 (89,06)	187 (91,22)
Não branco	1 (1,52)	5 (6,67)	5 (7,82)	11 (5,37)
Desconhecida	4 (6,06)	1 (1,33)	2 (3,12)	7 (3,41)
TOTAL	66 (100)	75 (100)	64 (100)	205 (100)

Nota: CEC – carcinoma de células escamosas. Não houve diferenças estatísticas entre os grupos.

As taxas de incidência de câncer de boca também variam consideravelmente entre grupos raciais/étnicos no mundo e são atribuídas às diferenças nutricionais, padrões de

tabagismo e diferença nas quantidades de tabaco e álcool consumidas, ao invés de fatores genéticos (DAY *et al.*, 1993; WARNAKULASURIYA, 2009a).

4.2.2 Avaliação dos fatores de risco

Ao analisar a frequência do consumo (passado ou atual) de tabaco e bebidas alcoólicas (Tabela 4), verificou-se que a maioria dos pacientes com câncer de boca faz ou já fez uso de tabaco, dos quais 53,66% eram tabagistas e etilistas. Apenas 8,29% dos pacientes negaram uso dessas substâncias. Esses resultados corroboram os dados encontrados na literatura, nos quais já é bem descrito o sinergismo entre uso de tabaco e consumo de bebidas alcoólicas como principal causa das neoplasias de boca e orofaringe (ANDRADE; SANTOS; OLIVEIRA, 2015; BATISTA *et al.*, 2010; BLOT *et al.*, 1988; HASHIBE *et al.*, 2009; KO *et al.*, 1995; MUWONGE *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2015; SOUSA *et al.*, 2016; VOLKWEIS *et al.*, 2014).

Tabela 4 - Distribuição dos pacientes com CEC de boca segundo história atual ou passada de tabagismo e etilismo.

Fator de risco	Tumores de lábio n (%)	Tumores da cavidade oral n (%)	Tumores de orofaringe n (%)	TOTAL n (%)
Tabagismo e etilismo	12 (18,18)	52 (69,34)	46 (71,88)	110 (53,66)
Apenas tabagismo	21 (31,82)	10 (13,33)	11 (17,19)	42 (20,49)
Apenas etilismo	-	1 (1,33)	-	1 (0,49)
Negam uso	6 (9,09)	9 (12,00)	2 (3,12)	17 (8,29)
Não informado	27 (40,91)	3 (4,00)	5 (7,81)	35 (17,07)
TOTAL	66 (100)	75 (100)	64 (100)	205 (100)

Nota: CEC – carcinoma de células escamosas. A análise de qui-quadrado evidenciou um menor número de indivíduos com tumores de lábio com história de etilismo (18,18%), em comparação com os grupos tumores de cavidade oral (70,67%) e tumores de orofaringe (71,88%), valor de $p < 0,01$.

A maioria dos pacientes com tumores de lábio relataram história de tabagismo, todavia, a análise das variáveis tabagismo e etilismo nesses indivíduos foi prejudicada, pois em 40,91% dos prontuários essa informação não foi descrita, provavelmente devido ao fato de o câncer labial estar mais associado à exposição solar crônica. No entanto, foi demonstrado em diversos estudos uma associação entre o consumo de tabaco e o câncer labial (BIASOLI *et al.*, 2016; MARUCCIA *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2011), corroborando os resultados do presente estudo.

O tabaco e o álcool são os principais fatores de risco reconhecidos para o desenvolvimento do CEC de boca, entretanto, alguns estudos prévios encontraram relação entre esse câncer e o exercício de determinadas profissões, como pedreiros, pintores, motoristas, trabalhadores da indústria de madeira, açougueiros, cozinheiros, pescadores, entre outras (ANDREOTTI *et al.*, 2006; BROWN *et al.*, 2002; JI; HEMMINKI, 2005; PUKKALA; SÖDERHOLM; LINDQVIST, 1994; SCHILDT *et al.*, 1999; TARVAINEN *et al.*, 2008).

Na Tabela 5, estão listadas as profissões exercidas pelos participantes do estudo. Entre as ocupações mais frequentes, observam-se os trabalhadores de obras (13,17%) e os trabalhadores rurais (9,76%). No estudo de Melo *et al.* (2010), 35,8% dos pacientes com câncer de boca eram trabalhadores braçais e, no estudo de Santos *et al.* (2009), 53,9% dos pacientes eram trabalhadores rurais que, segundo os autores, pode ser um reflexo da constante exposição aos raios solares e substâncias carcinogênicas envolvidas nessas ocupações. Outros autores sugerem que o maior risco para o desenvolvimento de câncer em certas ocupações pode estar relacionado a fatores socioeconômicos, que refletem no acesso a cuidados médicos e diferenças comportamentais, como um maior consumo de álcool e/ou tabaco (HASHIBE *et al.*, 2003; TARVAINEN *et al.*, 2008).

Tabela 5 - Distribuição dos pacientes com CEC de boca de acordo com sua profissão

Profissão	Tumores de lábio n (%)	Tumores da cavidade oral n (%)	Tumores de orofaringe n (%)	TOTAL n (%)
Trabalhador de obra	8 (12,12)	7 (9,33)	12 (18,75)	27 (13,17)
Trabalhador rural	9 (13,64)	10 (13,33)	1 (1,56)	20 (9,76)
Do lar/Doméstica	6 (9,09)	5 (6,67)	6 (9,38)	17 (8,29)
Aposentado	4 (6,06)	5 (6,67)	2 (3,13)	11 (5,37)
Motorista	1 (1,52)	8 (10,67)	1 (1,56)	10 (4,88)
Auxiliar de serviços gerais	5 (7,57)	3 (4,00)	2 (3,13)	10 (4,88)
Auxiliar de cozinha	5 (7,57)	1 (1,33)	3 (4,69)	9 (4,39)
Comerciante	2 (3,03)	3 (4,00)	4 (6,25)	9 (4,39)
Pescador	3 (4,54)	3 (4,00)	2 (3,13)	8 (3,90)
Carpinteiro/Marceneiro	3 (4,54)	2 (2,67)	3 (4,69)	8 (3,90)
Desempregado	2 (3,03)	4 (5,33)	1 (1,56)	7 (3,42)
Mecânico	1 (1,52)	2 (2,67)	2 (3,13)	5 (2,44)
Vigilante	1 (1,52)	1 (1,33)	2 (3,13)	4 (1,95)
Professor	1 (1,52)	2 (2,67)	1 (1,56)	4 (1,95)
Eletricista	1 (1,52)	1 (1,33)	1 (1,56)	3 (1,46)
Outras*	6 (9,09)	11 (14,67)	13 (20,31)	30 (14,63)
Desconhecida	8 (12,12)	7 (9,33)	8 (12,50)	23 (11,22)
TOTAL	66 (100)	75 (100)	64 (100)	205 (100)

Nota: *Outras profissões exercidas com frequência absoluta menor do que 3. CEC – carcinoma de células escamosas.

A infecção persistente pelo Papilomavírus Humano é considerada um fator de risco independente para o CEC em orofaringe e, em menor grau, para o câncer de boca (HUANG; GULLANE; O’SULLIVAN, 2018). Atualmente, tanto o AJCC como o *College of American Pathologists* (CAP) recomendam a realização de testes diagnósticos para a infecção pelo HPV como parte da investigação de tumores da orofaringe (AMIN; EDGE, 2017; LEWIS JR *et al.*, 2017). No entanto, no período de tempo analisado, foi infrequente a utilização de exames para o diagnóstico do HPV em amostras de boca e orofaringe e, conseqüentemente, não foi possível avaliar este fator de risco no presente estudo.

4.2.3 Características clínicas dos tumores

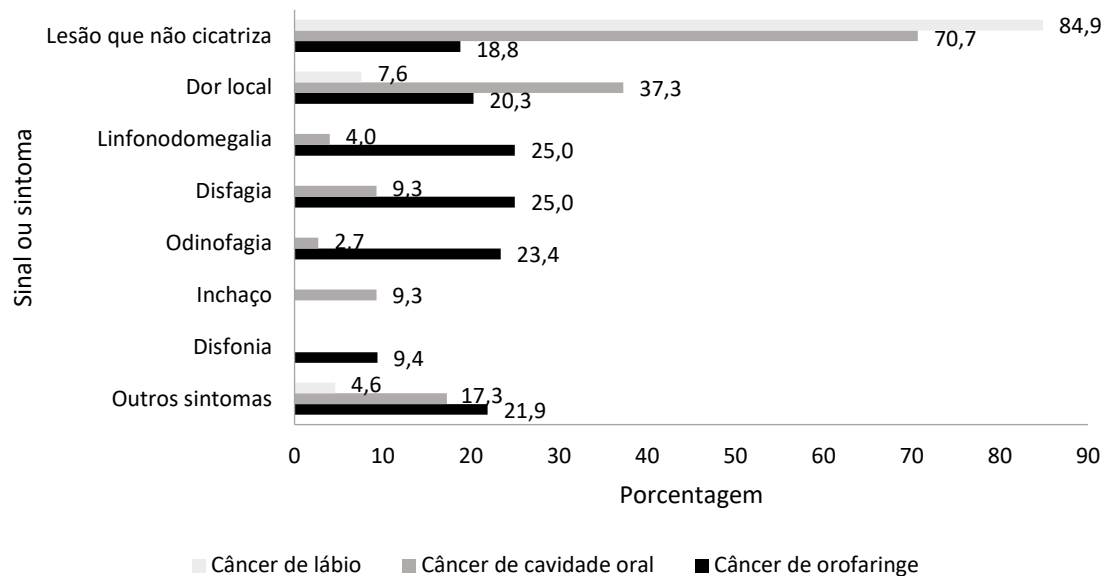
No presente estudo, a maioria dos pacientes com tumor de boca observou a presença de um ou mais sinais e/ou sintomas relacionados ao câncer antes do diagnóstico (Tabela 6). Não houve diferença significativa entre os grupos ($p > 0,05$). Desses, o mais relatado pelos pacientes com tumores de lábio e da cavidade oral foi a presença de lesão que não cicatriza, seguida de dor local e, pelos pacientes com tumor de orofaringe, os sinais e/ou sintomas mais relatados foram linfonodomegalia, disfagia e odinofagia (Figura 13).

Tabela 6 - Distribuição dos pacientes com CEC de boca segundo a presença de sinais e/ou sintomas.

Presença de sinais e/ou sintomas	Tumores de lábio n (%)	Tumores da cavidade oral n (%)	Tumores de orofaringe n (%)	TOTAL n (%)
Sim	56 (84,85)	66 (88,00)	48 (73,01)	170 (82,93)
Não	-	1 (1,33)	1 (1,59)	2 (0,97)
Não especificado	10 (15,15)	8 (10,67)	15 (25,40)	33 (16,10)
TOTAL	66 (100)	75 (100)	64 (100)	205 (100)

Nota: CEC – carcinoma de células escamosas. Não houve diferenças estatísticas entre os grupos.

Figura 13 - Distribuição da frequência dos sinais e sintomas, segundo a localização anatômica do câncer.



Fonte: A autora.

O câncer de boca em seu estágio inicial geralmente é assintomático. Mas em 40% dos casos mais avançados, quando a lesão alcança um tamanho considerável, outros sintomas podem se manifestar (LEMOS JUNIOR *et al.*, 2013). A sintomatologia varia de acordo com a localização e estágio do câncer (GOUVEA *et al.*, 2010; MCILWAIN *et al.*, 2014; QUEENAN *et al.*, 2018; SOUSA *et al.*, 2016; SOUZA; SAKAE; GUEDES, 2008), e a presença de linfonodomegalia, disfagia, odinofagia, perda de peso e sangramento oral já foram associados a um mau prognóstico em pacientes com câncer de boca (PUGLIANO *et al.*, 1997; PUGLIANO *et al.*, 1999; RIBEIRO; KOWALSKI; OLIVEIRA, 2003).

Com relação ao tempo de evolução da doença (tempo da percepção dos primeiros sintomas até o atendimento médico), pacientes com tumor de lábio demoraram em média 22,5 meses (1 - 120 meses) para buscar atendimento; pacientes com tumor de cavidade oral, 5,5 meses (2 semanas - 24 meses); e de orofaringe, 4,5 meses (1 semana - 36 meses). Na Tabela 7, pode-se observar a distribuição dos pacientes com câncer de boca, segundo o tempo de evolução da doença.

Tabela 7 - Tempo de percepção pelos pacientes dos primeiros sintomas até o atendimento médico, em meses, segundo a localização anatômica do tumor.

Tempo de percepção dos sintomas	Tumores de lábio n (%)	Tumores da cavidade oral n (%)	Tumores de orofaringe n (%)	TOTAL n (%)
Até 3 meses	5 (7,57)*	25 (33,34)	22 (34,38)	52 (25,37)
4 a 6 meses	13 (19,70)	12 (16,00)	10 (15,62)	35 (17,07)
7 a 9 meses	2 (3,03)	5 (6,67)	-	7 (3,42)
10 a 12 meses	7 (10,61)	10 (13,33)	4 (6,25)	21 (10,24)
Mais de 12 meses	15 (22,73)*	1 (1,33)	1 (1,56)	17 (8,29)
Desconhecido	24 (36,36)	22 (29,33)	27 (42,19)	73 (35,61)
TOTAL	66 (100)	75 (100)	64 (100)	205 (100)

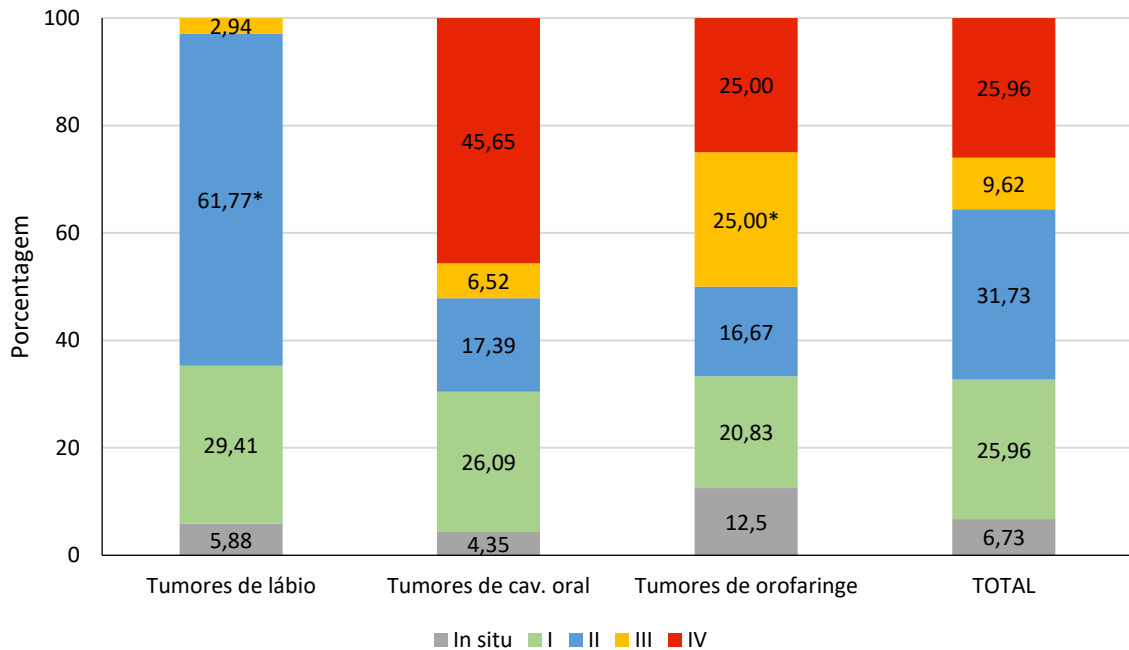
*Valor de $p < 0,01$, em comparação com os grupos tumores da cavidade oral e tumores de orofaringe.

Apesar do tumor de lábio ser o mais facilmente visualizado, foi o tumor que os pacientes demoraram mais tempo para buscar atendimento médico/odontológico, provavelmente pelo fato das lesões serem indolores (apenas 7,6% dos pacientes relataram sentir dor local). Corroborando essa hipótese, no estudo de Santos et al. (2010), 41,9% dos pacientes com CEC de boca sabiam da lesão, mas só procuraram atendimento quando sentiram dor.

Embora um número maior de pacientes com câncer de cavidade oral e orofaringe buscou atendimento em até 3 meses, a recomendação atual é que diante de alguma lesão que não cicatrize em até 15 dias, deve-se procurar um profissional de saúde (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2014). Em estudos prévios, verificou-se que o atraso do paciente em buscar atendimento é o contribuinte mais significativo para atrasos no diagnóstico e tratamento de cânceres bucais (FRIEDRICH, 2010; LE CAMPION *et al.*, 2016; STEFANUTO; DOUCET; ROBERTSON, 2014) que, por sua vez, pode estar associado ao diagnóstico do câncer em estádios mais avançados (GÓMEZ *et al.*, 2010).

Avaliando-se o estadiamento clínico e/ou patológico do câncer de boca, verificou-se que em 101 (49,3%) dos prontuários analisados não constava a informação do estadiamento clínico e/ou patológico do tumor e, por isso, foram excluídos da análise. O estadiamento dos 104 casos restantes foi realizado de acordo com a 7ª edição do *AJCC Cancer Staging Manual* (EDGE *et al.*, 2010). Na Figura 14, observa-se que a maioria dos tumores de lábio foram diagnosticados em estádios iniciais (I e II), porém aproximadamente metade dos tumores de cavidade oral e orofaringe foram diagnosticados em estádios tardios (III e IV). A análise estatística demonstrou que tumores labiais foram diagnosticados mais frequentemente em estágio II e menos frequentemente em estágio IV ($p < 0,01$), e tumores de orofaringe foram mais frequentemente diagnosticados em estágio III ($p < 0,05$), em comparação entre os grupos.

Figura 14 - Estadiamento dos tumores de lábio, cavidade oral e orofaringe, atendidos no período de 2013 à 2018.



Fonte: A autora.

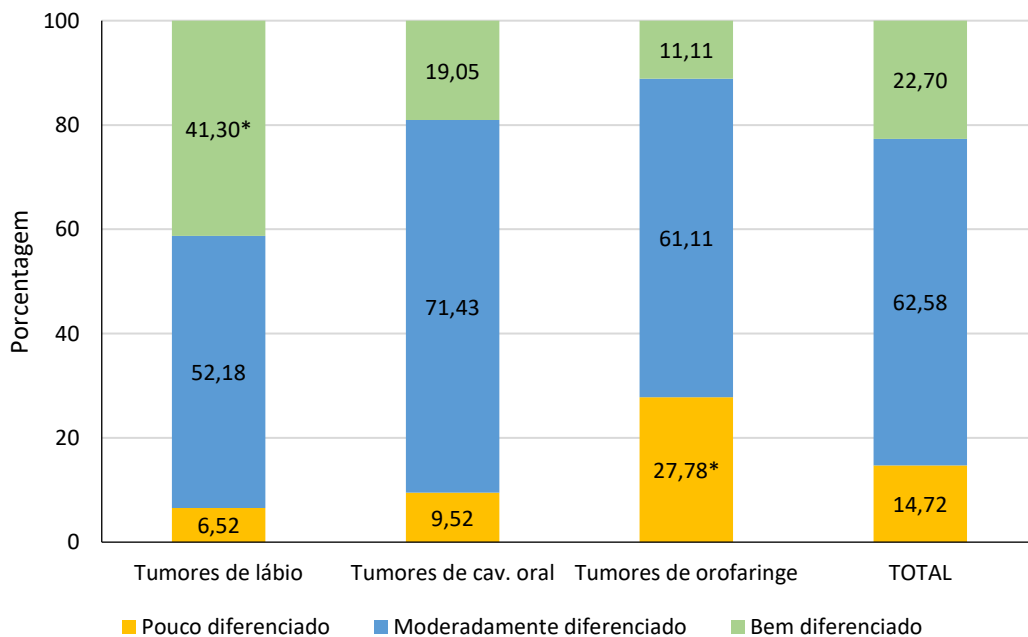
Em um estudo prévio realizado no Centro de Pesquisa Oncológica (CEPON) de Florianópolis-SC, 92,2% dos pacientes com câncer de boca foram diagnosticados em estádios III e IV (SCHNEIDER *et al.*, 2014). Em outros estudos nacionais, foi demonstrado que no Brasil a maioria dos tumores de cavidade oral e orofaringe são diagnosticados tardiamente (BONFANTE *et al.*, 2014; CURADO *et al.*, 2016; INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2016). Mesmo em países desenvolvidos, como os EUA, aproximadamente 50% dos tumores orais e 87% dos tumores de orofaringe são diagnosticados em estádios tardios (WEATHERSPOON *et al.*, 2015). Pacientes diagnosticados com tumor localizado apresentam um melhor prognóstico, com sobrevida de 84% em cinco anos, enquanto pacientes com metástases regionais e distantes apresentam sobrevidas de 66% e 39%, respectivamente, em cinco anos (HOWLADER *et al.*, 2019).

Em contrapartida, os tumores labiais geralmente são diagnosticados em estádios iniciais, apresentam melhor prognóstico e menor taxa de metástase do que os demais tumores de boca, que podem ser explicados pela diferença na vascularização sanguínea e linfática nesses locais anatômicos, ou ainda pela facilidade na detecção dos tumores labiais pelos pacientes (BATISTA *et al.*, 2010; OLIVEIRA-NETO *et al.*, 2012; SOUZA *et al.*, 2011).

A gradação histológica dos casos de CEC de boca, distribuído por localização anatômica, é apresentada na Figura 15. O tipo moderadamente diferenciado foi predominante nos três grupos. A análise estatística demonstra que tumores de lábio apresentaram mais frequentemente gradação bem diferenciada ($p \leq 0,01$) e tumores de orofaringe apresentaram mais frequentemente gradação pouco diferenciada ($p \leq 0,01$), em comparação entre os grupos. Na literatura, relata-se com maior frequência tumores bucais do tipo moderadamente diferenciado (DEDIVITIS *et al.*, 2004; MORO *et al.*, 2018; WOOLGAR; TRIANTAFYLLOU, 2009) e bem diferenciado (ANJOS HORA *et al.*, 2003; STRIEDER *et al.*, 2017; WU *et al.*, 1986).

Destaca-se ainda, a ocorrência de 27,78% de tumores de orofaringe pouco diferenciados, que de acordo com Kademani *et al.* (2005) e Woolgar e Triantafyllou (2009), apresentam maior prevalência de metástase cervical e piores índices de sobrevida.

Figura 15 - Distribuição da frequência de casos de CEC quanto à gradação histológica e localização anatômica.



Fonte: A autora.

4.2.4 Tratamento indicado

Na Tabela 8, observa-se a distribuição da frequência dos tratamentos indicados para os carcinomas de lábio, cavidade oral e orofaringe. É importante salientar que o tratamento adjuvante foi realizado em outros hospitais, portanto não foi possível verificar a efetividade dos mesmos. A maioria dos pacientes com tumor de lábio foi submetida ao tratamento cirúrgico,

sem indicação de terapia adjuvante. Em 53 (70,67%) pacientes com tumores da cavidade oral, o tratamento mais indicado foi o cirúrgico, aliado ou não à terapia adjuvante. Já para os pacientes com tumores de orofaringe, o tratamento radioquimioterápico foi o mais indicado (57,81%), e o tratamento cirúrgico foi indicado em apenas 31,26% dos casos.

Tabela 8 - Distribuição dos casos de CEC de boca de acordo com o tratamento indicado pelo médico especialista.

Tratamento	Tumores de lábio		Tumores da cavidade oral		Tumores da orofaringe		TOTAL	
	n	%	n	%	n	%	n	%
Cirurgia	58	87,88	21	28,00	7	10,94	86	41,95
Cirurgia + Radioterapia	2	3,03	11	14,67	7	10,94	20	9,76
Cirurgia + Quimioterapia	1	1,52	2	2,67	-	-	3	1,46
Cirurgia + Radioterapia + Quimioterapia	-	-	19	25,33	6	9,38	25	12,20
Radioterapia + Quimioterapia	-	-	12	16,00	37	57,81	49	23,90
Radioterapia	-	-	2	2,67	2	3,12	4	1,95
Tratamento paliativo	-	-	1	1,33	2	3,12	3	1,46
Não informado	5	7,57	7	9,33	3	4,69	15	7,32
TOTAL	66	100	75	100	64	100	205	100

Nota: CEC – carcinoma de células escamosas. Foram observadas diferenças estatísticas entre todos os tratamentos indicados e os grupos analisados (valor de $p < 0,05$).

Existem três modalidades de tratamento para as neoplasias malignas de boca: cirurgia, radioterapia e quimioterapia; utilizados de forma isolada ou em conjunto. O tratamento dos tumores labiais em estádios iniciais pode ser realizado com cirurgia ou radioterapia (RT), de forma igualmente eficaz. Porém, a cirurgia geralmente é a primeira escolha, por ser menos onerosa e possuir menos efeitos colaterais que a RT. A cirurgia também é a primeira modalidade de tratamento dos tumores bucais ressecáveis e, em tumores localmente avançados, a RT ou radioquimioterapia adjuvante podem ser indicadas para melhor controle e sobrevida. Atualmente, o tratamento primário da maioria dos cânceres de faringe e laringe é realizado com radioterapia, associada ou não à quimioterapia. Pacientes com tumores de orofaringe poderiam se beneficiar do tratamento cirúrgico, com uma redução de 20% na recidiva em comparação com aqueles tratados com radioquimioterapia primária, no entanto, a cirurgia envolve abordagens mais invasivas e um risco associado (KERAWALA *et al.*, 2016; SHANTI; O'MALLEY, 2018).

4.3 CONSIDERAÇÕES FINAIS DO ESTUDO RETROSPECTIVO

Considerando a prevalência e a gravidade do câncer de boca na população estudada, a demora na liberação de laudos anatomopatológicos, além das limitações da análise IHQ citadas anteriormente, acreditamos que a utilização da citometria de fluxo como método para avaliação de biomarcadores prognósticos pode ser útil para o melhor acompanhamento desses pacientes.

5 ESTUDO PROSPECTIVO

5.1 MATERIAL E MÉTODOS

5.1.1 Padronização e titulação dos anticorpos em linhagens celulares

Os biomarcadores escolhidos para essa etapa inicial de validação da citometria de fluxo na avaliação de marcadores de câncer de boca foram: p53, p16, Ki-67 e pan-citoqueratina (CK 4+5+6+10+13+18), os quais já são utilizados na avaliação IHQ do câncer de boca na ULAP do HU/UFSC/EBSERH e possuem disponibilidade comercial. Os seguintes clones foram adquiridos para essa etapa: anti-p53 (clone DO-7, Becton Dickinson – BD[®], San Jose, CA, EUA), anti-p16 (clone G175-1239, BD[®], San Jose, EUA), pan-citoqueratina (clone C-11, Invitrogen[®], Carlsbad, CA, EUA) e Ki-67 (clone 20Raj1, Invitrogen[®], Carlsbad, CA, EUA).

Para a validação e titulação dos anticorpos anti-p53, anti-p16 e pan-citoqueratina, foram utilizadas células de linhagens celulares que expressavam esses antígenos com o objetivo de avaliar a reação antígeno-anticorpo e determinar a concentração mais adequada de anticorpos a serem utilizados. As linhagens celulares utilizadas foram obtidas do *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, EUA) e estão listadas no Quadro 3. Como exceção, foi utilizada como controle negativo do anticorpo pan-citoqueratina uma amostra de sangue periférico de um voluntário cujo hemograma não apresentou alterações. A padronização do biomarcador Ki-67 foi realizada previamente por Wopereis (2019).

Quadro 3 - Linhagens celulares utilizadas na validação e titulação dos anticorpos anti-p53, anti-p16 e pan-citoqueratina.

Anticorpo	Controle positivo	Controle negativo
Anti-p53	SKBR3	MCF7
Anti-p16	HeLa	MCF7
Pan-citoqueratina	MCF7	Leucócitos provenientes de sangue periférico

Nota: Todas as linhagens celulares foram obtidas do *American Type Culture Collection* (ATCC, Manassas, EUA).

As células foram mantidas em garrafa para cultura celular contendo meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium* (DMEM) suplementado com 10% de soro bovino fetal (SBF, Gibco[®], Carlsbad, CA, EUA), 100 U/ml de penicilina (Gibco[®], Carlsbad, CA, EUA), 100 µg/ml de estreptomicina (Gibco[®], Carlsbad, CA, EUA) e 10 mM de tampão HEPES (Gibco[®], Carlsbad, CA, EUA) em pH 7,2. As células foram mantidas em incubadora com

atmosfera úmida de 5% de CO₂ à 37°C e o meio foi trocado a cada dois ou três dias para manutenção da viabilidade celular.

Antes dos experimentos, as células foram tratadas com solução de tripsina 0,25% (Amresco, Solon, OH, EUA) durante 5 a 10 minutos com o objetivo de desagregá-las. Posteriormente, a suspensão celular obtida foi transferida a um tubo Falcon contendo meio de cultura a fim de inativar a ação da tripsina. Após essa etapa, o tubo foi centrifugado a 1500 RPM por 5 minutos, o sobrenadante foi descartado e, ao *pellet* celular, foram acrescentados 2 mL de tampão fosfato salino (PBS, do inglês *Phosphate Buffered Saline*) contendo 0,2% de albumina sérica bovina (BSA) e o tubo foi centrifugado novamente a 1500 RPM por 5 minutos, esse procedimento foi repetido três vezes. Finalmente, o *pellet* celular foi ressuspensão em 1 mL de PBS, e a viabilidade celular foi avaliada pelo método de exclusão do corante azul de Trypan 0,4% (Sigma-Aldrich[®], St. Louis, MO, EUA).

Em cada tubo de citometria de fluxo foram adicionadas 500.000 células/100 µL de PBS. Essas células foram incubadas com 100 µL do reagente A (BD Intrasure[™] Kit, BD[®], San Jose, CA, EUA) por 15 minutos na ausência de luz e em temperatura ambiente. Posteriormente, a amostra foi centrifugada por 5 minutos a 2.000 RPM e o sobrenadante foi descartado. Foram adicionados ao *pellet* 100 µL de reagente B e o volume necessário dos anticorpos de interesse. Os tubos foram incubados novamente por 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Posteriormente, foi acrescentado 4 mL de PBS e os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 2.000 RPM, o sobrenadante foi descartado e as células suspensas em 300 µL de PBS e adquiridas (100.000 eventos) no citômetro de fluxo FACS Canto II (BD[®], San Jose, CA, EUA).

Como controle de marcação, foi utilizado um tubo controle sem marcação (tubo branco), ou seja, sem adição dos anticorpos. Os controles de marcação foram utilizados para a definição do ponto de corte entre as populações negativas e positivas para um determinado marcador.

Para determinação do volume ideal de anticorpo, foi utilizado o cálculo do *stain index*:

$$\text{Stain index} = \frac{\text{IFM (+)} - \text{IFM (-)}}{2 \times \text{DP (-)}}$$

Onde IFM (+) e IFM (-) são, respectivamente, a intensidade de fluorescência média da população positiva e negativa, e DP (-) é o desvio padrão da intensidade de fluorescência da população negativa.

A diluição escolhida foi a que apresentou o maior *stain index*, pois representa a melhor concentração de anticorpo que gera marcações específicas com a menor quantidade de fluorescência de fundo (em inglês, *background*).

5.1.2 Seleção da amostra

Este estudo utilizou o método não-probabilístico de amostragem por conveniência, assim, foram incluídas 40 amostras de pacientes com suspeita de carcinoma de células escamosas de boca atendidos nos ambulatórios de Estomatologia e de Suporte Odontológico ao paciente com Câncer de Boca no Núcleo de Odontologia Hospitalar (NOH) do HU/UFSC/EBSERH e pacientes atendidos no ambulatório de Cirurgia de Cabeça e Pescoço (CCP) do HU/UFSC/EBSERH, que realizaram biópsia e exame histopatológico, no período de outubro de 2018 a julho de 2021. As informações clínicas foram obtidas por meio de busca nos prontuários. Este estudo foi desenhado para captar um total de 50 amostras de câncer de boca, que é o mínimo recomendado pelo *National Commitee for Clinical Laboratory Standards* para validação de métodos qualitativos (NCCLS, 2002). No entanto, em decorrência da pandemia do COVID-19, o número de atendimentos no NOH e CCP do HU/UFSC/EBSERH, e consequentemente o número de biópsias realizadas, diminuiu muito e não foi possível realizar a coleta das 50 amostras, e, dessa forma, foram avaliadas 40 amostras.

Foram excluídas do estudo as amostras cuja retirada de material pudesse comprometer a análise histopatológica realizada pela ULAP do HU/UFSC/EBSERH. Outro critério de exclusão utilizado foi a ausência de populações de células viáveis após a avaliação com o marcador de viabilidade 7-aminoactinomicina D (7AAD) por citometria de fluxo.

