



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

Mariáh Luz Lisboa

**ESTUDO DA IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO
COMO FERRAMENTA AUXILIAR NO DIAGNÓSTICO DO CÂNCER DE
CAVIDADE ORAL E DE OROFARINGE,
COMPARADA AOS DADOS CLÍNICOS, HISTOLÓGICOS E
IMUNOHISTOQUÍMICOS.**

Florianópolis
2023

Mariáh Luz Lisboa

**ESTUDO DA IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO
COMO FERRAMENTA AUXILIAR NO DIAGNÓSTICO DO CÂNCER DE
CAVIDADE ORAL E DE OROFARINGE,
COMPARADA AOS DADOS CLÍNICOS, HISTOLÓGICOS E
IMUNOHISTOQUÍMICOS.**

Tese submetida ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Federal de Santa Catarina como requisito parcial para a obtenção do título de Doutora em Odontologia, Área de Concentração Diagnóstico Bucal.

Orientadora: Prof.^a. Liliane Jante Grando, Dr.^a

Florianópolis

2023

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

Lisboa, Mariáh Luz

ESTUDO DA IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO COMO FERRAMENTA AUXILIAR NO DIAGNÓSTICO DO CÂNCER DE CAVIDADE ORAL E DE OROFARINGE, COMPARADA AOS DADOS CLÍNICOS, HISTOLÓGICOS E IMUNOHISTOQUÍMICOS. / Mariáh Luz Lisboa ; orientadora, Liliane Janete Grando, 2023.

83 p.

Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós Graduação em Odontologia, Florianópolis, 2023.

Inclui referências.

1. Odontologia. 2. Diagnóstico precoce do câncer de cavidade oral e orofaringe. 3. Imunofenotipagem por citometria de fluxo. 4. Biomarcadores. I. Grando, Liliane Janete . II. Universidade Federal de Santa Catarina. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

Mariáh Luz Lisboa

**ESTUDO DA IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO
COMO FERRAMENTA AUXILIAR NO DIAGNÓSTICO DO CÂNCER DE
CAVIDADE ORAL E DE OROFARINGE,
COMPARADA AOS DADOS CLÍNICOS, HISTOLÓGICOS E
IMUNOHISTOQUÍMICOS.**

O presente trabalho em nível de Doutorado foi avaliado e aprovado, em 03 de março de 2023, pela banca examinadora composta pelos seguintes membros:

Prof.^a Alessandra Dutra da Silva, Dr.^a
Universidade do Sul de Santa Catarina (Unisul)

Prof.^a Daniella Serafin Couto Vieira, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Chandra Chiappin Cardoso, Dr.^a
Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC)

Certificamos que esta é a versão original e final do trabalho de conclusão que foi julgado adequado para obtenção do título de Doutora em Odontologia, Área de Concentração em Diagnóstico Bucal.

Insira neste espaço a
assinatura digital

Coordenação do Programa de Pós-Graduação

Insira neste espaço a
assinatura digital

Prof.^a Liliane Janete Grando, Dr.^a
Orientadora

Florianópolis, 2023.

Dedico este trabalho a todos os pacientes que aceitaram participar do estudo, contribuindo para a evolução da ciência brasileira.

AGRADECIMENTOS

À Deus, causa primária de todas as coisas, pela oportunidade dos estudos acadêmicos vividos nesta existência.

À minha família, em especial aos pais, Jofre e Anna Carla, que me deram a vida e sempre investiram nos meus estudos.

Ao Guilherme, companheiro de muitas jornadas, pelo amor e dedicação com a nossa filha para que este trabalho fosse possível.

À minha orientadora, Liliane Janete Grando, pela confiança de mais um trabalho juntas, pelos ensinamentos, pela troca de experiências, pela dedicação com o meu trabalho, pela paciência e pelo grande exemplo. É um privilégio ser sua aluna. Muito obrigada por tudo.

À Professora Maria Claudia Santos da Silva, pela confiança depositada em mim e na Profa. Liliane, por ter acreditado nesse trabalho, pelos ensinamentos e por toda a parceria.

Aos professores membros da banca de qualificação e defesa desta tese pela dedicação e contribuições para o aperfeiçoamento do trabalho.

Aos professores da Unidade de Laboratório de Anatomia Patológica do HU-UFSC/EBSERH pela coleta de amostras das peças cirúrgicas, pelas reações de imunohistoquímica do trabalho e pelo auxílio na leitura das lâminas.

À Bruna Fisher Duarte, que foi uma grande parceira desse trabalho. Juntas trocamos experiências, dúvidas, angústias e também bons momentos.

Aos médicos Dr Gustavo Phillipi de Los Santos e Dr João Henrique Cunha Villela, que realizaram as cirurgias de exérese dos tumores e contribuíram muito para a coleta de amostras.

Às pós-graduandas Lisandra e Ana Gabriela, que realizaram as análises no citômetro de fluxo de parte da amostra.

Aos graduandos Carlos Henrique Horst e Gabriely Franzoi, que auxiliaram na coleta de dados dos prontuários médicos.

Aos colegas de trabalho, professores e residentes do Núcleo de Odontologia Hospitalar pelo apoio e incentivo, em especial a amiga Professora Alessandra Rodrigues de Camargo.

Ao Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago – HU-UFSC/EBSERH por me possibilitar cursar o doutorado.

À Universidade Federal de Santa Catarina, onde realizei os cursos de graduação, especialização, mestrado e doutorado.

À todos que contribuíram para este trabalho.

“A menos que modifiquemos a nossa maneira de pensar, não seremos capazes de resolver os problemas causados pela forma como nos acostumamos a ver o mundo” (Albert Einstein).

RESUMO

Introdução: o estudo de biomarcadores para o câncer vem crescendo e a imunofenotipagem por citometria de fluxo (CF) representa um método rápido, sensível e específico de avaliação desses marcadores. **Objetivos:** avaliar a correlação das variáveis clínicas com a expressão dos biomarcadores Ki-67, p53 e p16 em amostras de carcinoma epidermóide de cavidade oral e orofaringe, pelos métodos de imuno-histoquímica (IHQ) e imunofenotipagem por citometria de fluxo. **Metodologia:** foi realizado um estudo do tipo observacional analítico transversal e quantitativo. Foram incluídos na amostra, pacientes que apresentaram lesões bucais com suspeita clínica de Carcinoma Epidermóide de orofaringe, hipofaringe e laringe. As amostras foram obtidas a partir da biopsia ou peça cirúrgica de um mesmo paciente e submetidas as seguintes análises: exame histológico complementado por imunoistoquímica (padrão ouro) e exame de imunofenotipagem por CF. Foram avaliadas a expressão dos marcadores Ki-67, p16 e p53. Os dados extraídos dos exames laboratoriais foram correlacionados com as informações clínicas obtidas por meio dos prontuários médicos. **Resultados:** dos 50 pacientes da amostra, 42 tiveram diagnóstico histológico confirmatório de Carcinoma Epidermóide. Houve predominância de pacientes do sexo masculino, com média de idade de 62 anos e usuários de tabaco, sendo que 56% dos pacientes usavam concomitante tabaco e álcool. Na correlação entre as variáveis clínicas e a expressão dos marcadores, houve associação estatisticamente significativa entre tamanho do tumor e a expressão de Ki-67 e p53 por imunofenotipagem por citometria de fluxo. Os testes de associação entre os biomarcadores observados nos dois exames demonstraram equivalência, porém com fraca concordância pelo teste Kappa. **Conclusões:** o perfil clínico da amostra foi compatível com os dados publicados para o câncer de boca. A associação entre as características clínicas da doença com as observações dos exames de histopatologia, IHQ e imunofenotipagem por CF foram, na maioria, estatisticamente não significativas. Provavelmente, esse fato está relacionado ao viés de poucas amostras analisadas, principalmente por falta de viabilidade celular. O estudo de tumores de origem epitelial por CF ainda é pioneiro e novos trabalhos são necessários a fim de aprimorar essa metodologia.

Palavras-chave: carcinoma epidermóide oral; biomarcadores; citometria de fluxo; imuno-histoquímica.

ABSTRACT

Introduction: the study of cancer biomarkers is increasing and immunophenotyping by flow cytometry (FC) represents a fast, sensitive, and specific method for evaluating these markers. **Aims:** to evaluate the correlation of clinical variables with the expression of Ki-67, p53 and p16 biomarkers in samples of squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx, by immunohistochemistry (IHC) and immunophenotyping by flow cytometry methods. **Methods:** this study is observational analytical cross-sectional and quantitative. Patients with oral, oropharyngeal, hypopharyngeal and laryngeal lesions with clinical suspicion of squamous cell carcinoma were included in the sample. Samples obtained from biopsy or surgery of the primary tumor were sent for this analyses: histopathological examination and IHC (gold standard) and immunophenotyping by FC. The expression of Ki-67, p16 and p53 markers were evaluated. Data extracted from laboratory tests were correlated with clinical information obtained from medical records. **Results:** 50 patients were evaluated, but only 42 had a histopathological diagnosis of oral squamous cell carcinoma. There was a predominance of males, a mean age of 62 years old, and abuse of tobacco, with 56% of patients in concomitant use of tobacco and alcohol. In the correlation between clinical variables and marker expression, there was a statistically significant association between tumor size and Ki-67 and p53 expression by immunophenotyping by FC. The tests of association between the biomarkers observed in the IHC and FC were equivalent, but with poor reliability by the Kappa test. **Conclusions:** the sample's clinical profile was consistent with published data for oral cancer. The association between the clinical characteristics of the disease and the histopathology, IHC, and immunophenotyping by FC exams were, in almost all cases, not statistically significant. This fact is probably associated to the bias of the few samples analyzed, mainly due to the absence of cell viability. The study of epithelial tumors by FC is still pioneering and further studies are required to improve this methodology.

Keywords: oral squamous cell carcinomas; cancer biomarker; flow cytometries; immunohistochemistry.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1. Anatomia da cavidade oral.....	20
Figura 2. Diagrama demonstrando resumidamente o processamento das amostras pelo método de Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo, segundo Duarte (2022).	46
Figura 3. Variadas apresentações clínicas do carcinoma epidermóide nos pacientes da amostra.	50
Figura 4. Gráfico de distribuição da amostra (n=42) quanto a graduação histológica do carcinoma epidermóide.	51
Figura 5. Gráfico de distribuição da amostra (n=42) de acordo com o tipo de tratamento realizado.....	52
Figura 6. Análises clínicas, histológicas e de imuno-histoquímica de três pacientes da amostra.	55

LISTA DE QUADROS

Quadro 1. Classificação TNM dos tumores de lábio e cavidade oral.	31
Quadro 2. Classificação TNM dos tumores de orofaringe.	32
Quadro 3. Descrição das informações clínicas coletadas nesse estudo.	42
Quadro 4. Descrição das informações laboratoriais coletadas nesse estudo.	43

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Distribuição da amostra (n = 50) quanto ao hábito do tabagismo (fumante, ex-fumante e não fumante); tipo de fumo consumido e quantidade de cigarros consumidos.	48
Tabela 2. Distribuição da amostra (n = 50) quanto ao hábito do etilismo (fumante, ex-etilista e não fumante) e tipo de bebida alcoólica.	49
Tabela 3. Tamanho da lesão ao exame físico, agrupados conforme a classificação TNM, AJCC, 8ª ed.	50
Tabela 4. Distribuição da amostra (n = 28) de acordo com o estágio clínico, o estadiamento TNM, a infiltração das margens e tipo de invasão.	53
Tabela 5. Teste não paramétrico de <i>Kruskal-Wallis</i> de correlação das variáveis selecionadas.	56
Tabela 6. Teste <i>Post-Hoc</i> para avaliar em quais variáveis há efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$).	56
Tabela 7. Teste de <i>McNemar</i> entre os biomarcadores do Grupo 1 e Grupo 2.	57
Tabela 8. Teste de concordância entre os Grupos 1 e 2 - <i>Kappa de Cohen</i>	58
Tabela 9. Análise da expressão do biomarcador Ki-67 nos Grupos 1 e 2, e sua associação com tabagismo, tamanho e localização da lesão.	59
Tabela 10. Análise da expressão do biomarcador p16 nos Grupos 1 e 2, e sua associação com tabagismo, tamanho e localização da lesão.	60
Tabela 11. Análise da expressão do biomarcador p53 nos Grupos 1 e 2, e sua associação com tabagismo, tamanho e localização da lesão.	62

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AIDS	Síndrome da imunodeficiência humana adquirida
AJCC	<i>American Joint Committee on Cancer</i>
CCOO	Câncer de cavidade oral e de orofaringe
CF	Citometria de fluxo
COVID-19	<i>Corona Virus Disease</i>
DNA	Ácido desoxirribonucleico
FVC	Falta de viabilidade celular
GBD	<i>Global Burden Disease</i>
H&E	Hematoxilina e eosina
HP	Histológico
HPV	Papiloma Vírus Humano
HU-UFSC/EBSERH	Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade Federal de Santa Catarina
IHQ	Imuno-histoquímica
INCA	Instituto Nacional do Câncer
LOEH/CCS/UFSC	Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias
NCCN	<i>National Comprehensive Cancer Network</i>
NOH/HU-UFSC/EBSERH	Núcleo de Odontologia Hospitalar
OMS	Organização Mundial de Saúde
PET/CT	Tomografia computadorizada por emissão de pósitrons
REM	Ressonância magnética
SISREG	Sistema Nacional de Regulação
SUS	Sistema Único de Saúde
TC	Tomografia computadorizada
TNM	Estadiamento clínico proposto pelo <i>American Joint Committee on Cancer</i>
UFSC	Universidade Federal de Santa Catarina
ULAP/HU-UFSC/EBSERH	Unidade de Laboratório de Anatomia Patológica
UOCB	Unidade de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia Buco-maxilo-facial
UV	Ultravioleta
VADS	Vias aéreas e digestivas superiores
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
18F-FDG	18F-fluordesoxiglicose

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	OBJETIVOS	19
2.1	OBJETIVO PRINCIPAL	19
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	19
3	REVISÃO DE LITERATURA	20
3.1	CÂNCER DE CAVIDADE ORAL E OROFARINGE.....	20
3.1.1	Fatores de risco	21
3.1.1.1	<i>Tabaco</i>	22
3.1.1.2	<i>Álcool</i>	22
3.1.1.3	<i>Papiloma Vírus Humano</i>	23
3.1.1.4	<i>Fatores Genéticos</i>	24
3.1.1.5	<i>Radiação ultravioleta (UV) e câncer de lábio</i>	25
3.1.2	Carcinogênese	26
3.1.3	Características Clínicas	27
3.1.4	Exame físico da cavidade oral e orofaringe	29
3.1.5	Características Histológicas	30
3.1.6	Tratamento	30
3.1.7	Exames de imagem no câncer de cavidade oral e orofaringe	33
3.1.8	Prognóstico	34
3.1.9	Biomarcadores	35
3.1.9.1	<i>Marcador Ki-67</i>	35
3.1.9.2	<i>Marcador p16</i>	36
3.1.9.3	<i>Marcador p53</i>	37
3.2	A IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO COMO MÉTODO COMPLEMENTAR DE DIAGNÓSTICO	37
4	METODOLOGIA	40
4.1	DELINEAMENTO DO ESTUDO.....	40
4.2	SELEÇÃO DA AMOSTRA	40
4.3	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO DA AMOSTRA.....	41
4.3.1	Critérios de inclusão	41
4.3.2	Critérios de exclusão	41
4.4	INSTRUMENTOS DO TRABALHO	42
4.5	COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS	43

4.6	GRUPO 1: ESTUDO HISTOLÓGICO E DE IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	43
4.7	GRUPO 2: IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO	44
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	46
5	RESULTADOS	48
5.1	AVALIAÇÃO DOS BIOMARCADORES	53
5.1.1	Avaliação do marcador Ki-67	58
5.1.2	Avaliação do marcador p16.....	59
5.1.3	Avaliação do marcador p53.....	61
6	DISCUSSÃO	63
7	CONCLUSÕES.....	71
7.1	CONSIDERAÇÕES FINAIS	71
	REFERÊNCIAS	72
	ANEXO A – TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO...81	
	ANEXO B – TABELA DE DADOS BRUTOS	83

1 INTRODUÇÃO

O câncer de cavidade oral e de orofaringe (CCOO) representa a quinta neoplasia maligna mais comum em homens brasileiros (INCA, 2022) e está entre as dez mais frequentes do mundo, constituindo, portanto, um problema de saúde pública global (RIVERA, 2015; MADHURA et al., 2020). O carcinoma epidermóide corresponde a 95% desses tumores (STEFANUTO; DOUCET; ROBERTSON, 2014; DE PAZ, 2017; AMORIM; DA SILVA SOUZA; ALVES, 2019; VARTHOLOMATOS et al., 2019; AUPÉRIN; 2020).

O CCOO é uma doença complexa e multifatorial em que ocorre a interação de fatores genéticos e epigenéticos com etiologia associada a agentes carcinogênicos externos, como o consumo de tabaco e álcool, infecção pelo papiloma vírus humano (HPV) e radiação ultravioleta para os tumores de lábio (FORD; FARAH, 2013; MONTERO; PATEL, 2015; KUMAR et al., 2016; WONG; WIESENFELD, 2018; AUPERIN, 2020).

O principal tratamento para essa doença é a excisão cirúrgica do tumor primário com margens adequadas de 1 cm de mucosa normal visível e palpável do tumor macroscópico (HOWARD; AGRAWAL; GOOI, 2021). Contudo, se houver comprometimento das margens ou a ocorrência de metástases, o tratamento multimodal com radioterapia e quimioterapia adjuvantes se faz necessário (GHARAT; MOMIN; BHAVSAR, 2016; RIVERA, 2015; HOWARD; AGRAWAL; GOOI, 2021).

O manejo do paciente com carcinoma epidermóide em estágio avançado frequentemente promove efeitos deletérios nas funções fisiológicas e na aparência estética dos doentes, além dos danos colaterais agudos e crônicos da radioterapia (DE PAZ et al., 2017; WONG; WIESENFELD, 2018).

Sharma, Mishra e Parikh (2019) consideraram que os pacientes com essa doença têm piora na qualidade de vida de modo mais significativo em comparação a outras malignidades. Os autores sugerem que o protocolo de tratamento e intervenção para o carcinoma epidermóide de cavidade oral e orofaringe deve estar focado não apenas na sobrevivência, mas também em garantir a qualidade de vida ao longo do tratamento e da recuperação, com estratégias que facilitem a gestão da dor, da instabilidade psicossocial e redução de perdas debilitantes da função. Ademais, os tumores com maior estadiamento clínico e/ou patológico tem pior prognóstico (VOSSSEN et al., 2019).

De acordo com o Instituto Nacional de Câncer (INCA, 2022), o diagnóstico precoce de neoplasias malignas é de suma importância para redução dos índices de incidência e mortalidade da doença.

O carcinoma epidermóide de cavidade oral e orofaringe têm considerável mortalidade e morbidade, com taxa de sobrevivência relativa em cinco anos entre 40 a 50% aproximadamente. Apesar dos avanços de diagnóstico e tratamento na área da oncologia, não foram registradas alterações nas taxas de sobrevida dos pacientes ao longo dos anos. Um dos fatores que contribuem para isso são as falhas na detecção precoce, visto que a maioria dos indivíduos já apresenta metástase locorreional no momento do diagnóstico (FANG et al., 2009; ECONOMOPOULOU et al., 2019).

Nesse contexto, o estudo de biomarcadores para o CCOO vem crescendo (ALMANGUSH et al., 2017). A identificação de biomarcadores em lesões malignas orais pode levar ao diagnóstico precoce do câncer, mas também pode ser utilizada para o estadiamento, avaliação da resposta terapêutica, detecção de recorrências e prognóstico (SØLAND; BRUSEVOLD, 2013; ALMANGUSH et al., 2017; ECONOMOPOULOU et al., 2019).

Dentre os biomarcadores mais utilizados para o carcinoma epidermóide de cavidade oral e orofaringe, pode-se citar: o Ki-67 como um dos marcadores de proliferação celular mais estudados, o p53 como um dos marcadores de supressão tumoral e resposta antitumoral mais relevantes, e o p16 como um dos marcadores para a detecção do vírus HPV mais amplamente utilizados, representando um fator prognóstico importante para as lesões de orofaringe (SØLAND; BRUSEVOLD, 2013; ADHAM et al., 2021; DODDAWAD et al., 2022;

O exame histológico, complementado com imuno-histoquímica, ainda representa o padrão ouro para o diagnóstico de lesões orais suspeitas. Entretanto, esse método possui limitações, como a incapacidade de analisar a totalidade das células da amostra e a morosidade da técnica decorrente das etapas laboratoriais (COTTA, 2010; DUARTE, 2022).

A imunofenotipagem por citometria de fluxo (CF) representa um método rápido, sensível e específico de avaliação de biomarcadores. Esse método é baseado na avaliação de características celulares específicas, incluindo propriedades físicas, como tamanho da célula e complexidade do citoplasma, através da medição de vários antígenos (intracelulares e de expressão na membrana da célula) pelo uso de

anticorpos conjugados com fluorocromos (DEL PRÍNCIPE et al., 2019). Ainda, o método possibilita a avaliação de diferentes populações celulares simultaneamente (VIEIRA, et al., 2022).

Em 2008, a Organização Mundial da Saúde (OMS) incorporou a imunofenotipagem por CF no diagnóstico das leucemias, e atualmente é o principal método diagnóstico das neoplasias onco-hematopoiéticas, pois um grande número de células pode ser avaliado com precisão em um período muito curto de tempo (SANTOS; DE MORAIS CORDEIRO, 2021).

A imunofenotipagem por CF ainda não integra a rotina laboratorial para o diagnóstico de tumores sólidos, porém já é utilizada na prática clínica como um método complementar de diagnóstico. Acosta, Pereira e Arroz (2016) descreveram que esse método é altamente sensível (96,7%) e específico (99,3%) quando comparado ao padrão ouro para o diagnóstico de carcinomas metastáticos. Os autores sugeriram que a detecção de células CD326 (antígeno epitelial específico, clone Ber-Ep4) positivas, CD45 negativas e CD33 negativas é fortemente indicativa da presença de células de carcinoma. Todavia, afirmam que é necessário avaliar os resultados por CF em conjunto com a análise histológica padrão para a precisão do diagnóstico. Também com resultados promissores, Ferreira-Facio et al. (2021) sugeriram um protocolo de 12 marcadores para orientação diagnóstica e classificação de tumores sólidos pediátricos, com alta precisão de diagnóstico, exceto para um pequeno grupo de amostras de linfonodos infiltrados por linfoma de Hodgkin.

