



UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA  
CAMPUS REITOR JOÃO DAVID FERREIRA LIMA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

Nicole Lonni Nascimento

**Avaliação do brotamento tumoral em carcinoma epidermoide de boca e sua associação com a expressão imunohistoquímica das proteínas e-caderina e vimentina.**

Florianópolis  
2022

Nicole Lonni Nascimento

**Avaliação do brotamento tumoral em carcinoma epidermoide de boca e sua associação com a expressão imunistoquímica das proteínas e-caderina e vimentina.**

Dissertação submetida ao Programa de Pós-graduação da Universidade Federal de Santa Catarina para a obtenção do título de mestre em Diagnóstico Bucal.  
Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dr<sup>ª</sup>. Elena Riet Correa Rivero

Florianópolis

2022

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

Nascimento, Nicole Lonni

Avaliação do brotamento tumoral em carcinoma epidermoide de boca e sua associação com a expressão imunohistoquímica das proteínas e-caderina e vimentina. / Nicole Lonni Nascimento ; orientadora, Elena Riet Correa Rivero, 2022. 86 p.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Odontologia, Florianópolis, 2022.

Inclui referências.

1. Odontologia. 2. Carcinoma epidermoide de boca. 3. Brotamento tumoral. 4. Transição epitélio-mesênquimal. I. Rivero, Elena Riet Correa. II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

Nicole Lonni Nascimento

**Avaliação do brotamento tumoral em carcinoma epidermoide de boca e sua associação com a expressão imunoistoquímica das proteínas e-caderina e vimentina.**

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

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Adriana Etges

Universidade Federal de Pelotas

Prof. Dr. Ricardo Luiz Cavalcanti de Albuquerque Junior

Universidade Federal de Santa Catarina

Prof. Dr. Rogerio de Oliveira Gondak

Universidade Federal de Santa Catarina

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

---

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

---

Prof<sup>a</sup> Dr<sup>a</sup> Elena Riet Correa Rivero

Orientadora

Florianópolis, 2022

Este trabalho é dedicado à minha mãe, Luciana Lonni.

## AGRADECIMENTOS

A minha orientadora, Elena Riet Correa Rivero, por todas as oportunidades oferecidas, orientação constante e dedicação persistente ao meu aprimoramento como pesquisadora;

Aos professores constituintes da banca de qualificação: Adriana Etges, Alessandra Dutra da Silva e Filipe Modolo pela leitura cuidadosa, críticas construtivas e inestimáveis contribuições metodológicas e conceituais;

A CNPq pelas bolsas durante o período;

As colegas do Laboratório de Patologia Bucal, especialmente Andressa Fernanda Paza Miguel, pelos ensinamentos transmitidos de maneira paciente e didática durante o desenvolvimento das atividades laboratoriais;

A doutoranda Elis Ângela Batistella e a discente Julia Pedron, pelo apoio técnico e pelos momentos de descontração;

Ao professor Antonio Carrilho Neto por ter me ensinado, incentivado e me guiado por este caminho,

A minha mãe Luciana Lonni, que sempre foi uma fonte de inspiração e que me proporcionou oportunidades para que eu seguisse meus sonhos;

Ao meu marido, Caio Vinícius de Andrade Viana, por todo o incentivo, paciência, compreensão e parceria durante esta jornada;

Aos meus familiares pelo apoio em todos os momentos. Principalmente aos meus avós, Maria José e João Carlos e as minhas tias, Alaíde, Cecília e Tereza, que estão sempre torcendo pelas minhas conquistas;

A todos que, direta ou indiretamente, contribuíram para a realização deste trabalho.

*“Deveríamos fazer do comum algo de extraordinário e então nos surpreenderíamos que está muito perto de nós a fonte de prazer que buscamos em algum lugar distante e difícil. Estamos muitas vezes ao ponto de pisar na maravilhosa utopia, mas acabamos olhando por cima dela com nosso telescópio”.*

*(Ludwig Tieck)*

## RESUMO

**Introdução:** O carcinoma epidermoide de boca (CEB) é a neoplasia maligna mais comum na cavidade oral. A classificação clínica através do sistema TNM tem sido universalmente aceita ao longo dos anos como fator determinante para o prognóstico e estratificação em técnicas apropriadas de tratamento. No entanto, mesmo casos de CEB categorizados em estágios iniciais pela classificação TNM podem apresentar um comportamento agressivo com um resultado fatal. Isso enfatiza a necessidade de buscarmos novos fatores prognósticos que otimizem a estratificação de risco e guiem o plano de tratamento. A avaliação histopatológica de brotamentos tumorais (BT) tem se mostrado como um biomarcador prognóstico emergente reconhecido como um fator desfavorável no prognóstico de diversos carcinomas, no entanto, seu valor em CEB ainda não é completamente compreendido. Os BT são definidos como a presença de células cancerígenas isoladas ou em grupos de até 4 células presentes na frente de invasão. O BT representa uma alteração parcial em células epiteliais coesas para um fenótipo com motilidade, similar ao que ocorre no processo conhecido como transição epitélio-mesenquimal (TEM). A expressão diferenciada de diversas proteínas coordena a dinâmica da TEM, incluindo a diminuição da proteína e-caderina (e-CAD) e o aumento da proteína vimentina (VIM). Essa alteração nas propriedades das células malignas, de epitelial para mesenquimal, é considerada um pré-requisito para a invasão e metástase. **Objetivo:** determinar a significância prognóstica do BT em CEB e sua possível associação com a expressão das proteínas e-CAD e VIM. **Metodologia:** 47 amostras de CEB foram submetidas a marcação imunoistoquímica para pancitoqueratina, e-CAD e VIM. Todas as lâminas foram digitalizadas e analisadas com o software QuPath. Os casos foram submetidos à classificação histológica em relação à diferenciação neoplásica e à intensidade de BT, com auxílio da imunomarcação com anti-pancitoqueratina. O BT foi avaliado quantitativa e qualitativamente, classificadas em alta intensidade ( $>4$  células) ou baixa/ausente ( $\leq 4$  células). A mensuração do BT foi realizada em uma área correspondente ao aumento de 200x na frente de invasão e áreas de “*hot spot*”, em ressecções e biópsias incisionais respectivamente. Para avaliação das proteínas da TEM a mesma área de “*hot spot*” foi identificada para a e-CAD e VIM. A avaliação foi quantitativa (% de células positivas em relação ao número total de células) e qualitativa (classificada em fraca, moderada e forte). A análise estatística não paramétrica, realizada separadamente para o grupo das ressecções e das biópsias incisionais, investigou associações do BT e proteínas da TEM com as características clínicas e patológicas. A sobrevida foi avaliada pelo método de Kaplan Meier e a comparação entre as curvas pelo teste de *log rank*. A significância estatística estabelecida foi de 5%. **Resultados:** No grupo das ressecções (N=27) o alto número de BT, na análise quantitativa e qualitativa, apresentou associação com uma menor diferenciação histopatológica das amostras ( $p=0,033$  e  $p=0,05$ , respectivamente). A alta intensidade de BT também foi associada a uma maior expressão da proteína VIM ( $p=0,029$ ) e menor expressão da e-CAD ( $p=0,030$ ). A expressão de e-CAD nas ressecções foi associada a um menor tempo livre de recorrência ( $p=0,046$ ). O grupo das biópsias incisionais evidenciou uma correlação positiva moderada entre a expressão de VIM e a uma menor diferenciação histopatológica ( $\rho$  de Spearman= 0,628;  $p=0,003$ ). Um maior número de células positivas para e-CAD foi associada a presença de metástase em linfonodos regionais ( $p=0,031$ ). **Conclusão:** O BT está associado a alterações semelhantes a TEM, e evidências de TEM parcial foram encontradas em nosso estudo. Nossos dados fornecem indícios para o significado biológico e clínico da expressão de VIM e e-CAD como potenciais biomarcadores preditivos para identificar pacientes com metástase linfonodal ou prognóstico ruim no CEB.



**Palavras-chave:** Carcinoma epidermoide de boca; brotamento tumoral; transição epitélio-mesenquimal; e-caderina; vimentina.

## ABSTRACT

**Background:** Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the most common malignancy of the oral cavity. The clinical TNM classification has been the universally accepted determinant for prognosis and stratification into appropriate treatment strategies. However, even OSCC classified as early-stage tumours by the TNM classification may behave aggressively with a fatal outcome. This emphasizes the demand for novel prognostic factors to optimize risk stratification and guide treatment decisions. Despite the extensive association of tumor budding (TB) with tumor progression and unfavorable prognosis for diverse types of cancer, there are only limited reports on the role of TB in OSCC. TB is the presence of single carcinoma cells or small clusters (up to 4 cells) located at the invasive front of malignant epithelial tumors. TB represents a partial switch in epithelial cells from a cohesive to a mobile phenotype, similar to what happens in a process known as epithelial-mesenchymal transition (EMT). Differential expression of several proteins dictates the dynamics of EMT, including downregulation of E-cadherin (E-CAD) and upregulation of vimentin (VIM). This change in carcinoma cells properties from epithelial to mesenchymal, is considered a prerequisite for invasion and metastasis. **Aim:** Investigate the prognostic value of TB in OSCC, as well as determine its association with E-CAD and VIM expression. **Methodology:** We examined the expression of cytokeratin, E-CAD, and VIM in 47 OSCC samples. Glass slides were scanned, and the images were imported to the open-source software QuPath. TB was examined by quantitative and qualitative methods, using a two-tier system with a cut-off point of 4 tumor buds to classify in high (>4 cells) or low intensity ( $\leq 4$  cells). The cases were submitted to histological classification concerning neoplastic differentiation and BT intensity, with the aid of immunostaining with anti-pan-cytokeratin. The field area where the counting was performed corresponds to a 200x magnification at the tumor invasion front and hot spot areas for resection and biopsies, respectively. Immunoreactivity was performed at the same hotspot areas for each marker. Evaluation based on staining intensity was examined by quantitative (% of positive cells) and qualitative (weak, moderate, and strong) methods. Nonparametric statistics were performed, separately in resection and biopsy samples, to evaluate the correlation between TB, e-CAD, and VIM with clinicopathological parameters. The survival rate was estimated using the Kaplan–Meier method and compared by the log-rank test. A P-value <0.05 was considered statistically significant. **Results:** The resection group (N=27) showed that high-grade TB was correlated with the worst pattern of histopathological differentiation in quantitative and qualitative analysis ( $p=0,033$  and  $p=0,05$ , respectively). High-grade TB is associated with strong VIM expression ( $p=0,029$ ) and adversely low presence of e-CAD expression ( $p=0,030$ ). The analysis for disease-free survival also showed that e-CAD expression was correlated with poorer survival ( $p=0,046$ ) in the resection group. The incisional biopsy group showed a positive correlation between VIM expression and poor differentiation (Spearman's  $\rho=0,628$ ;  $p=0,003$ ). A higher number of e-CAD positive cells was also correlated with regional lymph node metastasis ( $p=0,031$ ). **Conclusion:** Tumor budding was associated with EMT-like changes, and at least partial EMT was found in our series. Our data provide evidence for the biological and clinical significance of e-CAD and VIM expression as potential predictive biomarkers for identifying patients with lymph node metastasis or poor prognosis in OSCC.

**Keywords:** Oral squamous cell carcinoma; tumor budding; epithelial-mesenchymal transition; e-cadherin; vimentin.

## LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Gradação Histológica OMS .....	<b>Erro! Indicador não definido.</b>	<b>5</b>
Figura 2 - Intensidade de brotamento tumoral (BT).....		46
Figura 3 - Padrão de avaliação para E-caderina. ....		47
Figura 4 - Padrão de avaliação para vimentina.....		48
Figura 5 – Avaliação de e-caderina (B) e vimentina (C) de acordo com a área de "hot spot" localizada na lâmina de citoqueratina.....		49
Figura 6 - Brotamento tumoral em citoqueratina (A) e hematoxilina-eosina (B). ....		62
Figura 7 - Expressão simultânea de e-caderina e vimentina. ....		64
Figura 8 - Expressão de vimentina na periferia das ilhas neoplásicas.....		66

## LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1 - Número de brotamentos e diferenciação histopatológica dos tumores.....	53
Gráfico 2 - Expressão das proteínas da TEM segundo a intensidade de brotamento tumoral em ressecções. ....	55
Gráfico 3 - Porcentagem de células expressando vimentina e intensidade de brotamento tumoral em ressecções. ....	56
Gráfico 4 – Expressão de vimentina e intensidade de brotamento tumoral em biópsias incisionais. ....	56
Gráfico 5 - Porcentagem de células expressando vimentina e intensidade de brotamento tumoral em biópsias incisionais.....	57
Gráfico 6 - Porcentagem de células positivas para vimentina em biópsias incisionais nos diferentes níveis de diferenciação histopatológica. ....	57
Gráfico 7 - Tempo de sobrevida e expressão de vimentina.....	58

## LISTA DE QUADROS

Quadro 1 - Alterações genéticas e moleculares identificadas no carcinoma epidermoide de boca (CEB).....	20
Quadro 2 - Alterações celulares e arquiteturais presentes nas displasias epiteliais. ....	22
Quadro 3 - Estadiamento TNM Cavidade Oral. ....	24
Quadro 4 - Regulação de proteínas durante a transição epitélio-mesenquimal (TEM).....	30
Quadro 5 - Características dos anticorpos utilizados.....	44
Quadro 6 - Classificação histopatológica do CEB. ....	45

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Teste Kappa para avaliação dos marcadores da transição epitélio-mesenquimal...49	49
Tabela 2 - Caracterização da amostra total..... 51	51
Tabela 3 - Expressão das proteínas e-caderina e vimentina. .... 54	54
Tabela 4 - Matriz de correlação de Spearman. .... 55	55
Tabela 5 - Presença de metástase em linfonodos regionais e expressão de e-caderina..... 58	58

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ADLH-1: aldeído desidrogenase 1  
AE1/AE2: anticorpo pan-citoqueratina  
AMAV: adesões de matriz associada à vimentina  
BT: brotamento tumoral (do inglês *tumor budding*)  
CEB: carcinoma epidermoide de boca  
CECP: carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço  
CEPON: Centro de Pesquisas Oncológicas  
CIT: células de iniciação tumoral  
DAB: diaminobenzidina  
DOI: profundidade de invasão (do inglês *depth of invasion*)  
DOPM: desordens orais potencialmente malignas  
e-CAD: E-caderina  
EBSERH: Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares  
FAC: fibroblastos associados ao câncer  
GLOBOCAN: Observatório Global do Câncer  
HE: hematoxilina-eosina  
HU: Hospital Universitário  
IBGE: Instituto Brasileiro Geografia e Estatística  
ICC: índice de correlação intraclasse  
INCA: Instituto Nacional de Câncer  
JA: junções Aderentes  
kDa: quilodalton  
MEC: matriz extracelular  
mRNAs: micro RNAs  
n-CAD: caderina neural mesenquimal  
NK: natural killer  
OMS: organização mundial da saúde  
PBS: tampão fosfato salino  
PDGF: fator de crescimento derivado de plaquetas  
PPGO: Programa de Pós-graduação em Odontologia  
SEC: sobrevida específica do câncer

SLR: sobrevida livre de recorrência

TCF: fator de células T

TEM: transição epitélio-mesenquimal

TGF- $\beta$ : fator de transformação do crescimento beta

TNM: tumor, nódulo, metástase

UFSC: Universidade Federal de Santa Catarina

VEGF: fator de crescimento vascular endotelial

VIM: vimentina



## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>15</b>
1.1	OBJETIVOS .....	16
1.1.1	<b>Objetivo geral.....</b>	<b>16</b>
1.1.2	<b>Objetivos específicos .....</b>	<b>16</b>
1.2	PERGUNTA NORTEADORA .....	17
<b>2</b>	<b>FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA.....</b>	<b>18</b>
2.1	CARCINOMA EPIDERMOIDE DE BOCA .....	18
2.1.1	<b>Fatores de risco .....</b>	<b>18</b>
2.1.2	<b>Patogênese molecular do CEB.....</b>	<b>19</b>
2.1.3	<b>Características clínicas .....</b>	<b>21</b>
2.1.4	<b>Características histopatológicas .....</b>	<b>21</b>
2.1.5	<b>Classificação histopatológica .....</b>	<b>22</b>
2.1.6	<b>Estadiamento do CEB .....</b>	<b>24</b>
2.1.7	<b>Tratamento e prognóstico .....</b>	<b>25</b>
2.2	BROTAMENTO TUMORAL.....	26
2.3	TRANSIÇÃO EPITÉLIO MESENQUIMAL .....	29
2.4	E-CADERINA.....	31
2.4.1	<b>Definição e função.....</b>	<b>31</b>
2.4.2	<b>Papel na transição epitélio mesenquimal e na carcinogênese.....</b>	<b>32</b>
2.4.3	<b>Relação com o carcinoma epidermoide de boca e brotamento tumoral.....</b>	<b>34</b>
2.5	VIMENTINA.....	35
2.5.1	<b>Definição e função.....</b>	<b>35</b>
2.5.2	<b>Papel na transição epitélio-mesenquimal e na carcinogênese.....</b>	<b>38</b>
2.5.3	<b>Relação com o carcinoma epidermoide de boca e brotamento tumoral.....</b>	<b>40</b>
<b>3</b>	<b>METODOLOGIA.....</b>	<b>43</b>

3.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO E ASPECTOS ÉTICOS E LEGAIS .....	43
3.2	SELEÇÃO DA AMOSTRA .....	43
3.3	COLETAS DAS INFORMAÇÕES CLÍNICAS .....	43
3.4	IMUNOISTOQUÍMICA .....	44
3.5	CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA DOS CARCINOMAS .....	45
3.6	AVALIAÇÃO DO BROTAMENTO TUMORAL .....	46
3.7	AVALIAÇÃO DA VIMENTINA E E-CADERINA .....	47
3.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	50
<b>4</b>	<b>RESULTADOS .....</b>	<b>51</b>
4.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA.....	51
4.2	RESULTADOS NA ANÁLISE MORFOLÓGICA .....	52
4.3	AVALIAÇÃO E-CADERINA E VIMENTINA .....	54
<b>4.3.1</b>	<b>Amostra total.....</b>	<b>54</b>
<b>4.3.2</b>	<b>Ressecção .....</b>	<b>54</b>
<b>4.3.3</b>	<b>Biópsias incisionais .....</b>	<b>56</b>
4.4	RELAÇÃO COM OS DESFECHOS .....	58
<b>5</b>	<b>DISCUSSÃO .....</b>	<b>59</b>
<b>6</b>	<b>CONCLUSÃO.....</b>	<b>69</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>70</b>
	<b>APÊNDICE A – Alterações histológicas em CEB .....</b>	<b>80</b>
	<b>APÊNDICE B – Ferramentas anotação e contagem .....</b>	<b>81</b>
	<b>APÊNDICE C - Distribuição das variáveis dependentes de acordo com características clínicas e patológicas da amostra total (N=47) .....</b>	<b>82</b>
	<b>APÊNDICE D - Valores estatísticos para relação entre as variáveis independentes e dependentes qualitativas.....</b>	<b>83</b>
	<b>APÊNDICE E - Valores estatísticos para relação entre as variáveis independentes e dependentes quantitativas. ....</b>	<b>84</b>
	<b>ANEXO A – Parecer consubstanciado .....</b>	<b>85</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O carcinoma epidermoide de boca (CEB) representa a neoplasia maligna epitelial de maior prevalência envolvendo cabeça e pescoço. As taxas de morbidade e mortalidade relacionadas ao CEB permanecem elevadas mesmo com os avanços no tratamento oncológico indicando a necessidade do desenvolvimento de marcadores prognósticos mais precisos e tratamento mais efetivos.

O estadiamento clínico da doença baseado no sistema tumor-nódulo-metástase (TNM) é um dos principais guias para o estabelecimento do prognóstico e tratamento do CEB. No entanto, variações na resposta ao tratamento oncológico e no curso da doença, mesmo em pacientes com características semelhantes, indica que esse sistema não consegue estratificar a heterogeneidade tumoral.

A análise da frente de invasão tumoral tem ganhado relevância por refletir melhor a interação tumor-hospedeiro e conseqüentemente a agressividade e o prognóstico do CEB. O biomarcador prognóstico emergente chamado brotamento tumoral (BT), ou do inglês “*tumor budding*”, presente na margem invasiva do tumor, representa a dissociação de células cancerígenas invasivas da massa tumoral principal. Esse processo de invasão é caracterizado pela alternância do fenótipo epitelial para o fenótipo mesenquimal, assemelhando-se aos eventos da transição epitélio-mesenquimal (TEM) que ocorrem na embriogênese e na regeneração tecidual.

Durante o processo de TEM as junções intercelulares são perdidas através da diminuição da expressão de proteínas como a E-caderina (e-CAD), uma molécula que desempenha um importante papel na adesão celular através de seus domínios extracelulares, citoplasmáticos e transmembrânicos. Concomitantemente com a diminuição na expressão de e-CAD, um fenótipo migratório se desenvolve por meio do aumento da expressão de vimentina (VIM), um filamento intermediário, reconhecido como marcador mesenquimal, que tem dentre suas funções manter a integridade do citoplasma, reparar a célula e estabilizar as interações que ocorrem no citoesqueleto. No câncer, a dinamicidade desse processo indica os primeiros passos para o crescimento invasivo e a metástase.

Na tentativa de melhor adequar o manejo individual dos pacientes, uma variedade de marcadores moleculares tem sido explorada para avaliar a progressão do CEB. A rede complexa de eventos que levam a carcinogênese e a progressão tumoral faz com que alguns

dos marcadores sejam frequentemente debatidos e por vezes os resultados achados são contraditórios.

Apesar de estudos recentes reconhecerem o BT como um fator prognóstico em outras malignidades, ele ainda não é utilizado como critério para a estratificação de risco do CEB devido ao desconhecimento do mecanismo molecular de funcionamento.

No intuito de esclarecer o processo de progressão tumoral, o objetivo deste estudo foi avaliar o valor prognóstico de BT em CEB e determinar sua correlação com biomarcadores moleculares da TEM, como a e-CAD e VIM.

## 1.1 OBJETIVOS

### 1.1.1 Objetivo Geral

Avaliar o valor prognóstico da presença de brotamento tumoral (BT) em carcinoma epidermoide de boca (CEB) e adicionalmente determinar sua correlação com a expressão imunohistoquímica dos biomarcadores moleculares da transição epitélio-mesenquimal, E-caderina e vimentina.

### 1.1.2 Objetivos Específicos

- Classificar os casos de CEB conforme a intensidade de BT em: baixa intensidade de BT ou ausência de BT ( $4 \leq$  focos de brotamento) e alta intensidade de budding tumoral ( $>4$  focos de brotamento);
  - Avaliar a presença de marcadores de TEM nos casos de CEB;
  - Analisar possíveis correlações entre a intensidade de BT e marcadores de TEM;
  - Analisar possíveis associações entre a intensidade de BT e a presença de marcadores de TEM com as variáveis clínicas dos pacientes;
  - Estabelecer a relação entre a intensidade de BT e a presença de marcadores de TEM com a gradação histológica dos casos de CEB;
  - Correlacionar a intensidade de BT e a presença de marcadores de TEM com os desfechos sobrevida dos pacientes e recorrência das lesões;

## 1.2 PERGUNTA NORTEADORA

Qual a relação entre a intensidade do brotamento tumoral, expressão de marcadores de TEM e sobrevida de pacientes em casos de carcinoma epidermoide de boca?

## 2 FUNDAMENTAÇÃO TEÓRICA

### 2.1 CARCINOMA EPIDERMOIDE DE BOCA

O carcinoma epidermoide de boca (CEB) é definido como a proliferação maligna dos queratinócitos presentes no epitélio de revestimento oral, representando 90% de todas as neoplasias malignas da cavidade oral<sup>1</sup>.

Estimativas realizadas pelo Observatório Global do Câncer (GLOBOCAN) indicam que a incidência mundial de câncer de lábio e da cavidade oral de 2020 a 2040 chegue a 535.157, tendo o continente asiático como primeiro colocado no ranking mundial representando 67% (362.155) dos novos casos. As taxas de mortalidade nesse mesmo período podem chegar a 261.254 casos<sup>2</sup>.

No Brasil, o Instituto Nacional de Câncer (INCA) estima que os números de novos casos de câncer de boca e orofaringe para cada ano do triênio 2020/2022 chegue a 15.190. Segundo esse levantamento, as taxas de incidência chegam a 11.180 casos para sexo masculino e 4.010 para o sexo feminino<sup>3</sup>. Esses dados colocam o Brasil em 18º no ranking mundial<sup>2</sup>.