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos da UFSC, com número de parecer 2.985.964 e CAAE 52861715.0.0000.0121 (Anexo B), e todos os indivíduos participantes da pesquisa assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) de forma a manifestarem sua concordância em participar (Anexo C).

5.1.3 Coleta e processamento das biópsias de boca

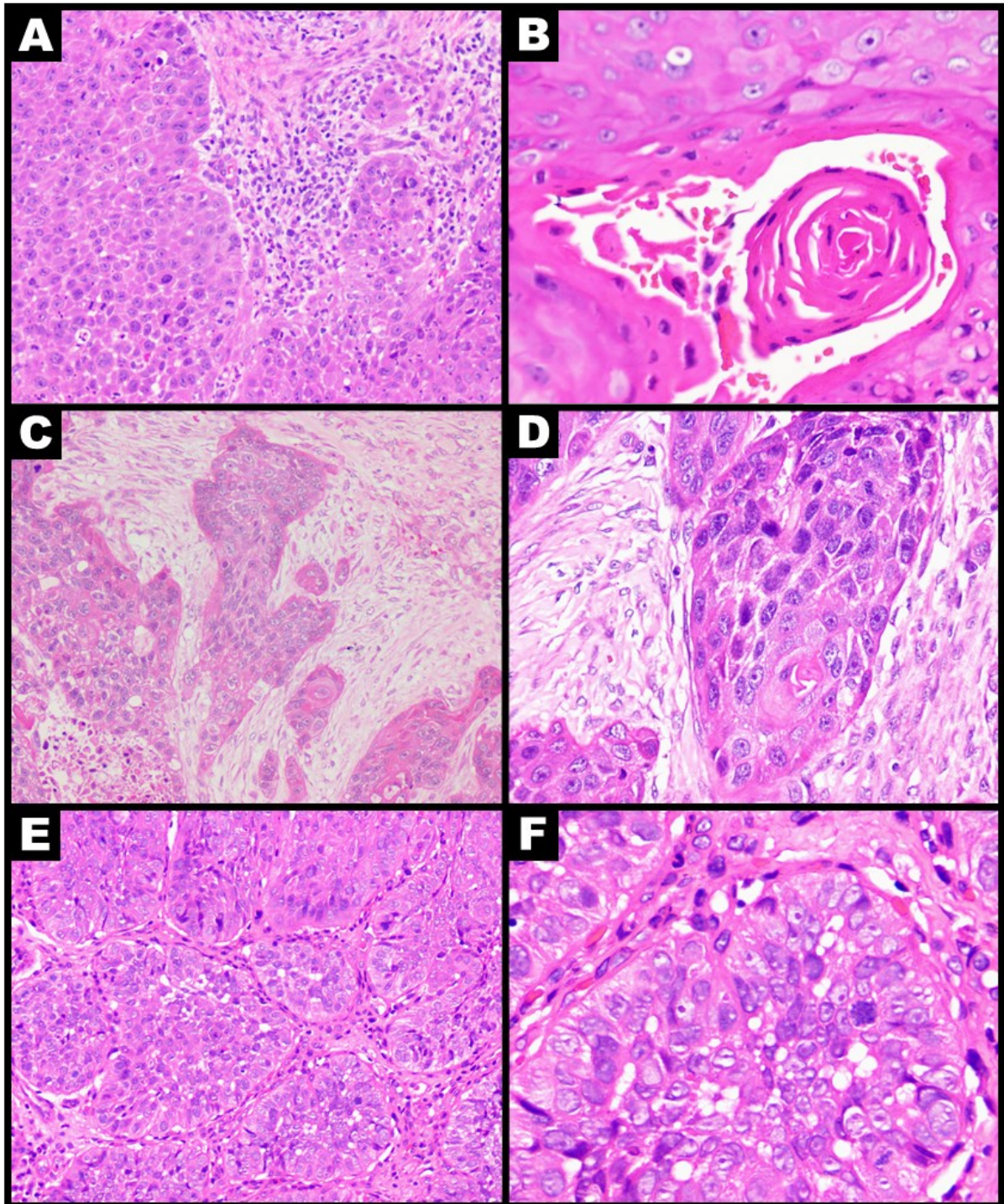
A coleta das amostras provenientes do NOH foi realizada por cirurgião dentista, por meio de biópsia incisional. As amostras foram divididas em dois fragmentos: um deles foi transportado em solução de formol tamponado a 10% para a ULAP, para realização de estudo anatomopatológico e imuno-histoquímico de rotina (padrão ouro); e o outro fragmento foi

transportado em PBS para o Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias (LOEH/CCS/UFSC) para a realização das análises imunofenóticas por citometria de fluxo. As amostras do CCP foram obtidas a partir da ressecção cirúrgica dos carcinomas invasivos de boca. Essas amostras foram enviadas a fresco, imediatamente após a sua coleta, para a ULAP, onde a equipe responsável pela macroscopia tumoral realizou a coleta de um fragmento de tecido em PBS, destinado à análise por citometria de fluxo. O material restante foi fixado em formol e submetido ao processamento conforme a rotina do setor.

Para realização do estudo anatomopatológico, as amostras fixadas foram incluídas em parafina, cortadas a 3 μm de espessura e coradas em hematoxilina e eosina. Para avaliar os produtos de expressão proteica, foi realizado estudo imuno-histoquímico com os marcadores selecionados p16, p53 e Ki-67 pelo método automatizado (VENTANA - modelo Benchmark XT) seguindo as orientações do fabricante. Controles de marcação (amostras de tecidos positivas para o marcador de interesse) foram usados em todos os casos. As lâminas foram analisadas por patologistas e revisadas por um patologista sênior em microscópio (Nikon Eclipse E200) no aumento de 200x, conforme recomendação do AJCC (2017) e OMS (2017a; b). Os casos de carcinoma invasivo foram classificados de acordo com o seu grau de diferenciação celular em: bem diferenciados, moderadamente diferenciados e pouco diferenciados (Figura 16).

Para avaliação histoquímica, as células com coloração marrom foram consideradas como expressão positiva. Os resultados de Ki-67 foram expressos em porcentagem de células positivas para cada caso. A mediana foi utilizada como ponto de corte para a definição do grupo Ki-67 alto e do grupo Ki-67 baixo. Os resultados de p16 e p53 foram pontuados de acordo com a intensidade (fraca, moderada ou forte) da coloração (Figura 17) e a porcentagem de células neoplásicas positivas.

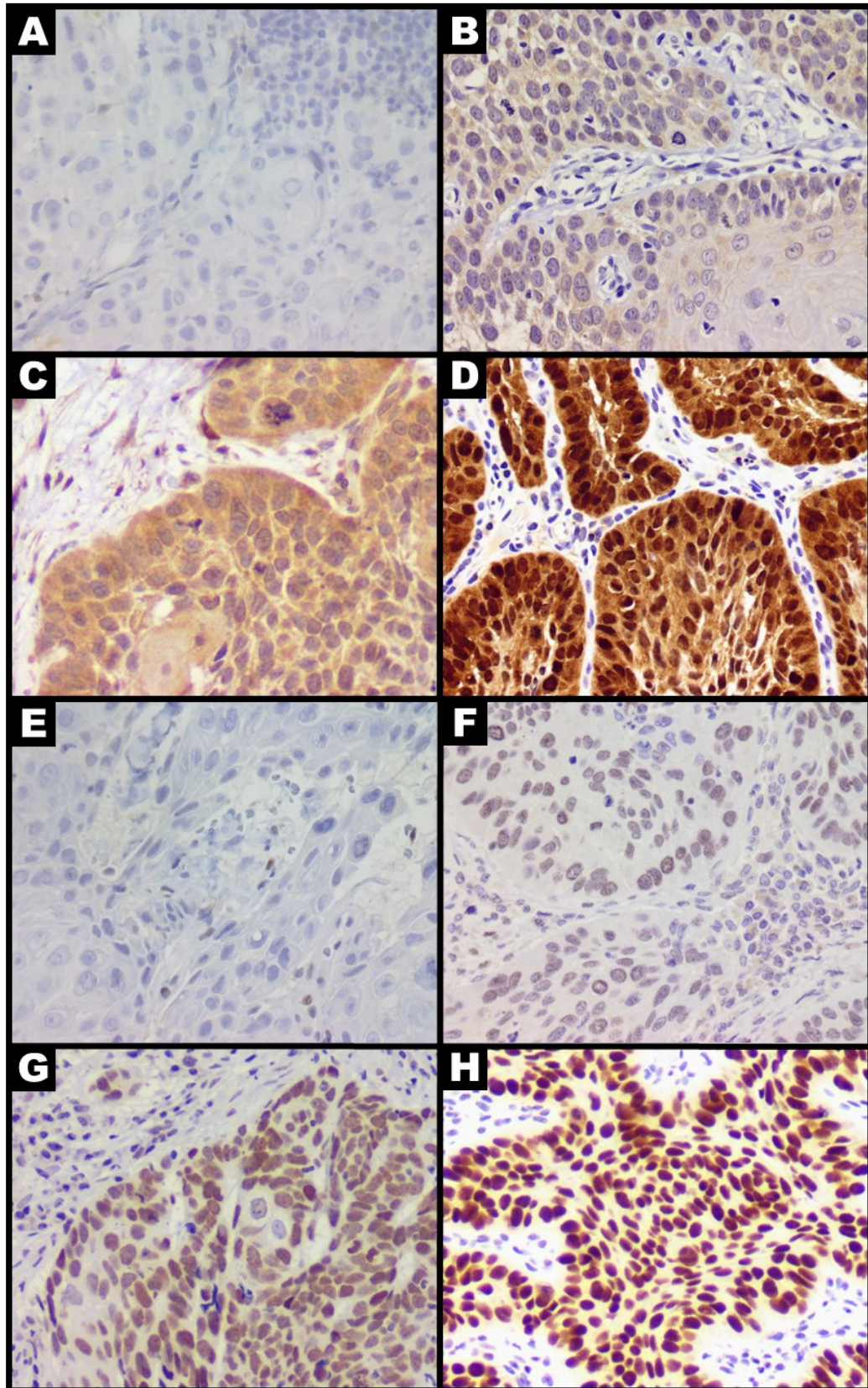
Figura 16 - Figura ilustrativa das características morfológicas dos tumores, segundo a sua gradação histológica.



Fonte: A autora.

Nota: Fotomicrografias de tumores de boca bem diferenciados (A e B), moderadamente diferenciados (C e D) e pouco diferenciados (E e F). Painel A – Blocos de células neoplásicas de padrão escamoso com fenótipo semelhante ao do epitélio escamoso estratificado (aumento de 200x); Painel B – formação de pérola córnea (aumento de 400x); Painel C – Blocos de células tumorais, com tentativa de preservação do epitélio escamoso estratificado (aumento de 200x); Painel D – células atípicas, com cromatina grosseira, apoptose e com tendência de queratinização (aumento de 400x); Painel E – Blocos tumorais pequenos e médios, com células atípicas que não se assemelham ao epitélio escamoso, não há formação de pérola córnea e nem de áreas de queratinização (aumento de 200x); Painel F – mitoses aberrantes e atipias nucleares mais pronunciadas (aumento de 400x).

Figura 17 - Figura ilustrativa da avaliação da expressão dos marcadores p16 e p53 em células tumorais.



Fonte: A autora.

Nota: Painel A: amostra p16 negativa; Painéis B-D: coloração nuclear e citoplasmática de p16 de intensidade fraca (B), moderada (C) e forte (D); Painel E: amostra p53 negativa; Painéis F-H: coloração nuclear de p53 de intensidade fraca (F), moderada (G) e forte (H). Aumento de 400x.

A fim de garantir que as amostras utilizadas na citometria de fluxo se tratavam de fato de tecido tumoral, foram confeccionadas lâminas de microscopia por *imprinting* do material analisado, seguido de fixação e coloração hematoxilina-eosina. Para a realização da imunofenotipagem, as amostras de tecido de boca foram primeiramente dissociadas, para obtenção de uma suspensão de células únicas, e processadas em, no máximo, uma hora. Nessa etapa, o tecido foi seccionado com auxílio de bisturi, em gelo, e depois macerado em tubo de ensaio contendo, aproximadamente, 500 μL de PBS-BSA. Em seguida, as amostras foram filtradas, com auxílio do filtro CellTrics[®] 150 μm (Sysmex[®], Hamburg, Alemanha) e ressuspensas em PBS-BSA quantidade suficiente para 1 mL.

Após a dissociação, as amostras seguiram o protocolo de marcação dos antígenos de membrana e intracelulares já estabelecido no LOEH. Resumidamente, as amostras foram incubadas com os anticorpos direcionados aos marcadores de superfície por 15 minutos em geladeira. Após a incubação, foram adicionados 100 μL do reagente A (BD Intrasure[™] Kit, BD[®], San Jose, CA, EUA) e as amostras foram incubadas por 5 minutos em geladeira. Posteriormente, as células anucleadas foram lisadas, adicionando-se 1 mL de solução lisante (BD[®], San Jose, CA, EUA) aos tubos, os quais foram incubados por mais 10 minutos e, em seguida, centrifugados por 5 minutos a 2.000 RPM e os sobrenadantes foram descartados. Foram adicionados ao *pellet* 50 μL de reagente B e o volume necessário dos anticorpos direcionados aos marcadores intracelulares. Os tubos foram incubados por 15 minutos à temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após a incubação, foram acrescentados 2 mL de PBS e os tubos foram centrifugados por 5 minutos a 2.000 RPM, o sobrenadante foi descartado e as células suspensas em 200 μL de PBS.

No decorrer do estudo, foi necessária a padronização de uma nova técnica de dissociação dos tecidos de boca para obtenção de um maior número de eventos viáveis. Assim, foram testadas duas soluções enzimáticas: 1) Colagenase tipo II (Gibco[®], Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) na concentração de 1 mg/mL (202 U/mL); e 2) Dispase II (Gibco[®], Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) na concentração de 2 mg/mL (1,54 U/mL). Ambas as enzimas foram utilizadas em conjunto com a Nuclease Universal de Pierce (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, EUA) na concentração de 375 U/mL, a qual digere os ácidos nucléicos liberados pelas células lisadas, reduzindo assim a viscosidade das suspensões celulares. Para realização da dissociação enzimática, os tecidos foram inicialmente fragmentados com auxílio de bisturi e, então, incubados à 37 °C sob agitação mecânica, por uma hora, com as soluções enzimáticas. Ao término da digestão, as amostras foram filtradas,

lavadas com 5 mL de PBS-BSA e suspensas em 1 mL de PBS-BSA. Em seguida, foram incubadas com os anticorpos, seguindo o protocolo de marcação descrito anteriormente.

5.1.4 Aquisição das amostras e estratégias de análise

A aquisição das amostras foi realizada no citômetro de fluxo BD FACS Canto II (BD[®], San Jose, CA, EUA) utilizando-se o programa BD FACSDiva versão 6.1.2 (BD[®], San Jose, CA, EUA) e a análise dos dados foi realizada utilizando-se o programa Infinicyt[™] versão 2.0 (Cytognos, Santa Marta de Tormes, Salamanca, Espanha). Não foi estabelecido um número máximo de eventos a serem adquiridos. Padronizou-se a aquisição do volume total de suspensão celular em cada tubo, a fim de se obter uma população representativa das células tumorais.

A disposição do painel de anticorpos utilizados está descrita no Quadro 4. A viabilidade das células foi avaliada pelo 7AAD (BD[®], San Jose, CA, EUA), um intercalador de DNA que só penetra nas células quando as mesmas têm a perda da integridade da membrana (ZIMMERMANN; MEYER, 2011). Assim, quando ocorre danos nas estruturas celulares expondo seu DNA, o 7AAD se liga ao mesmo e as células apresentarão fluorescência, a qual será detectada pelo citômetro de fluxo. Assim, a viabilidade da amostra é calculada pela porcentagem de eventos que não expressam fluorescência para 7-AAD. Adicionalmente, foi realizada a análise da população de leucócitos intratumorais, por meio da avaliação do tubo LST (de *lymphoid screening tube*) estabelecido pelo Consórcio Euroflow (Tubo 4). Os anticorpos utilizados foram os mesmos descritos no estudo de Reis (2020).

Quadro 4 - Painel de anticorpos utilizados para avaliação de marcadores em amostras de boca

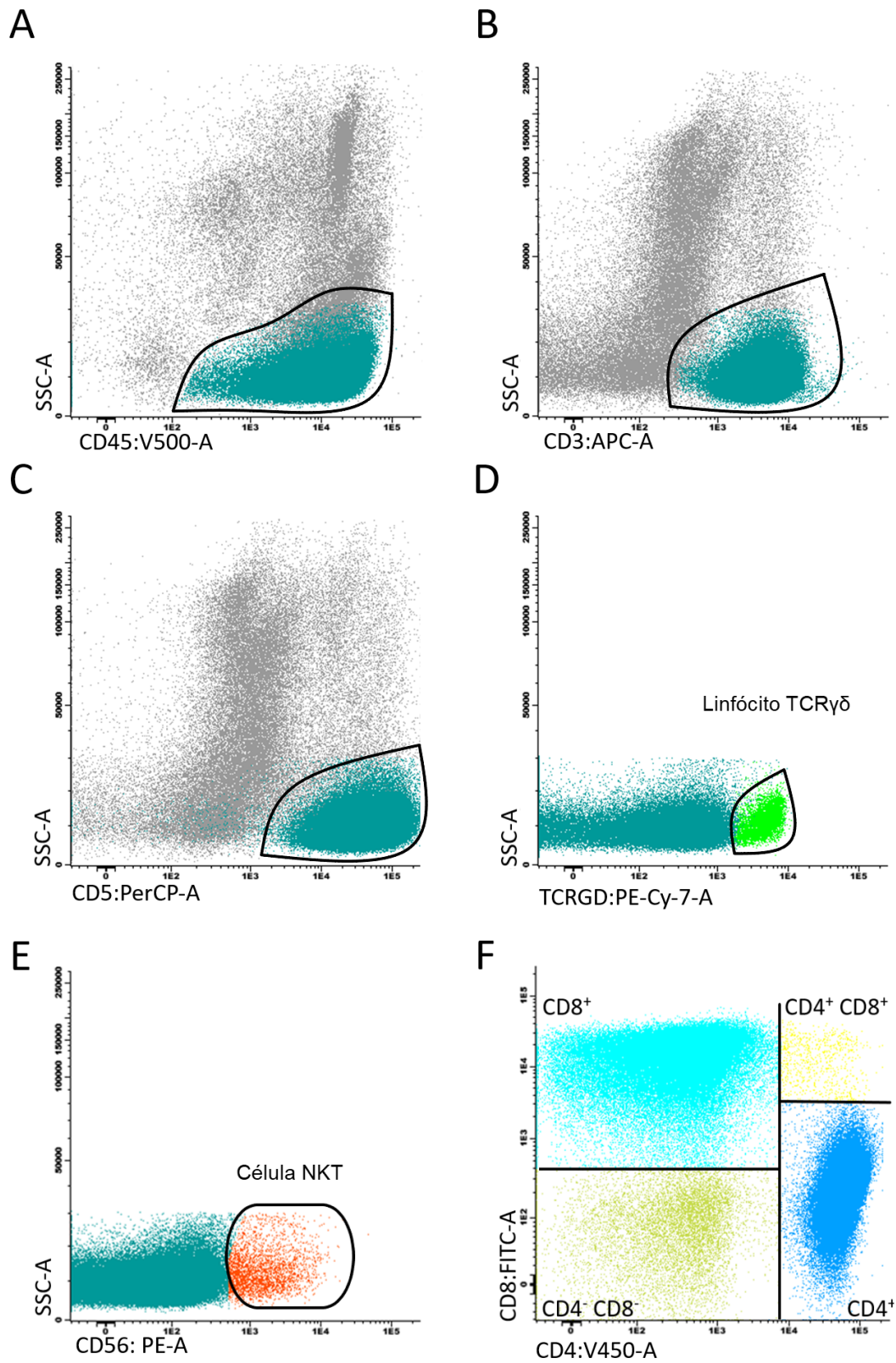
Tubos	Fluorocromos							
	FITC	PE	PerCP	PE-Cy7	APC	APC-H7	V450	V500
1	-	-	7AAD	-	-	-	-	CD45
2	p53*	p16*	-	CD16	Pan-CK*	CD14	-	CD45
3	Ki-67*	-	-	-	Pan-CK*	-	-	CD45
4	CD8/ Lambda	CD56/ Kappa	CD5	CD19/ TCR $\gamma\delta$	CD3/CD14	CD38	CD20/CD4	CD45

Fonte: A autora.

Nota: FITC - *Fluorescein isothiocyanate*; PE - *Phycoerythrin*; PerCP - *Peridinin Chlorophyll Protein Complex*; PE-Cy7: PE/*Cyanine Dye 7*; APC - *Allophycocyanin*; APC-H7 – APC/*Cyanine Dye H7*; 7AAD – 7-aminoactinomicina D; Pan-CK – Pan-citoqueratina; *marcadores intracelulares.

Para a análise e identificação das populações celulares, foi utilizada uma estratégia de seleção de eventos sequenciais (em inglês *gates*). Para a avaliação dos leucócitos intratumorais, foi realizado primeiramente um *gate* na região dos linfócitos no *dot plot* complexidade interna (SSC-A) *versus* expressão do antígeno CD45. A seguir, foram realizados *gates* para a identificação dos linfócitos T e NKT (Figura 18), linfócitos B (Figura 19) e células NK (Figura 20). Os linfócitos T são caracterizados pela expressão antigênica de CD3 e CD5, e são classificados em subtipos de acordo com a expressão dos marcadores TCR $\gamma\delta$, CD4 e CD8. Os linfócitos NKT também expressam CD3 e CD5 e caracterizam-se pela positividade para CD56. Os linfócitos B são caracterizados pela expressão de CD19. Linfócitos B maduros expressam também CD20, enquanto os plasmócitos caracterizam-se pela expressão antigênica de CD38. A clonalidade dos linfócitos B maduros é avaliada pela expressão de *Kappa* e *Lambda*. As células NK são identificadas pela ausência de expressão de CD3 e expressão de CD56.

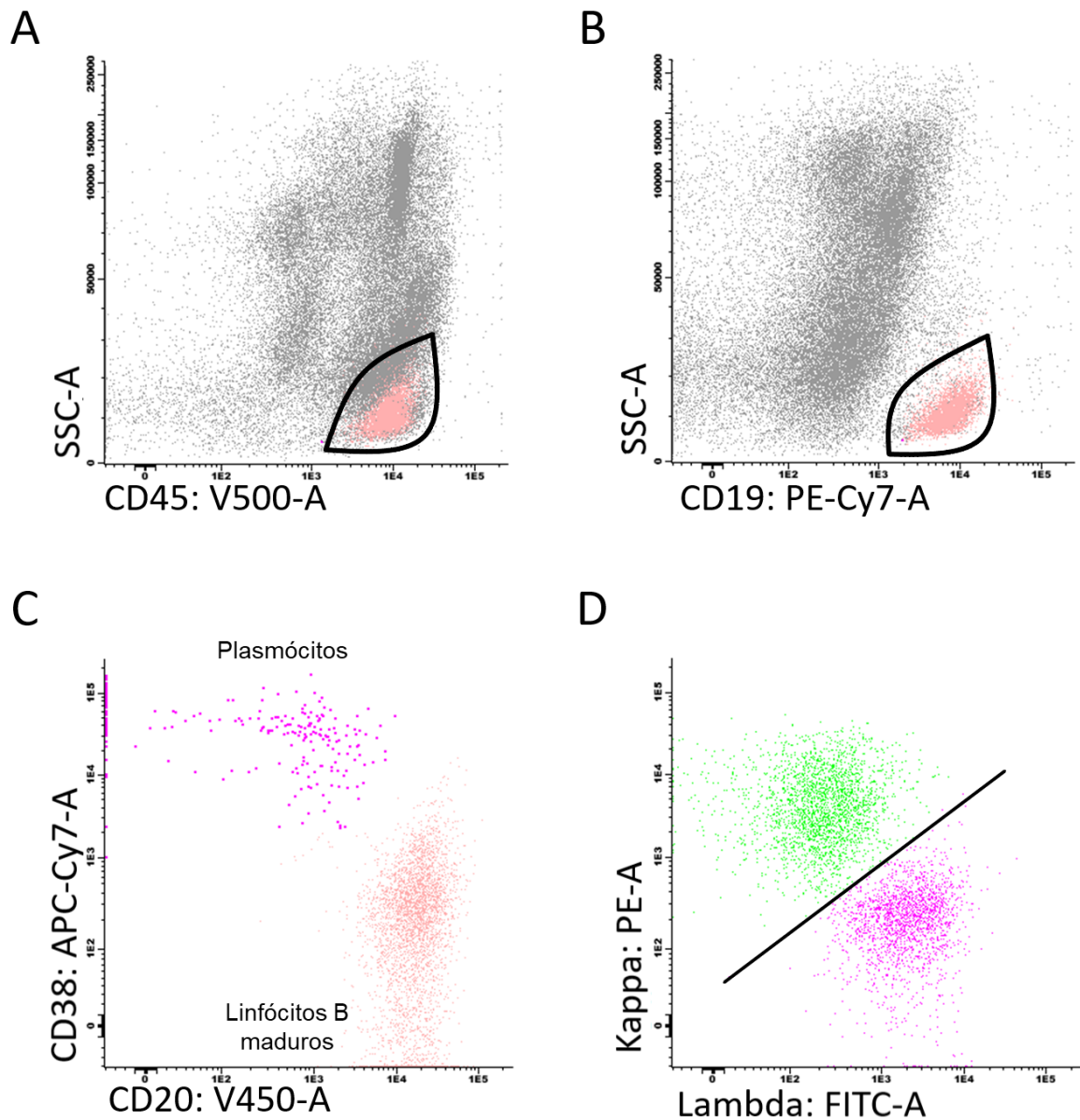
Figura 18 - Estratégias de análise dos linfócitos T e NKT



Fonte: A autora.

Nota: Painel A: seleção das células com baixa complexidade e com expressão de CD45 no *dot plot* complexidade celular (SSC-A) versus CD45; Painel B: seleção das células CD3+ no *dot plot* SSC-A versus CD3; Painel C: seleção das células CD5+ no *dot plot* SSC-A versus CD5; Painel D: seleção das células com expressão de TCR $\gamma\delta$ no *dot plot* SSC-A versus TCR $\gamma\delta$; Painel E: seleção das células CD56+ no *dot plot* SSC-A versus CD56; Painel F: avaliação da expressão de CD4 e CD8 no *dot plot* CD8 versus CD4.

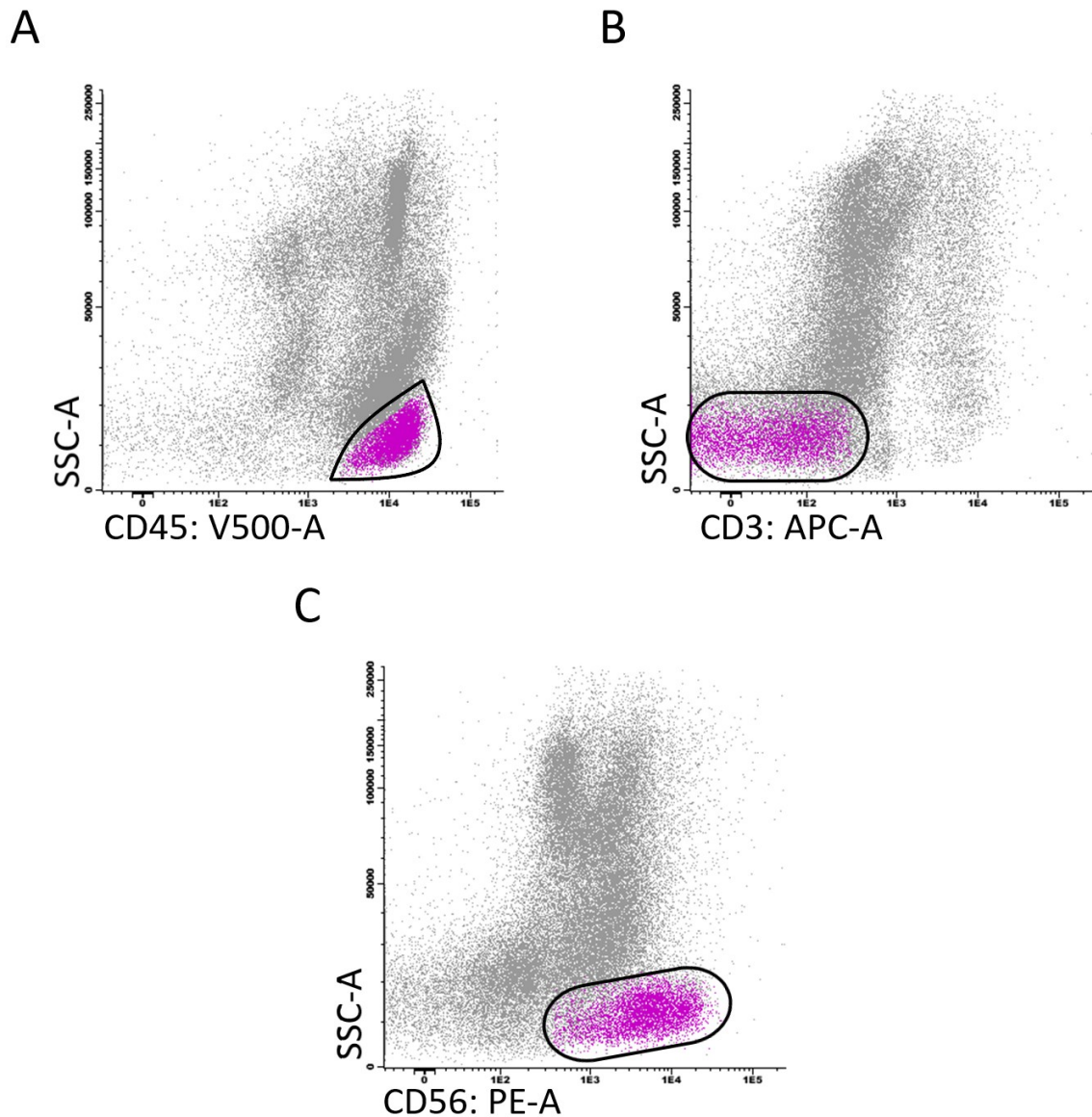
Figura 19 - Estratégias de análise dos linfócitos B e plasmócitos



Fonte: A autora.

Nota: Painel A: seleção das células com baixa complexidade e com expressão de CD45 no *dot plot* complexidade celular (SSC-A) versus CD45; Painel B: seleção das células CD19+ no *dot plot* SSC-A versus CD19; Painel C: seleção das células plasmocitárias (CD38+) e linfócitos B maduros (CD20+) no *dot plot* CD38 versus CD20; Painel D: avaliação da clonalidade dos linfócitos B maduros no *dot plot* Kappa versus Lambda. Em verde, células positivas para Kappa e em rosa, células positivas para Lambda.

Figura 20 - Estratégias de análise das células NK

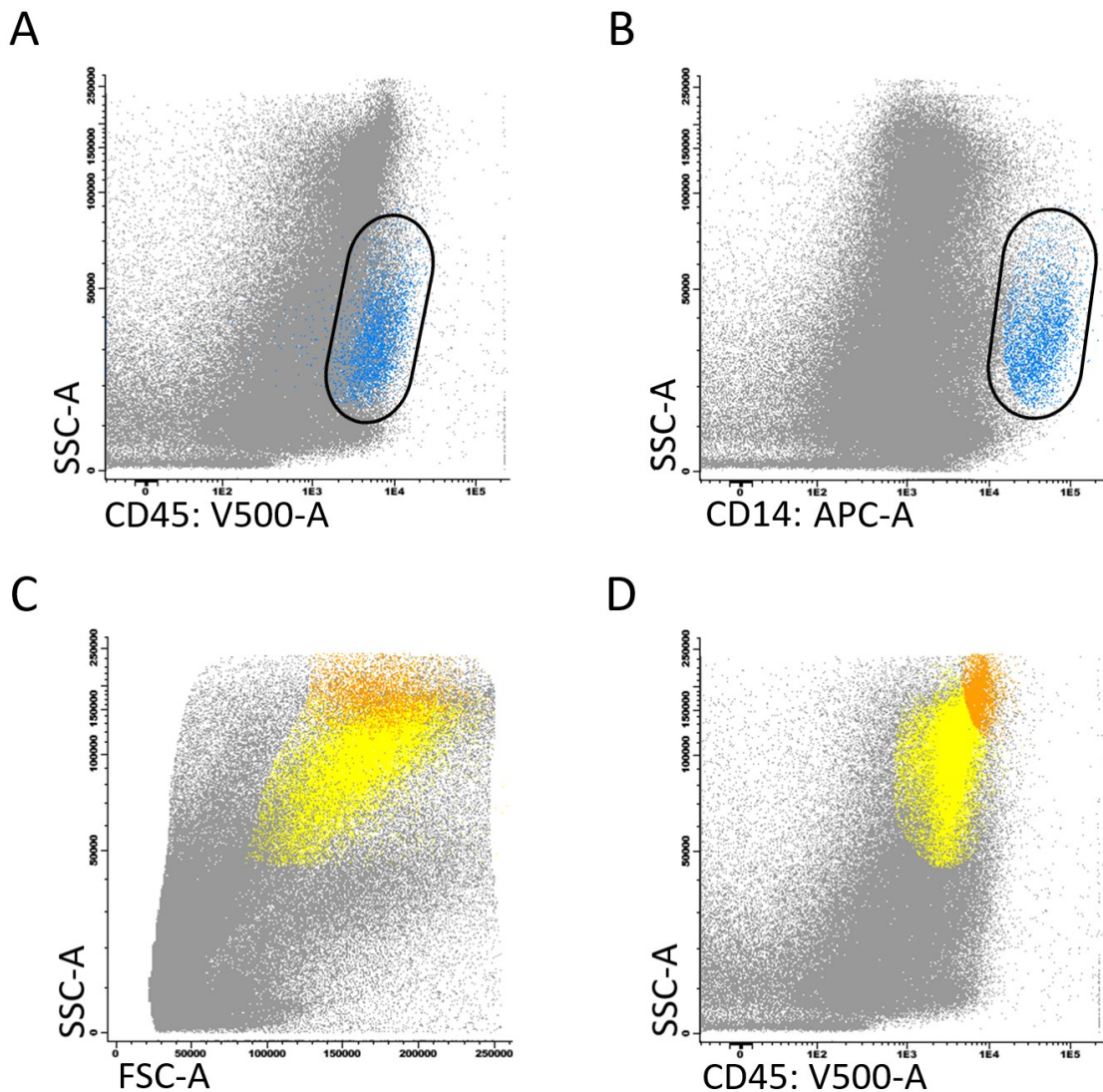


Fonte: A autora.