O diagnóstico rápido e preciso do câncer é fundamental para a intervenção terapêutica precoce, o que impacta em melhor prognóstico para o paciente. Como a análise de tumores sólidos é dependente do exame histológico padrão, geralmente complementado por painéis reativamente amplos de imuno-histoquímica, exige muitas vezes maior tempo para obtenção de resultados. Desse modo, a imunofenotipagem por CF pode complementar a análise diagnóstica de tumores sólidos de origem epitelial, produzindo resultados eficazes em um curto período de tempo, o que possibilita abordagem terapêutica mais precoce, com melhor prognóstico ao doente (FERREIRA-FACIO et al., 2021).

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO PRINCIPAL

Avaliar a correlação das variáveis clínicas com a expressão dos biomarcadores Ki-67, p53 e p16 em amostras de carcinoma epidermóide de cavidade oral e orofaringe, pelos métodos de imuno-histoquímica e imunofenotipagem por citometria de fluxo.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) Descrever o perfil clínico dos pacientes da amostra;
- b) Analisar as lesões com diagnóstico de carcinoma epidermóide de cavidade oral e orofaringe com diferentes métodos, sendo eles: histopatologia, imuno-histoquímica e imunofenotipagem por citometria de fluxo;
- c) Investigar a presença dos marcadores Ki-67 e p53 em lesões com diagnóstico de carcinoma epidermóide de cavidade oral e orofaringe, por imuno-histoquímica e imunofenotipagem por citometria de fluxo;
- d) Investigar a expressão da p16 em lesões com diagnóstico de carcinoma epidermóide de cavidade oral e orofaringe HPV positivas ou não, por imuno-histoquímica e imunofenotipagem por citometria de fluxo.

3 REVISÃO DE LITERATURA

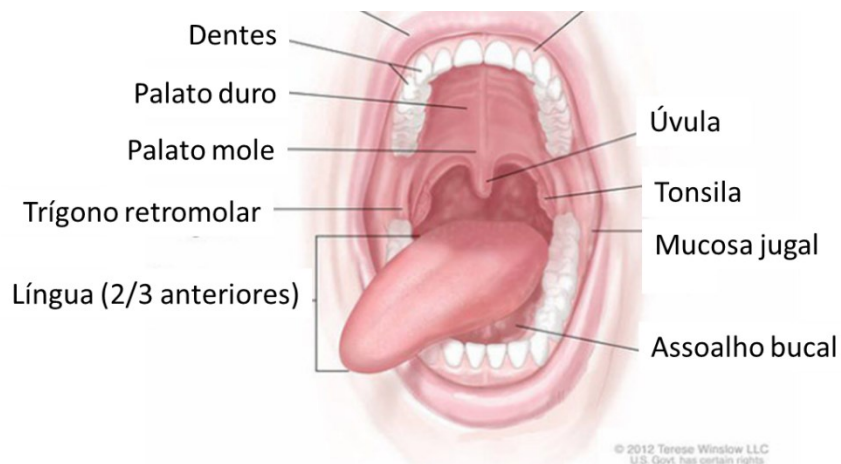
3.1 CÂNCER DE CAVIDADE ORAL E OROFARINGE

O diagnóstico precoce de neoplasias malignas é essencial para promover um plano de tratamento com melhor prognóstico de vida para o paciente.

Na literatura, o termo *Head and Neck Tumour* refere-se aos tumores que acometem a cavidade oral, orofaringe, hipofaringe e laringe (AUPÉRIN, 2020). Sob um amplo espectro, as neoplasias de cabeça e pescoço representam um conjunto de tumores que se distribuem ao longo destas diversas regiões anatômicas. Com exceção dos tumores de pele, as vias aéreas e digestivas superiores (VADS) compreendem os sítios mais acometidos por malignidades (PATRONIERI, 2006; GRAY et al., 2021). As principais estruturas anatômicas que compõe as VADS são: boca, língua, faringe, tonsilas, glândulas salivares, seios nasais, paranasais e face (GRAY et al., 2021).

A cavidade oral é definida como um espaço anatômico situado entre um plano coronal, que é traçado a partir da junção entre palato duro e mole em direção às papilas circunvaladas da língua, até o vermelhão dos lábios. As estruturas localizadas na cavidade oral são: lábios, língua, assoalho bucal, palato duro e mole, rebordo alveolar e trígono retromolar (WONG; WIESENFELD, 2018; HOWARD; AGRAWAL; GOOI, 2021).

Figura 1. Anatomia da cavidade oral.



Fonte: adaptado de WONG; WIESENFELD, 2018

O carcinoma epidermóide, também denominado de carcinoma de células escamosas ou carcinoma espinocelular (CEC), constitui o tipo de neoplasia maligna mais frequentemente observado dentre os tumores de cavidade oral e orofaringe, representando 95% das doenças malignas orais. Outros tumores, como os originados de tecido linfóide, carcinomas em glândulas salivares, carcinomas verrucosos, melanomas, sarcomas e metástases, são vistos com menor frequência (STEFANUTO; DOUCET; ROBERTSON, 2014; DE PAZ, 2017; SLOOTWEG; EL-NAGGAR, 2018; AMORIM; DA SILVA SOUZA; ALVES, 2019; AUPÉRIN; 2020).

Um estudo *Global Burden Disease* (GBD), publicado pelo conjunto de periódicos *The Lancet* em 2019, estimou 890.000 casos de câncer de cavidade oral e orofaringe (CCOO) em todo o mundo, o que representa 5,3% de todos os tumores, excluindo os que não eram melanoma em pele (*Global Burden of Disease Cancer Collaboration*, 2019; AUPÉRIN; 2020).

No Brasil, o Instituto Nacional do Câncer (INCA) informou a incidência de 11.200 casos de câncer de cavidade bucal em homens, que corresponde ao quinto tipo de neoplasia maligna mais comum para esse grupo, representando 5% de todos os tumores. Nas mulheres, esse tipo de lesão não está entre as principais, todavia a incidência foi de até 5,89 mulheres a cada 100mil na região do nordeste brasileiro. Considerando a mortalidade, o câncer de boca é a oitava neoplasia maligna mais letal em homens, o que representa cerca de 4,2% de todas as mortes (INCA; 2022).

3.1.1 Fatores de risco

O CCOO é uma doença multifatorial que apresenta interação complexa de fatores genéticos e epigenéticos de vias celulares e moleculares, com etiologia fortemente associada a fatores exógenos carcinogênicos (GHARAT; MOMIN; BHAVSAR, 2016; MADHURA et al., 2020; FORD; RICH, 2021). Desses, o tabagismo, principalmente se associado ao etilismo, representa o principal fator de risco para o desenvolvimento dos tumores em cavidade oral e orofaringe (FORD; FARAH, 2013; MONTERO; PATEL, 2015; KUMAR et al., 2016; WONG; WIESENFELD, 2018; AUPÉRIN, 2020).

3.1.1.1 *Tabaco*

O tabagismo, em suas várias formas de uso, pode afetar a mucosa oral, bem como os dentes e o tecido periodontal, seja por meio do calor ou através das interações moleculares com os agentes carcinogênicos (FORD; RICH, 2021).

O tabaco contém substâncias que induzem a carcinogênese, como nitrosaminas e hidrocarbonetos policíclicos, que estão associados a uma grande expressão de BL-2, um proto-oncogene que passa a inibir a apoptose e leva as células tumorais ao desenvolvimento de tumores (MONTERO; PATEL, 2015; DE PAZ et al., 2017). Com a metabolização dos carcinógenos ocorre a ativação de enzimas, como a P-450 e as metabolizadoras de xenobióticos, as quais são encontradas principalmente no fígado e nas mucosas das VADS. O acúmulo dessas enzimas aumenta a susceptibilidade do indivíduo aos efeitos dos carcinogênicos. Essas substâncias e seus metabólitos podem ligar-se de modo covalente ao DNA de células-tronco de queratinócitos, gerando mutações na replicação do DNA de células maduras. Os acúmulos dessas alterações podem levar à transformação maligna (KUMAR et al., 2016).

A pessoa tabagista tem de quatro a sete vezes mais chance de desenvolver o carcinoma epidermóide de cavidade oral e orofaringe quando comparada ao indivíduo não fumante e o risco de transformação maligna aumenta proporcionalmente à quantidade de anos de exposição ao tabaco (MONTERO; PATEL, 2015; GHARAT; MOMIN; BHAVSAR, 2016; WONG; WIESENFELD, 2018). Ainda, quando associado ao alto consumo de bebidas alcoólicas as chances de malignização aumentam em até 15 vezes (FORD; RICH, 2021).

3.1.1.2 *Álcool*

O álcool representa um importante fator de risco para o CCOO e etilistas crônicos têm cinco vezes mais chance de desenvolvimento do carcinoma epidermóide em comparação àqueles que não ingerem alcoólicos. A intensidade do consumo de álcool aumenta proporcionalmente o risco de câncer (AUPÉRIN, 2020; FORD; RICH, 2021). Esse fator de risco está mais associado aos tumores de faringe, laringe, esôfago e fígado (KUMAR et al., 2016).

O etilismo integra os principais fatores de risco para o carcinoma epidermóide devido ao seu efeito imunossupressor e ao polimorfismo genético associado ao

metabolismo do álcool (MONTERO; PATEL, 2015; DE PAZ et al., 2017; AUPÉRIN; 2020).

3.1.1.3 *Papiloma Vírus Humano*

A associação entre o Papiloma Vírus Humano (HPV) e a carcinogênese oral foi descrita inicialmente por Syrjanen et al. em 1983 (TANAKA; ALAWI, 2018). Cerca de 25% dos CCOO são lesões de orofaringe associadas ao HPV (MARUR; FORASTIERE, 2016; TUMBAN, 2019).

O HPV está relacionado a maioria dos tumores malignos em colo de útero e em região anogenital (MARUR; FORASTIERE, 2016; TUMBAN, 2019). A prevalência desse vírus em cavidade oral e orofaringe é consideravelmente menor quando comparada à região genital. A infecção oral também está associada ao comportamento sexual, sendo maior em homens do que em mulheres (AUPÉRIN; 2020).

Estudos epidemiológicos têm demonstrado aumento da incidência das lesões de orofaringe HPV-positivas, enquanto que se observa redução do CCOO associado ao tabagismo e etilismo. Diferenças importantes nas características clínicas e resposta ao tratamento entre essas condições foram destacadas na mais recente edição da Classificação de Tumores de Cabeça e Pescoço da OMS (quarta edição de 2017), bem como na oitava edição de 2016 do Comitê Conjunto Americano de Estadiamento de Câncer (*American Joint Committee on Cancer – AJCC*) (AMIN et al., 2017; TANAKA; ALAWI, 2018).

O perfil do indivíduo com tumores HPV-positivos geralmente corresponde a homens mais jovens, abaixo dos 60 anos de idade, não fumantes e de padrão socioeconômico mais elevado, com histórico de múltiplos parceiros sexuais (MARUR; FORASTIERE, 2016; TANAKA; ALAWI, 2018).

O HPV corresponde a um vírus de DNA epitélio-trópico, com especial afinidade por epitélio pavimentoso estratificado, o qual reveste a cavidade oral. Essa família viral compõe aproximadamente 200 cepas virais, sendo mais de 40 transmitidas por contato direto com a pele e membranas mucosas (TANAKA; ALAWI, 2018). Promove lesões proliferativas benignas, como papiloma, verruga vulgar, condiloma acuminado e hiperplasia epitelial focal. No entanto alguns tipos de HPV podem induzir à carcinogênese (TUMBAN, 2019). Então, dependendo da sua capacidade de transformação das células epiteliais infectadas, os subtipos de HPV

podem ser classificados como de baixo ou de alto risco ao desenvolvimento de câncer (JIANG; DONG, 2017; TANAKA; ALAWI, 2018).

Treze tipos de HPV já foram classificados como de alto risco pela Agência Internacional de Pesquisas Oncológicas: 16/18/31/33/35/39/45/51/52/56/58/59/66 (SENKOMAGO, et al., 2019; AUPÉRIN; 2020). Destes, o HPV 16 tem maior relevância, visto que é identificado em cerca de 91% dos carcinomas epidermóides de orofaringe (MARUR; FORASTIERE, 2016; AUPÉRIN; 2020).

O estudo epidemiológico realizado por Aupérin (2020) demonstrou que o HPV está relacionado a 22,4% dos tumores de orofaringe, 4,4% de boca e 3,5% de laringe. Nos Estados Unidos, a porcentagem de tumores em orofaringe HPV-positivos chega a 71%.

O genoma do HPV codifica seis genes não estruturais (genes iniciais: E1, E2, E4, E5, E6 e E7) e dois genes estruturais (genes tardios: L1 e L2). Após a infecção do queratinócito há a integração de E6 e E7 no DNA do hospedeiro e o acúmulo desses oncogenes interferem na regulação do ciclo celular, por meio da ligação e destruição das proteínas supressoras de tumor, p53 e pRb (retinoblastoma). Assim, há perda de controle na replicação e reparo do DNA, e também da apoptose (RIVERA, 2015; KUMAR et al., 2016; TUMBAN, 2019). O prognóstico dos pacientes portadores de tumores HPV-positivos é melhor do que os associados ao tabagismo e etilismo (MARUR; FORASTIERE, 2016).

3.1.1.4 *Fatores Genéticos*

Fatores genéticos também são descritos na literatura como possíveis influenciadores no risco de desenvolvimento do CCOO (LI et al., 2021). A vigilância imunológica pode ser descrita como o processo de monitoramento do sistema imune afim de detectar e destruir patógenos invasores, bem como células com material genético alterado. A não detecção de DNA mutado representa uma falha da vigilância imunológica. O câncer representa uma doença imunológica independente de sua origem genética. Os denominados linfócitos infiltrantes tumorais têm a capacidade de organizar um microambiente tumoral imunossupressor, o qual é dependente das interações recíprocas entre o tumor e o hospedeiro (CHAKRABORTY et al., 2018). Assim, indivíduos imunossuprimidos, seja por medicações pós-transplante ou por síndromes como a da imunodeficiência humana adquirida (AIDS), por exemplo, são

mais susceptíveis ao desenvolvimento de tumores (HOWARD; AGRAWAL; GOOI, 2021; LI et al., 2021).

Algumas associações de risco foram identificadas, como variantes genéticas associadas ao metabolismo do álcool, vias de reparo do DNA e genes envolvidos no metabolismo da nicotina (CONWAY; PURKAYASTHA; CHESTNUTT, 2018).

Ainda, doenças genéticas também podem aumentar o risco de neoplasia maligna oral. Mutações nos genes que codificam as enzimas que reparam as quebras de DNA presentes na anemia de Fanconi, elevam as chances de desenvolvimento do câncer de boca (HOWARD; AGRAWAL; GOOI, 2021; LI et al., 2021). A síndrome de Howel-Evans é uma doença autossômica dominante caracterizada pelo espessamento da pele das mãos e dos pés. Esses indivíduos têm alto risco de câncer de esôfago, mas também de câncer oral, particularmente da língua (HOWARD; AGRAWAL; GOOI, 2021).

Estudos populacionais para determinar a genética ou predisposição familiar para câncer oral são limitados pela coexistência de fatores de risco, como tabagismo e álcool (KUMAR et al., 2016).

3.1.1.5 *Radiação ultravioleta (UV) e câncer de lábio*

O câncer de lábio corresponde a cerca de 10 a 20% dos tumores em cavidade oral e frequentemente se desenvolve a partir da lesão potencialmente maligna, queilite actínica. A maioria das lesões ocorre no lábio inferior (HOWARD; AGRAWAL; GOOI, 2021). Os tumores de lábio podem ser classificados como câncer de VADS, de boca ou como de pele. O tipo histológico presente na grande maioria das lesões também é o carcinoma epidermóide, devido a origem do epitélio pavimentoso estratificado do vermelhão dos lábios (TOPRANI; MANE, 2021).

Os carcinógenos presentes no tabaco podem afetar a mucosa e semimucosa dos lábios. Todavia, devido as características anatômicas, frequentemente ocorre a exposição do vermelhão labial aos raios solares e, por consequência, à radiação ultravioleta (UV) (DE OLIVEIRA RIBEIRO; DA SILVA; MARTINS-FILHO, 2014; RIVERA, 2015; ANT et al., 2019).

A radiação UV promove indiretamente danos ao DNA, através da produção de espécies reativas de oxigênio, dos quais podem ser destacados os superperóxidos, os peróxidos, as hidroxilas e os oxigênios singletos. O acúmulo desses radicais gera um estresse oxidativo, que pode acarretar em perda da capacidade do sistema

imunológico de identificar, reparar ou induzir à apoptose de células com DNA alterado (DE OLIVEIRA RIBEIRO; DA SILVA; MARTINS-FILHO, 2014).

3.1.2 Carcinogênese

A carcinogênese do câncer oral compreende um processo múltiplo e complexo, em que eventos genéticos responsáveis pelas vias de transdução de sinais que controlam o ciclo celular dos queratinócitos estão alterados. O acúmulo dessas alterações ou mutações promove o aparecimento de células tumorais funcionalmente independentes do epitélio pavimentoso estratificado, normalmente constituído por funções celulares fortemente controladas por vias reguladoras, as quais são subvertidas nas células tumorais, aumentando a capacidade dessas de proliferar, estimular a neovascularização e crescer invadindo o tecido localmente ou promovendo metástases em locais distantes (JUREL et al., 2014).

O desenvolvimento do carcinoma epidermóide resulta de múltiplos eventos moleculares que ocorrem a partir de fatores da predisposição genética do indivíduo combinados com a exposição à carcinógenos ambientais (CHOI; MYERS, 2018; TOPRANI; MANE, 2021).

As alterações do genoma, como inserção, deleção ou substituição de nucleotídeos, e anormalidades cromossômicas levam a um fenótipo celular defeituoso e o acúmulo dessas alterações tem como consequências o desenvolvimento de displasia epitelial, o crescimento celular desordenado e, finalmente, o carcinoma (GHARAT; MOMIN; BHAVSAR, 2016; CHAKRABORTY et al., 2018; CHOI; MYERS, 2018; TOPRANI; MANE, 2021).

As mutações ocorrem principalmente nos oncogenes e nos genes supressores de tumor. Enquanto os primeiros têm mutações ativadoras, que promovem a proliferação celular e reduzem a apoptose, os genes supressores de tumor sofrem inibição. A partir dessas alterações, as células tumorais adquirem crescimento autônomo, resultando em desenvolvimento tumoral descontrolado (GHARAT; MOMIN; BHAVSAR, 2016; CHOI; MYERS, 2018)

Em meados da década de 90, Sidransky (1995) e Califano et al. (1996) desenvolveram o modelo de progressão genética do carcinoma epidermóide de VADS. Foi observado que a principal alteração genética desses tumores corresponde a deleções no cromossomo 9, mais especificamente no braço longo em 9p21,

presente de 70-80% nas displasias epiteliais da mucosa oral. A região 9p21, conhecida como locus CDKN2A, codifica os supressores de tumor p16 e p14^{ARF}.

O gene p16 codifica a proteína 16^{Kda} que inibe a CDK4/6 (quinase dependente de ciclina 4/6). A CDK4/6 quando ligada a ciclina D promove a fosforilação da proteína Rb (pRb), liberando o fator de transcrição E2F, que permite a progressão do ciclo celular de G1 para a fase S. Assim, quando a p16^{Kda} liga-se com a CDK4/6, impede a fosforilação de pRb e, conseqüentemente, a liberação de E2F fazendo com que o ciclo celular pare. O gene p16, desta forma, atua como um regulador negativo do ciclo e é considerado um supressor tumoral (CHOI; MYERS, 2008).

A perda da heterozigidade da região cromossômica 17p e a mutação do gene Tp53 são alterações genéticas que ocorrem na fase mais tardia da progressão de displasia para carcinoma epidermóide invasivo. O gene Tp53 também é um supressor de tumor, visto que sua expressão, a proteína p53, por meio de fatores de transcrição, promove a parada reversível do ciclo celular para a reparação do DNA quando alterado. Quando as mutações genéticas excedem a capacidade de reparo, a p53 induz a célula a apoptose (SANTOS et al., 2011).

A perda do controle do ciclo celular e a proliferação de células alteradas são os mecanismos fundamentais que impulsionam a carcinogênese, e os índices quantitativos de proliferação celular são marcadores de potencial malignização, crescimento tumoral e, mais recentemente, de prognóstico de vida do paciente portador do tumor (THOMSON, 2018).

3.1.3 Características Clínicas

Inicialmente, a apresentação clínica do carcinoma epidermóide ocorre como uma lesão caracterizada por placa branca não removível a raspagem (leucoplasia), vermelha (eritroplasia) ou mesmo branco-avermelhada (eritroleucoplasia). Essas placas são denominadas lesões orais potencialmente malignas e são frequentemente assintomáticas (NEVILLE; DAY, 2002; WARNAKULASURIYA, et al., 2021).

A OMS descreve as lesões orais potencialmente malignas, também denominadas de pré-malignas ou cancerizáveis, como um grupo de desordens de tecido morfológicamente alterado com risco de desenvolvimento de câncer na cavidade oral (EL-NAGGAR, 2017; SOARES; PERSCHBACHER; PEREZ-ORDONEZ, 2018; WOO, 2019; WARNAKULASURIYA, et al., 2021).

A leucoplasia e suas variações (eritroleucoplasia, leucoplasia verrucosa proliferativa), a eritroplasia e a fibrose submucosa (mais prevalente na Índia, devido ao hábito de mascar o betel) são as lesões de maior risco de cancerização, visto que mais frequentemente apresentam displasia epitelial, carcinoma in situ ou mesmo invasivo à análise histológica (WOO, 2019).

