

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

THABATA COELI DIAS DAMASCENO

**BIOMARCADORES DE PROGRESSÃO TUMORAL EM CARCINOMA
EPIDERMÓIDE DA CAVIDADE BUCAL**

VITÓRIA
2017

THABATA COELI DIAS DAMASCENO

**BIOMARCADORES DE PROGRESSÃO TUMORAL EM CARCINOMA
EPIDERMÓIDE DA CAVIDADE BUCAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Sandra Lúcia
Ventorin von Zeidler

VITÓRIA
2017

THABATA COELI DIAS DAMASCENO

**BIOMARCADORES DE PROGRESSÃO TUMORAL EM CARCINOMA
EPIDERMÓIDE DA CAVIDADE BUCAL**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Biotecnologia.

Apresentada em 16 de Fevereiro de 2017.

**Prof^a. Dr^a. Sandra Lúcia Ventorin von
Zeidler
Universidade Federal do Espírito
Santo
Orientadora**

**Prof^a. Dr^a. Greiciane Gaburro Paneto
Universidade Federal do Espírito
Santo**

**Prof^a. Dr^a. Aline Carvalho Batista
Universidade Federal de Goiás**

VITÓRIA

2017

AGRADECIMENTOS

A Deus e a Nossa Senhora, pelo cuidado, amor e intercessão durante a minha vida.

A minha mãe Débora Soares Dias Damasceno, meu pai Walter Damasceno Júnior e minha irmã Tathiane Cristhine Soares Damasceno, por todo apoio, carinho e incentivo ao longo da vida.

Ao programa de pós-graduação em Biotecnologia da Universidade Federal do Espírito Santo.

À Prof^a. Dr^a Sandra Lúcia Venturin von Zeidler, por todo o apoio, dedicação e orientação.

A família LabPatol pelos momentos e apoio ao longo do trabalho.

A professora Danielle Camisasca, pela ajuda com os gráficos e cálculos de sobrevida.

Ao laboratório multiusuário de análises biomoleculares, laboratório de ultraestrutura celular Carlos Alberto Redins e ao laboratório de patologia do HUCAM pela parceria e disponibilidade para as análises de imunohistoquímica.

Às agências de apoio e financiamento: CAPES, CNPq e FAPES.

RESUMO

Atualmente têm-se a necessidade da implementação de abordagens terapêuticas específicas e individualizadas para os pacientes com carcinoma epidermóide (CE) da cavidade bucal, e a construção de painéis de biomarcadores de progressão tumoral e prognóstico. Células neoplásicas apresentam certa autonomia quanto a sua ativação, o que leva à superexpressão de ciclina D1 e redução do tempo de duração da fase G1, levando ao aumento da proliferação tumoral. Este trabalho teve por objetivo analisar a expressão da ciclina D1 em CE da cavidade bucal e sua aplicabilidade como biomarcador de progressão tumoral e prognóstico. Realizou-se um estudo analítico longitudinal com a inclusão de amostras biológicas, dados clínicos e de seguimento de 115 pacientes com CE da cavidade bucal. As lâminas histológicas confeccionadas e coradas pelo método de hematoxilina e eosina foram analisadas quanto à gradação tumoral, padrão de infiltrado linfocitário tumoral, padrão de invasão tumoral, invasão vascular, linfática e perineural. Realizou-se a validação das lâminas de tissue microarray (TMA) e a análise da expressão nuclear da ciclina D1 em células tumorais de CE da cavidade bucal (front e porção mediana), displasia e epitélio adjacente ao tumor, por meio da avaliação da lâmina de TMA corada pela técnica de imunohistoquímica foi categorizada em alta (> 140) e baixa (≤ 140). Para as associações entre as variáveis estudadas, o teste Qui-Quadrado e Exato de Fisher foram utilizados, sendo considerados significantes valores de $p \leq 0.05$. As curvas de sobrevida foram calculadas através do modelo de Kaplan-Meier com índice de confiança igual a 95% ajustados pelo modelo de Regressão multivariado de Cox, com $p \leq 0, 2$ (SG) e $p \leq 0, 1$ (SLD). Nossos resultados mostraram correlação entre a alta contagem de TIL e as variáveis tamanho do tumor primário T1/T2 ($p = 0,001$) e estadiamento inicial I/II ($p = 0,005$); já a menor contagem de TIL foi associada ao tabagismo ($p = 0,026$). O padrão de invasão tumoral do tipo IV mostrou associação com tumores T3/T4 ($p = 0,006$) e estádios II/IV ($p = 0,028$). A invasão perineural mostrou correlação com tumores T1/T2 ($p = 0,035$). A superfície tumoral apresentou alta expressão de ciclina D1 em 49% dos casos, porém não foi observada significância com as variáveis analisadas. A redução da SG foi relacionada com o tamanho do tumor ($p = 0,000$) e o

acometimento linfonodal ($p = 0,001$), sendo confirmadas, pela análise multivariada ($p = 0,004$; $p = 0,066$). A SLD exibiu associação com o hábito etilista ($p = 0,048$), fato comprovado pela análise multivariada ($p = 0,078$), em que indivíduos não etilistas recidivaram em menor tempo. Conclui-se com o estudo que a expressão da ciclina D1 não mostrou ser um bom marcador de progressão tumoral e prognóstico. Uma vez que, sua expressão está mais associada ao início da tumorigênese, e a maior ocorrência de estadiamento clínico avançado, neste estudo, explicaria a falta de correlação entre a expressão da proteína com as características clínico-patológicas.

Palavras-Chave: Carcinoma epidermóide da cavidade bucal. Ciclina D1. Imunohistoquímica.

ABSTRACT

Currently, it is necessary to implement specific and individualized therapeutic approaches for patients with squamous cell carcinoma (EC) of the oral cavity, and the construction of biomarkers panels of tumor progression and prognosis. Neoplastic cells have a certain autonomy regarding their activation, which leads to the overexpression of cyclin D1 and reduction of the duration time of the G1 phase, leading to the increase of tumor proliferation. This work aimed to analyze the expression of cyclin D1 in EC of the oral cavity and its applicability as a biomarker of tumor progression and prognosis. A longitudinal analytical study was carried out with the inclusion of biological samples, clinical data and follow-up of 115 patients with EC of the oral cavity. The hematoxylin and eosin stained histological blades were analyzed for tumor gradient, tumor lymphocyte infiltrate pattern, tumor invasion pattern, vascular, lymphatic and perineural invasion. Validation of tissue microarray slides (TMA) and analysis of nuclear expression of cyclin D1 in EC tumor cells of the oral cavity (front and medial portion), dysplasia and epithelium adjacent to the tumor were performed by assessing the lamina Of TMA stained by the immunohistochemistry technique was categorized as high (> 140) and low (≤ 140). For the associations between the studied variables, Fisher's Chi-Square and Exact test were used, being considered significant values of $p \leq 0.05$. The survival curves were calculated using the Kaplan-Meier model with a confidence index equal to 95% adjusted by the Cox multivariate regression model, with $p \leq 0, 2$ (SG) and $p \leq 0.1$ (SLD). Our results showed a correlation between the high TIL count and the variables T1 / T2 primary tumor size ($p = 0.001$) and initial staging I / II ($p = 0.005$); The lower TIL count was associated with smoking ($p = 0.026$). Tumor invasion pattern of type IV showed association with T3 / T4 tumors ($p = 0.006$) and stages II / IV ($p = 0.028$). Perineural invasion showed correlation with T1 / T2 tumors ($p = 0.035$). The tumor surface showed high expression of cyclin D1 in 49% of the cases, but no significance was observed with the variables analyzed. SG reduction was related to tumor size ($p = 0.000$) and lymph node involvement ($p = 0.001$) and were confirmed by multivariate analysis ($p = 0.004$, $p = 0.066$). The SLD showed association with the alcoholic habit ($p = 0.048$), a fact evidenced by multivariate

analysis ($p = 0.078$), in which non-alcoholic individuals relapsed in a shorter time. It was concluded from the study that the expression of cyclin D1 did not prove to be a good marker of tumor progression and prognosis. Since its expression is more associated with the onset of tumorigenesis, and the greater occurrence of advanced clinical staging in this study would explain the lack of correlation between the expression of the protein and the clinical-pathological characteristics.