Nota: Painel A: seleção das células com baixa complexidade e com expressão de CD45 no *dot plot* complexidade celular (SSC-A) versus CD45; Painel B: seleção das células CD3- no *dot plot* SSC-A versus CD3; Painel C: seleção das células CD56+ no *dot plot* SSC-A versus CD56.

Para identificação dos macrófagos (Figura 21– Painéis A e B), foi realizado um *gate* na região dos monócitos no *dot plot* SSC-A versus CD45. A seguir, os monócitos foram identificados pela positividade dos marcadores CD14. E, por último, os neutrófilos e os eosinófilos foram identificados na região dos neutrófilos nos *dot plots* tamanho celular versus SSC-A e SSC-A versus CD45 (Figura 21, Painéis E e F).

Figura 21 - Estratégias de análise dos macrófagos, neutrófilos e eosinófilos.

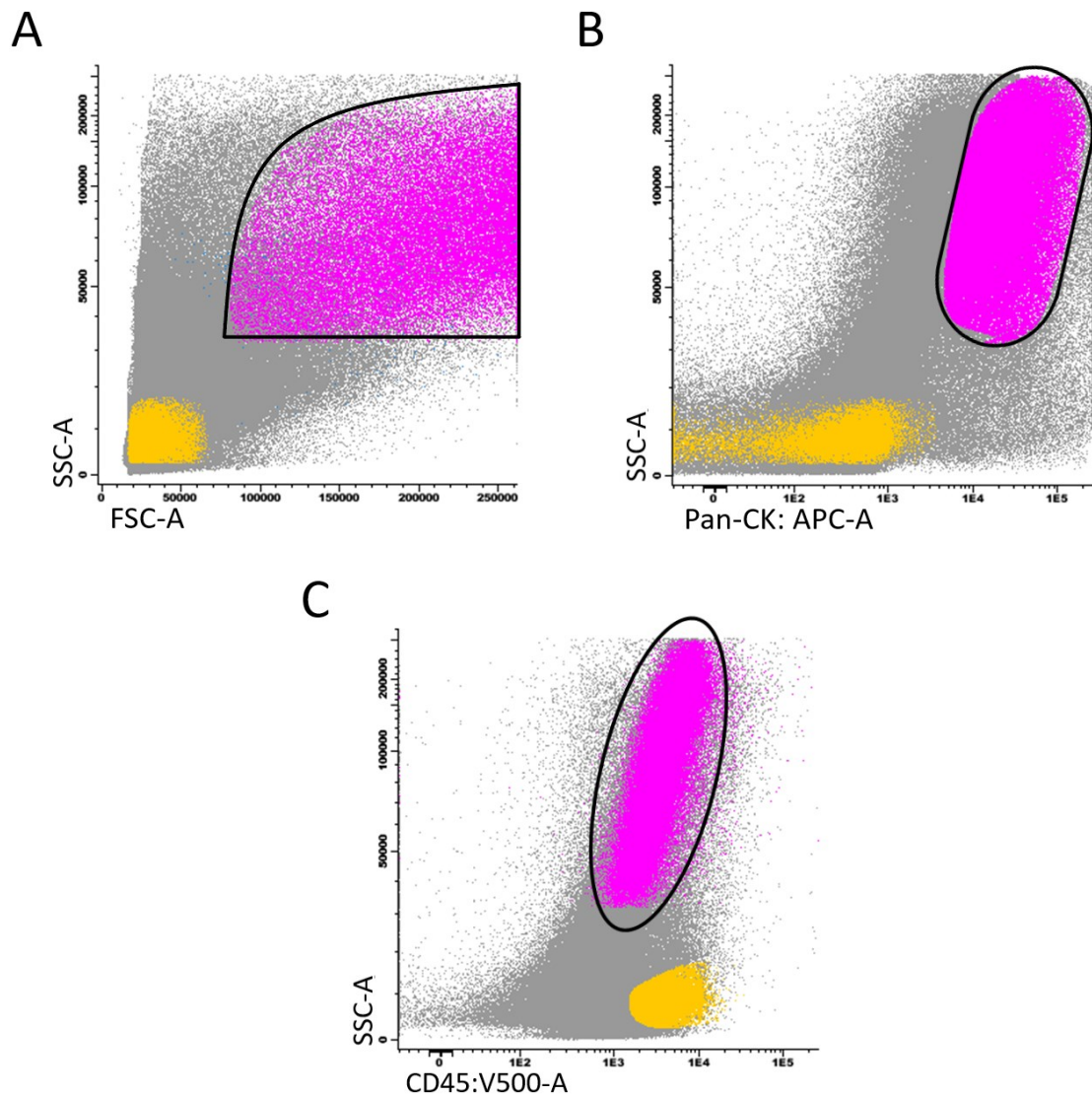


Fonte: A autora.

Nota: Painel A: seleção das células com complexidade intermediária e com expressão de CD45 no *dot plot* complexidade celular (SSC-A) versus CD45; Painel B: seleção das células CD14+ no *dot plot* SSC-A versus CD14; Painel C: seleção das células com alta complexidade e tamanho celular no *dot plot* SSC-A versus tamanho celular (FSC-A); Painel D: seleção das células CD45+ na região dos neutrófilos e eosinófilos no *dot plot* SSC-A versus CD45.

A identificação das células epiteliais foi realizada pela avaliação do seu tamanho (FSC) e complexidade celular (SSC) (Figura 22, Painel A) e positividade para o marcador Pancitoqueratina (Figura 22, Painel B). Embora as células epiteliais não expressem o antígeno CD45, foi observado que essas células apresentam certo grau de autofluorescência no comprimento de onda referente ao CD45 (Figura 22, Painel C). A avaliação de p53, p16 e Ki-67 foi realizada conforme descrito por Wopereis (2019), utilizando os linfócitos como base de comparação.

Figura 22 - Estratégia de análise das células epiteliais.



Fonte: A autora.

Nota: Painel A: seleção das células com tamanho e complexidade celular maiores que a dos linfócitos (em amarelo) no *dot plot* complexidade celular (SSC-A) versus tamanho celular (FSC-A); Painel B: seleção das células positivas para citoqueratinas no *dot plot* SSC-A versus Pan-CK; Painel C: seleção das células CD45 negativas no *dot plot* SSC-A versus CD45.

5.1.5 Análise estatística

Para a análise descritiva dos dados, foram estimadas as frequências absolutas e relativas das variáveis categóricas, e as medidas de tendência central e dispersão das variáveis numéricas.

Para comparação das técnicas de imunofenotipagem, os resultados foram classificados, dentro de diagramas de contenção, como verdadeiros positivos (VP), falsos

positivos (FP), verdadeiros negativos (VN) e falsos negativos (FN), adotando-se como padrão áureo a IHQ. Para os cálculos de sensibilidade, especificidade, valor preditivo positivo (VPP) e valor preditivo negativo (VPN) foram aplicadas as respectivas fórmulas: $VP/(FN+VP)$; $VN/(FP+VN)$; $VP/(VP+FP)$ e $VN/(VN+FN)$. Para a avaliação de concordância entre os resultados de citometria de fluxo e IHQ foi utilizado o teste *Kappa* e adotaram-se como referência os valores determinados por Altman (1991). Desta forma, foi atribuída concordância pobre para valores de *Kappa* entre 0 - 0,20, concordância razoável a valores entre 0,21 - 0,40, concordância moderada a valores entre 0,41 - 0,60, concordância boa a valores 0,61 - 0,80 e concordância excelente a valores entre 0,81-1,00.

Os resultados de Ki-67 foram comparados utilizando o teste t de uma amostra do viés entre as metodologias, seguido pela disposição gráfica de Bland-Altman. Para a construção desse gráfico, primeiramente foi efetuado o teste t de uma amostra, com o objetivo de verificar se a média do viés entre as metodologias testadas era estatisticamente igual à zero (concordância perfeita). Posteriormente, o viés para cada amostra foi plotado num gráfico de dispersão para verificar se os resultados estão dentro do intervalo de confiança estabelecido. E, por fim, foi realizada a análise de regressão linear simples para verificar se as amostras apresentam viés de proporção, com uma tendência para cima ou para baixo da média.

Para a comparação entre o perfil dos linfócitos encontrados e sua correlação com a localização anatômica, o grau histológico e o estadiamento tumoral, as variáveis foram primeiramente testadas quanto à sua normalidade pelo teste de Shapiro-Wilk. A seguir, as variáveis numéricas paramétricas foram comparadas pelos testes t de Student ou ANOVA de uma via seguido do post-hoc Bonferroni. Por outro lado, as variáveis numéricas não paramétricas foram comparadas pelos testes de Mann-Whitney U ou Kruskal-Wallis seguido do post-hoc de Mann Whitney U modificado por Bonferroni. Foram considerados estatisticamente significativos valores de $p \leq 0,05$. A confecção do banco de dados foi realizada com o auxílio do software Excell[®] e, para a análise estatística, foram utilizados os softwares SPSS versão 17.0 (Chicago, IL, EUA) e Graphpad Prism versão 9.0.0 (San Diego, CA, EUA).

5.2 RESULTADOS E DISCUSSÃO

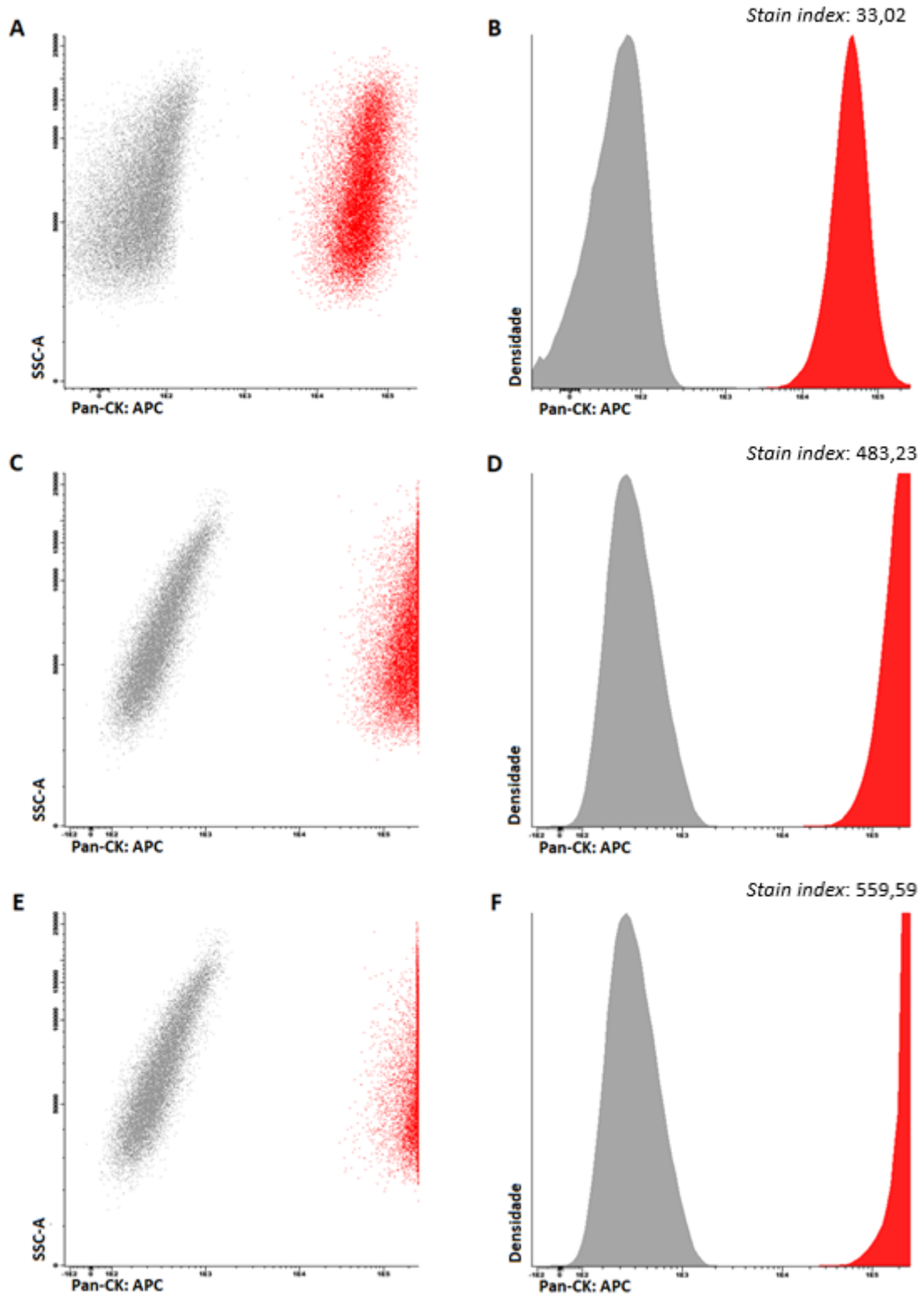
5.2.1 Padronização dos anticorpos em linhagens celulares

Inicialmente, foi avaliada a sensibilidade e especificidade do anticorpo pancitoqueratina nas células de linhagem de carcinoma de mama MCF-7 (controle positivo). Para a avaliação da autofluorescência das células, foi utilizado um tubo controle sem marcação do anticorpo e, para a avaliação de ligações inespecíficas do anticorpo, foi utilizado um controle negativo, que consistiu na marcação de uma amostra de sangue periférico. A utilização de um controle negativo é importante para a avaliação da especificidade da ligação do anticorpo ao antígeno correspondente na população de células, as quais foram expostas às mesmas condições de incubação que a população celular em estudo.

Embora o volume de anticorpo a ser utilizado seja informado pelo fabricante, é essencial realizar a titulação dos anticorpos com o objetivo de determinar a diluição ideal, de forma a maximizar a sensibilidade do anticorpo e minimizar a ligação de fundo não específica (em inglês *background*). Para isso, deve-se realizar a marcação com várias diluições do anticorpo. A diluição que propiciar a melhor separação entre células não marcadas e marcadas, e que exibir sinal desprezível em células não-alvo, deve ser utilizada. Frequentemente, o volume ideal é menor do que o recomendado pelo fornecedor, o que favorece a economia de recursos (KALINA; LUNDSTEN; ENGEL, 2020).

Para a avaliação da expressão das citoqueratinas nas células MCF-7, foram utilizados os volumes de 1 μL , 2 μL e 5 μL (recomendado pelo fabricante) de anticorpo. Pode-se observar na Figura 23, tanto nos *dot plots* quanto nos histogramas, o aumento da intensidade de fluorescência no eixo x das células marcadas (em vermelho), em comparação com o controle não marcado (tubo branco, em cinza), o que evidencia a capacidade de ligação do anticorpo às citoqueratinas presentes nas células. Embora o *stain index* tenha sido maior com a utilização de 5 μL de anticorpo, nos volumes de 2 μL e 5 μL , a marcação extrapolou a área do gráfico, portanto, o volume de anticorpo definido foi o de 1 μL (Figura 23). Como pode ser observado na Figura 24, não houve marcação de citoqueratinas nos leucócitos do sangue periférico. Esse resultado nos permite concluir que o anticorpo anti-citoqueratina utilizado é específico para as células não hematológicas.

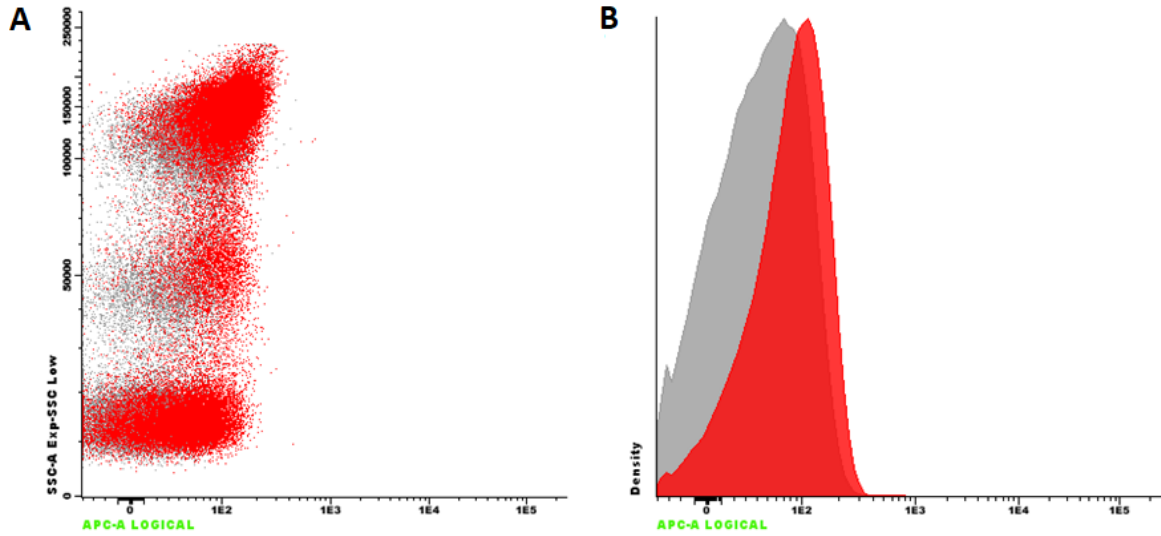
Figura 23 - Comparação entre células MCF-7 não marcadas (em cinza) e células marcadas com anticorpo pan-citoqueratina (em vermelho), nos volumes 1 μL , 2 μL e 5 μL .



Fonte: A autora.

Nota: Painéis A e B - “Dot Plot” e histograma, respectivamente, mostrando a distribuição da intensidade de fluorescência média das células marcadas com 1 μL de anticorpo. Painéis C e D - “Dot Plot” e histograma, respectivamente, mostrando a distribuição da intensidade de fluorescência média das células marcadas com 2 μL de anticorpo. Painéis E e F - “Dot Plot” e histograma, respectivamente, mostrando a distribuição da intensidade de fluorescência média das células marcadas com 5 μL de anticorpo.

Figura 24 - Comparação entre leucócitos do sangue periférico não marcados (cinza) e leucócitos marcados (vermelho) com anticorpo pan-citoqueratina.



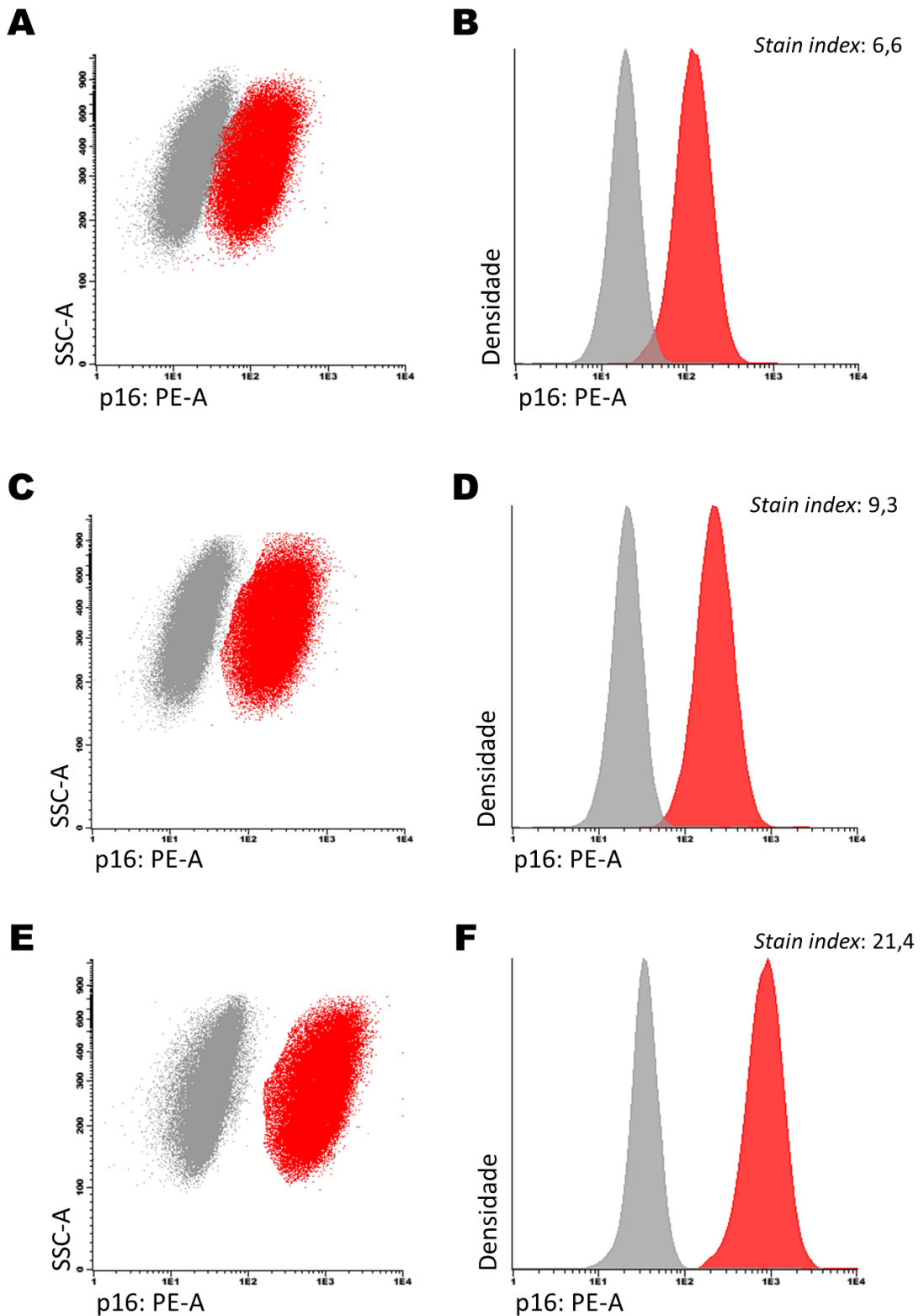
Fonte: A autora.

Nota: Painel A - “Dot Plot” mostrando a distribuição das populações quanto à sua complexidade estrutural (eixo y) e a intensidade de fluorescência (eixo x) do tubo branco (em cinza) e das células marcadas com 1 μ L de anticorpo pan-citoqueratina (em vermelho). Painel B - histograma evidenciando a densidade populacional (eixo y) e a intensidade de fluorescência. Pan-CK – Pan-citoqueratina.

A padronização do anti-p16 foi realizada nas células de linhagem celular de carcinoma de colo uterino HeLa (ATCC[®] CCL-2[™]), as quais contêm HPV18 e, portanto, superexpressam p16. O anticorpo foi analisado nos volumes 10 μ L, 15 μ L e 20 μ L (recomendado pelo fabricante), e o *stain index* de cada diluição foi calculado. Como pode ser observado na Figura 25, a utilização de 20 μ L de anticorpo anti-p16 proporcionou a melhor distinção entre as células marcadas (em vermelho) e os controles não marcados (tubo branco, em cinza), com o maior *stain index*, portanto, esse foi o volume de anticorpo escolhido para os testes subsequentes.

Como controle negativo para marcação de p16, foram utilizadas células de linhagem celular MCF-7, as quais possuem deleção homozigótica de p16 (HERMAN *et al.*, 1995). Como esperado, não houve marcação de p16 nessas células (Figura 26).

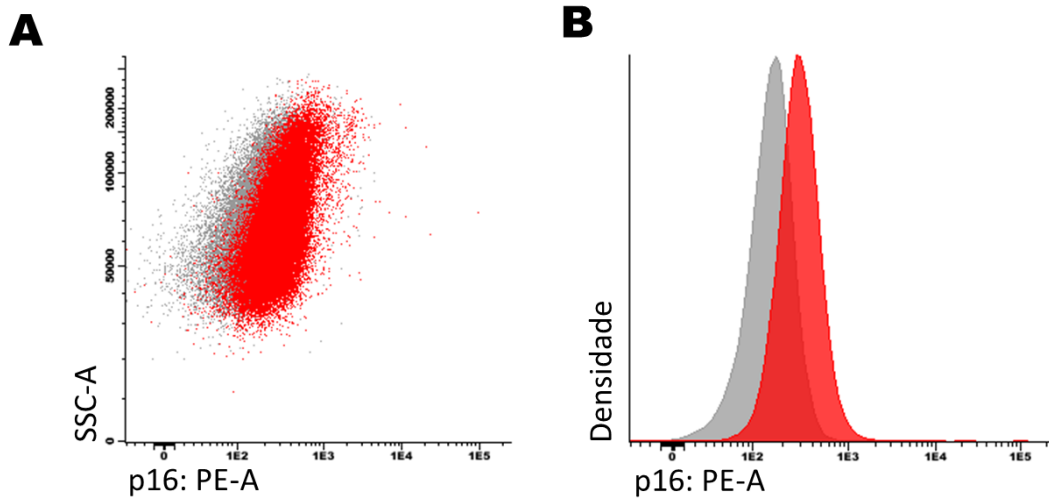
Figura 25 - Comparação entre células HeLa não marcadas (cinza) e células marcadas (vermelho) com anti-p16, nos volumes 10 μ L, 15 μ L e 20 μ L.



Fonte: A autora.

Nota: Painéis A e B - “Dot Plot” e histograma, respectivamente, mostrando a distribuição da intensidade de fluorescência média das células marcadas com 10 μ L de anticorpo. Painéis C e D - “Dot Plot” e histograma, respectivamente, mostrando a distribuição da intensidade de fluorescência média das células marcadas com 15 μ L de anticorpo. Painéis E e F - “Dot Plot” e histograma, respectivamente, mostrando a distribuição da intensidade de fluorescência média das células marcadas com 20 μ L de anticorpo.

Figura 26 - Comparação entre células MCF-7 não marcadas (cinza) e células marcadas (vermelho) com anti-p16.

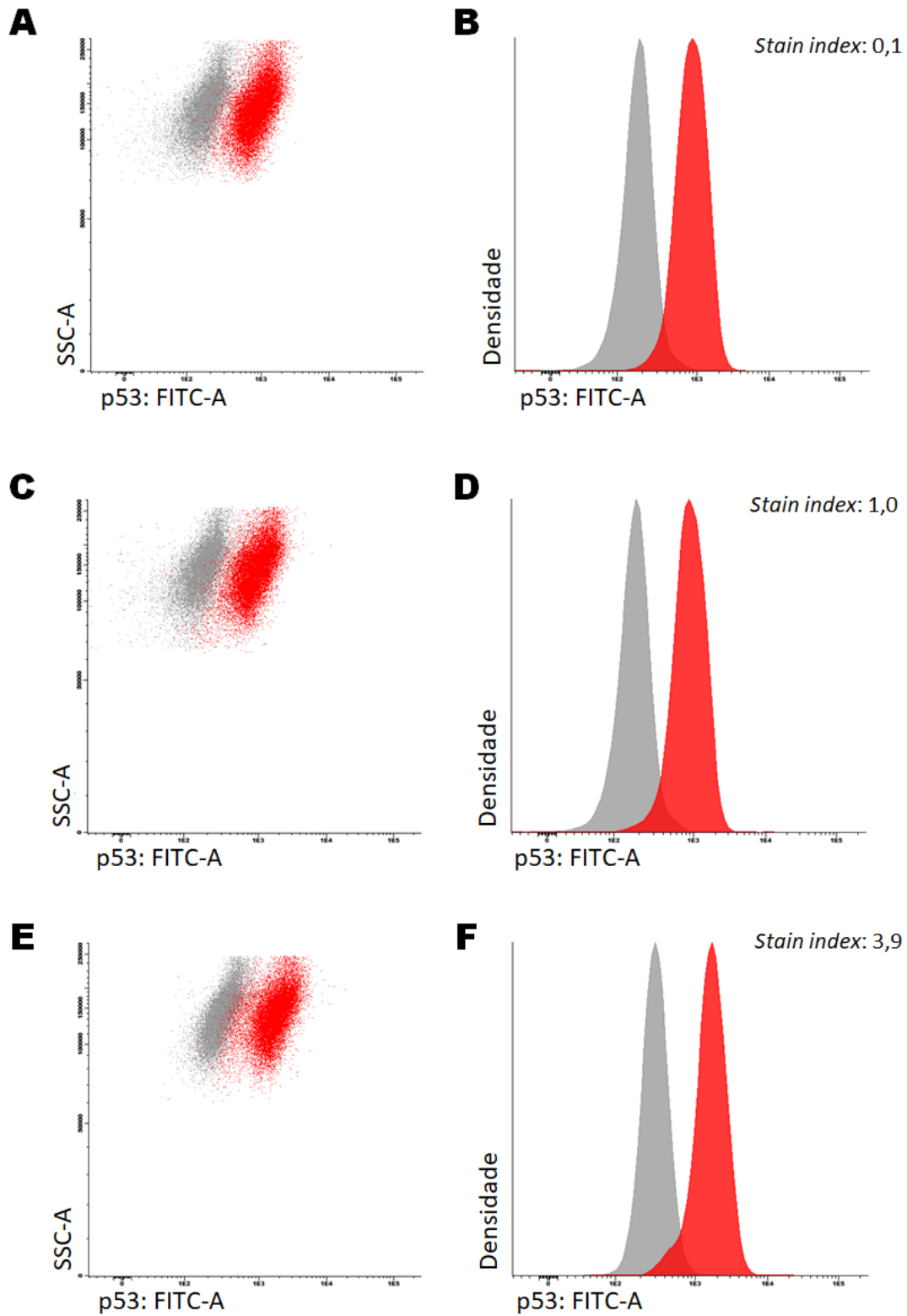


Fonte: A autora.

Nota: Painel A - “Dot Plot” mostrando a distribuição das populações quanto à sua complexidade estrutural (eixo y) e a intensidade de fluorescência (eixo x) do controle não marcado (em cinza) e das células marcadas com 20 μ L de anti-p16 (em vermelho). Painel B – histograma evidenciando a densidade populacional (eixo y) e a intensidade de fluorescência.

A sensibilidade e a especificidade do anticorpo anti-p53 foram avaliadas nas células das linhagens SKBR3 (controle positivo) e MCF-7 (controle negativo). O anticorpo foi analisado nos volumes 10 μ L, 15 μ L e 20 μ L (recomendado pelo fabricante), e o *stain index* de cada diluição foi calculado. Como pode ser observado na Figura 27, a adição do anticorpo anti-p53 (em vermelho) causou um aumento da intensidade de fluorescência no eixo x, em comparação com o controle não marcado (tubo branco, em cinza), porém, a intensidade de fluorescência foi menor do que a observada para o marcador p16. Uma das justificativas para essa menor intensidade de fluorescência média observada se deve ao fato do p53 ser uma molécula localizada apenas no núcleo das células, ao contrário do p16 que se localiza tanto no citoplasma como no núcleo das células. Adicionalmente, o anti-p53 estava conjugado ao fluorocromo FITC, o qual apresenta menor intensidade de fluorescência do que o fluorocromo PE, ao qual o anti-p16 estava conjugado.

Figura 27 - Comparação entre células SKBR3 não marcadas (cinza) e células marcadas (vermelho) com anti-p53, nos volumes 10 μ L, 15 μ L e 20 μ L.