#### 2.1.1 Fatores de risco

Dentre os principais fatores de risco para o desenvolvimento do CEB estão o álcool e o tabaco. Estudos apontam que mais de 72 componentes carcinogênicos presentes no tabaco estão associados com a mutação de diversos genes, perda do controle do ciclo celular, diminuição da apoptose e aumento da angiogênese.<sup>4</sup> Pacientes fumantes apresentam um risco sete a dez vezes maior para o desenvolvimento de CEB quando comparados a não fumantes.<sup>5</sup>

O consumo de álcool também causa danos ao material genético através da produção de acetaldeído resultante do metabolismo de espécies reativas de oxigênio.<sup>6</sup> Apesar de serem fatores de risco independentes, os efeitos mutagênicos do álcool e do tabaco ocorrem de maneira sinérgica aumentando para 15 vezes o risco de desenvolver CEB quando consumidos em conjunto.<sup>7</sup> Isso ocorre porque o álcool exacerba a permeabilidade da mucosa oral e age como solvente dos componentes do tabaco, aumentando seu potencial carcinogênico.<sup>7</sup>

As diferenças na incidência do CEB quando observamos regiões específicas, como a Ásia, refletem fatores associados com diferentes práticas culturais, por exemplo, o consumo do kit Betel.<sup>9</sup> A população indiana e taiwanesa consome em maior quantidade esses produtos, apresentando assim um risco significativamente aumentado para o desenvolvimento do CEB,

retratada pela alta incidência dos casos estimados pela GLOBOCAN no continente asiático.<sup>2,8</sup> Noz-de-areca, *Cannabis* e narcóticos também foram identificados como fatores de risco para o câncer oral.<sup>9</sup>

Além dos fatores citados, uma resposta imune inadequada do hospedeiro pode levar a uma predisposição ao desenvolvimento do CEB e/ou a um pior prognóstico, como pacientes infectados pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV)<sup>10</sup>, pacientes submetidos a transplantes de órgãos<sup>11</sup> e aqueles sob terapia imunossupressora.<sup>12</sup>

### 2.1.2 Patogênese molecular do CEB

O CEB é uma neoplasia maligna resultante de múltiplos eventos combinados, influenciados por características genéticas e pela exposição a agentes carcinogênicos. Os danos ao DNA podem ativar mutações ou ampliações dos oncogenes, responsáveis pela sobrevivência e proliferação celular.<sup>13</sup>

Em 2011 foram propostas as dez principais características centrais na progressão tumoral, sendo elas: manutenção de sinais proliferativos, evasão dos supressores naturais, evasão da destruição imune, ativação da invasão e metástase, inflamação promotora de tumor, imortalidade replicativa, indução da angiogênese, mutação e instabilidade genômica, resistência a morte celular e desregulação energética.<sup>14</sup>

Os oncogenes promovem a proliferação e a sobrevivência celular simultaneamente à inativação dos genes de supressão tumoral, envolvidos na inibição destes processos. Essas alterações são significativas por conferirem às células tumorais a capacidade de desenvolvimento autônomo e evasão de sinais inibidores de crescimento, resultando em uma atividade celular descontrolada.<sup>13</sup>

Concomitantemente ao aumento na quantidade celular e à invasão tecidual ocorre o processo de neovascularização, ponto essencial para manter o suprimento das células tumorais. As células carcinogênicas conseguem estimular o desenvolvimento de neovasos ocasionando a proliferação de células endoteliais para a formação tumoral.<sup>15</sup>

O conceito “campo de cancerização”, do inglês “*field cancerization*”, propõe que o tecido adjacente à origem do tumor também carrega características moleculares pré-neoplásicas que eventualmente podem ocasionar uma recorrência ou o desenvolvimento de um novo tumor primário.<sup>16</sup>

No câncer de origem epitelial, a ativação de oncogenes, a mutação de genes supressores tumorais, perda de heterozigose e instabilidade genômica são as principais

características moleculares observadas no campo de cancerização.<sup>17</sup> Essas células mutantes pré-cancerosas são conhecidas por possibilitar o desenvolvimento e expansão do campo neoplásico. É conjecturado que as células molecularmente alteradas substituam células epiteliais normais da mucosa, aumentando a susceptibilidade ao acúmulo de novas alterações genéticas e epigenéticas, desencadeando a tumorigênese.<sup>18</sup>

Os campos de cancerização têm sido caracterizados pela expressão mutada do gene de supressão tumoral TP53, que codifica a proteína p53. O gene TP53 é conhecido como “guardião do genoma”, pois apresenta um papel essencial no reparo de danos causados ao material genético e controle do ciclo celular. Células com a proteína p53 mutada formam aglomerados desorganizados, sugerindo sua natureza clonal, que ao se expandirem gradualmente perpetuam as mutações e permitem vantagens para a proliferação celular, formando um campo pré-neoplásico confluyente que desloca o epitélio normal.<sup>19</sup>

Mutações na enzima transcriptase reversa de telomerase também foram identificadas na maioria dos casos de CEB, representando cerca de 80% dos casos. O não funcionamento dessa enzima ocasiona uma instabilidade cromossômica e acarreta a desregulação do ciclo celular e a proliferação descontrolada.<sup>19</sup>

Mutações nos genes CDKN2A, CCND1, PIK3CA, PTEN e HRAS (quadro 1) são responsáveis pela desregulação do ciclo celular e pela imortalização das células, desempenhando papel importante na iniciação e progressão do CEB. Outro ponto chave constantemente indicado é a perda da heterozigose (ausência da região cromossômica que contém o gene, seja na parte materna ou paterna) dos cromossomos 3p, 8p, 9p (p16) e 17p (p53).<sup>19</sup>

Quadro 1 - Alterações genéticas e moleculares identificadas no carcinoma epidermoide de boca (CEB).

GENE	PROTEÍNA	ALTERAÇÃO	FUNÇÃO
CDKN2A	p16	Deleção ou inativação	Regula progressão do ciclo celular
CCND1	Ciclina D1	Amplificação	Permite a progressão do ciclo celular
PIK3CA	p110 $\alpha$	Amplificação	Ativação da cascata de sobrevivência
PTEN	Fosfatase homóloga à tensina	Deleção ou inativação	Aumenta a migração e sobrevivência celular, favorece a angiogênese
HRAS	H-Ras	Amplificação	Regula a divisão celular em resposta ao estímulo do fator de crescimento
NOTCH1	Notch 1	Perda de função	Regula a diferenciação da epiderme e homeostase

Fonte: adaptado de Li e colaboradores.<sup>19</sup>



Embora os avanços na biologia oncológica tenham elucidado alguns dos mecanismos moleculares do CEB, o prognóstico do câncer loco regional e metastático avançado aguarda melhorias.

### 2.1.3 Características clínicas

O CEB pode apresentar-se em diversas formas com características variando segundo o local do tumor primário, os fatores etiológicos e o estágio de desenvolvimento das lesões.<sup>1</sup> Tipicamente, as lesões em mucosa oral, quando em estágio avançado, são caracterizadas por úlceras, de bordas elevadas e que não cicatrizam, porém, quando em estágios iniciais as lesões apresentam-se clinicamente como uma leucoplasia e/ou eritroplasia.<sup>1,20</sup>

As leucoplasias são consideradas placas brancas que não podem ser caracterizadas clinicamente ou histopatologicamente como nenhuma outra desordem. Já as lesões eritroplásicas são áreas vermelhas ardentes que não podem ser identificadas como nenhuma outra desordem. Algumas lesões podem apresentar combinação entre áreas leucoplásicas e eritroplásicas, o que chamamos de eritroleucoplasia ou leucoeritroplasia, nomeando conforme o aspecto predominante.<sup>21</sup>

A leucoplasia e a eritroplasia são as principais lesões intraorais que compõem o grupo das desordens orais potencialmente malignas (DOPM) e constituem um grupo de interesse na detecção precoce do CEB.<sup>21</sup> As DOPM são definidas pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como um grupo de desordens onde o tecido epitelial apresenta um risco maior de transformação maligna quando comparado ao tecido normal devido à presença de displasia epitelial no histopatológico destas lesões, fato explicado na próxima seção.<sup>21</sup>

### 2.1.4 Características histopatológicas

Nas DOPM, a presença de displasia epitelial representa um maior potencial de progressão para o câncer quando comparada a um epitélio sem alterações displásicas.<sup>21</sup> A displasia epitelial inclui um conjunto de características anormais na proliferação, maturação e diferenciação das células epiteliais causadas pelo acúmulo de alterações genéticas que elevam progressivamente as chances de transformação em CEB.<sup>21</sup> O diagnóstico e a gradação das displasias epiteliais em leve, moderada ou severa (carcinoma *in situ*) é realizado com base nos critérios de alterações citológicas e/ou arquiteturais (apêndice A) presentes no componente epitelial do tecido (Quadro 2).<sup>21</sup>

Quadro 2 - Alterações celulares e arquiteturais presentes nas displasias epiteliais.

CRITÉRIOS CITOLÓGICOS	CRITÉRIOS ARQUITETURAI
Pleomorfismo nuclear e celular	Estratificação epitelial irregular
Alteração do tamanho nuclear e celular	Alteração na polaridade das células basais
Proporção núcleo/citoplasma alterada	Pérolas de ceratina
Figuras mitóticas atípicas	Mitoses superficiais anormais
Aumento no núcleo e tamanho dos nucléolos	Discratose
Hipercromatismo nuclear	

Fonte: adaptado de El Nagar e colaboradores.<sup>22</sup>

O CEB também apresenta alterações compatíveis com a displasia epitelial, porém, a invasão das células neoplásicas de origem epitelial no tecido conjuntivo adjacente é o ponto de diferenciação entre a displasia severa (carcinoma *in situ*) e o CEB propriamente dito.<sup>21</sup>

Um pré-requisito da transição do carcinoma *in situ* para carcinoma invasivo é a progressão para o tecido conjuntivo por meio do rompimento da membrana basal do epitélio e migração das células epiteliais em direção a lâmina própria. Durante este processo as células epiteliais passam por alterações fenotípicas, como perda de adesão e ganho de motilidade, evento conhecido como transição epitélio-mesenquimal (TEM).<sup>23</sup>

Um acompanhamento constante das lesões que compõem as DOPM pode identificar displasias epiteliais em estágios iniciais, evitando a progressão para CEB, porém a identificação dessas lesões ainda é um ponto insatisfatório tanto pela falta de campanhas preventivas que incentivem um acompanhamento odontológico periódico quanto pela falha na realização de um exame intraoral criterioso por profissionais da saúde.<sup>21,22</sup> Outro ponto é a necessidade de descentralização das campanhas para atingir um público populacional e profissional maior, promovendo uma maior consciência do problema do câncer de boca.

### 2.1.5 Classificação histopatológica

A classificação histopatológica do CEB foi publicada pela primeira vez por Broders<sup>24</sup> durante a análise histopatológica de 537 casos de carcinomas de lábio, onde o autor abordou as diferentes características de diferenciação entre os tumores. Segundo a classificação do autor, os tumores são divididos em grau I (até 25% das células indiferenciadas), grau II (25-50% das células indiferenciadas), grau III (50-75% das células indiferenciadas) e grau IV (75-100% das células indiferenciadas).<sup>24</sup>

Ao longo dos anos outros sistemas de classificação com maior complexidade foram apresentados considerando características multifatoriais relacionadas: aos tumores em si (diferenciação), ao hospedeiro (resposta inflamatória) e as interações na interface tumor/hospedeiro (padrões de invasão).<sup>25</sup>

Bryne e colaboradores, na tentativa de aprimorar a classificação tumoral com a capacidade de prever o comportamento biológico das malignidades orais, consideraram apenas a área mais invasiva do tumor, denominada frente de invasão tumoral, como o local a ser utilizado para a gradação histopatológica.<sup>26</sup> Existe um consenso de que a informação de valor prognóstico mais significativa está presente na frente invasiva do tumor, onde estão as células mais profundas e supostamente mais agressivas, com menor grau de diferenciação e maior grau de dissociação.<sup>26,27</sup> Outra modificação feita por Bryne foi a remoção do parâmetro morfológico número de mitoses. Esta alteração manteve o valor prognóstico do sistema de gradação e aumentou a reprodutibilidade.<sup>26</sup>

Em contramão a esse processo de evolução, a edição atual da OMS<sup>22</sup> aborda a classificação dos tumores de cabeça e pescoço de forma simplificada, baseando-se apenas no critério proposto por Brothers sem considerar outras características histopatológicas no comportamento biológico do CEB. Segundo a classificação sugerida pela OMS, o CEB pode ser graduado como: a) bem diferenciado, ou seja, muito similar ao epitélio de origem; b) pouco diferenciado, onde predominam células imaturas, queratinização mínima, presença de numerosas mitoses típicas e atípicas, características que tornam por vezes difícil a identificação do tecido de origem; c) moderadamente diferenciado quando as características estão entre os dois grupos citados.

Vários estudos<sup>28,29</sup> apontam que a classificação histológica possui pouca ou nenhuma relação com o prognóstico do paciente e a própria OMS reconheceu a limitação preditiva em seu sistema de classificação.<sup>29</sup>

A classificação da OMS<sup>22</sup> também afirma em sua última edição que “tumores bem diferenciados tendem a invadir em ilhas maiores”, porém essa afirmação não é uma regra visto que pequenos grupos de células tumorais também podem estar presentes em tumores bem diferenciados.<sup>25</sup> O fato desse sistema focar apenas na diferenciação tumoral pode ser a razão do seu baixo valor prognóstico. Uma maneira de solucionar este problema seria considerar também a dissociação, além da diferenciação tumoral.<sup>25</sup>

Um estudo realizado por Elseragy<sup>30</sup> propôs uma revisão no atual sistema de classificação histopatológico da OMS, incluindo o uso do brotamento tumoral (BT) como

fator prognóstico para o CEB assim como no carcinoma colorretal, como listado pela União Internacional de Controle do Câncer.<sup>31</sup>

### 2.1.6 Estadiamento do CEB

O sistema de estadiamento tumor, nódulo, metástase (TNM) é baseado no tamanho do tumor primário (parâmetro “T”), no envolvimento loco regional dos linfonodos (parâmetro “N”) e na presença de metástases distantes do local de origem do tumor (parâmetro “M”). Essa avaliação reflete a extensão do crescimento tumoral e é importante no planejamento do tratamento, estimativa do risco de recorrência e de sobrevida.<sup>25</sup>

A análise conjunta desses componentes permite a determinação do estadiamento da doença, como mostrado no Quadro 3. Os estadiamentos variam de I a IV e indicam o avanço progressivo da doença, no entanto, por considerar apenas a extensão anatômica da doença esse sistema também apresenta limitações.

Quadro 3 - Estadiamento TNM Cavidade Oral.

ESTÁGIOS	TUMOR	LINFONODO	METÁSTASE
ESTÁGIO 0	Tis*	N0	M0
ESTÁGIO I	T1	N0	M0
ESTÁGIO II	T2	N0	M0
ESTÁGIO III	T1, T2	N1	M0
	T3	N0-1	
ESTÁGIO IVA	T1, T2, T3, T4a	N2	M0
		N0-2	
ESTÁGIO IVB	Qualquer T, T4b	N3 Qualquer N	M0
ESTÁGIO IVC	Qualquer T	Qualquer N	M1

\*Tis: carcinoma *in situ*. Fonte: adaptado de O'Sullivan.<sup>31</sup>

As limitações do uso do sistema TNM no prognóstico do CEB são observados quando mesmo casos categorizados em seus estágios iniciais e tratados consoante aos protocolos preconizados evoluem para recorrências locais e metástases, muitas vezes levando o paciente a óbito.<sup>32</sup>

Na tentativa de realizar uma estratificação tumoral de maneira mais acurada, o sistema de classificação TNM passou por atualizações constantes desde a sua primeira publicação em 1968. Dentre as recentes alterações, comparando a sétima e oitava edição do

estadiamento TNM, a mais recente de 2017 inclui a profundidade de invasão (DOI, do inglês *depth of invasion*) e extensão extracapsular da metástase nodal.<sup>33</sup>

Os dois novos parâmetros adicionados alteraram principalmente a distribuição das categorias T e N, impactando no estadiamento do CEB e conseqüentemente no tratamento. Mattavelli e colaboradores apontaram que apesar de ganhos positivos provenientes das atualizações, o grupo classificado como T3 apresentou um padrão heterogêneo quanto à probabilidade e padrão das recorrências.<sup>33</sup>

### **2.1.7 Tratamento e Prognóstico**

O tratamento do CEB em estágios I e II compreende a cirurgia e/ou radioterapia, resultando usualmente em cura permanente. Em casos mais avançados (estágio III e IV) o uso da quimioterapia e/ou radioterapia adjuvante ao procedimento cirúrgico pode ser necessária.<sup>1</sup>

Anatomicamente, CEB localizado em língua e gengiva são os mais propensos a invadir músculos mais profundos e mandíbula, respectivamente. O alto potencial de causar metástase nos linfonodos cervicais também é característico do CEB devido à abundância de vasos linfáticos, com intensa anastomose na cavidade oral.<sup>34</sup> Esse acontecimento reduz as taxas de sobrevivência a 50%.<sup>35</sup> Em relação às metástases distantes, estas ocorrem normalmente no pulmão, porém, outros locais como mediastino, fígado e ossos também foram relatados. As metástases distantes diminuem as taxas de sucesso do tratamento oncológico, o que, leva a uma piora do prognóstico.<sup>36</sup>

O prognóstico do CEB é melhor em casos detectados precocemente, especialmente quando bem diferenciados e sem a presença de metástase.<sup>13</sup> Infelizmente essa não é a realidade, já que a maioria dos casos é diagnosticada tardiamente e a sobrevida em 5 anos não excede 12% dos casos, onde a maioria dos pacientes entra em óbito nos primeiros 30 meses da doença.<sup>37</sup>

Apesar dos avanços nas técnicas aplicadas ao tratamento, a sobrevida em 5 anos permanece em torno de 50%.<sup>37</sup> Uma limitação nas terapias com radiação e quimioterapia é a heterogeneidade intratumoral. Essa diversidade celular é causada tanto por alterações genéticas distintas quanto pelas propriedades pluripotentes e sua habilidade de transitar entre o fenótipo epitelial e mesenquimal.<sup>13</sup>

Na tentativa de mudar esse cenário, a terapia molecular e genética tem sido estudada em pacientes com CEB. Essas modalidades de tratamento limitam os efeitos colaterais

causados pelas formas convencionais e podem funcionar como um complemento no plano de tratamento.<sup>13</sup>

## 2.2 BROTAMENTO TUMORAL

Os brotamentos tumorais (BT), do inglês “*tumor budding*”, são caracterizados histologicamente como um conjunto de células malignas indiferenciadas no estroma tumoral, localizadas principalmente em proximidade com a frente de invasão tumoral.<sup>38</sup>

Imai foi o primeiro autor a descrever a relação deste fenômeno celular com o prognóstico do câncer de estômago.<sup>38</sup> Nas décadas seguintes, o BT foi correlacionado com um pior prognóstico em câncer de língua, laringe, mama, estômago, cólon, reto e cérvix.<sup>38</sup>

Um fenômeno compatível com a definição do BT também foi descrito de maneira independente em 1980 através de estudos em ratos com câncer de cólon induzido experimentalmente. Ao analisar a frente invasiva, evidenciou-se uma notável desorganização na morfologia tumoral com a desdiferenciação ao nível celular.<sup>38</sup> Essas mudanças resultaram em células tumorais isoladas da massa tumoral principal com um fenótipo uniforme. As características celulares observadas eram compatíveis com aquelas presentes durante a motilidade celular (perda das junções celulares e da membrana basal, presença de microfilamentos citoplasmáticos, versatilidade no formato celular e pseudópodes), levantando a hipótese de que essas alterações ocorrem com o intuito de favorecer a invasão dos tecidos adjacentes através da locomoção celular.<sup>38</sup>

Similarmente, amostras cirúrgicas obtidas de ressecções em paciente com câncer de cólon encontraram células malignas pobremente diferenciadas destacadas da frente de invasão, tanto individuais quanto em grupos.<sup>38</sup> As células agrupadas apresentaram grandes lamelas citoplasmáticas semelhantes a um bordo de ataque, enquanto células isoladas evidenciaram projeções semelhantes a lamelipódios, achados esses compatíveis com a aquisição de motilidade.<sup>38</sup>

A semelhança do processo de desenvolvimento do BT com os eventos da invasão e metástase levam a acreditar que o BT pode ser considerado um dos primeiros sinais histopatológicos do processo metastático.<sup>38</sup> A habilidade de migração das células que compõe os BT foi sugerida através de uma forte associação entre uma alta intensidade de BT e a presença de metástases em diversos carcinomas<sup>38</sup>, dentre eles o CEB.<sup>39,40</sup>

Além da capacidade migratória, a similaridade do BT com células-tronco tumorais ou células de iniciação tumoral (CIT), explica a capacidade de iniciação do câncer em locais

distantes.<sup>41</sup> A expressão de aldeído desidrogenase (ALDH1), um marcador de células-tronco tumorais, foi identificado em BT de carcinomas de nasofaringe<sup>42</sup> e em regiões de alta intensidade de BT em CEB<sup>43</sup> corroborando a hipótese de que as células que compõem o BT apresentam propriedades fenotípicas semelhantes as CIT que também possuem características da TEM.<sup>41</sup>

Outros estudos em amostras de CEB reportaram evidências da correlação entre a alta proliferação celular em regiões de alta densidade de BT<sup>44</sup>, e a expressão de CD44, proteína conhecida por regular a proliferação e migração celular.<sup>45</sup>

A capacidade de evasão dos ataques provenientes do sistema imune também é outra característica do BT, porém o exato mecanismo de interação entre o microambiente tumoral e a formação dos BT ainda não foi identificado.<sup>41</sup> Evidências recentes sugerem uma correlação inversa entre a presença de BT e a infiltração de linfócitos T CD8+, células conhecidas por induzir a morte celular, indicando o papel de defesa contra os BT no microambiente tumoral.<sup>41</sup>

O acúmulo de células T FOXP3+, indispensáveis para manutenção da tolerância e homeostase imune, possuem uma forte correlação com a alta intensidade de BT.<sup>46</sup> O mesmo ocorre com os macrófagos CD163+ (M2), conhecidos por promover a invasão tumoral e metástase.<sup>47</sup> Além disso, uma forte relação entre outros importantes componentes do microambiente tumoral, miofibroblastos estromais e BT em CEB foi identificada.<sup>48</sup>

O BT representa duas características importantes: a perda da adesão celular e a invasão ativa.<sup>49</sup> Seu valor prognóstico em diferentes carcinomas já foi demonstrado e dentre suas características atrativas no uso da rotina laboratorial estão a facilidade da visualização mesmo com a coloração de hematoxilina/eosina, associada a sua razoável reprodutibilidade.<sup>50</sup>

A avaliação do BT compreende uma metodologia heterogênea. As principais diferenças estão relacionadas a i) definição, incluindo a escolha de valores dos pontos de corte para o número de células que caracterizam os brotamentos, ii) o método utilizado na identificação do BT (coloração de hematoxilina/eosina ou imunoistoquímica com pancitoqueratina); iii) identificação final do BT após a exclusão de estruturas semelhantes, mas que não são brotamentos verdadeiros; iv) região de interesse escolhida (todo o tumor ou regiões de “*hot spot*”); v) ampliação e o tamanho do campo de visão; vi) quantificação da intensidade do BT (descritiva, semiquantitativa ou quantitativa); vii) escolha dos valores de corte do prognóstico e viii) aplicabilidade de cada método ao estágio da lesão primária. Diferentes combinações e adaptações dessas metodologias são encontradas na literatura.<sup>38</sup>

Quanto a categorização histológica do BT, algumas variações são encontradas na literatura. Segundo Morodomi os BT são definidos como células malignas indiferenciadas isoladas ou grupos  $\geq 5$  de células malignas mostrando uma estrutura microtubular.<sup>38</sup> Diferentemente, Ueno definiu o BT como células malignas isoladas ou focos  $\leq 4$  células malignas agrupadas no estroma na frente invasiva do tumor.<sup>38</sup> Alguns autores aumentaram o valor de corte em uma célula, definindo assim os brotamentos como células malignas isoladas ou focos de células malignas  $\leq 5$  agrupadas e estudos recentes tem favorecido essa definição.<sup>49,51</sup>

A intensidade do BT também pode ser classificada. Segundo Wang<sup>49</sup> a intensidade do BT é dividida em baixa intensidade ou ausente quando os focos de BT são  $\leq 4$  e alta intensidade quando um número  $>4$  está presente no estroma à frente da frente de invasão em regiões de “*hot spot*”.

Em CEB o BT é um forte preditor de um prognóstico desfavorável.<sup>39</sup> A alta intensidade de BT está correlacionada com uma menor sobrevida, especialmente em cinco anos.<sup>49,52</sup> Em língua, a alta quantidade de BT está relacionada com o tamanho do tumor, estadiamento clínico, gradação histopatológica e a presença de metástase para os linfonodos regionais.<sup>49</sup>

O BT foi considerado pela União de Controle Internacional do Câncer como um fator prognóstico adicional em carcinoma colorretal e como potencial fator prognóstico segundo as diretrizes da Sociedade Europeia de Oncologia Médica.<sup>38</sup>

Do ponto de vista histopatológico, o BT foi sugerido como um marcador que reflete o processo de TEM em diferentes tipos de câncer.<sup>41</sup> A diminuição de marcadores epiteliais concomitantemente ao aumento de marcadores mesenquimais observados nas áreas de BT indicam uma semelhança entre esta estrutura e a TEM.<sup>38</sup> No intuito de entender a semelhança entre ambos os processos, marcadores característicos da TEM foram utilizados no estudo do BT, no entanto, as evidências conectando esses mecanismos ainda são escassas.<sup>49,53</sup>

Forte evidências indicam que o BT pode ter um papel significativo na seleção da estratégia de tratamento para casos de CEB.<sup>41</sup> No entanto, o BT ainda não é considerado critério para estratificação de risco nesses casos. Essas limitações ocorrem por uma falta de exames estatísticos robustos com análises multivariadas e pelo desconhecimento do processo molecular que envolve a formação do BT.<sup>38</sup>



### 2.3 TRANSIÇÃO EPITÉLIO MESENQUIMAL

A transição epitélio mesenquimal (TEM) é um processo pelo qual as células epiteliais perdem suas características e adquirem atributos semelhantes às células mesenquimais. A TEM é mediada por fatores de transcrição nucleares que podem orquestrar alterações intracelulares como a diminuição de marcadores epiteliais e aumento de marcadores mesenquimais.<sup>54</sup>

O processo da TEM ocorre durante diversos mecanismos biológicos, presentes em três momentos. O primeiro ocorre durante o desenvolvimento embrionário, o segundo é associado com a regeneração do tecido adulto e o terceiro ocorre na progressão do câncer.<sup>55</sup> A transformação maligna em muitos carcinomas é associada com a perda da diferenciação epitelial e ganho do fenótipo mesenquimal.<sup>56</sup>

Evidências sugerem que a TEM talvez seja uma característica preditora da progressão do CEB.<sup>56,57</sup> A expressão de genes mesenquimais associada a progressão do câncer é acompanhada pelo aumento da motilidade celular e perda de particularidades epiteliais, incluindo: redução da adesão intercelular e perda da polaridade celular.<sup>58</sup> Essas propriedades da TEM são observadas não só em casos de CEB, mas também em casos de displasia epitelial, sugerindo que a identificação desses genes e seus produtos em estágios iniciais tem um papel importante no processo de malignização e podem ser potenciais biomarcadores deste mecanismo.<sup>56</sup>

Para que as células percam as características epiteliais e adquiram um fenótipo mesenquimal é necessária uma reorganização no citoesqueleto, acarretando um alongamento seguido de desconexão das células vizinhas.<sup>57</sup> Dentre os eventos que fazem parte deste processo temos: a perda das junções aderentes, a diminuição da expressão de citoqueratinas e E-caderinas (marcadores epiteliais específicos) e o aumento na expressão de fibronectina, N-caderina e vimentina (marcadores mesenquimais).<sup>55</sup> As células fenotipicamente mutadas passam então a romper a matriz extracelular, dissipando-se para tecidos adjacentes, constituindo um dos eventos mais importantes para o início da metástase.<sup>57</sup>

O controle da TEM é modulado por complexas vias moleculares que envolvem marcadores de superfície celular, marcadores do citoesqueleto, proteínas extracelulares, fatores de transcrição, marcadores epigenéticos e microRNAs.<sup>55</sup> O quadro 4 apresenta as principais alterações envolvidas no processo da TEM e suas funções.