Key Words: Squamous cell carcinoma of the oral cavity. Cyclin D1. Immunohistochemistry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1- Ativação de Ciclina D1 e progressão do ciclo celular.....	20
Figura 2- Fotomicroscopia mostrando a gradação tumoral em CE da cavidade bucal.	32
Figura 3- Fotomicroscopia mostrando o padrão de infiltração linfocitária tumoral (TIL) em CE da cavidade bucal.....	33
Figura 4- Fotomicroscopia mostrando o padrão de invasão tumoral em CE da cavidade bucal.	34
Figura 5- Fotomicroscopia mostrando a invasão vascular, linfática e perineural em CE da cavidade bucal.	35
Figura 6- Expressão nuclear de ciclina D1 em CE da cavidade bucal.	39
Figura 7- Curva de sobrevida global (SG) com tamanho do tumor primário (T) e comprometimento linfonodal (N)	43
Figura 8- Curva de sobrevida livre de doença (SLD) com etilismo pelo método de Kaplan-Meier ($p \leq 0,05$).....	44
Figura 9 - Curva de sobrevida global (SG) e livre de doença (SLD) com a expressão da ciclina D1 em alta e baixa no tumor pelo método de Kaplan-Meier ($p \leq 0,05$).....	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Características demográficas e clínico-patológicas dos pacientes diagnosticados com CE da cavidade bucal	31
Tabela 2. Correlação entre a gradação tumoral, padrão de infiltração linfocitária tumoral (TIL), padrão de invasão tumoral, invasão vascular, linfática e perineural com as características clínico-patológicas dos pacientes diagnosticados com CE da cavidade bucal	36
Tabela 3. Comparação da expressão de Ciclina D1 entre as regiões de superfície tumoral, displasia e epitélio normal adjacente ao tumor na progressão tumoral.	40
Tabela 4. Correlação entre a expressão de ciclina D1 na superfície tumoral e no front de invasão com as características clínico-patológicas dos pacientes diagnosticados com CE da cavidade bucal.....	41
Tabela 5. Relação entre a modalidade terapêutica empregada e os indicadores de prognóstico.....	42
Tabela 6. Análise regressiva multivariada da Sobrevida Global e Livre de Doença..	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CE - Carcinoma Epidermóide

CDKs - Cinases Dependentes de Ciclina

CECP - Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço

COHR - Centre for Oral Health Research

DAB - 3,3-diaminobenzidina

DNA - Ácido Desoxirribonucleico (do inglês Deoxyribonucleic Acid)

HHV-4 - Herpesvírus Humano tipo 4

HPV - Papilomavírus Humano (do inglês - *Human Papiloma Virus*)

HUCAM - Hospital Universitário Cassiano Antonio Moraes

IARC - Agência Internacional para Pesquisa em Câncer

IHQ - Imunohistoquímica

TMA - *Tissue Microarray*

TNM - Estadiamento de Tumores Malignos

OMS - Organização Mundial da Saúde

SG - Sobrevida Global

SLD - Sobrevida Livre de Doença

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	14
1.1	Câncer.....	14
1.2	Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço.....	15
1.3	Carcinoma Epidermóide da cavidade bucal.....	18
1.4	Ciclina D1.....	19
2	OBJETIVOS	23
2.1	Objetivo Geral	23
2.2	Objetivos Específicos.....	23
3	MATERIAL E MÉTODOS	24
3.1	Casuística	24
3.2	Análise Histopatológica.....	25
3.3	Construção do Tissue microarray (TMA)	26
3.4	Imunohistoquímica (IHQ)	27
3.5	Análise de Sobrevida	29
3.6	Análise Estatística.....	29
4	RESULTADOS	30
5	DISCUSSÃO	46
6	CONCLUSÃO	51
7	REFERÊNCIAS	52
8	ANEXOS	59
8.1	Anexo 1.....	59

8.2 Anexo 2.....	63
------------------	----

1 INTRODUÇÃO

1.1 Câncer

Nas últimas décadas, a população brasileira apresentou mudanças significativas tanto na expectativa de vida como em seus hábitos. O aumento e prolongamento da exposição aos fatores de risco e seus consequentes efeitos, a partir do desenvolvimento industrial e tecnológico, ampliou e ocasionou a elevação do número de casos de doenças crônico-degenerativas como o câncer, que têm se destacado pelas crescentes taxas de morbimortalidade no país (INCA, 2014).

No Brasil, estima-se para 2016 a ocorrência de 596 mil novos casos de neoplasias malignas, dentre as mais incidentes os tumores de próstata com 61.200 casos e mama feminina com 57.960 casos. Observa-se o encaminhamento tardio de aproximadamente 60% dos pacientes com diagnósticos já em estadios avançados às unidades de saúde especializadas, aumentando assim a taxa de mortalidade (FERNANDES; BERGMANN; OLIVEIRA, 2013; INCA, 2015).

O câncer é uma doença multifatorial atribuível à combinação de diversos fatores, dentre os quais estão a exposição ambiental, hábitos e estilo de vida, além de alterações genéticas e epigenéticas, que podem, ao longo do tempo, promover uma combinação que irá desencadear a tumorigênese. Em relação a esses fatores observa-se a influência da exposição a radiações ionizantes e a substâncias químicas nocivas ao organismo (ambientais). Além do estilo de vida como a alimentação (35%), tabaco (30%), infecção (10%) e o comportamento sexual e reprodutivo (7%). As mutações genéticas e epigenéticas, que podem ser herdadas ou decorrentes da exposição aos fatores ambientais, atuam em protooncogenes, genes supressores tumorais e nos genes de reparo ao DNA, culminando assim, na alteração dos mecanismos de expressão gênica, no crescimento desordenado e no

desenvolvimento do potencial invasivo das células modificadas (INCA, 2006; ALVES et al., 2013; KARASIK, NEWMAN, 2015; INCA, 2016).

O processo de tumorigênese é lento e envolve a proliferação de células modificadas pelo efeito da exposição ambiental, diretamente influenciado pela frequência e tempo de exposição, onde a interação com carcinógenos irá acarretar transformações genéticas e assim possibilitar o estado iniciado dessas células. No estágio de promoção, essas células transformadas iniciarão a proliferação clonal, de forma gradual e lenta, e estarão susceptíveis ao acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas, favorecidas pela instabilidade gênica e constante contato com os carcinógenos. A interrupção desse contato, algumas vezes, pode suspender o progresso da tumorigênese. No estágio de progressão ocorre a proliferação descontrolada e irreversível dessas células alteradas. Por fim, sucede-se a disseminação tumoral, sendo um processo complexo e não de todo compreendido. Nesta etapa verifica-se a invasão e infiltração de tecidos subjacentes por células neoplásicas, através de pequenos vasos linfáticos e sanguíneos, com posterior liberação na circulação. Estas células modificadas conseguem evadir ao sistema de defesa imunológico, ativar os mecanismos de sobrevivência celular, extravasar e crescer em outros tecidos e órgãos, ou seja, sofrer metástase (INCA, 2011).

1.2 Carcinoma Epidermóide de Cabeça e Pescoço

O carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECP) é uma neoplasia maligna que tem por origem o epitélio de revestimento e ocorre com maior frequência na cavidade bucal. É o sexto tipo de câncer mais frequente em homens, estando associado a elevadas taxas de morbimortalidade. Apresenta maior ocorrência no sudoeste da Ásia, nas regiões centrais e sudeste da Europa e no Brasil. Já o Japão, a China e o oeste Africano exibem intensidades menores de distribuição da doença (BRENER et al., 2007; MONSJOU et al., 2013; BAUMAN; MICHEL; CHUNG, 2012).

No Brasil, o CECP apresenta um risco estimado de 10 novos casos a cada 100 mil homens e 4 a cada 100 mil mulheres, com maior ocorrência entre a quinta e a sétima décadas de vida. No entanto, a frequência da doença vem aumentando em indivíduos mais jovens, sobretudo do sexo feminino, em decorrência do maior consumo de álcool, tabaco e das infecções por HPV (ALVARENGA et al., 2008; INCA, 2016).

Na população brasileira, a ocorrência do CECP tem sido diretamente relacionada ao elevado consumo de álcool e tabaco. O álcool pode ocasionar supressão imunológica e deficiências nutricionais, além de potencializar e agir como um solvente para os carcinógenos presentes no tabaco, facilitando a penetração dessas substâncias nos tecidos-alvos (FERREIRA; ROCHA, 2010).

No tabaco é possível evidenciar a presença de mais de 7000 substâncias tóxicas, tendo uma parte delas efeito carcinogênico. No organismo, as substâncias carcinogênicas são convertidas em metabólitos reativos, sendo muitos deles enzimas oxidativas, capazes de interagir com o material genético promovendo modificações. O cigarro sozinho é responsável por cerca de 42% dos óbitos por CECP e por uma maior probabilidade de desenvolvimento de tumores neste sítio anatômico (SINGH et al., 2011; INCA, 2014).

Além do tabagismo e etilismo, outros fatores têm sido citados como possíveis envolvidos no desenvolvimento do CECP, como as infecções virais, fatores ocupacionais, radiações, deficiências nutricionais, condições precárias de higiene bucal e condição sócio-econômica. Aliado a estes fatores, a ausência de informações sobre a doença, o diagnóstico tardio e a dificuldade de acesso a serviços básicos de saúde contribuem para que seja observada uma maior incidência da doença na população de baixa renda (CHUANG et al., 2012; ALVES et al., 2013; LEMOS JUNIOR et al., 2013).

Infecções pelo Papilomavírus Humano (HPV) e Herpesvírus humano tipo 4 (HHV-4) têm sido correlacionadas ao desenvolvimento do CECP. Porém, as taxas de infecção são bastante variadas considerando os diferentes sítios anatômicos e distribuição geográfica da população. O HPV é conhecido por induzir transformações neoplásicas tendo papel importante na patogênese desses tumores, sendo

comumente mais frequente na orofaringe. Já o HHV-4 tem sido relacionado principalmente com o desenvolvimento de tumores na nasofaringe, predominantes em áreas endêmicas do norte da Ásia e África (GILLISON et al., 2012; KUNDU, NESTOR, 2012; GALBIATTI et al., 2013; HO et al., 2013).