A leucoplasia é definida como uma placa branca não removível à raspagem que não pode ser caracterizada clinicamente como outra doença. Já a eritroplasia representa uma placa vermelha não removível à raspagem que não pode ser caracterizada clinicamente como outra doença. A excisão cirúrgica da placa vermelha é indicada na maioria das vezes, por apresentar potencial de malignidade maior do que a lesão branca (NEVILLE; DAY, 2002; WARNAKULASURIYA, 2018; WOO, 2019).

A eritroleucoplasia é uma placa mista de coloração vermelha e branca, que pode apresentar bordos irregulares. Bem como na eritroplasia, as áreas vermelhas características de atrofia epitelial geralmente demonstram displasia ou mesmo o carcinoma in situ (WARNAKULASURIYA, 2018).

Na fibrose submucosa ocorre uma reação inflamatória justa-epitelial com conseqüente fibrose da mucosa de revestimento. As alterações fibro-elásticas que ocorrem no epitélio conduzem a rigidez da mucosa oral de revestimento (WOO, 2019).

À medida que aumenta o tempo de evolução das lesões cancerizáveis, frequentemente se desenvolve ulceração superficial no tecido e, com o crescimento da lesão, forma-se uma massa exofítica com superfície granulomatosa ou papilar. No entanto, outros tumores apresentam padrão de crescimento endofítico, o que configura uma úlcera crateriforme de bordos elevados, usualmente com área de necrose central (NEVILLE; DAY, 2002; MONTERO; PATEL, 2015; DE PAZ et al., 2017; WONG; WIESENFELD, 2018; STEIGEN et al., 2020). De modo menos frequente, o carcinoma epidermóide pode ter a apresentação de forma semelhante a lesão cística, mimetizando cistos e tumores odontogênicos (WONG; WIESENFELD, 2018). As lesões iniciais, na maioria das vezes, são indolores ou estão associadas a um pequeno desconforto. Todavia, lesões extensas, devido a invasão tumoral de nervos periféricos, podem ser muito doloridas (NEVILLE; DAY, 2002).

A língua, principalmente em seus bordos, no terço posterior, é a estrutura anatômica mais acometida pelo carcinoma epidermóide, visto que cerca de 50% das lesões ocorre nessa região. Em seguida, descreve-se o assoalho bucal, o palato mole, o tecido gengival, as mucosas jugais e o palato duro como os sítios de maior

frequência do carcinoma epidermóide em ordem decrescente (NEVILLE; DAY, 2002; MONTERO; PATEL, 2015; DE PAZ et al., 2017; MAYMONE et al., 2019; STEIGEN et al., 2020; HOWARD; AGRAWAL; GOOI, 2021).

Além da cavidade oral propriamente dita, os carcinomas epidermóides também se desenvolvem frequentemente no vermelhão do lábio e na orofaringe (NEVILLE; DAY, 2002). Em relação aos tumores de lábio, há evidente predileção pelo lábio inferior de indivíduos de pele clara. O carcinoma epidermóide de lábio, em sua maioria, está associado a exposição crônica ao sol e se desenvolve a partir da lesão cancerizável denominada de queilite actínica (HOWARD; AGRAWAL; GOOI, 2021). O câncer de orofaringe possui características clínicas semelhantes as daqueles desenvolvidos na cavidade oral. Devido à dificuldade de visualização, essas lesões comumente são diagnosticadas mais tardiamente. Os sintomas mais observados são alterações na voz, como rouquidão, disfagia e odinofagia (NEVILLE; DAY, 2002).

3.1.4 Exame físico da cavidade oral e orofaringe

O exame físico minucioso da cavidade oral deve integrar os cuidados médicos e odontológicos de rotina, visto que possui alta capacidade de identificar alterações na mucosa que podem ser potencialmente ou já malignas. A identificação clínica de lesões pode ser associada a métodos auxiliares de diagnóstico bucal, tais como a coloração com azul de toluidina e a quimioluminescência (FORD; FARAH, 2013).

Após a detecção de uma alteração clínica, o procedimento de biópsia deve ser executado para promover a análise histológica do tecido. O exame histológico dos tecidos é considerado o padrão ouro atual para confirmação do diagnóstico de qualquer lesão suspeita de malignidade. No caso de possibilidade clínica de lesão maligna, a biópsia deve ser do tipo incisional (GRÉGOIRE et al., 2010; WONG; WIESENFELD, 2018; RAO et al., 2020).

O êxito no exame histológico depende de o clínico realizar uma coleta de amostra adequada, além de fornecer corretamente os dados de anamnese e exame clínico do paciente. O carcinoma epidermóide exige a coleta de amostras mais profundas devido as características de hiperqueratose do epitélio. Cabe ao patologista a interpretação morfológica do tecido biopsiado e preparado em laboratório, inicialmente corado com hematoxilina e eosina (H&E) (RAO et al., 2020).

O cirurgião-dentista é fundamental no diagnóstico precoce das malignidades que acometem a cavidade bucal, em virtude do conhecimento anatômico da região,

das doenças que acometem a boca e da frequência diária de exames (STEFANUTO; DOUCET; ROBERTSON, 2014; AMORIM; DA SILVA SOUZA; ALVES, 2019).

3.1.5 Características Histológicas

A OMS sugere a diferenciação tumoral em três categorias conforme as características morfológicas do tumor, pleomorfismo nuclear e grau de ceratinização (STEIGEN et al., 2020).

Ao exame histológico, o carcinoma epidermóide pode ser classificado em bem diferenciado (Grau I), moderadamente diferenciado (Grau II), indiferenciado (Grau III) e anaplásico (Grau IV). No primeiro, o epitélio neoplásico maligno guarda semelhança ao epitélio pavimentoso estratificado normal, porém apresenta invasão de tecido conjuntivo na forma de ilhas com ampla ceratinização, distribuída em pérolas de ceratina. O moderadamente diferenciado contém atividade mitótica elevada, com mitoses aberrantes e pleomorfismo nuclear distinto, e geralmente há menos ceratinização. Já nos indiferenciados e anaplásicos predominam células imaturas, com numerosas mitoses atípicas e ceratinização mínima (FANG et al., 2009; MONTERO; PATEL, 2015; DE PAZ et al., 2017; STEIGEN et al., 2020).

3.1.6 Tratamento

No Brasil, a Lei 12.732 de 22 de novembro de 2012, popularmente conhecida como a “Lei dos 60 dias” dispõe no artigo 2º. que:

O paciente com neoplasia maligna tem direito de se submeter ao primeiro tratamento no Sistema Único de Saúde (SUS), no prazo de até 60 (sessenta) dias contados a partir do dia em que for firmado o diagnóstico em laudo patológico ou em prazo menor, conforme a necessidade terapêutica do caso registrada em prontuário único (Brasil, 2012).

O plano de tratamento dos carcinomas epidermóides de cavidade oral e orofaringe, bem como o prognóstico da doença, estão diretamente relacionados com o seu estadiamento clínico e com a graduação histológica (FANG et al., 2009; MONTERO; PATEL, 2015; DE PAZ et al., 2017; STEIGEN et al., 2020).

O estadiamento clínico proposto pelo *American Joint Committee on Cancer*, o sistema TNM, é o mais amplamente aceito devido a ser relativamente simples e de fácil uso, sendo: “T” o tamanho do tumor primário; “N” o comprometimento do sistema

Quadro 2. Classificação TNM dos tumores de orofaringe.

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

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

Nota: IEC - invasão extracapsular.

A ressecção cirúrgica ainda é o tratamento de escolha para os carcinomas epidermóides de cavidade oral e orofaringe e possibilita o estadiamento patológico preciso, por meio da análise da infiltração tumoral nas margens, bem como da invasão no tecido muscular, angiolímfático e do tecido nervoso. Quanto maior é o estadiamento TNM da doença, mais estruturas anatômicas envolvidas na ressecção cirúrgica e maior é a possibilidade de indicação de terapias complementares, como a radioterapia e a quimioterapia (FANG et al., 2009; MONTERO; PATEL, 2015; DE PAZ et al., 2017; STEIGEN et al., 2020; HOWARD; AGRAWAL; GOOI, 2021).

As atuais diretrizes da *National Comprehensive Cancer Network* (NCCN) indicam a excisão tumoral com margens de segurança e definem 1 cm de mucosa normal visível e palpável do tumor macroscópico e 0,5 cm na análise histológica, como margens adequadas. A presença de células tumorais próximo as margens ressecadas (de 0,5 cm) indicam invasão microscópica (PFISTER et al., 2020; HOWARD; AGRAWAL; GOOI, 2021).

Havendo a presença de invasão e/ou a metástase em múltiplos linfonodos, a NCCN indica a realização de radioterapia adjuvante. As recomendações para a quimioterapia adjuvante incluem metástase em linfonodos ou margens infiltradas na ressecção do tumor primário (PFISTER et al., 2020; HOWARD; AGRAWAL; GOOI, 2021).

3.1.7 Exames de imagem no câncer de cavidade oral e orofaringe

Os exames de imagem são importantes para a definição do estadiamento clínico, e a tomografia computadorizada (TC) e a ressonância magnética (REM) são os mais utilizados. Está indicado o uso do contraste em ambos os casos afim de melhor distinguir o tumor dos tecidos adjacentes. Todavia, lesões menores do que 2cm de tamanho geralmente não são visualizadas nas imagens. As TC têm as importantes vantagens de serem menos onerosas e, portanto, mais disponíveis, além de representarem um método rápido e com alta resolução para o tecido ósseo. Já as REM são superiores na caracterização dos tecidos moles, melhor evidenciando a invasão tumoral em profundidade, perineural e na medula óssea (HOWARD; AGRAWAL; GOOI, 2021).

O exame de PET/CT (tomografia computadorizada por emissão de pósitrons) é o melhor indicado para avaliar metástases a distância, porém também pode ser utilizado para estadiamento pré-tratamento, detecção de tumor primário oculto,

planejamento da radioterapia, avaliação da resposta à terapia e vigilância para recorrência da doença. Para os tumores de VADS, geralmente se utiliza o PET/CT com 18F-fluordesoxiglicose (18F-FDG), um análogo de glicose radiomarcado que é transportado para as células, porém não metabolizado, atuando como um marcador substituto para o metabolismo da glicose. Células neoplásicas, bem como as do carcinoma epidermóide, têm esse metabolismo aumentado e, portanto, ficam evidentes no exame. Todavia, isso também ocorre em processos inflamatórios, e a correlação com imagens de TC e com os dados clínicos é fundamental para a correta interpretação do exame (ARRAES et al, 2016; KALE; RATH, 2017). Devido ao alto custo, o PET/CT ainda é pouco utilizado no Sistema Único de Saúde do Brasil.

3.1.8 Prognóstico

Como citado anteriormente, o prognóstico de vida do paciente é diretamente proporcional ao estadiamento clínico (sistema TNM) e a graduação histológica do tumor (FANG et al., 2009; MONTERO; PATEL, 2015; DE PAZ et al., 2017; STEIGEN et al., 2020).

Quanto menos diferenciado for o carcinoma, pior é o seu prognóstico. No entanto, a graduação histológica não leva em consideração as interações do tumor versus hospedeiro, que modulam a progressão e a agressividade da doença, visto que vários fatores, como a inflamação, também podem influenciar no prognóstico (DE PAZ et al., 2017; STEIGEN et al., 2020). Desta forma, deve-se considerar as interações complexas que ocorrem entre as células tumorais, o tecido neoplásico recém-formado e as células que o circundam, ou seja, o microambiente tumoral (RIVERA, 2015).

Alterações oncogênicas induzem ao acúmulo de radicais de oxigênio, superprodução de citocinas e transição epitélio-mesenquimal, o que promove modificações no microambiente tumoral. Os fibroblastos associados ao câncer são elementos críticos dessas alterações, pois contribuem para a proliferação, invasão e metástase das células mutadas. Além disso, a resposta imune adaptativa é suprimida por meio da superexpressão de citocinas, e a inflamação favorece a angiogênese tumoral (RIVERA, 2015; KONG et al., 2022).

Apesar dos avanços no diagnóstico e tratamento do carcinoma epidermóide de cavidade oral e orofaringe, a sobrevida livre de doença em 5 anos dos tumores HPV-negativos de indivíduos com neoplasia locorregional avançada é de apenas 40

a 50%, sem alterações significativas nos últimos anos. Em parte, esse fato está associado a falhas no diagnóstico precoce. Nesse sentido, o estudo de biomarcadores para o câncer oral se faz importante (ECONOMOPOULOU et al., 2019).

3.1.9 Biomarcadores

Um biomarcador pode ser definido como um sinal molecular que indica a ocorrência de uma determinada função normal ou patológica, ou ainda a resposta a um agente farmacológico (ALMANGUSH et al., 2017; ECONOMOPOULOU et al., 2019). Os biomarcadores podem ser utilizados como análise complementar no diagnóstico de neoplasias malignas, mas também no estadiamento, avaliação da resposta terapêutica, detecção de recorrências e como marcadores de prognóstico (SØLAND; BRUSEVOLD, 2013).

Para o carcinoma epidermóide de cavidade oral e orofaringe deve-se considerar a sua heterogeneidade genética, o que pode influenciar no comportamento biológico desses tumores. Lesões com características clínicas e histológicas semelhantes podem apresentar comportamento biológico distinto. Esse fator dificulta a determinação de um painel específico de biomarcadores para o CCOO e, ainda nos dias atuais, nenhum marcador é indicativo do comportamento dos cânceres orais ou do prognóstico do paciente (SØLAND; BRUSEVOLD, 2013).

O marcador Ki-67 é classificado como de proliferação celular e representa um dos mais estudados no CCOO. De modo semelhante, o p53 constitui um dos marcadores de supressão tumoral e resposta antitumoral mais utilizados. Para a detecção do vírus HPV, o p16 apresenta quantitativo substancial de estudos (SØLAND; BRUSEVOLD, 2013; ADHAM et al., 2021; DODDAWAD et al., 2022).

3.1.9.1 Marcador Ki-67

O antígeno Ki-67 é uma proteína nuclear associada à transcrição de RNA ribossômico (VIEIRA, et al., 2022). Por ser expresso durante a divisão celular, da fase G1 para M do ciclo celular, o Ki-67 é considerado um marcador de proliferação celular. A proliferação de células tumorais é um importante parâmetro biológico para o diagnóstico tumoral (JING et al., 2019; NAZAR et al., 2020; GOVINDARAJ et al., 2021; VIEIRA, et al., 2022).

Foi descrito em 1983 e, desde então, é amplamente utilizado em reações imuno-histoquímicas para diferentes tipos de cânceres, tanto como marcador preditivo quanto como de prognóstico (VIEIRA, et al., 2022). Muitos estudos já demonstraram que a proliferação do Ki-67 é um importante marcador prognóstico em pacientes com carcinoma epidermóide de VADS e a alta expressão desse marcador está associada a um pior prognóstico (JING et al., 2019; NAZAR et al., 2020; GOVINDARAJ et al., 2021; DUMITRU et al., 2022; VIEIRA, et al., 2022).

Além da manifestação em lesões malignas, o Ki-67 pode ser observado em lesões cancerizáveis, estando relacionado com a presença e gravidade da displasia epitelial (NAZAR et al., 2020).

Devido a associação positiva com a proliferação e invasão tumoral, o Ki-67 representa também um marcador de agressividade do tumor (JING et al., 2019). Ainda, a alta expressão desse marcador está associada a uma maior taxa de metástases linfonodais (XIE et al., 2016; DUMITRU et al., 2022). De acordo com Duarte (2022) alta expressão de Ki-67 foi considerada quando a porcentagem de células marcadas foi maior do que 50% e baixa quando foi menor ou igual a 50%.

3.1.9.2 *Marcador p16*

Como descrito anteriormente, o carcinoma epidermóide de VADS, principalmente para as lesões de orofaringe, pode estar associado ao HPV. Essas lesões possuem patogênese, epidemiologia e características clínicas singulares quando comparadas às lesões HPV negativas. Assim, o HPV representa um biomarcador prognóstico (MESHMAN et al., 2017).

Na análise imuno-histoquímica, a presença do vírus é determinada pelo biomarcador p16^{INK4A} (p16), que se torna suprarregulado nas células infectadas pelo HPV, quando o oncogene viral E7 inativa o supressor tumoral pRb (MESHMAN et al., 2017).

A superexpressão de p16 como marcador prognóstico para o carcinoma epidermóide em orofaringe é bem estabelecida, já que está independentemente correlacionada com a melhora da sobrevida global e menores taxas de recidiva. Já para os tumores em outros sítios das vias áreas e digestivas superiores, essa relação ainda não está consolidada na literatura (MESHMAN et al., 2017; MAEBAYASHI et al., 2019).

3.1.9.3 Marcador p53

O TP53 é o gene mutado mais comum do carcinoma epidermóide de VADS, já que se expressa em 65 a 85% das neoplasias. O TP53 do tipo selvagem corresponde a um gene supressor de tumor e regula atividades celulares básicas, como proliferação, diferenciação, reparo de DNA, apoptose, além da angiogênese. Já o gene do tipo mutante está diretamente relacionado com o desenvolvimento, progressão e prognóstico da neoplasia maligna (KONG et al., 2022). O estudo de Poeta et al. (2009) demonstrou que o prognóstico de pacientes que expressam o TP53 mutado é pior quando comparado a sobrevivência dos que expressam o tipo selvagem.

O TP53, como fator de transcrição, medeia a função de inibição tumoral para ativar vários genes-alvo. Mutações ou deleção desse gene levam a alterações nas vias de sinalização intracelular, multiplicação desordenada e evasão da apoptose. Além disso, o TP53 também está associado a regulação imune tumoral (ZHOU; LIU; MYERS, 2016; KONG et al., 2022).

Nos tumores HPV positivos há menor expressão de mutações do gene TP53. Aproximadamente um terço dos tumores em orofaringe estão relacionados ao HPV e apresentam o TP53 selvagem, que é inativado por meio das ligações às proteínas virais E6 e não por mutação. Já nos tumores de boca, que geralmente são HPV negativos, há grande expressão do TP53 mutado. Esse resultado sugere que a carcinogênese induzida por vírus seja prevalente em neoplasias de orofaringe, enquanto que as mutações do TP53 sejam importantes para carcinogênese e progressão dos tumores em boca (ZHOU; LIU; MYERS, 2016; KONG et al., 2022).

3.2 A IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO COMO MÉTODO COMPLEMENTAR DE DIAGNÓSTICO

O diagnóstico precoce é diretamente relacionado a tratamentos mais conservadores e melhor prognóstico para o paciente. Diante das manifestações que envolvem a cavidade oral, é possível destacar a importância do cirurgião-dentista no diagnóstico precoce de neoplasias malignas da boca (PETERSEN, 2009; AHERN; MCGEOWN; NUNN, 2018; STEIGEN et al., 2020).

Todavia, apenas um terço dos pacientes são diagnosticados em fase inicial e a maioria dos doentes já apresenta metástase locorregional, exigindo abordagem terapêutica multimodal. Alguns fatores podem contribuir para os baixos índices de diagnóstico precoce, como a falta de triagem e de biomarcadores diagnósticos

(ECONOMOPOULOU et al., 2019). Os estudos com biomarcadores para os carcinomas epidermóides de VADS têm demonstrado resultados promissores para o diagnóstico, prognóstico e monitoramento do câncer (ALMANGUSH et al., 2017).

A biópsia seguida do exame histológico representa o padrão ouro para o diagnóstico de lesões suspeitas e a expressão dos biomarcadores pode ser avaliada na análise complementar de imuno-histoquímica (IHQ) (FANG et al., 2009; DE PAZ et al., 2017; ECONOMOPOULOU et al., 2019).

O exame de imuno-histoquímica visa identificar e classificar células específicas dentro de uma população celular com morfologia heterogênea, por meio da expressão dos antígenos (CAPELOZZI, 2009). Contudo, a incapacidade de analisar a totalidade das células da amostra, a dificuldade de marcar diversos antígenos em um mesmo corte de tecido, e a morosidade do método, representam limitações da técnica de IHQ (COTTA, 2010; DUARTE, 2022).

Desse modo, o estudo de métodos auxiliares de diagnóstico que visem a detecção precoce do câncer de modo rápido e seguro se faz importante. Nesse contexto, a análise imunofenotípica por citometria de fluxo de tumores sólidos pode ser uma alternativa promissora (QUIXABEIRA; SADDI, 2008; SILVEIRA; ARRES, 2008; DUARTE, 2022).

A imunofenotipagem por citometria de fluxo (CF) consiste no método utilizado para identificar, quantificar e caracterizar doenças normais, reativas e neoplásicas, através da análise celular individual quanto à expressão de antígenos celulares específicos. Representa uma técnica altamente específica e sensível, e possibilita a avaliação de diferentes populações celulares simultaneamente com alta velocidade de processamento (PEDREIRA et al., 2013; VIEIRA, et al., 2022).

A imunofenotipagem por CF é uma técnica baseada na avaliação de características celulares específicas, como propriedades físicas e expressão de vários antígenos, pelo uso de anticorpos conjugados com fluorocromos. Em uma primeira etapa, as células da amostra passarão individualmente por vários feixes de luz promovidos por múltiplos lasers intercruzados. Esses feixes atingem o fluoróforo que é conjugado com anticorpos, determinando um estado de excitação e levando a uma emissão de energia liberada como um fóton de luz com propriedades espectrais específicas, exclusivas de diferentes fluorocromos. A luz dispersa é capturada por dois detectores, dispersão direta e lateral, para fornecer informações sobre o tamanho e a complexidade interna das células, respectivamente, propriedades físicas que podem

definir algumas populações de células. Posteriormente, os sinais adquiridos são amplificados e processados para análise e exibidos em uma tela, na forma de histograma, plotagem 2 ou 3D, mostrando a intensidade e abundância de múltiplas variáveis. É possível selecionar um subconjunto específico de variáveis, tanto físicas quanto imunológicas, para criar o histograma desejado a fim de analisar a população de células bloqueadas (DEL PRÍNCIPE et al., 2019).