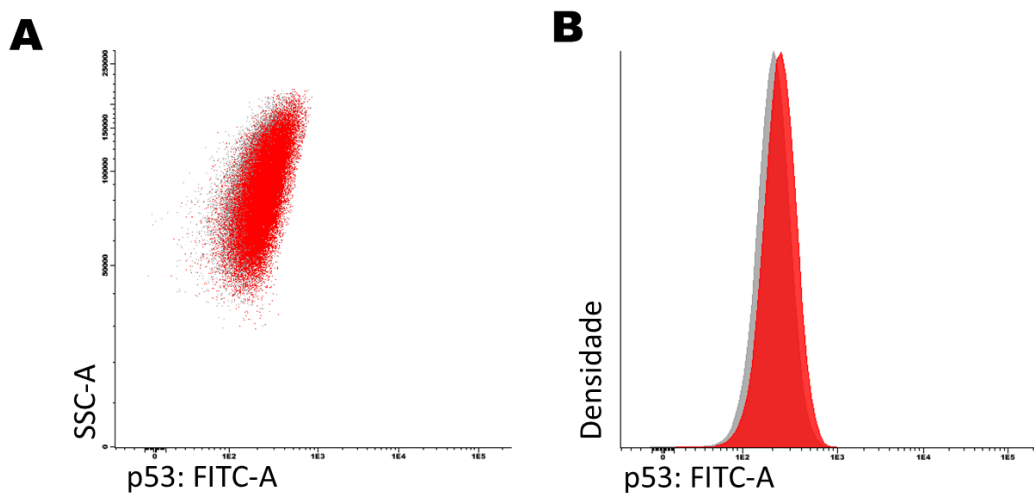


Fonte: A autora.

Nota: Painéis A e B - “Dot Plot” e histograma, respectivamente, mostrando a distribuição da intensidade de fluorescência média das células marcadas com 10 μ L de anticorpo. Painéis C e D - “Dot Plot” e histograma, respectivamente, mostrando a distribuição da intensidade de fluorescência média das células marcadas com 15 μ L de anticorpo. Painéis E e F - “Dot Plot” e histograma, respectivamente, mostrando a distribuição da intensidade de fluorescência média das células marcadas com 20 μ L de anticorpo.

Como esperado, não houve marcação de p53 nas células MCF7 (Figura 28), pois nessas células a atividade do gene TP53 está prejudicada pela amplificação do gene MDMX que codifica reguladores negativos de TP53 (HAUPT *et al.*, 2015).

Figura 28 - Comparação entre células MCF-7 não marcadas (cinza) e células marcadas (vermelho) com anti-p53.



Fonte: A autora.

Nota: Painel A - “Dot Plot” mostrando a distribuição das populações quanto à sua complexidade estrutural (eixo y) e a intensidade de fluorescência (eixo x) do controle não marcado (em cinza) e das células marcadas com 20 μ L de anti-p53 (em vermelho). Painel B - histograma evidenciando a densidade populacional (eixo y) e a intensidade de fluorescência.

Com a validação dos anticorpos em células de linhagens celulares e a definição dos volumes adequados de cada um dos anticorpos, procedeu-se à análise das amostras de biópsias de boca.

5.2.2 Caracterização dos participantes do estudo

Foram avaliadas neste estudo 40 amostras de pacientes com suspeita de carcinoma de boca. No entanto, em virtude de problemas técnicos ou metodológicos, como falta de reagentes ou impossibilidade de comparação com a metodologia de referência, algumas análises não puderam ser realizadas em uma parcela das amostras. Assim, os leucócitos foram analisados em 40 amostras, os marcadores p16 e p53 em 22 amostras e o Ki-67 em 13 amostras. Dos pacientes incluídos no estudo, 62,5% eram do sexo masculino (n=25) e 37,5% do sexo feminino (n=15), 92,5% eram caucasianos (n=37), e a idade variou de 21 a 93 anos com mediana de 63 anos. A viabilidade celular das amostras analisadas por citometria de fluxo variou de 27 a 91%.

Das 40 amostras analisadas, três (7,5%) receberam diagnóstico de lesões não malignas (como abscessos e paracoccidiodomicose), seis (15,0%) de lesões potencialmente malignas (como leucoplasia e lesões papilomatosas e acantóticas) e 31 (77,5%) receberam diagnóstico de CEC invasivo. Os resultados das variáveis clínicas e morfológicas dos casos de CEC invasivo estão descritos na Tabela 9.

Tabela 9 - Resultados das variáveis clínicas e morfológicas dos casos de carcinoma de boca.

Variáveis clínicas e morfológicas		nº casos	%
Idade	< 40	2	6,45
	40 – 70	21	67,74
	> 70	8	25,81
Sexo	Feminino	11	35,48
	Masculino	20	64,52
Fatores de risco	Tabaco	24	77,42
	Álcool	17	54,84
Localização	Lábios	2	6,45
	Cavidade oral	22	70,97
	Orofaringe	7	22,58
Gradação histológica	Bem diferenciado	5	16,13
	Moderadamente diferenciado	20	64,52
	Pouco diferenciado	6	19,35

5.2.3 Validação do marcador p16

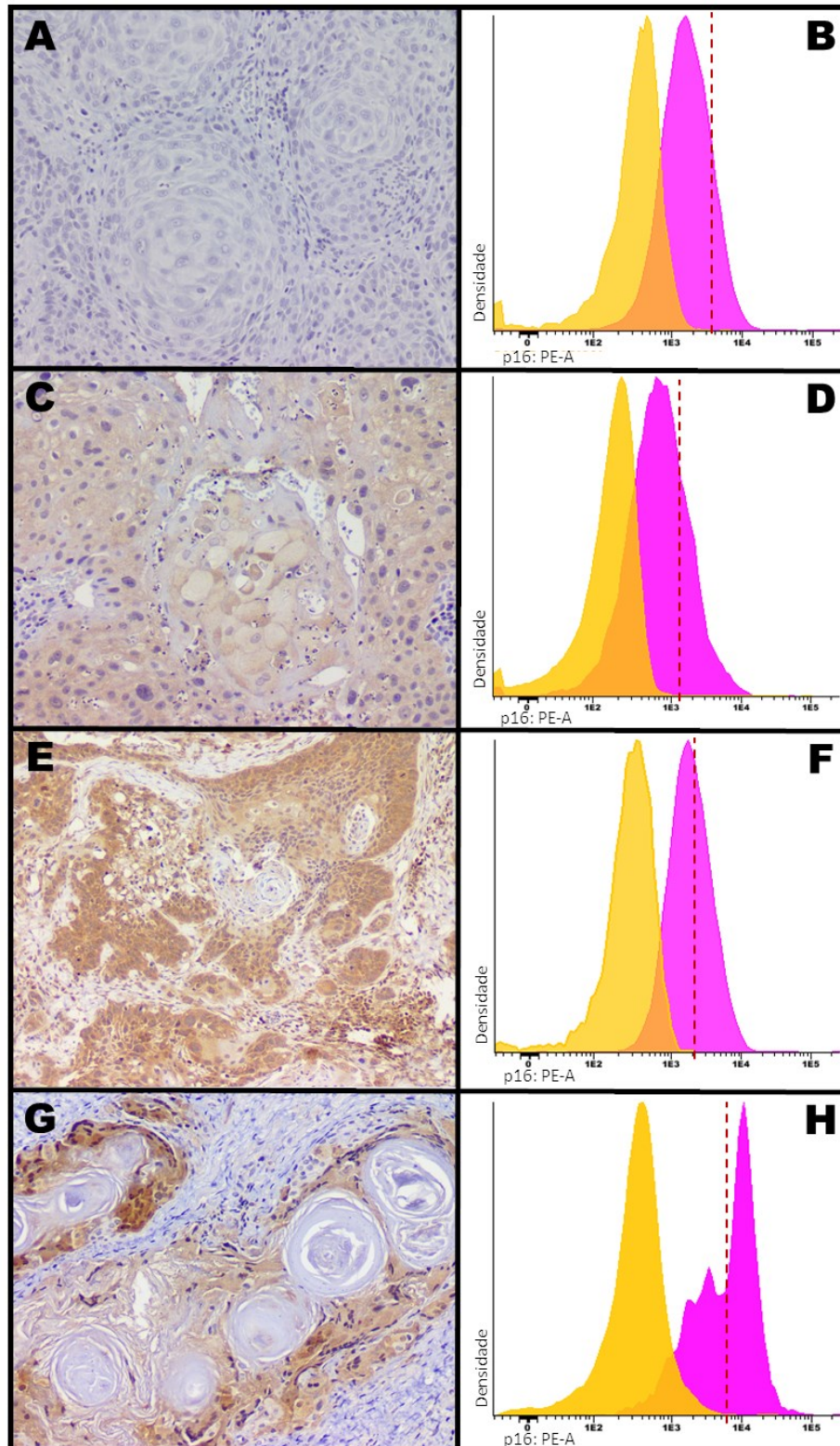
A avaliação IHQ do p16 é comumente usada como um marcador indireto para a infecção ativa por HPV. Em amostras não citológicas, este método apresenta uma sensibilidade extremamente alta, com sensibilidade de 100%, mas uma especificidade relativamente baixa, de 79 a 82%. A baixa especificidade se deve principalmente à superexpressão de p16 em outros cânceres de cabeça e pescoço não relacionados ao HPV e outras doenças benignas. No entanto, devido à alta prevalência de infecção por HPV na orofaringe, a detecção de p16 tem se mostrado tão boa quanto os testes específicos para a detecção de HPV em carcinomas de orofaringe, bem como nas regiões nodais onde esse tumor metastatiza com mais frequência (YANG *et al.*, 2019).

A atual recomendação do Colégio Americano de Patologistas para avaliação imuno-histoquímica de p16 em tecidos é relatar a positividade quando houver expressão nuclear e citoplasmática de intensidade moderada a forte em 70% ou mais das células neoplásicas (LEWIS JR. *et al.*, 2018). Para a avaliação de p16 em amostras por imunocitoquímica, ainda não existe um consenso. Foi demonstrado em alguns estudos a ocorrência de uma taxa

inaceitavelmente alta de resultados falso-negativos quando o limite de 70% foi usado para interpretar a positividade de p16 por imunocitoquímica. Nesses casos, a adoção de um ponto de corte inferior deve ser utilizada para diminuir os resultados falso-negativos, se a especificidade puder ser mantida (BUONOCORE *et al.*, 2019). Xu e colaboradores (2016) e Jalaly e colaboradores (2015) observaram que a utilização de um limiar de 10% e 15% de positividade, respectivamente, apresentou a melhor taxa de concordância com a IHQ dos tecidos e com o teste de hibridização *in situ*. Enquanto Yang e colaboradores (2019) obtiveram uma sensibilidade de 74% e uma especificidade de 100% para um limiar de 50% de positividade de p16.

No presente estudo, a positividade para p16 foi avaliada pelo aumento da intensidade de fluorescência acima daquela observada para os linfócitos, os quais não expressam o marcador (Figura 29). Foram consideradas positivas as amostras que apresentavam 20% ou mais de células com intensidade de fluorescência acima da observada para os linfócitos. Do mesmo modo, quando as populações apresentaram intensidade de fluorescência menor ou igual aos linfócitos, a amostra foi considerada negativa para expressão do marcador. Permitindo, dessa forma, a discriminação entre amostras positivas e negativas para p16. Destaca-se que a expressão forte do marcador em apenas 30% das células (amostra representada na Figura 29, Painel G) gerou um aumento significativo (acima de 10^4) da IFM avaliada por citometria de fluxo (Figura 29, Painel H), ao contrário das amostras com menor intensidade de expressão.

Figura 29 - Comparação dos perfis de expressão de p16 por citometria de fluxo e por imunohistoquímica em amostras com suspeita de carcinoma de boca.



Fonte: A autora.

Nota: Painéis A, C, E e G: fotomicrografias da avaliação imuno-histoquímica de amostras de carcinoma de boca cuja expressão de p16 é ausente, fraca, moderada e forte, respectivamente. Coloração de Hematoxilina seguida de DAB-peroxidase. Ampliação 200x. Painéis B, D, F e H: histogramas dos resultados da citometria de fluxo das amostras destacadas nos painéis A, C, E e G. Foram consideradas positivas as amostras com 20% ou mais de células (rosa) com intensidade de fluorescência acima da observada para os linfócitos (laranja).

Para realização da comparação entre as metodologias de imunofenotipagem por IHQ (padrão-ouro) e por citometria de fluxo (CMF) os dados foram organizados em diagramas de contenção (Quadro 5), e os valores de sensibilidade, especificidade, VPP e VPN foram calculados. No presente estudo, optou-se por classificar as amostras apenas como positivas ou negativas para determinado marcador. A escolha se deu levando-se em consideração o fato de que a subdivisão em mais grupos comprometeria o poder estatístico dos testes utilizados, bem como dificultaria a interpretação dos resultados obtidos.

Quadro 5 - Diagrama de contenção para cálculo de sensibilidade e especificidade do marcador p16

p16	Positivo IHQ	Negativo IHQ
Positivo CMF	9	5
Negativo CMF	2	6

Nota: IHQ – imuno-histoquímica; CMF – citometria de fluxo.

Como pode ser observado no Quadro 5, de 22 amostras analisadas, nove foram considerados resultados “verdadeiro positivo”, cinco “falso-positivo”, dois “falso negativo” e seis “verdadeiro negativo”. O que resultou em uma sensibilidade de 81,8% e uma especificidade de 54,5%. Os VPP, VPN foram de 64,3% e 75%, respectivamente. A concordância entre os testes foi considerada “razoável”, com valor de *kappa* de 0,364.

A alta proporção de resultados falso positivos, observada tanto no diagrama de contenção, quanto pelo baixo VPP, indica uma dificuldade em estabelecer um ponto de corte para determinação das amostras positivas e negativas para p16. Uma das justificativas se dá pelo fato de que das onze amostras positivas para o marcador p16, em nove delas houve expressão fraca do marcador. Para determinação de um ponto de corte para diferenciação de amostras positivas e negativas para p16 por citometria de fluxo, se faz necessária a avaliação de um maior número de amostras com intensidade de expressão moderada a forte.

5.2.4 Validação do marcador p53

A mutação do gene TP53 é a alteração genética mais frequente no carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço, incluindo o câncer de boca. Acredita-se que essas mutações em TP53 ocorrem no estágio inicial das lesões epiteliais orais e são mutuamente exclusivas

com a infecção pelo HPV (SAWADA *et al.*, 2021). A meia-vida da proteína p53 selvagem (ou *wild type*) é de 6 a 20 minutos, enquanto sua forma mutante tem até 6 horas de meia-vida, possivelmente, devido à estabilização da proteína. Esse aumento na meia-vida torna possível a detecção da proteína p53 mutante em tumores pela IHQ (DHURIA *et al.*, 2020). Enquanto a expressão de p53 selvagem mostra coloração fraca irregular, as mutações de p53 geralmente mostram coloração forte difusa devido ao acúmulo da proteína p53 mutada ou, ainda, se mostram totalmente sem coloração devido à deleção ou degradação da proteína (LI; YANG; YANG, 2016).

No presente estudo, a positividade para o marcador p53 foi avaliada da mesma forma que o p16, por meio do deslocamento da população de células tumorais com intensidade de fluorescência acima dos linfócitos. Como pode ser observado na Figura 30, quanto maior a intensidade de expressão de p53, maior foi a fluorescência das células tumorais no eixo x.

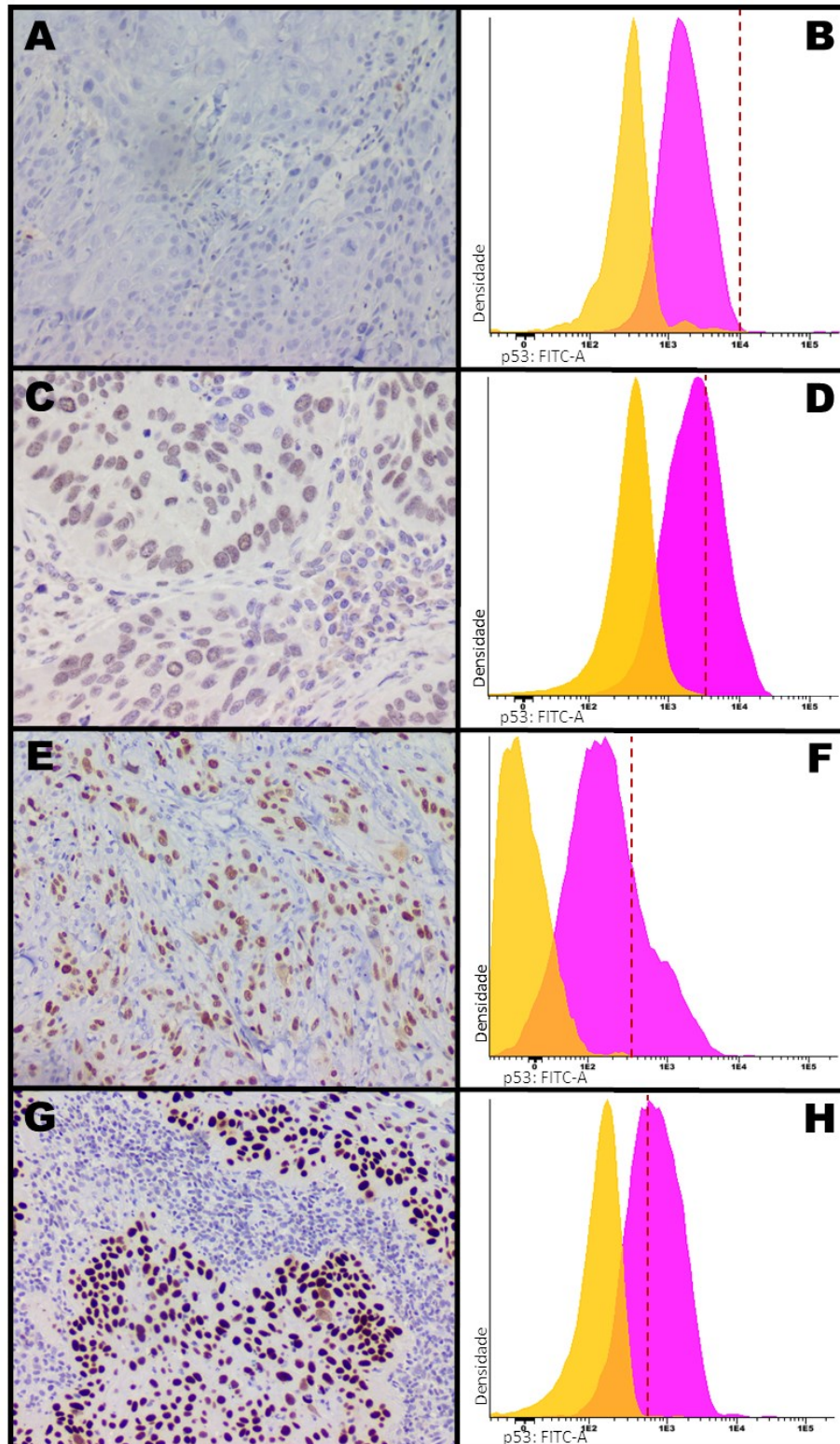
Como pode ser observado no Quadro 6, das 22 amostras analisadas, 19 foram considerados resultados “verdadeiro positivo”, dois “falso-positivo” e um “verdadeiro negativo”. Não foram observados resultados “falso negativo” para p53. Esses resultados proporcionaram valores de sensibilidade e especificidade de 100% e 33,3%, respectivamente. Os VPP e VPN foram de 90,5% e 100%, respectivamente. No entanto, esses valores devem ser interpretados com cautela, devido ao baixo número de amostras negativas para p53 incluídas neste estudo. A concordância entre os testes foi considerada “moderada”, com valor de *kappa* de 0,463.

Quadro 6 - Diagrama de contensão para cálculo de sensibilidade e especificidade do marcador p53

p53	Positivo IHQ	Negativo IHQ
Positivo CMF	19	2
Negativo CMF	0	1

Nota: IHQ – imuno-histoquímica; CMF – citometria de fluxo.

Figura 30 - Comparação dos perfis de expressão de p53 por citometria de fluxo e por imunohistoquímica em amostras com suspeita de carcinoma de boca.

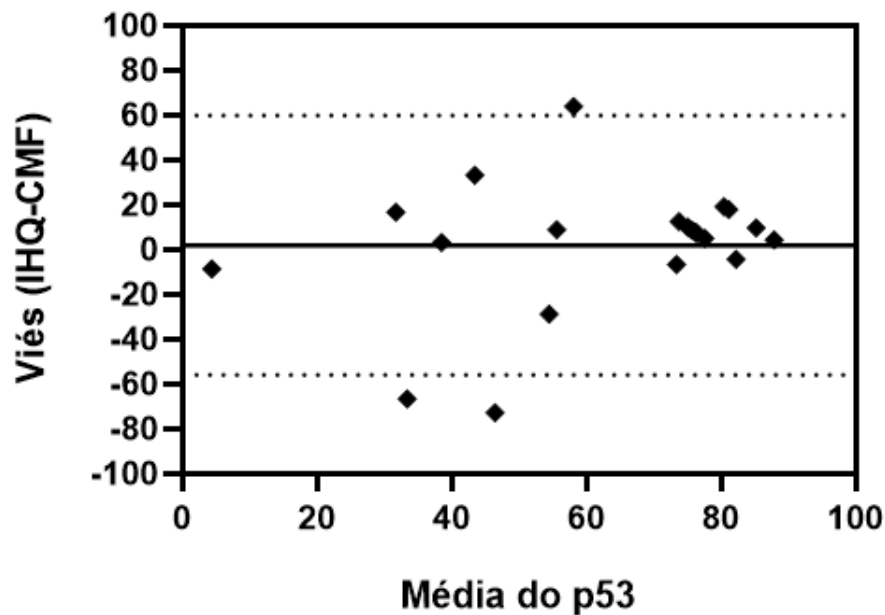


Fonte: A autora.

Nota: Painéis A, C, E e G: fotomicrografias da avaliação imuno-histoquímica de amostras de carcinoma de boca cuja expressão de p53 é ausente, fraca, moderada e forte, respectivamente. Coloração de Hematoxilina seguida de DAB-peroxidase. Ampliação 200x. Painéis B, D, F e H: histogramas dos resultados da citometria de fluxo das amostras destacadas nos painéis A, C, E e G. Foram consideradas positivas as amostras com 20% ou mais de células (rosa) com intensidade de fluorescência acima da observada para os linfócitos (laranja).

Em decorrência dessa alta prevalência de p53 na amostra estudada, resolveu-se avaliar a concordância entre as duas metodologias também por meio da plotagem gráfica com Bland-Altman (Figura 31). As análises mostraram concordância satisfatória entre a citometria de fluxo e a IHQ, com viés médio de 1,96% e valor de $p = 0,764$. A análise de regressão linear demonstrou que não há viés de proporção na amostragem estudada, com valor de $p = 0,205$.

Figura 31 - Gráfico de Dispersão de Bland-Altman para o marcador p53.



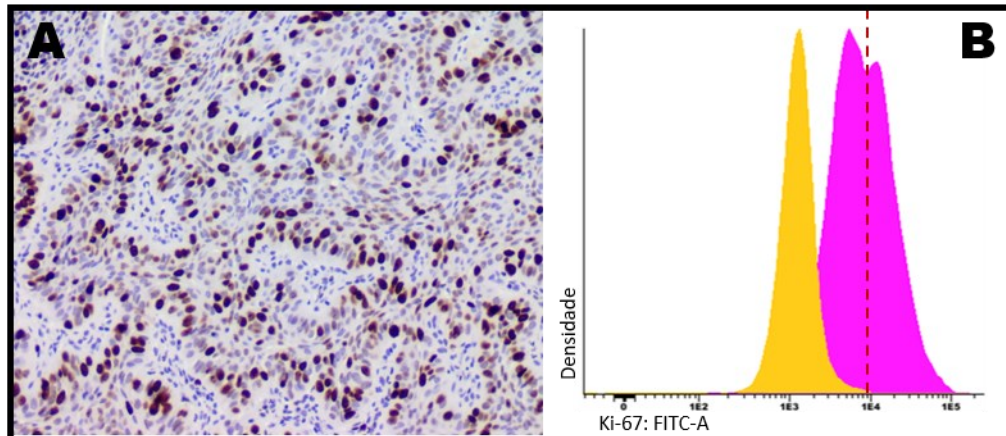
Fonte: A autora.

Nota: O eixo y é a escala dos valores de viés, a reta contínua representa o viés médio (1,960) e as linhas tracejadas, os limites inferior (-55,96) e superior (59,88), considerando-se um intervalo de confiança de 95%.
Nota-se que três amostras apresentaram viés fora do intervalo de confiança de 95% ($n = 22$).

5.2.5 Validação do marcador Ki-67

Para definição do ponto de corte entre células positivas para o marcador Ki-67 e células negativas na imunofenotipagem por citometria de fluxo, foram utilizados os linfócitos como base de comparação, conforme padronizado por Wopereis (2019). Dessa forma, obteve-se a porcentagem de células tumorais positivas para Ki-67 e os resultados foram comparados com os obtidos por IHQ.

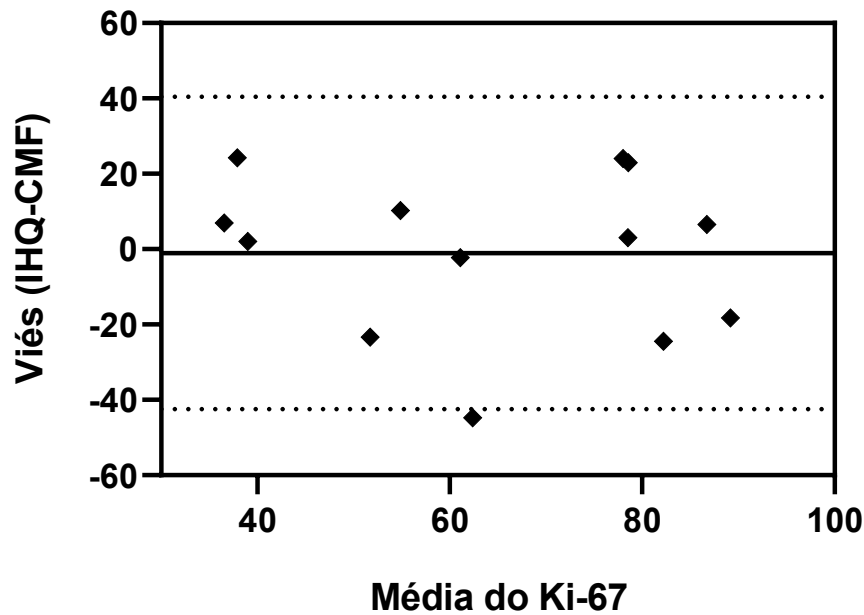
Figura 32 - Comparação da expressão de Ki-67 por citometria de fluxo e por imuno-histoquímica em amostras com suspeita de carcinoma de boca.



Nota: Painei A: fotomicrografia da avaliação imuno-histoquímica de amostras de carcinoma de boca positiva para Ki-67. Coloração de Hematoxilina seguida de DAB-peroxidase. Ampliação 200x. Painei B: histograma do resultado da citometria de fluxo da amostra destacada no painei A. Os resultados de Ki-67 foram expressos em porcentagem de células (rosa) com intensidade de fluorescência acima da dos linfócitos (laranja).

A concordância entre os valores de Ki-67 obtidos com as duas metodologias foi avaliada em 13 amostras por plotagem gráfica com Bland-Altman (Figura 33). As análises mostraram concordância satisfatória entre a citometria de fluxo e a IHQ. O viés médio foi de -1,012%, com valor de $p = 0,886$ (teste t de uma amostra), o que mostra que os valores de Ki-67 obtidos pelas duas metodologias são concordantes. A análise de regressão linear demonstra que não há viés de proporção na amostragem estudada, com valor de $p=0,670$. Esses resultados são concordantes com os obtidos por Wopereis (2019) em amostras de carcinoma de mama.

Figura 33 - Gráfico de Dispersão de Bland-Altman para o marcador Ki-67.



Fonte: A autora.

Nota: O eixo y é a escala dos valores de viés, a reta contínua representa o viés médio (-1,012) e as linhas tracejadas, os limites inferior (-42,47) e superior (40,45), considerando-se um intervalo de confiança de 95%.

Nota-se que uma amostra apresentou viés fora do intervalo de confiança de 95%.

Como mencionado anteriormente, o Ki-67 é um marcador confiável de proliferação tumoral e se correlaciona com o prognóstico, progressão e risco metastático em diferentes tipos de tumores, como os cânceres de mama, próstata, pulmão, dentre outros. No entanto, a sua aplicação clínica ainda é controversa devido à falta de padronização e baixa reprodutibilidade da técnica IHQ usada para sua detecção (ÁCS *et al.*, 2018; MARTINO *et al.*, 2020). Nesse contexto, a imunofenotipagem por citometria de fluxo apresenta-se como uma alternativa viável para detecção do Ki-67, pois permite a análise de um maior número de células e está sujeita a um menor viés observacional, pois é realizada com auxílio de um *software*. E a sua utilização, pode auxiliar na avaliação prognóstica de tumores de boca, nos quais a análise IHQ do Ki-67 apresenta resultados altamente controversos (JING *et al.*, 2019).

5.2.6 Dissociação enzimática dos tecidos

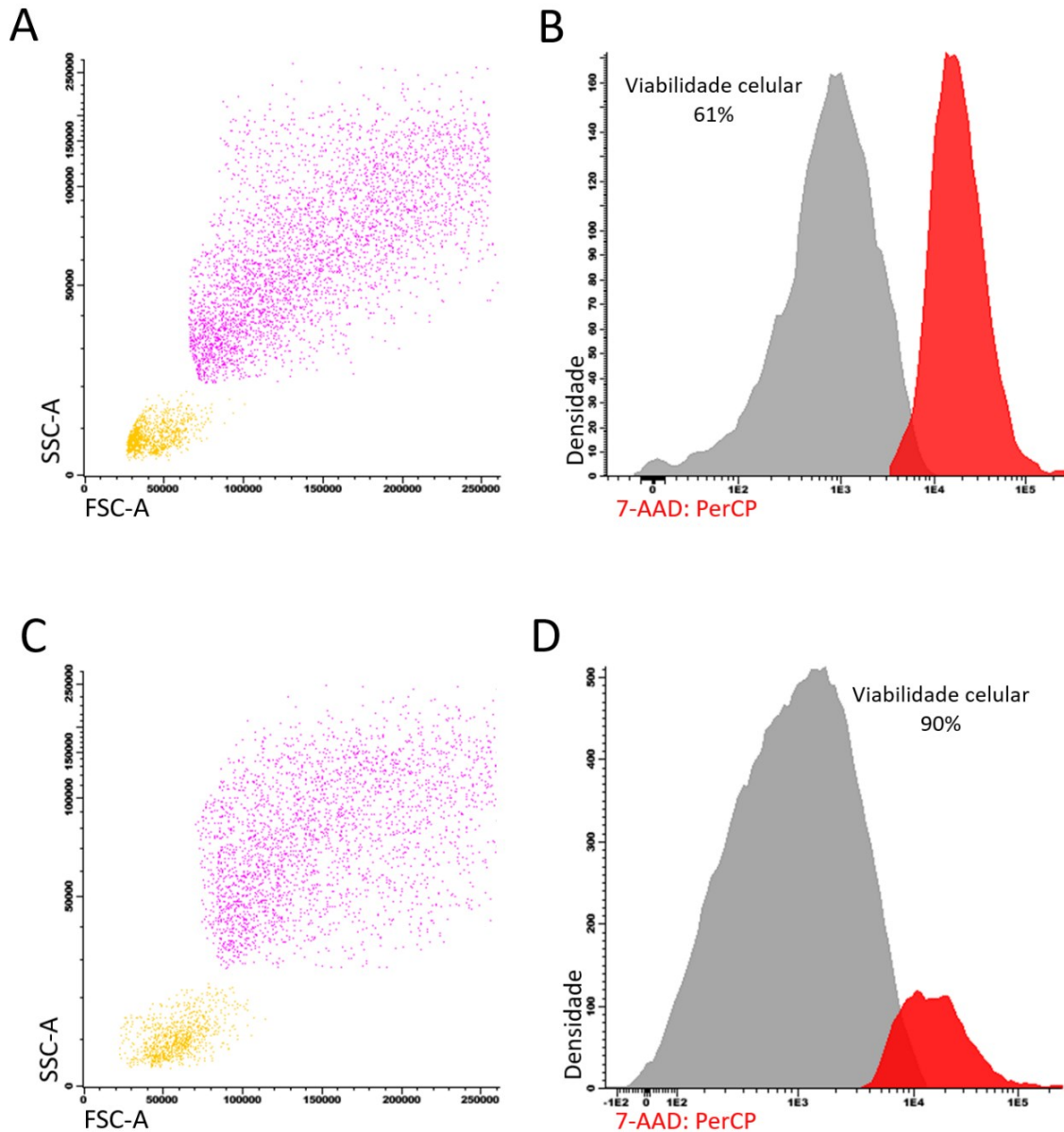
Os resultados obtidos com a dissociação mecânica do tecido evidenciaram um grande número de amostras com baixa viabilidade e celularidade, o que pode influenciar na sensibilidade e especificidade da citometria de fluxo para avaliação dos tumores sólidos de

bova. Dessa forma, foi necessária a padronização de uma nova metodologia de dissociação dos tecidos de boca para obtenção de um maior número de eventos viáveis.