Indivíduos com CECP apresentam padrão clínico heterogêneo e pior prognóstico quando diagnosticados nos estadios mais avançados da doença. Nas últimas décadas, a sobrevida média dos pacientes com CECP não apresentou aumento significativo, mesmo com as novas abordagens terapêuticas e com os avanços nas técnicas cirúrgicas. Assim, a taxa de sobrevida da doença, em um período de 5 anos, tem permanecido em torno de 50% (FARNEBO et al., 2013; HSU et al., 2014).

Atualmente, os critérios utilizados para a escolha da terapêutica de primeira linha a ser instituída nos tumores de cabeça e pescoço estão baseados no tipo histológico do tumor, no sítio anatômico e no estadiamento clínico no momento do diagnóstico. (FERREIRA, ROCHA, 2010; FARNEBO et al., 2013; HSU et al., 2014).

Para a avaliação, diagnóstico e tratamento do CECP são utilizados os sistemas de classificação da União Internacional Contra o Câncer (UICC), proposta para o Estadiamento de Tumores Malignos - TNM (UICC, 2009) e da OMS para classificação dos parâmetros histopatológicos e gradação tumoral.

As características analisadas do tumor consistem no sítio primário, relacionado ao: tamanho tumoral (T), sua extensão, localização ou ambos (T0 a T4); Características dos linfonodos (N) das cadeias de drenagem linfática do órgão em que o tumor se localiza (N0 a N3); Metástase à distância (M), ausência ou presença (M0 a M1). Estes parâmetros não refletem apenas a taxa de crescimento e a extensão da neoplasia, mas também o tipo de tumor e sua relação com o paciente (PATEL; SHAH, 2005).

Na análise de prognóstico são considerados, além do tamanho do tumor primário e do comprometimento linfonodal, a avaliação histopatológica das margens após excisão cirúrgica, a presença de invasão perineural e profundidade de invasão. Com o tratamento do tumor primário e das metástases regionais, é possível observar o

aumento da sobrevida em mais da metade dos casos. Porém, são comuns as recidivas e a resistência aos tratamentos radio e quimioterápicos (INCA, 2001).

1.3 Carcinoma Epidermóide da cavidade bucal

Em 2012 foram diagnosticados cerca de 300 mil novos casos de carcinoma epidermóide (CE) da cavidade bucal no mundo, sendo este o maior subsítio de câncer de cabeça e pescoço.

Estes tumores desenvolvem-se a partir do epitélio de revestimento da cavidade bucal, podendo acometer língua, assoalho de boca, gengiva, mucosas jugal e vestibular, área retromolar e palato duro, sendo os dois primeiros os sítios mais frequentes. (UICC, 2009; NOGUTI et al., 2012; DORSEY, AGULNIK, 2013; FERLAY et al., 2015).

Em 2016 o INCA publicou a estimativa de ocorrência de 11.140 novos casos de câncer da cavidade bucal em homens e 4.350 em mulheres no Brasil. Casos diagnosticados nos estádios I e II apresentam maiores taxas de sobrevida, 70%-90%, em cinco anos, ao modo que pacientes com diagnóstico tardio (estádios III e IV) têm menor taxa, 50%, com opções de tratamento limitadas e pior prognóstico. Os tratamentos disponíveis como a cirurgia e/ou a combinação de quimioterapia e radioterapia afetam de forma significativa a qualidade de vida desses pacientes (FERLAY et al, 2015; INCA, 2016).

A carcinogênese dos tumores da cavidade bucal é um processo complexo, multifatorial e contínuo, em que o epitélio escamoso de revestimento é afetado por fatores endógenos e exógenos ao organismo. Um aspecto significativo para a frequente agressividade dessa neoplasia é a alta taxa de proliferação celular observada. Estudos que utilizam técnicas moleculares na detecção precoce de alterações protéicas e em fatores envolvidos na regulação do ciclo celular vêm ganhando força, a fim de auxiliar a implementação de abordagens terapêuticas

específicas e individualizadas, bem como na construção de painéis de biomarcadores de prognóstico (IRIMIE et al., 2015).

1. 4 Ciclina D1

O gene *CCDN1* localizado no cromossomo 11q13 é responsável pela codificação da proteína Ciclina D1 (45 kDa), pertencente à família das Ciclinas que incluem D2 e D3, e sua expressão varia ao longo do ciclo celular. Essas proteínas apresentam uma sequência de 100 aminoácidos N-terminal com uma estrutura tridimensional conservada que proporciona a interface de ligação para as cinases dependentes de ciclina (CDKs), enquanto o domínio C-terminal do gene regula a estabilidade proteica. Essas proteínas estão intimamente relacionadas à regulação e controle ao longo do ciclo celular (QIE; DIEHL, 2016).

As vias de transdução dos sinais extracelulares induzidas por mitógenos, como os fatores de crescimento, aumentam a transcrição, tradução e estabilidade proteica de ciclina D1. Isto permite a importação e formação de complexos ativos com a CDK4/CDK6 no núcleo, e assim, a fosforilação da proteína retinoblastoma (pRb). Posteriormente, ocorre a dissociação do complexo pRb/E2F o que permite a liberação do fator de transcrição E2F e a progressão do ciclo celular, com a transição das fases G1-S (Figura 1). Em células que não estão em processo de divisão celular, a pRb encontra-se em um estado hipofosforilado, inibindo o ciclo celular através da formação de um complexo inativo com o fator de transcrição E2F (HAKEN et al., 2014; RAMAKRISHNA et al., 2013; QIE; DIEHL, 2016; RAMOS-GARCIA et al., 2016).

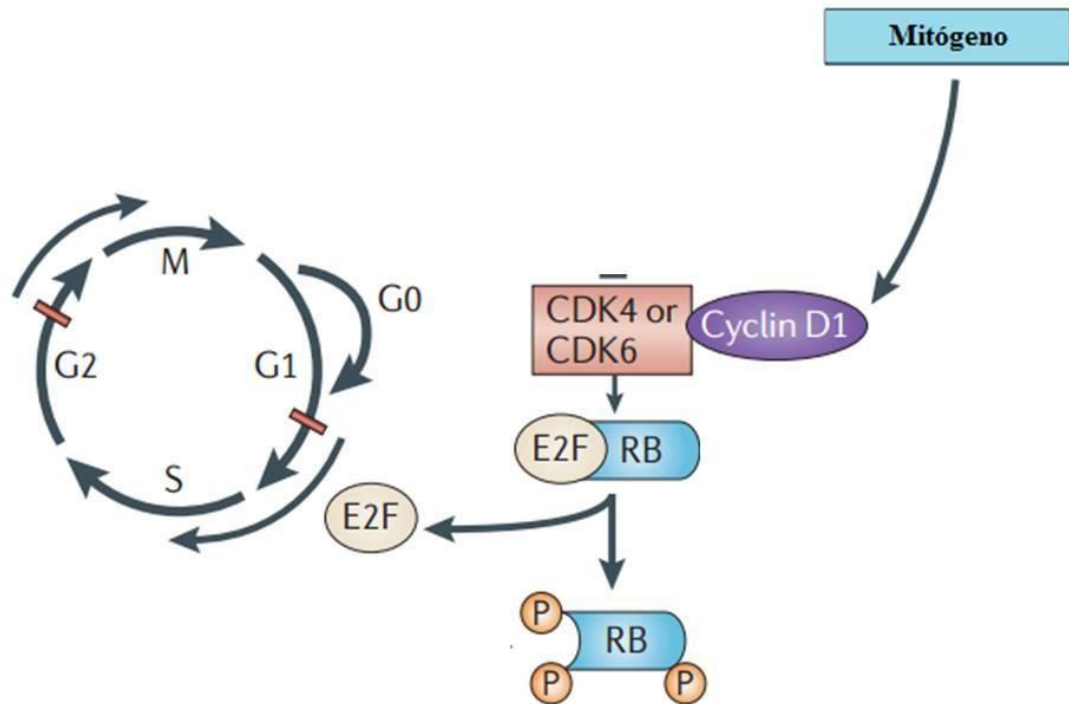


Figura 1- Ativação de Ciclina D1 e progressão do ciclo celular. À partir de um sinal extracelular gerado por um mitógeno ocorre a ativação da cascata de transcrição e tradução da Ciclina D1. A proteína ativada forma um complexo com CDK4/CDK6 que fosforila a proteína retinoblastoma (pRb) provocando a dissociação do complexo pRb/E2F, liberação do fator de transcrição E2F e a progressão da fase G1-S. Fonte: Adaptado de Leemans et. al (2011).

Por ser uma proteína instável, sua degradação ocorre ao final da fase do ciclo celular pela via proteossomal com a fosforilação específica do resíduo de treonina conservado (Thr-286). Caso ocorra uma mutação no resíduo Thr-286, a Ciclina D1 fica estabilizada, ocasionando a inibição de sua exportação nuclear e o desencadeamento da ativação constitutiva de CDK4/CDK6. Este processo acarreta a inativação de p53, a instabilidade genômica e a tumorigênese, sendo o controle pós-transcricional responsável, em última instância, pela acumulação total da proteína nas células (QIE; DIEHL, 2016).