Há mais de duas décadas, esse método vem fornecendo informações relevantes para o diagnóstico, classificação e monitoramento de doenças onco-hematológicas (CRAIG; FOON, 2008; VAN DONGEN et al., 2012). Quando há a manifestação dessas lesões em mucosa oral é possível realizar o diagnóstico de modo seguro e em poucas horas através da análise do tecido oral por imunofenotipagem por CF. De Camargo et al. (2020) apresentaram o relato de dois casos clínicos, em que as manifestações em boca de um linfoma plasmablastico e um linfoma difuso de grandes células B foram diagnosticadas por meio da imunofenotipagem por CF. De modo semelhante, Schulz et al. (2022) também demonstraram o diagnóstico de um linfoma plasmablastico em mandíbula através da análise de fragmento de biópsia oral por CF.

Visto que amostras de mucosa oral são passíveis de análise por CF e que há o desenvolvimento de estudos para diagnóstico de tumores sólidos por esse método, estima-se a imunofenotipagem por CF possa ser utilizada como método complementar de diagnóstico do câncer de cavidade oral e orofaringe.

O atual padrão ouro de diagnóstico por avaliação histológica complementada por imuno-histoquímica pode requerer um tempo considerável entre a biópsia tecidual e o diagnóstico definitivo. Dessa forma, métodos que possibilitem resultados mais rápidos com alta sensibilidade e especificidade, como a imunofenotipagem por CF, são de suma importância (FURLANETTO et al., 2021).

Ainda, estima-se que a imunofenotipagem por CF complementar à análise morfológica e por IHQ para o carcinoma epidermóide de cavidade oral e orofaringe, possa auxiliar o clínico na decisão da conduta cirúrgica e na indicação de radioterapia e quimioterapia adjuvantes de modo mais precoce, visto que seus resultados podem ser avaliados em poucas horas. Se possível, essa avaliação conjunta poderá implicar significativamente no prognóstico dos pacientes.

4 METODOLOGIA

4.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO

Foi realizado um estudo do tipo observacional analítico transversal e quantitativo. O macroprojeto que deu origem ao mesmo intitula-se “Investigação de Novos Alvos Imunofenotípicos e Moleculares Aplicados ao Diagnóstico e ao Prognóstico de Neoplasias Hematológicas e Não Hematológicas” e foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos da Universidade Federal de Santa Catarina (UFSC): CAAE 52861715.0.0000.0121.

Este estudo é uma continuidade da tese de doutorado intitulada “Padronização de Biomarcadores para Avaliação Prognóstica e Investigação de Células do Sistema Imune Intratumorais no Câncer de Boca por Citometria de Fluxo” de autoria de Bruna Fischer Duarte (DUARTE, 2022) do Programa de Pós-graduação em Farmácia da UFSC.

Na tese supracitada, foram realizadas adaptações de uma técnica laboratorial já existente e já utilizada no diagnóstico de doenças do sistema hematopoiético - a imunofenotipagem por citometria de fluxo – para permitir seu uso como metodologia complementar na avaliação de marcadores de prognóstico em tumores sólidos de origem epitelial de boca. Desse modo, foi efetuada a padronização laboratorial para permitir a análise das amostras de carcinoma epidermóide oral.

No presente estudo, os dados laboratoriais obtidos a partir das análises de amostras de biopsias de lesões com suspeita com imunofenotipagem por CF foram confrontados com os dados clínicos dos pacientes da amostra.

4.2 SELEÇÃO DA AMOSTRA

Todos os pacientes possuíam idade igual ou superior a 18 anos, concordaram em participar do estudo e assinaram o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (modelo em anexo).

Os pacientes da amostra foram selecionados dentre aqueles encaminhados pelo Sistema Nacional de Regulação (SISREG) do Sistema Único de Saúde (SUS) para atendimento clínico do Núcleo de Odontologia Hospitalar (NOH/HU-UFSC/EBSERH) e Ambulatório de Cirurgia de Cabeça e Pescoço, ambos da Unidade de Oftalmologia, Otorrinolaringologia e Cirurgia Buco-maxilo-facial (UOCB) do Hospital Universitário Professor Polydoro Ernani de São Thiago da Universidade

Federal de Santa Catarina – HU-UFSC/EBSERH. Foram selecionados aqueles pacientes que apresentaram lesões de cavidade oral e orofaringe com suspeita clínica de carcinoma epidermóide.

Foi realizado um cálculo amostral com calculadora virtual gratuita disponibilizada pela Universidade de São Paulo, campus Bauru (SP – Brasil), intitulada “Cálculo Amostral” (LAURIS, 2015) considerando-se desvio padrão de 25%, nível de confiança (α) de 95% e poder (β) de 80%. O software sugeriu amostra de 99 indivíduos para esse estudo.

Contudo, devido a pandemia de COVID-19 houve uma redução significativa no número de atendimentos nos ambulatórios do NOH/HU-UFSC/EBSERH e de Cirurgia de Cabeça e Pescoço. Dessa forma, foi possível recrutar o total de 50 pacientes para esse estudo.

Cabe destacar que, como a pesquisa foi desenvolvida dentro de serviços hospitalares já bem estruturados e consolidados, a maioria dos procedimentos seriam realizados independentemente deste trabalho.

4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO E EXCLUSÃO DA AMOSTRA

4.3.1 Critérios de inclusão

Foram incluídos na amostra, os pacientes que apresentaram lesões de cavidade oral e orofaringe com suspeita clínica de carcinoma epidermóide.

As amostras deste estudo tiveram 2 diferentes origens:

- As lesões em cavidade bucal foram decorrentes de biópsias incisionais executadas com finalidade de diagnóstico pela equipe de cirurgiões-dentistas do NOH/HU-UFSC/EBSERH;

- As lesões em orofaringe foram advindas das peças da cirurgia de exérese do tumor primário realizadas pela equipe médica de Cirurgia de Cabeça e Pescoço.

4.3.2 Critérios de exclusão

Os pacientes que apresentaram lesões de cavidade oral e orofaringe com suspeita clínica carcinoma epidermóide recidivante ou novo tumor primário foram excluídos da amostra. Ainda, foram excluídos os indivíduos que não desejaram integrar a pesquisa. A não participação na amostra não interferiu no plano de tratamento do paciente.

4.4 INSTRUMENTOS DO TRABALHO

Como instrumentos deste trabalho foram utilizados:

- A) Informações clínicas dos pacientes, as quais foram extraídas dos prontuários. Os dados foram organizados e agrupados em tabela do programa Office Excel 2016® (Microsoft Corporation). Os dados coletados estão dispostos no Quadro 3.

Quadro 3. Descrição das informações clínicas coletadas nesse estudo.

INFORMAÇÕES COLETADAS:	DETALHAMENTO DAS MESMAS:
Dados sociodemográficos:	Número do prontuário.
	Idade.
	Sexo.
	Naturalidade.
Dados sobre o paciente:	Data da primeira consulta.
	Data da cirurgia de exérese do tumor primário.
	Tipo de tratamento realizado (cirurgia / cirurgia e radioterapia / cirurgia, radioterapia e quimioterapia / radioterapia e quimioterapia).
	Tempo de vida livre de doença.
	Tempo de vida até o óbito.
Dados da lesão apresentada:	Suspeita clínica da lesão.
	Localização anatômica da lesão.
	Tamanho da lesão (em cm).
Hábitos:	Tabagismo (tipo, há quantos anos e quantidade de consumo).
	Cessação do tabagismo.
	Etilismo (tipo, há quantos anos e quantidade de consumo).
	Cessação do etilismo.

- B) Informações laboratoriais decorrentes dos exames histológico, imuno-histoquímica e por imunofenotipagem:
- a. Os dados dos exames histológicos e de imuno-histoquímica foram obtidos por meio dos laudos processados na Unidade de Laboratório de Anatomia Patológica (ULAP/HU-UFSC/EBSERH). Nos casos em que houve amostra coletada por biópsia incisional e peça cirúrgica da exérese do tumor primário advindas de um mesmo paciente, optou-se por incluir no estudo apenas os dados

- referentes a peça cirúrgica, pelo fato da mesma fornecer mais material para o estudo.
- b. Os dados da análise do exame de imunofenotipagem foram obtidos por meio do processamento das amostras no Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias (LOEH/CCS/UFSC) segundo a padronização de Duarte (2022).
 - c. As informações coletadas estão dispostas do Quadro 4.

Quadro 4. Descrição das informações laboratoriais coletadas nesse estudo.

TIPO DE EXAME LABORATORIAL	DETALHAMENTO DOS MESMOS
Exame histológico:	Data do laudo.
	Conclusão principal do laudo.
	Estadiamento TNM do tumor
	Comprometimento das margens.
	Presença de invasão tumoral (perineural, perivascular e muscular).
Exame de imuno-histoquímica:	Expressão dos biomarcadores (Ki-67, p16 e p53).
Exame de imunofenotipagem por citometria de fluxo:	Expressão dos biomarcadores (Ki-67, p16 e p53), conforme apresentado por Duarte (2022).

4.5 COLETA E PROCESSAMENTO DAS AMOSTRAS

As amostras obtidas a partir da biópsia/ peça cirúrgica de um mesmo paciente foram encaminhadas para diferentes análises:

- A) As amostras do GRUPO 1 (padrão ouro) seguiram para estudo histológico e imuno-histoquímico, que foram realizados na ULAP/HU-UFSC/EBSERH.
- B) As amostras do GRUPO 2 seguiram para estudo de imunofenotipagem por citometria de fluxo no LOEH/CCS/UFSC.

4.6 GRUPO 1: ESTUDO HISTOLÓGICO E DE IMUNO-HISTOQUÍMICA

O tecido removido foi fixado em solução de formol tamponado a 10% e foi encaminhado para a ULAP/HU-UFSC/EBSERH após o término do procedimento cirúrgico. As amostras foram submetidas a processamento histológico padrão, emblocadas em parafina e coradas com hematoxilina e eosina em cortes seriados de 3µm de espessura. As lâminas foram analisadas por patologistas médicos da unidade e as amostras positivas para carcinoma epidermóide foram classificadas conforme a graduação sugerida pela OMS em bem diferenciado (Grau I), moderadamente

diferenciado (Grau II), indiferenciado (Grau III) e anaplásico (Grau IV) (FANG et al., 2009; MONTERO; PATEL, 2015; DE PAZ et al., 2017; STEIGEN et al., 2020).

Foram selecionados os biomarcadores que foram estudados por imunohistoquímica com mais frequência no câncer de cavidade oral e orofaringe, de acordo com a revisão sistemática de Almangush et al. (2017): Ki-67, Anti-p16 e Anti-p53 pelo método automatizado (VENTANA - modelo Benchmark XT), seguindo as orientações dos fabricantes. Controles externos (amostras de tecidos positivas para o marcador de interesse) foram usados em todos os casos. As lâminas foram analisadas por patologistas médicos da ULAP/HU-UFSC/EBSERH.

Para o Ki-67 o resultado da expressão positiva foi quantificado em porcentagem e foram consideradas amostras com alta expressão maior do que 50% e baixa com porcentagem de expressão menor ou igual a 50%, de acordo com Duarte (2022). A expressão de p16 e p53 foi marcada quanto a intensidade em fraca, moderada ou forte, também conforme a padronização de Duarte (2022).

4.7 GRUPO 2: IMUNOFENOTIPAGEM POR CITOMETRIA DE FLUXO

As amostras foram processadas conforme a padronização de Duarte (2022). O tecido removido foi acondicionado em frasco apropriado, contendo solução fisiológica 0,9% ou PBS (*Phosphate Buffered Saline*) e imediatamente encaminhado ao LOEH/CCS/UFSC. As amostras foram processadas em até três horas. Para este estudo foram selecionados os biomarcadores Ki-67, p16 e p53.

Os clones adquiridos foram: Ki-67 (clone 20Raj1, Invitrogen®, *Carlsbad*, CA, EUA), anti-p16 (clone G175-1239, BD®, *San Jose*, CA, EUA) e anti-p53 (clone DO-7, *Becton Dickinson* – BD®, *San Jose*, CA, EUA).

Antes do processamento da amostra, o tecido foi avaliado pela técnica de microscopia por *imprinting* corado com hematoxilina e eosina (H&E), afim de garantir o processamento de uma área do tumor.

Para a avaliação no citômetro se faz necessário a aquisição das células em suspensão e o tecido necessita ser dissociado. O método de dissociação utilizado foi a secção da amostra disposta sobre uma placa de gelo, com lâmina de bisturi, seguida do maceramento em tudo de ensaio com 500 µL de PBS-BSA. Após essa etapa, o tecido dissociado foi filtrado com CellTrics® 150 µm (Sysmex®, *Hamburg*, Alemanha) e em seguida as células foram ressuspensas em PBS-BSA na quantidade de 1 mL.

No entanto, no decorrer do estudo foi necessário o uso de outros métodos de dissociação para aumentar o quantitativo de células viáveis para análise. Assim, após a secção e maceração do tecido, algumas amostras foram tratadas com a solução enzimática Colagenase tipo II (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, *Waltham*, MA, EUA) na concentração de 1 mg/mL; e outra parte com a solução enzimática Dispase II (Gibco®, Thermo Fisher Scientific, *Waltham*, MA, EUA) na concentração de 2 mg/mL (1,54 U/mL). Para reduzir a viscosidade das suspensões celulares, as duas soluções foram utilizadas em conjunto com a Nuclease Universal de Pierce (Thermo Fisher Scientific, *Waltham*, MA, EUA) na concentração de 375 U/mL e incubadas a 37 °C sob agitação mecânica por uma hora.

A partir da dissociação, foi realizada a marcação dos antígenos de membrana e intracelulares, por meio do protocolo padrão já estabelecido como rotina no LOEH/CCS/UFSC. O protocolo (de modo resumido) consiste em incubar as amostras com os anticorpos selecionados em geladeira por 15 min. Após esse tempo, adicionou-se 100 µL do reagente A (BD Intrasure™ Kit, BD®, *San Jose*, CA, EUA) e aguardou-se novo tempo de 5 min em geladeira. As células anucleadas foram lisadas por meio de 1 mL de solução lisante BD®, *San Jose*, CA, EUA) por 10 min. Em seguida, a amostra foi centrifugada por 5 minutos a 2.000 RPM e os sobrenadantes foram descartados.

Então, foram adicionados 50 µL de reagente B e os anticorpos de marcação intracelular. Houve novo tempo de incubação de 15 min, desta vez em temperatura ambiente e ao abrigo da luz. Após esse tempo, foram acrescentados 2 mL de PBS e foi realizada nova centrifugação por 5 min a 2.000 RPM. O sobrenadante foi descartado e as células foram ressuspensas em 200 µL de PBS.

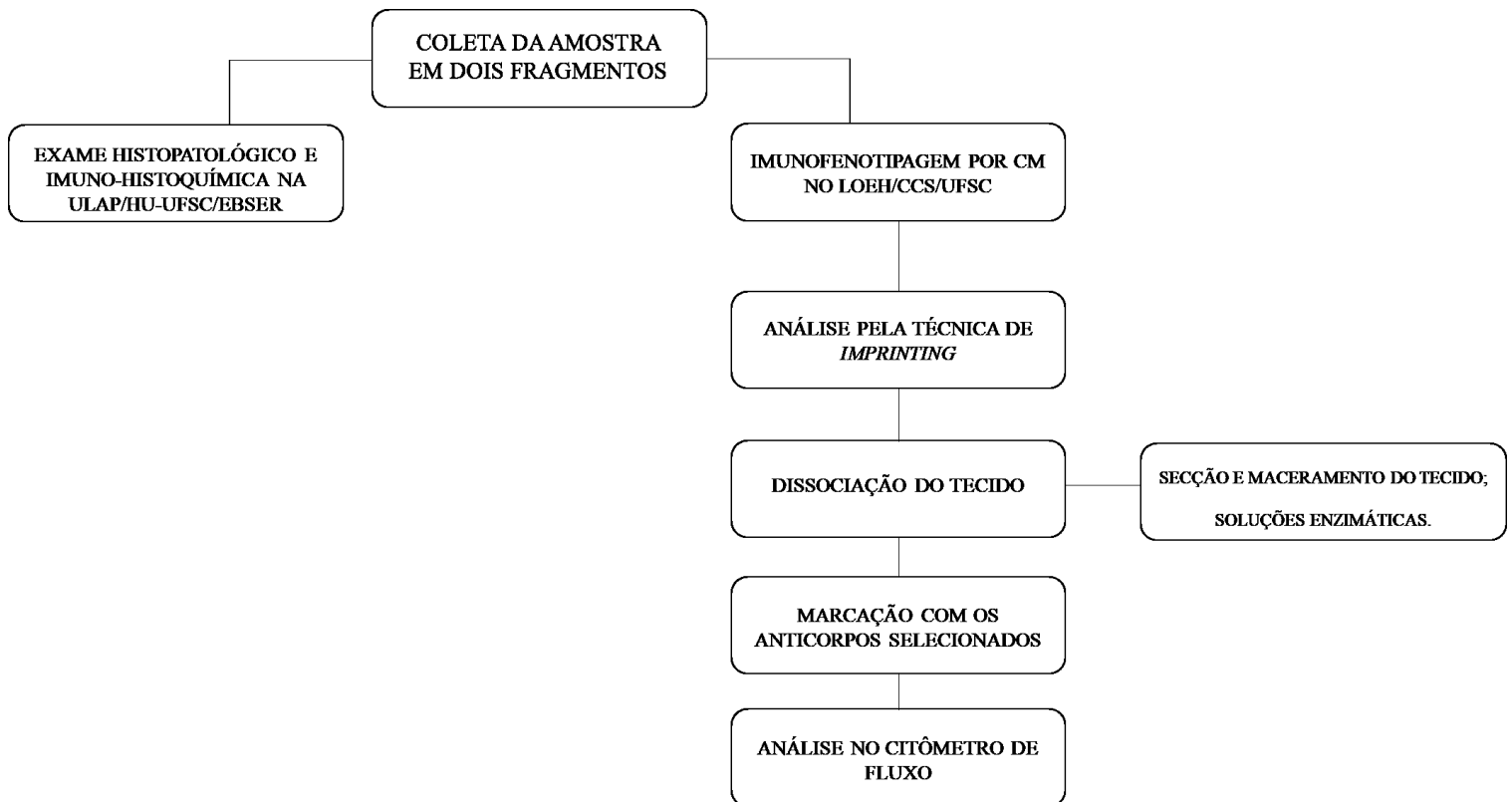
Conforme padronizado por Duarte (2022), a aquisição das amostras foi realizada no citômetro de fluxo BD FACS Canto II (BD®, *San Jose*, CA, EUA) com o programa BD FACSDiva versão 6.1.2 (BD®, *San Jose*, CA, EUA) e a análise dos dados foi realizada por meio do programa Infinicyt™ 2.0 (Cytognos, *Santa Marta de Tormes*, *Salamanca*, Espanha).

A viabilidade celular foi avaliada segundo Zimmermann e Meyer (2011) por meio do intercalador de DNA, o 7AAD (BD®, *San Jose*, CA, EUA). A estratégia de seleção de eventos sequenciais (denominados *gates*) foi utilizada para a identificação e análise das populações celulares. A avaliação de p53, p16 e Ki-67 foi realizada

conforme descrito por Wopereis (2019), utilizando os linfócitos como base de comparação.

O processamento das amostras para imunofenotipagem por citometria de fluxo, conforme Duarte (2022) está disposto, de forma resumida, no diagrama da Figura 2.

Figura 2. Diagrama demonstrando resumidamente o processamento das amostras pelo método de Imunofenotipagem por Citometria de Fluxo, segundo Duarte (2022).



4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para o estudo de correlação entre a expressão dos biomarcadores p53, p16 e Ki-67 do Grupo 1 e do Grupo 2 foram selecionados os seguintes dados clínicos: localização anatômica da lesão, tamanho do tumor primário, grau de diferenciação histológica do tumor, comprometimento das margens das peças cirúrgicas e presença de metástase.

A análise estatística dessa etapa foi realizada por meio do *Software IBM SPSS® Statistics 21.0* (IBM® Company). Para o teste de hipótese foram utilizados os testes *Shapiro-Wilk* e *Kolmogorov-Smirnov*. A análise não paramétrica das variáveis foi realizada por meio do teste H de *Kruskal-Wallis* seguido do *Post-hoc de Mann*

Whitney modificado por *Bonferroni*. Foi estipulado nível de significância estatística de 5%, ou seja, $p\text{-valor} \leq 0,05$.

A comparação da expressão dos biomarcadores de cada grupo foi realizada no *Software R 4.2.1* (R Core Team, 2016). Para comparar os resultados da expressão de cada biomarcador em ambos os exames foi utilizado o teste de *McNemar*, a fim de avaliar se resultados positivos e negativos se mantiveram iguais em ambos testes. Novamente, foi estipulado nível de significância estatística de 5% (valor de $p \leq 0,05$). Após essa análise, foi realizado o teste *Kappa* de consistência (*Kappa* de Cohen), para avaliar a concordância dos resultados de cada exame.

Segundo Landis e Koch (1977) a interpretação da magnitude dos estimadores de concordância do *Kappa* foi convencionada em: pobre < 0 / fraca 0 - 0,20 / razoável 0,21 - 0,40 / moderada 0,41 - 0,60 / substancial 0,61 - 0,80 / perfeita 0,81 – 1,00. Esses foram os intervalos considerados para este estudo.

5 RESULTADOS

Foram incluídos no estudo o total de 50 pacientes com lesões suspeitas de carcinoma epidermóide, localizadas em cavidade oral e orofaringe. Houve predominância do sexo masculino, com 68% dos casos. A média de idade foi de 62 anos e a maior parte dos pacientes era natural de municípios da Grande Florianópolis (54%).

Os participantes foram questionados quanto a hábitos como tabagismo, etilismo e consumo de narcóticos (Tabelas 1 e 2). Desses, 48% declarou ser tabagista, 30% ex-tabagista, 18% ser etilista e 12% ex-etilista. Apenas um (2%) paciente declarou uso de cannabis em conjunto com o uso de cigarros convencionais. Quanto ao consumo concomitante, 56% declarou fazer uso do tabaco e de bebidas alcoólicas. O tempo médio de tabagismo para os fumantes foi estimado em 36,54 anos e tempo médio de cessação do tabagismo foi de 13,64 anos.

Tabela 1. Distribuição da amostra (n = 50) quanto ao hábito do tabagismo (fumante, ex-fumante e não fumante); tipo de fumo consumido e quantidade de cigarros consumidos.