Quadro 4 - Regulação de proteínas durante a transição epitélio-mesenquimal (TEM).

<b>PROTEÍNAS ELEVADAS</b>	<b>PROTEÍNAS DIMINUÍDAS</b>	<b>ALTERAÇÕES FUNCIONAIS</b>
N-caderina Vimentina Fibronectina Snail 1 e Snail 2 Twist Sox 10 Metaloproteinases de Matriz (2, 3 e 9)	E-caderina Desmoplaquina Citoqueratina Ocludinas	Aumento da migração Aumento da invasão Alongamento celular Resistência à apoptose Resistência à <i>anoikis</i>

Fonte: adaptado de Ribatti.<sup>55</sup>

O processo de TEM também pode ocorrer de maneira reversa, processo chamado de transição mesenquimal epitelial. Ambos os processos são intimamente conectados com a propriedade pluripotente das CIT durante a carcinogênese. A plasticidade epitelial depende do tecido e do contexto de sinalização existente no microambiente tumoral, ocasionando elevada resistência a diversas terapias anticâncer e o dificultando o entendimento do processo carcinogênico.<sup>57</sup> O papel da TEM na tumorigênese em diferentes tipos de câncer já foi demonstrado, dentre eles o câncer hepatocelular, colorretal, pulmonar, pancreático, de mama e oral.<sup>38,58</sup>

Além da atuação no processo de invasão da matriz extracelular (MEC), a TEM compromete a efetividade do sistema imune. A indução da TEM em células carcinomatosas, por componentes celulares do estroma, modifica a atividade de células da imunidade inata e adaptativa.<sup>59</sup> As células T CD8+, natural killer (NK) e macrófagos ativados M1 possuem propriedades antitumorais, porém, essas células ficam oprimidas por células com funções imunossupressoras como células T regulatórias, macrófagos M2 ativados e células supressoras derivadas de linhagem mieloide.<sup>59</sup> Outrossim, é a capacidade das células tumorais de escapar da imunovigilância durante a TEM por exibirem uma proteção contra lise mediada por linfócitos através da diminuição da apresentação de antígenos tumorais, como mostrado in vitro em carcinoma de células mamárias.<sup>60</sup> Em conjunto, essas alterações favorecem a progressão tumoral.<sup>58</sup>

É importante ressaltar que a TEM não é um sistema binário que se resume na troca de um fenótipo epitelial para fenótipo mesenquimal, mas sim, um estado intermediário, que é ditado conforme o microambiente.<sup>60</sup> Uma variedade de biomarcadores tem sido associada à TEM, dentre eles estão a vimentina (VIM) e a E-caderina (e-CAD).

## 2.4 E-CADERINA

### 2.4.1 Definição e função

As caderinas clássicas compreendem uma grande família de glicoproteínas de adesão transmembrana que contêm cinco domínios extracelulares, cálcio dependente, responsáveis por interações homotípicas e uma cauda citoplasmática que interage com vários efetores para transdução de sinais físicos e bioquímicos para a célula.<sup>61,62</sup>

As caderinas são reconhecidas como tipo I e tipo II, baseada na presença da sequência de aminoácidos histidina-alanina-valina no primeiro domínio extracelular. Embora as caderinas tipo I tenham sido inicialmente nominadas segundo o tipo celular no qual eram expressas, um novo consenso definiu a nomenclatura como CDH1 (E-caderina), CDH2 (N-caderina), CDH3 (P-caderina), CDH4 (R-caderina), e CDH15 (M-caderina).<sup>62</sup>

A E-caderina (e-CAD), uma glicoproteína do tipo I, é considerada o protótipo da família das caderinas devida a sua extensa caracterização em condições normais e patológicas. Uvomorulina, L-CAM, cell-CAM 120/180 ou Arc-1, também são sinônimos dessa representante.<sup>63</sup>

O gene CDH1 localizado no cromossomo 16q22.1 codifica polipeptídios precursores das moléculas de e-CAD que desempenham um papel importante na morfogênese e na embriogênese.<sup>61</sup> O precursor polipeptídico de 135 kDa é processado proteoliticamente no Complexo de Golgi a um polipeptídio maduro de 120kDa. A glicoproteína é então transportada do Complexo de Golgi para a superfície celular onde atua como um “zíper” de adesão intercelular.<sup>62</sup>

A adesão mediada pela e-CAD é dinâmica e regulada por diversas vias de transdução de sinal. Existem evidências de que as caderinas não são apenas alvos para vias de sinalização que regulam a adesão. Essas glicoproteínas também enviam sinais que regulam processos celulares básicos, como migração, proliferação, apoptose e diferenciação celular.<sup>61</sup>

Os domínios extracelulares e a cauda citosólica da e-CAD formam um núcleo de mecanotransdução e sinalização, chamado de junções aderentes (JA). As JA são responsáveis por ligar os contatos intercelulares a estruturas externas, como o citoesqueleto de actina e os microtúbulos.<sup>61</sup> Esse processo ocorre em conjunto com as cateninas, mediadoras essenciais de sinais mecânicos e bioquímicos.<sup>64</sup>

Em tecidos epiteliais normais, os quais apresentam intensa expressão de e-CAD, a  $\beta$ -catenina é sequestrada na membrana celular, prevenindo a sua liberação no citoplasma e

posterior entrada no núcleo. Sem acesso ao núcleo, a  $\beta$ -catenina não consegue se ligar a família de proteínas de ligação ao DNA (como o fator intensificador de linfóide e de células T), impedindo assim ativação da via de sinalização Wnt, um dos caminhos pelo qual a carcinogênese tem início.<sup>64</sup>

A evidência da função direta da e-CAD na adesão intercelular foi provida por um experimento onde o DNA complementar da e-CAD foi clonado e expresso em fibroblastos, células que normalmente não expressam essa glicoproteína. Esse experimento induziu alterações morfológicas, tendo como resultado células que cresceram em grupos coesos em ambientes com condições cálcio dependente.<sup>62,64</sup>

Durante o desenvolvimento embrionário a expressão da e-CAD começa em estágios iniciais, apresentando papel-chave na adesão dos blastômeros e na compactação de embriões. A compactação no período da mórula é induzida pela adesão de filopódios mediados pela e-CAD e tração de blastômeros vizinhos através da miosina.<sup>65</sup> Um estudo que promoveu a inibição em homozigose do gene CDH1 em ratos ocasionou a letalidade embrionária causada por uma falha na formação do trofotoderma (camada celular responsável pela formação dos anexos embrionários), evidenciando a importância do papel da e-CAD na embriogênese.<sup>62</sup>

#### **2.4.2 Papel na transição epitélio mesenquimal e na carcinogênese**

A depleção ou diminuição da expressão de e-CAD é um dos principais eventos relacionados a TEM, processo que ocasiona a perda da adesão célula-célula e está relacionado a progressão do câncer. As vias de sinalização de TGF- $\beta$ , via Wnt e Src além de modular a expressão de e-CAD ativam genes que tem como produto proteínas que favorecem as adesões mesenquimais, causando assim uma alteração no fenótipo celular.<sup>66</sup>

Normalmente a análise imunistoquímica em tecido epitelial normal e tumores benignos apresenta uma marcação homogênea para a e-CAD, no entanto, em tumores malignos a expressão torna-se heterogênea, com alterações quantitativas e qualitativas na marcação. A perda de função da e-CAD é um dos maiores fatores contribuintes para progressão do câncer, uma vez que a maioria dos tumores sólidos são carcinomas de origem epitelial.<sup>64</sup>

A função do gene da e-CAD pode ser alterado em níveis genéticos e/ou epigenéticos. Mais comumente, a expressão de e-CAD é reduzida via alterações epigenéticas em vários níveis que incluem a metilação do promotor e modificações de histonas, condensando a cromatina e limitando o acesso aos fatores de transcrição reguladores *cis*.<sup>64</sup> Alguns exemplos

de alterações genéticas do CDH1 incluem as mutações inativadoras e perda de heterozigose encontradas em carcinoma lobular infiltrante de mama,<sup>67,68</sup> bem como mutações heterozigóticas nas linhagens germinativas que aumentam o risco ao longo da vida do desenvolvimento de câncer gástrico difuso e câncer de mama lobular.<sup>69</sup> No entanto, a mutação da sequência codificante do gene CDH1 ocorre apenas na minoria dos casos de disfunção da e-CAD no câncer.<sup>70</sup>

A regulação negativa da expressão de e-CAD favorece o aumento da expressão da N-caderina (n-CAD), resultando em fenótipos com comportamentos divergentes. Células com maior expressão de n-CAD, apresentam um rearranjo do citoesqueleto que alavanca o estado de mobilidade.<sup>71</sup> Este fato é complementado pelo ganho de outros marcadores mesenquimais (tais como a VIM, fibronectina) resultando em uma perda da associação com as células epiteliais e aumento da afinidade por componentes do estroma, facilitando a invasão através da MEC. Nas células tumorais a troca entre e-CAD por n-CAD é um papel-chave na sobrevivência, crescimento, invasão e metástase.<sup>72</sup>

Além do papel na movimentação celular, a diminuição na expressão de e-CAD ou sua translocação da membrana plasmática para o citoplasma permite o acesso da  $\beta$ -catenina ao núcleo ativando fatores transcricionais que induzem eventos relacionados a tumorigênese, dentre eles o aumento da proliferação celular, escape da apoptose e aumento do potencial invasivo.<sup>70,73</sup>

A diminuição ou perda da expressão do conjunto e-CAD e  $\beta$ -catenina indica um prognóstico desfavorável no câncer de pulmão de não pequenas células (74). Em câncer de próstata com fenótipo invasivo a diminuição de e-CAD influencia na invasão local, disseminação sanguínea e recorrência.<sup>75</sup>

O gene da e-CAD (CDH1) também tem sido considerado um potente supressor tumoral porque sua regulação negativa é frequentemente encontrada em malignidade de origem epitelial. Uma das razões é a importância da e-CAD na manutenção do fenótipo epitelial e da homeostase do tecido por várias vias de sinalização.<sup>76</sup>

No entanto, nos últimos anos foram descritos papéis paradoxais da e-CAD na progressão de vários tipos de câncer. Embora o paradigma atual da aquisição de um fenótipo invasivo tenha sido associado à perda de e-CAD durante o processo de TEM, estudos em vários tipos de carcinoma mostram que os tumores são bastante heterogêneos e perda de e-CAD nem sempre está associada ao aumento do comportamento invasivo. Da mesma forma, a

manutenção da expressão desta glicoproteína não é prejudicial ao processo de invasão e metástase.<sup>77</sup>

A análise histopatológica de espécimes de pacientes com câncer colorretal, de mama, câncer de pulmão, melanoma, carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (CECP), câncer de tireoide e carcinoma cístico adenoide das glândulas salivares indicaram que o processo de invasão ocorre em aglomerados celulares, processo denominado “invasão coletiva”.<sup>78</sup> A invasão coletiva é caracterizada por um processo de invasão polarizada e manutenção da adesão célula a célula no grupo celular invasor, mantendo as células tumorais conectadas. Essas células retêm a expressão de e-CAD assim como tem sido observado em células metastáticas. Essas informações levantam a hipótese que as células tumorais apresentam um estado híbrido entre as características epiteliais e mesenquimais, o que é chamado de TEM parcial.<sup>78</sup> Esses eventos explicam por que apenas a perda da e-CAD não é suficiente para evocar as alterações associadas a TEM.

A expressão da e-CAD tem sido foco, também, no estudo de novos métodos de tratamento. O papel da TEM na tolerância de células neoplásicas às drogas utilizadas no tratamento foi documentado através do aumento da resistência à apoptose.<sup>64</sup> Além de diminuir o potencial de invasividade e de metástase das células cancerígenas, os micro RNA (mRNAs) que aumentam a expressão de e-CAD, tem demonstrado resultados promissores no combate da resistência a fármacos através da redução simultânea dos sinais pró-sobrevivência fornecidos pela TEM.<sup>79</sup>

Em células de câncer de mama, a introdução ectópica de pré-miR-200b ou pré-miR-200c em uma linhagem celular altamente invasiva e resistentes a fármacos, diminuiu significativamente a invasividade celular e aumentou a sensibilidade a doxorrubicina através do aumento da expressão de genes da via apoptótica p53. Assim, a regulação pós-transcricional da e-CAD permite a reversão do processo de TEM.<sup>79</sup>

### **2.4.3 Relação com o carcinoma epidermoide de boca e brotamento tumoral**

A ausência da e-CAD permite que as células tumorais transgridam o limite da membrana basal e disseminem-se através do tecido adjacente.<sup>58</sup> Isso se torna claro frente a observação de que a perda de e-CAD é progressiva à medida que a gravidade da lesão intraepitelial avança, como foi observado em CECP.<sup>80</sup>

Ren e colaboradores<sup>81</sup> realizaram uma revisão sistemática com metanálise para avaliar o valor prognóstico da e-CAD em CECP. O resultado apontou que a alta expressão do

gene da e-CAD é um fator prognóstico positivo resultando em uma melhor sobrevida geral e sobrevida livre de doença, no entanto, o autor ressalta que essa apuração deve ser interpretada com cautela devido a algumas limitações do estudo.

Em CEB a diminuição da expressão de e-CAD é associada a um fenótipo mais agressivo e a um pior prognóstico.<sup>82</sup> A ínfima expressão da e-CAD em CEB foi associada com o padrão histológico invasivo e com a metástase para os linfonodos cervicais. Em análise univariada e multivariada, esse padrão de expressão da e-CAD mostrou ser um indicativo de menor período livre da doença e menor tempo de sobrevida.<sup>82</sup>

O BT também parece estar correlacionado com diminuição na expressão de e-CAD bem como a perda da expressão de moléculas de adesão das células epiteliais em carcinoma colorretal. Esse fenômeno assemelha-se a eventos primordiais no processo de TEM, iniciando os primeiros passos da carcinogênese: destruição da membrana basal e perda das adesões intercelulares.<sup>58,83</sup>

Em carcinoma epidermoide localizado em língua, a expressão de e-CAD estava significativamente reduzida em células localizadas no fronte de invasão tumoral e em células localizadas no BT quando comparadas àquelas localizadas nas porções centrais e superficiais das amostras do tumor.<sup>49</sup> A diminuição da expressão de e-CAD nas regiões citadas está associada ao aumento na expressão de VIM, sugerindo que as células tumorais localizadas no BT sofreram TEM, fato associado a um maior potencial metastático.<sup>49</sup>

A e-CAD é significativa nos diferentes fenótipos do câncer e o modo de ação no contexto da invasão tumoral e metástase ainda precisa ser totalmente elucidado. Embora a maioria dos estudos atuais tenha revelado que a expressão alterada da e-CAD durante a TEM é associada à aquisição de fenótipo metastático, fica evidente que o microambiente local está criticamente envolvido na invasão e metástase do câncer.

## 2.5 VIMENTINA

### 2.5.1 Definição e Função

A vimentina (VIM) é uma proteína multifuncional composta por 466 aminoácidos e que possui alto grau de conservação evolutiva nos vertebrados, sugerindo importantes participações em papéis fisiológicos.<sup>84</sup> A VIM é a principal proteína que compõe o grupo dos chamados filamento intermediários formando uma rede complexa distribuída pelo citoplasma das células mesenquimais.<sup>85</sup>

No desenvolvimento dos ratos foi identificado que a VIM emerge inicialmente em células com alta capacidade migratória, mais especificamente, quando o embrião ainda é composto por apenas duas camadas epiteliais e as células do ectoderma começam a migrar em direção a fenda mesodérmica. Nestas primeiras células mesenquimais os genes da queratina são inativados e, contrariamente, os genes da VIM são ativados.<sup>85</sup> Ainda no mesmo estudo observou-se que a expressão pós-natal do gene codificador da VIM é restrito a fibroblastos, células endoteliais, linfócitos e diversas células especializadas no timo e no cérebro.<sup>85</sup>

O primeiro experimento realizado décadas atrás em ratos geneticamente modificados com a inativação do gene da VIM foi descrito como ausente de fenótipo,<sup>85</sup> o que levou os pesquisadores a uma errônea conclusão de que essa proteína não desempenhava funções fisiológicas de grande importância. No entanto, estudos posteriores demonstraram o papel da VIM em múltiplas funções celulares relacionadas a manutenção da pluripotência, diferenciação, proliferação, adesão, migração e invasão.<sup>85</sup>

Juntamente aos microtúbulos e filamentos de actina, a VIM forma o citoesqueleto. Seu funcionamento garante a manutenção da forma celular, integridade do citoplasma e a estabilização de interações citoesqueléticas.<sup>85</sup> Atualmente já é evidente na literatura que células móveis e invasivas apresentam uma maior expressão de VIM e estudos demonstram que esse fenômeno ocorre devido à interação desta proteína com demais componentes celulares.<sup>85</sup>

A VIM consegue orquestrar rearranjos no citoesqueleto e sinais de mecanotransdução para promover a migração celular. Para que o movimento celular ocorra de maneira direcionada, um pré-requisito é a manutenção da polaridade celular, realizada pela atuação conjunta dos microtúbulos e da VIM.<sup>84</sup> Os microtúbulos, com sua alta taxa de *turn-over*, estabilizam a polaridade celular durante o movimento com a VIM que atua como guia direcional aos microtúbulos recém-formados no processo de rotatividade.<sup>86</sup>

A migração celular também depende dos filamentos de actina para formar protrusões (como lamelipódios e filopódios) à medida que se reorganizam em feixes direcionados, permitindo a propulsão celular no substrato.<sup>86</sup> A VIM faz parte deste processo, interagindo com os filamentos de actina direta ou indiretamente (via proteína plectina).<sup>87</sup>

Além do ganho de motilidade, o aumento na expressão de VIM em células epiteliais induz a alterações no formato celular, perda das junções intercelulares e aumento da troca das adesões focais. Outra consequência é o aumento da elasticidade celular, protegendo contra o estresse mecânico, como, por exemplo, a compressão.<sup>88</sup> O ganho dessa característica é



essencial para que as células tumorais submetidas a forças compressivas, à medida que se multiplicam de maneira descontrolada em um espaço limitado, mantenham suas atividades essenciais. Além disso, essa característica favorece a migração e invasividade celular efetiva em ambientes de alta densidade celular.<sup>89</sup>

A VIM atua também na regulação das adesões celulares através da interação com integrinas. As integrinas são receptores transmembrana que medeiam a interação intercelular com o meio extracelular através de seus domínios extracelulares, permitindo o funcionamento da mecanotransdução através de sua conexão com o citoesqueleto.<sup>90</sup>

Estruturas chamadas de adesões de matriz associada à vimentina (AMAV) são locais de onde VIM e actina estão conectadas às integrinas e onde ocorre a ligação de proteínas, como vinculina e plectina. Durante a migração, as AMAV são ativamente montadas e desempenham uma função semelhante às adesões focais, tendo seu tamanho e estabilidade regulados pela VIM.<sup>89,90</sup>

Em células onde a integrina  $\alpha_2\beta_1$  está presente juntamente as AMAVs foi identificado que essas estruturas funcionaram como um intermediário transitório durante a adesão e que a plectina não estava associada a essas estruturas.<sup>91</sup> A integrina  $\alpha_2\beta_1$  reconhece colágeno e laminina dependendo do tipo celular. Células epiteliais não transformadas conseguem reconhecer ambos ligantes, porém quando expressam a VIM elas reconhecem apenas o colágeno. Isso sugere que a VIM pode regular a interação dos receptores de integrina através da modulação da afinidade e da arquitetura do sítio de ligação.<sup>90</sup>

A VIM demonstra uma capacidade de promover um sítio de ligação com o receptor do ácido hialurônico, um glicosaminoglicano que compõe a maior parte da MEC.<sup>85</sup> A ligação ocorre através do receptor CD44 que caracteriza um dos principais locais de adesão celular à matriz. A VIM promove um sítio de ligação direto para CD44 em sua parte N-terminal e o aumento da expressão de ácido hialurônico foi correlacionada ao aumento dos níveis de VIM, sugerindo sua influência na adesão celular com o estroma.<sup>85</sup>

Com o aumento da expressão da VIM pelas células tumorais, novas interações positivas e dinâmicas com o estroma ocorrem à medida que a neoplasia evolui. Tais interações representam uma violação da fronteira normal do tecido que fisiologicamente previne a mistura de células de diferentes origens, como as epiteliais e mesenquimais.

### 2.5.2 Papel na transição epitélio-mesenquimal e na carcinogênese

Em situações especiais a VIM é exibida por células não mesenquimais, como em células malignas de origem epitelial. A medida que as células perdem sua orientação tridimensional elas expressam VIM, que como citado anteriormente, é considerado um dos principais marcadores da TEM.<sup>85</sup>

Durante a TEM as células epiteliais passam por alterações funcionais e comportamentais para que ocorra a diferenciação em células mesenquimais. Contudo, ainda não foi esclarecido se o funcionamento da VIM contribui para a expressão padrão de genes responsáveis pelo fenótipo TEM ou se a expressão do gene VIM é somente resultado dessa transição.<sup>85</sup>

A expressão da VIM confere às células um formato mais plano, fusiforme e alongado que é característico de células mesenquimais.<sup>89</sup> Outra característica é a interação com microtúbulos e demais proteínas motoras, promovendo a motilidade celular e o comportamento invasivo, como explicado na seção anterior.<sup>84</sup>

Estudos apontam que a super expressão de VIM parece estar correlacionada a um pior prognóstico em diversos tipos de câncer e uma das razões é devido a sua habilidade de promover a TEM através do aumento de fatores de transcrição relacionados a este fenômeno (como o Slug) e através da supressão de proteínas adesivas como a e-CAD.<sup>92</sup> Os resultados apresentados por Liu e colaboradores indicam que a expressão de VIM funciona como um desencadeador de processos da TEM mediados pelo fator de transcrição Slug.<sup>93</sup>

Caso essa expressão de VIM não ocorresse nas células epiteliais malignas, não haveria a possibilidade de coordenação das redes que compõem o citoesqueleto para a formação de adesões focais estáveis e com uma arquitetura apropriada, impedindo assim que as células cancerígenas tivessem polaridade e força celular suficiente para posterior tumorigênese.<sup>93</sup>

Por fim, fica claro que o papel da VIM na TEM de células neoplásicas malignas é a de manutenção da integridade celular, coordenação a reorganização do citoesqueleto para formar a polaridade celular, ganho da motilidade e reforçar a geração de tensão celular, facilitando o processo de migração em diversos tecidos.<sup>94</sup>

A expressão elevada de VIM já foi conectada a diversas condições patológicas, dentre elas a transformação maligna e a metástase. É importante lembrar que a VIM tem sido usada por décadas como um marcador clínico da TEM, um processo essencial para a disseminação das células tumorais.<sup>85</sup> As observações iniciais apontaram que a expressão do

gene da VIM era observado principalmente em células proliferativas e indiferenciadas, o que mais tarde foi conectada a outros estudos indicando sua ligação com a transformação maligna e a disseminação metastática.<sup>85</sup>

A descaracterização das células que inicialmente eram coesas, justapostas e sem motilidade indicam um rompimento na homeostase tecidual. As alterações bioquímicas que ocorrem na TEM conferem às células um aumento da capacidade migratória, invasividade, resistência a apoptose e produção elevada de componentes da MEC. O rompimento da membrana basal e uma afinidade maior dessas células com o estroma indicam as primeiras etapas do processo carcinogênico.<sup>93</sup>

No câncer de pulmão, a expressão de VIM foi identificada em carcinomas pulmonares de células grandes e adenocarcinomas pulmonares bem diferenciados.<sup>95</sup> A presença desta proteína também foi associada com metástases em carcinomas pulmonares de não pequenas células e a ausência de diferenciação celular. O aumento na expressão da VIM nesse câncer é um fator prognóstico que indica uma menor sobrevida.<sup>95</sup>

Estudos mais recentes em casos de adenocarcinoma pulmonar mostraram que a superexpressão de VIM em fibroblastos associados ao câncer (FAC) é um pré-requisito para a disseminação em estágios iniciais, indicando a participação da VIM no processo de promoção da capacidade carcinogênica dos FAC no microambiente tumoral.<sup>96</sup>

O câncer de mama também foi relacionado com a superexpressão de VIM, principalmente em casos com um comportamento invasivo agressivo e estão associados com a migração de células mamárias epiteliais.<sup>97</sup>

Nos casos de melanoma a VIM é uma componente chave para a invasão celular e metástase. Estudos indicaram que o aumento da VIM é um indicador hematogênico da metástase e que, por isso, ela pode agir como um preditor clínico, individualizando as opções de tratamento.<sup>98</sup>

No câncer de próstata as análises *in vivo* de células epiteliais a VIM mostrou-se essencial para a manutenção da homeostase dos ácinos presentes na próstata. Essa alteração sugere uma alta atividade tumorigênica.<sup>99</sup> Além disso, o estudo mostrou que a VIM é na movimentação da integrina  $\beta 1$  para a projeção invasiva da célula, uma condição migratória necessária para a metástase. A elucidação desse processo também permitiu a sugestão de novos tratamentos que bloqueiem essa interação integrina-VIM na tentativa de evitar a ocorrência de metástases.<sup>100</sup>

Nos tumores do trato gastrointestinal, o aumento dos níveis de VIM estão geralmente associados a uma maior agressividade. Em casos de câncer colorretal, a expressão desta glicoproteína foi correlacionada ao estágio de progressão neoplásica das células cancerígenas.

101

Outros tipos de câncer também foram conectados a expressão excessiva de VIM, como, por exemplo, alguns tipos de linfoma, carcinomas endometriais, carcinomas cervicais, tumores do sistema nervoso central, carcinoma papilífero de tireoide e carcinoma renal de células claras. Em resumo, a expressão de VIM em vários tipos de células cancerígenas e FAC parecem estar conectados com a progressão maligna e a resistência a tratamentos.<sup>85</sup>

### 2.5.3 Relação com o carcinoma epidermoide de boca e brotamento tumoral

A expressão de VIM em displasias orais e sua relação com TEM foi estudada por Chaw<sup>56</sup> que encontrou aumento na expressão de VIM e  $\beta$ -catenina à medida que as displasias orais progrediam em severidade.