As células modificadas apresentam certa autonomia quanto a sua ativação pelos fatores de crescimento, o que leva à superexpressão de ciclina D1 e redução do tempo de duração da fase G1, levando à proliferação anormal e ocorrência de alterações genéticas adicionais (RAMAKRISHNA et al., 2013; QIE; DIEHL, 2016).

As proteínas inibidoras de CDK pertencentes às famílias CIP/KIP e INK4 (INK4A, INK4B, INK4C e INK4D) inibem a entrada precoce na fase S mediante a sua ligação com o complexo ciclina-CDK e a ativação de CDK4/CDK6, impossibilitando a associação com ciclinas D. Ao final na fase G1 ocorre o ponto de restrição (R) em que observa-se a alteração dessas células, culminando em uma regulação autossuficiente, levando à replicação de seu DNA e progressão contínua do ciclo celular. Esta etapa é muito importante na tumorigênese, posto que os processos oncogênicos atuam também sobre os reguladores de progressão da fase G1 (ciclina D1 e pRb) (RAMOS-GARCIA et. al, 2016).

Modelos animais para o estudo da função de ciclina D1 têm demonstrado seu valor significativo para a formação do câncer, além de seu papel no início tardio do desenvolvimento da neoplasia (ZHU et al., 2013). A expressão desta proteína na progressão tumoral pode proporcionar uma condição desconhecida que permite a transformação celular neoplásica, ou mesmo que prepare as células para a indução oncogênica, e na sobrevivência tumoral por diversos mecanismos. Dentre os quais a regulação da transcrição, promoção da migração celular, inibição da diferenciação e controle do balanço energético celular, mecanismos que promovem a formação e o desenvolvimento do câncer (JIRAWATNOTAI e SITTITHUMCHAREE, 2016).

A superexpressão da ciclina D1 é comum em células em processo de divisão celular, mas específica para determinados tipos de neoplasias (câncer de mama, do cólon e epidermóide), devido ao resultado da alteração da amplificação e translocação do gene CCND1, e a deficiência na degradação da ciclina D1 (KNUDSEN et al., 2006). A análise da tumorigênese revelou que a superexpressão de ciclina D1, frequentemente, esta relacionada com o elevado grau de instabilidade cromossômica em câncer de mama, da bexiga, cabeça e pescoço, e colorretal. Deste modo, propõe-se que a expressão da ciclina D1 estimule a instabilidade genômica e propicie o desenvolvimento tumoral (PESTELL, 2013; CASIMIRO et al., 2015). Entretanto, ainda não foi possível a utilização desta proteína no diagnóstico de rotina, e seu uso no prognóstico permanece incerto (NASSER et al., 2011).

Visto a importância das ciclinas D na regulação da proliferação celular, nota-se a superexpressão dessas proteínas e a ativação aumentada de suas CDKs no

crescimento de células neoplásicas. A superexpressão de ciclina D1 tem sido observada em CE da cavidade bucal, podendo estar associada à elevada taxa de recidiva, metástase linfonodal, pior prognóstico e sobrevida reduzida dos pacientes (QIE; DIEHL, 2016). A compreensão do papel da ciclina D1 nos processos e vias nos quais o CE da cavidade bucal se desenvolve é de suma importância para o entendimento da progressão tumoral.

Ademais, a utilização de Ciclina D1 como um biomarcador poderia auxiliar na detecção de alterações moleculares em diferentes estágios da tumorigênese, e assim, contribuir para a confecção de um painel de biomarcadores de progressão tumoral e prognóstico, com sua implementação na rotina clínica e no desenvolvimento de novos alvos terapêuticos possibilitando maior chance de cura e melhores tratamentos para o paciente.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo Geral

- Analisar a expressão da proteína ciclina D1 em carcinoma epidermóide da cavidade bucal e sua aplicabilidade como biomarcador de progressão tumoral e prognóstico.

2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar a expressão da proteína ciclina D1 em CE da cavidade bucal por meio da imunohistoquímica (IHQ);
- Avaliar a expressão de ciclina D1 na progressão tumoral e sua correlação com os dados clínico-patológicos;
- Verificar a correlação entre a expressão da ciclina D1, gradação tumoral, o infiltrado linfocitário tumoral (TIL), padrão de invasão tumoral, invasão vascular, linfática e perineural com as características clinico-patológicas.
- Avaliar o emprego de ciclina D1 como biomarcador de prognóstico mediante análise da Sobrevida Global (SG) e Sobrevida Livre de Doença (SLD) em indivíduos com CE da cavidade bucal.

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 Casuística

Foi realizado um estudo analítico longitudinal onde foram incluídas amostras biológicas e dados clínicos e de seguimento de pacientes atendidos entre os anos de 2010 e 2015 nos serviços de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do Hospital Santa Rita de Cássia (AFECC), Hospital Cassiano Antônio de Moraes (HUCAM) da Universidade Federal do Espírito Santo, Brasil e da University Hospitals Coventry and Warwickshire NHS Trust localizada no Reino Unido. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa do Centro Integrado de Atenção à Saúde, Vitória - ES (Processo nº 318/2011; Anexo 1) e pelo NRES Committee West Midlands – Coventry & Warwickshire (EC.10.H1210.9, Anexo 2).

Na seleção dos casos utilizaram-se como critérios de inclusão pacientes com diagnóstico conclusivo de carcinoma epidermóide da cavidade bucal, de ambos os sexos, grupos étnicos e faixa etária, os quais não haviam sido submetidos a tratamento antineoplásico prévio, acompanhamento mínimo de 24 meses e que apresentavam lâminas e blocos em bom estado de conservação, com mais de 75% da área tecidual total representada por tumor. Foram excluídas do estudo amostras com lâminas e blocos defeituosos, neoplasias de outros sítios anatômicos, recidivas e amostras de pacientes que haviam sido submetidos a tratamentos prévios.

Mediante entrevistas, consulta médica e busca em prontuários foram obtidas as variáveis clínicas como idade, sexo, estadiamento clínico (sistema TNM), sítio anatômico do tumor e histórico do consumo de álcool e tabaco dos 115 pacientes incluídos no estudo. Indivíduos que não apresentavam o consumo de álcool e tabaco em tempo maior há cinco anos foram classificados como ex-etilistas e ex-tabagistas. As amostras provenientes dos centros de pesquisa do Brasil e da

Inglaterra foram, respectivamente, 59 (51%) e 56 (49%) pacientes, totalizando 115 casos.

3.2 Análise Histopatológica

Os espécimes selecionados, fixados previamente em solução tamponada de formol a 10% (pH 7,4), foram incluídos em parafina e posteriormente seccionados em micrótomo (Leica RM2165). Obteve-se de cada bloco cortes consecutivos de 5 µm, colocados sobre lâminas histológicas e corados pelo método de hematoxilina e eosina (HE). As lâminas coradas em HE que apresentaram um percentual de tumor acima de 75% da área total do tecido (áreas representativas) foram analisadas em microscópio óptico Zeiss® quanto à gradação tumoral, contagem de linfócitos infiltrantes no tumor (TIL), padrão de invasão tumoral, invasão vascular, linfática e perineural.

O grau de diferenciação tumoral foi analisado de acordo com os critérios de classificação de tumores estabelecidos pela OMS (2005). Nesta classificação os tumores foram agrupados em três categorias: bem diferenciado, em que a arquitetura tecidual assemelha-se ao padrão normal do epitélio escamoso; moderadamente diferenciado, apresenta certo grau de pleomorfismo celular e nuclear, atividade mitótica e pouca queratinização; e pouco diferenciado, com predomínio de células imaturas, numerosas mitoses típicas e atípicas e ausência de queratinização.

O padrão de Infiltração Linfocitária Tumoral (TIL) foi analisado no aumento de 25X sendo categorizado em: alta, quando verificada a presença de linfócitos em > 80% da área do tumor/estroma; moderada, com presença de infiltrado heterogêneo e irregular de linfócitos ocupando entre 20 e 80% da área tumoral/estromal; baixa, infiltrado discreto distribuído em < 20% de tumor/estroma ou inexistente (MARSH et al., 2011).

O padrão de invasão tumoral foi avaliado conforme proposto por Bryne et al. (1992) que consiste na avaliação do front de invasão tumoral utilizando aumento de 200x. Nesta classificação o front de invasão tumoral é classificado em quatro categorias: padrão I, compressivo e bordas infiltrantes bem delineadas; padrão II - infiltrante com cordões sólidos; III - pequenos grupos ou cordões de células infiltrantes; padrão IV - marcante dissociação em grupos pequenos ou células individualizadas.

Também foram analisadas a Invasão Vascular e Linfática, caracterizadas pela presença de células neoplásicas dentro de vasos/artérias sanguíneas e linfáticas, além da existência de Invasão Perineural, de acordo com os parâmetros estabelecidos pelo *The Royal College of Pathologists* (HIRSCHOWITZ et al., 2010). Estas análises foram descritas como presença ou ausência.

As análises histopatológicas foram realizadas por dois examinadores, em casos de discrepância, as lâminas foram revisadas e um consenso foi obtido como resultado final.