Os tecidos mantêm as células unidas por meio de uma matriz extracelular e de junções célula-célula, compostas por diferentes proteínas e moléculas biológicas, que requerem enzimas específicas para sua dissociação. As enzimas mais usadas rotineiramente são: *i*) Colagenases, que quebram as ligações peptídicas presentes no colágeno, um dos principais componentes da matriz extracelular, o que leva a sua digestão e liberação das células; *ii*) Dispase II, que também cliva ligações entre as células e a matriz extracelular, mas nesse caso atua sobre o colágeno IV e a fibronectina. Essas enzimas são geralmente utilizadas em conjunto com a DNase, que hidrolisa os complexos DNA-proteína, os quais podem levar à reagregação das células suspensas (CUNNINGHAM, 2010; REICHARD; ASOSINGH, 2019).

Para auxiliar na escolha da melhor enzima para dissociação das amostras de boca, a técnica da dissociação mecânica foi comparada às técnicas de dissociação com colagenase tipo 2 + nuclease de Pierce e com dispase II + nuclease de Pierce, em duas amostras distintas. Os resultados demonstram que a dissociação do tecido pela colagenase tipo II resultou em um aumento relativo da viabilidade celular (Figura 34). No entanto, não foi observado aumento da celularidade.

Figura 34 - Comparação da celularidade relativa e da viabilidade celular resultante de dissociação mecânica e por collagenase tipo II por meio da avaliação do 7AAD.

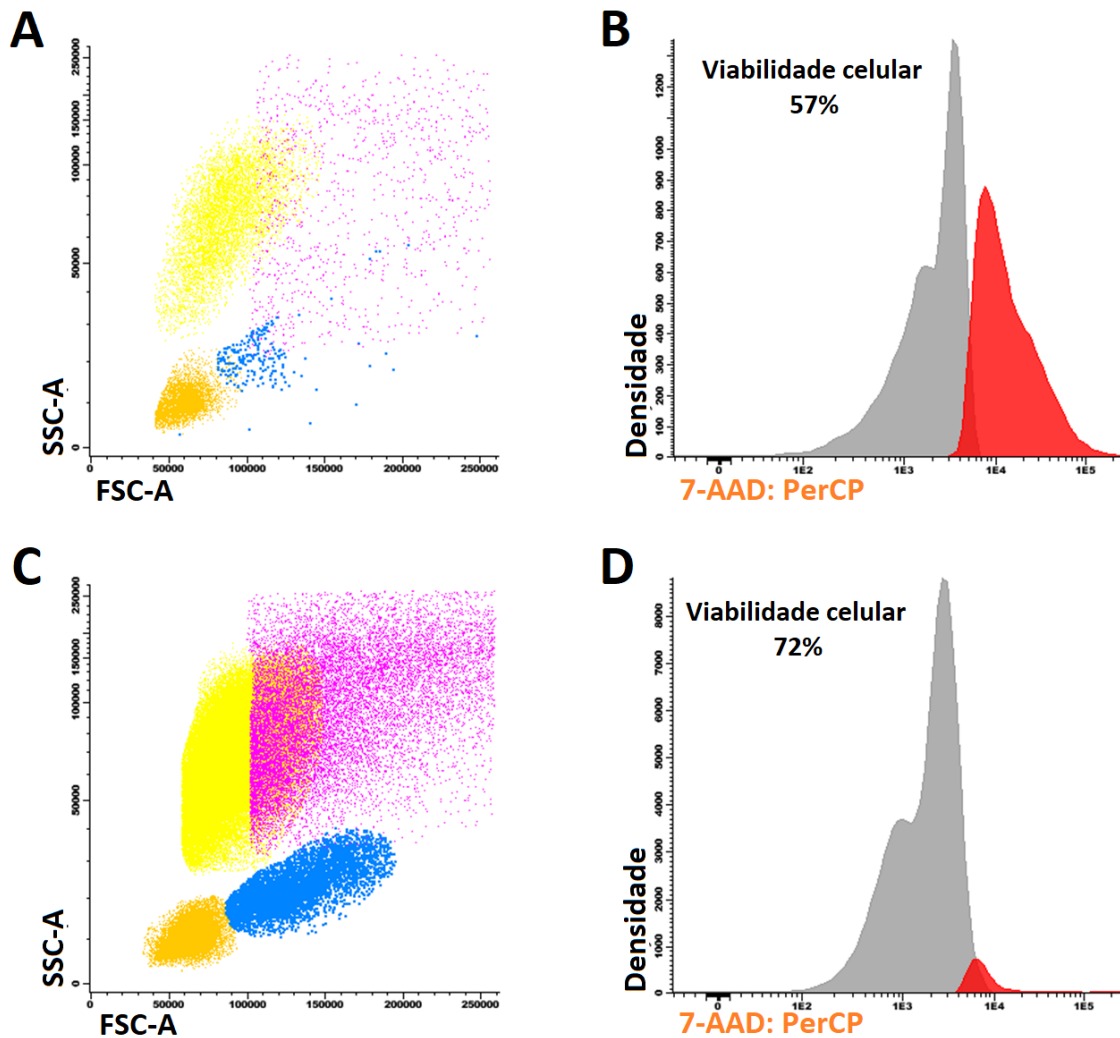


Fonte: A autora.

Nota: Painéis A e B - “Dot Plot” e histograma, respectivamente, mostrando a distribuição das populações quanto ao seu tamanho e complexidade celular e intensidade de fluorescência do marcador de viabilidade celular 7-AAD da amostra dissociada de forma mecânica. Painéis C e D - “Dot Plot” e histograma, respectivamente, mostrando a distribuição das populações quanto ao seu tamanho e complexidade celular e intensidade de fluorescência do 7-AAD da amostra dissociada com collagenase tipo II (n = 1). Em rosa as células epiteliais, em laranja, os linfócitos e, em vermelho, as células 7-AAD positivas (não viáveis).

Ao se comparar a dissociação mecânica com a dissociação com dispase II, verificou-se que a dissociação enzimática resultou em um aumento no número de eventos tanto dos leucócitos intratumorais como das células epiteliais, além de um aumento da viabilidade celular (Figura 35).

Figura 35 - Comparação da celularidade relativa e da viabilidade celular resultante de dissociação mecânica e por dispase II, por meio da avaliação do 7AAD.



Fonte: A autora.

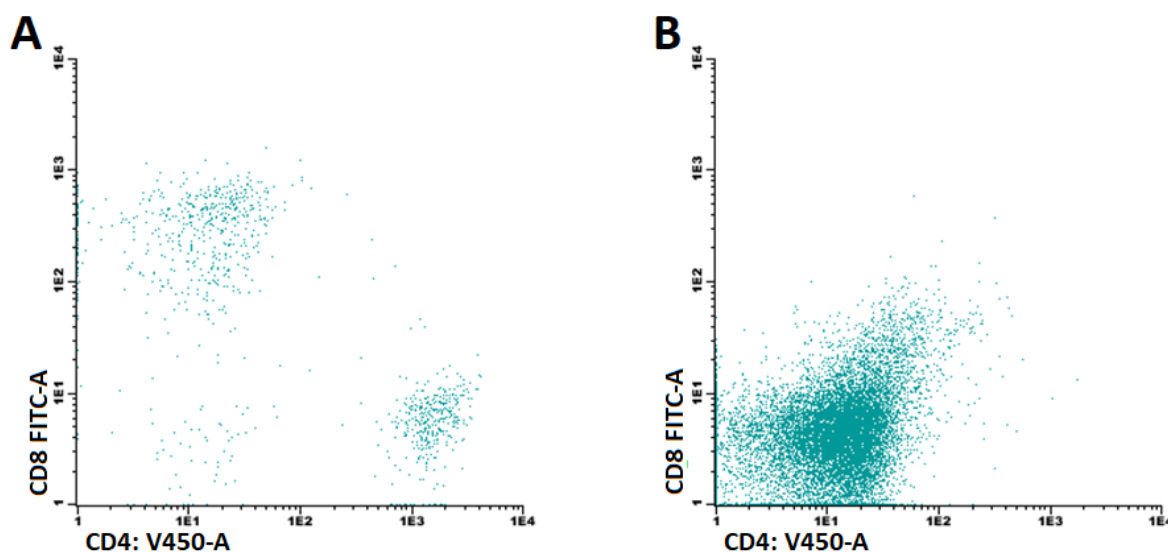
Nota: Painéis A e B - “Dot Plot” e histograma, respectivamente, mostrando a distribuição das populações quanto ao seu tamanho e complexidade celular e intensidade de fluorescência do marcador de viabilidade celular 7-AAD da amostra dissociada de forma mecânica. Painéis C e D - “Dot Plot” e histograma, respectivamente, mostrando a distribuição das populações quanto ao seu tamanho e complexidade celular e intensidade de fluorescência do 7-AAD da amostra dissociada com dispase II (n = 1). Em rosa as células epiteliais, em laranja os linfócitos, em amarelo os neutrófilos, em azul os macrófagos e em vermelho as células 7-AAD positivas (não viáveis).

A eficiência dessas enzimas também já foi avaliada em outros estudos. Volovitz e colaboradores (2016) observaram que a digestão de tecidos cerebrais com dispase aumenta a viabilidade e a qualidade celular. Happle e colaboradores (2018) observaram um aumento no número de células epiteliais alveolares em amostras de pulmão dissociadas com dispase, em comparação com amostras digeridas com collagenase. Em contrapartida, a dissociação de tecidos com dispase levou a uma diminuição do número de leucócitos e suas subpopulações, o que sugere que a enzima cliva algumas moléculas e antígenos de superfície (HAPPLE *et al.*,

2018; SKULSKA *et al.*, 2019). Por essa razão, não se deve utilizar a dispase na dissociação de amostras destinadas à avaliação dos leucócitos intratumorais.

Ao contrário dos estudos supracitados, neste estudo observou-se que a dissociação com dispase ocasionou um aumento do número de leucócitos isolados, entretanto, a detecção dos linfócitos T CD4 e CD8 foi prejudicada (Figura 36). Destaca-se que este é um resultado preliminar de apenas uma amostra analisada.

Figura 36 - Comparação da expressão dos marcadores CD4 e CD8 pelos linfócitos T (em verde) entre as amostras dissociadas mecanicamente e por dispase II.



Fonte: A autora.

Nota: “Dot Plots” mostrando a distribuição dos linfócitos T quanto aos marcadores CD4 e CD8 em amostra dissociada de forma mecânica (Painel A) e com dispase II (Painel B).

Considerando as evidências encontradas na literatura e os resultados obtidos com esse teste preliminar, optou-se pela padronização da dispase II associada a DNase para o processamento das amostras de boca com suspeita de carcinoma. Como perspectiva futura, pretende-se analisar a influência dessas enzimas na avaliação dos marcadores de câncer de boca.

5.2.7 Avaliação dos leucócitos intratumorais

O carcinoma de boca é um tumor altamente imunogênico, caracterizado por infiltração abundante de células imunes (HADLER-OLSEN; WIRSING, 2019). O crescimento do tumor primário está associado à presença dessas células imunes e as evidências atuais sugerem que a progressão do tumor e a ocorrência de metástases são influenciadas pelos constituintes do

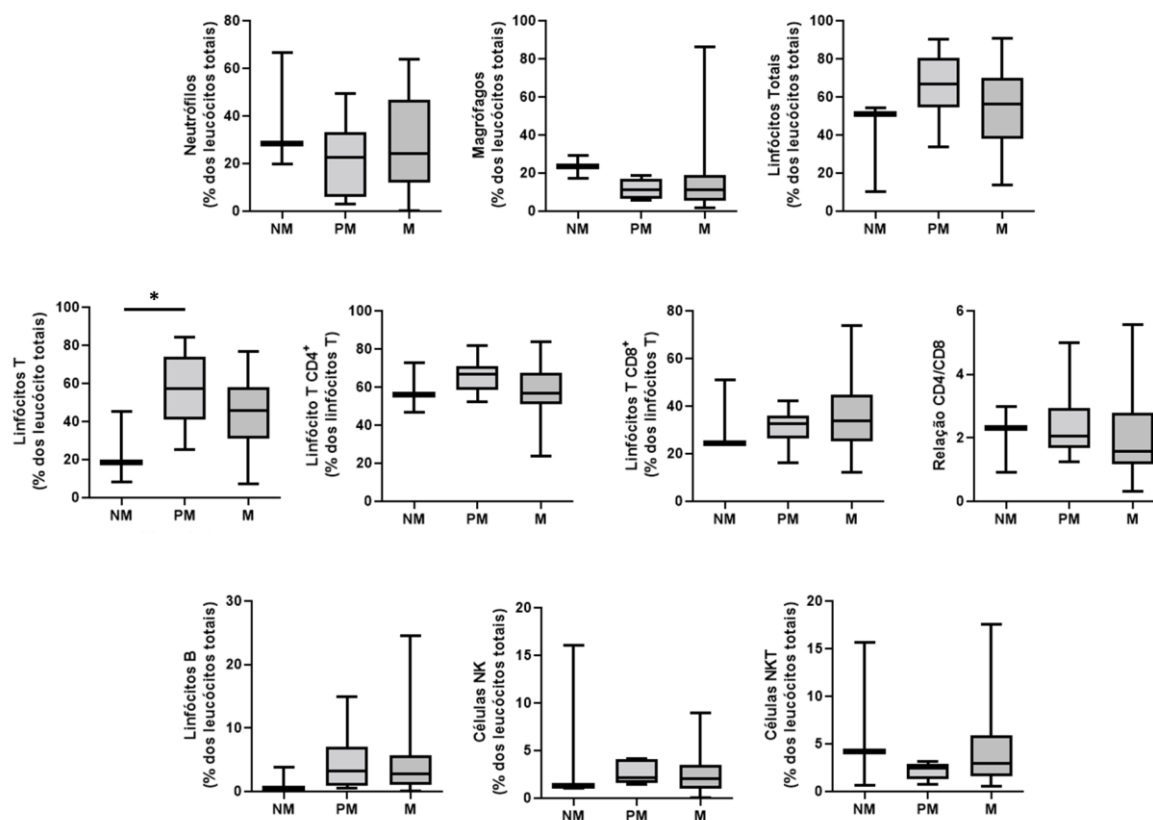
microambiente tumoral (CANNING *et al.*, 2019; PELTANOVA; RAUDENSKA; MASARIK, 2019).

Considerando o envolvimento do sistema imunológico no câncer e a necessidade de marcadores de prognóstico confiáveis para o CEC de boca, no presente estudo, foi avaliada a associação entre as várias subpopulações de leucócitos intratumorais, detectadas pela citometria de fluxo, e as características clínicas dos pacientes, incluindo diagnóstico, localização anatômica, grau histológico e presença de fatores de risco (tabagismo e consumo de álcool).

Como pode ser observado na Figura 37, na avaliação dos leucócitos nas lesões não malignas (n=3), potencialmente malignas (n=6) e malignas (n=29), houve diferença significativa apenas para os linfócitos T, que se encontravam em proporção significativamente maior nas lesões potencialmente malignas, em comparação com as lesões não malignas. Também foi observada maior frequência relativa dos linfócitos T em lesões malignas, porém não houve diferença significativa. Quando foram analisados os subtipos de linfócitos T (CD4 e CD8), não foram observadas associações com relação ao diagnóstico. Ressalta-se que o presente estudo foi delineado para analisar amostras de indivíduos com suspeita de CEC de boca, portanto, foram analisadas poucas amostras de lesões não malignas e potencialmente malignas. Adicionalmente, as amostras não malignas consistiam de lesões orais, as quais geralmente estão associadas a um processo inflamatório o que poderia justificar as poucas associações encontradas entre os subtipos de células imunes e a malignidade da amostra.

No estudo realizado por Gannot e colaboradores (2002), foi observado que as alterações patológicas graves (ou seja, displasia moderada e grave ou carcinoma) são acompanhadas por um maior número de linfócitos e macrófagos infiltrantes, em comparação com lesões com alterações mais leves (como hiperqueratose ou displasia leve). Além disso, com o aumento da transformação epitelial, observou-se uma mudança na população de células infiltrantes, que passou de células não especializadas para linfócitos T e B. No presente estudo, das seis amostras de lesões potencialmente malignas, três apresentavam displasia moderada e grave. Portanto, podem apresentar um perfil de células imune infiltrantes semelhante às amostras malignas.

Figura 37 - Celularidade relativa dos leucócitos infiltrados nas amostras, de acordo com o diagnóstico.



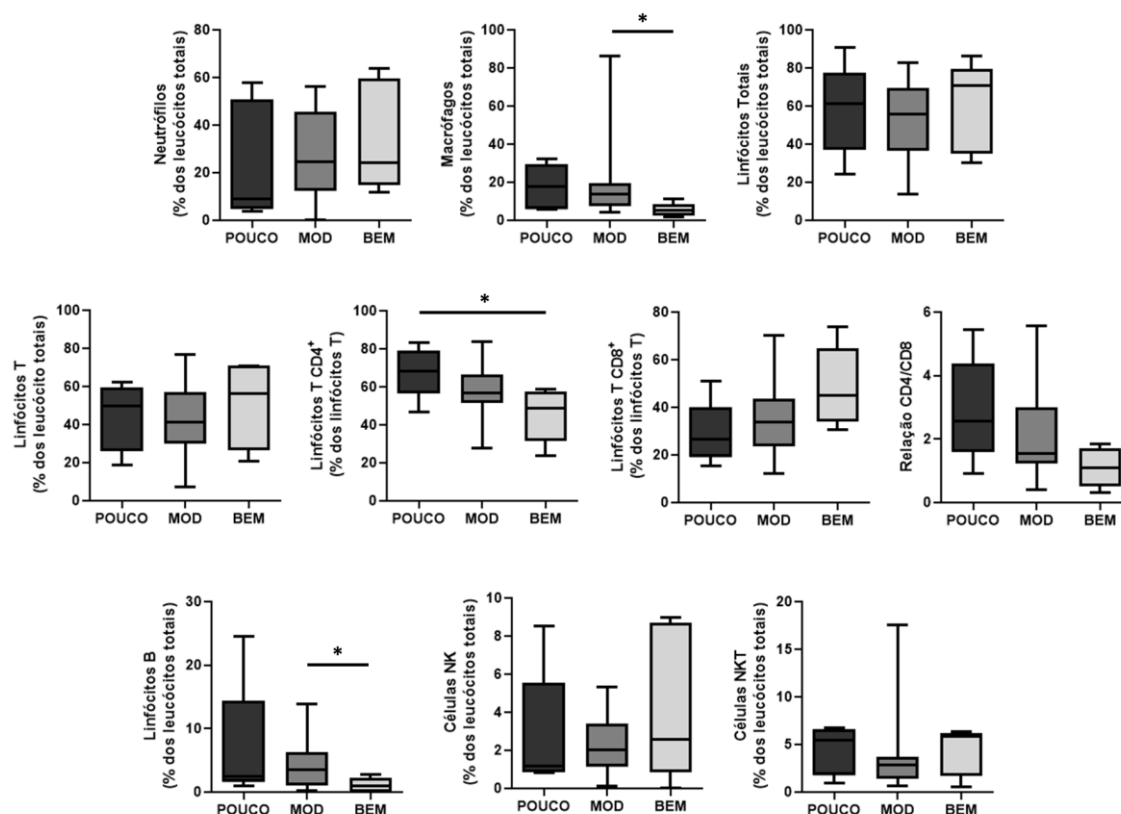
Fonte: A autora.

Nota: Valores representados como porcentagens considerando-se os leucócitos totais como 100%. Resultados de T CD4 e T CD8 expressos em porcentagem dentro dos linfócitos T. As variáveis paramétricas foram analisadas pelo teste de ANOVA seguida do Post-Hoc de Bonferroni e as variáveis não paramétricas foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis. $*p \leq 0,05$. NM: lesões não malignas (n = 3); PM: lesões potencialmente malignas (n = 6); M: lesões malignas (n = 31). Elementos dos gráficos de caixas: *whisker*: valores mínimos e máximos; linha base da caixa: primeiro quartil; linha superior da caixa: terceiro quartil; linha central da caixa: mediana ou segundo quartil.

A comparação dos tipos de leucócitos de acordo com o grau histológico (Figura 38) evidenciou um número significativamente maior de macrófagos no carcinoma moderadamente diferenciado em comparação com os tumores bem diferenciados, e uma tendência de maior número de macrófagos em tumores pouco diferenciados. Além disso, observou-se um maior número de linfócitos B em tumores moderadamente diferenciados, em comparação aos tumores bem diferenciados. A análise dos subtipos dos linfócitos T mostrou uma tendência ao aumento da frequência relativa dos linfócitos T CD4 e diminuição dos linfócitos T CD8 em tumores menos diferenciados, porém esse resultado só foi significativo para a comparação de linfócitos T CD4 em amostras pouco e bem diferenciadas. No estudo de Quan e colaboradores (2020), não foram observadas associações entre linfócitos T e B intratumorais e o grau histológico do tumor. No entanto, esse estudo avaliou os leucócitos pela metodologia de IHQ, a qual apresenta

interpretação subjetiva e não permite a avaliação quantitativa dos diferentes subtipos de linfócitos na mesma amostra (KINOSHITA *et al.*, 2016).

Figura 38 - Celularidade relativa das amostras de acordo com o grau histológico.



Fonte: A autora.

Nota: Valores representados como porcentagens considerando-se os leucócitos totais como 100%. Resultados de T CD4 e T CD8 expressos em porcentagem dentro dos linfócitos T. As variáveis paramétricas foram analisadas pelo teste de ANOVA seguida do Post-Hoc de Bonferroni e as variáveis não paramétricas foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis. $*p \leq 0,05$. POUCO: CEC pouco diferenciado (n = 6); MOD: CEC moderadamente diferenciado (n = 20); BEM: CEC bem diferenciado (n = 5). Elementos dos gráficos de caixas: *whisker*: valores mínimos e máximos; linha base da caixa: primeiro quartil; linha superior da caixa: terceiro quartil; linha central da caixa: mediana ou segundo quartil.

A gradação histológica dos tumores tem sido utilizada há décadas para avaliação prognóstica do câncer. Alguns estudos suportam a hipótese de que a transição epitelial-mesenquimal (EMT) seja um dos mecanismos envolvidos nesse processo de diferenciação tumoral. Embora a perda da identidade e função celular seja intrínseca ao processo maligno, durante a progressão do tumor as células tumorais são expostas a diversas moléculas de sinalização secretadas pelas células do microambiente tumoral, como fatores de crescimento, citocinas, quimiocinas e hormônios, as quais ativam uma vasta gama de vias de sinalização que facilitam vários aspectos da progressão do câncer, incluindo a diferenciação tumoral (BHAT *et al.*, 2021; JÖGI *et al.*, 2012; YUAN; NORGDARD; STANGER, 2019).

Macrófagos associados a tumores têm sido implicados no desenvolvimento e progressão do câncer, influenciando a angiogênese, invasão e metástases, e estão associados a um mau prognóstico em pacientes com câncer de cavidade oral (WOLF *et al.*, 2015). Um estudo conduzido por Gao e colaboradores (2018) demonstrou que os macrófagos são cruciais para a indução da EMT em células de CECCP, por meio da secreção de EGF e TGF- β e ativação da via de sinalização EGFR/ERK1/2. Dessa forma, a sua maior frequência relativa em tumores moderadamente e pouco diferenciados pode estar relacionada à menor diferenciação destes tumores.

A presença de linfócitos intratumorais já foi estabelecida como um fator prognóstico em diferentes tipos de câncer. No entanto, diferentes subconjuntos de linfócitos têm funções diferentes ou mesmo opostas no microambiente tumoral. Os linfócitos T CD8 têm a capacidade de destruir diretamente as células tumorais através da ligação às moléculas MHC classe I e sua presença no microambiente tumoral foi associada com melhor prognóstico em tumores de cabeça e pescoço. A função das células T CD4 não é clara, pois existe uma ampla gama de subconjuntos de células CD4 com diferentes funções. As células Th1 promovem a resposta imune antitumoral ao estimular as células T citotóxicas. Por outro lado, as células Tregs estão envolvidas na manutenção da tolerância imunológica e, portanto, são consideradas supressoras da resposta imune antitumoral. Dessa forma, a avaliação das células T CD4 no CECCP possui prognóstico inconclusivo (DE RUITER *et al.*, 2017)

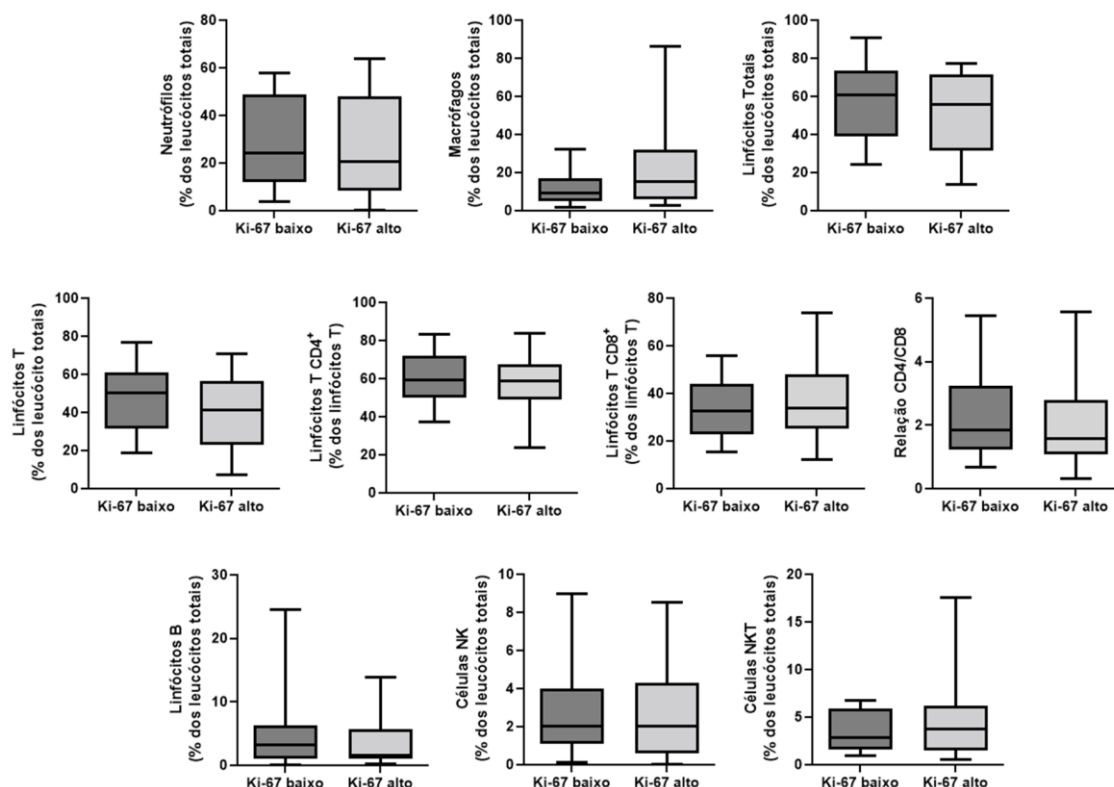
Uma forte associação entre presença de linfócitos T CD8 e carcinomas bem diferenciados já foi demonstrada, por avaliação IHQ, em outros dois estudos (MONTALLI *et al.*, 2018; SALES DE SÁ *et al.*, 2020). Esses dados estão em acordo com os obtidos neste estudo, visto que os tumores bem diferenciados, que geralmente apresentam um bom prognóstico, demonstraram uma maior frequência relativa de linfócitos T CD8, apesar de não ter apresentado significância estatística. Em contrapartida, no estudo de Wolf e colaboradores (2015), foram observados baixos números de linfócitos T CD4 e uma baixa razão CD4/CD8 em tumores pouco diferenciados.

Ao contrário das células T, as células B intratumorais foram analisadas em poucos estudos de CECCP e apresentou resultados ambíguos com relação ao prognóstico dos pacientes (HADLER-OLSEN; WIRSING, 2019; SUÁREZ-SÁNCHEZ *et al.*, 2021). No estudo de Distel e colaboradores (2009), linfócitos B intratumorais foram associados a um desfecho favorável em tumores em estágio inicial, em contrapartida, existe uma correlação inversa no estágio avançado. Segundo os autores, essa diferença pode ser explicada pelo alto grau de plasticidade na função e composição das células B no decorrer da doença. Linfócitos B podem suprimir a

progressão do tumor por meio da secreção de imunoglobulinas, ativação das células T e citotoxicidade mediada por granzima B. Por outro lado, podem apresentar função pró-tumoral por meio da secreção de citocinas imunossupressoras como IL10 e TGF- β (TOKUNAGA *et al.*, 2019). Em contrapartida, Lechner e colaboradores (2019) não observaram diferenças nos subconjuntos de linfócitos B em relação ao estadiamento da doença. Assim, mais estudos são necessários para determinar o mecanismo pelo qual os linfócitos B influenciam no prognóstico de pacientes com CECCP e qual a sua relação com o grau histológico dos tumores de boca.

Atualmente já está bem estabelecido que as células tumorais possuem mecanismos que as permitem reprogramar os leucócitos do microambiente tumoral de forma a criar um microambiente favorável à proliferação do tumor. Um dos mecanismos é pelo estímulo à secreção de citocinas pró-inflamatórias que regulam a expressão de genes responsáveis pela proliferação celular. As células tumorais dependem dessas citocinas para o seu crescimento, assim os leucócitos infiltrantes são programados de forma a liberar continuamente tais mediadores (BHAT *et al.*, 2021; WHITESIDE, 2008). Como pode ser observado na Figura 39, a atividade proliferativa do tumor, determinada pela expressão de Ki-67, não apresentou associação com a presença de leucócitos intratumorais no presente estudo. Assim como não foram localizados estudos prévios que avaliassem a influência da proliferação tumoral sobre os leucócitos intratumorais.

Figura 39 - Celularidade relativa das amostras de acordo com a expressão de Ki-67.

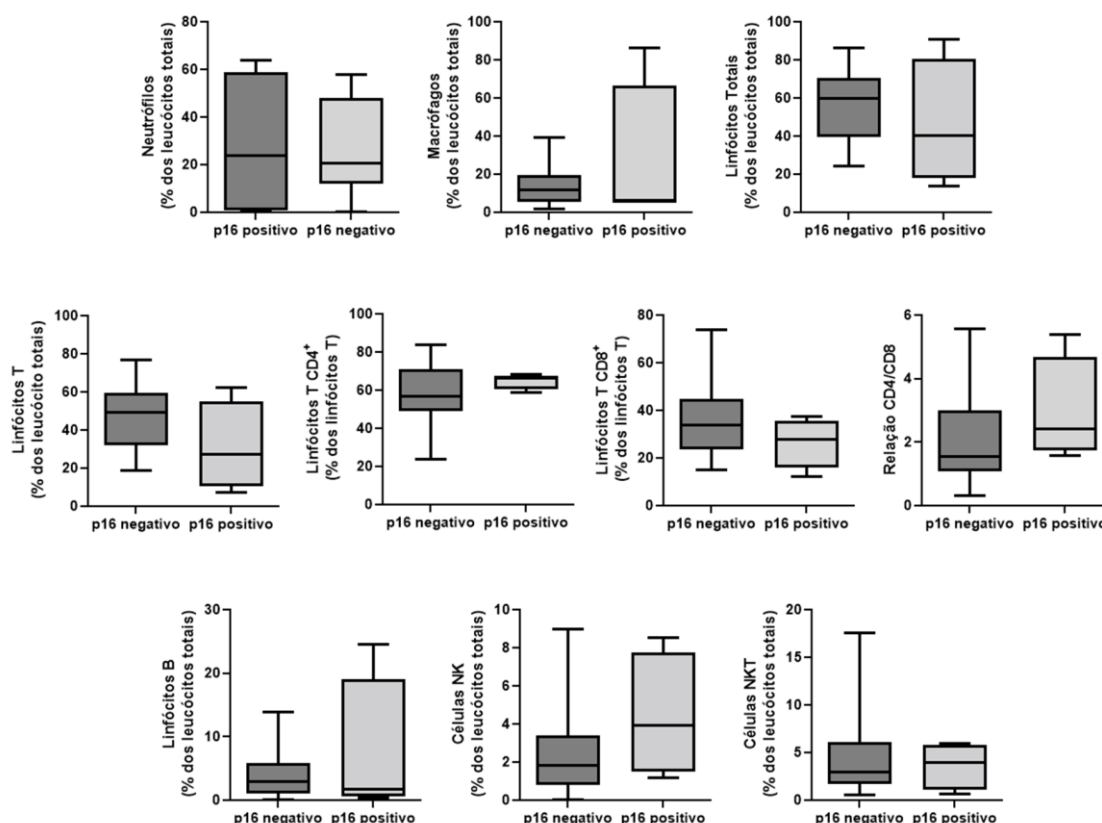


Fonte: A autora.