Sawant<sup>102</sup> e colaboradores avaliaram a expressão imunoistoquímica de VIM em DOPM de boca e orofaringe, concluindo que a imunorreatividade desta proteína aumentou progressivamente em displasias, carcinoma *in situ* e carcinoma propriamente dito. O mesmo estudo reportou que em leucoplasias heterogêneas houve maior expressão de VIM do que nas homogêneas. Esses resultados levam a acreditar que a expressão de VIM poderia estar relacionada à diferença no comportamento clínico entre estas lesões e que a ocorrência da TEM estaria envolvida na progressão maligna das displasias.<sup>102</sup>

Ghosh e colaboradores<sup>103</sup> realizaram um ensaio em câmara de invasão e imunofluorescência com células derivadas de queratinócitos gengivais pré-malignos e de CEB. Os resultados do estudo mostraram que a expressão elevada da VIM está associada a alteração na morfologia e no comportamento da célula, já que o aumento da proteína foi observado nas células neoplásicas e naquelas que atravessaram o matrigel.<sup>103</sup>

Em linhagens celulares de CECP subpopulações ricas em ALDH-1 foram isoladas, caracterizando seu potencial invasivo e o fenótipo da TEM.<sup>66</sup> Os agregados celulares, derivadas dessa subpopulação agressiva, apresentaram um aumento da expressão de VIM quando comparados a células derivadas de monocamada de diferentes linhagens celulares. Esse mesmo padrão de expressão foi identificado em células nodais metastáticas quando comparadas as células dos tumores primários de CECP, potencializado pelo fator de crescimento epidérmico e fator de transformação do crescimento beta (TGF- $\beta$ ).<sup>66,104</sup>

Um modelo desenvolvido por Yoon e colaboradores<sup>105</sup> selecionou uma subpopulação celular altamente metastática derivada do CECP e evidenciou que a população adquiriu características mesenquimais, sendo elas: aumento da VIM e integrina  $\beta 1$ , bem como a redução da expressão epitelial de e-CAD e involucrina. Em concordância, no estudo realizado por Paccione a redução da concentração dos níveis de VIM por interferência no RNA reduziu a proliferação, invasão e migração de células metastáticas quando comparadas com células controle.<sup>106</sup>

O aumento da expressão de VIM foi associado com metástases linfonodais sendo considerados preditores de um pior prognóstico em amostras de CEB.<sup>93</sup> Outro achado relevante é o aumento da expressão da VIM e a associação com recorrência e morte.<sup>107</sup> Estudos também apontam a relação inversa entre a expressão de VIM e E-CAD.<sup>104,107</sup>

A avaliação da expressão de VIM nos BT em casos de CEB evidenciou que houve o aumento na expressão deste filamento intermediário em mais de 85% dos tumores classificados com alta intensidade de BT.<sup>108</sup> Outro estudo realizado em carcinoma epidermoide localizado em língua observou que a expressão da VIM ocorreu no citoplasma de células do estroma em tecido adjacente aos tecidos linguais não cancerosos, porém não foi observada no tecido epitelial.<sup>49</sup> Esse achado foi corroborado com outros estudos encontrados na literatura.<sup>93</sup> Nenhuma ou marcação fraca da VIM (<10% das células tumorais) foi localizada no centro e partes superficiais do tumor. Contrariamente, o aumento da expressão de VIM foi detectado na frente de invasão tumoral e no BT.<sup>49</sup>

Diversas pesquisas<sup>49,93</sup> indicam que o aumento na expressão de VIM está relacionada a alteração na morfologia e no comportamento celular, portanto, a elucidação do mecanismo de “*cross-talk*” entre os filamentos intermediários e as vias de sinalização intracelular pode contribuir para o melhor entendimento do desenvolvimento, invasão e metástase tumoral.

Apesar de avanços consideráveis no estudo do CEB, o risco iminente de metástase regional, mesmo em carcinomas identificados em estágios iniciais, ainda representa uma incerteza no tratamento e no prognóstico do paciente. Mesmo com estudos recentes reconhecendo o BT como um fator prognóstico em outras malignidades, ele ainda não é utilizado como critério para a estratificação de risco do CEB devido ao desconhecimento do mecanismo molecular de funcionamento.

Diante deste cenário, uma melhor compreensão dos eventos moleculares e a descoberta de marcadores específicos podem prever a necessidade de tratamentos mais agressivos em estágios iniciais onde os sinais de metástase são incipientes, individualizando o

protocolo de tratamento dos pacientes de acordo com uma estratificação de risco. Além da melhora no prognóstico, a possibilidade do desenvolvimento de tratamentos inovadores deve ser considerada.

### 3 METODOLOGIA

#### 3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO E ASPECTOS ÉTICOS E LEGAIS

O estudo realizado é do tipo observacional descritivo, retrospectivo. Este estudo é parte de um projeto maior, o qual foi submetido e aprovado pelo comitê de ética em pesquisa com seres humanos do Hospital Universitário (HU)/Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)/Empresa Brasileira de Serviços Hospitalares (EBSERH) e do Centro de Pesquisas Oncológicas (CEPON) (parecer número 3.677.018 – 01/09/2019 – anexo A).

#### 3.2 SELEÇÃO DA AMOSTRA

No período compreendido entre 2013–2018, foram identificados 171 laudos com diagnóstico de CEB no arquivo do Serviço de Anatomia Patológica do HU-UFSC. Destes, foi possível recuperar os prontuários e as informações clínicas de 94 pacientes.

Após o rastreamento inicial, os critérios de inclusão e exclusão foram aplicados. Foram incluídos pacientes com diagnóstico histológico de CEB primário (CID: Cavidade oral: C02-06: mucosa oral, gengiva, alvéolos superiores, alvéolos inferiores, língua, assoalho de boca) e excluídos os casos com material insuficiente para o preparo das lâminas e análises propostas, pacientes com prontuários incompletos para coleta das informações de interesse e pacientes diagnosticados com carcinoma epidermoide de lábio. A amostra final foi composta por 47 casos, sendo 27 provenientes de ressecções cirúrgicas e 20 de biópsias incisionais.

#### 3.3 COLETAS DAS INFORMAÇÕES CLÍNICAS

Características relativas ao paciente [sexo, idade, exposição a fatores de risco (fumo e consumo de álcool)] e relativas à doença (classificação TNM, localização do tumor, tempo de evolução da lesão, tamanho da lesão, apresentação clínica, data do diagnóstico) foram coletadas dos prontuários e um banco de dados eletrônico foi elaborado para registro e análise das informações. O estadiamento clínico seguiu a classificação pelo sistema TNM.

Os desfechos de interesse coletados são definidos abaixo:

- Sobrevida geral: tempo decorrido (dias) entre a data do início do tratamento e a data do óbito por qualquer causa;
- Sobrevida livre de metástase: tempo decorrido (dias) entre a data do início do tratamento e a data da metástase;

•Sobrevida livre de recorrência: tempo decorrido (dias) entre a data do início do tratamento e a data da recorrência.

### 3.4 IMUNOISTOQUÍMICA

Cortes teciduais seriados, de 4µm de espessura foram realizados nas amostras selecionadas (fixados em formol e emblocadas em parafina) e montados em lâmina preparada com solução de ATPS (3-aminopropyltriethoxysilene). Os cortes foram desparafinados em xilol e hidratados por passagens sucessivas em etanol de concentrações decrescentes (100, 90, 80%). O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado por meio de dois banhos em solução composta por 16 ml de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) e 64 ml de metanol durante 20 minutos cada.

Para recuperação antigênica as lâminas foram imersas durante 40 min em solução tampão de citrato 0,001M (pH 6,0) a uma temperatura de 96°C em banho maria. Posteriormente, o bloqueio das reações inespecíficas foi realizado através da imersão das lâminas, durante 40 min, em uma solução a 5% de leite desnatado com solução salina tamponada com fosfato (PBS).

Em uma câmara úmida à 4°C os cortes permaneceram incubados durante a noite com os anticorpos primários para citoqueratina, VIM e e-CAD (quadro 5). A amplificação da reação exigiu a incubação, em temperatura ambiente durante 75 minutos, com a utilização do sistema EnVision+.

Quadro 5 - Características dos anticorpos utilizados.

ANTICORPO	MARCA	CLONE	DILUIÇÃO	TEMPO DE INCUBAÇÃO
<b>PANCITOQUERATINA</b>	Santa Cruz Biotechnology, INC.	AE1/AE3	1:50	Overnight
<b>E-CADERINA</b>	Dako	NCH-38	Pronta para uso	Overnight
<b>VIMENTINA</b>	Santa Cruz Biotechnology, INC.	E-5	1:800	Overnight

Fonte: Autoria própria.

Como cromógeno utilizamos a diaminobenzidina (DAB) e as seções foram contrastadas com hematoxilina de Harris. O controle positivo para citoqueratina e e-CAD foi realizado através de espécimes normais de mucosa hiperplásica e o de VIM através do tecido



conjuntivo saudável da amostra. O controle negativo foi realizado pela supressão do anticorpo primário.

### 3.5 CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA DOS CARCINOMAS

Todos os casos foram classificados de acordo com os critérios da Organização Mundial da Saúde (OMS)<sup>22</sup> – quadro 6.

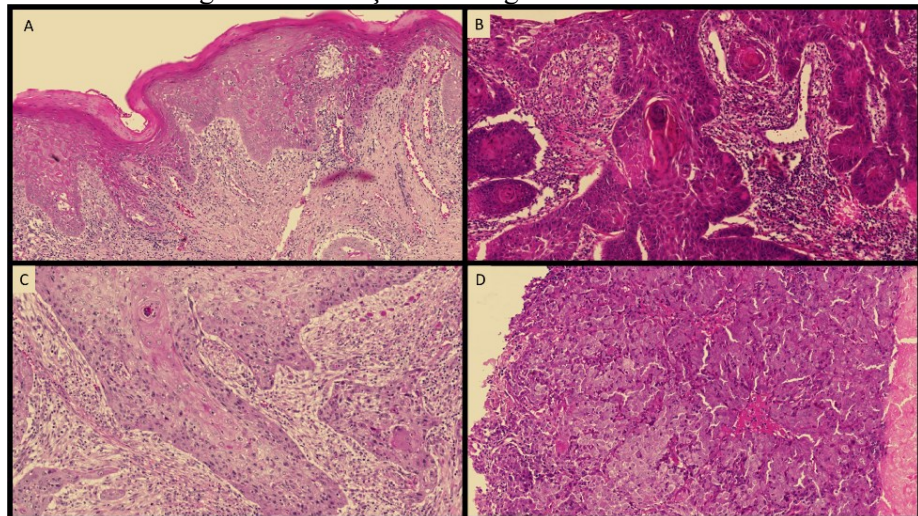
Quadro 6 - Classificação histopatológica do CEB.

GRAU HISTOLÓGICO	CARACTERÍSTICAS PRINCIPAIS
<b>Bem Diferenciado</b>	Presença de células poligonais estratificadas, numerosas e visíveis pontes intercelulares, pouca mitose, pequeno grau de anaplasia, evidente queratinização, com visíveis e numerosas pérolas córneas.
<b>Moderadamente Diferenciado</b>	Presença de células poligonais estratificadas, poucas pontes intercelulares, mitoses numerosas e atípicas, pleomorfismo nuclear evidente e formação de pérolas córneas escassas ou ausentes
<b>Indiferenciado</b>	Raras células poligonais, com difícil visualização de pontes intercelulares. Predomínio de células pequenas alongadas e indiferenciadas, acentuado pleomorfismo e hiperchromatismo nuclear, mitoses numerosas e atípicas, queratinização mínima ou ausente

Fonte: adaptado de El-Naggar e colaboradores.<sup>22</sup>

A figura 1 ilustra as diferentes classificações de acordo com os critérios estabelecidos pela OMS.

Figura 1 - Gradação Histológica OMS.



Gradação histológica do CEB segundo a OMS: A) *in situ*, B) bem diferenciado, C) moderadamente diferenciado, D) pobremente diferenciado. Fonte: autoria própria.

### 3.6 AVALIAÇÃO DO BROTAMENTO TUMORAL

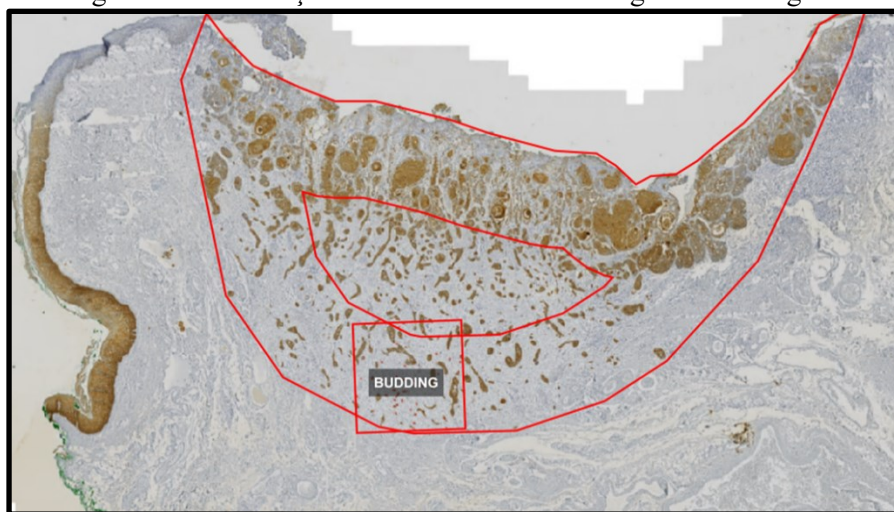
A avaliação das reações imunoistoquímicas foi realizada com o software QuPath®<sup>109</sup> a partir de imagens capturadas com o digitalizador de lâminas Zeiss Axioscan 7®.

O BT foi definido como a presença de células tumorais isoladas ou em pequenos ninhos, de até 4 células, presentes na frente de invasão tumoral (em ressecções) ou em regiões intratumorais (em biópsias incisionais).<sup>110</sup>

Nos cortes histológicos submetidos à reação imunoistoquímica para as citoqueratinas AE1/AE3 (pancitoqueratina) a contagem e a classificação da intensidade do BT foram realizadas, de acordo com recomendações estabelecidas na literatura,<sup>49,111</sup> em uma área quadrangular de  $0,785 \mu\text{m}^2$ , o que correspondente a um aumento de 200x em microscópio com uma ocular de 20 mm de diâmetro.

Nos casos de ressecção cirúrgica, primeiramente identificou-se a região de frente de invasão tumoral, a qual foi definida como uma faixa de 1mm de espessura estendendo-se a partir da margem tumoral (figura 2). A margem tumoral foi desenhada à  $500\mu\text{m}$  do limite tumoral. Toda a extensão da frente tumoral foi analisada e a área com maior número de BT (*hotspot*) foi selecionada para contagem. Um campo com  $0,785 \mu\text{m}^2$  foi desenhado com o auxílio da ferramenta de desenho “*rectangle*” (apêndice B). O mesmo procedimento foi realizado para biópsias incisionais, exceto a identificação da frente de invasão, sendo a contagem de brotamentos realizada na região de *hotspot*.

Figura 2 - Delimitação do frente de invasão e região da contagem.



Fonte: autoria própria.

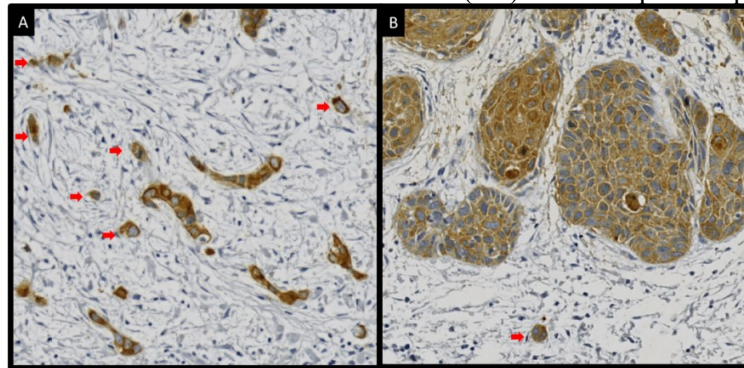
A padronização da contagem dos BT seguiu os seguintes critérios: i) conter no máximo 4 núcleos; ii) os núcleos devem ser visíveis e evidenciados pela coloração azulada da

hematoxilina; iii) independentemente do tamanho do brotamento, serão contados e considerados apenas os núcleos visíveis; iv) para serem consideradas independentes, entre duas ilhotas não deve haver linha ou sombra de marcação com DAB, mesmo que mínima; v) a marcação marrom deve ser uniforme e por todo o citoplasma para que uma célula seja considerada positiva, principalmente em casos de células isoladas; vi) acúmulos focais de DAB no citoplasma não foram considerados.

Para a calibração em relação à contagem do BT foi utilizado o índice de correlação intraclasse (ICC). Para avaliação inter-observador, a calibração foi feita entre um avaliador e um patologista bucal experiente. O ICC intra-observador foi igual a 0,966 (excelente). Para o cálculo do ICC intra-observador, o avaliador principal realizou a contagem de brotamentos em dois momentos diferentes, com um intervalo de 21 dias e com 20% da amostra sorteada de maneira aleatória. O ICC intra-observador foi igual a 0,932 (excelente).

Após a calibração realizou-se a contagem para classificação da intensidade dos BT em alto ( $\geq 5$  focos) ou baixo/ausente ( $< 5$  focos de BT) (figura 3) como reportado na literatura.<sup>49,111</sup>

Figura 3 - Intensidade de brotamento tumoral (BT) com anti-pancitoqueratina.



Legenda: setas vermelhas indicam os brotamentos tumorais (BT). A intensidade de BT é classificada como alta (A) e baixa (B). Fonte: autoria própria.

### 3.7 AVALIAÇÃO DA VIMENTINA E E-CADERINA

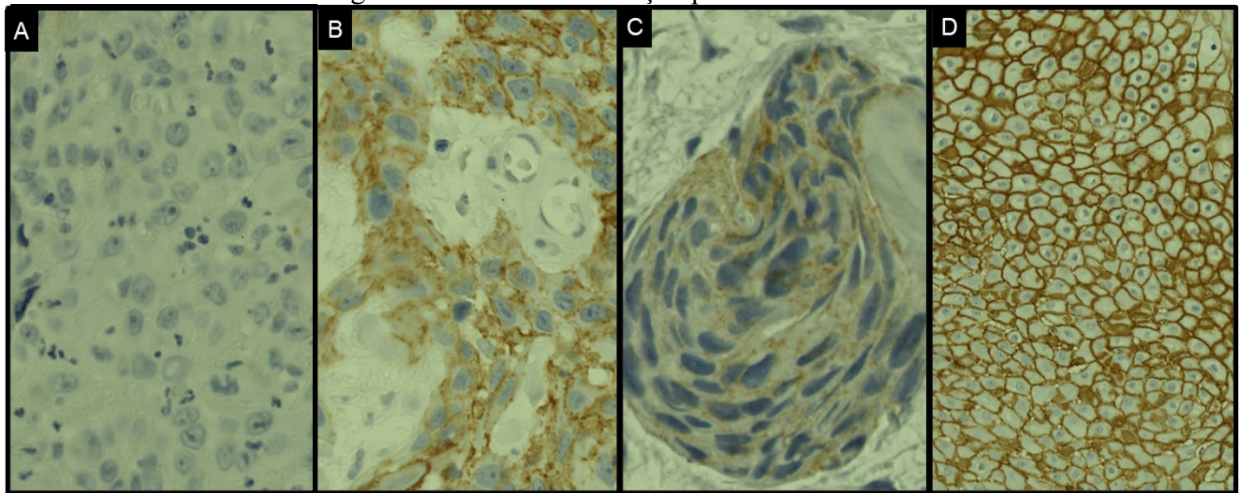
Após identificar as regiões de maior intensidade de BT na lâmina de pancitoqueratina, a avaliação de E-CAD e VIM foi realizada em cortes seriados, em uma área quadrangular de  $0,392 \mu\text{m}^2$ , o que é correspondente a um aumento de 400x em microscópio convencional com uma ocular de 20 mm de diâmetro.<sup>111</sup> As áreas de “hot spot” selecionadas na lâmina de citoqueratina foram então identificadas nas lâminas de e-CAD e VIM e



marcadas através do uso das ferramentas “*objects*”, “*annotation*” and “*specify annotation*” disponíveis no software e ilustradas no apêndice B.

A positividade da reação para e-CAD foi considerada dentro do padrão de normalidade quando a marcação da membrana citoplasmática das células epiteliais neoplásicas foi completa e contínua (Figura 4). Este padrão foi considerado anormal quando houve descontinuidade ou ausência da marcação de membrana, com ou sem marcação citoplasmática.

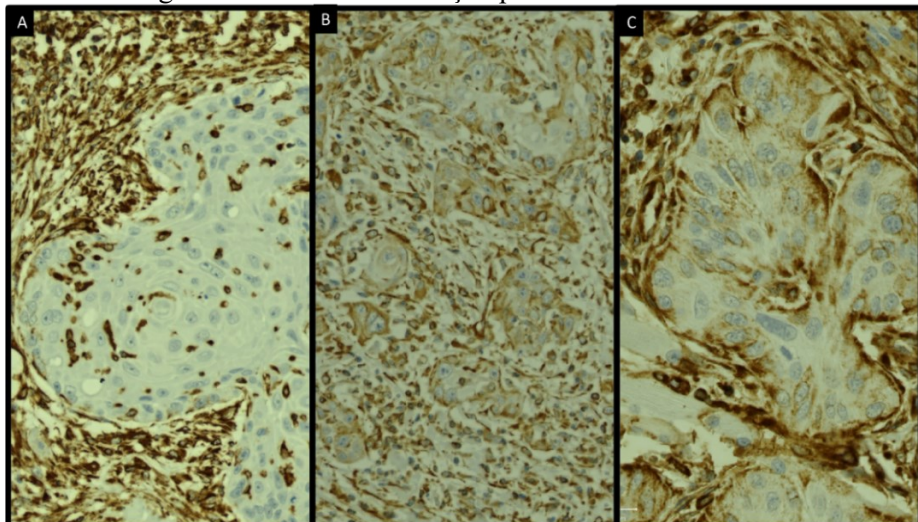
Figura 4 - Padrão de avaliação para E-caderina.



Padrão de marcação da e-caderina considerado negativo (A-C) e positivo (D). Fonte: autoria própria

A positividade para a VIM foi considerada quando as células epiteliais neoplásicas apresentavam o citoplasma com coloração castanha. A figura 5 representa a reação positiva e negativa para avaliação da VIM.

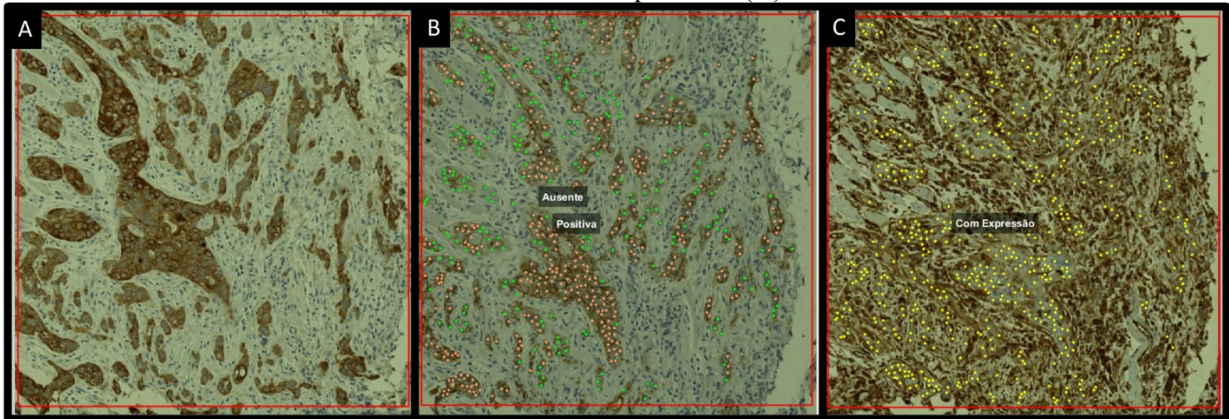
Figura 5 - Padrão de avaliação para vimentina.



Padrão de marcação da vimentina considerado negativo (A) e positivo (B-C). Fonte: autoria própria

Para ambos os marcadores da TEM foi realizada a avaliação quantitativa e qualitativa na mesma região de “hot spot” identificada nas reações com pancitoqueratina e transferida para a imagem digitalizada da VIM e e-CAD. Primeiramente procedeu-se a contagem do total de células positivas (com a expressão) e células negativas (sem a expressão) com a utilização da ferramenta “counting” (figura 6) disponível no QuPath®.<sup>109</sup>

Figura 6 - Avaliação de e-caderina (B) e vimentina (C) de acordo com a área de “hot spot” localizada na lâmina de citoqueratina (A).



O quadrado em vermelho delimita uma área de  $0,392 \mu\text{m}^2$ . A) Marcação com anti-pancitoqueratina. B) círculos verdes e laranja representam células com expressão negativa e positiva, respectivamente para e-caderina (e-CAD). C) pontos amarelos indicam células positivas para vimentina (VIM) O software permite o aumento da magnificação dentro da área de interesse para a observação de maiores detalhes. Fonte: autoria própria

Em seguida foi realizada a categorização da expressão imunoistoquímica, como reportado na literatura,<sup>112</sup> em fraca (<20%), moderada (20-50%) e forte ( $\geq 50$ ). A avaliação foi executada por um avaliador e um patologista bucal experiente, previamente calibrados. O teste kappa inter e intra observador obteve concordância superior a 0,75 em todos os quesitos como mostrado na tabela 1. A avaliação intra-observador foi realizada após um período de 15 dias em dez amostras aleatórias.

Tabela 1 - Teste Kappa para avaliação dos marcadores da transição epitélio-mesenquimal.

AVALIAÇÃO	MARCADOR	KAPPA	P
INTRA-AVALIADOR	E-caderina	K= 0,762	P= 0,002
	Vimentina	K= 1,0	P= 0,002
INTERAVALIADOR	E-caderina	K= 0,824	P= 0,024
	Vimentina	K= 1,0	P= 0,009

Fonte: autoria própria

### 3.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados pelo software SPSS Statistics 25® (SPSS Inc., IBM) e valores de  $P < 0.05$  foram considerados estatisticamente significantes.