HABITO DO TABAGISMO		n	%
Tabagismo	Tabagista	24	48,00
	Ex-tabagista	15	30,00
	Não tabagista	9	18,00
	Não informado	2	4,00
	Total	50	100,00
Tipo de fumo consumido	Cigarro	32	64,00
	Palheiro	5	10,00
	Cigarro + palheiro	1	2,00
	Cigarro + cannabis	1	2,00
	Não fuma	10	20,00
	Não informado	1	2,00
	Total	50	100,00
Quantidade de cigarros/dia	Até 10	7	14,00
	>10 a ≤ 20	13	26,00
	>20 a ≤30	0	0,00
	> 30 a ≤40	5	10,00
	> 40 a 50	0	0,00
	> 50 a 60	3	6,00
	Não fuma	10	20,00
	Não informado	12	24,00
	Total	50	100,00

Tabela 2. Distribuição da amostra (n = 50) quanto ao hábito do etilismo (etilista, ex-etilista e não etilista) e tipo de bebida alcoólica.

HÁBITO DO ETILISMO		n	%
Etilismo	Etilista	18	36,00
	Ex-etilista	12	24,00
	Não etilista	17	34,00
	Não informado	3	6,00
	Total	50	100,00
Tipo de bebida alcoólica consumida	Destilados	10	20,00
	Fermentados	6	12,00
	Destilados e fermentados	5	10,00
	Não etilista	18	36,00
	Não informado	11	22,00
	Total	50	100,00

Na Figura 3, foram apresentadas variadas apresentações clínicas da doença nos pacientes da amostra. Ao exame físico da cavidade oral, a maioria das lesões estava localizada na língua (24%), seguida do assoalho bucal (22%), orofaringe (14%), lábio inferior (14%), palato mole (8%), rebordo gengival (8%), trígono retromolar (4%), mucosa jugal (4%) e fundo de sulco (2%). As lesões foram agrupadas de acordo com o tamanho, seguindo a classificação TNM (AMIN et al., 2017), e os dados estão dispostos na Tabela 3.

Figura 3. Variadas apresentações clínicas do carcinoma epidermóide nos pacientes da amostra.

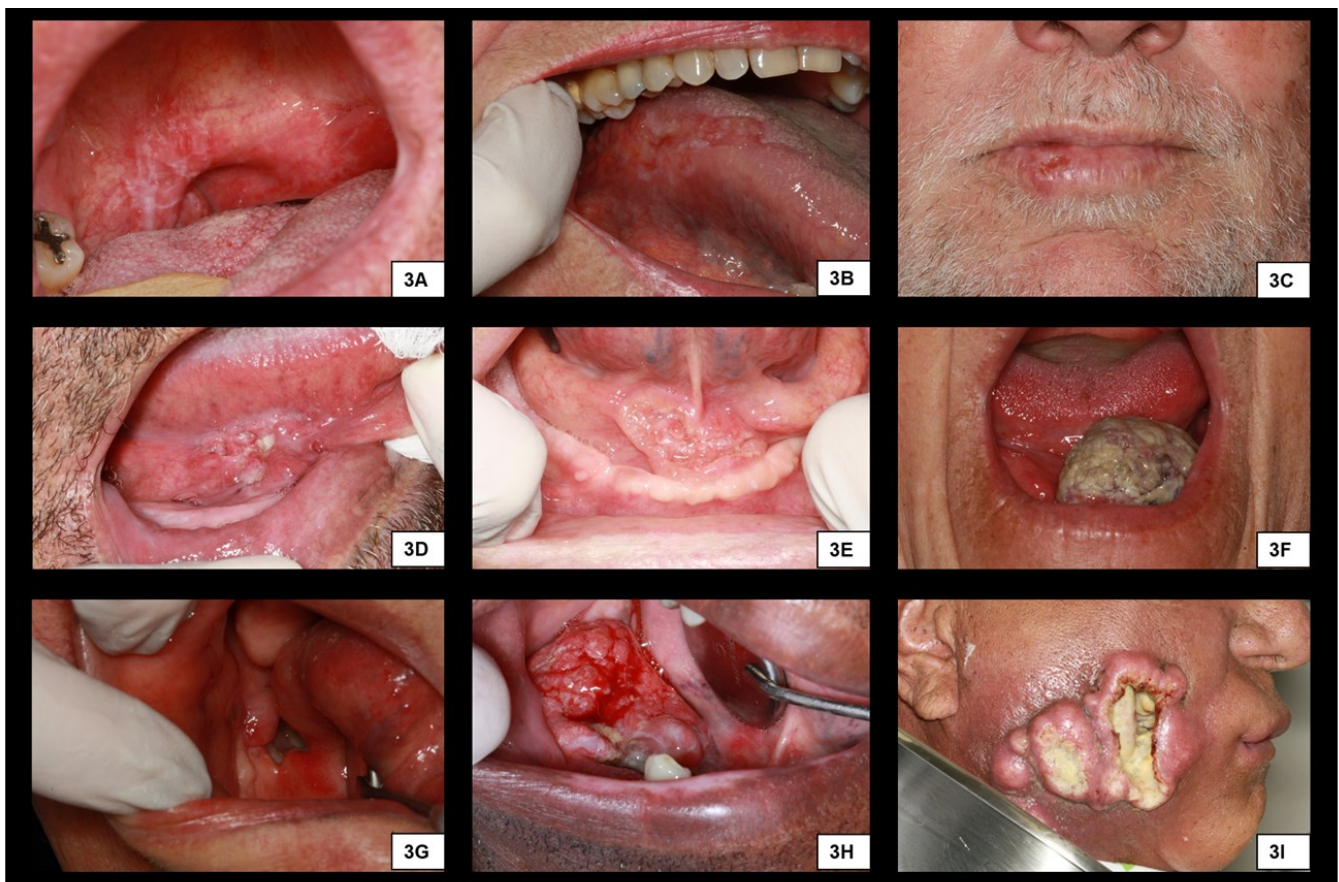


Figura 3: Variadas manifestações clínicas do CEC em VADS de pacientes da amostra. (A) Eritroleucoplasia em pilar amigdaliano com extensão para orofaringe. (B) Eritroleucoplasia em bordo posterior de língua com extensão para dorso. (C) Úlcera crateriforme de bordos elevados em semimucosa de lábio inferior. (D, E, F) Úlceras vegetantes, de superfície irregular, em assoalho bucal. (G, H) Úlceras crateriformes, com área central de necrose, com sugestão clínica de lesão com grande tempo de evolução. (I) Úlceras crateriformes em face com grande área de necrose central, com diagnóstico clínico tardio.

Tabela 3. Tamanho da lesão ao exame físico, agrupados conforme a classificação TNM, AJCC, 8ª ed.

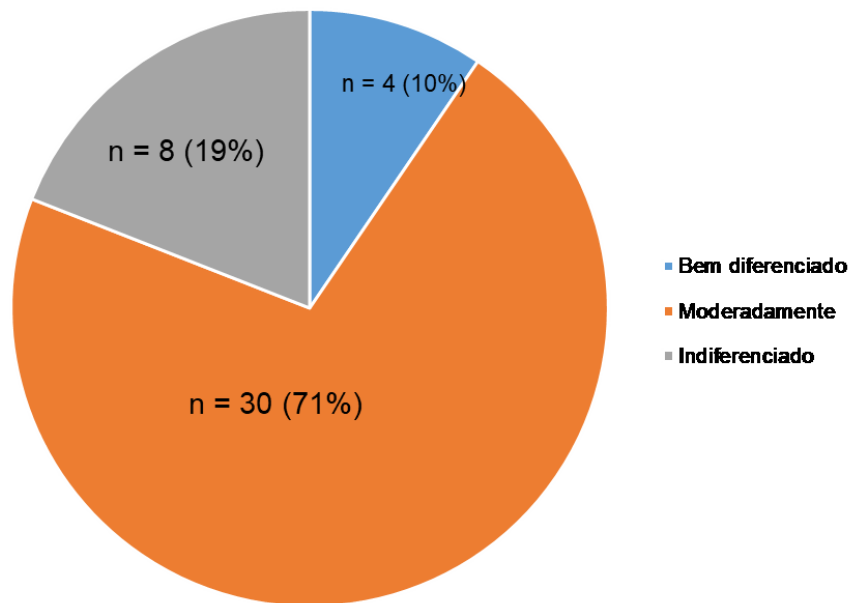
TAMANHO DA LESÃO	N	%
≤ 2 cm	28	56%
> 2 e ≤ 4 cm	11	22%
> 4 cm	9	18%
Não informado	2	4%
TOTAL	50	100%

Após a avaliação histológica das amostras, apenas 42 foram conclusivas de carcinoma epidermóide, sendo esse o total de casos (n) analisados a seguir. Dentre as conclusões dos laudos histológicos das lesões biopsiadas não indicativas de carcinoma epidermóide, pode-se incluir: acantose e hiperqueratose epitelial (n=2);

displasia epitelial de baixo grau (n=1); micose profunda (n=1); úlcera inflamatória (n=2), e carcinoma mucoepidermóide (n=1).

Do total de espécimes avaliados, 14 (33%) foi proveniente de biópsia incisional e 28 (67%) da peça cirúrgica da excisão do tumor primário. A maioria dos laudos foi conclusivo de carcinoma epidermóide moderadamente diferenciado (71,43%) (Figura 4).

Figura 4. Gráfico de distribuição da amostra (n=42) quanto a graduação histológica do carcinoma epidermóide.



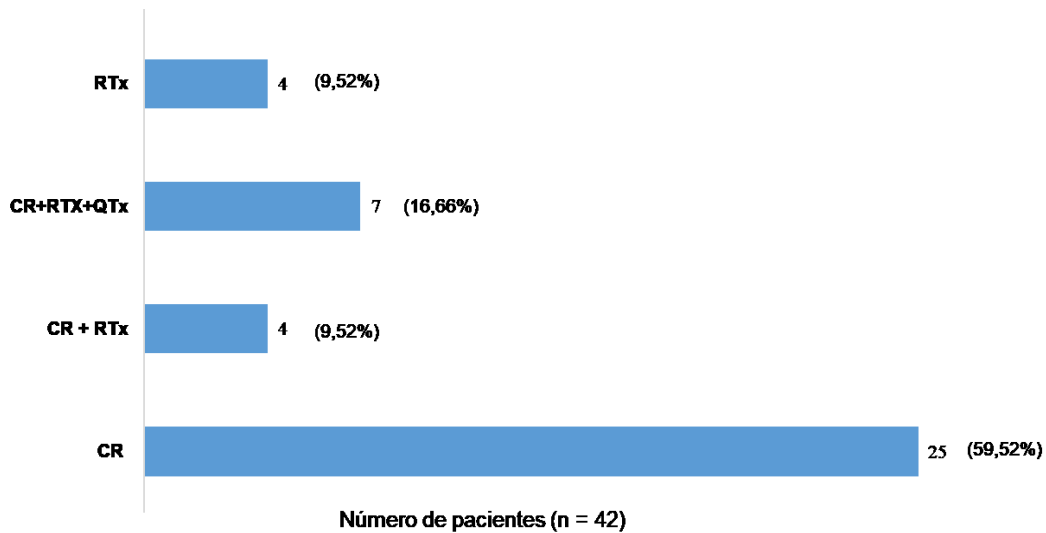
Fonte: elaborado pela autora (2023).

Os casos provenientes de peças cirúrgicas foram estadiados segundo a classificação TNM proposta pela AJCC (AMIN et al., 2017) e os pacientes foram categorizados em estágio I, II, III e IV (Quadros 1 e 2, capítulo Revisão de Literatura). De acordo com o exposto na Tabela 4, pôde-se observar que apesar do estágio I ser o mais frequente (32,14%), 42,85% dos pacientes já apresentava comprometimento de linfonodos e 21,42% metástase a distância. Quanto a infiltração das margens, 43% apresentaram positividade, sendo os tipos de invasão angiolinfática e perineural os mais frequentes.

A ressecção cirúrgica do tumor primário foi a modalidade de tratamento mais realizada (59,52%), seguida da cirurgia complementada com radioterapia e quimioterapia adjuvantes (16,66%) (Figura 5). Todos os pacientes em estágio clínico I, até o momento da coleta de dados, foram tratados com cirurgia de ressecção do tumor primário. No estágio clínico II, todos os pacientes foram submetidos a cirurgia e

apenas um fez radioterapia adjuvante. No estágio III, a modalidade de tratamento mais frequente foi cirurgia seguida de radioterapia e, no IV, foi a cirurgia seguida de radioterapia e quimioterapia adjuvantes. Apenas dois pacientes da amostra (4,76%) não foram tratados com a etapa cirúrgica.

Figura 5. Gráfico de distribuição da amostra (n=42) de acordo com o tipo de tratamento realizado.



Nota: RTx = radioterapia / QT x = quimioterapia / CR = cirurgia.
 Fonte: elaborado pela autora (2023).

O tempo médio entre a data da primeira consulta e a data da exérese do tumor primário foi de 87 dias. Desse período, dois dias foi o menor tempo e 972 dias (referente a um paciente que não aceitou realizar o tratamento no momento do diagnóstico) o maior. Entretanto, é importante ressaltar que os pacientes com suspeita de malignidade que foram encaminhados ao Núcleo de Odontologia Hospitalar, realizaram o procedimento de biópsia incisional e receberam o laudo histológico nesse setor, previamente ao agendamento da primeira consulta médica. O tempo médio entre a entrega do laudo histológico no NOH/HU-UFSC/EBSERH e o agendamento da consulta médica no Ambulatório de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do HU-UFSC/EBSERH foi de sete dias.

Tabela 4. Distribuição da amostra (n = 28) de acordo com o estágio clínico, o estadiamento TNM, a infiltração das margens e tipo de invasão.

ESTÁGIO	TNM	INFILTRAÇÃO NAS MARGENS	INVASÃO	n (%)
I	T1 N0 M0	Não	-	9 (32,14%)
	T1 N0 M0	Não	-	
	T1 N0 M0	Não	-	
	T1 N0 M0	Não	-	
	T1 N0 M0	Não	-	
	T1 N0 M0	Não	-	
	T1 N0 M0	Não	-	
	T1 N1 M0	Não	-	
	T1 N1 M0	Não	-	
II	T1 N2 M0	Sim	Angiolinfática	8 (28,57%)
	T2 N0 M0	Não	-	
	T2 N0 M0	Não	-	
	T2 N0 M0	Não	-	
	T2 N0 M0	Não	-	
	T2 N2 M0	Não	Perineural	
	T3 N2 M0	Não	Angiolinfática + Perineural	
	T3 N2 M0	Não	Angiolinfática + Perineural	
III	T3 N3 M0	Sim	Angiolinfática + Perineural	5 (17,85%)
	T4 N0 M0	Sim	Angiolinfática	
	T4 N1 M0	Sim	Angiolinfática	
	T4 N2 M0	Sim	Angiolinfática + Perineural	
	T4 N3 M0	Sim	Angiolinfática	
IV	T1 N0 M1	Sim	Angiolinfática	6 (21,42%)
	T2 N0 M1	Sim	Angiolinfática + Muscular	
	T2 N2 M1	Sim	Perineural	
	T2 N3 M1	Sim	Angiolinfática + Perineural	
	T3 N1 M1	Sim	Angiolinfática + Perineural	
	T3 N3 M1	Sim	Angiolinfática + Perineural	
TOTAL				28 (100,00%)

Estadiamento TNM segundo AJCC, 8ª ed. (AMIN; EDGE, 2017).

5.1 AVALIAÇÃO DOS BIOMARCADORES

Os espécimes do Grupo 1 foram submetidos aos exames de imunohistoquímica (padrão ouro) para os biomarcadores: Ki-67, p16 e p53. Os do Grupo 2 foram analisados por imunofenotipagem por CF para os mesmos marcadores. Contudo, de modo semelhante ao destacado na tese de Duarte (2022), pesquisadora que padronizou a metodologia utilizada no LOEH/CCS/UFSC e que foi utilizada neste estudo, houve dificuldades na obtenção de amostras com viabilidade celular suficiente para as análises, e atraso na aquisição de reagentes, em decorrência da pandemia

de COVID-19. Assim, algumas análises não puderam ser realizadas em um quantitativo dos casos e, conseqüentemente, deve-se considerar um viés dos testes estatísticos. A imunofenotipagem por CF é um método já bem estabelecido para o diagnóstico de doenças onco-hematopoiéticas e a análise pioneira de um novo tecido por CF pode requerer diversos estudos de aperfeiçoamento do método.

Foi realizado a correlação da expressão dos biomarcadores de ambos os grupos com a localização anatômica, o tamanho do tumor primário, com o grau de diferenciação histológica do tumor, com o comprometimento das margens das peças cirúrgicas e com a presença de metástase.

A Figura 6 apresenta o exemplo de três pacientes da amostra e as respectivas comparações: características clínicas, histológicas e expressão dos biomarcadores ao exame de imuno-histoquímica.

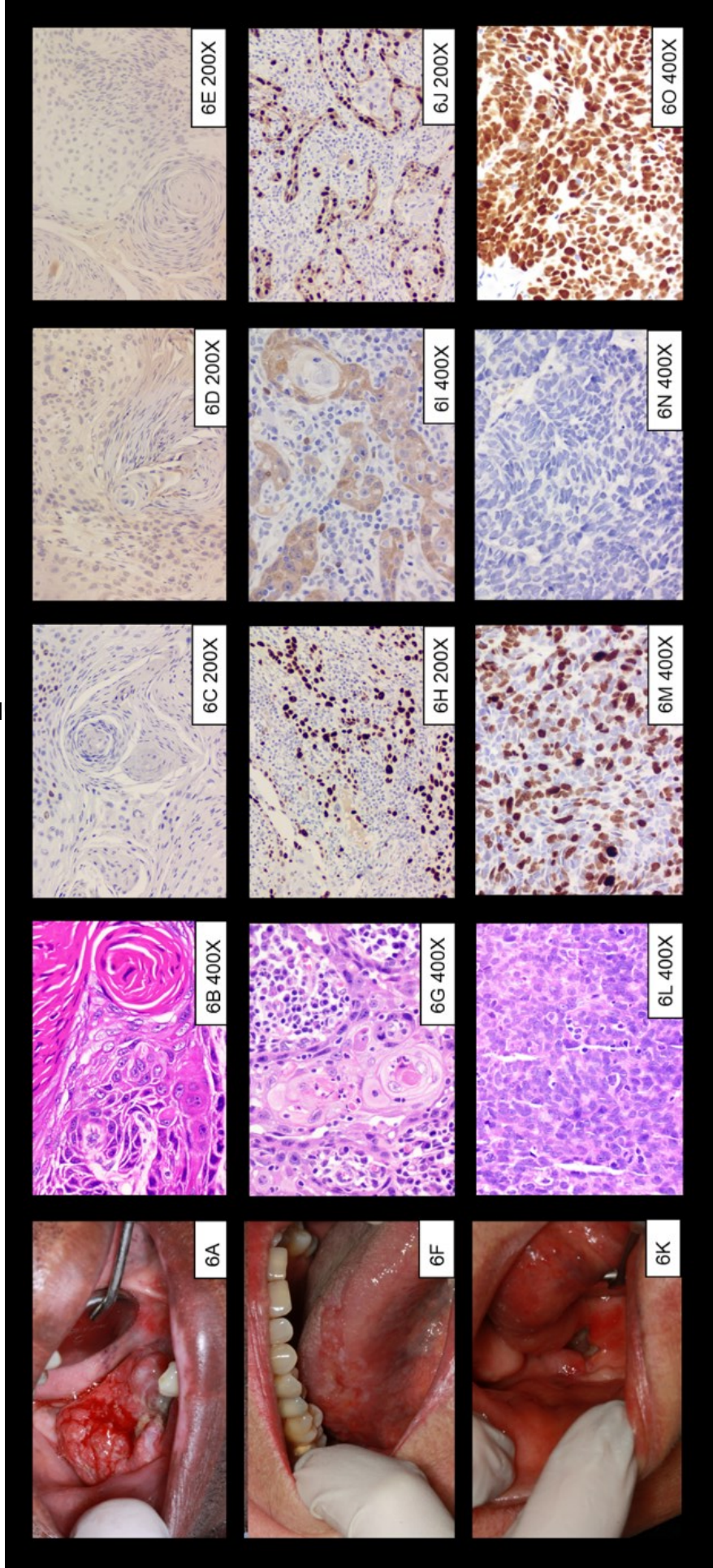


Figura 6. (A) Úlcera crateriforme, sangrante, com área central de necrose. (B) HP, coloração H&E (400X), conclusivo de CEC bem diferenciado, com destaque para a formação de pérolas de queratina. (C) K6-67 (200X) negativo ao exame de IHQ. (D) p16 (200X) negativo ao exame de IHQ. (E) p53 (200X) negativo ao exame de IHQ. (F) Eritroleucoplasia em pilar amigdaliano com extensão para orofaringe. (G) HP, coloração H&E (400X), conclusivo de CEC moderadamente diferenciado. (H) K6-67 (200X) positivo ao exame de IHQ. (I) p16 (400X) positivo fraco difuso nas células neoplásicas ao exame de IHQ. (J) p53 (200X) positivo forte e difuso nas células neoplásicas ao exame de IHQ. (K) Úlcera crateriforme, com área central de necrose em assoalho bucal. (L) HP, coloração H&E (400X), de CEC indiferenciado. (M) K6-67 (400X) positivo ao exame de IHQ. (N) p16 (400X) negativo ao exame de IHQ. (O) p53 (400X) positivo forte ao exame de IHQ. (P) CEC bem diferenciado, com destaque para a formação de pérolas de queratina. (Q) K6-67 (200X) negativo ao exame de IHQ. (R) p16 (200X) negativo ao exame de IHQ. (S) p53 (200X) negativo ao exame de IHQ. (T) H&E (400X), conclusivo de CEC moderadamente diferenciado. (U) p16 (400X) positivo fraco difuso nas células neoplásicas ao exame de IHQ. (V) p53 (200X) positivo forte e difuso nas células neoplásicas ao exame de IHQ. (W) p53 (400X) positivo forte ao exame de IHQ. (X) H&E (400X), de CEC moderadamente diferenciado. (Y) p53 (400X) positivo forte ao exame de IHQ.