Nota: Valores representados como porcentagens considerando-se os leucócitos totais como 100%. Resultados de T CD4 e T CD8 expressos em porcentagem dentro dos linfócitos T. Foi considerado Ki-67 baixo a expressão em $\leq 50\%$ das células ($n = 14$) e Ki-67 alto a expressão em $> 50\%$ das células ($n = 13$). As variáveis paramétricas foram analisadas pelo teste de ANOVA seguida do Post-Hoc de Bonferroni e as variáveis não paramétricas foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis. Elementos dos gráficos de caixas: *whisker*: valores mínimos e máximos; linha base da caixa: primeiro quartil; linha superior da caixa: terceiro quartil; linha central da caixa: mediana ou segundo quartil.

Evidências sugerem que o panorama imunológico de tumores HPV-positivos difere de tumores de HPV-negativos (CANNING *et al.*, 2019). Tumores de cabeça e pescoço HPV positivos possuem uma maior infiltração de células imunes e células T, em comparação com os tumores HPV negativos (MANDAL *et al.*, 2016) e, altos números de linfócitos T CD8 já foram associados a uma maior sobrevida em tumores de orofaringe HPV positivos e negativos, enquanto os linfócitos T CD4 apresentaram resultados controversos com o desfecho clínico em amostras HPV positivas (DE RUITER *et al.*, 2017; NORDFORS *et al.*, 2013). No presente estudo, destaca-se que foram avaliadas amostras de boca e orofaringe, diferentemente dos outros estudos, e apenas quatro tumores apresentaram expressão IHQ de p16 de intensidade forte a moderada em mais de 70% das células e, assim como no estudo de Wolf e colaboradores (2015), não houve associação entre a expressão de p16 e os valores dos leucócitos intratumorais no presente estudo (**Erro! Fonte de referência não encontrada.**)

Figura 40 - Celularidade relativa das amostras de acordo com a expressão de p16 (n = 27).

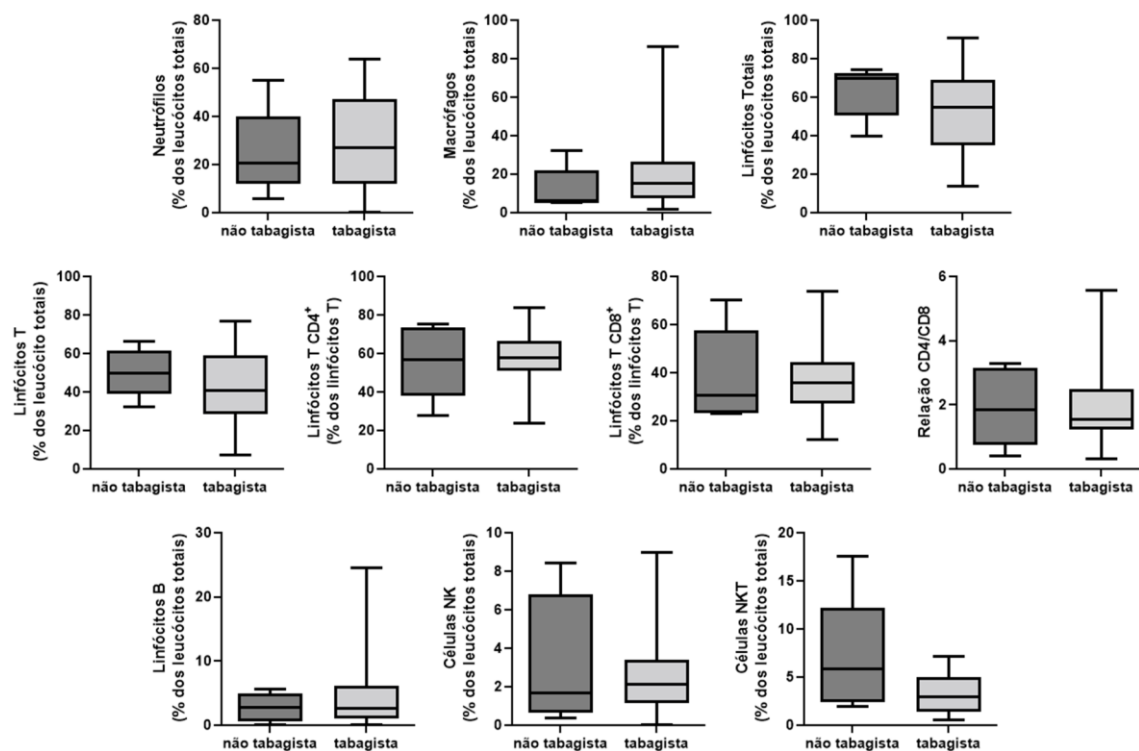


Fonte: A autora.

Nota: Valores representados como porcentagens considerando-se os leucócitos totais como 100%. Resultados de T CD4 e T CD8 expressos em porcentagem dentro dos linfócitos T. As variáveis paramétricas foram analisadas pelo teste de ANOVA seguida do Post-Hoc de Bonferroni e as variáveis não paramétricas foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis. Elementos dos gráficos de caixas: *whisker*: valores mínimos e máximos; linha base da caixa: primeiro quartil; linha superior da caixa: terceiro quartil; linha central da caixa: mediana ou segundo quartil. Foram consideradas amostras p16 positivas quando houve expressão moderada a forte em mais de 70% das células neoplásicas avaliadas por imuno-histoquímica (n = 4).

Também não foram observadas associações entre os leucócitos intratumorais e a história prévia de tabagismo (Figura 41). Esses resultados corroboram os obtidos por Quan e colaboradores (2020), que também não observaram associações entre os linfócitos intratumorais e os fatores de risco tabagismo e etilismo. No entanto, no presente estudo, observou-se uma maior frequência relativa de neutrófilos em amostras de pacientes com história de etilismo (Figura 42). Não existem evidências disponíveis na literatura sobre a relação do efeito do consumo de álcool e a presença de polimorfonucleares no microambiente tumoral, porém já foi reportada uma correlação entre a concentração sanguínea da gama-glutamil transferase (como uma medida do consumo de álcool) com o comprometimento da função dos neutrófilos circulantes (DOMNICH *et al.*, 2020; KHOCHT *et al.*, 2013).

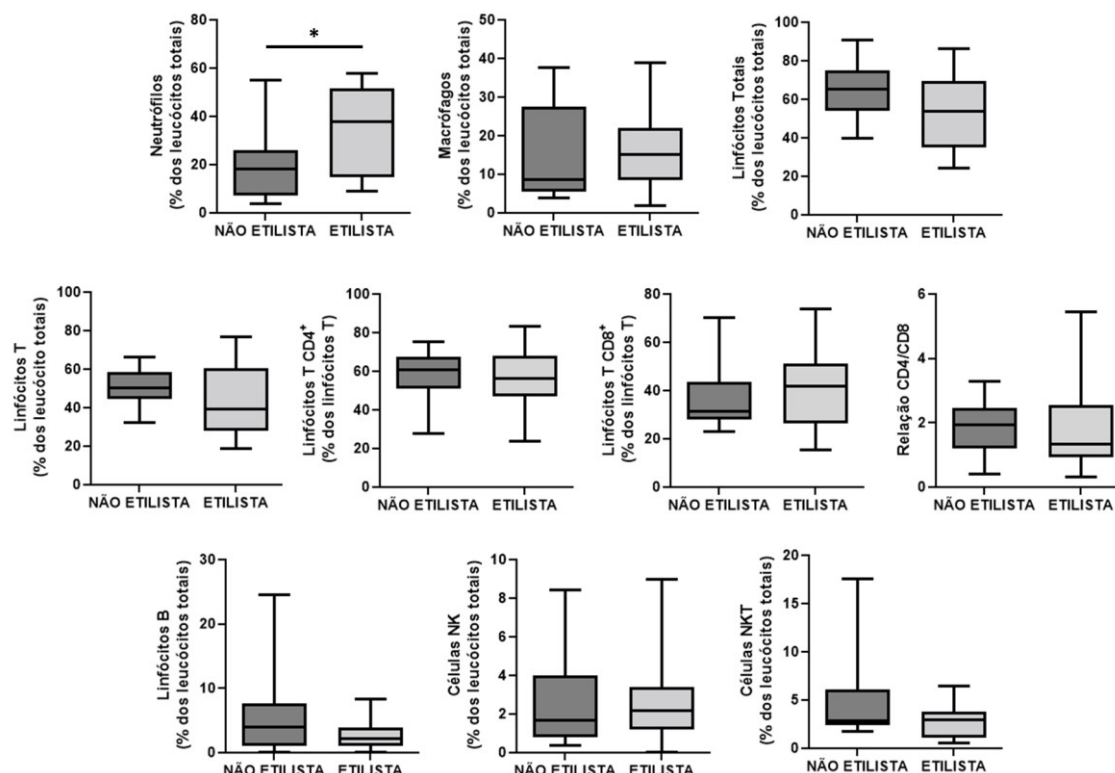
Figura 41 - Celularidade relativa das amostras de acordo com a história prévia de tabagismo.



Fonte: A autora.

Nota: Valores representados como porcentagens considerando-se os leucócitos totais como 100%. Resultados de T CD4 e T CD8 expressos em porcentagem dentro dos linfócitos T. As variáveis paramétricas foram analisadas pelo teste de ANOVA seguida do Post-Hoc de Bonferroni e as variáveis não paramétricas foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis. Elementos dos gráficos de caixas: *whisker*: valores mínimos e máximos; linha base da caixa: primeiro quartil; linha superior da caixa: terceiro quartil; linha central da caixa: mediana ou segundo quartil. Tabagistas n = 24 e não tabagistas n = 5.

Figura 42 - Celularidade relativa das amostras de acordo com a história prévia de etilismo.



Fonte: A autora.

Nota: Valores representados como porcentagens considerando-se os leucócitos totais como 100%. Resultados de T CD4 e T CD8 expressos em porcentagem dentro dos linfócitos T. As variáveis paramétricas foram analisadas pelo teste de ANOVA seguida do Post-Hoc de Bonferroni e as variáveis não paramétricas foram analisadas pelo teste de Kruskal-Wallis. Elementos dos gráficos de caixas: *whisker*: valores mínimos e máximos; linha base da caixa: primeiro quartil; linha superior da caixa: terceiro quartil; linha central da caixa: mediana ou segundo quartil. Não etilista (n = 10) e etilista (n = 14).

Embora estudos anteriores tenham mostrado que a infiltração de leucócitos, principalmente os linfócitos T, está presente no CEC de boca e pode se correlacionar com as características clínicas dos tumores, seu papel na carcinogênese oral e progressão tumoral ainda é incerto. Poucos estudos avaliaram todos os leucócitos analisados no presente estudo. A maioria dos estudos realizou a avaliação pela metodologia de IHQ e focou nos macrófagos e linfócitos T CD4 e TCD8. Portanto, é necessário que se realize uma caracterização abrangente do repertório de leucócitos intratumorais para elucidar o seu valor prognóstico potencial no câncer de boca. Nesse sentido, a citometria de fluxo pode se mostrar um grande aliado para avaliação dos leucócitos intratumorais, pois é uma metodologia bem estabelecida na avaliação de células hematológicas, e permite a avaliação de diversos marcadores leucocitários simultaneamente, de forma segura e rápida.

6 CONCLUSÕES E PERSPECTIVAS FUTURAS

Os resultados encontrados neste estudo permitem concluir que:

a) Aproximadamente 90% das neoplasias de boca analisadas na ULAP/HU/UFSC/EBSERH, no período de 2013 a 2018, foram CEC. O perfil epidemiológico mostrou que o câncer de boca acometeu principalmente indivíduos do sexo masculino, brancos, na quinta década de vida. E a maioria dos indivíduos relatou história de tabagismo e etilismo. Na amostra estudada, o lábio foi a região mais acometida pelo CEC, contabilizando 32,19% dos casos. A maioria dos pacientes com tumores labiais observou a presença de lesão que não cicatriza, todavia, levaram em média 22,5 meses para buscar atendimento médico/odontológico. Apesar dessa demora, a maioria dos tumores foi diagnosticada em estádios iniciais (I e II). Os pacientes com tumores de cavidade oral e orofaringe demoraram cerca de cinco meses após a percepção dos primeiros sintomas para buscar atendimento e aproximadamente metade desses tumores foram diagnosticados em estádios tardios (III e IV), que geralmente estão associados a um mau prognóstico.

b) A avaliação imunofenotípica do marcador p16 por citometria de fluxo mostrou uma concordância razoável quando comparada à imuno-histoquímica. A metodologia parece ser mais eficaz em identificar amostras com forte intensidade de expressão do marcador. No entanto, mais estudos são necessários para avaliar a eficácia dessa metodologia em amostras fortemente positivas para p16.

c) A avaliação imunofenotípica do marcador p53 por citometria de fluxo mostrou alta sensibilidade e concordância moderada, quando comparada à imuno-histoquímica. No entanto, apresentou baixa especificidade, provavelmente devido ao baixo número de amostras negativas avaliadas.

d) A avaliação da expressão do marcador Ki-67 por citometria de fluxo mostrou-se comparável à avaliação imuno-histoquímica, o que a torna uma metodologia alternativa promissora na avaliação das amostras, especialmente por apresentar menor viés observacional;

e) A análise dos infiltrados imunes intratumorais mostrou-se plenamente factível com o auxílio da citometria de fluxo. Embora tenham sido observadas poucas correlações entre as variáveis estudadas, acredita-se que a detecção dessas células infiltradas por meio da citometria de fluxo poderá auxiliar na determinação do valor prognóstico do perfil imune nos casos de câncer de boca, visto que pela avaliação morfológica não há possibilidade de diferenciar as células linfóides.

Por fim, existe uma clara necessidade de aprimoramento dessa metodologia para a análise de tumores sólidos, como o câncer de boca. Portanto, como perspectivas futuras pretende-se: i) padronizar a digestão enzimática dos tecidos, para obtenção de um maior número de células viáveis; ii) avaliar um maior número de amostras positivas para p16 e negativas para p53, visando a determinação de pontos de corte mais fidedigno, e o aumento de sensibilidade e especificidade da metodologia; iii) avaliar a presença dos diferentes subtipos de linfócitos T CD4+ e macrófagos e sua relação com o prognóstico do paciente.

REFERÊNCIAS

- ABBEY, L. M. *et al.* Intraexaminer and interexaminer reliability in the diagnosis of oral epithelial dysplasia. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 80, n. 2, p. 188-191, 1995.
- ACHA, A. *et al.* Aplicaciones de la citología oral por raspado (exfoliativa) en el cáncer y precáncer oral. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 10, n. 2, p. 95-102, 2005.
- ÁCS, B. *et al.* Reproducibility and prognostic potential of Ki-67 proliferation index when comparing digital-image analysis with standard semi-quantitative evaluation in breast cancer. **Pathology & Oncology Research**, v. 24, n. 1, p. 115-127, 2018.
- ALAMOUD, K. A.; KUKURUZINSKA, M. A. Emerging insights into Wnt/ β -catenin signaling in head and neck cancer. **Journal of Dental Research**, v. 97, n. 6, p. 665-673, 2018.
- ALMANGUSH, A. *et al.* Prognostic biomarkers for oral tongue squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. **British Journal of Cancer**, v. 117, n. 6, p. 856-866, 2017.
- AMIN, M. B.; EDGE, S. B., Eds. **AJCC cancer staging manual**. New York: Springer, 8th ed. 2017.
- AMINUDDIN, A.; NG, P. Y. Promising druggable target in head and neck squamous cell carcinoma: Wnt signaling. **Frontiers in Pharmacology**, v. 7, n. 244, p. 1-13, 2016.
Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC4982242/pdf/fphar-07-00244.pdf>.
- ANDRADE, J. O. M.; SANTOS, C. A. S. T.; OLIVEIRA, M. C. Fatores associados ao câncer de boca: um estudo de caso-controle em uma população do Nordeste do Brasil. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 18, p. 894-905, 2015.
- ANDREOTTI, M. *et al.* Ocupação e câncer da cavidade oral e orofaringe. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 22, p. 543-552, 2006.
- ANJOS HORA, I. A. *et al.* Estudo epidemiológico do carcinoma epidermóide de boca no estado de Sergipe. **Brazilian Dental Science**, v. 6, n. 2, p. 41-48, 2003.
- AQUINO, R. C. A. *et al.* Aspectos epidemiológicos da mortalidade por câncer de boca: conhecendo os riscos para possibilitar a detecção precoce das alterações na comunicação. **Revista CEFAC**, v. 17, n. 4, p. 1254-1261, 2015.
- ARNETH, B. Tumor microenvironment. **Medicina**, v. 56, n. 15, p. 1-21, 2020.
- ASTHANA, S.; VOHRA, P.; LABANI, S. Association of smokeless tobacco with oral cancer: A review of systematic reviews. v. 5, n. 34, p. 1-12, 2019.

BAE, E.-A. *et al.* Roles of NKT cells in cancer immunotherapy. **Archives of pharmacal research**, v. 42, n. 7, p. 543-548, 2019.

BATISTA, A. C. *et al.* Distinctive clinical and microscopic features of squamous cell carcinoma of oral cavity and lip. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontology**, v. 109, n. 3, p. e74-e79, 2010. Disponível em: <https://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S1079210409008208?via%3Dihub>.

BATTY, P.; GERLICH, D. W. Mitotic chromosome mechanics: how cells segregate their genome. **Trends in cell biology**, v. 29, n. 9, p. 717-726, 2019.

BERKOVITZ, B. K.; HOLLAND, G. R.; MOXHAM, B. J. **Oral Anatomy, Histology and Embryology**. 5th. Amsterdam, The Netherlands: Elsevier Health Sciences, 2017.

BHAT, A. A. *et al.* Tumor microenvironment: an evil nexus promoting aggressive head and neck squamous cell carcinoma and avenue for targeted therapy. **Signal Transduction and Targeted Therapy**, v. 6, n. 1, p. 1-15, 2021.

BIASOLI, É. R. *et al.* Lip cancer: a clinicopathological study and treatment outcomes in a 25-year experience. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 74, n. 7, p. 1360-1367, 2016.

BLATT, S. *et al.* Biomarkers in diagnosis and therapy of oral squamous cell carcinoma: a review of the literature. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 45, n. 5, p. 722-730, 2017.

BLOOR, B.; SEDDON, S.; MORGAN, P. Gene expression of differentiation-specific keratins in oral epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma. **Oral oncology**, v. 37, n. 3, p. 251-261, 2001.

BLOT, W. J. *et al.* Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. **Cancer Research**, v. 48, n. 11, p. 3282-3287, 1988. Disponível em: <http://cancerres.aacrjournals.org/content/canres/48/11/3282.full.pdf>.

BONFANTE, G. M. S. *et al.* Sobrevida de cinco anos e fatores associados ao câncer de boca para pacientes em tratamento oncológico ambulatorial pelo Sistema Único de Saúde, Brasil. **Cadernos de Saúde Pública**, v. 30, p. 983-997, 2014.

BOSE, P.; BROCKTON, N. T.; DORT, J. C. Head and neck cancer: from anatomy to biology. **International Journal of Cancer**, v. 133, n. 9, p. 2013-2023, 2013.

BOUVARD, V. *et al.* A review of human carcinogens—Part B: biological agents. **The Lancet Oncology**, v. 10, n. 4, p. 321-322, 2009.

BRASIL. Portaria nº 516, de 17 de junho de 2015. Aprova as Diretrizes Diagnósticas e Terapêuticas do Câncer de Cabeça e Pescoço. **Diário Oficial da União**, 2015.

BROTHWELL, D. J. *et al.* Observer agreement in the grading of oral epithelial dysplasia. **Community dentistry and oral epidemiology**, v. 31, n. 4, p. 300-305, 2003.

- BROWN, L. M. *et al.* Exposures in the painting trades and paint manufacturing industry and risk of cancer among men and women in Sweden. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, v. 44, n. 3, p. 258-264, 2002.
- BRUNI, D.; ANGELL, H. K.; GALON, J. The immune contexture and Immunoscore in cancer prognosis and therapeutic efficacy. **Nature Reviews Cancer**, v. 20, n. 11, p. 662-680, 2020.
- BRYNE, M. Prognostic value of various molecular and cellular features in oral squamous cell carcinomas: a review. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 20, n. 9, p. 413-420, 1991.
- BUONOCORE, D. J. *et al.* Cytologic evaluation of p16 staining in head and neck squamous cell carcinoma in CytoLyt versus formalin-fixed material. **Cancer cytopathology**, v. 127, n. 12, p. 750-756, 2019.
- CANCELA, M. C. *et al.* Oral cavity cancer in developed and in developing countries: Population-based incidence. **Head & Neck: Journal for the Sciences and Specialties of the Head and Neck**, v. 32, n. 3, p. 357-367, 2010.
- CANCER GENOME ATLAS NETWORK. Comprehensive genomic characterization of head and neck squamous cell carcinomas. **Nature**, v. 517, n. 7536, p. 576-582, 2015.
- CANNING, M. *et al.* Heterogeneity of the head and neck squamous cell carcinoma immune landscape and its impact on immunotherapy. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 7, p. 52, 2019.
- CARRERAS-TORRAS, C.; GAY-ESCODA, C. Techniques for early diagnosis of oral squamous cell carcinoma: Systematic review. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 20, n. 3, p. e305-e315, 2015.
- CHANG, Q.; HEDLEY, D. Emerging applications of flow cytometry in solid tumor biology. **Methods**, v. 57, n. 3, p. 359-367, 2012.
- CHINN, S. B.; MYERS, J. N. Oral cavity carcinoma: current management, controversies, and future directions. **Journal of Clinical Oncology**, v. 33, n. 29, p. 3269-3276, 2015.
Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5320919/pdf/zlj3269.pdf>.
- CHOW, L. Q. Head and neck cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 382, n. 1, p. 60-72, 2020.
- CONWAY, D. I.; PURKAYASTHA, M.; CHESTNUTT, I. G. The changing epidemiology of oral cancer: definitions, trends, and risk factors. **British Dental Journal**, v. 225, n. 9, p. 867-873, 2018.
- CORVER, W. E.; CORNELISSE, C. J. Flow cytometry of human solid tumours: clinical and research applications. **Current Diagnostic Pathology**, v. 8, n. 4, p. 249-267, 2002.
- CRAMER, J. D. *et al.* The changing therapeutic landscape of head and neck cancer. **Nature reviews Clinical oncology**, v. 16, n. 11, p. 669-683, 2019.

CUNNINGHAM, R. E. Tissue disaggregation. In: OLIVER, C. e JAMUR, M. C. (Ed.). **Immunocytochemical Methods and Protocols**. 3rd. Totowa, NJ: Humana Press, 2010. cap. 32, p.327-330.

CURADO, M. P. *et al.* Oral and oropharynx cancer in South America: Incidence, mortality trends and gaps in public databases as presented to the Global Oral Cancer Forum. **Translational Research in Oral Oncology**, v. 1, p. 1-7, 2016.

D'SOUZA, G. *et al.* Sex Differences in Risk Factors and Natural History of Oral Human Papillomavirus Infection. **The Journal of Infectious Diseases**, v. 213, n. 12, p. 1893-1896, 2016. Disponível em: <https://doi.org/10.1093/infdis/jiw063>. Acesso em: 12/21/2021.

DABBS, D. J. **Diagnostic immunohistochemistry: theranostic and genomic application**. 4th ed. Philadelphia: Elsevier, 2013. 960 p.

DAY, G. L. *et al.* Racial differences in risk of oral and pharyngeal cancer: alcohol, tobacco, and other determinants. **JNCI: Journal of the National Cancer Institute**, v. 85, n. 6, p. 465-473, 1993.

DE ANGELIS, R. *et al.* Cancer survival in Europe 1999–2007 by country and age: results of EUROCORE-5—a population-based study. **The Lancet Oncology**, v. 15, n. 1, p. 23-34, 2014.

DE FELICE, F. *et al.* Multidisciplinary team in head and neck cancer: a management model. **Medical Oncology**, v. 36, n. 1, p. 1-6, 2019.

DE RUITER, E. J. *et al.* The prognostic role of tumor infiltrating T-lymphocytes in squamous cell carcinoma of the head and neck: A systematic review and meta-analysis. **Oncoimmunology**, v. 6, n. 11, p. e1356148, 2017.

DEDIVITIS, R. A. *et al.* Características clínico-epidemiológicas no carcinoma espinocelular de boca e orofaringe. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 70, n. 1, p. 35-40, 2004.

DEL CORSO, G. *et al.* Current trends in oral cancer: A review. **Cancer Cell & Microenvironment** v. 3, p. 1-11, 2016.

DENARO, N.; RUSSI, E. G.; MERLANO, M. C. Pros and cons of the new edition of TNM classification of head and neck squamous cell carcinoma. **Oncology**, v. 95, n. 4, p. 202-210, 2018.

DEPONDY, J. *et al.* Cytokeratin alterations as diagnostic and prognostic markers of oral and pharyngeal carcinomas. A prospective study. **European journal of oral sciences**, v. 107, n. 6, p. 442-454, 1999.

DHURIA, R. *et al.* p53 Immunoexpression as a Prognostic Indicator of Survival in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. 2020.

DIAS, E. P. *et al.* A novel evaluation method for Ki-67 immunostaining in paraffin-embedded tissues. **Virchows Archiv**, p. 1-11, 2021.

DISTEL, L. V. *et al.* Tumour infiltrating lymphocytes in squamous cell carcinoma of the oro- and hypopharynx: prognostic impact may depend on type of treatment and stage of disease. **Oral oncology**, v. 45, n. 10, p. e167-e174, 2009.

DOMNICH, M. *et al.* Oral Neutrophils: Underestimated Players in Oral Cancer. **Frontiers in Immunology**, v. 11, p. 2529, 2020.

DONNENBERG, V. S.; DONNENBERG, A. D. Flow cytometry on disaggregated solid tissues. **International Journal of Drug Discovery**, v. 6, p. 14-18, 2011.

DRAKE, V. E. *et al.* Timing, number, and type of sexual partners associated with risk of oropharyngeal cancer. **Cancer**, v. 127, n. 7, p. 1029-1038, 2021.

EDGE, S. B. *et al.*, Eds. **AJCC cancer staging manual**. New York: Springer, 7th ed. 2010.

EPSTEIN, J. B. *et al.* The limitations of the clinical oral examination in detecting dysplastic oral lesions and oral squamous cell carcinoma. **The Journal of the American Dental Association**, v. 143, n. 12, p. 1332-1342, 2012.

EPSTEIN, J. B.; ZHANG, L.; ROSIN, M. Advances in the diagnosis of oral premalignant and malignant lesions. **Journal-Canadian Dental Association**, v. 68, n. 10, p. 617-621, 2002.

FARAH, C. S. *et al.* Aetiology of oral cavity cancer. In: KURIAKOSE, M. A. (Ed.). **Contemporary Oral Oncology**: Springer, 2017. cap. 2, p.31-76.

FARAJI, F. *et al.* Molecular mechanisms of human papillomavirus-related carcinogenesis in head and neck cancer. **Microbes and Infection**, v. 19, n. 9-10, p. 464-475, 2017.

FLACH, S.; MANIAM, P.; MANICKAVASAGAM, J. E-cigarettes and head and neck cancers: A systematic review of the current literature. **Clinical Otolaryngology**, v. 44, p. 749-756, 2019.

FOSSUM, C. C. *et al.* Characterization of the oropharynx: anatomy, histology, immunology, squamous cell carcinoma and surgical resection. **Histopathology**, v. 70, n. 7, p. 1021-1029, 2017.

FRIEDRICH, R. E. Delay in diagnosis and referral patterns of 646 patients with oral and maxillofacial cancer: a report from a single institution in Hamburg, Germany. **Anticancer Research**, v. 30, n. 5, p. 1833-1836, 2010.

FROHWITTER, G. *et al.* Cytokeratin and protein expression patterns in squamous cell carcinoma of the oral cavity provide evidence for two distinct pathogenetic pathways. **Oncology Letters**, v. 12, n. 1, p. 107-113, 2016.

FURNESS, S. *et al.* Interventions for the treatment of oral cavity and oropharyngeal cancer: chemotherapy. **Cochrane Database of Systematic Reviews**, n. 9, 2010. Disponível em: <https://doi.org/10.1002/14651858.CD006386.pub2>.

GALVIS, M. M. *et al.* Expression of cell cycle proteins according to HPV status in oral squamous cell carcinoma affecting young patients: a pilot study. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 125, n. 4, p. 317-325, 2018.

GANNOT, G. *et al.* Increase in immune cell infiltration with progression of oral epithelium from hyperkeratosis to dysplasia and carcinoma. **British journal of cancer**, v. 86, n. 9, p. 1444-1448, 2002.

GAO, L. *et al.* Tumor associated macrophages induce epithelial to mesenchymal transition via the EGFR/ERK1/2 pathway in head and neck squamous cell carcinoma. **Oncology reports**, v. 40, n. 5, p. 2558-2572, 2018.

GENDEN, E. M. *et al.* Contemporary management of cancer of the oral cavity. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v. 267, n. 7, p. 1001-1017, 2010.

GIRALDO, N. A. *et al.* Integrating histopathology, immune biomarkers, and molecular subgroups in solid cancer: the next step in precision oncology. **Virchows Archiv**, v. 474, n. 4, p. 463-474, 2019.

GÓMEZ, I. *et al.* Is early diagnosis of oral cancer a feasible objective? Who is to blame for diagnostic delay? **Oral Diseases**, v. 16, n. 4, p. 333-342, 2010.

GOUVEA, A. *et al.* Aspectos clínicos e epidemiológicos do câncer bucal em um hospital oncológico: predomínio de doença localmente avançada. **Revista Brasileira de Cirurgia da Cabeça e Pescoço**, v. 39, n. 4, p. 261-265, 2010.

GRIMM, M. *et al.* Immunophenotyping of patients with oral squamous cell carcinoma in peripheral blood and associated tumor tissue. **Tumor Biology**, v. 37, n. 3, p. 3807-3816, 2016.

GROEGER, S.; MEYLE, J. Oral mucosal epithelial cells. **Frontiers in immunology**, v. 10, n. 208, p. 1-22, 2019.

GUO, T.; CALIFANO, J. A. Molecular biology and immunology of head and neck cancer. **Surgical Oncology Clinics**, v. 24, n. 3, p. 397-407, 2015.

HADDAD, R. I.; SHIN, D. M. Recent advances in head and neck cancer. **New England Journal of Medicine**, v. 359, n. 11, p. 1143-1154, 2008.

HADLER-OLSEN, E.; WIRSING, A. M. Tissue-infiltrating immune cells as prognostic markers in oral squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. **British journal of cancer**, v. 120, n. 7, p. 714-727, 2019.

HANAHAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HAPPLE, C. *et al.* Improved protocol for simultaneous analysis of leukocyte subsets and epithelial cells from murine and human lung. **Experimental lung research**, v. 44, n. 3, p. 127-136, 2018.

HASHIBE, M. *et al.* Interaction between tobacco and alcohol use and the risk of head and neck cancer: pooled analysis in the International Head and Neck Cancer Epidemiology Consortium. **Cancer Epidemiology and Prevention Biomarkers**, v. 18, n. 2, p. 541-550, 2009. Disponível em: <http://cebp.aacrjournals.org/content/cebp/18/2/541.full.pdf>.

HASHIBE, M. *et al.* Socioeconomic status, lifestyle factors and oral premalignant lesions. **Oral Oncology**, v. 39, n. 7, p. 664-671, 2003.

HAUPT, S. *et al.* Targeting Mdmx to treat breast cancers with wild-type p53. **Cell death & disease**, v. 6, n. 7, p. 1-11, 2015.

HERMAN, J. G. *et al.* Inactivation of the CDKN2/p16/MTS1 gene is frequently associated with aberrant DNA methylation in all common human cancers. **Cancer research**, v. 55, n. 20, p. 4525-4530, 1995.

HINSHAW, D. C.; SHEVDE, L. A. The tumor microenvironment innately modulates cancer progression. **Cancer research**, v. 79, n. 18, p. 4557-4566, 2019.

HIRSHBERG, A. *et al.* Metastatic tumours to the oral cavity—pathogenesis and analysis of 673 cases. **Oral oncology**, v. 44, n. 8, p. 743-752, 2008.

HOWLADER, N. *et al.* SEER Cancer Statistics Review, 1975-2017, National Cancer Institute. Bethesda, MD. 2020. Disponível em: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2017/. Acesso em: 20 agosto 2021.

HOWLADER, N. *et al.* **SEER Cancer Statistics Review, 1975-2016**. Bethesda, MD: National Cancer Institute, 2019. Disponível em: https://seer.cancer.gov/csr/1975_2016/. Acesso em: 04 jul. 2019.