3. 3 Construção do Tissue microarray (TMA)

As lâminas coradas em hematoxilina e eosina (HE) foram digitalizadas na plataforma Panoramic Digital Slide Scanner (3DHISTCH Ltd®, Hungria). As imagens obtidas foram analisadas utilizando o software Pannoramic Viewer para Windows (versão 1.15 3DHISTCH Ltd®, Hungria). Amostras de tecido representativas das áreas de tumor (front de invasão e porção mediana), displasia e epitélio adjacente ao tumor foram então selecionadas utilizando a ferramenta TMA do software Pannoramic Viewer. Em seguida os blocos correspondentes às lâminas selecionadas (blocos doadores) foram inseridos no equipamento TMA Master II (3DHISTCH Ltd®, Hungria) sendo então escaneados. As imagens geradas das lâminas com as áreas de TMA selecionadas foram alinhadas às imagens dos blocos utilizando o software do TMA Master II (3DHISTCH Ltd®, Hungria). Fragmentos cilíndricos de 0,6mm

foram obtidas, retirados fragmentos cilíndricos de 1mm da parte central (cerne) e inseridos em outro bloco receptor em locais definidos na matriz de forma automatizada (TMA Master II, 3DHISTCH Ltd®, Hungria), no The Nottingham Health Science Biobank (NHSB) - Reino Unido. Para cada caso e região selecionada (superfície tumoral, front de invasão, displasia e epitélio adjacente ao tumor) as amostras foram obtidas em triplicata. Após término da construção do TMA, os blocos receptores foram seccionados em micrótomo para a obtenção de cortes histológicos sequenciais de 3 μ os quais foram dispostos em lâminas silanizadas, com conseguinte validação do TMA.

3.4 Imunohistoquímica (IHQ)

As reações de imunohistoquímica foram realizadas nas lâminas de TMA, a partir da desparafinização com xilol e reidratação em concentrações decrescentes de álcool etílico (absoluto - 95% - 70%) e posterior uso de água destilada. Para a recuperação antigênica as lâminas foram incubadas em tampão de citrato pH 6,0 sob pressão, à temperatura de 121°C por 3 minutos (Pressure Cooker, Aptum Biologics) consecutivamente, resfriados à temperatura ambiente e, assim, lavados em água deionizada. Para a neutralização da peroxidase endógena, as lâminas foram incubadas com peróxido de hidrogênio 3%, seguido da aplicação do tampão Tris SDS (TBS) por 5 minutos em cada etapa. Após esta etapa, as lâminas foram incubadas overnight a 4°C com o anticorpo primário monoclonal anti-ciclina D1 camundongo (Clone SP4, Abcam, 1:50). As lâminas foram lavadas com TBS, e posteriormente incubadas com o anticorpo secundário (Post Primary, Novolink™ – Novocastra™) por 30 minutos e lavadas por 5 minutos em TBS. À seguir, as lâminas foram incubadas com o polímero (Novolink™ Polymer - Novocastra™) por 30 minutos e subsequentemente lavadas com TBS por 5 minutos. Em seguida, procedeu-se à revelação da reação utilizando o 3.3'-Diaminobenzidina (DAB) em uma solução cromogênica à temperatura ambiente. A reação foi interrompida com água destilada e as lâminas contra-coradas com hematoxilina de Harrys (HHS80,

Sigma-Aldrich®), por 30 segundos, à temperatura ambiente. Após serem lavadas com água corrente por 10 minutos, as lâminas foram desidratadas com isopropanol em séries crescentes de 60, 70 e 90%, passadas em xilol e montadas com solução de resina não aquosa (Entelan® - Merck Millipore) e recobertas com lamínula. Foram utilizados como controles positivos fragmentos de tonsila humana e como controle interno da reação, foi considerada a marcação dos queratinócitos da camada basal. Os controles negativos foram obtidos pela omissão do anticorpo primário, o qual foi substituído por soro não-imune de camundongo (X501-1, DAKO) diluído em solução diluente de anticorpo (S0809, DAKO). A reação com o anticorpo utilizado foi previamente submetida a testes para padronização.

Para avaliar a expressão da ciclina D1 foi considerada a marcação nuclear em queratinócitos utilizando o método H-score (PICKHARD et al., 2014). Este método consiste em uma análise semi-quantitativa obtida pelo produto da intensidade da coloração utilizando uma escala de 0 a 3 (0, representa ausência de imunomarcação; 1, imunomarcação de fraca intensidade; 2, imunomarcação de intensidade moderada e 3, imunomarcação de intensidade forte) pela porcentagem de células marcadas em cada nível de intensidade (0 a 100%). Todas as secções foram analisadas por 2 examinadores, usando um microscópio de luz (200X) e um consenso foi obtido nos casos discordantes.

Avaliou-se a expressão tecidual de ciclina D1 em células tumorais de CE da cavidade bucal (front e porção mediana), displasia e epitélio adjacente ao tumor. A categorização quanto à expressão em alta e baixa de Ciclina D1 ocorreu através da instituição do ponto de corte, baseado na mediana (valor de 140) obtida pelo cálculo do H-score na região da porção mediana do tumor, sendo adotada para as outras regiões (front de invasão, displasia e epitélio adjacente ao tumor). A expressão de ciclina D1 nas regiões com H-score \leq 140 foi considerada baixa, enquanto o H-Score $>$ 140 apresentou alta expressão.

Para a validação do uso da IHQ em TMA foram utilizadas 10 lâminas contendo tecido tumoral de carcinoma epidermóide de orofaringe imunomarcadas com ciclina D1. O escore foi realizado por dois patologistas independentes. A análise estatística de comparação entre os grupos sucedeu-se com a avaliação de interobservadores e

não houve diferença significativa entre as leituras. Em seguida, estes valores foram comparados com os escores obtidos dos TMAs, não sendo observada diferença.

3.5 Análise de Sobrevida

Os pacientes diagnosticados com a neoplasia foram acompanhados ao longo de um período mínimo de cinco anos. O seguimento dos pacientes foi realizado em etapas, sendo o primeiro seguimento realizado entre 6 e 18 meses após a consulta de diagnóstico e final do tratamento de primeira linha; o segundo seguimento foi registrado 6 meses após o primeiro seguimento e o terceiro e quarto seguimentos em 30 e 60 meses subsequentes à data do diagnóstico clínico. A avaliação do seguimento foi realizada pela equipe médica e os resultados da avaliação clínica foram anotados em formulário específico e complementados com entrevista e análise dos prontuários. O tratamento realizado foi registrado e subdividido nas seguintes categorias: Cirurgia exclusiva, Cirurgia + Radioterapia + Quimioterapia e Radioterapia + Quimioterapia. A análise da progressão tumoral considerou três condições clínicas pós-tratamento: remissão tumoral, recidiva e óbito.

3.6 Análise Estatística

Para as associações entre as variáveis estudadas, o teste do Qui-Quadrado foi utilizado e a confirmação dos valores foi realizada por meio da utilização do teste Exato de Fisher (o nível de significância de $p \leq 0,05$).

O cálculo da sobrevida foi obtido considerando o intervalo de tempo entre a data do diagnóstico e o desfecho do paciente. Para a Sobrevida Global (SG) o desfecho foi

considerado o óbito ou o último retorno, e na análise da Sobrevida Livre de Doença (SLD), a ocorrência de recidiva local, recidiva regional ou último retorno do paciente. Para os casos nos quais não se sucedeu o desfecho, o último dia do retorno ou a última data conhecida por estar vivo foi considerado. As curvas de sobrevivência foram obtidas através da utilização do modelo de Kaplan-Meier com índice de confiança igual a 95% ajustados pelo modelo de Regressão multivariado de Cox, com índice de significância igual ou inferior a 0,2 para SG e 0,1 para SLD. Todas as análises estatísticas e gráficas foram realizadas utilizando o software SPSS® v. 20.

4 RESULTADOS

As características clínicas e histopatológicas dos casos incluídos no estudo estão descritas na Tabela 1. Observa-se um maior número de indivíduos do sexo masculino (77%) e com idade média de 60 anos (IC = 32 – 98 anos). Em relação aos fatores de risco para o desenvolvimento da doença, como o álcool e o tabaco, 50% dos indivíduos eram etilistas e 47%, tabagistas e 42% dos indivíduos eram etilistas e tabagistas concomitantemente, sendo 86% deles do sexo masculino.

O sítio anatômico mais acometido foi a língua, com 29% dos casos, quando comparado aos outros subsítios palato, assoalho bucal, área retromolar, gengiva, vestíbulo e mucosa jugal. Quanto ao tamanho do tumor primário e ao acometimento linfonodal, foram diagnosticados 63 indivíduos com tumores de tamanho T1/T2 (54%) e 63 (54%) sem metástase linfonodal (N0). Dos casos analisados 52% apresentaram estágio avançado (estádios III/IV) no momento do diagnóstico. Com os dados obtidos do seguimento clínico dos pacientes registramos a presença de recidiva local em 18% dos indivíduos e óbito em 51% no decorrer do estudo.

Tabela 1. Características demográficas e clínico-patológicas dos pacientes diagnosticados com CE da cavidade bucal.