Foi verificado, por meio dos testes de *Shapiro-Wilk* e *Kolmogorov-Smirnov*, que os dados não seguem uma distribuição normal, visto que as análises de todas as variáveis resultaram em p-valor igual a zero. Desse modo, foi utilizado a análise não paramétrica dos dados com o teste H de *Kruskal-Wallis*. Como pode ser observado na Tabela 5, há associação estatisticamente significativa entre o tamanho da lesão e os biomarcadores Ki-67 e p53 por imunofenotipagem por CF, confirmada pelo teste *Post-Hoc de Bonferroni* (Tabela 6).

Tabela 5. Teste não paramétrico de *Kruskal-Wallis* de correlação das variáveis selecionadas.

VARIÁVEL	BIOMARCADORES						
	Teste H de <i>Kruskal-Wallis</i>	Ki-67 grupo 1	P16 grupo 1	P53 grupo 1	Ki-67 grupo 2	P16 grupo 2	P53 grupo 2
Localização anatômica	Qui-quadrado p-valor	5,545 0,236	6,729 0,151	6,422 0,170	2,451 0,654	4,201 0,380	4,327 0,364
Tamanho da lesão	Qui-quadrado p-valor	0,221 0,896	0,561 0,755	0,115 0,949	11,924 0,003*	6,822 0,033*	9,693 0,008*
Grau de diferenciação histológica do tumor	Qui-quadrado p-valor	0,566 0,754	0,305 0,858	0,747 0,688	1,487 0,476	1,146 0,564	0,332 0,847
Comprometimento das margens das peças cirúrgicas	Qui-quadrado p-valor	0,693 0,707	0,919 0,631	2,756 0,252	0,602 0,740	1,055 0,590	0,899 0,638
Presença de metástase	Qui-quadrado p-valor	0,201 0,977	1,330 0,722	4,256 0,235	1,011 0,799	0,576 0,902	1,382 0,710

* Valor de $p < 0,05$ inferindo efeito estatisticamente significativo.

Tabela 6. Teste *Post-Hoc* para avaliar em quais variáveis há efeito estatisticamente significativo ($p < 0,05$).

BIOMARCADORES	TESTE POST-HOC		
	Qui-quadrado	Grau de liberdade	p-valor
Ki-67 grupo 2	12,685	3	0,005*
P16 grupo 2	7,152	3	0,067
P53 grupo 2	9,958	3	0,019*

* Valor de $p < 0,05$ inferindo efeito estatisticamente significativo.

Após a correlação da expressão dos biomarcadores de ambos os grupos com as variáveis descritas acima observou-se associação estatisticamente significativa entre o tamanho da lesão e a expressão de Ki-67 e p53 por imunofenotipagem por CF. Ademais, a expressão dos biomarcadores foi comparada para avaliar se os resultados do método de imunofenotipagem por CF foram equivalentes aos do padrão ouro. O teste não paramétrico de *McNemar* (Tabela 7) demonstrou que a proporção entre resultados positivos e negativos se manteve igual em ambos testes, visto que todas as análises resultaram em nível de significância maior do que 5% ($p\text{-valor} > 0,05$), o que infere aceitar a hipótese nula (de que não ocorreu mudança significativa de estados positivo ou negativo entre os dois exames).

A fim avaliar a concordância entre os resultados dos Grupos 1 e 2 foi realizado o teste *Kappa* de consistência (*Kappa de Cohen*). Os resultados para os três biomarcadores foi de consistência fraca, segundo a classificação de Landis e Koch (1977), e não houve efeito estatisticamente significativo (valores de $p > 0,05$).

Tabela 7. Teste de *McNemar* entre os biomarcadores do Grupo 1 e Grupo 2.

KI-67 GRUPO 1				
	Negativo	Positivo	Total	p-valor
Ki-67 Grupo 2				0,13
Negativo	1 (100%)	4 (67%)	5 (71%)	
Positivo	0 (0%)	2 (33%)	2 (29%)	
Total	1 (100%)	6 (100%)	7 (100%)	
P16 GRUPO 1				
	Negativo	Positivo	Total	p-valor
P16 Grupo 2				0,3
Negativo	6 (75%)	6 (67%)	12 (71%)	
Positivo	2 (25%)	3 (33%)	5 (29%)	
Total	8 (100%)	9 (100%)	17 (100%)	
P53 GRUPO 1				
	Negativo	Positivo	Total	p-valor
P53 Grupo 2				>0,9
Negativo	3 (50%)	4 (44%)	7 (47%)	
Positivo	3 (50%)	5 (56%)	8 (53%)	
Total	6 (100%)	9 (100%)	15 (100%)	

5.1.1 Avaliação do marcador Ki-67

Do total de amostras analisadas ($n = 42$), o Ki-67 foi avaliado em 14 casos do Grupo 1, com 13 (92,85%) amostras positivas e uma (7,14%) negativa. No Grupo 2, esse marcador foi testado em todos os 42 espécimes; em 25 deles (59,52%) houve FVC, com 3 (7,14%) amostras positivas e 14 (33,33%) negativas.

Na comparação entre os grupos, quando o Ki-67 foi realizado no Grupo 1 e houve viabilidade celular no Grupo 2, os métodos foram concordantes em três casos (um deles positivo e dois deles negativos) e não concordantes em quatro casos. Conforme o teste *Kappa* de consistência (Tabela 8) houve concordância fraca entre os grupos ($Kappa = -0,091$ e valor de $p = 0,580$). O teste de *McNemar* não encontrou mudança significativa de resultados entre um exame e outro (valor de $p = 0,13$).

Tabela 8. Teste de concordância entre os Grupos 1 e 2 - *Kappa de Cohen*.

BIOMARCADORES	Kappa (IC 95%)	p-valor
KI-67	-0,091 (-0,720; 0,652)	0,580
P16	0,059 (-0,411; 0,510)	0,405
P53	0,084 (-0,419; 0,555)	0,374

IC = intervalo de confiança

Como pode ser observado na Tabela 9, quando o exame do Ki-67 por imunohistoquímica foi positivo, houve quantidades equivalentes de pacientes fumantes e ex-fumantes, os quais representaram maioria dos casos. A maior parte dos pacientes apresentou lesões pequenas de até 2 cm e a orofaringe foi a região de maior frequência. Houve apenas um caso de Ki-67 negativo no exame de IHQ.

Ao avaliar os dados referentes ao exame de Ki-67 por imunofenotipagem por CF, pode-se destacar que a maioria dos testes obteve resultado negativo. Houve apenas três casos positivos, sendo a maioria em pacientes não tabagista. A distribuição quanto ao tamanho da lesão foi equivalente e as regiões afetadas foram língua, palato e rebordo gengival.

Tabela 9. Análise da expressão do biomarcador Ki-67 nos Grupos 1 e 2, e sua associação com tabagismo, tamanho e localização da lesão.

Método realizado	Biomarcador	n	Tabagismo	n	Tamanho da lesão	n	Localização da lesão	n	Média de idade (anos)
GRUPO 1	Ki-67 positivo	13	Tabagista	5	≤ 2 cm	6	Orofaringe	3	69,1
			Ex-tabagista	5	> 2 e ≤ 4 cm	4	Assoalho bucal	2	
			Não tabagista	3	> 4 cm	2	Língua	2	
			Não informado	-	Não informado	1	Rebordo gengival	2	
	Ki-67 negativo	1	Tabagista	1	≤ 2 cm	1	Palato	1	
			Ex-tabagista	-	> 2 e ≤ 4 cm	-	Fundo de sulco	1	
			Não tabagista	-	> 4 cm	-	Lábio	1	
			Não informado	-	Não informado	-	Mucosa jugal	1	
GRUPO 2	Ki-67 positivo	3	Tabagista	-	≤ 2 cm	1	Língua	1	67,6
			Ex-tabagista	1	> 2 e ≤ 4 cm	1	Palato	1	
			Não tabagista	2	> 4 cm	1	Rebordo gengival	1	
			Não informado	-	Não informado	-			
	Ki-67 negativo	14	Tabagista	9	≤ 2 cm	8	Assoalho bucal	4	59,4
			Ex-tabagista	3	> 2 e ≤ 4 cm	3	Lábio	3	
			Não tabagista	-	> 4 cm	2	Orofaringe	2	
			Não informado	1	Não informado	1	Palato	1	

Nota: Grupo 1: análise por imuno-histoquímica.

Grupo 2: análise por imunofenotipagem por citometria de fluxo.

5.1.2 Avaliação do marcador p16

Do total de amostras analisadas (n = 42), o p16 foi avaliado em 22 casos do Grupo 1, com 12 (54,54%) casos positivos e dez (45,45%) negativos. No Grupo 2, o p16 foi analisado no total de amostras, contudo em 12 (28,57%) houve FVC. Das amostras viáveis, oito (19,04%) foram positivas e 22 (52,38%) negativas.

Quando os resultados dos Grupos 1 e 2 foram comparados (considerando apenas os casos em que o p16 foi testado na IHQ e em que houve viabilidade celular na imunofenotipagem por CF) houve correspondência em nove casos (três positivos e seis negativos) e diferenças em oito amostras. De acordo com o teste *Kappa* de consistência (Tabela 8) houve concordância fraca entre os grupos (*Kappa* = 0,059 e valor de p = 0,405). O teste de *McNemar* não encontrou mudança significativa de resultados entre um exame e outro (valor de p = 0,3).

Pode-se observar na Tabela 10 que, quando o p16 por IHQ foi positivo, houve predominância de tabagistas e ex-tabagistas, com lesões de até 2 cm e a língua foi a região de maior frequência. A média de idade foi de 65,6 anos. Já nas amostras positivas do Grupo 2, houve a mesma quantidade de tabagistas e não tabagistas, bem como houve o mesmo número de lesões de até 2 cm, e entre 2 e 4 cm. O assoalho bucal e a língua foram as regiões mais frequentes e a média de idade foi de 72,5 anos.

Tabela 10. Análise da expressão do biomarcador p16 nos Grupos 1 e 2, e sua associação com tabagismo, tamanho e localização da lesão.

Método realizado	Biomarcador	n	Tabagismo	n	Tamanho da lesão	n	Localização da lesão	n	Média de idade (anos)
GRUPO 1	p16 positivo	12	Tabagista	4	≤ 2 cm	5	Língua	4	65,6
			Ex-tabagista	5	> 2 e ≤ 4 cm	4	Rebordo gengival	2	
			Não tabagista	3	> 4 cm	3	Assoalho bucal	1	
			Não informado	0	Não informado	0	Orofaringe	1	
	p16 negativo	10	Tabagista	4	≤ 2 cm	5	Lábio	1	
			Ex-tabagista	3	> 2 e ≤ 4 cm	1	Fundo de sulco	1	
			Não tabagista	3	> 4 cm	4	Palato	1	
			Não informado	0	Não informado	0	T. retromolar	1	
GRUPO 2	p16 positivo	8	Tabagista	3	≤ 2 cm	3	Orofaringe	2	72,5
			Ex-tabagista	2	> 2 e ≤ 4 cm	3	Mucosa jugal	2	
			Não tabagista	3	> 4 cm	2	Assoalho bucal	1	
			Não informado	0	Não informado	0	Língua	1	
	p16 negativo	22	Tabagista	11	≤ 2 cm	11	Lábio	1	
			Ex-tabagista	6	> 2 e ≤ 4 cm	6	Rebordo gengival	1	
			Não tabagista	4	> 4 cm	4	T. retromolar	1	
			Não informado	1	Não informado	1	Assoalho bucal	4	
			Tabagista	11	≤ 2 cm	11	Língua	4	61,3
		Ex-tabagista	6	> 2 e ≤ 4 cm	6	Orofaringe	3		
		Não tabagista	4	> 4 cm	4	Lábio	3		
		Não informado	1	Não informado	1	Rebordo gengival	3		
			Não informado	1	Não informado	1	Mucosa jugal	2	
			Não informado	1	Não informado	1	Palato	2	
			Não informado	1	Não informado	1	T. retromolar	1	

Nota: Grupo 1: análise por imuno-histoquímica.

Grupo 2: análise por imunofenotipagem por citometria de fluxo.

T. retromolar = trígono retromolar.

5.1.3 Avaliação do marcador p53

Do total de amostras analisadas ($n = 42$), o p53 foi avaliado em 19 casos do Grupo 1, com 12 (63,15%) casos positivos e sete (36,84%) negativos. No Grupo 2, o p53 também foi analisado no total de amostras, porém em 12 (28,57%) houve FVC para o teste. Das amostras viáveis, 13 (30,95%) foram positivas e 17 (40,47%) negativas.

Na comparação entre os Grupos 1 e 2, houve o mesmo resultado em oito casos (cinco positivos e três negativos) e desfechos diferentes em sete casos. Para esta comparação foram considerados apenas os casos em que o p53 por IHQ foi realizado, bem como aqueles em que houve viabilidade celular por imunofenotipagem. De acordo com o teste *Kappa* de consistência (Tabela 8) houve concordância fraca entre os grupos ($Kappa = 0,084$ e valor de $p = 0,374$). O teste de *McNemar* não encontrou mudança significativa de resultados entre um exame e outro (valor de $p > 0,9$).

Os dados completos da análise do p53 estão dispostos na Tabela 11. Ressalta-se que dos casos positivos para o exame de IHQ, os ex-tabagistas foram os pacientes mais frequentes, seguidos dos não fumantes. A maioria das lesões apresentou tamanho pequeno de até 2 cm e a orofaringe foi a região mais afetada. A média de idade foi de 67 anos. Quando se observa os resultados positivos do p53 no exame de imunofenotipagem por CF, pode se destacar que houve quantitativos semelhantes entre tabagista, ex-tabagistas e não fumantes. Também houve equivalência no número de lesões de até 2 cm e de lesões de 2 até 4 cm. A língua foi a região de maior frequência e a média de idade foi de 68,8 anos.

6 DISCUSSÃO

O câncer de VADS representa um importante problema de saúde pública global, visto que está entre os dez tipos de neoplasias malignas mais frequentes em todo o mundo. Países em desenvolvimento, como o Brasil, geralmente apresentam índices elevados dessa doença, que possui consideráveis taxas de mortalidade, chegando a 50% em cinco anos (MONTERO; PATEL, 2015; RIVERA, 2015; MADHURA et al., 2020).

O grupo de risco para o desenvolvimento do câncer de VADS é composto predominantemente por pessoas com idade acima dos 60 anos, do sexo masculino, que são usuários pesados de tabaco e álcool, com dieta pobre e baixo nível socioeconômico (FORD; FARAH, 2013; MONTERO; PATEL, 2015). Howard, Agrawal e Gooi (2021) descreveram proporção entre homens e mulheres afetados de 2:1, com faixa etária variando entre 65 e 84 anos de idade. Esses dados corroboram com o estudo epidemiológico realizado por Aupérin (2020). A caracterização da amostra do presente estudo vai ao encontro das publicações citadas, uma vez que houve predominância do sexo masculino, média de idade de 62 anos e consumo de tabaco na maioria dos participantes, com 56% dos pacientes em uso concomitante de tabaco e álcool (Tabelas 1 e 2).

A etiologia do câncer de VADS é decorrente de interações complexas entre fatores genéticos e agentes carcinogênicos ambientais. Destes últimos, o tabagismo e etilismo, principalmente se associados, representam os principais fatores de risco (FORD; FARAH, 2013; MONTERO; PATEL, 2015; KUMAR et al., 2016; WONG; WIESENFELD, 2018; AUPÉRIN, 2020). Costa et al. (2016) após estudo sócio-demográfico, concluíram que os homens fumam significativamente mais do que mulheres e que há consideráveis diferenças entre os gêneros masculino e feminino quanto aos estímulos de cessação do tabagismo. West (2017), em um estudo sobre prevalência do tabagismo, fez observações equivalentes. O maior consumo de tabaco na população masculina pode ser um importante fator para aumentar a prevalência do câncer de VADS em homens.

Os tumores em orofaringe têm fatores de risco muito semelhantes aos do câncer de boca, no entanto, o HPV deve ser incluído entre as principais causas do câncer em orofaringe, hipofaringe e em laringe, visto que pode estar presente em até 90% das lesões nestes sítios anatômicos (AUPÉRIN, 2020).

Para as lesões de boca, a língua é o sítio mais afetado, e para o pescoço a orofaringe representa a região de maior prevalência do carcinoma epidermóide (NEVILLE; DAY, 2002; MONTERO; PATEL, 2015; DE PAZ et al., 2017; MAYMONE et al., 2019; SENKOMAGO, et al., 2019; AUPÉRIN; 2020; STEIGEN et al., 2020; HOWARD; AGRAWAL; GOOI, 2021). No presente estudo, essas também foram as regiões mais afetadas. Na Figura 2, foram apresentadas imagens clínicas do carcinoma epidermóide em pacientes da amostra com variadas manifestações, como placa e úlcera, diferentes tamanhos e locais. A maioria dos tumores primários apresentou tamanho igual ou inferior a 2 cm (Tabela 3).

A ressecção cirúrgica do tumor primário, principal terapia indicada, promove mutilações importantes que têm como consequências gerar impactos na qualidade da fala, da deglutição, da mobilidade da musculatura facial, entre outros (FANG et al., 2009; MONTERO; PATEL, 2015; DE PAZ et al., 2017; SHARMA et al., 2019; STEIGEN et al., 2020; KONG et al., 2022). Nesse estudo, a maioria dos pacientes foi tratada com cirurgia de ressecção do tumor primário e, até o momento da coleta de dados, pouco mais da metade havia realizado radioterapia adjuvante (Gráfico 2). Estima-se que, se houver nova avaliação desses pacientes em um segundo momento, o número de indicações para radioterapia e quimioterapia será maior, principalmente para os indivíduos em estágio II, III e IV da doença.

Apesar dos avanços para o diagnóstico do CCOO, como *microarrays* (microarranjos de DNA), sequenciamento de nova geração do DNA, *Lab-on-chip* (tecnologia microfluídica), nano-tecnologias para diagnósticos, biópsia líquida e biologia sintética, aproximadamente 70% dos pacientes ainda tem o diagnóstico tardio (ECONOMOPOULOU et al., 2019; MADHURA et al., 2020).

Os pacientes com diagnóstico tardio têm pior prognóstico, que é diretamente proporcional ao estágio clínico e ao grau de diferenciação histológica do tumor. Quanto menor é o grau de diferenciação histológica, pior é o prognóstico (FANG et al., 2009; MONTERO; PATEL, 2015; DE PAZ et al., 2017; STEIGEN et al., 2020). Nessa amostra, a maioria dos pacientes (71%) foi diagnosticada com carcinoma epidermóide moderadamente diferenciado (Gráfico 1).

A presença de linfonodos cervicais clinicamente identificáveis reduz a sobrevida pela metade (DE PAZ et al., 2017; DE BREE et al., 2019; VOSSSEN et al., 2019). Ademais, há impactos significativos na qualidade de vida dos indivíduos durante e também após o tratamento da doença. (FANG et al., 2009; MONTERO;

PATEL, 2015; DE PAZ et al., 2017; SHARMA et al., 2019; STEIGEN et al., 2020; KONG et al., 2022). No presente estudo, mais da metade dos pacientes (60,71%) se apresentava em estágio clínico I e II. Entretanto, 42,85% dos indivíduos já apresentava comprometimento de linfonodos e 21,42% metástase a distância (Tabela 4). Isso sugere a existência de falhas no diagnóstico precoce da doença, nos pacientes da amostra.

O tempo médio entre a data da primeira consulta e a data da exérese do tumor primário foi de 87 dias, maior do que os 60 dias estipulados em lei (Lei 12.732 – Brasil, 2012). Todavia, é preciso ressaltar que no momento da cirurgia de exérese do tumor primário, o paciente já está em tratamento médico e, ainda, deve-se considerar a necessidade do preparo cirúrgico. Ou seja, são necessários uma série de exames, tais como laboratoriais, eletrocardiograma, tomografia computadorizada, entre outros, todos realizados pelo Sistema Único de Saúde.

Ainda, destaca-se que a pandemia de COVID-19 foi decretada pela OMS no momento em que a coleta de dados desse estudo já estava em curso. E, no período mais crítico da pandemia, houve significativa redução de procedimentos realizados em centros cirúrgicos, devido à crítica sobrecarga nos sistemas de saúde em todo o mundo. Desta forma, acredita-se que a pandemia de COVID-19 contribuiu para o aumento do tempo médio entre a data da primeira consulta e a data da exérese do tumor primário, observado neste trabalho.

Após a correlação entre a expressão dos biomarcadores de ambos os grupos com a localização anatômica da lesão, com o tamanho do tumor primário, com o grau de diferenciação histológica do tumor (Gráfico 1), com o comprometimento das margens das peças cirúrgicas e com a presença de metástase; houve associação estatisticamente significativa com o tamanho do tumor e a expressão de Ki-67 e p53 por imunofenotipagem por CF (Tabela 5). Na Figura 3 foram apresentadas imagens da manifestação clínica da doença, seguida das respectivas análises histológica e de imuno-histoquímica.

O Ki-67 é um marcador de proliferação celular, sendo importante para avaliação prognóstica de pacientes com carcinoma epidermóide de VADS. A alta expressão desse marcador está associada a um pior prognóstico (JING et al., 2019; NAZAR et al., 2020; GOVINDARAJ et al., 2021; DUMITRU et al., 2022; VIEIRA, et al., 2022).

A expressão de p53 indica a presença de mutações no gene supressor tumoral TP53. E estudos demonstram que alterações nesse gene são as mais frequentes no carcinoma epidermóide de VADS, o que demonstra a importância desse gene na supressão do desenvolvimento e na progressão da doença. Clinicamente, a alta expressão de p53 está associada a menor expectativa de vida e à maior resistência do tumor aos tratamentos de radioterapia e quimioterapia. Assim, a expressão desse marcador se faz importante para estratificação prognóstica dos pacientes (ZHOU et al., 2016).