As associações entre BT, VIM e e-CAD com características clínicas e patológicas foram realizadas através dos testes não paramétricos: qui-quadrado de Pearson ( $\chi^2$ ) e Fisher. Já as diferenças entre as médias nos grupos avaliados foram realizadas através dos testes de Mann-Whitney e Kruskal Wallis (*post hoc*: teste de Dunn). Os dados quantitativos não apresentaram distribuição normal, justificando a análise da relação entre as variáveis por meio do coeficiente de correlação de Spearman. A utilização de escores e a ausência de normalidade na distribuição dos dados ordinais também justificam a utilização dos testes de análise de média não paramétricos.

O método de Kaplan-Meier foi aplicado para análise de sobrevida, incluindo análise de sobrevida geral, sobrevida livre de metástase e sobrevida livre de recorrência considerando o tempo (dias) desde a cirurgia/intervenção até o evento de interesse, como definido anteriormente no item 3.3. As diferenças entre as curvas de sobrevivência foram avaliadas através do teste de log-rank.

## 4 RESULTADOS

Os dados clínico-demográficos de 171 laudos foram analisados durante o período compreendido entre 2013-2018. Destes, 47 foram elegíveis para o estudo após seleção por critérios de inclusão e exclusão.

### 4.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

A amostra selecionada para o estudo teve os dados clínicos dos pacientes coletados a partir da análise dos prontuários, demonstrado na tabela 2. A distribuição das variáveis dependentes de acordo com características clínicas e patológicas da amostra total pode ser visualizada no apêndice C. Todos os resultados estatísticos entre as variáveis clínicas e demográficas em relação à quantidade e intensidade do BT estão apresentados nos apêndices D e E.

Tabela 2 - Caracterização da amostra total.

VARIÁVEIS INDEPENDENTES	INTENSIDADE DE BT		VARIÁVEIS INDEPENDENTES	INTENSIDADE DE BT			
	BAIXO	ALTO		BAIXO	ALTO		
<b>IDADE</b>	39-59	11	15	<b>G*</b>	In situ	3	0
	>60	6	15		Diferenciado <sup>a</sup>	6	6
<b>SEXO</b>	M	15	19		Moderadamente <sup>b</sup>	7	21
	F	2	11		Indiferenciado <sup>b</sup>	1	3
<b>CIGARRO</b>	Não	1	5	<b>ESTÁGIO</b>	1/2	3	10
	Sim	16	24		3/4	9	14
<b>ALCOOL</b>	Não	2	7	<b>ÓBITO</b>	Não	9	21
	Sim	15	20		Sim	1	3
<b>LOCAL</b>	Língua	8	19	<b>RECORRÊNCIA</b>	Perdidos	13	
	Assoalho	6	6		Não	7	16
	Outro	3	5		Sim	3	8
<b>T</b>	T1/T2	9	16		Perdidos	13	
	T3/T4	7	12		<b>METÁSTASE</b>	Não	10
<b>N</b>	N-	9	16		Sim	0	2
	N+	6	9		Perdidos	12	
<b>M</b>	M-	16	28	<b>TIPO DA AMOSTRA</b>	Ressecção	6	21
	M+	0	1		Incisional	11	9

T: tamanho do tumor, N: envolvimento linfonodal (+) positivo (-) negativo, M: metástases distantes (-) ausente (+) presente, G: graduação histopatológica segundo a OMS, BT: brotamento tumoral. G\*: indica que houve significância estatística no grupo das ressecções. <sup>a, b</sup>: letras diferentes nas colunas indicam significância estatística entre os subgrupos da graduação histopatológica. Fonte: autoria própria

A análise dos dados clínicos revelou maior prevalência de indivíduos do sexo masculino (72,3%) e uma razão homem:mulher de 2,61:1. A idade dos pacientes variou de 47 a 90 anos, com média e desvio padrão de 59,83±9,69 anos. A média e desvio padrão do sexo feminino foi de 64±11 anos, enquanto no sexo masculino a média foi de 58±9 anos. Em relação aos fatores de risco, foi observado que uma alta porcentagem (89%) dos pacientes fazia uso de tabaco e/ou consumia bebidas alcoólicas.

Quanto a localização das lesões encontradas, aproximadamente 57% estavam localizadas em língua, seguida do assoalho bucal (25%). Outras localizações compreenderam 17% das lesões. A aparência clínica descrita na grande maioria dos casos foi de úlcera, seguida de leucoeritroplasia.

No que concerne ao estadiamento clínico TNM, o estágio IVA foi o mais prevalente (44,4%), seguido do estágio I (19%), estágio II (16%), estágio III e IV (ambos com 8,3%) e por fim o estágio IVC (2,8%). Quando agrupado em estágios iniciais (I e II) e estágios avançados (III e IV), as porcentagens foram 36,1 e 63,9 respectivamente.

O tratamento de escolha para o CEB foi excisão cirúrgica isolada (29,8%), ressecção associada a radioterapia (21,3%) e ressecção associada à radio e quimioterapia juntamente (14,9%). Casos tratados com a radioterapia e quimioterapia corresponderam a 25,5%. A radioterapia administrada isoladamente foi o tratamento em 4% dos pacientes.

A última atualização nos dados de sobrevida ocorreu em dezembro de 2021. O tempo médio de acompanhamento foi de 27,81 meses (amplitude 1-95 meses). Conforme indicado na tabela 4, óbitos ocorreram em 11,8% dos casos (tempo médio de 897 dias) e recorrências em 32% dos casos (tempo médio de 787 dias). 5,7% dos pacientes evoluíram para metástase em um tempo médio de 897 dias.

A distribuição das variáveis dependentes (BT, VIM e e-CAD) conforme as características clínicas e patológicas da amostra total pode ser visualizada no apêndice C.

#### 4.2 RESULTADOS NA ANÁLISE MORFOLÓGICA

A gradação histopatológica dos tumores segundo a Organização Mundial da Saúde (OMS) foi predominantemente moderadamente diferenciada (59,6%). 25% dos casos foram considerados bem diferenciados, 8,5% indiferenciados e apenas 6,4% classificados como carcinoma *in situ*.

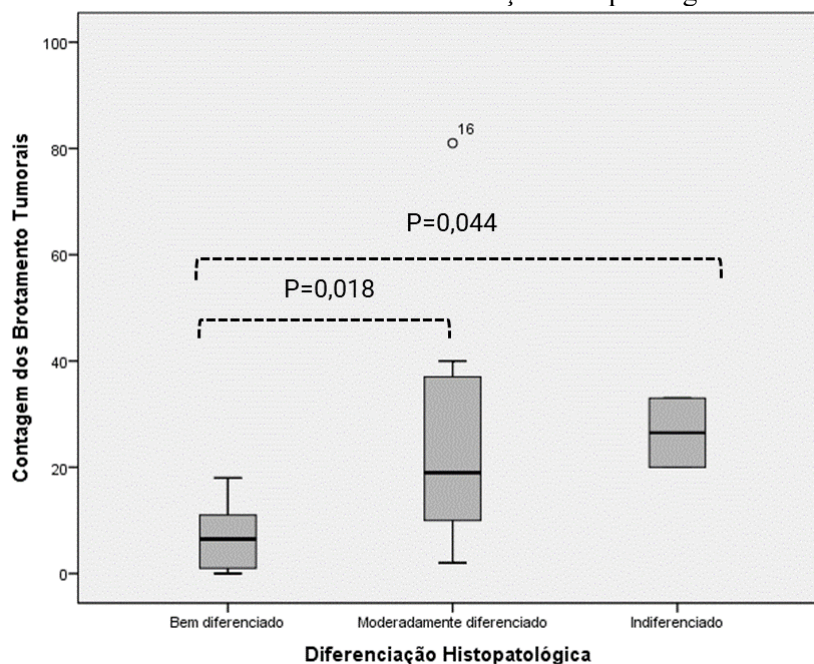
O resultado da avaliação quantitativa do número de BT na amostra total não apresentou uma distribuição normal dos dados, com mediana de 12 BT. A mediana em



biópsias incisionais foi de 6 BT e nas ressecções 18 BT. Devido à discrepância dos números, as correlações com características clínicas e patológicas foram realizadas separadamente no grupo das ressecções e nas biópsias incisionais.

Em ressecções, a análise quantitativa do BT foi estatisticamente significativa dentre os diferentes grupos de classificação histopatológica [ $\chi^2_{(2)}=6,829$ ;  $p=0,033$ ]. Comparações em pares (gráfico 1) evidenciaram diferenças no número de BT entre o grupo bem diferenciado e moderadamente diferenciado ( $p=0,018$ ) e entre o grupo bem diferenciado e indiferenciado (0,044).

Gráfico 1 - Número de brotamentos e diferenciação histopatológica dos tumores.



Legenda: Diferenças significativas em comparação com o grupo bem diferenciado (Kruskal-Wallis e teste de Dunn). Fonte: autoria própria

Ao comparar a intensidade do BT e a diferenciação dos tumores observou-se que a alta intensidade de BT está associada a uma pior diferenciação histopatológica das amostras ( $\chi^2_{(3)}=6,992$ ;  $p=0,05$ ), apresentando uma correlação positiva moderada entre as variáveis ( $p=0,012$ ;  $\rho=0,479$ ) segundo o teste de Spearman.

As avaliações quantitativas e qualitativas do BT não apresentaram associação com variáveis clínicas ou patológicas em biópsias incisionais. Os apêndices D e E apresentam os valores estatísticos para relação entre as variáveis independentes e dependentes, separadamente nas biópsias incisionais e excisionais.

### 4.3 AVALIAÇÃO E-CADERINA E VIMENTINA

#### 4.3.1 Amostra Total

O padrão de expressão imunoistoquímica da e-CAD apresentou diferentes versões. A maioria das amostras, tanto nas biópsias incisionais quanto nas ressecções, apresentou marcação positiva focalmente, encontrada principalmente nas regiões de pérolas de ceratina e no centro das ilhas e ninhos tumorais. A marcação de membrana apresentou aspecto pontilhado quando presente. Diferentemente, nas células da periferia dos ninhos, verificava-se perda completa ou parcial da expressão de membrana e ganho de expressão citoplasmática ou ausência de expressão. De forma geral, a análise da expressão da e-CAD nas regiões de “*hot spot*” revelou imunopositividade predominantemente classificada como “fraca” (72% da amostra total).

A expressão da VIM no citoplasma de células epiteliais ocorreu predominantemente na periferia das ilhas e ninhos tumorais. Em 53% dos casos a imunomarcação foi considerada “fraca” e apenas 32% apresentaram expressão considerada “forte”. A tabela 3 sumariza o padrão de expressão das amostras.

Tabela 3 - Expressão das proteínas e-caderina e vimentina.

TIPO DE AMOSTRA	E-CADERINA			VIMENTINA		
	Fraca	Moderada	Forte	Fraca	Moderada	Forte
<b>INCISIONAL</b>	65%	20%	15%	45%	15%	40%
<b>RESSECÇÃO</b>	77%	11%	11%	59%	14%	25%

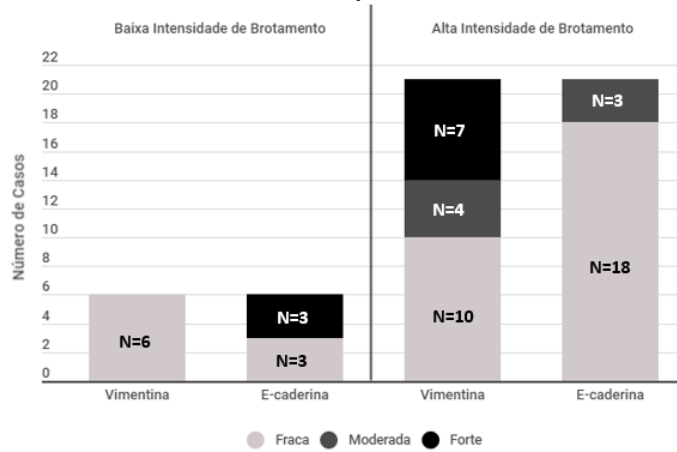
Fonte: autoria própria

A avaliação foi feita de forma independente nos casos de ressecção e biópsias incisionais, conforme descrito a seguir.

#### 4.3.2 Ressecção

A expressão das proteínas VIM e e-CAD em ressecções não apresentou associação com características clínicas e patológicas. No entanto, ao avaliarmos a relação da intensidade de BT com as proteínas da TEM observamos que houve uma associação significativa com a expressão de e-CAD ( $U=36,0$ ;  $p=0,030$ ) e VIM ( $U=30,0$ ;  $p=0,029$ ) categorizadas. Nos casos com alta intensidade de BT a fraca marcação para e-CAD e forte marcação para VIM foi predominante. O inverso ocorreu com a expressão desses marcadores no grupo com baixa intensidade de brotamento tumoral, como evidenciado no gráfico 2.

Gráfico 2 - Expressão das proteínas da TEM segundo a intensidade de brotamento tumoral em ressecções.



Fonte: autoria própria

A correlação de Spearman apontou uma correlação negativa moderada entre a intensidade de BT e a e-CAD categorizada e uma correlação positiva moderada entre a expressão de VIM categorizada e a intensidade de BT, como mostrado na matriz de correlação (tabela 4).

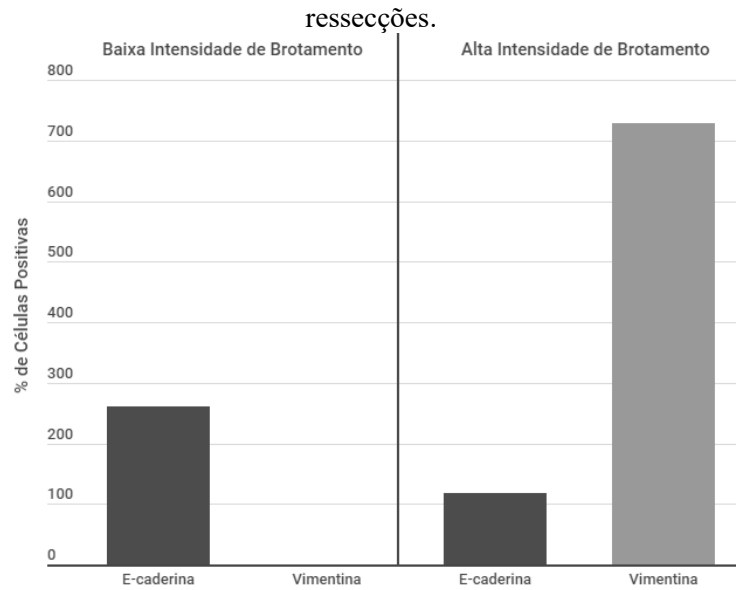
Tabela 4 - Matriz de correlação de Spearman.

		Intensidade de Brotamento	E-caderina	Vimentina
<b>Intensidade de Brotamento</b>	rho de Spearman	-		
	valor de p	-		
<b>E-caderina</b>	rho de Spearman	-0,425	-	
	valor de p	<b>0,027*</b>	-	
<b>Vimentina</b>	rho de Spearman	0,430	-0,311	-
	valor de p	<b>0,025*</b>	0,114	-

\*Valores de  $p < 0,05$ . Fonte: Autoria própria.

A porcentagem de células positivas para VIM também foi associada intensidade de brotamento tumoral ( $U=120,00$ ;  $p=0,000$ ). O número de células marcadas positivamente foi maior no grupo com alta intensidade de BT, quando comparada ao grupo de baixa intensidade de BT (gráfico 3). A porcentagem de células marcadas para e-CAD não foi estatisticamente significativa entre os dois grupos ( $p=0,099$ ).

Gráfico 3 - Porcentagem de células expressando vimentina e intensidade de brotamento tumoral em ressecções.

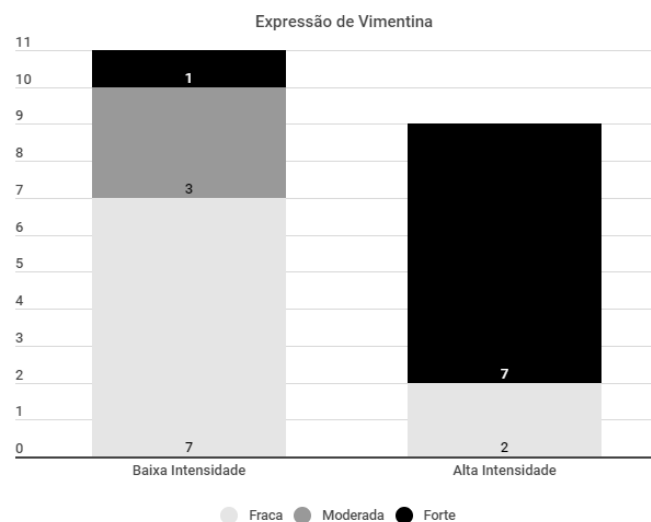


Fonte: Autoria própria.

### 4.3.3 Biópsias Incisionais

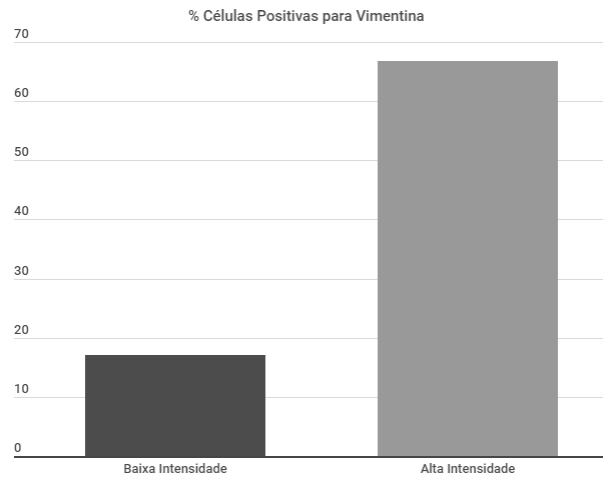
A expressão de VIM em biópsias incisionais foi associada tanto à intensidade ( $U=18,500$ ;  $p=0,016$  – gráfico 4) quanto a contagem de BT ( $U=13,000$ ;  $p=0,005$  – gráfico 5). A correlação entre as variáveis foi considerada positiva moderada ( $\rho=0,588$ ;  $p=0,006$ ).

Gráfico 4 – Expressão de vimentina e intensidade de brotamento tumoral em biópsias incisionais.



Fonte: Autoria própria.

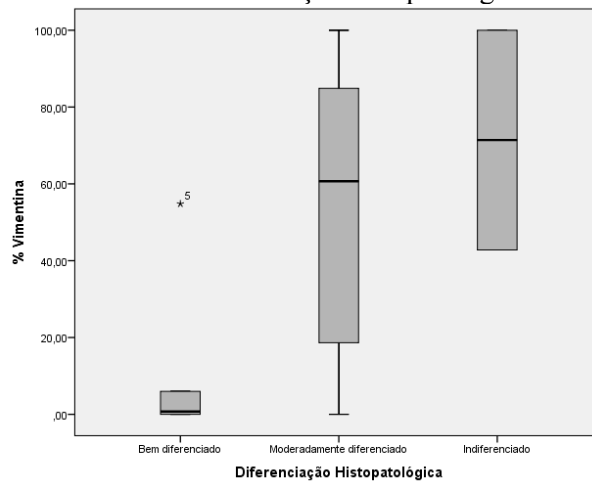
Gráfico 5 - Porcentagem de células expressando vimentina e intensidade de brotamento tumoral em biópsias incisionais.



Fonte: Autoria própria.

A mediana da porcentagem de células positivas para VIM não apresentou diferença significativa dentre as diferentes classes da gradação histopatológica como indicado pelo teste de Kruskal Wallis ( $p=0,052$ ), porém o teste de correlação de Spearman indicou uma correlação positiva moderada ( $\rho=0,628$ ;  $p=0,003$ ) entre as duas variáveis (gráfico 6).

Gráfico 6 - Porcentagem de células positivas para vimentina em biópsias incisionais nos diferentes níveis de diferenciação histopatológica.



Fonte: Autoria própria.

O teste de Mann-Whitney mostrou diferença entre a mediana no grupo onde havia a presença de metástase em linfonodos regionais quando comparado ao grupo sem metástase em linfonodos regionais, tanto na avaliação qualitativa ( $U=17,500$ ;  $p=0,05$ ) quanto

quantitativa ( $U=13,000$ ;  $p=0,031$ ). A mediana mostrou-se superior no grupo com metástase local positiva (tabela 5).

Tabela 5 - Presença de metástase em linfonodos regionais e expressão de e-caderina.

Metástase em Linfonodos	Expressão de E-caderina			% de células positivas
	Fraca	Forte	Moderada	Mediana
Negativa	6	1	0	2,39
Positiva	4	3	3	39,38

Fonte: autoria própria

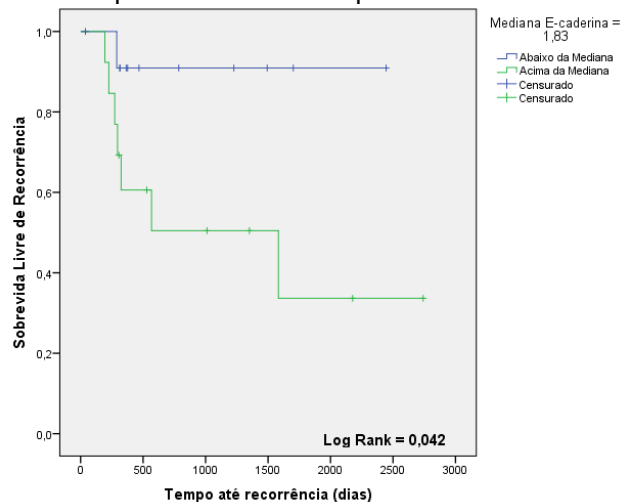
Os apêndices D e E descrevem todas as associações testadas entre os parâmetros clínicos e patológicos e os valores de “P” correspondentes, quando comparado as variáveis BT, VIM e e-CAD.

#### 4.4 RELAÇÃO COM OS DESFECHOS

As análises de sobrevida geral nas ressecções pelo método de Kaplan Meier apontaram um menor tempo de sobrevida nos grupos que apresentaram uma moderada expressão de e-CAD ( $\log \text{rank} = 0,042$ ) e VIM ( $\log \text{rank} = 0,007$ ) quando comparada aos demais grupos.

A sobrevida livre de recorrência no grupo das ressecções foi maior nos pacientes que apresentaram a expressão de e-CAD abaixo da mediana, como mostrado no gráfico 7.

Gráfico 7 - Tempo de sobrevida e expressão de vimentina.



Fonte: Autoria própria.

As análises dos desfechos de interesse no grupo das biópsias incisionais não apresentou nenhuma correlação com o BT e com os marcadores da TEM.