HUANG, S. H.; GULLANE, P.; O’SULLIVAN, B. Human Papillomavirus and Head and Neck Cancer. In: CAMPISI, P. (Ed.). **Recurrent Respiratory Papillomatosis**. Cham: Springer International Publishing, 2018. p.167-181.

HUBER, M. A.; TANTIWONGKOSI, B. Oral and oropharyngeal cancer. **Medical Clinics**, v. 98, n. 6, p. 1299-1321, 2014.

INSTITUTO BRASILEIRO DE GEOGRAFIA E ESTATÍSTICA. **Síntese de indicadores sociais: uma análise das condições de vida da população brasileira**. Rio de Janeiro: IBGE, Coordenação de População e Indicadores Sociais, 2016. Disponível em: <https://biblioteca.ibge.gov.br/visualizacao/livros/liv98965.pdf>. Acesso em: 12 abril 2019.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Informativo Detecção Precoce - Monitoramento das ações de controle dos cânceres de lábio e cavidade oral**. Boletim ano 5, n. 3, 2014. Disponível em: <https://www.inca.gov.br/sites/ufu.sti.inca.local/files//media/document//informativo-deteccao-precoce-3-2014-errata.pdf>.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Monitoramento das Ações de Controle dos Cânceres de Lábio e Cavidade Oral. **Informativo**

Detecção Precoce, n. 1, ano 7, 2016. Disponível em:

http://www1.inca.gov.br/inca/Arquivos/informativodeteccaoprecoce_janabr2016.pdf. Acesso em: 17 jul. 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Atlas de mortalidade por câncer. 2019a. Disponível em:

<https://mortalidade.inca.gov.br/MortalidadeWeb/pages/Modelo03/consultar.xhtml;jsessionid=C04CAE4DDFCABDB2C67503A85E11E352>. Acesso em: 18 janeiro 2021.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA.

Estimativa 2020 : incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2019b.

JAHAN-TIGH, R. R. *et al.* Flow cytometry. **The Journal of Investigative Dermatology**, v. 132, n. 10, p. 1-6, 2012.

JALALY, J. B. *et al.* Correlation of p16 immunohistochemistry in FNA biopsies with corresponding tissue specimens in HPV-related squamous cell carcinomas of the oropharynx. **Cancer cytopathology**, v. 123, n. 12, p. 723-731, 2015.

JAYARAJ, G. *et al.* Inter-observer agreement in grading oral epithelial dysplasia—A systematic review. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery, Medicine, and Pathology**, v. 27, n. 1, p. 112-116, 2015.

JL, J.; HEMMINKI, K. Occupation and upper aerodigestive tract cancers: a follow-up study in Sweden. **Journal of Occupational and Environmental Medicine**, v. 47, n. 8, p. 785-795, 2005.

JING, Y. *et al.* Ki-67 is an independent prognostic marker for the recurrence and relapse of oral squamous cell carcinoma. **Oncology letters**, v. 17, n. 1, p. 974-980, 2019.

JITENDER, S. *et al.* Screening for oral cancer. **Journal of Experimental Therapeutics & Oncology**, v. 11, n. 4, p. 303-307, 2016.

JÖGI, A. *et al.* Cancer cell differentiation heterogeneity and aggressive behavior in solid tumors. **Upsala journal of medical sciences**, v. 117, n. 2, p. 217-224, 2012.

JOHNSON, D. E. *et al.* Head and neck squamous cell carcinoma. **Nature reviews Disease primers**, v. 6, n. 1, p. 1-22, 2020.

KADEMANI, D. *et al.* Prognostic factors in intraoral squamous cell carcinoma: the influence of histologic grade. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 63, n. 11, p. 1599-1605, 2005.

KALINA, T.; LUNDSTEN, K.; ENGEL, P. Relevance of antibody validation for flow cytometry. **Cytometry Part A**, v. 97, n. 2, p. 126-136, 2020.

KANG, H.; KIESS, A.; CHUNG, C. H. Emerging biomarkers in head and neck cancer in the era of genomics. **Nature Reviews Clinical Oncology**, v. 12, n. 1, p. 11-26, 2015.

- KARABULUT, A. *et al.* Observer variability in the histologic assessment of oral premalignant lesions. **Journal of oral pathology & medicine**, v. 24, n. 5, p. 198-200, 1995.
- KARANTZA, V. Keratins in health and cancer: more than mere epithelial cell markers. **Oncogene**, v. 30, n. 2, p. 127-138, 2011.
- KATO, M. G. *et al.* Update on oral and oropharyngeal cancer staging—International perspectives. **World Journal of Otorhinolaryngology-Head and Neck Surgery**, v. 6, p. 66-75, 2020.
- KERAWALA, C. *et al.* Oral cavity and lip cancer: United Kingdom national multidisciplinary guidelines. **The Journal of Laryngology & Otology**, v. 130, n. S2, p. S83-S89, 2016.
- KESHAVARZI, M. *et al.* Molecular imaging and oral cancer diagnosis and therapy. **Journal of Cellular Biochemistry**, v. 118, n. 10, p. 3055-3060, 2017.
- KFOURI, S. A. *et al.* Fração de câncer de cabeça e pescoço atribuível ao tabaco e ao álcool em cidades de três regiões brasileiras. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 21, n. e180005, p. 1-12, 2018.
- KHOCHT, A. *et al.* Neutrophil function and periodontitis in alcohol-dependent males without medical disorders. **Journal of the International Academy of Periodontology**, v. 15, n. 3, p. 68-74, 2013.
- KINOSHITA, T. *et al.* Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes differs depending on histological type and smoking habit in completely resected non-small-cell lung cancer. **Annals of Oncology**, v. 27, n. 11, p. 2117-2123, 2016.
- KLUSSMANN, J. P. Head and neck cancer-new insights into a heterogeneous disease. **Oncology research and treatment**, v. 40, n. 6, p. 318-319, 2017.
- KO, Y. C. *et al.* Betel quid chewing, cigarette smoking and alcohol consumption related to oral cancer in Taiwan. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 24, n. 10, p. 450-453, 1995.
- KOZAKIEWICZ, P.; GRZYBOWSKA-SZATKOWSKA, L. Application of molecular targeted therapies in the treatment of head and neck squamous cell carcinoma. **Oncology Letters**, v. 15, n. 5, p. 7497-7505, 2018.
- KREPPPEL, M. *et al.* Clinical and histopathological staging in oral squamous cell carcinoma—Comparison of the prognostic significance. **Oral Oncology**, v. 60, p. 68-73, 2016.
- KUMAR, M. *et al.* Oral cancer: Etiology and risk factors: A review. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 12, n. 2, p. 458-463, 2016. Disponível em: <http://www.cancerjournal.net/article.asp?issn=0973-1482;year=2016;volume=12;issue=2;spage=458;epage=463;aulast=Kumar>. Acesso em: 14 fev 2019.

- KWON, S. *et al.* Automated measurement of multiple cancer biomarkers using quantum-dot-based microfluidic immunohistochemistry. **Analytical Chemistry**, v. 87, n. 8, p. 4177-4183, 2015.
- LE CAMPION, V. *et al.* Caracterização do atraso no diagnóstico do câncer de boca e orofaringe em dois centros de referência. **Cadernos Saúde Coletiva**, v. 24, n. 2, p. 178-184, 2016.
- LECHNER, A. *et al.* Tumor-associated B cells and humoral immune response in head and neck squamous cell carcinoma. **Oncoimmunology**, v. 8, n. 3, p. 1535293, 2019.
- LEEMANS, C. R.; BRAAKHUIS, B. J.; BRAKENHOFF, R. H. The molecular biology of head and neck cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 11, n. 1, p. 9-22, 2011.
- LEEMANS, C. R.; SNIJDERS, P. J. F.; BRAKENHOFF, R. H. The molecular landscape of head and neck cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 18, n. 5, p. 269-282, 2018.
- LEERS, M. P. G.; NAP, M. Clinical flow cytometry of solid tumors. In: HAYAT, M. A. (Ed.). **Handbook of Immunohistochemistry and in Situ Hybridization of Human Carcinomas**: Academic Press, v.2, 2002. cap. 9, p.89-112.
- LEI, X. *et al.* Immune cells within the tumor microenvironment: Biological functions and roles in cancer immunotherapy. **Cancer letters**, v. 470, p. 126-133, 2020.
- LEMOS JUNIOR, C. A. *et al.* Câncer de boca baseado em evidências científicas. **Revista da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas**, v. 67, n. 3, p. 178-186, 2013.
- LEWIS JR, J. S. *et al.* Human papillomavirus testing in head and neck carcinomas: guideline from the College of American Pathologists. **Archives of Pathology & Laboratory Medicine**, v. 142, n. 5, p. 559-597, 2017.
- LEWIS JR., J. S. *et al.* Human Papillomavirus Testing in Head and Neck Carcinomas: Guideline From the College of American Pathologists. **Archives of pathology & laboratory medicine**, v. 142, n. 5, p. 559-597, 2018.
- LI, R.; AGRAWAL, N.; FAKHRY, C. Anatomical sites and subsites of head and neck cancer. In: FAKHRY, C. e D'SOUZA, G. (Ed.). **HPV and head and neck cancers**. New Delhi: Springer, 2015. cap. 1, p.1-11.
- LI, Z.; YANG, H.; YANG, B. Molecular Markers in Head and Neck Cytology. In: (Ed.). **Molecular Cytopathology**: Springer, 2016. p.99-120.
- LOURENÇO, S. Q. C. *et al.* Classificações histopatológicas para o carcinoma de células escamosas da cavidade oral: revisão de sistemas propostos. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 3, p. 325-333, 2007.
- 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, n. 2, p. 122-137, 2017. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.3322/caac.21389>.

MANDAL, R. *et al.* The head and neck cancer immune landscape and its immunotherapeutic implications. **JCI Insight**, v. 1, n. 17, p. e89829-e89829, 2016.

MARTINO, F. *et al.* A machine-learning approach for the assessment of the proliferative compartment of solid tumors on hematoxylin-eosin-stained sections. **Cancers**, v. 12, n. 5, p. 1344, 2020.

MARUCCIA, M. *et al.* Lip cancer: a 10-year retrospective epidemiological study. **Anticancer Research**, v. 32, n. 4, p. 1543-1546, 2012.

MARUR, S. *et al.* HPV-associated head and neck cancer: a virus-related cancer epidemic. **The Lancet Oncology**, v. 11, n. 8, p. 781-789, 2010.

MCILWAIN, W. R. *et al.* Initial symptoms in patients with HPV-positive and HPV-negative oropharyngeal cancer. **JAMA Otolaryngology–Head & Neck Surgery**, v. 140, n. 5, p. 441-447, 2014.

MCKINNON, K. M. Flow cytometry: an overview. **Current protocols in immunology**, v. 120, n. 1, p. 5.1. 1-5.1. 11, 2018.

MEHROTRA, R.; GUPTA, D. K. Exciting new advances in oral cancer diagnosis: avenues to early detection. **Head & Neck Oncology**, v. 3, n. 33, p. 1-8, 2011.

MELO, L. D. C. *et al.* Perfil epidemiológico de casos incidentes de câncer de boca e faringe. **Revista Gaúcha de Odontologia**, v. 58, n. 3, p. 351-355, 2010.

MES, S. W.; LEEMANS, C. R.; BRAKENHOFF, R. H. Applications of molecular diagnostics for personalized treatment of head and neck cancer: state of the art. **Expert Review of Molecular Diagnostics**, v. 16, n. 2, p. 205-221, 2016.

MESKAR, A. *et al.* Alcohol-xenobiotic interactions. Role of cytochrome P450 2E1. **Pathologie-biologie**, v. 49, n. 9, p. 696-702, 2001.

MIRGHANI, H.; BLANCHARD, P. Treatment de-escalation for HPV-driven oropharyngeal cancer: Where do we stand? **Clinical and Translational Radiation Oncology**, v. 8, p. 4-11, 2018. Disponível em: <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pmc/articles/PMC5862680/pdf/main.pdf>.

MONTALLI, V. A. *et al.* Correlation of increased numbers of tumor-infiltrating T regulatory, CD19 and CD8 T cells in well differentiated oral squamous cell carcinoma. **InterAmerican Journal of Medicine and Health**, v. 1, p. e201801004-e201801004, 2018.

MONTERO, P. H.; PATEL, S. G. Cancer of the oral cavity. **Surgical Oncology Clinics**, v. 24, n. 3, p. 491-508, 2015.

MOODY, C. A.; LAIMINS, L. A. Human papillomavirus oncoproteins: pathways to transformation. **Nature Reviews Cancer**, v. 10, n. 8, p. 550-560, 2010.

MOORE, S. R.; PIERCE, A. M.; WILSON, D. F. 'Oral cancer'--the terminology dilemma. **Oral Diseases**, v. 6, n. 3, p. 191-193, 2000.

MORGAN, P. *et al.* Potential applications of anti-keratin antibodies in oral diagnosis. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 16, n. 4, p. 212-222, 1987.

MORGAN, P. R.; SU, L. Intermediate filaments in oral neoplasia. I. Oral cancer and epithelial dysplasia. **European Journal of Cancer Part B: Oral Oncology**, v. 30, n. 3, p. 160-166, 1994.

MORO, J. S. *et al.* Câncer de boca e orofaringe: epidemiologia e análise da sobrevivida. **Einstein**, v. 16, n. 2, p. 1-5, 2018.

MORRIS, Z. S.; TRAYNOR, A. M.; HARARI, P. M. Molecular Targeted Therapies in Head and Neck Cancer. In: BERNIER, J. (Ed.). **Head and Neck Cancer: Multimodality Management**. Cham: Springer International Publishing, 2016. p.349-372.

MOSKOVITZ, J. M. *et al.* Immunotherapy for head and neck squamous cell carcinoma: a review of current and emerging therapeutic options. **The oncologist**, v. 22, n. 6, p. 680, 2017.

MOUSOPOULOS, N. M.; KONKEL, J. E. Tissue-specific immunity at the oral mucosal barrier. **Trends in immunology**, v. 39, n. 4, p. 276-287, 2018.

MUÑOZ, N. *et al.* HPV in the etiology of human cancer. **Vaccine**, v. 24, p. S1-S10, 2006.

MUWONGE, R. *et al.* Role of tobacco smoking, chewing and alcohol drinking in the risk of oral cancer in Trivandrum, India: a nested case-control design using incident cancer cases. **Oral Oncology**, v. 44, n. 5, p. 446-454, 2008.

NAGARAJ, N. S. *et al.* Cigarette smoke condensate induces cytochromes P450 and aldo-keto reductases in oral cancer cells. **Toxicology Letters**, v. 165, n. 2, p. 182-194, 2006.

NEVILLE, B. W.; DAY, T. A. Oral cancer and precancerous lesions. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 52, n. 4, p. 195-215, 2002.

NORDFORS, C. *et al.* CD8+ and CD4+ tumour infiltrating lymphocytes in relation to human papillomavirus status and clinical outcome in tonsillar and base of tongue squamous cell carcinoma. **European journal of cancer**, v. 49, n. 11, p. 2522-2530, 2013.

O'DONNELL, E. A.; ERNST, D. N.; HINGORANI, R. Multiparameter flow cytometry: advances in high resolution analysis. **Immune Network**, v. 13, n. 2, p. 43-54, 2013.

OLIVEIRA-NETO, H. H. *et al.* A comparative study of microvessel density in squamous cell carcinoma of the oral cavity and lip. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 113, n. 3, p. 391-398, 2012.

OLIVEIRA, L. R.; RIBEIRO-SILVA, A. Prognostic significance of immunohistochemical biomarkers in oral squamous cell carcinoma. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 40, n. 3, p. 298-307, 2011.

PARISE JUNIOR, O. **Câncer de boca: aspectos básicos e terapêuticos**. São Paulo: SARVIER, 2000. 256 p.

PATEL, K. J. *et al.* Concordance between clinical and histopathologic diagnoses of oral mucosal lesions. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 69, n. 1, p. 125-133, 2011.

PATIL, S. *et al.* The relationship of “shisha”(water pipe) smoking to the risk of head and neck cancer. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 48, n. 4, p. 278-283, 2019.

PDQ® SCREENING AND PREVENTION EDITORIAL BOARD. **PDQ Oral Cavity, Pharyngeal, and Laryngeal Cancer Prevention**. Bethesda, MD. 2019. Disponível em: <https://www.cancer.gov/types/head-and-neck/patient/oral-prevention-pdq>. Acesso em: 25 maio 2019.

PEDREIRA, C. E. *et al.* Overview of clinical flow cytometry data analysis: recent advances and future challenges. **Trends in Biotechnology**, v. 31, n. 7, p. 415-425, 2013.

PELTANOVA, B.; RAUDENSKA, M.; MASARIK, M. Effect of tumor microenvironment on pathogenesis of the head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review. **Molecular cancer**, v. 18, n. 1, p. 1-24, 2019.

PFISTER, D. G. *et al.* Head and neck cancers, version 2.2020, NCCN clinical practice guidelines in oncology. **Journal of the National Comprehensive Cancer Network**, v. 18, n. 7, p. 873-898, 2020.

PRESLAND, R. B.; DALE, B. A. Epithelial structural proteins of the skin and oral cavity: function in health and disease. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 11, n. 4, p. 383-408, 2000.

PUGLIANO, F. A. *et al.* Clinical-severity staging system for oropharyngeal cancer: five-year survival rates. **Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery**, v. 123, n. 10, p. 1118-1124, 1997.

PUGLIANO, F. A. *et al.* Clinical-severity staging system for oral cavity cancer: five-year survival rates. **Otolaryngology—Head and Neck Surgery**, v. 120, n. 1, p. 38-45, 1999.

PUKKALA, E.; SÖDERHOLM, A.-L.; LINDQVIST, C. Cancers of the lip and oropharynx in different social and occupational groups in Finland. **European Journal of Cancer Part B: Oral Oncology**, v. 30, n. 3, p. 209-215, 1994.

QUAIL, D. F.; JOYCE, J. A. Microenvironmental regulation of tumor progression and metastasis. **Nature medicine**, v. 19, n. 11, p. 1423-1437, 2013.

QUAN, H. *et al.* The repertoire of tumor-infiltrating lymphocytes within the microenvironment of oral squamous cell carcinoma reveals immune dysfunction. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 69, n. 3, p. 465-476, 2020.

QUEENAN, J. *et al.* Symptom appraisal, help seeking, and lay consultancy for symptoms of head and neck cancer. **Psycho-oncology**, v. 27, n. 1, p. 286-294, 2018.

RADOMSKA-LEŚNIEWSKA, D. M.; BIAŁOSZEWSKA, A.; KAMIŃSKI, P. Angiogenic Properties of NK Cells in Cancer and Other Angiogenesis-Dependent Diseases. **Cells**, v. 10, n. 7, p. 1621, 2021.

REIBEL, J. Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. **Critical Reviews in Oral Biology & Medicine**, v. 14, n. 1, p. 47-62, 2003.

REICHARD, A.; ASOSINGH, K. Best practices for preparing a single cell suspension from solid tissues for flow cytometry. **Cytometry Part A**, v. 95, n. 2, p. 219-226, 2019.

REIS, M. L. **Análise do fenótipo das células neoplásicas em efusões pleurais por citometria de fluxo**. 2020. 119 p. (Doutorado). Programa de Pós-graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

RETTIG, E. M.; D'SOUZA, G. Epidemiology of head and neck cancer. **Surgical Oncology Clinics**, v. 24, n. 3, p. 379-396, 2015.

RIAZ, N. *et al.* Unraveling the molecular genetics of head and neck cancer through genome-wide approaches. **Genes & Diseases**, v. 1, n. 1, p. 75-86, 2014.

RIBEIRO, I. L. A. *et al.* Factors associated with lip and oral cavity cancer. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 18, p. 618-629, 2015.

RIBEIRO, K. C. B.; KOWALSKI, L. P.; OLIVEIRA, M. R. D. Perioperative complications, comorbidities, and survival in oral or oropharyngeal cancer. **Archives of Otolaryngology–Head & Neck Surgery**, v. 129, n. 2, p. 219-228, 2003.

RIVERA, C. Essentials of oral cancer. **International journal of clinical and experimental pathology**, v. 8, n. 9, p. 11884–11894, 2015.

RIVERA, C. *et al.* Prognostic biomarkers in oral squamous cell carcinoma: a systematic review. **Oral Oncology**, v. 72, p. 38-47, 2017.

RIVERA, C.; VENEGAS, B. Histological and molecular aspects of oral squamous cell carcinoma. **Oncology Letters**, v. 8, n. 1, p. 7-11, 2014.

ROCHE. Pathophysiology of PV. 2021. Disponível em: <https://www.aboutpv.roche.com/home/hcp/pathophysiology.html>. Acesso em: 17 jun. 2021.

SAFADI, R. A. *et al.* Clinical and histopathologic prognostic implications of the expression of cytokeratins 8, 10, 13, 14, 16, 18 and 19 in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Archives of oral biology**, v. 99, p. 1-8, 2019.

SALES DE SÁ, R. *et al.* Increased tumor immune microenvironment CD3+ and CD20+ lymphocytes predict a better prognosis in oral tongue squamous cell carcinoma. **Frontiers in cell and developmental biology**, v. 8, p. 1822, 2020.

- SANO, D.; ORIDATE, N. The molecular mechanism of human papillomavirus-induced carcinogenesis in head and neck squamous cell carcinoma. **International Journal of Clinical Oncology**, v. 21, n. 5, p. 819-826, 2016.
- SANTOS, L. C. O.; BATISTA, O. M.; CANGUSSU, M. C. T. Characterization of oral cancer diagnostic delay in the state of Alagoas. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 76, n. 4, p. 416-422, 2010.
- SANTOS, L. C. O. *et al.* Câncer bucal: amostra populacional do estado de Alagoas em hospital de referência. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 75, n. 4, p. 524-529, 2009.
- SANTOSH, A. B. R.; JONES, T.; HARVEY, J. A review on oral cancer biomarkers: Understanding the past and learning from the present. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v. 12, n. 2, p. 486-492, 2016.
- SAWADA, K. *et al.* Immunohistochemical staining patterns of p53 predict the mutational status of TP53 in oral epithelial dysplasia. **Modern Pathology**, p. 1-9, 2021.
- SCHILDT, E. *et al.* Occupational exposures as risk factors for oral cancer evaluated in a Swedish case-control study. **Oncology Reports**, v. 6, n. 2, p. 317-337, 1999.
- SCHNEIDER, I. J. C. *et al.* Survival rates of patients with cancer of the lip, mouth and pharynx: a cohort study of 10 years. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 17, p. 680-691, 2014.
- SCHOLZEN, T.; GERDES, J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. **Journal of cellular physiology**, v. 182, n. 3, p. 311-322, 2000.
- SCULLY, C.; BAGAN, J. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. **Oral Diseases**, v. 15, n. 6, p. 388-399, 2009.
- SCULLY, C.; FIELD, J. K.; TANZAWA, H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. **Oral Oncology**, v. 36, n. 3, p. 256-263, 2000.
- SHANTI, R. M.; O'MALLEY, B. W. Surgical management of oral cancer. **Dental Clinics**, v. 62, n. 1, p. 77-86, 2018.
- SHIAH, S.-G.; SHIEH, Y.-S.; CHANG, J.-Y. The role of Wnt signaling in squamous cell carcinoma. **Journal of Dental Research**, v. 95, n. 2, p. 129-134, 2016.
- SHIELD, K. D. *et al.* The global incidence of lip, oral cavity, and pharyngeal cancers by subsite in 2012. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, n. 1, p. 51-64, 2017.
- SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2016. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 66, n. 1, p. 7-30, 2016.
- SIEGEL, R. L.; MILLER, K. D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2017. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 67, n. 1, p. 7-30, 2017.

SILVA, L. V. O. *et al.* Demographic and Clinicopathologic Features of Actinic Cheilitis and Lip Squamous Cell Carcinoma: a Brazilian Multicentre Study. **Head and Neck Pathology**, p. 1-10, 2020.

SINGH, A. G.; CHATURVEDI, P. Smoking and other addictions related to cancer of the head and neck. **Revista Médica Clínica Las Condes**, v. 29, n. 4, p. 405-410, 2018.

SKULSKA, K. *et al.* Impact of tissue enzymatic digestion on analysis of immune cells in mouse reproductive mucosa with a focus on $\gamma\delta$ T cells. **Journal of immunological methods**, v. 474, p. 112665, 2019.

SOLOMON, M. C. *et al.* The prognostic implication of the expression of EGFR, p53, cyclin D1, Bcl-2 and p16 in primary locally advanced oral squamous cell carcinoma cases: a tissue microarray study. **Medical Oncology**, v. 33, n. 138, p. 1-7, 2016.

SOUSA, A. R. *et al.* Perfil clínico-epidemiológico de pacientes com câncer de cabeça e pescoço em hospital de referência. **Revista da Sociedade Brasileira de Clínica Médica**, v. 14, n. 3, p. 129-132, 2016.

SOUZA, L. R. *et al.* Lip squamous cell carcinoma in a Brazilian population: epidemiological study and clinicopathological associations. **Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v. 16, n. 6, p. e757-e762, 2011.

SOUZA, M. L. **Rede de atenção à saúde bucal para diagnóstico e tratamento de câncer de boca no Estado de Santa Catarina**. 2017. 206 f. Dissertação (Mestrado) - Programa de Pós-graduação em Odontologia, Centro de Ciências da Saúde, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis, 2017.

SOUZA, R.; SAKAE, T. M.; GUEDES, A. L. Características clínico-epidemiológicas de pacientes portadores de carcinomas da cavidade oral e orofaringe em clínica privada no sul do Brasil. **Arquivos Catarinenses de Medicina**, v. 37, n. 2, p. 32-41, 2008.

SPEIGHT, P. M. *et al.* Interobserver agreement in dysplasia grading: toward an enhanced gold standard for clinical pathology trials. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology**, v. 120, n. 4, p. 474-482. e2, 2015.

SRITIPPHO, T.; CHOTJUMLONG, P.; IAMAROON, A. Roles of Human Papillomaviruses and p16 in Oral Cancer. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 16, n. 15, p. 6193-6200, 2015.

STEFANUTO, P.; DOUCET, J. C.; ROBERTSON, C. Delays in treatment of oral cancer: a review of the current literature. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 117, n. 4, p. 424-429, 2014.

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

SUÁREZ-SÁNCHEZ, F. J. *et al.* Tumor-infiltrating CD20+ B lymphocytes: Significance and prognostic implications in oral cancer microenvironment. **Cancers**, v. 13, n. 3, p. 395, 2021.

SUH, Y. *et al.* Clinical update on cancer: molecular oncology of head and neck cancer. **Cell Death & Disease**, v. 5, n. 1, p. 1-12, 2014.

SUN, X.; KAUFMAN, P. D. Ki-67: more than a proliferation marker. **Chromosoma**, v. 127, n. 2, p. 175-186, 2018.

SUNG, H. *et al.* Global cancer statistics 2020: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 71, n. 3, p. 209-249, 2021.

TAGHAVI, N.; YAZDI, I. Prognostic factors of survival rate in oral squamous cell carcinoma: clinical, histologic, genetic and molecular concepts. **Archives of Iranian Medicine**, v. 18, n. 5, p. 314-319, 2015.

TARVAINEN, L. *et al.* Cancer of the mouth and pharynx, occupation and exposure to chemical agents in Finland [in 1971–95]. **International Journal of Cancer**, v. 123, n. 3, p. 653-659, 2008.

TEIXEIRA, A. K. M. *et al.* Carcinoma espinocelular da cavidade bucal: um estudo epidemiológico na Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 55, n. 3, p. 229-236, 2009.

TERABE, M.; BERZOFSKY, J. A. Tissue-specific roles of NKT cells in tumor immunity. **Frontiers in immunology**, v. 9, p. 1838, 2018.

TIRELLI, G. *et al.* Prognostic indicators of improved survival and quality of life in surgically treated oral cancer. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 126, n. 1, p. 31-40, 2018.

TOKUNAGA, R. *et al.* B cell and B cell-related pathways for novel cancer treatments. **Cancer treatment reviews**, v. 73, p. 10-19, 2019.

ULAGANATHAN, G. *et al.* A clinicopathological study of various oral cancer diagnostic techniques. **Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences**, v. 9, n. Suppl 1, p. S4-S10, 2017.

UPASANI, O. S.; VAIDYA, M. M.; BHISEY, A. N. Database on monoclonal antibodies to cytokeratins. **Oral Oncology**, v. 40, n. 3, p. 236-256, 2004.

UXA, S. *et al.* Ki-67 gene expression. **Cell Death & Differentiation**, p. 1-14, 2021.

VAN DEN BRAND, M. *et al.* Sequential immunohistochemistry: a promising new tool for the pathology laboratory. **Histopathology**, v. 65, n. 5, p. 651-657, 2014.

VAN DIJK, B. A. *et al.* Trends in oral cavity cancer incidence, mortality, survival and treatment in the Netherlands. **International Journal of Cancer**, v. 139, n. 3, p. 574-583, 2016. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/pdf/10.1002/ijc.30107>.

VAN DYNE, E. A. *et al.* Trends in human papillomavirus-associated cancers—United States, 1999–2015. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 67, n. 33, p. 918, 2018.

VIRGO, P. F.; GIBBS, G. J. Flow cytometry in clinical pathology. **Annals of Clinical Biochemistry**, v. 49, n. 1, p. 17-28, 2012.

VOLKWEIS, M. R. *et al.* Perfil epidemiológico dos pacientes com câncer bucal em um CEO. **Revista de Cirurgia e Traumatologia Buco-maxilo-facial**, v. 14, n. 2, p. 63-70, 2014.

VOLOVITZ, I. *et al.* A non-aggressive, highly efficient, enzymatic method for dissociation of human brain-tumors and brain-tissues to viable single-cells. **BMC neuroscience**, v. 17, n. 1, p. 1-10, 2016.

WALKER, D. M.; BOEY, G.; MCDONALD, L. The pathology of oral cancer. **Pathology**, v. 35, n. 5, p. 376-383, 2003.

WANG, M. *et al.* Role of tumor microenvironment in tumorigenesis. **Journal of Cancer**, v. 8, n. 5, p. 761, 2017.

WARNAKULASURIYA, S. Causes of oral cancer—an appraisal of controversies. **British Dental Journal**, v. 207, n. 10, p. 471, 2009a.

WARNAKULASURIYA, S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. **Oral Oncology**, v. 45, n. 4-5, p. 309-316, 2009b.

WARNAKULASURIYA, S. Potentially Malignant Disorders of the Oral Cavity. In: WARNAKULASURIYA, S. e GREENSPAN, J. S. (Ed.). **Textbook of Oral Cancer: Prevention, Diagnosis and Management**. Cham, Switzerland: Springer, 2020. cap. 12, p.141-158.

WARNAKULASURIYA, S. *et al.* Oral potentially malignant disorders: A consensus report from an international seminar on nomenclature and classification, convened by the WHO Collaborating Centre for Oral Cancer. **Oral diseases**, 2020.

WARNAKULASURIYA, S.; MAEDA, H.; GREENSPAN, J. S. Pathology of Oral and Oropharyngeal Cancers. In: WARNAKULASURIYA, S. e GREENSPAN, J. S. (Ed.). **Textbook of Oral Cancer: Prevention, Diagnosis and Management**. Cham, Switzerland: Springer, 2020. cap. 7, p.69-80.

WEATHERSPOON, D. J. *et al.* Oral cavity and oropharyngeal cancer incidence trends and disparities in the United States: 2000–2010. **Cancer Epidemiology**, v. 39, n. 4, p. 497-504, 2015.

WHITESIDE, T. The tumor microenvironment and its role in promoting tumor growth. **Oncogene**, v. 27, n. 45, p. 5904-5912, 2008.

WIGHT, A.; OGDEN, G. Possible mechanisms by which alcohol may influence the development of oral cancer—a review. **Oral Oncology**, v. 34, n. 6, p. 441-447, 1998.

WOLF, G. T. *et al.* Tumor infiltrating lymphocytes (TIL) and prognosis in oral cavity squamous carcinoma: a preliminary study. **Oral oncology**, v. 51, n. 1, p. 90-95, 2015.

WOOLGAR, J. A.; TRIANTAFYLLOU, A. Pitfalls and procedures in the histopathological diagnosis of oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma and a review of the role of pathology in prognosis. **Oral Oncology**, v. 45, n. 4-5, p. 361-385, 2009.

WOPEREIS, S. **Validação da Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo para a Investigação de Marcadores de Diagnóstico e de Prognóstico para o Câncer de Mama.** 2019. 75 p. (Doutorado). Programa de Pós-graduação em Farmácia, Universidade Federal de Santa Catarina, Florianópolis.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Tumours of the oral cavity and mobile tongue. In: EL-NAGGAR, A.; CHAN, J., *et al* (Ed.). **WHO classification of tumours of the head and neck.** 4th ed. Lyon: IARC Press, 2017a.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Tumours of the oropharynx (base of tongue, tonsils, adenoids). In: EL-NAGGAR, A.; CHAN, J., *et al* (Ed.). **WHO classification of tumours of the head and neck.** Lyon: IARC Press, 2017b. p.132-146.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. **Oral Health.** World Health Organization. 2018. Disponível em: <https://www.who.int/news-room/fact-sheets/detail/oral-health>. Acesso em: 25 jul. 2019.