A expressão de biomarcadores por exame de imunofenotipagem por CF pode ser avaliada de modo muito mais rápido quando comparada ao método de imunohistoquímica, com possibilidade de obtenção dos resultados em poucas horas. Diante disso, o processo de tratamento primário do paciente pode ser desencadeado em um menor período de tempo e os resultados podem auxiliar o clínico na tomada de decisões para a escolha da melhor terapia para o paciente, por exemplo: na extensão de margens durante a exérese do tumor, na extensão do esvaziamento cervical de linfonodos e na indicação de radioterapia e quimioterapia adjuvantes de modo mais precoce. Dessa forma, o tratamento mais rápido pode implicar em melhor prognóstico dos pacientes.

Os resultados da expressão dos biomarcadores Ki-67, p16 e p53 foram comparados utilizando-se a imunohistoquímica como padrão-ouro (Grupo 1), e a imunofenotipagem por CF como método alternativo a ser testado para este fim (Grupo 2). Os resultados das comparações foram dispostos das Tabelas 9, 10 e 11.

Conforme já descrito no capítulo de Resultados, após o teste de associação entre essas variáveis não houve efeito estatisticamente significativo. Isso infere que a hipótese nula, de que a expressão de um mesmo biomarcador do Grupo 1 não difere da expressão desse mesmo biomarcador no Grupo 2, deve ser aceita. Inicialmente, a análise desse resultado é favorável ao exame de imunofenotipagem por CF como método complementar ao diagnóstico e avaliação de prognóstico do carcinoma epidermóide de VADS. Entretanto, é essencial considerar o viés estatístico desse trabalho, que corresponde ao pequeno número de amostras testadas.

Novamente, ressalta-se que não foi possível testar os biomarcadores no total de amostras do estudo (n = 42), devido aos seguintes fatores:

a) Impossibilidade de atingir o quantitativo de 99 amostras indicadas pelo cálculo amostral em decorrência da pandemia de COVID-19, que acarretou em

redução do número de pacientes atendidos por determinação da Secretaria Estadual de Saúde do estado de Santa Catarina, absenteísmo dos pacientes e prioridade laboratorial no processamento de amostras suspeitas de COVID;

b) Falta de reagentes ou impossibilidade de comparação com a metodologia de referência, também impactada pela pandemia de COVID-19, com atraso da liberação de recursos para aquisição dos reagentes;

c) Por dificuldade na etapa laboratorial de dissociação das células das amostras, o que acarretou em número considerável de espécimes com falta de viabilidade celular para a análise no Grupo 2. Houve a tentativa de melhorar a dissociação das células, conforme descrito no capítulo de Metodologia, todavia, com sucesso parcial.

Apesar do teste estatístico de *McNemar* ter demonstrado que a proporção de resultados positivos e negativos foi equivalente nos dois grupos, no teste de confiabilidade, o índice *Kappa* de consistência demonstrou fraca concordância, com valores menores do que 0,20 e p-valor maior do 5% para os três biomarcadores (Tabelas 7 e 8). Isso pode ser explicado devido ao viés estatístico decorrente do quantitativo pequeno de amostras.

Apesar das dificuldades relatadas acima, é importante ressaltar que a avaliação de tumores de origem epitelial por imunofenotipagem por CF é ainda incipiente. E, no caso específico do carcinoma epidermóide de VADS é pioneiro.

A avaliação do tecido tumoral por exame histológico seguido de imunohistoquímica é atualmente o padrão ouro para o diagnóstico da maioria das neoplasias malignas epiteliais. A IHQ permite a avaliação morfológica das células e da arquitetura do tecido analisado e representa um método de fácil implementação e standardização. Porém, apresenta limitações relevantes, como o tempo necessário para a conclusão do laudo, a impossibilidade de avaliar simultaneamente vários marcadores e o total de células da amostra, além de ser um método de avaliação subjetiva, dependente do treinamento dos patologistas (WOPEREIS et al., 2021).

A imunofenotipagem por CF consiste em um método baseado na avaliação de características celulares específicas, incluindo propriedades físicas como o tamanho da célula e a complexidade do citoplasma, através da medição de vários antígenos (intracelulares e de expressão na membrana da célula) pelo uso de anticorpos conjugados com fluorocromos (DEL PRÍNCIPE et al., 2019). As células marcadas passam individualmente por um feixe de laser que permite a identificação

das características celulares e dos padrões de expressão dos antígenos. É possível realizar uma análise multiparamétrica simultânea de cada célula e classificá-las em diferentes populações conforme o padrão de expressão (O'DONNELL; ERNST; HINGORANI, 2013; VIEIRA, et al., 2021; WOPEREIS et al., 2021).

As principais vantagens da imunofenotipagem por CF são: (a) a rapidez de análise, com viabilidade de obtenção dos resultados em poucas horas, e (b) a possibilidade de avaliação simultânea de vários marcadores em no total das células da amostra. No entanto, a morfologia celular e a arquitetura do tecido não são passíveis de análise. (O'DONNELL; ERNST; HINGORANI, 2013; VIEIRA, et al., 2021; WOPEREIS et al., 2021).

Duarte (2022) padronizou a imunofenotipagem por CF como metodologia complementar para avaliação de marcadores de prognóstico em tumores sólidos de origem epitelial de boca. A autora avaliou que apesar dos testes de associação entre os marcadores expressos na IHQ e no método de imunofenotipagem por CF resultarem em valores estatisticamente não significativos, pôde-se considerar a existência de “concordância razoável” entre os exames para o p16 (teste *Kappa* = 0,364), “concordância moderada” para o p53 (teste *Kappa* = 0,463) e “concordância satisfatória” para o Ki-67 (teste T de uma amostra = 0,886). A autora ainda afirmou que a expressão do Ki-67 por imunofenotipagem por CF é comparável ao padrão ouro, o que torna o método alternativo promissor. Contudo, nas conclusões do estudo, ressaltou a importância do desenvolvimento de novos trabalhos para o aprimoramento da metodologia da imunofenotipagem por CF para tumores epiteliais, em especial, para o carcinoma epidermóide.

Chang e Hedley (2012) afirmaram que na maioria dos tumores sólidos humanos há interações dinâmicas entre as células normais que formam o estroma e o sistema vascular, com o tumor propriamente dito, e com células inflamatórias, as quais podem promover o crescimento tumoral ou uma resposta imune contra o câncer. E, como a citometria de fluxo é capaz de avaliar processos biológicos complexos que ocorrem em populações de células heterogêneas, esse método pode ser promissor para o estudo de tumores sólidos. Os autores afirmaram que um método capaz de avaliar vários componentes de um processo celular em um mesmo exame pode ser de suma importância para o diagnóstico e tratamento rápido do câncer. No entanto, ressaltaram que os antígenos de interesse para esses tumores são, na maioria dos casos, expressos de modo intracelular, o que torna a detecção desses por CF mais

desafiadora quando comparada com marcadores de superfície. Os autores avaliaram xenoinxertos primários em camundongos imunodeficientes e concluíram que apesar do otimismo inicial, a primeira geração de agentes moleculares para os tumores sólidos avaliados por imunofenotipagem por CF, imprimiu relativamente pouco impacto para o tratamento clínico, e que a heterogeneidade celular desses tumores representaria um grande obstáculo.

Wopereis et al. (2021) avaliaram a possibilidade de detectar os marcadores para o câncer de mama por imunofenotipagem por CF, bem como se essa identificação poderia complementar o método de imuno-histoquímica para um diagnóstico mais rápido e seguro. Os tipos histológicos de câncer mamário mais comuns são os carcinomas ductal invasivos e os carcinomas lobular invasivos. Portanto, tumores sólidos de origem epitelial. Os autores identificaram que a expressão dos marcadores por CF obteve boa sensibilidade e especificidade, e houve concordância moderada em comparação ao padrão ouro. Assim, concluíram que o uso da imunofenotipagem por CF em conjunto com a análise morfológica do padrão ouro poderia superar as limitações individuais de cada método e fornecer resultados mais rápidos e eficientes para o diagnóstico do câncer de mama.

Vieira et al. (2021) avaliaram a expressão de Ki-67 em carcinomas de mama por imunofenotipagem por CF e por IHQ. Os autores avaliaram que os resultados observados foram equivalentes nas duas metodologias utilizadas, e concluíram que a avaliação do Ki-67 por CF poderia complementar a análise morfológica do padrão ouro, o que resultaria em diagnóstico precoce. Os autores ainda ressaltaram a possibilidade promissora do estudo do Ki-67 por CF em outros tipos de tumores epiteliais.

A imunofenotipagem por CF é, atualmente, uma ferramenta indispensável no diagnóstico e classificação das doenças onco-hematopoiéticas, e os resultados obtidos por esse método são incluídos nos critérios diagnósticos da OMS para as leucemias agudas (WEIR; BOROWITZ, 2001; INOUE et al., 2014; DEL PRÍNCIPE et al., 2019; KHOURY et al., 2022). Contudo, a avaliação desse método para tumores sólidos de origem epitelial ainda permanece no escopo da pesquisa, com resultados promissores para o câncer de mama.

O presente estudo observou efeito estatisticamente significativo apenas entre o tamanho do tumor primário e a expressão de Ki-67 e p53 por imunofenotipagem por CF (Tabela 5). E apesar do teste *Kappa* de consistência não ter demonstrado

associação significativa entre os três biomarcadores, isso não deve desmotivar o investimento em novos estudos com o carcinoma epidermóide de VADS. Conforme foi evidenciado ao longo desse trabalho, bem como no de Duarte (2022), houve dificuldade na dissociação tecidual, o que gerou grande número de amostras com falta de viabilidade celular.

O estudo dos biomarcadores para o carcinoma epidermóide de VADS por imunofenotipagem por CF pode nortear a conduta terapêutica proposta, sugerindo abordagem cirúrgica específica de modo mais precoce. Por exemplo, a realização de cirurgia com maior margem de segurança, caso a expressão de genes que sugerem agressividade seja maior, ou o uso da radioterapia e quimioterapia adjuvantes antes mesmo do estadiamento patológico da peça excisada. Além disso, esse método pode acelerar o diagnóstico do câncer de VADS, uma vez que seus resultados podem ser observados em poucas horas, não exigindo tempo de fixação tecidual, cortes histológicos e colorações, como as técnicas do padrão ouro que demandam maior tempo laboratorial.

7 CONCLUSÕES

O perfil clínico dos pacientes deste estudo foi composto majoritariamente por indivíduos do sexo masculino, com média de idade acima de 60 anos e em abuso de tabaco e álcool. Não houve diferença na caracterização clínica dos casos em que houve p16 positivo no exame de IHQ, o que pode estar relacionado ao quantitativo pequeno da amostra.

As conclusões dos exames de histopatologia (grau histológico do tumor), IHQ e imunofenotipagem por CF foram associadas com as características clínicas da doença. Contudo, os resultados evidenciaram associação estatisticamente significativa apenas entre o tamanho do tumor primário e a expressão de Ki-67 e p53 pela análise por CF.

A comparação da expressão dos marcadores Ki-67, p16 e p53 entre o padrão ouro e a metodologia testada mostrou que os resultados positivos e negativos se mantiveram iguais em ambos testes. Entretanto, não houve associação estatisticamente significativa e o teste de consistência mostrou concordância fraca entre os resultados. Provavelmente, esse fato está relacionado ao viés de poucas amostras analisadas, principalmente por falta de viabilidade celular.

Novos estudos podem aprimorar o método de dissociação tecidual e novas análises podem concluir que a imunofenotipagem por CF pode complementar as avaliações morfológicas do padrão ouro, demonstrando a expressão de biomarcadores em poucas horas. Essa avaliação complementar pode nortear a conduta terapêutica do paciente de modo precoce e seguro, bem como predizer o prognóstico.

7.1 CONSIDERAÇÕES FINAIS

O presente trabalho é pioneiro e novos estudos são necessários para aprimorar essa metodologia, principalmente no que se refere à dissociação dos tecidos para obtenção de um maior número de células viáveis.

Como perspectivas futuras, estima-se ampliar a amostra do estudo para novamente correlacionar a expressão dos biomarcadores com o comportamento clínico do câncer de VADS, assim como estudar se há efeito na sobrevida dos pacientes após cinco anos do diagnóstico da doença.

REFERÊNCIAS

- ACOSTA, M.; PEREIRA, J.; ARROZ, M. Screening of carcinoma metastasis by flow cytometry: a study of 238 cases. **Cytometry Part B: Clinical Cytometry**, v. 90, n. 3, p. 289-294, 2016.
- ADHAM, M.; ALDINO, N.; ZAHRA, S.; RACHMADI, L.; BARDOSONO, S. Feasibility of p16 surrogate biomarker as adjunct diagnosis of oral and oropharyngeal malignancy in a resource-constrained country. **Acta Oto-Laryngologica**, v. 141, n. 1, p. 106-110, 2021.
- AHERN, J.; MCGEOWN, D.; NUNN, J. Dentist's views on incorporating oral health collaborative practice into primary medical care in Ireland. **Community Dent Health**, v. 35, n. 4, p. 252-256, 2018.
- ALMANGUSH, A.; HEIKKINEN, I.; MÄKITIE, AA.; COLETTA, RD.; LÄÄRÄ, E.; LEIVO, I.; SALO, T. Prognostic biomarkers for oral tongue squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. **British Journal of Cancer**, v. 117, n. 6, p. 856-866, 2017.
- AMIN MB.; GREENE FL.; EDGE SB.; COMPTON CC.; GERSHENWALD JE.; BROOKLAND, RK.; MEYER, L.; GRESS, DM.; BYRD, DR.; WINCHESTER, DP. The eighth edition AJCC cancer staging manual: continuing to build a bridge from a population-based to a more "personalized" approach to cancer staging. **CA: a cancer journal for clinicians**, v. 67, n. 2, p. 93-99, 2017.
- AMIN, MB.; EDGE, SB. **AJCC Cancer Staging Manual**. 8. ed. Nova Iorque: Springer, 2017.
- AMORIM, NGC.; DA SILVA SOUZA, A.; ALVES, SM. Prevenção e diagnóstico precoce do câncer bucal: Uma revisão de literatura. **Revista Uningá**, v. 56, n. 2, p. 70-84, 2019.
- ANT, A.; KILIC, C.; BALTU, Y.; DURAN, AB.; TUNCCAN, T.; OZLUGEDIK, S.; BOZDOGAN, N. Lip cancer: reconsidering the at-risk patients with pathological assessment. **Oral Diseases**, v. 25, n. 3, p. 742-749, 2019.
- ARRAES, AED.; SOUZA, AWS DE.; MARIZ, HA.; SILVA, NP.; TORRES, ICG.; PINTO, PNV.; LIMA, ENP.; SATO, EI. 18 F-Fluorodeoxyglucose positron emission tomography and serum cytokines and matrix metalloproteinases in the assessment of disease activity in Takayasu's arteritis. **Revista Brasileira de Reumatologia**, v. 56, p. 299-308, 2016.
- AUPÉRIN, A. Epidemiology of head and neck cancers: An update. **Current opinion in oncology**, v. 32, n. 3, p. 178-186, 2020.
- BRASIL. Lei nº 12.732, de 22 de novembro de 2012. Dispõe sobre o primeiro tratamento de paciente com neoplasia maligna comprovada e estabelece prazo para seu início. Diário Oficial da União: seção 1, Brasília, DF, p. 1, 23 nov. 2012.

Disponível em: https://www.planalto.gov.br/ccivil_03/_ato2011-2014/2012/lei/l12732.htm. Acesso em: 16 jan. 2023.

CALIFANO, J.; VAN DER RIET, P.; WESTRA, W.; NAWROZ, H.; CLAYMAN, G.; PIANTADOSI, S.; CORIO, R.; LEE, D.; GREENBERG, B.; KOCH, W.; SIDRANSKY D. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. **Cancer Research**, v. 56, n. 11, p. 2488-2492, 1996.

CAPELOZZI, VL. Papel da imuno-histoquímica no diagnóstico do câncer de pulmão. **Jornal Brasileiro de Pneumologia**, v. 35, p. 375-382, 2009.

CHAKRABORTY, P.; KARMAKAR, T.; ARORA, N.; MUKHERJEE, G. Immune and genomic signatures in oral (head and neck) cancer. **Heliyon**, v. 4, n. 10, p. e00880, 2018.

CHANG, Q.; HEDLEY, D. Emerging applications of flow cytometry in solid tumor biology. **Methods**, v. 57, n. 3, p. 359-367, 2012.

CHOI, S.; MYERS, JN. Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy. **Journal of Dental Research**, v. 87, n. 1, p. 14-32, 2008.

CONWAY, DI.; PURKAYASTHA, M.; CHESTNUTT, IG. The changing epidemiology of oral cancer: definitions, trends, and risk factors. **British Dental Journal**, v. 225, n. 9, p. 867-873, 2018.

COSTA, Eleonora CV et al. Perfil Sócio-demográfico e Clínico de uma Amostra de Fumantes Portugueses: Implicações do Sexo para a Intervenção na Cessação Tabágica. **Psicologia: Teoria e Pesquisa**, v. 32, 2016.

COTTA, CV. Diagnostic Immunohistochemistry Theranostic and Genomic Applications by David J. Dabbs. **The American Journal of Surgical Pathology**, v. 34, n. 12, p.1892, 2010.

CRAIG, FE.; FOON, KA. Flow cytometric immunophenotyping for hematologic neoplasms. *Blood*, **The Journal of the American Society of Hematology**, v. 111, n. 8, p. 3941-3967, 2008.

DE BREE R.; TAKES, RP.; SHAH, JP.; HAMOIR, M.; KOWALSKI, LP.; ROBBINS, KT.; RODRIGO, JP.; SANABRIA, A.; MEDINA, JE.; RINALDO, A.; SHAHA, AR.; SILVER, C.; SUÁREZ, C.; BERNAL-SPREKELSEN, M.; FERLITO, A. Elective neck dissection in oral squamous cell carcinoma: Past, present and future. **Oral oncology**, v. 90, p. 87-93, 2019.

DE CAMARGO, AR.; DUARTE, BF.; LISBOA, ML.; CARDOSO, CC.; MUNHOZ, EA.; VIEIRA, DSC.; DEL MORAL, JAGD.; SANTOS-SILVA, MC.; GRANDO, LJ. Immunophenotyping for Diagnosis of Oral Lesions: Is It an Important Tool? **International Journal of Medical and Pharmaceutical Case Reports**, v. 5, p. 6, 2020.

DE OLIVEIRA RIBEIRO, A.; DA SILVA, LCF.; MARTINS-FILHO, PRS. Prevalence of and risk factors for actinic cheilitis in Brazilian fishermen and women. **International Journal of Dermatology**, v. 53, n. 11, p. 1370-1376, 2014.

DE PAZ, D.; KAO, HK.; HUANG, Y.; CHANG, KP. Prognostic stratification of patients with advanced oral cavity squamous cell carcinoma. **Current oncology reports**, v. 19, n. 10, p. 1-9, 2017.

DEL PRINCIPE, MI.; DE BELLIS, E.; GURNARI, C.; BUZZATI, E.; SAVI, A.; CONSALVO, MAI.; VENDITTI, A. Applications and efficiency of flow cytometry for leukemia diagnostics. **Expert review of molecular diagnostics**, v. 19, n. 12, p. 1089-1097, 2019.

DODDAWAD, Vidya Gowdappa et al. Biomarkers of oral cancer: A current views and directions. **Biomedical and Biotechnology Research Journal (BBRJ)**, v. 6, n. 1, p. 33, 2022.

DUARTE, BF. Padronização de biomarcadores para avaliação prognóstica e investigação de células do sistema imune intratumorais no câncer de boca por citometria de fluxo. Tese (doutorado) - Universidade Federal de Santa Catarina, Centro de Ciências da Saúde, Programa de Pós-Graduação em Farmácia, Florianópolis, 2022.

DUMITRU, CS.; CEAUSU, AR.; COMSA, S.; RAICA, M. Loss of E-Cadherin Expression Correlates With Ki-67 in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. **In Vivo**, v. 36, n. 3, p. 1150-1154, 2022.

ECONOMOPOULOU, P.; DE BREE, R.; KOTSANTIS, I.; PSYRRI, A. Diagnostic tumor markers in head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) in the clinical setting. **Frontiers in Oncology**, v. 9, p. 827, 2019.

EL-NAGGAR, Adel K. et al. WHO classification of head and neck tumours. 2017.

FANG, KH.; KAO, HK.; CHENG, MH.; CHANG, YL.; TSANG, NM.; HUANG, YC.; LEE, LY.; YU, JS.; HAO, SP.; CHANG, KP. Histological differentiation of primary oral squamous cell carcinomas in an area of betel quid chewing prevalence. **Otolaryngology—Head and Neck Surgery**, v. 141, n. 6, p. 743-749, 2009.

FERREIRA-FACIO, CS.; BOTAFOGO, V.; FERRÃO, PM.; CANELLAS, MC.; MILITO, CB.; ROMANO, S.; LOPES, DV.; TEIXEIRA, LC.; OLIVEIRA, E.; BRUNO-RISCAROLLI, E.; MELLO, FV.; SIQUEIRA, PFR.; MOURA, P.; MACEDO, FN.; FORNY, DN.; SIMIÃO, L.; PUREZA, AL.; LAND, MGP.; PEDREIRA, CE.; DONGEN, JJMV.; ORFAO, A.; COSTA, ESD. Flow cytometry Immunophenotyping for diagnostic orientation and classification of pediatric cancer based on the EuroFlow solid tumor orientation tube (STOT). **Cancers**, v. 13, n. 19, p. 4945, 2021.

FORD, PJ.; FARAH, CS. Early detection and diagnosis of oral cancer: Strategies for improvement. **Journal of Cancer Policy**, v. 1, n. 1-2, p. e2-e7, 2013.

FORD, P.J.; RICH, AM. Tobacco use and oral health. **Addiction**, v. 116, n. 12, p. 3531-3540, 2021.

FURLANETTO, G. et al. Citometria de fluxo como ferramenta diagnóstica em tumores sólidos da infância. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 57, 2021.

GHARAT, AS.; MOMIN, MM.; BHAVSAR, C. Oral squamous cell carcinoma: current treatment strategies and nanotechnology-based approaches for prevention and therapy. **Critical Reviews™ in Therapeutic Drug Carrier Systems**, v. 33, n. 4, 2016.