## 5 DISCUSSÃO

Na amostra estudada, pacientes do sexo masculino foram mais acometidos pelo CEB, assim como é reportado em estudos epidemiológicos realizados no Brasil<sup>113</sup> e em outras regiões do globo.<sup>2,114</sup> A proporção homem:mulher global é em média 5,5:2,5<sup>22</sup>, com amplitude de 1,2:1<sup>115</sup> a 3,02:1<sup>116</sup>. O presente estudo encontrou uma proporção de 2,61:1. A prevalência no sexo masculino pode ser justificada por uma maior exposição a fatores de risco tanto em atividades sociais (consumo de álcool, tabagismo, sexo sem proteção) quanto profissionais (trabalho com exposição a agentes carcinogênicos) visto que a proporção de homens e mulheres no estado de Santa Catarina é aproximadamente a mesma segundo o Instituto Brasileiro Geografia e Estatística (IBGE).<sup>117</sup>

Estudos reforçam que os indivíduos são diagnosticados principalmente entre os 50 e 70 anos, o que também foi corroborado em nossos resultados.<sup>113,118</sup> Apenas 4 pacientes tinham idade inferior a 50 anos no momento do diagnóstico. Estes achados estão relacionados ao processo de desenvolvimento da doença que ocorre à medida que o acúmulo de lesões no material genético ao longo dos anos torna as células mais propensas ao desenvolvimento de malignidades. Portanto, é natural que indivíduos idosos tenham um maior acúmulo de mutações no material genético quando comparados a pacientes jovens. Algumas regiões específicas, como a Nigéria<sup>119</sup> e o Catar,<sup>114</sup> divergem desses achados por apresentarem uma idade média de 45,3 e 46,9 anos, respectivamente, no momento do diagnóstico. As características socioeconômicas na Nigéria e hábitos culturais regionais no Catar podem justificar as diferenças entre os dados coletados e a literatura.<sup>114,119</sup>

O consumo atual ou passado de álcool e cigarro são considerados os fatores de risco mais importantes no desenvolvimento do CEB.<sup>13</sup> Assim como reportado em nosso estudo, a maioria dos pacientes masculinos relatam hábitos deletérios relacionados ao consumo dessas substâncias, justificando a alta prevalência dessas lesões malignas no sexo masculino.<sup>113,120</sup> A literatura mostra que pacientes jovens com CEB muitas vezes não reportam o uso destas substâncias ou a frequência do uso não tem um potencial carcinogênico relevante para o desenvolvimento da doença, levando a acreditar que outros fatores estejam envolvidos, como fatores nutricionais, predisposição genética e exposição ao HPV.<sup>13</sup>

A língua foi a localização mais frequente das lesões de CEB neste levantamento, assim como reportado na América e Europa.<sup>118,121</sup> O perfil de pacientes que historicamente desenvolvem lesões nessa localização é geralmente de idosos e fumantes, semelhante às características da amostra presente neste estudo. A localização das lesões pode variar de acordo com hábitos culturais. No sudeste asiático as lesões são mais comuns na mucosa bucal devido ao hábito do consumo da noz-de-areca e fumo mascado, que mantem esses materiais em contato com a mucosa durante o uso.<sup>20</sup>

Contrariamente ao perfil dos pacientes da amostra com lesões em língua, estudos apontam que uma mudança epidemiológica vem ocorrendo globalmente.<sup>122</sup> Ao longo das últimas décadas, um aumento de lesões localizadas em língua vem sendo detectada principalmente em pacientes jovens e sem exposição aos fatores de risco tradicionais.<sup>122</sup> Relatos indicam um comportamento atípico e mais agressivo dessas lesões em língua, porém, as evidências ainda são inconclusivas.<sup>122</sup>

As lesões de CEB em língua apresentam um pior prognóstico mesmo em estágios iniciais da doença e uma das hipóteses é que isso esteja conectado a características estruturais que influenciam na disseminação tumoral como, por exemplo, a riqueza em vasos linfáticos nessa região e a presença de fibras musculares.<sup>28</sup>

A apresentação clínica prevalente das lesões foi em forma de úlcera ou leucoeritroplasia, corroborando com a literatura.<sup>113</sup> A aparência característica do CEB são lesões ulceradas e de bordos elevados, porém, as úlceras podem ser causadas por diversos agentes etiológicos, tornando essencial um diagnóstico diferencial criterioso para determinar a sua origem.<sup>123,124</sup> Já as leucoeritroplasias são lesões que apresentam uma maior propensão a transformação maligna, reforçando a importância do conhecimento das DOPM para que o diagnóstico precoce do CEB seja realizado.<sup>21</sup>

A avaliação histopatológica da diferenciação tumoral segundo os critérios da OMS revelou que a maioria dos casos foi classificada como moderadamente diferenciada, seguido dos bem diferenciados, corroborando a literatura.<sup>113,114,121</sup> Alguns autores utilizam a gradação histopatológica como um componente para estratificação de risco dos pacientes.<sup>125</sup> Essa questão ainda é debatida, pois a própria OMS<sup>22</sup> reconheceu que a diferenciação histopatológica do tumor não está diretamente correlacionada ao curso da doença e estudos apontam que a classificação histológica possui pouca ou nenhuma relação com o prognóstico do paciente.<sup>28,29</sup>



O diagnóstico tardio do CEB infelizmente ainda é uma realidade. Na nossa amostra, 48,9% dos casos foram diagnosticados em estágio tardio (III e IV), assim como aponta um levantamento feito no Brasil.<sup>126</sup> Os fatores que justificam esses índices são complexos e incluem tanto falhas profissionais, do sistema de saúde público e da realidade socioeconômica dos pacientes diagnosticados com CEB.<sup>127</sup> Os dados do presente estudo são provenientes de um hospital público, onde a maioria dos usuários possui baixo *status* socioeconômico. Além das limitações do paciente temos a do próprio sistema de fluxo utilizado pelo Sistema Único de Saúde onde o paciente, após diagnosticado, deve ser encaminhado aos centros de tratamento, o que pode causar atrasos no início das intervenções. Por último, porém não menos importante, não podemos deixar de considerar o desconhecimento pelos cirurgiões dentistas das DOPM e dos aspectos iniciais do CEB, que muitas vezes pode ter uma aparência indolente. Além disso, a habilidade do dentista durante a notificação de notícias ruins é de extrema importância para o entendimento e aceitação do paciente quanto ao seu quadro de saúde.<sup>128</sup>

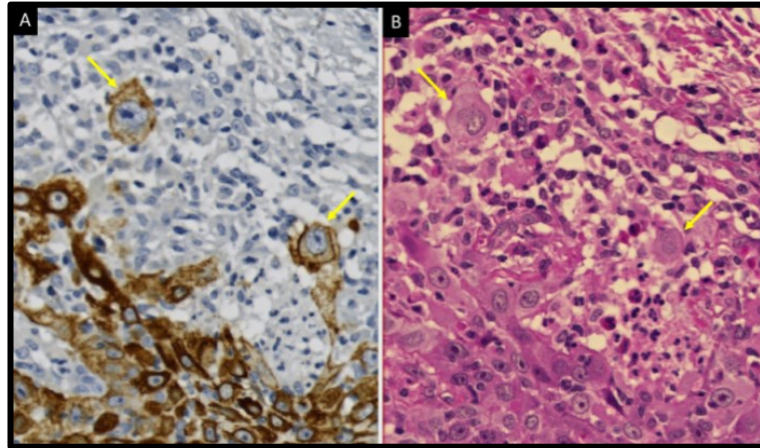
No presente estudo, o tratamento realizado para o CEB foi predominantemente ressecção cirúrgica associada a quimioterapia e/ou radioterapia. A literatura reporta que a cirurgia de maneira isolada permanece como terapia de escolha para o CEB, porém quando a lesão não é removida com margem de segurança ou quando o tumor está em fase avançada a terapia adjuvante é indicada.<sup>20,129</sup> Os métodos de tratamentos predominantes em nossos dados são compatíveis com o estágio avançado que os tumores apresentaram no momento do diagnóstico. Devemos lembrar que os tratamentos mais agressivos deixam sequelas consideráveis nos pacientes, tanto estéticas quanto funcionais, impactando diretamente na qualidade de vida desses indivíduos.<sup>129</sup> Esses achados ressaltam a importância de um diagnóstico precoce e a necessidade do desenvolvimento de novos métodos de tratamento que sejam menos invasivos e com limitados efeitos colaterais.

Mesmo com essas considerações, o prognóstico do CEB ainda é paradoxal. As taxas de recorrência e metástase permanecem altas mesmo em pacientes que receberam o tratamento adequado e apresentaram margens cirúrgicas livres.<sup>25,29</sup> Uma das hipóteses é que esse evento ocorra devido a células cancerosas que se desprendem da massa tumoral principal e invadem o tecido subjacente em forma de células isoladas ou em grupos, como o BT.<sup>52,58</sup>

A escolha de avaliar as células neoplásicas utilizando marcação com pancitoqueratina foi baseada na facilidade de visualização das células epiteliais e conseqüentemente dos BT. A avaliação em HE pode causar confusões principalmente em

tumores com intenso infiltrado inflamatório.<sup>49</sup> Uma maior confiabilidade e reprodutibilidade pôde ser atingida com o uso da marcação com citoqueratina, assim como reportado na literatura.<sup>130,131</sup> A figura 7 evidencia a diferença na visualização entre as duas metodologias. Essa técnica pode ser implementada como um recurso auxiliar na avaliação dos BT por conferir maior facilidade na visualização de tais estruturas.

Figura 7 - Brotamento tumoral (BT) visualizado com anti-pancitoqueratina (A) e hematoxilina-eosina (B).



Setas amarelas indicam os brotamentos tumorais (BT) visualizados em reação imunoistoquímica com anti-pancitoqueratina (A) e hematoxilina-eosina (B) Fonte: autoria própria.

O número de BT encontrado em biópsias incisoriais foi inferior ao das ressecções neste estudo. Ao avaliar essa discrepância, devemos considerar que biópsias incisoriais frequentemente não incluem a frente de invasão tumoral e que é desafiador identificar essa área em biópsias pequenas.<sup>132</sup> Estudos indicam que uma avaliação baseada no número de BT é mais valiosa do que os métodos convencionais como a diferenciação histopatológica, padrão de crescimento infiltrativo e invasão linfovascular para prever o potencial metastático em diversos tipos de câncer.<sup>39,83,110,133</sup>

O BT não apresentou valor prognóstico em biópsias incisoriais e excisoriais do presente estudo, divergindo de dados presentes na literatura.<sup>132,134</sup> As diferentes metodologias utilizadas, como, definição da área do campo avaliado, técnica de coloração (hematoxilina ou citoqueratina), região do tumor avaliada (intratumoral ou peritumoral), ponto de corte e tamanho da amostra podem explicar essas discrepâncias.<sup>38,52</sup>

Em ressecções, nosso estudo apontou que um maior número e a alta intensidade de BT foi associada com a indiferenciação histopatológica dos tumores. Os BT representam a perda de coesão e o ganho de características que promovem a invasão ativa, ou seja, essas células inicialmente epiteliais sofrem uma desdiferenciação para perderem características epiteliais e ganharem características mesenquimais.<sup>41,49</sup> Portanto, é esperado que quanto mais

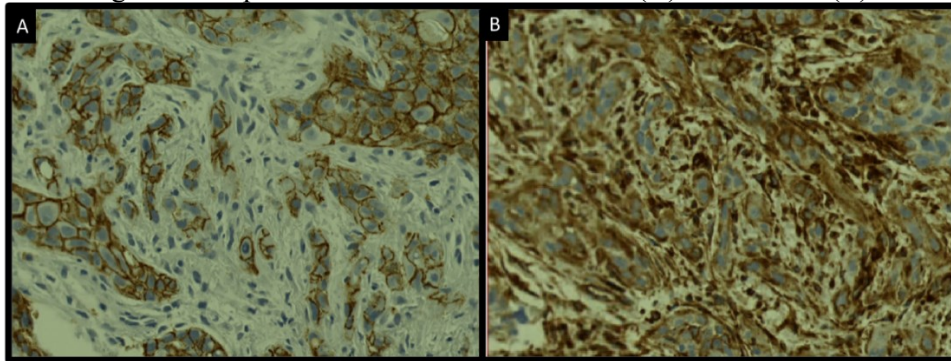
indiferenciado o tumor, maior seja o número de BT visto que ocorre a perda da identidade do tecido de origem. A associação dos BT com o grau histopatológico pode melhorar o valor prognóstico do sistema criado pela OMS, pois consideraria não apenas a diferenciação dos tumores como também a dissociação.<sup>30</sup>

A avaliação dos BT e sua associação com as proteínas da TEM ajudaram entender parte do processo de desdiferenciação e dissociação celular. A expressão da proteína e-CAD em ressecções foi menor no grupo de alta intensidade de BT. Resultados semelhantes avaliando a associação do BT com a diminuição de e-CAD foram reportados na literatura.<sup>49,53,108</sup> A diminuição na expressão da e-CAD é o primeiro passo para que as células consigam se separar da massa tumoral principal, representando uma característica importante na progressão tumoral e permitindo que as células se organizem em grupos menores ou isoladamente.<sup>56</sup>

Como esperado, a expressão da VIM apresentou um padrão inverso ao da e-CAD em nossos achados, no entanto, não houve uma associação significativa, divergindo de outros estudos.<sup>49,104,107,108,135,136</sup> Os casos com maior número e intensidade de BT apresentaram predominantemente uma marcação forte para VIM tanto em ressecções quanto em biópsias incisionais. Esse padrão foi identificado em diversos estudos.<sup>49,108,135,136</sup> A participação da VIM nesse processo envolve o segundo passo da progressão tumoral: ganho de motilidade. A expressão da VIM coordena uma rede complexa de interação no citoesqueleto para que a célula mantenha um formato apropriado e adesões focais estáveis, requisitos fundamentais para a manutenção da polaridade e para a geração de tensão celular, facilitando o processo de migração em diversos tecidos.<sup>94</sup>

Apesar de tratada como um processo dicotômico para fins didáticos, o processo de TEM é reversível e a perda de características epiteliais e ganho de mesenquimais é considerada temporária e não permanente.<sup>38,133</sup> Um estado híbrido, também chamado de TEM parcial, pode ser observado durante esse processo. Nessas situações tanto marcadores mesenquimais quanto epiteliais estão expressos simultaneamente (figura 8) o que justificaria a ausência de uma correlação negativa entre esses dois marcadores.<sup>38,133,137</sup> Devemos considerar também que a interação com diversas proteínas ocorre neste processo e que o microambiente tumoral pode influenciar na expressão gênica que irá guiar este dinamismo.<sup>138</sup>

Figura 8 - Expressão simultânea de e-caderina (A) e vimentina (B).



Fonte: autoria própria

Os resultados deste estudo mostraram que a presença de metástase em linfonodos regionais foi associada a forte expressão da proteína e-CAD em biópsias incisionais e a um maior número na contagem de células positivas. Este resultado discorda com parte da literatura,<sup>56,82</sup> no entanto, alguns artigos mencionam o chamado “paradoxo epitelial”.<sup>77,78,137,139</sup> Evidências histológicas sugerem que a metástase de vários tumores sólidos retém a expressão de e-CAD.<sup>139</sup> Um estudo avaliando a quantidade de RNA mensageiro para e-CAD em CEB constatou que a expressão do RNA mensageiro era menor quando comparada a tecidos saudáveis. No entanto, a baixa expressão dos níveis de RNA mensageiro ocorreu apenas nos estágios clínicos iniciais da doença e não continuaram a diminuir significativamente nos casos mais avançados. Por isso, o uso desta quantificação para estratificação de risco do CEB é limitado. Além disso, outros fatores como processo de reparo, inflamação e resposta imune também podem influenciar na expressão desta proteína.<sup>140</sup> Chao e colaboradores<sup>141</sup> reportaram que células malignas em mama perderam a expressão de e-CAD transitoriamente durante sua disseminação, e então, reexpressaram esta e outras moléculas de adesão em um local metastático distante.

O fenômeno conhecido como “invasão coletiva”<sup>78</sup> também pode justificar a associação de e-CAD com a metástase de linfonodos. O processo de invasão coletiva foi identificado em estudos *in vitro* e *in vivo* com células mamárias malignas, apontando a expressão simultânea de marcadores epiteliais e mesenquimais. No processo de invasão coletiva, algumas das células que se desconectam da massa tumoral principal atuam como “células líderes”, cuja função é guiar as demais células durante o processo de invasão. Cheung e colaboradores<sup>142</sup> relataram que as células com papel “guia” apresentam morfologias distintas e polarizadas, preferencialmente expressando diversos marcadores basais (citoqueratina-14 e 5, p63) e epiteliais luminiais (e-CAD, citoqueratina-8). Já as células na retaguarda das chamadas células “guia” também expressavam fortemente essas proteínas basais e luminiais,

porém, a expressão era concomitante aos marcadores comuns da TEM, como a VIM. A invasão celular em forma de grupos celulares pode facilitar a cooperação para promover a sobrevivência durante o processo de invasão, explicando o porquê de as células manterem a expressão de e-CAD durante a metástase.<sup>78,142</sup>

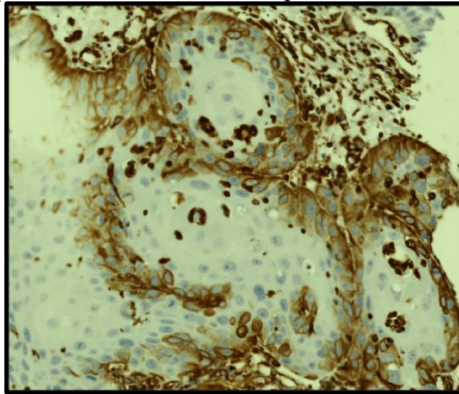
O tempo de sobrevida livre de recorrência em ressecções foi menor no grupo que apresentou uma expressão de E-CAD acima da mediana. Apesar da maioria dos estudos apontarem a elevada expressão de e-CAD como um indicativo de bom prognóstico, a discordância dos nossos resultados com a literatura pode ser justificada com as informações citadas anteriormente sobre o paradoxo epitelial e a migração coletiva.<sup>77,78</sup>

Outro ponto a ser considerado é a regulação espaço temporal da e-CAD durante a TEM. O gene *Snail* parece ser um dos reguladores envolvidos em todos os aspectos relacionados a TEM, inclusive na sua iniciação. Evidências mostraram que a superexpressão deste gene é o suficiente para induzir a TEM *in vivo* através da ligação direta no promotor da e-CAD. Ao se ligar no promotor da e-CAD, o gene age como um repressor direto.<sup>143</sup> Uma hipótese é que a perda de caderina seja apenas uma característica transitória e inicial, e a medida que a TEM evolui, a expressão de outros genes regulatórios revertam esse processo, favorecendo o reestabelecimento das adesões celulares para que as células consigam acelerar a taxa de invasão através da resistência a *anoikis* (morte celular programada que ocorre em células dependentes de ancoragem quando elas se desprendem da matriz extracelular) e crescimento independente de ancoragem.<sup>64,141</sup> Esses achados indicam que a e-CAD possui um papel complexo na progressão tumoral e que mais estudos são necessários para entender os mecanismos envolvidos na regulação desta proteína.<sup>144</sup>

A avaliação da expressão de VIM nas células do CEB encontra diversas variações na literatura, devido a pontos de corte não padronizados e classificação dicotômica que consideram apenas a presença ou ausência da proteína e não sua intensidade. A expressão da VIM em células epiteliais reflete a alteração fenotípica ocasionada pelas mudanças moleculares que ocorrem nas células neoplásicas epiteliais e que são responsáveis pelo aumento da motilidade e conseqüentemente do potencial invasivo.<sup>85</sup> Estudos prévios detectaram o aumento da expressão de VIM em amostras de pacientes e linhagens celulares de CEB.<sup>94,104,107,145</sup> Este estudo revelou que 46% da amostra total de CEB eram tumores com moderada ou forte marcação para VIM, corroborando outros achados da literatura.<sup>145,146</sup> Outros estudos detectaram a expressão de VIM também em displasias severas, indicando o potencial papel dessa proteína no desenvolvimento tumoral.<sup>147,148</sup>

As células epiteliais neoplásicas que expressaram VIM exibiram uma distribuição localizada principalmente na frente de invasão e concentradas intracelularmente em direção ao estroma (figura 9), assim como reportado na literatura.<sup>94</sup> Esses achados podem estar relacionados as propriedades identificadas *in vitro* relacionadas a processos invasivos e migratórios.<sup>84,149</sup> A expressão da VIM foi evidente em grupos e/ou células tumorais isoladas pobremente diferenciadas,<sup>146</sup> bem como em células com formato fusiforme.

Figura 9 - Expressão de vimentina na periferia das ilhas neoplásicas



Fonte: autoria própria

O padrão de expressão da VIM pode estar associado aos processos de migração coletiva e individual das células. Na presença de VIM, as forças de actinmiosina são redirecionadas para as adesões periféricas, indicando que as fibras de VIM restringem a formação de lamelipódios e o fluxo de actina para uma região específica, facilitando o alinhamento das forças de tração para promover a migração celular individual em colaboração com os microtúbulos.<sup>78,84</sup>

A sobrevida geral no grupo das ressecções apresentou um menor tempo nos grupos que apresentaram uma moderada expressão de VIM assim como reportado por Liu e colaboradores.<sup>150</sup> No entanto, não houve correlação com recorrência ou metástase, divergindo de outros estudos em CEB que associam a alta expressão de VIM a recorrência local, invasividade tumoral e metástase.<sup>107,135,145</sup>

O aumento da VIM em neoplasias epiteliais malignas explica a capacidade de sobrevivência e movimentação da célula epitelial pelo tecido conjuntivo. Além do ganho de motilidade, as células que expressam VIM tem aumento na elasticidade e na resistência a compressão.<sup>88</sup> Esse fator é essencial para que as células neoplásicas consigam invadir ambientes com alta densidade celular enquanto mantêm suas atividades essenciais. A expressão de VIM também restringe e aumenta a afinidade das células por componentes do

estroma como colágeno e ácido hialurônico.<sup>90,151</sup> Tais interações representam uma violação da fronteira normal do tecido que fisiologicamente previne a mistura de células de diferentes origens, como as epiteliais e mesenquimais.<sup>151</sup> Ao violar essa barreira, o tumor tem mais facilidade em realizar o crescimento invasivo, piorando o prognóstico do paciente.

Outro motivo para justificar uma menor sobrevida nos pacientes com moderada expressão de VIM é que o tratamento quimioterápico pode ter sua efetividade comprometida, pois essa proteína inibe receptores AXL de tirosina quinase diminuindo a sensibilidade das células malignas ao quimioterápico Erlotinib.<sup>152</sup>

Além dos pontos apresentados, o crescimento invasivo do tumor e o desenvolvimento de resistência a drogas são fatores relacionados que apresentam um importante papel na progressão tumoral.<sup>153</sup> A relação entre a motilidade celular e a resistência a drogas está associada ao fato de que durante a migração as células perdem a capacidade de se multiplicar e por isso ficam menos suscetíveis a ação de quimioterápicos e radioterápicos. Outro ponto a ser analisado, é que células no estado de TEM exibem quimiorresistência devido à indução da expressão de proteínas transportadoras da família ABC responsáveis pelo efluxo dos quimioterápicos para fora da célula. É muito provável que as mesmas vias estejam envolvidas na progressão tumoral e na resistência aos tratamentos.<sup>153</sup>

Não podemos deixar de considerar que o estudo apresenta limitações. A população da região atendida é predominantemente caucasiana, não refletindo a realidade de outras localidades do Brasil. Outros fatores como amostra com número reduzido de casos, o tempo de seguimento dos pacientes relativamente curto e falta de informações disponíveis limitam a validade do nosso estudo. A utilização de testes estatísticos não paramétricos também reduz a robustez das nossas análises.

A técnica de imunoistoquímica é amplamente utilizada, mas suas limitações não podem ser desconsideradas. A subjetividade está presente no ajuste do limiar onde a marcação é considerada positiva e conseqüentemente a avaliação tendenciosa da quantidade de células coradas positivamente. A agressividade dos procedimentos intrínsecos ao processo de imunoistoquímica (como fixação, desidratação e hidratação) em que as amostras são submetidas também não deve ser desconsiderada. Por fim, ressaltamos que a avaliação de um processo dinâmico como a TEM não pode ser completamente compreendido apenas com a imunoistoquímica, visto que os resultados representam apenas uma fase de um processo que é contínuo e complexo. Aumentar a amostra em um estudo futuro e conduzir um

acompanhamento de longo prazo são essenciais para confirmar a relação entre BT, TEM e o prognóstico dos pacientes.



## 6 CONCLUSÃO

Síntese dos principais resultados do estudo:

- O BT não apresentou associação com prognóstico dos pacientes em biópsias incisionais e ressecções, no entanto, apresentou associação com os marcadores de TEM;
- Em ressecções a alta quantidade e intensidade de BT estão associadas a uma maior expressão de VIM, baixa expressão de e-CAD e a uma pior diferenciação histopatológica;
- Em biópsias incisionais a alta quantidade e intensidade de BT foi associada a um maior número de células positivas e a expressão “forte” da proteína VIM. A presença de metástase nos linfonodos também evidenciou um maior número de células positivas e forte expressão de e-CAD;
- Nas ressecções a moderada expressão de VIM e e-CAD foi associada a um menor tempo de sobrevida geral. As amostras com expressão de e-CAD acima da mediana apresentaram menor sobrevida livre de recorrência.

Baseado nesses resultados, podemos concluir que a avaliação do BT juntamente a diferenciação histopatológica e marcadores da TEM pode aprimorar o estadiamento patológico e clínico do CEB para melhor prever o prognóstico do paciente. No entanto, uma padronização metodológica deve ser oficializada para evitar discrepâncias nas análises dos dados, assim como observamos na literatura atualmente.

Estudos adicionais devem ser realizados para investigar demais eventos moleculares associados com as células tumorais que residem na frente de invasão tumoral e nas regiões de “*hot spot*”, para melhor elucidar o processo de evolução do CEB. Ainda não podemos deixar de considerar o papel do microambiente tumoral nessas alterações celulares.

A elucidação dos aspectos moleculares no CEB e do papel da TEM nesse processo nos ajudariam também a explorar novas estratégias terapêuticas que mirem especificamente inibindo sinais da TEM. No entanto, a dinamicidade e plasticidade deste mecanismo são os maiores obstáculos para a compressão desta cascata de eventos.

## REFERÊNCIAS

1. JOHNSON, Daniel E, et al. Head and neck squamous cell carcinoma. **Nature Reviews Disease Primers**, v. 6, n. 1, p. 92, 2020.
2. World Health Organization. International Agency for Research on Cancer - IARC. GLOBOCAN. GLOBOCAN 2020: **Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide**, 2020. Lyon: IARC, 2021. Disponível em: <http://globocan.iarc.fr>. Acesso em: 18 mar 2021.
3. INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER – INCA. **Neoplasia maligna da cavidade oral (taxas ajustadas)**. 16 de julho de 2019, <https://www.inca.gov.br/estimativa/taxas-ajustadas/neoplasia-maligna-da-cavidade-oral>. Acesso em: 18 mar 2021.
4. KHARIWALA, Samir. S.; HATSUKAMI, Dorothy.; HECHT, Stephen. S. Tobacco carcinogen metabolites and DNA adducts as biomarkers in Head and Neck cancer: Potential screening tools and prognostic indicators. **Head & Neck**, v. 34, n. 3, p. 441–447, 2012.
5. ESFAHROOD, Zeinab. R, et al. The effect of nicotine and cotinine on human gingival fibroblasts attachment to root surfaces. **Journal of Basic and Clinical Physiology and Pharmacology**, v. 26, n. 5, 2015.
6. VARELA-REY, Marta, et al. Alcohol, DNA Methylation, and Cancer. **Alcohol Research: Current Reviews**, v. 35, n. 1, p. 25–35, 2013.
7. MELLO, Fernanda W, et al. The synergistic effect of tobacco and alcohol consumption on oral squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. **Clinical Oral Investigations**, v. 23, n. 7, p. 2849–2859, 2019.
8. WARNAKULASURIYA, Saman.; CHEN, T. H. H. Areca Nut and Oral Cancer: Evidence from Studies Conducted in Humans. **Journal of Dental Research**, v. 101, n. 10, p. 1139–1146, 2022.
9. KERSTEN, Brian P.; MCLAUGHLIN, Megan E. Toxicology and Management of Novel Psychoactive Drugs. **Journal of Pharmacy Practice**, v. 28, n. 1, p. 50–65, 2015.
10. PICARD, Annabelle et al. Head and neck squamous cell carcinoma in people living with HIV in France. **Médecine et Maladies Infectieuses**, v. 48, n. 8, p. 503–508, 2018.
11. CHAULAGAIN, Chakra P, et al. Clinicopathologic characteristics of secondary squamous cell carcinoma of head and neck in survivors of allogeneic hematopoietic stem cell transplantation for hematologic malignancies. **Bone Marrow Transplantation**, v. 54, n. 4, p. 560–566, 2019.
12. HIRAI, Hideaki, et al. Clinical Course of Oral Squamous Cell Carcinoma in Patients on Immunosuppressant and Glucocorticoid Therapy. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery: Official Journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons**, v. 75, n. 9, p. 1980–1986, 2017.
13. LEEMANS, René; SNIJDERS, Peter J. F.; BRAKENHOFF, Ruud H. The molecular landscape of head and neck cancer. **Nature Reviews Cancer**, v. 18, n. 5, p. 269–282, 2018.
14. HANAHAN, Douglas; WEINBERG, Robert. A. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.
15. JIANG, Xianjie; WANG, Jie; DENG, Xiangying; *et al.* The role of microenvironment in tumor angiogenesis. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 39, n. 1, p. 204, 2020.
16. TABATABAEIFAR, Siavosh, et al. Investigating a case of possible field cancerization in oral squamous cell carcinoma by the use of next-generation sequencing. **Oral Oncology**, v. 68, p. 74–80, 2017.