WU, P. *et al.* Statistical and pathological analysis of oral tumors in the Hong Kong Chinese. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 15, n. 2, p. 98-102, 1986.

XIE, S. *et al.* What is the prognostic significance of Ki-67 positivity in oral squamous cell carcinoma? **Journal of Cancer**, v. 7, n. 7, p. 758, 2016.

XU, B. *et al.* The utility of p16 immunostaining in fine needle aspiration in p16-positive head and neck squamous cell carcinoma. **Human pathology**, v. 54, p. 193-200, 2016.

YANG, E. C. *et al.* Noninvasive diagnostic adjuncts for the evaluation of potentially premalignant oral epithelial lesions: current limitations and future directions. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology**, v. 125, n. 6, p. 670-681, 2018.

YANG, Z. *et al.* HPV testing through p16 immunocytochemistry in neck-mass FNA and its correlation with tissue samples. **Cancer cytopathology**, v. 127, n. 7, p. 458-464, 2019.

YETE, S.; D'SOUZA, W.; SARANATH, D. High-risk human papillomavirus in oral cancer: clinical implications. **Oncology**, v. 94, n. 3, p. 133-141, 2018.

YOUNG, Y. K. *et al.* Analyzing the tumor microenvironment by flow cytometry. In: URSINI-SIEGEL, J. e BEAUCHEMIN, N. (Ed.). **The Tumor Microenvironment: Methods and Protocols.** New York: Springer, 2016. cap. 8, p.95-110.

YUAN, S.; NORGDARD, R. J.; STANGER, B. Z. Cellular plasticity in cancer. **Cancer discovery**, v. 9, n. 7, p. 837-851, 2019.

ZIMMERMANN, M.; MEYER, N. Annexin V/7-AAD staining in keratinocytes. In: STODDART, M. (Ed.). **Mammalian Cell Viability. Methods and Protocols**: Springer, v.740, 2011. cap. 8, p.57-63. (Methods in Molecular Biology).

ANEXO A – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP Nº 2.986.011

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: PERFIL DOS PACIENTES COM CÂNCER DE BOCA ATENDIDOS NO SERVIÇO DE CIRURGIA DE CABEÇA E PESCOÇO DO HU/UFSC

Pesquisador: Llliane Janete Grandó

Área Temática:

Versão: 4

CAAE: 12079213.0.0000.0121

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Catarina

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.986.011

Apresentação do Projeto:

O câncer de boca continua sendo uma das poucas doenças bucais que oferecem risco de morte ao paciente, no mundo ocidental. Considerando ambos os sexos, o CA de boca e faringe ocupa o 6o lugar entre os tipos de câncer mais prevalentes no mundo.201 O exame minucioso da cavidade oral é de competência do Cirurgião Dentista (CD) que deve ser o principal responsável pelo diagnóstico precoce de lesões orais. Para o diagnóstico destas lesões a inspeção visual de todas as estruturas bucais, bem como a palpação das cadeias linfáticas da região de cabeça e pescoço, são recursos semiotécnicos indiscutivelmente importantes e inerentes a prática odontológica que não devem jamais ser negligenciados. (PINHEIRO; CARDOSO; PRADO, 2010)Tão importante quanto diagnosticar uma lesão já estabelecida é identificar no paciente a presença de fatores de risco ao desenvolvimento das mesmas. O tabaco e o álcool são os principais fatores etiológicos do câncer de boca e estão presentes ao longo de muitos anos na vida dos pacientes sendo assim, facilmente identificados pelo profissional da Odontologia. Este, por sua vez, tem o dever de realizar orientações sobre os riscos do uso destas substâncias e da importância do abandono destas práticas.O carcinoma espinocelular de boca (neoplasia maligna mais comum nesta região anatômica) manifesta-se geralmente como uma úlcera indolor que não cicatriza.(ROSEBUSH et al., 2011) Seu tratamento de escolha é a cirurgia radical, associada ou não à radioterapia e/ou quimioterapia, dependendo da localização e do estágio da doença.(ROSEBUSH et al., 2011) Todas as modalidades de tratamento causam sequelas no paciente tratado. Conhecer estas sequelas,

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 2.986.011

saber como evitar as que são passíveis de serem evitadas e manejar as que não o são buscando uma melhor qualidade de vida para o paciente, tanto no trans quanto no pós tratamento, também são responsabilidade da Odontologia. O prognóstico do paciente em geral diminui quando a doença é diagnosticada na fase avançada, quando o paciente tiver baixo status sócio-econômico, idade avançada e manutenção do estilo de vida de risco. Diante destes fatos é possível concluir que o CA de boca é uma doença de extrema relevância para a saúde pública mundial. Para intervir em uma realidade é necessário, antes de mais nada, conhecê-la.

Sendo assim, os pesquisadores visam determinar o perfil de aproximadamente 70 pacientes com câncer de boca atendidos no serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do HU/UFSC com relação a critérios como: idade, sexo, etnia, localização da lesão, estadiamento clínico, tratamento proposto/realizado, necessidade de preparo de boca e presença de hábitos como tabagismo, etilismo e/ou uso de drogas de abuso.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Primário:

Conhecer o perfil dos pacientes portadores de câncer de boca atendidos no Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital Universitário Polydoro Ernani de São Thiago (HU/UFSC).

Objetivo Secundário:

1- Distribuir a amostra quanto ao sexo, faixa etária, tipo de câncer de boca mais prevalente e sua localização preferencial; 2- Identificar quais os agentes etiológicos do câncer de boca que mais acometeram os pacientes da amostra; 3- Verificar o estágio em que o câncer de boca foi diagnosticado e correlacionar com as prováveis consequências do seu tratamento para o paciente; 4- Identificar as opções de tratamento mais recomendadas por aquele Serviço; 5- Verificar as sequelas apresentadas pelos pacientes no pós tratamento do câncer de boca.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos:

Os riscos desta pesquisa para os pacientes são os mesmos inerentes a qualquer exame odontológico de rotina, tais como alguns gostos não usuais, pequenos desconfortos durante o afastamento dos tecidos bucais, eventual dor à palpação da lesão.

Benefícios:

Serão os seguintes os benefícios aos pacientes:- Orientações sobre as boas práticas de higiene bucal;- Preparo de boca pré-tratamento radio e quimioterápico, incluindo restaurações, remoção de focos de infecção, remoção de tártaro- Tratamento das sequelas da cirurgia, radioterapia e

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 2.986.011

quimioterapia, tais como comunicações buco-nasais e buco-sinusais, candidíases, mucosite radio e quimioinduzida, cáries de radiação, hipossalivação, entre outras.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma emenda de um estudo exploratório, cujo objetivo é traçar o perfil de pacientes oncológicos (câncer de boca) atendidos no ambulatório do Serviço de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do HU-UFSC.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Apresenta TCLE

Recomendações:

Nada a recomendar.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Emenda aprovada.

Considerações Finais a critério do CEP:

A análise foi realizada com base em todos os documentos apresentados, incluindo o projeto em sua íntegra. Os pesquisadores responderam a todos os questionamentos indicados na lista de pendências apontadas no campo Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações do parecer prévio, identificando claramente as respostas de acordo com a numeração das pendências, através de carta ao CEP (em documento editável/word), que deverá ser adicionada à Plataforma Brasil. Os documentos anteriormente submetidos, como, por exemplo, o projeto, cronograma e o TCLE, foram adicionados na carta de respostas claramente identificados, apresentando uma nova versão dos documentos.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_1197706_E2.pdf	08/10/2018 16:22:44		Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	RespostaCEP_ProfaLilianeJGrando_Bruna.docx	08/10/2018 09:41:44	Bruna Fischer Duarte	Aceito
Cronograma	Cronograma_2018.doc	08/10/2018 09:40:01	Bruna Fischer Duarte	Aceito
Cronograma	NOVO_cronograma_PERFIL_DOS_PACIENTES.pdf	22/07/2016 16:20:48	Liliane Janete Grando	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	NOVA_resposta_TCLE_PERFIL_DOS_PACIENTES.pdf	22/07/2016 16:20:24	Liliane Janete Grando	Aceito

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 2.986.011

Justificativa de Ausência	NOVA_resposta_TCLE_PERFIL_DOS_PACIENTES.pdf	22/07/2016 16:20:24	Liliane Janete Grando	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	ProfaLilianeJGrando_TCLE_TCCNatalia.pdf	17/04/2016 17:48:18	Liliane Janete Grando	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Maira M Rosa - Projeto câncer de Boca HU-UFSC.pdf	16/02/2013 11:27:24		Aceito
Folha de Rosto	folha_de_rosto_Maira_Rosa.jpg	12/02/2013 17:12:50		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	Maira M Rosa -TCLE-projeto Câncer de Boca do HU-UFSC.pdf	21/01/2013 19:13:24		Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FLORIANOPOLIS, 28 de Outubro de 2018

Assinado por:
Maria Luiza Bazzo
(Coordenador(a))

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

ANEXO B – PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP Nº 2.985.964

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DA EMENDA

Título da Pesquisa: Investigação de Novos Alvos Imunofenotípicos e Moleculares Aplicados ao Diagnóstico e ao Prognóstico de Neoplasias Hematológicas e Não Hematológicas

Pesquisador: Maria Cláudia Santos da Silva

Área Temática:

Versão: 6

CAAE: 52861715.0.0000.0121

Instituição Proponente: Universidade Federal de Santa Catarina

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 2.985.964

Apresentação do Projeto:

Trata-se de uma nova emenda ao Projeto Projeto de pesquisa de Renata Cristina Messores Rudolf de Oliveira, Mariangeles Auat e Sandro Wopereis, sob orientação da Profa. Dra Maria Cláudia Santos da Silva, do Programa de Pós-graduação em Farmácia da UFSC, que pretende avaliar novos marcadores imunofenotípicos em amostras de aspirado e biópsia de medula óssea e sangue periférico, amostras de aspirados e biópsias de linfonodos e biópsias de mama de um total de 300 pacientes. As análises serão realizadas no Laboratório de Onco-hematologia e Patologia do HU/UFSC. A justificativa da emenda se refere a inclusão da análise de amostras com suspeita de câncer de boca. Para os pesquisadores "inclusão das amostras com suspeita de câncer de boca estaria dentro dos objetivos do mesmo, e na mesma linha de investigação, a qual analisa a utilização da citometria de fluxo com ferramenta de diagnóstico na área de oncologia."

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo primário: Investigar alvos moleculares e novos alvos imunofenotípicos que sirvam como marcadores para o diagnóstico e para o prognóstico de neoplasias hematológicas e não hematológicas.

Objetivo Secundário:

- Determinar os padrões de expressão de novos marcadores em células de pacientes com suspeita diagnóstica neoplasias hematológicas;- Comparar a intensidade de expressão dos novos

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 2.985.964

marcadores entre as células neoplásicas e as células B normais presentes na medula óssea, no sangue periférico e no linfonodo;- Identificar os marcadores celulares mais eficientes na distinção entre células normais e neoplásicas;- Identificar os marcadores celulares mais úteis na classificação e diagnóstico diferencial das neoplasias hematológicas;- Verificar se os novos marcadores imunofenotípicos são úteis para detecção de doença residual mínima.- Estabelecer um painel de anticorpos monoclonais capaz de diferenciar as células neoplásicas das populações normais em amostras provenientes de mama;- Padronizar e validar a metodologia de citometria de fluxo para a identificação dos subtipos de câncer de mama;- Comparar os resultados obtidos na imunofenotipagem por citometria de fluxo com aqueles obtidos pela análise histo ou citopatológica;- Avaliar a relação custo-benefício para a aplicação dessa metodologia no ambiente hospitalar, bem como sua viabilidade; - Implementar a metodologia de citometria de fluxo para a investigação de marcadores úteis para o diagnóstico e avaliação prognóstica do câncer de mama.- Padronizar e implantar as translocações t(8;14)(q24;q32), t(11;14)(q13;q32) e t(14;18)(q32;q21) por biologia molecular (PCR ou FISH) para auxiliar na classificação e diagnóstico das neoplasias de células B maduras.- Estabelecer um painel de anticorpos monoclonais capaz de diferenciar as células neoplásicas das populações normais em amostras provenientes de boca;-Padronizar e validar a imunofenotipagem por citometria de fluxo para a identificação dos marcadores característicos dos casos de câncer de boca HPV induzidos ou não;-Analisar o fenótipo das células presentes em todas as amostras de biópsias com suspeita de câncer de boca encaminhadas ao Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias (LOEH);- Comparar os resultados da imunofenotipagem com aqueles obtidos na avaliação morfológica e imunohistoquímica (padrãoouro);- Comparar os resultados da imunofenotipagem com aqueles obtidos na avaliação morfológica (bem diferenciado, moderadamente diferenciado, indiferenciado e anaplásico) e imuno-histoquímica (CK5 E CK8) (padrão ouro);-Implantar a imunofenotipagem por citometria de fluxo para a investigação de marcadores úteis para o diagnóstico e avaliação prognóstica do câncer de boca na rotina do Laboratório de Análises Clínicas do Hospital Universitário da UFSC.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Os pesquisadores informam que o "paciente não será exposto a nenhum risco adicional inerente a coleta das amostras." uma vez que estas serão aquelas em que serão submetidos durante o processo de avaliação clínica e não exclusivamente por conta da pesquisa. Benefícios - genericamente, os pesquisadores afirmam que o estudo poderá contribuir para:"políticas de prevenção e de diagnóstico precoce, mostra-se essencial para assegurar menores custos aos sistemas de saúde e maior qualidade de vida da população acometida por estas doenças."

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

Continuação do Parecer: 2.985.964

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa continua mantendo o delineamento do projeto previamente aprovado em agosto de 2016 com a inclusão de objetivos específicos pertinentes as amostras de câncer de boca. O Cronograma ainda encontra-se em vigência para a realização da pesquisa. TCLE permanecem os mesmos sem alterações. Demais documentos ainda em vigência.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Adequados e ainda com os mesmos parâmetros do projeto aprovado anteriormente.

Recomendações:

sem recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Conclusão: aprovado.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_1224999_E2.pdf	21/09/2018 15:36:40		Aceito
Outros	Carta.pdf	21/09/2018 15:25:49	Bruna Fischer Duarte	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE2018.pdf	21/09/2018 13:09:22	Bruna Fischer Duarte	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	PROJETOCOMITE.pdf	21/09/2018 13:08:25	Bruna Fischer Duarte	Aceito
Outros	RESPOSTAASPENDENCIAS3.pdf	18/07/2016 18:30:22	Renata Cristina Messores Rudolf de Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE18072016.pdf	18/07/2016 18:29:50	Renata Cristina Messores Rudolf de Oliveira	Aceito
Outros	RESPOSTAASPENDENCIAS2.pdf	27/06/2016 15:08:14	Renata Cristina Messores Rudolf de Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	TCLE3.pdf	27/06/2016 15:05:18	Renata Cristina Messores Rudolf de	Aceito

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE
SANTA CATARINA - UFSC



Continuação do Parecer: 2.985.964

Justificativa de Ausência	TCLE3.pdf	27/06/2016 15:05:18	Oliveira	Aceito
Outros	RESPOSTAASPENDENCIAS.pdf	02/06/2016 15:03:35	Renata Cristina Messores Rudolf de Oliveira	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	NOVOTCLE.pdf	02/06/2016 15:02:22	Renata Cristina Messores Rudolf de Oliveira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	autorizacao.pdf	17/05/2016 14:06:27	Renata Cristina Messores Rudolf de Oliveira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	declaracaohemosc.pdf	17/05/2016 14:05:07	Renata Cristina Messores Rudolf de Oliveira	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	DeclaracaoHU.pdf	29/01/2016 16:41:49	Renata Cristina Messores Rudolf de Oliveira	Aceito
Folha de Rosto	folhaderosto.pdf	17/12/2015 15:29:38	Renata Cristina Messores Rudolf de Oliveira	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	projetodetalhado.pdf	16/12/2015 15:42:29	Renata Cristina Messores Rudolf de Oliveira	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

FLORIANOPOLIS, 28 de Outubro de 2018

Assinado por:
Maria Luiza Bazzo
(Coordenador(a))

Endereço: Universidade Federal de Santa Catarina, Prédio Reitoria II, R: Desembargador Vitor Lima, nº 222, sala 401
Bairro: Trindade **CEP:** 88.040-400
UF: SC **Município:** FLORIANOPOLIS
Telefone: (48)3721-6094 **E-mail:** cep.propesq@contato.ufsc.br

ANEXO C – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
Centro de Ciências da Saúde
Departamento de Análises Clínicas
Campus Universitário - Florianópolis, SC, 88049-000, Brasil
Tel: (48) 3721 8146

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO DA PESQUISA:

Investigação de Novos Alvos Imunofenotípicos Aplicados ao Diagnóstico e ao Prognóstico de Neoplasias Hematológicas e Não Hematológicas

O(a) Senhor(a) está sendo convidado a participar de uma pesquisa. Antes de decidir se deseja participar, é importante que o(a) Senhor(a) entenda por que esta pesquisa será feita. Por favor, leia com atenção e cuidado as informações a seguir para que a decisão sobre a sua participação possa ser uma decisão bem informada. Este termo de consentimento livre e esclarecido cumpre as exigências contidas nos itens IV. 3 da Resolução CNS nº466/12.

QUAL OBJETIVO DESTE ESTUDO?

O estudo acima refere-se a uma pesquisa que visa investigar novos marcadores que sirvam como alvos para o diagnóstico e para o prognóstico de neoplasias de células linfoides B maduras (linfomas) e não hematológicas. Após a coleta do material biológico e realização dos exames laboratoriais solicitados pelo médico do senhor(a), a amostra biológica restante será encaminhada para a pesquisa. Dessa forma, seus exames não serão alterados ou prejudicados pela realização da pesquisa.

EU TENHO QUE PARTICIPAR?

Cabe ao senhor(a) decidir se irá ou não participar. Isso não irá afetar de maneira nenhuma, o padrão de cuidados que o(a) senhor(a) irá receber. Caso decida participar, o(a) senhor(a) irá receber este Termo de Consentimento Livre e Esclarecido para assinar. Mesmo que decida participar, o(a) senhor(a) ainda será livre para sair do estudo a qualquer momento, bastando para isso informar a sua desistência. Isso não irá afetar de maneira nenhuma, o padrão de cuidados que o(a) senhor(a) irá receber.

EXISTEM RISCOS OU DESCONFORTOS ASSOCIADOS COM A PARTICIPAÇÃO?

Não, pois não haverá duas coletas, aproveitaremos o mesmo material biológico colhido para os exames laboratoriais, dessa forma não há nenhum desconforto adicional. Entretanto, existe um pequeno risco de que o senhor(a) possa sentir algum mal-estar durante ou logo após a coleta, porém, caso o senhor (a) sinta algo estará bem assistido pelos funcionários do setor de coleta.

QUAIS SÃO OS BENEFÍCIOS ESPERADOS COM A PESQUISA PARA O PARTICIPANTE? Mesmo que o(a) senhor(a) não se beneficie diretamente dos resultados da pesquisa informo-lhe que estes resultados poderão contribuir futuramente para melhorar o diagnóstico laboratorial de inúmeros pacientes.

TEREI CUSTOS SE PARTICIPAR? TENHO DIREITO A RESSARCIMENTO?

Não, por ser voluntário e sem interesse financeiro, o(a) senhor(a) não terá nenhum gasto extra e também não terá direito a nenhuma remuneração ou ressarcimento. A participação na pesquisa não gerará despesas pessoais, nem danos porque a participação do(a) senhor(a) será apenas com a doação da amostra biológica colhida para a realização dos exames laboratoriais.

EU POSSUO ALGUM DIREITO À INDENIZAÇÃO?

Caso o senhor(a) tenha algum prejuízo material ou imaterial em decorrência da pesquisa poderá solicitar indenização, de acordo com a legislação vigente e amplamente consubstanciada em juízo.

MEUS DADOS SERÃO DIVULGADOS?

Informamos que não haverá nenhuma avaliação física ou entrevistas efetuadas pelos pesquisadores, sendo assim, os dados do seu prontuário serão consultados e essas informações serão mantidas sob sigilo absoluto e privado. Os pesquisadores serão os únicos a ter acesso aos dados e tomarão todas as providências necessárias para a manutenção do sigilo, no entanto, existe a remota possibilidade da quebra do sigilo involuntário e não intencional, cujas consequências serão tratadas nos termos da lei. A divulgação dos resultados visará apenas mostrar os possíveis benefícios obtidos na pesquisa em questão e as informações divulgadas no meio científico serão anônimas e em conjunto com as informações de todos os participantes da pesquisa. O(a) Senhor(a) poderá solicitar informações durante todas as fases da pesquisa, inclusive após a publicação da mesma, pelos contatos informados no final deste documento.

COM QUEM DEVO ENTRAR EM CONTATO SE NECESSITAR DE MAIS INFORMAÇÕES?

Em caso de qualquer dano relacionado ao estudo, ou sempre que o(a) senhor(a) tiver qualquer dúvida sobre o estudo, por favor entre em contato com:

Coordenadora do Projeto:

Maria Cláudia Santos da Silva

Fone: (048) 3721-8146

Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias

E-mail: maria.claudia.silva@ufsc.br

Pesquisadores:

- Renata Cristina Messores Rudolf de Oliveira

- Fone: (048) 3721-8146 Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias

E-mail: renatarudolf@gmail.com

- Mariangeles Auat

- Fone: (048) 3721-8146 Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias

E-mail: mariauat@gmail.com

- Sandro Wopereis

- Fone: (048) 3721-8146 Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias

E-mail: swopereis@gmail.com

- Bruna Fischer Duarte

- Fone: (048) 3721-8146 Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias

E-mail: brufduarte@gmail.com

Comitê de Ética em Pesquisa (local):

Eu, _____ confirmo que:

1. Recebi informações sobre o estudo acima, além disso, li e entendi todas as informações fornecidas sobre minha participação nesta pesquisa;
2. Tive a oportunidade de discuti-las e fazer perguntas. Todas as minhas dúvidas foram esclarecidas satisfatoriamente e eu voluntariamente concordo em participar deste estudo;
3. Entendo que receberei uma cópia assinada deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.
4. Concordo em participar deste estudo.

Data: ____ / ____ / ____

Nome do participante

Assinatura do participante

Artigo publicado

Bioorganic & Medicinal Chemistry 27 (2019) 375–382



Contents lists available at ScienceDirect

Bioorganic & Medicinal Chemistry

journal homepage: www.elsevier.com/locate/bmc

Synthesis of novel pyrazoline derivatives and the evaluation of death mechanisms involved in their antileukemic activity



Natália Marcelli Stefanos^{a,b}, Jéssica Toigo^c, Mariana Franzoni Maioral^{a,b},
 Amanda Virtuoso Jacques^{a,b}, Louise Domeneghini Chiaradia-Delatorre^c, Daiane Mari Perondi^{a,b},
 Amanda Abdalla Biasi Ribeiro^a, Álisson Bigolin^{a,b}, Iris Mattos Santos Pirath^{a,b},
 Bruna Fischer Duarte^{a,b}, Ricardo José Nunes^c, Maria Cláudia Santos-Silva^{a,b,*}

^a Experimental Oncology and Hemopathies Laboratory, Clinical Analysis Department, Federal University of Santa Catarina, CEP: 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil

^b Post-Graduation Program in Pharmacy, Health Science Center, Federal University of Santa Catarina, CEP: 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil

^c Structure and Activity Laboratory, Chemistry Department, Federal University of Santa Catarina, CEP: 88040-900, Florianópolis, SC, Brazil

ARTICLE INFO

Keywords:
 Pyrazolines
 Acute leukemia
 Cytotoxicity
 Apoptosis

ABSTRACT

Malignant neoplasms are one of the leading causes of death worldwide and hematologic malignancies, including acute leukemia (AL) is one of the most relevant cancer types. Current available chemotherapeutics are associated with high morbidity and mortality rates, therefore, the search for new molecules with antitumor activity, specific and selective for neoplastic cells, became a great challenge for researchers in the oncology field. As pyrazolines stand out in the literature for their great variety of biological activities, the aim of this study was to synthesize and evaluate the antileukemic activity of five new pyrazoline derivatives. All pyrazolines showed adequate physicochemical properties for a good oral bioavailability. The two unpublished and most effective pyrazoline derivatives have been selected for further experiments. These compounds are highly selective for leukemic cells when compared to non-neoplastic cells and did not cause lysis on human red blood cells. Additionally, selected pyrazolines induced cell cycle arrest at G0/G1 phase and decreased cell proliferation marker Ki67. Apoptotic cell death induced by selected pyrazolines was confirmed by morphological analysis, assessment of phosphatidylerine residue exposure and DNA fragmentation. Several factors indicate that both intrinsic and extrinsic apoptosis occurred. These were: increased FasR expression; the predominance of Bax in relation to Bcl-2; the loss of mitochondrial membrane potential; AIF release; decreased expression of survivin (an antiapoptotic protein); and the activation of caspase-3. The selected pyrazolines were also found to be cytotoxic against neoplastic cells collected from the peripheral blood and bone marrow of patients with different subtypes of acute leukemia.

1. Introduction

The isolation of natural compounds as potential chemotherapeutic drugs is limited by their low-yield, as well as by the scarcity of their natural sources^{1,2}. In addition, some natural compounds are highly cytotoxic to non-neoplastic cells; thus, although presenting antitumor properties, their therapeutic use is limited³. For this reason, synthetic heterocyclic compounds are of great importance due to their wide applicability in many fields, including medicinal chemistry. Pyrazolines are important examples of biologically active molecules with a five membered ring containing two atoms of nitrogen and a double bond^{4,5}. Among the several biological properties of pyrazoline derivatives are the antimicrobial, antioxidant, anti-inflammatory and antitumor

activities⁵, including anticancer potential in cervix carcinoma (HeLa), and lung cancer (NCI-H522), among other cell lines^{6,7}.

Hematologic neoplasms are the most frequent cancer type in children, adolescents and young adults, and also present a high incidence in patients over 60 years of age^{8,9}. Acute leukemias (ALs) are a group of hematologic malignancies characterized by a blockage of normal differentiation and by the exacerbated clonal proliferation of a single myeloid or lymphoid progenitor¹⁰. Chemotherapy with cytotoxic and cytostatic drugs is the first therapeutic option against AL; however, it has several limitations, such as severe adverse effects and high relapse rates^{6,11}. In this perspective, since cancer is a major public health problem, the search for novel molecules that may be used as prototypes for the development of new drugs has motivated scientific researches in

* Corresponding author at: Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias (LOEH), Departamento de Análises Clínicas, Centro de Ciências da Saúde – Universidade Federal de Santa Catarina, 88040-900 Florianópolis, SC, Brasil.

E-mail addresses: nunesrj@ufsc.br (R.J. Nunes), maria.claudia.silva@ufsc.br (M.C. Santos-Silva).

<https://doi.org/10.1016/j.bmc.2018.12.012>

Received 31 August 2018; Received in revised form 28 November 2018; Accepted 6 December 2018

Available online 07 December 2018

0968-0896/ © 2018 Elsevier Ltd. All rights reserved.



Immunophenotyping for Diagnosis of Oral Lesions: Is It an Important Tool?

Alessandra Rodrigues de Camargo¹, Bruna Fischer Duarte^{2*},
Mariah Luz Lisboa¹, Chandra Chiappin Cardoso², Etiene de Andrade Munhoz¹,
Daniella Serafin Couto Vieira^{2,3}, Joanita Angela Gonzaga Del Moral⁴,
Maria Cláudia Santos-Silva² and Liliane Janete Grando¹

¹Dental Hospital Service, Federal University of Santa Catarina, Florianopolis, SC, Brazil.

²Postgraduation Program in Pharmacy, Federal University of Santa Catarina, Florianopolis, SC, Brazil.

³Pathology Service, Federal University of Santa Catarina, Florianopolis, SC, Brazil.

⁴Hematology Service, Federal University of Santa Catarina, Florianopolis, SC, Brazil.

Authors' contributions

This work was carried out in collaboration among all authors. Author ARC designed the study and wrote the first draft of the manuscript. Authors BFD, MLL, CCC, DSCV and JAGDM participated in the acquisition, analysis and interpretation of data and managed the literature searches. Authors MCSS and LJG participated in the initial conception and design of the study, analysis and interpretation of data, writing of the intellectual content of the manuscript and critical analysis of important intellectual content. All authors read and approved the final version of the manuscript.

Article Information

DOI: 10.9734/IJMPCR/2020/v13i130112

Editor(s):

(1) Dr. Sivapatham Sundaresan, SRM Institute of Science & Technology, India.

Reviewers:

(1) S.Murugan, The Tamilnadu Dr.M.G.R. Medical University Chennai, India.

(2) Juan Francisco Liuzzi Stamera, Oncological Service Hospital of the IVSS, Venezuela.

(3) Siti Noor Fazliah Mohd Noor, Universiti Sains Malaysia.

Complete Peer review History: <http://www.sdiarticle4.com/review-history/58482>

Case study

Received 15 April 2020
Accepted 22 June 2020
Published 30 June 2020

ABSTRACT

Aims: To report two cases of onco-hematologic diseases diagnosed by oral biopsy and subsequent flow cytometry immunophenotyping.

Presentation of Case: **Case 1:** A 36-year-old woman, HIV +, referred to the Hospital Dentistry Center presenting an extensive, ulcerated and painless lesion in the left maxilla involving teeth #24, #25, #26 and #27. A fine needle aspiration and incisional biopsy were performed and one sample

*Corresponding author: E-mail: brufduarte@gmail.com;



CARACTERÍSTICAS CLÍNICO-EPIDEMIOLÓGICAS DE PACIENTES PORTADORES DE CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE BOCA

CLINICAL-EPIDEMIOLOGICAL CHARACTERISTICS OF PATIENTS WITH ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA

Bruna Fischer Duarte¹
Daniella Serafin Couto Vieira²
Mariah Luz Lisboa³
Natália Marcelli Stefanés⁴
Liliane Jante Grando⁵
Maria Cláudia Santos da Silva⁶

RESUMO

Objetivo: avaliar os aspectos clínico-epidemiológicos de pacientes com carcinoma epidermóide de boca e orofaringe atendidos em um Hospital Universitário. Métodos: Foi realizado um estudo epidemiológico descritivo, transversal e retrospectivo dos casos de carcinoma de boca diagnosticados no período de janeiro/2013 a dezembro/2018, por meio da análise dos laudos anatomopatológicos e prontuários de atendimento. As variáveis analisadas foram: procedência, sexo, cor da pele, idade, uso de tabaco, consumo de bebidas alcoólicas, localização anatômica, sintomatologia, tempo de evolução, grau histológico, estadiamento e tratamento indicado. Para análise estatística descritiva, foram geradas as frequências absolutas e relativas das variáveis. Resultados: verificou-se maior acometimento de indivíduos do sexo masculino (79,51%), brancos (91,22%), na quinta década de vida, tabagistas e/ou etilistas; os sítios anatômicos mais acometidos foram os lábios (32,20%); tumores labiais apresentaram tempo de evolução de 22,5 meses e foram diagnosticados em estádios iniciais; tumores de cavidade oral e orofaringe apresentaram tempo de evolução de aproximadamente 5 meses e quase 50% foram diagnosticados em estádios tardios. Conclusão: Destaca-se na população estudada a alta incidência de câncer de lábio, o diagnóstico de tumores de cavidade oral e orofaringe em estádios avançados, além da demora em se procurar atendimento médico para esses tumores.

Palavras-chave: Neoplasias bucais. Neoplasias orofaríngeas. Perfil epidemiológico.

ABSTRACT

Objective: To evaluate the clinical and epidemiological aspects of patients with oral squamous cell carcinoma treated at a University Hospital. Methods: A retrospective, cross-sectional, epidemiological study of cases of oral carcinoma diagnosed between January 2013 and December 2018 was carried out by analyzing the anatomopathological reports and medical reports. The following data were collected: place of residence, sex, skin color, age, tobacco and alcohol use, cancer site, symptomatology, time

¹Mestre em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis, Brasil. E-mail: brufduarte@gmail.com

²Médica Patologista. Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis, Brasil. E-mail: daniellavieira.hu@gmail.com

³Mestre. Dentista. Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis, Brasil. E-mail: mariah.lisboa@gmail.com

⁴Mestre em Ciências Farmacêuticas. Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis, Brasil. E-mail: nataliamarcelis@gmail.com

⁵PhD. Mestre. Dentista. Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis, Brasil. E-mail: lilianejgrando@gmail.com

⁶PhD. Mestre. Farmacêutica. Universidade Federal de Santa Catarina – UFSC, Florianópolis, Brasil. E-mail: maria.claudia.silva@ufsc.br