Características demográficas e clínico-patológicas	CE da cavidade bucal	
	n	(%)
Sexo		
Masculino	89	77%
Feminino	26	23%
Idade (anos)^a		
< 60 anos	61	53%
≥ 60 anos	53	46%
Consumo de álcool^a		
Etilista	57	47%
Ex-etilista	14	12%
Nunca	13	11%
Uso de tabaco^a		
Tabagista	54	47%
Ex-tabagista	23	20%
Nunca	15	11%
Sítio anatômico^a		
Língua	33	29%
Assoalho bucal	8	7%
Gengiva	7	6%
Área retromolar	5	4%
Mucosa jugal	4	4%
Palato	1	1%
Vestíbulo bucal	1	1%
Tamanho do tumor primário (T)^a		
T1/T2	62	54%
T3/T4	49	43%
Comprometimento linfonodal (N)^a		
N0	63	55%
N+	45	39%
Estadiamento clínico^a		
I/II	48	42%
III/IV	60	52%
Recidiva Local	21	18%
Óbito	59	51%

^a Não informados: Idade (n = 2); Consumo de álcool (n = 31); Uso de tabaco (n = 23); Sítio anatômico não subclassificado (n = 55); Tamanho tumor primário (T) (n = 4); Comprometimento linfonodal (n = 7); Estadiamento clínico (n = 7). N0 = ausência de metástase linfonodal; N+ = presença de metástase linfonodal.

Na figura 2 visualiza-se a gradação tumoral em bem diferenciada (A) com 40% dos casos, moderadamente diferenciada (B) em 57% dos casos e pouco diferenciada (C) em 3% dos casos analisados com CE da cavidade bucal, na coloração de HE. Observa-se nas variáveis analisadas que o tecido pouco diferenciado (Figura 2C) apresentou menor ocorrência nos casos avaliados quando comparado às outras gradações (Tabela 2).

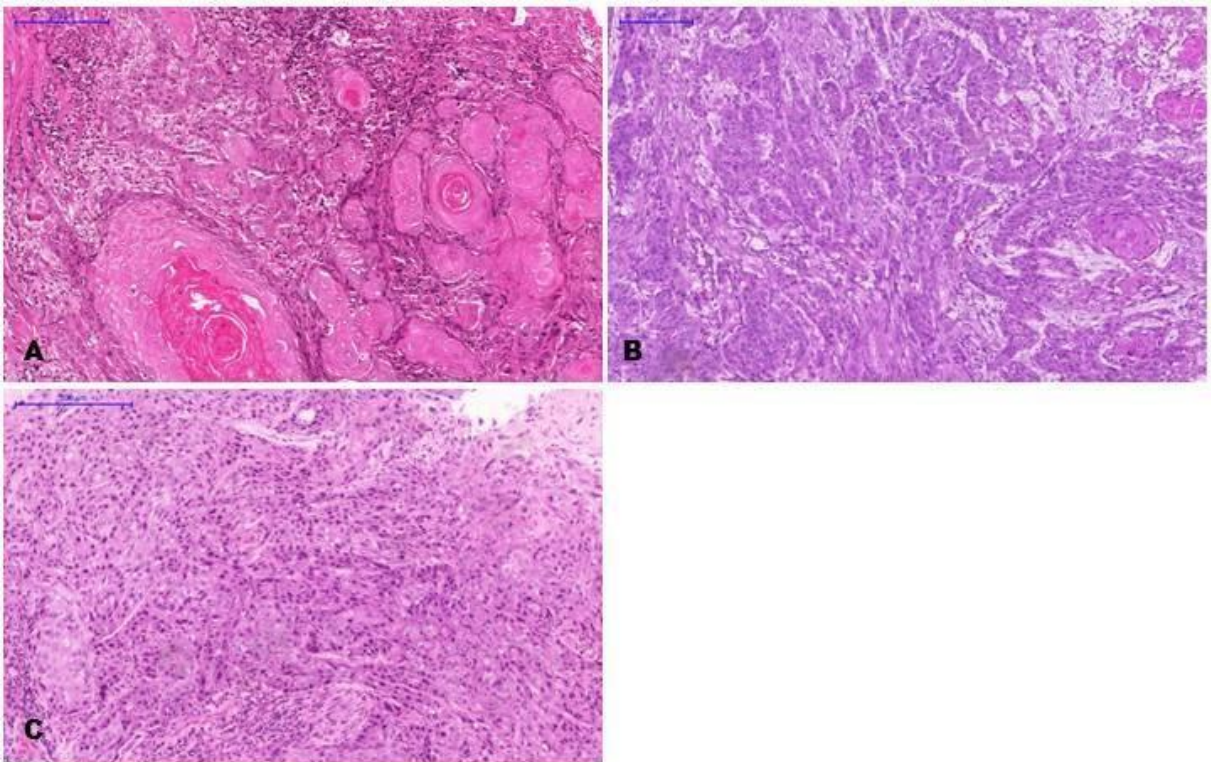


Figura 2- Fotomicroscopia mostrando a gradação tumoral em CE da cavidade bucal. (A) Células bem diferenciadas no tecido; (B) Células moderadamente diferenciadas no tecido; (C) Células pouco diferenciadas no tecido. Coloração de HE, magnificação original de 100X.

A figura 3 retrata o padrão de infiltração linfocitária tumoral (TIL) com quantidade baixa (A), moderada (B) e alta (C) de linfócitos no tecido, em 25%, 54% e 19% dos casos analisados, respectivamente, em CE da cavidade bucal na contra coloração HE. A menor quantidade de infiltrado linfocitário tumoral (Figura 3A) apresentou associação com o hábito tabagista, enquanto a maior quantidade de infiltrado no tumor (Figura 3C) teve correlação com o menor tamanho do tumor primário e estadiamentos iniciais (Tabela 2).

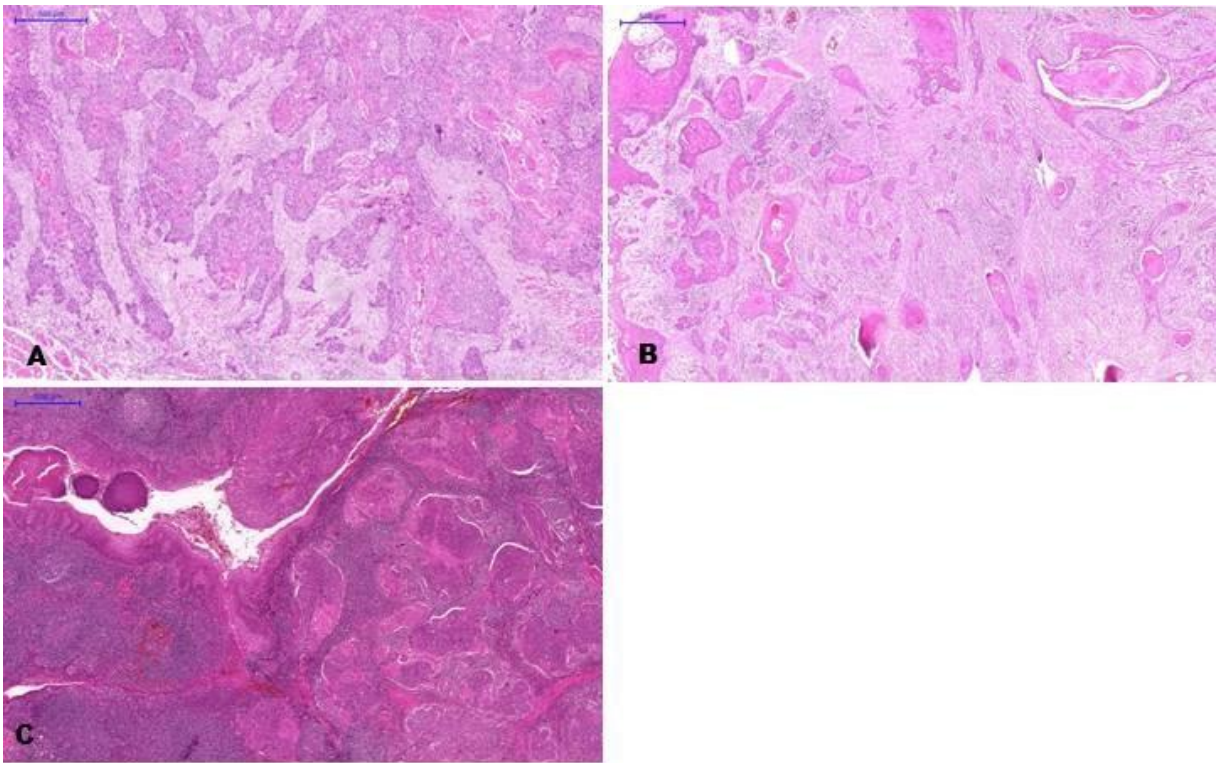


Figura 3- Fotomicroscopia mostrando o padrão de infiltração linfocitária tumoral (TIL) em CE da cavidade bucal. (A) Baixa quantidade de infiltrado linfocitário tumoral no tecido; (B) Moderada quantidade de infiltrado linfocitário tumoral no tecido; (C) Alta quantidade de infiltrado linfocitário tumoral no tecido. Coloração de HE, magnificação original de 25X.