17. SIMPLE, M, et al. Cancer stem cells and field cancerization of Oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, v. 51, n. 7, p. 643–651, 2015.
18. FELLER, Liviu L. et al. Oral squamous cell carcinoma in relation to field precancerisation: pathobiology. **Cancer Cell International**, v. 13, n. 1, p. 31, 2013.
19. LI, Chia-Cheng; SHEN, Zhen; BAVARIAN, Roxanne; *et al.* Oral Cancer: Genetics and the Role of Precision Medicine. **Dental Clinics**, v. 62, n. 1, p. 29–46, 2018.
20. JOHNSON, Newell W.; JAYASEKARA, Prasanna; AMARASINGHE, A. A. Hemantha K. Squamous cell carcinoma and precursor lesions of the oral cavity: epidemiology and aetiology. **Periodontology 2000**, v. 57, n. 1, p. 19–37, 2011.
21. WARNAKULASURIYA, Saman. 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**, v. 27, n. 8, p. 1862–1880, 2021.
22. EL-NAGGAR, Adel K, et al. World Health Organization. **Classification Of Head And Neck Tumours**. 4a ed. França, Lyon: Iarc, 2017. Vol 9.
23. WALTER, Christopher; DAVIS, Joshua T; MATHUR, Jairaj; *et al.* Physical defects in basement membrane-mimicking collagen-IV matrices trigger cellular EMT and invasion. **Integrative Biology**, v. 10, n. 6, p. 342–355, 2018.
24. BRODERS, A. C. Squamous-cell epithelioma of the lip: a study of five hundred and thirty-seven cases. **Journal of the American Medical Association**, v. 74, n. 10, p. 656, 1920.
25. ALMANGUSH, Alhadi; MÄKITIE, Antti A.; TRIANTAFYLLOU, Asterios; *et al.* Staging and grading of oral squamous cell carcinoma: An update. **Oral Oncology**, v. 107, p. 104799, 2020.
26. BRYNE, M, et al. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. **The Journal of Pathology**, v. 166, n. 4, p. 375–381, 1992.
27. CHANG, Yun-Ching, et al. Invasive pattern grading score designed as an independent prognostic indicator in oral squamous cell carcinoma: Invasive pattern grading score in OSCC. **Histopathology**, v. 57, n. 2, p. 295–303, 2010.
28. ALMANGUSH, Alhadi, et al. Depth of invasion, tumor budding, and worst pattern of invasion: Prognostic indicators in early-stage oral tongue cancer. **Head & Neck**, v. 36, n. 6, p. 811–818, 2014.
29. DIK, Eric A, et al. The value of histological grading of biopsy and resection specimens in early-stage oral squamous cell carcinomas. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v. 46, n. 6, p. 1001–1006, 2018.
30. ELSERAGY, Amr, et al. A Proposal to Revise the Histopathologic Grading System of Early Oral Tongue Cancer Incorporating Tumor Budding. **American Journal of Surgical Pathology**, v. 43, n. 5, p. 703–09, 2019.
31. O’SULLIVAN, Brian, et al. INTERNATIONAL UNION AGAINST CANCER (EDS.). **UICC manual of clinical oncology**. Ninth edition ed. Chichester, West Sussex, UK; Hoboken, NJ: John Wiley and Sons, Ltd, 2015.
32. WOOLGAR, Julia A.; HALL, Gillian L. Determinants of outcome following surgery for oral squamous cell carcinoma. **Future Oncology** (London, England), v. 5, n. 1, p. 51–61, 2009.
33. MATTAVELLI, Davide, et al. The 8th TNM classification for oral squamous cell carcinoma: What is gained, what is lost, and what is missing. **Oral Oncology**, v. 111, p. 104937, 2020.
34. GONZÁLEZ-GARCÍA, Raúl, et al. Contralateral lymph neck node metastasis of squamous cell carcinoma of the oral cavity: a retrospective analytic study in 315 patients.

**Journal of Oral and Maxillofacial Surgery: Official Journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons**, v. 66, n. 7, p. 1390–1398, 2008.

35. SHARMA, Aditi. et al. Clinical Analysis of Neck Node Metastasis in Oral Cavity Cancer. **Journal of the Korean Association of Oral and Maxillofacial Surgeons**, v. 44, n. 6, p. 282, 2018.
36. DUPREZ, Frédéric. et al. Distant Metastases in Head and Neck Cancer: Distant Metastases in Head and Neck Cancer. **Head & Neck**, v. 39, n. 9, p. 1733–43, 2017.
37. SAKA-HERRÁN, Constanza; JANÉ-SALAS, Enric; MARI-ROIG, Antoni; et al. Time-to-Treatment in Oral Cancer: Causes and Implications for Survival. **Cancers**, v. 13, n. 6, p. 1321, 2021.
38. GRIGORE, Alexandru; JOLLY, Mohit; JIA, Dongya; *et al.* Tumor Budding: The Name is EMT. Partial EMT. **Journal of Clinical Medicine**, v. 5, n. 5, p. 51, 2016.
39. ALMANGUSH, Alhadi, et al. Tumour budding in oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis. **British Journal of Cancer**, v. 118, n. 4, p. 577–586, 2018.
40. GONZALEZ-GUERRERO, Miriam, et al. The adverse prognostic effect of tumor budding on the evolution of cutaneous head and neck squamous cell carcinoma. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 76, n. 6, p. 1139–1145, 2017.
41. MÄKITIE, Antti A.; ALMANGUSH, Alhadi; RODRIGO, Juan P.; *et al.* Hallmarks of cancer: Tumor budding as a sign of invasion and metastasis in head and neck cancer. **Head & Neck**, v. 41, n. 10, p. 3712–3718, 2019.
42. LUO, Wei-Ren; GAO, Fei; LI, Si-Yi; et al. Tumour budding and the expression of cancer stem cell marker aldehyde dehydrogenase 1 in nasopharyngeal carcinoma: Tumour budding in nasopharyngeal carcinoma. **Histopathology**, v. 61, n. 6, p. 1072–1081, 2012.
43. MARANGON JUNIOR, Helvécio; MELO, Victória Vasconcellos Moreira; CAIXETA, Ângela Braga; *et al.* Immunolocalization of Cancer Stem Cells Marker ALDH1 and its Association with Tumor Budding in Oral Squamous Cell Carcinoma. **Head and Neck Pathology**, v. 13, n. 4, p. 535–542, 2019.
44. MARANGON JUNIOR, Helvécio; LEÃO, Priscila Laiza Rubim; MELO, Victória Vasconcellos Moreira; *et al.* Cell proliferation is associated with intensity of tumor budding in oral squamous cell carcinoma. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 47, n. 2, p. 128–135, 2018.
45. BOXBERG, Melanie, et al. Immunohistochemical expression of CD44 in oral squamous cell carcinoma in relation to histomorphological parameters and clinicopathological factors. **Histopathology**, v. 73, n. 4, p. 559–572, 2018.
46. WARTENBERG, Martin, et al. Accumulation of FOXP3+T-cells in the tumor microenvironment is associated with an epithelial-mesenchymal-transition-type tumor budding phenotype and is an independent prognostic factor in surgically resected pancreatic ductal adenocarcinoma. **Oncotarget**, v. 6, n. 6, p. 4190–4201, 2015.
47. HE, Ke-Fei, et al. CD163+ tumor-associated macrophages correlated with poor prognosis and cancer stem cells in oral squamous cell carcinoma. **BioMed Research International**, v. 2014, p. 838632, 2014.
48. MARANGON JUNIOR, Helvécio, et al. Laminin-5 gamma 2 chain expression is associated with intensity of tumor budding and density of stromal myofibroblasts in oral squamous cell carcinoma. **Journal of Oral Pathology & Medicine: Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology**, v. 43, n. 3, p. 199–204, 2014.
49. WANG, Cheng; HUANG, Hongzhang; HUANG, Zhiquan; *et al.* Tumor budding correlates with poor prognosis and epithelial-mesenchymal transition in tongue squamous cell

- carcinoma: Tumor budding and EMT in TSCC. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 40, n. 7, p. 545–551, 2011.
50. HAYES, Brian D.; MAGUIRE, Aoife; CONLON, Niamh; *et al.* Reproducibility of the Rapid Bud Count Method for Assessment of Tumor Budding in Stage II Colorectal Cancer. **American Journal of Surgical Pathology**, v. 34, n. 5, p. 746–748, 2010.
51. KOELZER, Viktor H.; ZLOBEC, Inti; LUGLI, Alessandro. Tumor budding in colorectal cancer—ready for diagnostic practice? **Human Pathology**, v. 47, n. 1, p. 4–19, 2016.
52. ALMANGUSH, Alhadi; SALO, Tuula; HAGSTRÖM, Jaana; *et al.* Tumour budding in head and neck squamous cell carcinoma - a systematic review. **Histopathology**, v. 65, n. 5, p. 587–594, 2014.
53. KOHLER, Ilona; BRONSERT, Peter; TIMME, Sylvia; *et al.* Detailed analysis of epithelial-mesenchymal transition and tumor budding identifies predictors of long-term survival in pancreatic ductal adenocarcinoma: EMT in pancreatic cancer. **Journal of Gastroenterology and Hepatology**, v. 30, p. 78–84, 2015.
54. MORAIS, Everton F., *et al.* Prognostic value of the immunohistochemical detection of epithelial-mesenchymal transition biomarkers in oral epithelial dysplasia: A systematic review. **Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal**, p. 0–0, 2020.
55. RIBATTI, Domenico; TAMMA, Roberto; ANNESE, Tiziana. Epithelial-Mesenchymal Transition in Cancer: A Historical Overview. **Translational Oncology**, v. 13, n. 6, p. 100773, 2020.
56. CHAW, S.Y.; ABDUL MAJEED, A.; DALLEY, A.J.; *et al.* Epithelial to mesenchymal transition (EMT) biomarkers – E-cadherin, beta-catenin, APC and Vimentin – in oral squamous cell carcinogenesis and transformation. **Oral Oncology**, v. 48, n. 10, p. 997–1006, 2012.
57. DOMINGUES, Cátia S. C., *et al.* Epithelial-mesenchymal transition and microRNAs: Challenges and future perspectives in oral cancer. **Head & Neck**, v. 40, n. 10, p. 2304–2313, 2018.
58. DONGRE, Anushka; WEINBERG, Robert A. New insights into the mechanisms of epithelial–mesenchymal transition and implications for cancer. **Nature Reviews Molecular Cell Biology**, v. 20, n. 2, p. 69–84, 2019.
59. AKALAY, Intissar; JANJI, Bassam; HASMIM, Meriem; *et al.* Epithelial-to-Mesenchymal Transition and Autophagy Induction in Breast Carcinoma Promote Escape from T-cell-Mediated Lysis. **Cancer Research**, v. 73, n. 8, p. 2418–2427, 2013.
60. ZHANG, Yun; WEINBERG, Robert A. Epithelial-to-mesenchymal transition in cancer: complexity and opportunities. **Frontiers of Medicine**, v. 12, n. 4, p. 361–373, 2018.
61. LECKBAND, Deborah E.; DE ROOIJ, Johan. Cadherin Adhesion and Mechanotransduction. **Annual Review of Cell and Developmental Biology**, v. 30, n. 1, p. 291–315, 2014.
62. GALL, Tamara M. H.; FRAMPTON, Adam E. Gene of the Month: E-Cadherin (CDH1). **Journal of Clinical Pathology**, v. 66, n. 11, p. 928–932, 2013.
63. JIANG, Wen G. E-cadherin and its associated protein catenins, cancer invasion and metastasis. **British Journal of Surgery**, v. 83, n. 4, p. 437–446, 2005.
64. WONG, Sonia How Ming; FANG, Chee Mun; CHUAH, Lay-Hong; *et al.* E-cadherin: Its dysregulation in carcinogenesis and clinical implications. **Critical Reviews in Oncology/Hematology**, v. 121, p. 11–22, 2018.
65. GUMBINER, Barry M. Regulation of cadherin-mediated adhesion in morphogenesis. *Nature Reviews*. **Molecular Cell Biology**, v. 6, n. 8, p. 622–634, 2005.

66. SCANLON, Christie. S, et al. Biomarkers of Epithelial-Mesenchymal Transition in Squamous Cell Carcinoma. **Journal of Dental Research**, v. 92, n. 2, p. 114–121, 2013.
67. SARRIÓ, David et al. Epigenetic and genetic alterations of APC and CDH1 genes in lobular breast cancer: relationships with abnormal E-cadherin and catenin expression and microsatellite instability. **International Journal of Cancer**, v. 106, n. 2, p. 208–215, 2003.
68. VAN DER POST, Rachel. S. et al. Hereditary diffuse gastric cancer: updated clinical guidelines with an emphasis on germline CDH1 mutation carriers. **Journal of Medical Genetics**, v. 52, n. 6, p. 361–374, 2015.
69. MASCIARI, Serena, et al. Germline E-cadherin mutations in familial lobular breast cancer. **Journal of Medical Genetics**, v. 44, n. 11, p. 726–731, 2007.
70. JEANES, A.; GOTTARDI, C. J.; YAP, A. S. Cadherins and cancer: how does cadherin dysfunction promote tumor progression? **Oncogene**, v. 27, n. 55, p. 6920–6929, 2008.
71. HAZAN, R. B. et al. Cadherin Switch in Tumor Progression. **Annals of the New York Academy of Sciences**, v. 1014, n. 1, p. 155–163, 2004.
72. GLOUSHANKOVA, Natalya A. et al. Cadherin-mediated cell-cell interactions in normal and cancer cells. **Tissue Barriers**, v. 5, n. 3, p. e1356900, 2017.
73. FUCHS, Serge Y, et al. Oncogenic  $\beta$ -Catenin Signaling Networks in Colorectal Cancer. **Cell Cycle**, v. 4, n. 11, p. 1522–1539, 2005.
74. PIRINEN, Risto T. Reduced expression of alpha-catenin, beta-catenin, and gamma-catenin is associated with high cell proliferative activity and poor differentiation in non-small cell lung cancer. **Journal of Clinical Pathology**, v. 54, n. 5, p. 391–395, 2001.
75. LORIC, Sylvain, et al. Abnormal E-cadherin expression and prostate cell blood dissemination as markers of biological recurrence in cancer. **European Journal of Cancer**, v. 37, n. 12, p. 1475–1481, 2001.
76. LOH, Chin-Yap, et al. The E-Cadherin and N-Cadherin Switch in Epithelial-to-Mesenchymal Transition: Signaling, Therapeutic Implications, and Challenges. **Cells**, v. 8, n. 10, p. 1118, 2019.
77. CHU, Khoi, et al. The paradox of E-cadherin: role in response to hypoxia in the tumor microenvironment and regulation of energy metabolism. **Oncotarget**, v. 4, n. 3, p. 446–462, 2013.
78. NAGAI, Tomoaki, et al. Tactics of cancer invasion: solitary and collective invasion. **Journal of Biochemistry**, v. 167, n. 4, p. 347–355, 2020.
79. TRYNDYAK, Volodymyr P.; BELAND, Frederick. A.; POGRIBNY, Igor P. E-cadherin transcriptional down-regulation by epigenetic and microRNA-200 family alterations is related to mesenchymal and drug-resistant phenotypes in human breast cancer cells. **International Journal of Cancer**, v. 126, n. 11, p. 2575–2583, 2010.
80. KUSHWAHA, Sandhya Singh; JOSHI, Sonia; ARORA, Karandeep Singh; *et al.* Correlation of E-cadherin Immunohistochemical Expression with Histopathological Grading of Oral Squamous Cell Carcinoma. **Contemporary Clinical Dentistry**, v. 10, n. 2, p. 232–238, 2019.
81. REN, Xusheng; WANG, Jianning; LIN, Xuefen; *et al.* E-cadherin expression and prognosis of head and neck squamous cell carcinoma: evidence from 19 published investigations. **OncoTargets and therapy**, v. 9, p. 2447–2453, 2016.
82. DINIZ-FREITAS, Márcio; GARCÍA-CABALLERO, Tomás; ANTÚNEZ-LÓPEZ, José; *et al.* Reduced E-cadherin expression is an indicator of unfavourable prognosis in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, v. 42, n. 2, p. 190–200, 2006.
83. KOYUNCUOGLU, Meral, et al. Tumor budding and E-Cadherin expression in endometrial carcinoma: Are they prognostic factors in endometrial cancer? **Gynecologic Oncology**, v. 125, n. 1, p. 208–213, 2012.

84. BATTAGLIA, Rachel A, et al. Vimentin on the move: new developments in cell migration. **F1000Research**, v. 7, p. 1796, 2018.
85. DANIELSSON, Frida, et al. Vimentin Diversity in Health and Disease. **Cells**, v. 7, n. 10, p. 147, 2018.
86. RIDLEY, Anne J, et al. Cell Migration: Integrating Signals from Front to Back. **Science**, v. 302, n. 5651, p. 1704–1709, 2003.
87. ESUE, Osigwe, et al. A direct interaction between actin and vimentin filaments mediated by the tail domain of vimentin. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 281, n. 41, p. 30393–30399, 2006.
88. MENDEZ, Melissa. G.; RESTLE, David; JANMEY, Paul A. Vimentin Enhances Cell Elastic Behavior and Protects against Compressive Stress. **Biophysical Journal**, v. 107, n. 2, p. 314–323, 2014.
89. MENDEZ, Melissa. G.; KOJIMA, Shin-Ichiro; GOLDMAN, Robert D. Vimentin induces changes in cell shape, motility, and adhesion during the epithelial to mesenchymal transition. **The FASEB Journal**, v. 24, n. 6, p. 1838–1851, 2010.
90. IVASKA, Johanna, et al. Novel functions of vimentin in cell adhesion, migration, and signaling. **Experimental Cell Research**, v. 313, n. 10, p. 2050–2062, 2007.
91. GONZALES, Meredith, et al. Structure and Function of a Vimentin-associated Matrix Adhesion in Endothelial Cells. **Molecular Biology of the Cell**, v. 12, n. 1, p. 85–100, 2001.
92. Toiyama, Yuji, et al. Increased expression of Slug and Vimentin as novel predictive biomarkers for lymph node metastasis and poor prognosis in colorectal cancer. **Carcinogenesis**, v. 34, n. 11, p. 2548–2557, 2013.
93. LIU, Ching-Yi, et al. Vimentin contributes to epithelial-mesenchymal transition cancer cell mechanics by mediating cytoskeletal organization and focal adhesion maturation. **Oncotarget**, v. 6, n. 18, p. 15966–15983, 2015.
94. LIU, Shuli, et al. High Vimentin Expression Associated with Lymph Node Metastasis and Predicated a Poor Prognosis in Oral Squamous Cell Carcinoma. **Scientific Reports**, v. 6, p. 38834, 2016.
95. DAUPHIN, Maryline, et al. Vimentin expression predicts the occurrence of metastases in non small cell lung carcinomas. **Lung Cancer**, v. 81, n. 1, p. 117–122, 2013.
96. ALKASALIAS, Twana, et al. RhoA knockout fibroblasts lose tumor-inhibitory capacity in vitro and promote tumor growth in vivo. **Proceedings of the National Academy of Sciences**, v. 114, n. 8, 2017.
97. GILLES, Christine, et al. Vimentin contributes to human mammary epithelial cell migration. **Journal of Cell Science**, v. 112 ( Pt 24), p. 4615–4625, 1999.
98. LI, Man, et al. A novel function for vimentin: the potential biomarker for predicting melanoma hematogenous metastasis. **Journal of Experimental & Clinical Cancer Research**, v. 29, n. 1, p. 109, 2010.
99. BELLO-DEOCAMPO, Diana; KLEINMAN, Hynda K.; WEBBER, Mukta M. The role of  $\alpha 6 \beta 1$  integrin and EGF in normal and malignant acinar morphogenesis of human prostatic epithelial cells. **Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis**, v. 480–481, p. 209–217, 2001.
100. IVASKA, Johanna, et al. PKC $\epsilon$ -mediated phosphorylation of vimentin controls integrin recycling and motility. **The EMBO Journal**, v. 24, n. 22, p. 3834–3845, 2005.
101. FUYUHIRO, Yuhiko, et al. Clinical significance of vimentin-positive gastric cancer cells. **Anticancer Research**, v. 30, n. 12, p. 5239–5243, 2010.
102. SAWANT, Sharada S, et al. Clinical significance of aberrant vimentin expression in oral premalignant lesions and carcinomas. **Oral Diseases**, v. 20, n. 5, p. 453–465, 2014.

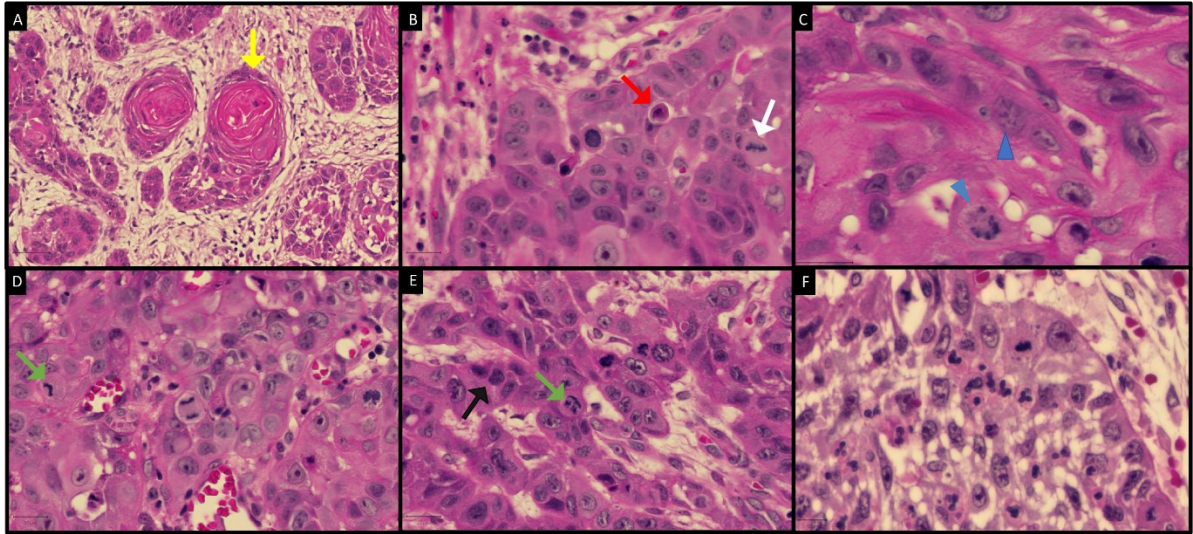
103. GHOSH, Supurna; MUNSHI, Hidayatullah. G.; SEN, Ratna; *et al.* Loss of adhesion-regulated proteinase production is correlated with invasive activity in oral squamous cell carcinoma. **Cancer**, v. 95, n. 12, p. 2524–2533, 2002.
104. ZHOU, Jingping; TAO, Detao; XU, Qing; *et al.* Expression of E-cadherin and vimentin in oral squamous cell carcinoma. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**, v. 8, n. 3, p. 3150–3154, 2015.
105. YOON, Younghyun; LIANG, Zhongxing; ZHANG, Xin; *et al.* CXCR4 chemokine receptor-4 antagonist blocks both growth of primary tumor and metastasis of head and neck cancer in xenograft mouse models. **Cancer Research**, v. 67, n. 15, p. 7518–7524, 2007.
106. PACCIONE, Rachel J, et al. Keratin down-regulation in vimentin-positive cancer cells is reversible by vimentin RNA interference, which inhibits growth and motility. **Molecular Cancer Therapeutics**, v. 7, n. 9, p. 2894–2903, 2008.
107. LIU, Lai-Kui, et al. Upregulation of Vimentin and Aberrant Expression of E-Cadherin/ $\beta$ -Catenin Complex in Oral Squamous Cell Carcinomas: Correlation with the Clinicopathological Features and Patient Outcome. **Modern Pathology**, v. 23, n. 2, p. 213–24, 2010.
108. ATTRAMADAL, Cecilie G, et al. Tumor Budding, EMT and Cancer Stem Cells in T1-2/N0 Oral Squamous Cell Carcinomas. **Anticancer Research**, v. 35, n. 11, p. 6111–6120, 2015.
109. BANKHEAD, Peter, et al. QuPath: Open source software for digital pathology image analysis. **Scientific Reports**, v. 7, n. 1, p. 16878, 2017.
110. UENO, H., et al. Tumour ‘budding’ as an Index to Estimate the Potential of Aggressiveness in Rectal Cancer: Tumour ‘budding’ in Rectal Cancer. **Histopathology**, v. 40, n. 2, p. 127–32, 2002.
111. LUGLI, Alessandro, et al. Intratumoral Budding as a Potential Parameter of Tumor Progression in Mismatch Repair–Proficient and Mismatch Repair–Deficient Colorectal Cancer Patients. **Human Pathology**, v. 42, n. 12, p. 1833–40, 2011.
112. IRANI, Soussan; DEHGHAN, Arash. The expression and functional significance of vascular endothelial-cadherin, CD44, and vimentin in oral squamous cell carcinoma. **Journal of International Society of Preventive and Community Dentistry**, v. 8, n. 2, p. 110, 2018.
113. PIRES, Fabio R. et al. Oral squamous cell carcinoma: clinicopathological features from 346 cases from a single oral pathology service during an 8-year period. **Journal of applied oral science: revista FOB**, v. 21, n. 5, p. 460–467, 2013.
114. ELAIWY, Orwa, et al. Epidemiology and pathology of oral squamous cell carcinoma in a multi-ethnic population: Retrospective study of 154 cases over 7 years in Qatar. **Annals of Medicine and Surgery** (2012), v. 60, p. 195–200, 2020.
115. RODRIGUES, Priscila C., et al. Clinicopathological prognostic factors of oral tongue squamous cell carcinoma: a retrospective study of 202 cases. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 43, n. 7, p. 795–801, 2014.
116. DISSANAYAKA, Waruna L., et al. Clinical and histopathologic parameters in survival of oral squamous cell carcinoma. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 113, n. 4, p. 518–525, 2012.
117. IBGE | Projeção da população. Disponível em: [https://www.ibge.gov.br/apps/populacao/projecao/box\\_generos.html?ag=42](https://www.ibge.gov.br/apps/populacao/projecao/box_generos.html?ag=42)>. Acesso em: 7 out. 2022.
118. MAROCCHIO, Luciana S, et al. Oral squamous cell carcinoma: an analysis of 1,564 cases showing advances in early detection. **Journal of Oral Science**, v. 52, n. 2, p. 267–273, 2010.