Global Burden of Disease Cancer Collaboration. Global, Regional, and National Cancer Incidence, Mortality, Years of Life Lost, Years Lived With Disability, and Disability-Adjusted Life-Years for 29 Cancer Groups, 1990 to 2017: A Systematic Analysis for the Global Burden of Disease Study. **JAMA Oncology** 2019; 5:1749–1768.

GOVINDARAJ, PK.; KALLARAKKAL, TG.; MOHD ZAIN, R.; TILAKARATNE, WM.; LEW, HL. Expression of Ki-67, Cornulin and ISG15 in non-involved mucosal surgical margins as predictive markers for relapse in oral squamous cell carcinoma (OSCC). **Plos One**, v. 16, n. 12, p. e0261575, 2021.

GRAY, H.; DRAKE, RL.; VOGL, W.; MITCHELL, AWM. **Gray anatomia clínica para estudantes**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2021. XXI, 937 p. ISBN 9788595151208.

GRÉGOIRE, V.; LEFEBVRE, JL.; LICITRA, L.; FELIP, E.; EHNS-ESMO-ESTRO GUIDELINES WORKING GROUP. Squamous cell carcinoma of the head and neck: EHNS–ESMO–ESTRO Clinical Practice Guidelines for diagnosis, treatment and follow-up. **Annals of Oncology**, v. 21, p. v184-v186, 2010.

HOWARD, A.; AGRAWAL, N.; GOOI, Z. Lip and Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma. **Hematology/Oncology Clinics**, v. 35, n. 5, p. 895-911, 2021.

INCA. Instituto Nacional do Câncer. Estatísticas do Câncer. Disponível em: <<https://www.inca.gov.br/numeros-de-cancer>>. Acesso em: 19 de janeiro de 2022.

INOUE, Tomoko et al. Multicolor analysis of cell surface marker of human leukemia cell lines using flow cytometry. **Anticancer research**, v. 34, n. 8, p. 4539-4550, 2014.

JIANG, S.; DONG, Y. Human papillomavirus and oral squamous cell carcinoma: A review of HPV-positive oral squamous cell carcinoma and possible strategies for future. **Current problems in cancer**, v. 41, n. 5, p. 323-327, 2017.

JING, Y.; ZHOU, Q.; ZHU, H.; ZHANG, Y.; SONG, Y.; ZHANG, X.; HUANG, X.; YANG, Y.; NI, Y.; HU, Q. Ki-67 is an independent prognostic marker for the recurrence and relapse of oral squamous cell carcinoma. **Oncology Letters**, v. 17, n. 1, p. 974-980, 2019.

JUREL, SK.; GUPTA, DS.; SINGH, RD.; SINGH, M.; SRIVASTAVA, S. Genes and oral cancer. **Indian Journal of Human Genetics**, v. 20, n. 1, p. 4, 2014.

KALE, H.; RATH, TJ. The role of PET/CT in squamous cell carcinoma of the head and neck. In: seminars in ultrasound, CT and MRI. **WB Saunders**, 2017. p. 479-494.

KHOURY, JD. et al. The 5th edition of the World Health Organization classification of haematolymphoid tumours: myeloid and histiocytic/dendritic neoplasms. **Leukemia**, v. 36, n. 7, p. 1703-1719, 2022.

KONG, W.; HAN, Y.; GU, H.; YANG, H.; ZANG, Y. TP53 mutation-associated immune infiltration and a novel risk score model in HNSCC. **Biochemistry and biophysics reports**, v. 32, p. 101359, 2022.

KUMAR, M.; NANAVATI, R.; MODI, TG.; DOBARIYA, C. Oral cancer: Etiology and risk factors: A review. **Journal of cancer research and therapeutics**, v. 12, n. 2, p. 458, 2016.

LANDIS, JR; KOCH, GG. The measurement of observer agreement for categorical data. **Biometrics**, p. 159-174, 1977.

LAURIS, JRP. Cálculo Amostral. Site de Estatística, Bauru, 2015. Disponível em: <<http://calculoamostral.bauru.usp.br/calculoamostral/calculos.php>>. Acesso em: 01 de dezembro de 2019.

LI, X.; KOSKINEN, AI.; HEMMINKI, O.; FÖRSTI, A.; SUNDQUIST, J.; SUNDQUIST, K.; HEMMINKI, K. Family history of head and neck cancers. **Cancers**, v. 13, n. 16, p. 4115, 2021.

MADHURA, MG.; RAO, RS.; PATIL, S.; FAGEEH, HN.; ALHAZMI, A.; AWAN, KH. Advanced diagnostic aids for oral cancer. **Disease-a-Month**. 2020 Dec;66(12):101034. doi: 10.1016/j.disamonth.2020.101034. Epub 2020 Jun 25. PMID: 32594996.

MAEBAYASHI, T.; ISHIBASHI, N.; AIZAWA, T.; SAKAGUCHI, M.; SAITO, T.; KAWAMORI, J.; TANAKA, Y.; HIROTANI, Y.; HOMMA, T. Roles of Ki-67 and p16 as biomarkers for unknown primary head and neck squamous cell carcinoma. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, v. 276, n. 4, p. 1221-1229, 2019.

MARUR, S.; FORASTIERE, AA. Head and neck squamous cell carcinoma: update on epidemiology, diagnosis, and treatment. **Mayo Clinic Proceedings**. Elsevier, 2016. p. 386-396.

MAYMONE, MBC.; GREER, RO.; KESECKER, J.; SAHITYA, PC.; BURDINE, LK.; CHENG, AD.; MAYMONE, AC.; VASHI, NA. Premalignant and malignant oral mucosal lesions: Clinical and pathological findings. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 81, n. 1, p. 59-71, 2019.

MESHMAN, J.; WANG, PC.; CHIN, R.; JOHN, MS.; ABEMAYOR, E.; BHUTA, S.; CHEN, AM. Prognostic significance of p16 in squamous cell carcinoma of the larynx and hypopharynx. **American Journal of Otolaryngology**, v. 38, n. 1, p. 31-37, 2017.

MONTERO, PH.; PATEL, SG. Cancer of the oral cavity. **Surgical Oncology Clinics**, v. 24, n. 3, p. 491-508, 2015.

NAZAR, M.; NAZ, I.; MAHMOOD, MK.; HASHMI, SN. Immunohistochemical expression of Cyclin D1 and Ki-67 in primary and metastatic oral squamous cell carcinoma. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP**, v. 21, n. 1, p. 37, 2020.

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

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

PATRONIERI, AT. Tendências de incidência do câncer das vias aéreas e digestivas superiores segundo 18 registros de câncer de base populacional com destaque ao município de São Paulo. 1969-1999. 2006. Dissertação (Mestrado em Epidemiologia) - Faculdade de Saúde Pública, Universidade de São Paulo, São Paulo, 2006.

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

PETERSEN, PE. Global policy for improvement of oral health in the 21st century—implications to oral health research of World Health Assembly 2007, World Health Organization. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, v. 37, n. 1, p. 1-8, 2009.

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

POETA, ML.; MANOLA, J.; GOLDWASSER, MA.; FORASTIERE, A.; BENOIT, N.; CALIFANO, JA.; RIDGE, JA.; GOODWIN, J.; KENADY, D.; SAUNDERS, J.; WESTRA, W.; SIDRANSKY, D.; KOCH, WM. TP53 mutations and survival in squamous-cell carcinoma of the head and neck. **New England Journal of Medicine**, v. 357, n. 25, p. 2552-2561, 2007.

QUIXABEIRA, VBL.; SADDI, VAA importância da imunofenotipagem e da citogenética no diagnóstico das leucemias: uma revisão da literatura. **Revista Brasileira de Análises Clínicas**, vol. 40(3): 199-202, 2008.

RAO, RS.; CHATURA, KR.; SV, S.; PRASAD, K.; LAKSHMINARAYANA, S.; ALI, FM.; AWAN, KH.; PATIL, S. Procedures and pitfalls in incisional biopsies of oral

squamous cell carcinoma with respect to histopathological diagnosis. **Disease-a-month**, v. 66, n. 12, p. 101035, 2020.

RIVERA, C. Essentials of oral cancer. **International Journal of Clinical and Experimental Pathology**. 2015 Sep 1;8(9):11884-94. PMID: 26617944; PMCID: PMC4637760.

SANTOS, FD.; MONTOVANI, J.; SOARES, CT.; CARVALHO, LR De. Expressão da P53 no tumor e no epitélio oral em pacientes com câncer de boca e faringe. **Arquivos Internacionais de Otorrinolaringologia**, v. 15, p. 41-47, 2011.

SANTOS, GCDA.; DE MORAIS CORDEIRO, N. A Imunofenotipagem no Diagnóstico da Leucemia Mieloide Aguda. **Revista Brasileira de Biomedicina**, v. 1, n. 1, 2021.

SCHULZ, RE.; TOMAZELLI, KB.; SMIDERLE, F.; BIANCO, BC.; LISBOA, ML.; DE CAMARGO, AR.; VIEIRA, DSC.; MEURER, MI.; SANTOS-SILVA, MC.; GRANDO, LJ. Flow cytometry immunophenotyping as an important tool for rapid diagnosis of oral non-Hodgkin's lymphoma. **Oral Oncology**, v. 135, p. 106241, 2022.

SENKOMAGO, V.; HENLEY, SJ.; THOMAS, CC.; MIX JM.; MARKOWITZ LE.; SARAIYA M. Human papillomavirus–attributable cancers—United States, 2012–2016. **Morbidity and Mortality Weekly Report**, v. 68, n. 33, p. 724, 2019.

SHARMA, Y.; MISHRA, G.; PARIKH, V. Quality of Life in Head and Neck Cancer Patients. **Indian Journal Otolaryngology Head Neck Surgery**, v.71, n. 1, p. 927-932, 2019.

SIDRANSKY, D. Molecular genetics of head and neck cancer. **Current Opinion in Oncology**, v. 7, n. 3, p. 229-233, 1995.

SILVEIRA NA.; ARRAES, SMAAA imunofenotipagem no diagnóstico diferencial das leucemias agudas: uma revisão. **Arquivos do Mudi**. 2008;12(1):5-14.

SØLAND, Tine M.; BRUSEVOLD, Ingvild J. Prognostic molecular markers in cancer—quo vadis? **Histopathology**, v. 63, n. 3, p. 297-308, 2013.

SLOOTWEG, PJ.; EL-NAGGAR, AK. World Health Organization 4th edition of head and neck tumor classification: insight into the consequential modifications. **Virchows Archiv**, v. 472, p. 311-313, 2018.

SOARES, AB.; PERSCHBACHER, K.; PEREZ-ORDONEZ, B. Oral potentially malignant disorders. **Diagnostic Histopathology**, v. 24, n. 5, p. 161-165, 2018.

STEFANUTO, P.; DOUCET, JC.; ROBERTSON, C. Delays in treatment of oral cancer: a review of the current literature. **Oral surgery, oral medicine, oral pathology and oral radiology**, v. 117, n. 4, p. 424-429, 2014.

STEIGEN, SE.; SOLAND, TM.; NGINAMAU, ES.; LAURVIK, H.; COSTEA, DE.; JOHANNESSEN, AC.; JEBSEN, P.; BJERKLI, IH.; UHLIN-HANSEN, L.; HADLER-OLSEN, E. Grading of oral squamous cell carcinomas—Intra and interrater

agreeability: Simpler is better? **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 49, n. 7, p. 630-635, 2020.

TANAKA, TI.; ALAWI, F. Human papillomavirus and oropharyngeal cancer. **Dental Clinics**, v. 62, n. 1, p. 111-120, 2018.

THOMSON, PJ. Perspectives on oral squamous cell carcinoma prevention—proliferation, position, progression and prediction. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 47, n. 9, p. 803-807, 2018.

TOPRANI, SM.; MANE, VK. A short review on DNA damage and repair effects in lip cancer. **Hematology/Oncology and Stem Cell Therapy**, v. 14, n. 4, p. 267-274, 2021.

TUMBAN, E. A current update on human papillomavirus-associated head and neck cancers. **Viruses**, v. 11, n. 10, p. 922, 2019.

VAN DONGEN, JJM.; LHERMITTE, L.; BÖTTCHER, S.; ALMEIDA, J.; VAN DER VELDEN, VHJ.; FLORES-MONTERO, J.; ORFAO, A. EuroFlow antibody panels for standardized n-dimensional flow cytometric immunophenotyping of normal, reactive and malignant leukocytes. **Leukemia**, v. 26, n. 9, p. 1908-1975, 2012.

VARTHOLOMATOS, G.; BASIARI, L.; EXARCHAKOS, G.; KASTANIOUDAKIS, I.; KOMNOS, I.; MICHALI, M.; MARKOPOULOS, GS.; BATISTATOU, A.; PAPOUDOU-BAI, A.; ALEXIOU, GA. Intraoperative flow cytometry for head and neck lesions. Assessment of malignancy and tumour-free resection margins. **Oral oncology**, v. 99, p. 104344, 2019.

VIEIRA, DSC.; WOPEREIS, S.; WALTER, LO.; DE OLIVEIRA SILVA, L.; RIBEIRO, AAB.; WILKENS, RS.; FERNANDES, BL.; REIS, ML.; GOLFETTO, L.; SANTOS-SILVA, MC. Analysis of Ki-67 expression in women with breast cancer: Comparative evaluation of two different methodologies by immunophenotyping. **Pathology-Research and Practice**, v. 230, p. 153750, 2022.

VOSSSEN, DM.; VERHAGEN, CVM.; VAN DER HEIJDEN, M.; ESSERS, PBM.; BARTELINK, H.; VERHEIJ, M.; WESSELS, LFA.; VAN DEN BREKEL, MWM.; VENS, C. Genetic factors associated with a poor outcome in head and neck cancer patients receiving definitive chemoradiotherapy. **Cancers**, v. 11, n. 4, p. 445, 2019.

WARNAKULASURIYA, S. Clinical features and presentation of oral potentially malignant disorders. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 125, n. 6, p. 582-590, 2018.

WARNAKULASURIYA, S.; KUJAN, O.; AGUIRRE-URIZAR, JM.; BAGAN, JV.; GONZÁLEZ-MOLES, MÁ.; KERR, AR.; LODI, G.; MELLO, FW.; MONTEIRO, L.; OGDEN, GR.; SLOAN, P.; JOHNSON, NW. 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.

WEIR, EG.; BOROWITZ, MJ. Flow cytometry in the diagnosis of acute leukemia. In: **Seminars in hematology**. WB Saunders, 2001. p. 124-138.

WEST, Robert. Tobacco smoking: Health impact, prevalence, correlates and interventions. **Psychology & Health**, v. 32, n. 8, p. 1018-1036, 2017.

WONG, TSC.; WIESENFELD, D. Oral cancer. **Australian Dental Journal**, v. 63, p. S91-S99, 2018.

WOO, SB. Oral epithelial dysplasia and premalignancy. **Head and Neck Pathology**, v. 13, n. 3, p. 423-439, 2019.

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

WOPEREIS, S.; WALTER, LO.; VIEIRA, DSC.; RIBEIRO, AAB.; FERNANDES, BL.; WILKENS, RS.; SANTOS-SILVA, MC. Evaluation of ER, PR and HER2 markers by flow cytometry for breast cancer diagnosis and prognosis. **Clinica Chimica Acta**, v. 523, p. 504-512, 2021.

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

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

ZHOU, G.; LIU, Z.; MYERS, JN. TP53 mutations in head and neck squamous cell carcinoma and their impact on disease progression and treatment response. **Journal of cellular biochemistry**, v. 117, n. 12, p. 2682-2692, 2016.

ANEXO A – Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
UNIVERSIDADE FEDERAL DE SANTA CATARINA
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE DEPARTAMENTO DE ANÁLISES CLÍNICAS
CAMPUS UNIVERSITÁRIO - FLORIANÓPOLIS, SC, 88049-000, BRASIL TEL:
(48) 3721 8146

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

TÍTULO DA PESQUISA:

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

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

QUAL OBJETIVO DESTA ESTUDO?

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

EU TENHO QUE PARTICIPAR?

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

EXISTEM RISCOS OU DESCONFORTOS ASSOCIADOS COM A PARTICIPAÇÃO?

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

QUAIS SÃO OS BENEFÍCIOS ESPERADOS COM A PESQUISA PARA O PARTICIPANTE?

Mesmo que o(a) senhor(a) não se beneficie diretamente dos resultados da pesquisa informo-lhe que estes resultados poderão contribuir futuramente para melhorar o diagnóstico laboratorial de inúmeros pacientes.

TEREI CUSTOS SE PARTICIPAR? TENHO DIREITO A RESSARCIMENTO?

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

EU POSSUO ALGUM DIREITO À INDENIZAÇÃO?

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

MEUS DADOS SERÃO DIVULGADOS?

Informamos que não haverá nenhuma avaliação física ou entrevistas efetuadas pelos pesquisadores, sendo assim, os dados do seu prontuário serão consultados e essas informações serão mantidas sob sigilo absoluto e privado. Os pesquisadores serão os únicos a ter acesso aos dados e tomarão todas as providências necessárias para a manutenção do sigilo, no entanto, existe a remota possibilidade da quebra do sigilo

involuntário e não intencional, cujas consequências serão tratadas nos termos da lei. A divulgação dos resultados visará apenas mostrar os possíveis benefícios obtidos na pesquisa em questão e as informações divulgadas no meio científico serão anônimas e em conjunto com as informações de todos os participantes da pesquisa. O(a) Senhor(a) poderá solicitar informações durante todas as fases da pesquisa, inclusive após a publicação da mesma, pelos contatos informados no final deste documento.

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

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

Coordenadora do Projeto:

Maria Cláudia Santos da Silva Fone: (048) 3721-8146

Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias E-mail: maria.claudia.silva@ufsc.br

Pesquisadores:

Renata Cristina Messores Rudolf de Oliveira

Fone: (048) 3721-8146 Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias E-mail: renatarudolf@gmail.com

Mariangeles Auat

Fone: (048) 3721-8146 Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias E-mail: mariauat@gmail.com

Sandro Wopereis

Fone: (048) 3721-8146 Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias E-mail: swopereis@gmail.com

Bruna Fischer Duarte

Fone: (048) 3721-8146 Laboratório de Oncologia Experimental e Hemopatias E-mail: brufduarte@gmail.com

Comitê de Ética em Pesquisa (local):

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

Eu, _____ confirmo que:

-Recebi informações sobre o estudo acima, além disso, li e entendi todas as informações fornecidas sobre minha participação nesta pesquisa;

-Tive a oportunidade de discutí-las e fazer perguntas. Todas as minhas dúvidas foram esclarecidas satisfatoriamente e eu voluntariamente concordo em participar deste estudo;

-Entendo que receberei uma cópia assinada deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

Concordo em participar deste estudo.

Data: _____/_____/_____ Assinatura _____
participante: _____

do

ANEXO B – TABELA DE DADOS BRUTOS

Paciente	Idade (anos)	Localização Anatômica da lesão	Tamanho	K167 CF (%)	P16 CF	P53 CF	IHQ K1-G7	IHQ p16	IHQ p53
1	58	Assoalho bucal	G1	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	X
2	58	Assoalho bucal	G2	FVC	FVC	FVC	X	X	X
3	65	Assoalho bucal	G1	FVC	POSITIVO	POSITIVO	X	X	X
4	65	Língua	G2	FVC	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
5	96	Orofaringe	G1	FVC	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO
6	60	Mucosa jugal	G2	FVC	NEGATIVO	POSITIVO	X	NEGATIVO	NEGATIVO
7	69	Palato	G3	FVC	FVC	FVC	X	NEGATIVO	X
8	72	Mucosa jugal	G3	FVC	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO
9	60	Palato	G1	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
10	60	Orofaringe	G1	FVC	NEGATIVO	POSITIVO	X	NEGATIVO	POSITIVO
11	55	Lábio	G1	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	X	X	X
12	44	Língua	G2	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	X	X	X
13	59	Lábio	G1	FVC	POSITIVO	POSITIVO	X	X	X
14	79	Assoalho bucal	G1	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	X	X	X
15	73	Rebordo gengival	G2	FVC	NEGATIVO	POSITIVO	X	X	X
16	63	Assoalho bucal	G1	FVC	NEGATIVO	POSITIVO	X	X	X
17	45	Trígono retromolar	G2	FVC	NEGATIVO	POSITIVO	X	X	X
18	60	Lábio	G1	FVC	FVC	FVC	POSITIVO	X	POSITIVO
19	63	Rebordo gengival	G3	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	X	NEGATIVO	X
20	72	Língua	G1	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	X	X	X
21	36	Língua	G2	FVC	POSITIVO	POSITIVO	X	POSITIVO	POSITIVO
22	65	Língua	G1	FVC	NEGATIVO	POSITIVO	X	NEGATIVO	NEGATIVO
23	42	Lábio	G1	FVC	FVC	FVC	X	NEGATIVO	POSITIVO
24	57	Orofaringe	NI	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	X	X	X
25	67	Língua	G1	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
26	71	Assoalho bucal	G1	FVC	FVC	FVC	X	X	X
27	85	Assoalho bucal	G2	FVC	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO	X
28	58	Assoalho bucal	G1	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	X	X	X
29	77	Orofaringe	NI	FVC	FVC	FVC	POSITIVO	X	X
30	88	Rebordo gengival	G3	FVC	NEGATIVO	POSITIVO	X	POSITIVO	POSITIVO
31	64	Trígono retromolar	G3	FVC	POSITIVO	POSITIVO	X	POSITIVO	POSITIVO
32	47	Fundo de sulco	G2	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO
33	62	Palato	G2	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	X	X	X
34	77	Assoalho bucal	G1	FVC	FVC	FVC	X	X	X
35	74	Rebordo gengival	G3	POSITIVO	POSITIVO	NEGATIVO	POSITIVO	NEGATIVO	NEGATIVO
36	61	Língua	G1	FVC	FVC	FVC	X	POSITIVO	NEGATIVO
39	70	Lábio	G1	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	POSITIVO	POSITIVO	POSITIVO
40	65	Orofaringe	G1	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	X	X	X
41	57	Lábio	G1	FVC	FVC	FVC	X	X	X
42	71	Assoalho bucal	G3	NEGATIVO	NEGATIVO	NEGATIVO	X	X	X

**Nota: FVC = falta de viabilidade celular]
x = exame não pôde ser realizado**