A figura 4 aborda o padrão de invasão tumoral com a maior ocorrência do tipo II (B), seguida dos tipos I (A), III (C) e IV (D), 52%, 19%, 17% e 7%, respectivamente, em CE da cavidade bucal na contra coloração HE. O padrão de invasão tumoral do tipo IV (Figura 4D) mostrou relação com o maior tamanho do tumor e estadiamento avançado (Tabela 2).

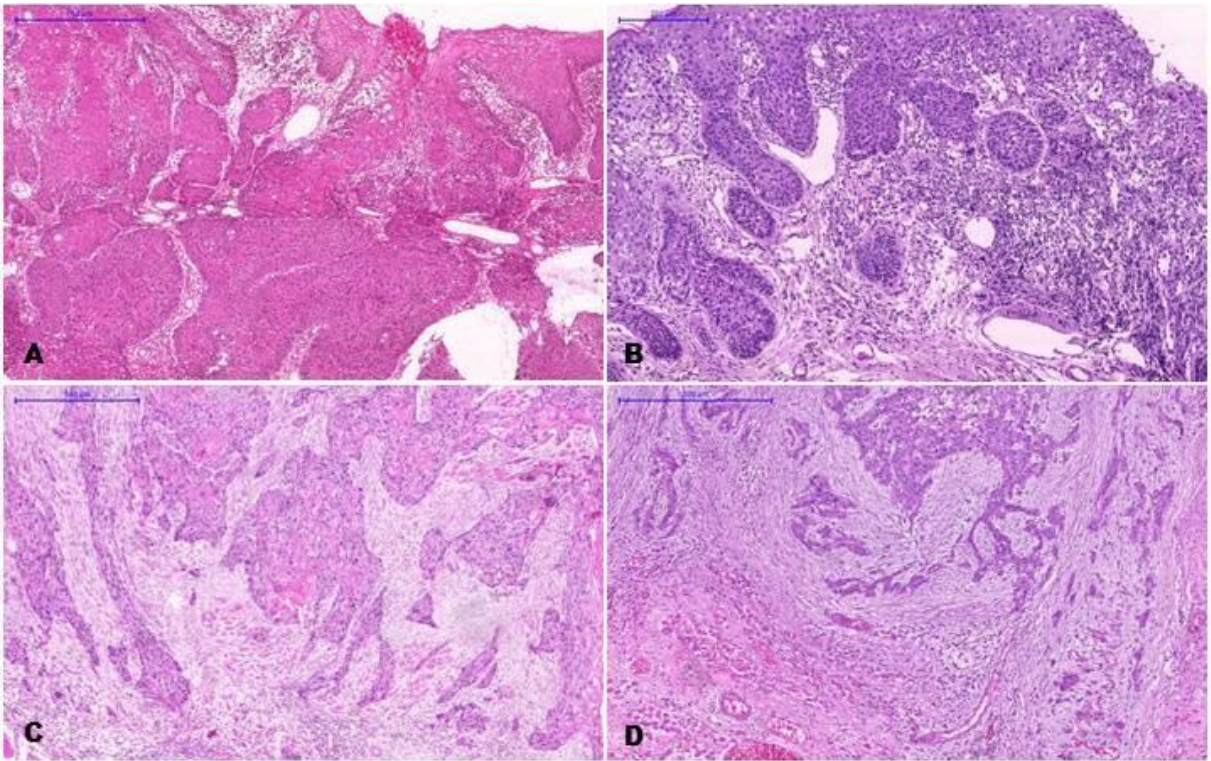


Figura 4- Fotomicroscopia mostrando o padrão de invasão tumoral em CE da cavidade bucal. (A) Padrão de invasão tumoral do tipo I; (B) Padrão de invasão tumoral do tipo II; (C) Padrão de invasão tumoral do tipo III; (D) Padrão de invasão tumoral do tipo IV. Coloração de HE, magnificações originais de 50X (C e D) e 100x (A e B).

A figura 5 retrata as invasões vascular (A), linfática (B) e perineural (C) por células neoplásicas em CE da cavidade bucal em 74%, 29% e 24% dos casos analisados, respectivamente, na coloração HE. Dentre essas, a invasão perineural exibiu associação com o menor tamanho do tumor (T1/T2) (Tabela 2).

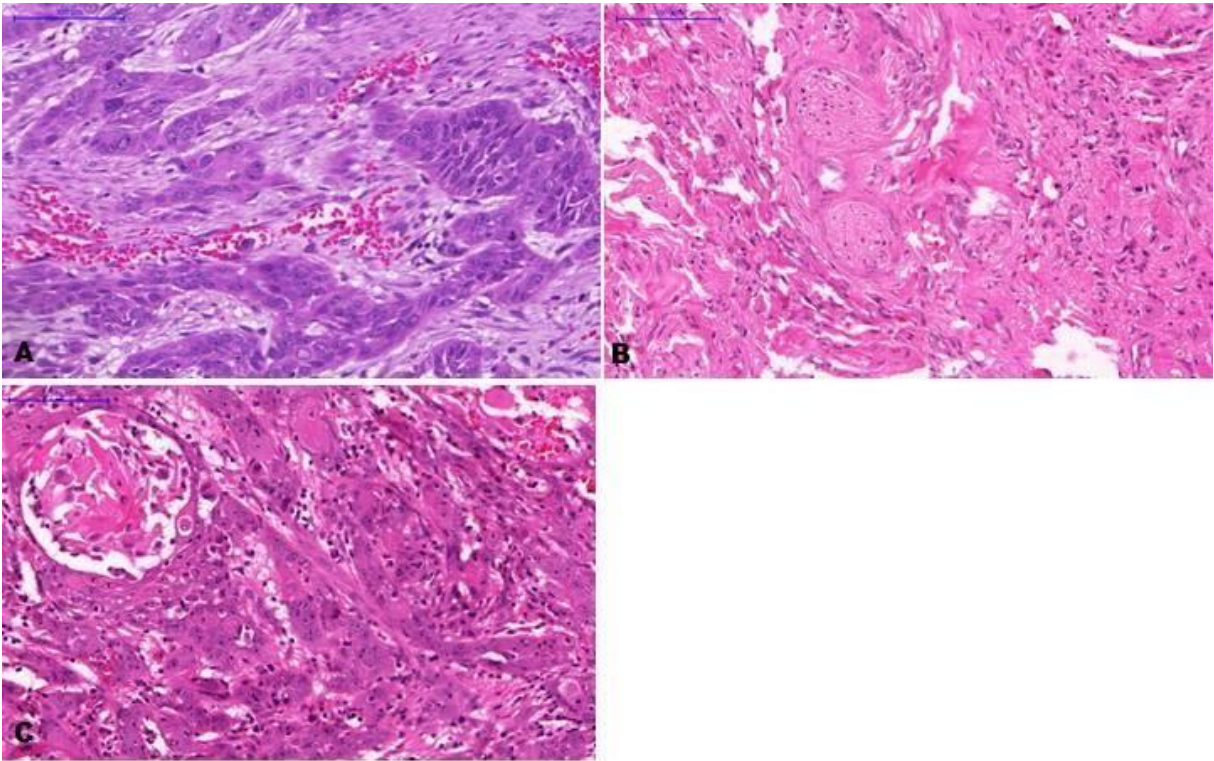


Figura 5- Fotomicroscopia mostrando a invasão vascular, linfática e perineural em CE da cavidade bucal. (A) Invasão vascular; (B) Invasão linfática; (C) Invasão perineural. Coloração de HE, magnificação original de 200x.

Na Tabela 2 estão descritos os parâmetros de gradação tumoral, TIL, padrão de invasão tumoral, invasão vascular, linfática e perineural, e sua correlação com as variáveis clínico-patológicas estudadas. Correlação significativa foi observada entre a maior ocorrência do padrão de infiltração linfocitária tumoral (TIL) alto com as variáveis menor tamanho do tumor primário ($p = 0,001$) e estadiamento inicial ($p = 0,005$); e a maior quantidade de infiltrado linfocitário tumoral de baixo grau com o hábito tabagista ($p = 0,026$). O padrão de invasão tumoral do tipo IV mostrou associação com o maior tamanho do tumor ($p = 0,006$) e o estadiamento clínico avançado ($p = 0,028$). A invasão perineural apresentou correlação com o menor tamanho do tumor ($p = 0,035$). Não foi observada correlação entre os parâmetros invasão vascular e linfática com das variáveis analisadas.

Tabela 2. Correlação entre a gradação tumoral, padrão de infiltração linfocitária tumoral (TIL), padrão de invasão tumoral, invasão vascular, linfática e perineural com as características clínico-patológicas dos pacientes diagnosticados com CE da cavidade bucal.