119. EFFIOM, Olajumoke A, et al. Oral squamous cell carcinoma: a clinicopathologic review of 233 cases in Lagos, Nigeria. *Journal of Oral and Maxillofacial Surgery: Official Journal of the American Association of Oral and Maxillofacial Surgeons*, v. 66, n. 8, p. 1595–1599, 2008.
120. KRUSE, Astrid L.; BREDELL, Marius; GRÄTZ, Klaus W. Oral cancer in men and women: are there differences? *Oral and Maxillofacial Surgery*, v. 15, n. 1, p. 51–55, 2011.
121. LARSEN, S. R. et al. The prognostic significance of histological features in oral squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, v. 38, n. 8, p. 657–662, 2009.
122. NG, Jia Hui, et al. Changing epidemiology of oral squamous cell carcinoma of the tongue: A global study: Changing epidemiology of tongue cancer. *Head & Neck*, v. 39, n. 2, p. 297–304, 2017.
123. MAUCERI, Rodolfo, et al. Oral Squamous Cell Carcinoma Mimicking Medication-Related Osteonecrosis of the Jaws (MRONJ): A Case Series. *Oral Research*, v. 1, n. 4, p. 326–331, 2021.
124. LOPES, Felipe Y. K., et al. Chronic traumatic ulcer mimicking oral squamous cell carcinoma on the tongue. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, v. 134, n. 3, p. e178, 2022.
125. BRANDWEIN-GENSLER, Margaret, et al. Oral Squamous Cell Carcinoma: Histologic Risk Assessment, but Not Margin Status, Is Strongly Predictive of Local Disease-free and Overall Survival. *American Journal of Surgical Pathology*, v. 29, n. 2, p. 167–178, 2005.
126. PARAGUASSU, Eber C., et al. Systematic review of the epidemiology of oral cancer in Brazil. *International Journal for Innovation Education and Research*, v. 7, n. 4, p. 366–374, 2019.
127. dos SANTOS, Luiz C. O.; BATISTA, Olívio M.; CANGUSSU, Maria C. T. Characterization of oral cancer diagnostic delay in the state of Alagoas. *Brazilian Journal of Otorhinolaryngology*, v. 76, p. 416–422, 2010.
128. MARTINS, Beatriz. N. F. L., et al. The challenges dentists face to communicate cancer diagnosis: self-assessment based on spikes protocol. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology*, v. 134, n. 3, p. e202, 2022.
129. OMURA, Ken. Current status of oral cancer treatment strategies: surgical treatments for oral squamous cell carcinoma. *International Journal of Clinical Oncology*, v. 19, n. 3, p. 423–430, 2014.
130. KAI, Keita, et al. Cytokeratin immunohistochemistry improves interobserver variability between unskilled pathologists in the evaluation of tumor budding in T1 colorectal cancer: Interobserver variability in budding. *Pathology International*, v. 66, n. 2, p. 75–82, 2016.
131. LEÃO, Priscila L. R., et al. Reproducibility, repeatability, and level of difficulty of two methods for tumor budding evaluation in oral squamous cell carcinoma. *Journal of Oral Pathology & Medicine: Official Publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*, v. 46, n. 10, p. 949–955, 2017.
132. ALMANGUSH, Alhadi, et al. Does evaluation of tumour budding in diagnostic biopsies have a clinical relevance? A systematic review. *Histopathology*, v. 74, n. 4, p. 536–544, mar. 2019.
133. LUGLI, Alessandro, et al. Intratumoral budding as a potential parameter of tumor progression in mismatch repair-proficient and mismatch repair-deficient colorectal cancer patients. *Human Pathology*, v. 42, n. 12, p. 1833–1840, 2011.

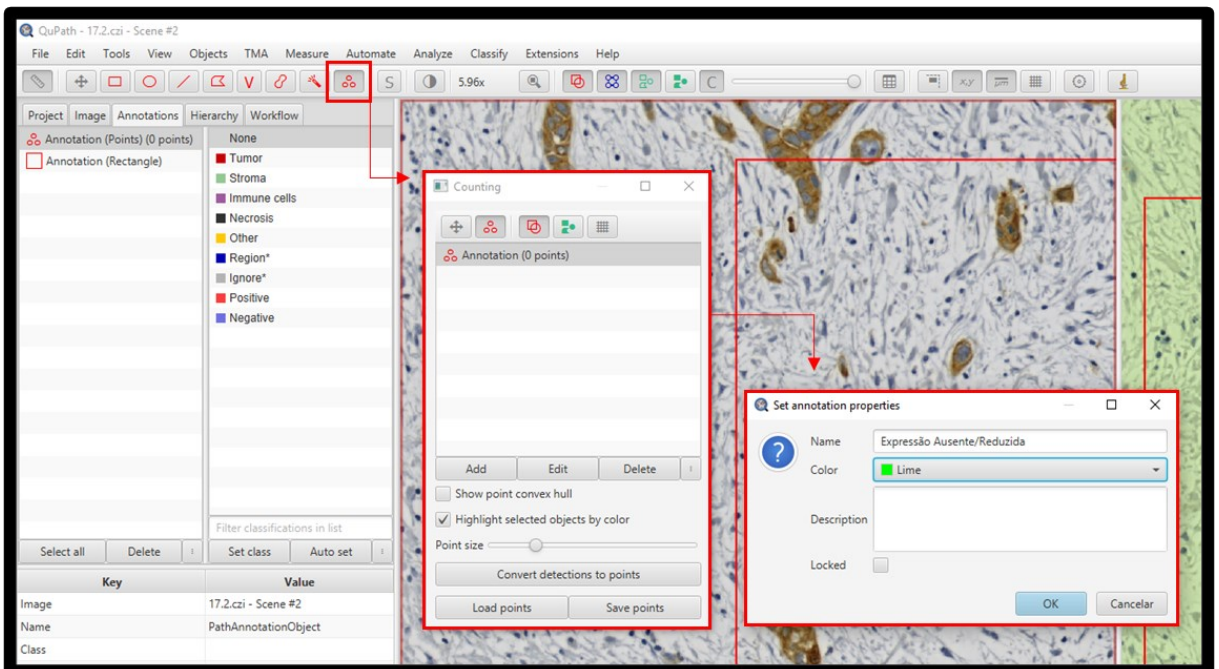
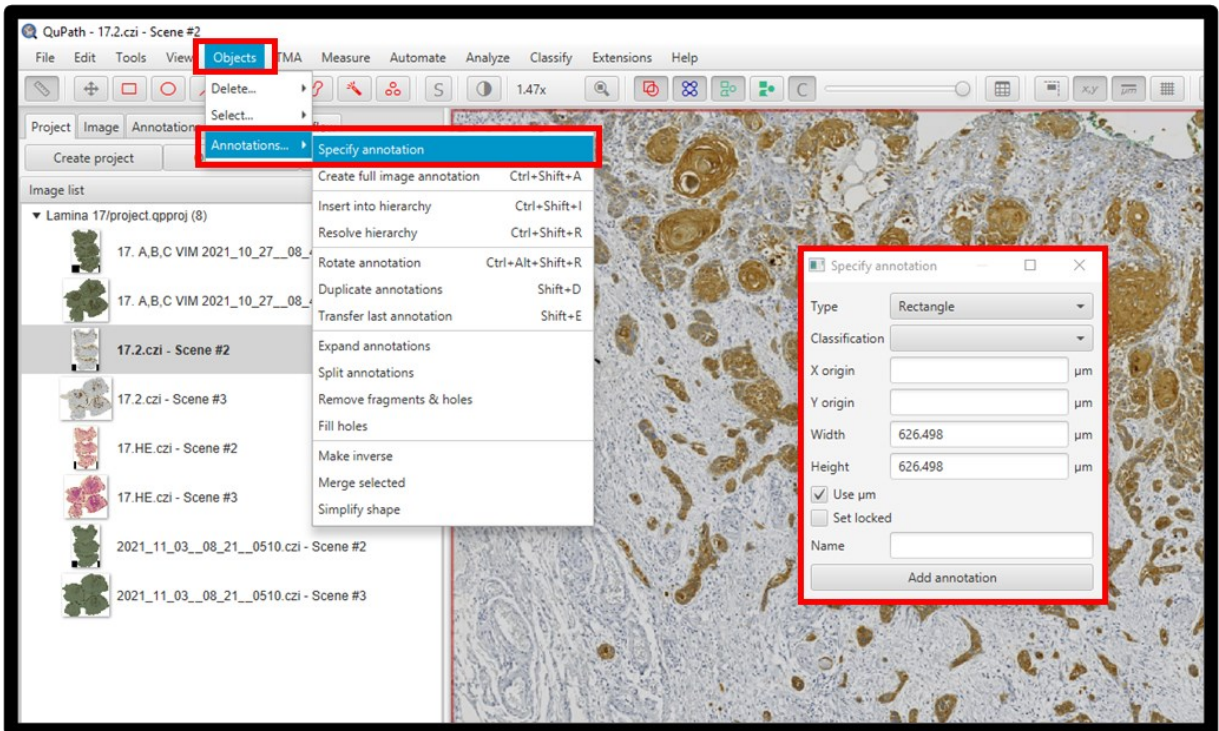
134. SEKI, Mai, et al. Tumour budding evaluated in biopsy specimens is a useful predictor of prognosis in patients with cN0 earlystage oral squamous cell carcinoma. **Histopathology**, v. 70, n. 6, p. 869–879, 2017.
135. MANDAL, Mahitosh, et al. Epithelial to mesenchymal transition in head and neck squamous carcinoma: association of Src activation with E-cadherin down-regulation, vimentin expression, and aggressive tumor features. **Cancer**, v. 112, n. 9, p. 2088–2100, 2008.
136. CHOUAT, Ezzeddine, et al. Tumor budding is a prognostic factor linked to epithelial mesenchymal transition in pancreatic ductal adenocarcinoma. Study report and literature review. **Pancreatology**, v. 18, n. 1, p. 79–84, 2018.
137. QUAN, Qianghua, et al. Cancer stem-like cells with hybrid epithelial/mesenchymal phenotype leading the collective invasion. **Cancer Science**, v. 111, n. 2, p. 467–476, 2020.
138. DE WEVER, Olivier; PAUWELS, Patrick; DE CRAENE, Bram; *et al.* Molecular and pathological signatures of epithelial–mesenchymal transitions at the cancer invasion front. **Histochemistry and Cell Biology**, v. 130, n. 3, p. 481, 2008.
139. YAMASHITA, Nami, et al. Epithelial Paradox: Clinical Significance of Coexpression of E-cadherin and Vimentin With Regard to Invasion and Metastasis of Breast Cancer. **Clinical Breast Cancer**, v. 18, n. 5, p. e1003–e1009, 2018.
140. LÓPEZ-VERDÍN, Sandra, et al. E-Cadherin gene expression in oral cancer: Clinical and prospective data. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 24, n. 4, p. e444–e451, 2019.
141. CHAO, Yvonne L.; SHEPARD, Christopher. R.; WELLS, Alan. Breast carcinoma cells re-express E-cadherin during mesenchymal to epithelial reverting transition. **Molecular Cancer**, v. 9, p. 179, 2010.
142. CHEUNG, Kevin J.; EWALD, Andrew J. Illuminating breast cancer invasion: diverse roles for cell–cell interactions. **Current Opinion in Cell Biology**, v. 30, p. 99–111, 2014.
143. CANO, Amparo, et al. The transcription factor Snail controls epithelial–mesenchymal transitions by repressing E-cadherin expression. **Nature Cell Biology**, v. 2, n. 2, p. 76–83, 2000.
144. ZHAO, Zhigang, et al. Is E-cadherin immunoexpression a prognostic factor for head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC)? A systematic review and meta-analysis. **Oral Oncology**, v. 48, n. 9, p. 761–767, 2012.
145. NIJKAMP, Monique M., et al. Expression of E-cadherin and vimentin correlates with metastasis formation in head and neck squamous cell carcinoma patients. **Radiotherapy and Oncology**, v. 99, n. 3, p. 344–348, 2011.
146. GOYAL, Neelakshi. et al. Association of E-cadherin & vimentin expression with clinicopathological parameters in lingual squamous cell carcinomas & their role in incomplete epithelial mesenchymal transition. **The Indian Journal of Medical Research**, v. 153, n. 4, p. 484–491, 2021.
147. MIGUEL, Andressa F. P., et al. Immunohistochemical Expression of MMP-9, TIMP-1, and Vimentin and its Correlation With Inflammatory Reaction and Clinical Parameters in Oral Epithelial Dysplasia. **Applied immunohistochemistry & molecular morphology**, v. 29, n. 5, p. 382–389, 2021.
148. MOGRE, Saie, et al. Biomarker Potential of Vimentin in Oral Cancers. **Life**, v. 12, n. 2, p. 150, 2022.
149. DONG, Yibo, et al. MiR-876-5p modulates head and neck squamous cell carcinoma metastasis and invasion by targeting vimentin. **Cancer Cell International**, v. 18, n. 1, p. 121, 2018.

150. LIU, Shuli; LIU, Liu; YE, Weimin; *et al.* High Vimentin Expression Associated with Lymph Node Metastasis and Predicated a Poor Prognosis in Oral Squamous Cell Carcinoma. **Scientific Reports**, v. 6, p. 38834, 2016.
151. AKHTAR, Kafil, et al. Transition of Immunohistochemical Expression of E-Cadherin and Vimentin from Premalignant to Malignant Lesions of Oral Cavity and Oropharynx. **Oman Medical Journal**, v. 31, n. 3, p. 165–69. 2016.
152. LI, Hui, et al. The tumor microenvironment: An irreplaceable element of tumor budding and epithelial-mesenchymal transition-mediated cancer metastasis. **Cell Adhesion & Migration**, v. 10, n. 4, p. 434–446, 2016.
153. KRAKHMAL, N. V. et al. Cancer Invasion: Patterns and Mechanisms. **Acta Naturae**, v. 7, n. 2, p. 17–28, 2015.

**APÊNDICE A – Alterações histológicas em CEB**

A) Seta amarela: pérolas de queratina; B) seta vermelha: disceratose; seta branca: mitose típica; C) Triângulo azul: aumento do número e tamanho dos nucléolos; D e E) seta verde: mitoses atípicas; E) Seta preta: hiperchromatismo nuclear e celular; F) pleomorfismo nuclear e celular.

## APÊNDICE B – Ferramentas anotação e contagem



**APÊNDICE C - Distribuição das variáveis dependentes de acordo com características clínicas e patológicas da amostra total (N=47)**

VÁRIÁVEIS INDEPENDENTES	BROTAMENTO TUMORAL		E-CADERINA			VIMENTINA		
	Baixo	Alto	Fraca	Moderada	Forte	Fraca	Moderada	Forte
<b>IDADE</b>								
39-59	11	15	19	3	4	16	6	7
>60	6	15	15	4	2	9	4	8
<b>SEXO</b>								
Masculino	15	19	23	5	6	18	5	11
Feminino	2	11	11	2	0	7	2	4
<b>CIGARRO</b>								
Não	1	5	6	0	0	3	0	3
Sim	16	24	28	7	5	22	7	11
<b>ÁLCOOL</b>								
Não	2	7	8	0	1	6	0	3
Sim	15	20	24	7	4	17	7	11
<b>LOCAL</b>								
Língua	8	19	20	5	2	13	3	11
Assoalho	6	6	9	1	2	8	2	2
Outro	3	5	5	1	2	4	2	2
<b>TUMOR</b>								
T1/T2	9	16	19	1	5	13	3	9
T3/T4	7	12	13	5	1	11	2	6
<b>LINFONODO</b>								
N- (Negativo)	9	16	20	2	3	15	1	9
N+ (Positivo)	6	9	8	4	3	7	2	6
<b>METÁSTASE</b>								
M- (Ausente)	16	28	31	7	6	23	6	15
M+ (Presente)	0	1	1	0	0	1	0	0
<b>GRADAÇÃO HISTOPATOLÓGICA</b>								
<i>In situ</i>	3	0	2	0	1	3	0	0
Diferenciado	6	6	9	1	2	9	0	3
Moderadamente	7	21	20	5	3	11	6	11
Indiferenciado	1	3	3	1	0	2	1	1
<b>ESTÁGIO</b>								
1/2	3	10	11	0	2	6	1	6
3/4	9	14	14	6	3	13	2	8
<b>ÓBITO</b>								
Não	9	21	23	3	4	17	3	10
Sim	1	3	2	1	1	2	1	1
<b>RECORRÊNCIA</b>								
Não	7	16	17	3	3	13	3	7
Sim	3	8	8	1	2	6	1	4
<b>METÁSTASE</b>								
Não	10	23	24	4	5	20	4	9
Sim	0	2	2	0	0	0	0	2
<b>TIPO DA AMOSTRA</b>								
Ressecção	6	21	21	3	3	16	4	7
Incisional	11	9	13	4	3	9	3	8

**APÊNDICE D - Valores estatísticos para relação entre as variáveis independentes e dependentes qualitativas.**

VÁRIÁVEIS INDEPENDENTES	BROTAMENTO TUMORAL		E-CADERINA		VIMENTINA	
	Incisional	Ressecção	Incisional	Ressecção	Incisional	Ressecção
<b>Idade</b>	0,370	1,000	0,326	0,221	0,805	0,227
<b>Sexo</b>	0,127	0,633	0,353	0,38	0,506	0,608
<b>Cigarro</b>	0,164	1,000	0,331	0,259	0,082	0,614
<b>Álcool</b>	0,528	1,000	0,776	0,137	0,441	0,217
<b>Local</b>	0,830	0,384	0,768	0,917	0,501	0,472
<b>Tumor</b>	1,000	0,278	0,307	0,523	0,601	0,31
<b>Linfonodo</b>	0,637	0,272	0,053	0,796	0,486	0,475
<b>Metástase</b>	-	1,000	-	0,587	-	0,441
<b>Gradação histopatológica</b>	0,890	<b>0,05*</b>	0,906	0,614	0,13	0,362
<b>Estágio</b>	0,648	0,508	0,404	0,468	0,481	0,363
<b>Óbito</b>	1,000	1,000	0,877	0,138	0,48	0,525
<b>Recorrência</b>	1,000	1,000	0,877	0,938	0,48	0,841
<b>Metástase</b>	1,000	1,000	0,487	0,587	0,289	0,143

\* Valores de  $p < 0,05$


**APÊNDICE E - Valores estatísticos para relação entre as variáveis independentes e dependentes quantitativas.**

VÁRIÁVEIS INDEPENDENTES	NÚMERO DE BROTAMENTOS <sup>1</sup>		% E-CADERINA		% VIMENTIN	
	Incisional	Ressecção	Incisional	Ressecção	Incisional	Ressecção
<b>Idade</b>	0,325	0,395	0,325	0,438	0,325	0,271
<b>Sexo</b>	0,371	0,716	0,202	0,934	0,599	0,572
<b>Cigarro</b>	0,176	0,557	0,06	0,544	0,072	0,73
<b>Álcool</b>	0,892	0,859	1,000	0,899	1,000	0,253
<b>Local</b>	0,734	0,796	0,744	0,842	0,249	0,419
<b>Tumor</b>	0,393	0,161	0,217	0,842	0,627	0,923
<b>Linfonodo</b>	0,906	0,172	<b>0,031*</b>	0,693	0,238	0,621
<b>Metástase</b>	-	0,563	-	0,298	-	0,223
<b>Gradação histopatológica</b>	0,388	<b>0,033*</b>	0,887	0,237	<b>0,05*</b>	0,074
<b>Estágio</b>	0,857	0,297	0,207	0,521	0,379	0,634
<b>Óbito</b>	0,558	0,45	0,696	0,316	0,364	0,674
<b>Recorrência</b>	0,079	0,688	0,603	0,157	0,697	0,377
<b>Metástase</b>	0,130	0,148	0,172	0,627	0,12	0,25

\* Valores de  $p < 0,05$



## ANEXO A – Parecer consubstanciado

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA - UFSC 

### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Valor prognóstico da razão neutrófilo/linfócito intra-tumoral em pacientes com carcinoma epidermoide da boca e orofaringe

**Pesquisador:** Elena Riet Correa Rivero

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 17674419.9.0000.0121

**Instituição Proponente:** Departamento de Patologia

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 3.490.975

#### Apresentação do Projeto:

Trata-se do parecer de um estudo observacional de tipo coorte prospectiva-retrospectiva. Serão selecionados retrospectivamente pacientes diagnosticados com CE de boca e orofaringe admitidos para tratamento no serviço ambulatorial de cabeça e pescoço do Centro de pesquisas oncológicas (CEPON) e do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago (HU/UFSC/EBSERH. O referido projeto de Tese de Doutorado está vinculado ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina do doutoranda Andressa Fernanda Paza Miguel sendo orientado pela profa. Dra Elena Riet Correa Rivero. Os pesquisadores solicitam dispensa de TCLE com as seguintes argumentações: "por ser um estudo descritivo retrospectivo que visa estabelecer a casuística dos casos de câncer de boca e orofaringe já diagnosticados.2. Não haverá recrutamento e participação direta de seres humanos na pesquisa. A coleta de dados será feita a partir dos prontuários e blocos de parafina provenientes de procedimentos cirúrgicos já realizados para fins de tratamento.3. Devido ao diagnóstico tardio, os casos de câncer de boca e orofaringe tendem a apresentar alta morbidade e mortalidade. Dessa maneira, existe a possibilidade de alguns pacientes já terem ido a óbito, ou ainda, apresentarem sequelas graves devido ao tratamento mutilante. Obter o consentimento destes indivíduos ou de seus familiares, poderia constituir um aborrecimento e acarretar impactos psicológicos. Assim, considerando que a perda de sigilo dos dados será o maior risco desta pesquisa e todos os cuidados que serão tomados para evita-lo, o risco de danos psicológicos no momento da obtenção do consentimento

**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.propeq@contato.ufsc.br

Página 01 de 04

UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA - UFSC 

Continuação do Parecer: 3.490.975

representaria maiores prejuízos ao paciente.4. Os casos tratados pelo CEPON não provêm apenas da cidade de Florianópolis. Diversos casos são oriundos de outras regiões do Estado, por tratar-se de um Centro de Referência no tratamento oncológico.5. Os dados dessa pesquisa contribuirão com a construção do conhecimento científico, visando o desenvolvimento de novos marcadores de prognóstico e novas terapias para aplicação futura. Diante do exposto será solicitada ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do CEPON e HU/UFSC/EBSERH a dispensa do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE)."

#### Objetivo da Pesquisa:

**Objetivo Primário:**

Avaliar a razão neutrófilo/linfócito (NLR) no sangue e nos tumores de pacientes com carcinoma epidermoide (CE) de boca e orofaringe e sua influência na sobrevida dos mesmos.

**Objetivo Secundário:**

- Avaliar a contagem absoluta de neutrófilos no sangue e seu marcador imuno-histoquímico no ambiente intra-tumoral de pacientes com CE;
- Avaliar a contagem absoluta de linfócitos no sangue e seu marcador imuno-histoquímico no ambiente intra-tumoral de pacientes com CE;
- Calcular a NLR no sangue e no ambiente intra-tumoral de pacientes com CE e avaliar seu impacto na sobrevida global, livre de doença e doença específica;
- Comparar o valor prognóstico do NLR sanguíneo e tecidual na sobrevida de pacientes com CE;
- Avaliar a correlação entre a contagem de neutrófilos, linfócitos e do NLR com as características clínicas de pacientes com CE.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

**Riscos:**

Durante a pesquisa será utilizado apenas o material resultante da cirurgia para retirada da lesão previamente realizada e informações presentes na ficha clínica, os quais se encontram armazenados nos arquivos do CEPON e HU, sem causar novamente os desconfortos da cirurgia e da coleta sanguínea já realizadas. Os pesquisadores serão os únicos que terão acesso aos dados, entretanto há um risco de perda de sigilo dessas informações, mesmo que involuntário e não intencional, mas os pesquisadores garantem que tomarão todos os cuidados para evitar que isso ocorra. Os resultados deste trabalho poderão ser apresentados em encontros ou revistas científicas, mas mostrarão apenas os resultados obtidos como um todo, sem revelar seu nome ou qualquer informação relacionada à privacidade.

**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.propeq@contato.ufsc.br

Página 02 de 04

Continuação do Parecer: 3.490.975

**Benefícios:**

Os dados dessa pesquisa contribuirão com a construção do conhecimento científico, visando o desenvolvimento de novos marcadores de prognóstico e novas terapias para aplicação futura.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

A pesquisa é relevante e apresenta importantes contribuições ao diagnóstico e tratamento oncológico. Há a presença de documentos necessários à submissão e nos documentos emitidos pelo CEPON e o Hospital Universitário são mencionados cuidados no acesso ao material a ser utilizado na pesquisa, referenciando os aspectos relacionados ao sigilo quanto às informações dos pacientes a serem realizados pelos funcionários que farão a disponibilização de dados, materiais e informações para o pesquisador - garantindo-se o anonimato das informações específicas do paciente.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

Solicita-se dispensa de TCLE pelos motivos expostos no item apresentação deste parecer.

**Recomendações:**

não se aplica.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Conclusão: aprovado.

Embora o período pretendido para acesso aos pacientes referenciado pelos pesquisadores como de 2017 a 2018 constitua-se em possibilidade para solicitação de um TCLE, este Comitê considerou a exposição de motivos dos pesquisadores e as garantias de anonimização dos dados informados pelas instituições nas quais o estudo será realizado.

**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_INFORMACOES_BASICAS_DO_P ROJETO_1379544.pdf	12/07/2019 11:06:32		Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	12/07/2019 11:03:15	Andressa Fernanda Paza Miguel	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Detalhado.docx	12/07/2019 11:01:49	Andressa Fernanda Paza Miguel	Aceito
Declaração de	Declaracao_material_biologico_HU.	28/06/2019	Andressa Fernanda	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 E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br  
 Telefone: (48)3721-6094

Página 03 de 04

Continuação do Parecer: 3.490.975

Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	pdf	18:18:56	Paza Miguel	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_da_Instituicao_Hu.docx	28/06/2019 18:18:38	Andressa Fernanda Paza Miguel	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Declaracao_da_Instituicao CEPON.pdf	28/06/2019 18:16:17	Andressa Fernanda Paza Miguel	Aceito

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

FLORIANOPOLIS, 07 de Agosto de 2019

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 E-mail: cep.propesq@contato.ufsc.br  
 Telefone: (48)3721-6094

Página 04 de 04