Variáveis	Gradação tumoral				TIL				Padrão de invasão tumoral					Invasão vascular			Invasão linfática			Invasão perineural		
	Bem	Mode-rada	Pouco	p	Baixa	Mode-rada	Alta	p	I	II	III	IV	p	Sim	Não	p	Sim	Não	p	Sim	Não	p
Idade (anos)																						
< 60 anos	20	39	2	0,270	16	37	7	0,104	11	28	13	6	0,318	44	9	1,000	21	20	0,109	15	9	1,000
≥ 60 anos	24	26	3		12	25	14		11	31	7	2		40	8		11	23		12	8	
Consumo de álcool																						
Sim	20	35	2	0,417	18	27	10	0,326	11	27	9	6	0,348	39	8	0,298	19	15	0,724	14	8	0,089
Nunca	8	5	0		1	10	2		3	8	1	0		9	4		4	5		5	1	
Ex-etilista	6	7	1		4	8	1		0	8	4	1		12	1		3	4		1	4	
Uso de tabaco																						
Sim	23	29	2	0,992	15	32	6	0,026*	9	24	11	5	0,286	35	7	0,819	16	15	0,993	11	9	0,737
Nunca	6	8	1		1	10	4		0	12	2	1		12	2		3	3		5	2	
Ex-tabagista	10	12	1		8	6	7		6	12	3	1		18	5		8	8		5	3	
Tamanho do tumor primário (T)																						
T1/T2	26	30	4	0,239	10	30	17	0,001*	13	36	9	0	0,006*	46	8	0,581	14	27	0,092	23	9	0,035*
T3/T4	17	32	1		17	31	2		5	23	11	7		34	8		16	13		4	8	

Tabela 2. Correlação entre a gradação tumoral, padrão de infiltração linfocitária tumoral (TIL), padrão de invasão tumoral, invasão vascular, linfática e perineural com as características clínico-patológicas dos pacientes diagnosticados com CE da cavidade bucal.

(conclusão)

Variáveis	Gradação tumoral				TIL				Padrão de invasão tumoral					Invasão vascular			Invasão linfática			Invasão perineural		
	Bem	Mode-rada	Pouco	<i>p</i>	Baixa	Mode-rada	Alta	<i>p</i>	I	II	III	IV	<i>p</i>	Sim	Não	<i>p</i>	Sim	Não	<i>p</i>	Sim	Não	<i>p</i>
Comprometi-mento linfonodal (N)																						
N+	14	26	1	0,444	12	23	4	0,255	7	22	8	3	0,990	31	5	0,778	11	16	0,809	9	5	1,000
N0	29	36	4		15	38	15		11	37	12	4		49	11		19	24		18	12	
Estadiamen-to clínico																						
I/II	23	22	3	0,141	7	26	14	0,005*	9	31	6	0	0,028*	38	7	1,000	13	20	0,634	16	10	1,000
III/IV	20	40	2		20	35	5		9	28	14	7		42	9		17	20		11	7	

Teste Qui Quadrado, * $p \leq 0,05$.

O padrão de expressão nuclear da ciclina D1 nas regiões do epitélio adjacente ao tumor, displasia, tumor (superfície tumoral e front de invasão tumoral) e os controles positivo e negativo estão exemplificados na Figura 6. Observa-se a imunomarcção da proteína nas camadas basal e parabasal no epitélio adjacente ao tumor na intensidade forte (Figura 6A) e imunomarcção fraca na região de displasia (Figura 6B). Na superfície tumoral e no front de invasão, visualiza-se a marcação forte nas células neoplásicas (Figura 6C, D) e nas células periféricas das ilhotas e cordões neoplásicos (Figura 6E, F).

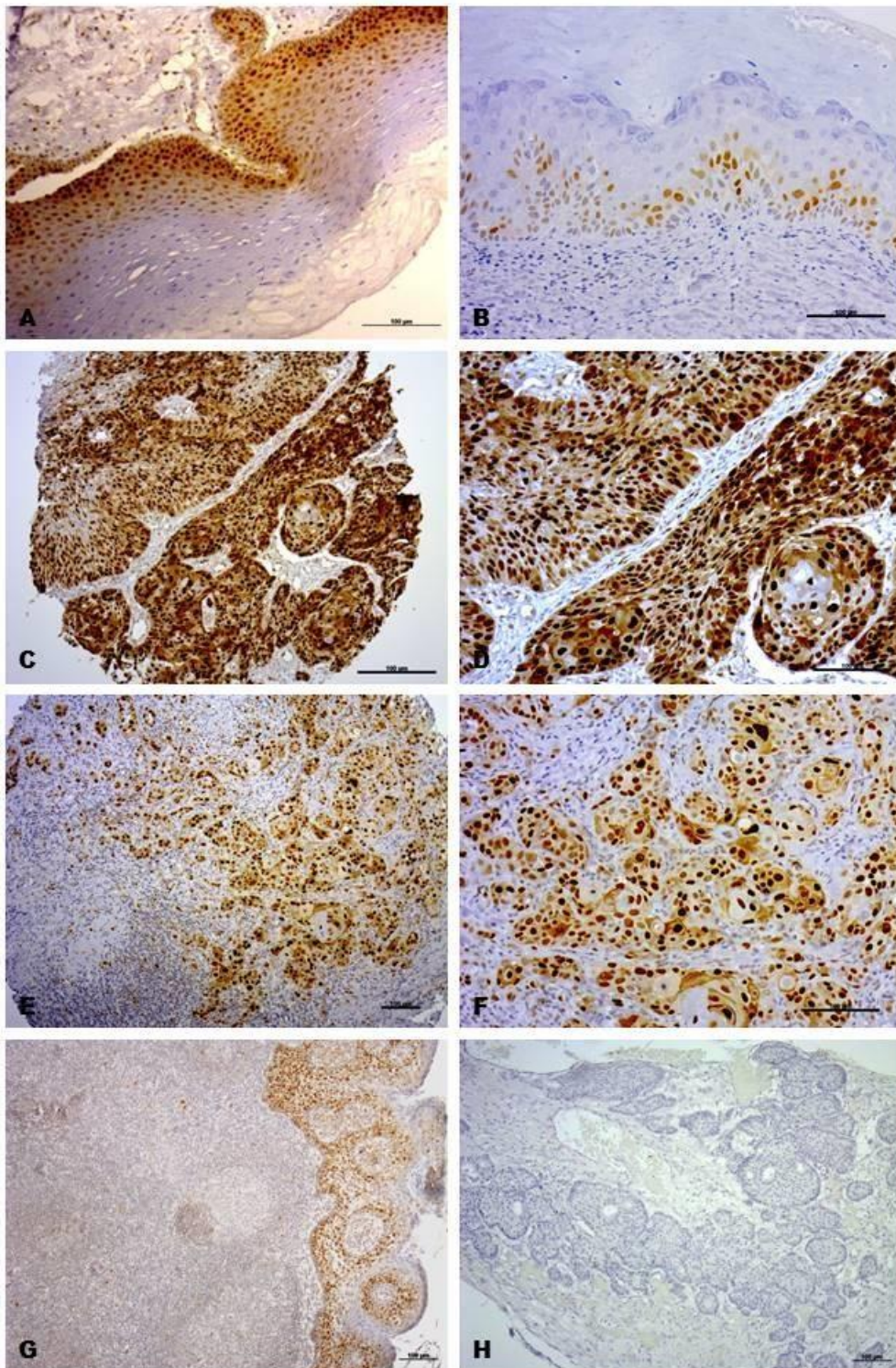


Figura 6- Expressão nuclear de ciclina D1 em CE da cavidade bucal. (A) Imunomarcção de intensidade forte (3) nas camadas basal e parabasal do epitélio normal adjacente ao tumor; (B) Imunomarcção fraca (1) na camada parabasal de epitélio com displasia leve; (C, D) Imunomarcção forte (3) na superfície tumoral; (E, F) Imunomarcção forte (3) no front de invasão; (G) Controle positivo com marcação dos queratinócitos da camada basal em tonsila; (H) Controle negativo. Magnificações originais de 100X (C, E, G, H) e 200X (A, B, D, F).

Ao longo da análise microscópica foi detectada a perda de material, diminuindo o n inicial de cada região. Quando analisado os campos do tecido quanto às regiões, a superfície tumoral apresentou alta expressão em 57 (52%) casos, seguida das regiões do epitélio adjacente ao tumor com 22 (58%), e front de invasão tumoral com 16 (52%) casos sendo a displasia a região com predomínio de baixa expressão em 33 (62%) pacientes. Na Tabela 3 é possível comparar a média da expressão da ciclina D1 nas regiões, obtidas pelo score, de forma pareada no desenvolvimento da neoplasia. Porém não foi observada associação significativa entre a expressão da proteína com a progressão tumoral (Tabela 3).

Tabela 3. Comparação da média dos scores da expressão de Ciclina D1 entre as regiões de superfície tumoral, displasia e epitélio adjacente ao tumor na progressão tumoral.

Regiões	n	Média do H-score	Desvio padrão	p
Superfície tumoral	110 ^a	140,5	71,8	0,160
Displasia	53 ^a	116,9	64,4	
Displasia	53 ^a	116,9	64,4	0,075
Epitélio adjacente ao tumor	38 ^a	133,3	57,7	

^a Casos não avaliados: Epitélio adjacente (n = 77); Displasia (n = 62); Superfície tumoral (n = 5); Front de invasão (n = 84); Teste t para amostras independentes; $p \leq 0,05$.

A Tabela 4 mostra a relação entre as características clínico-patológicas e a expressão da Ciclina D1. Como pode ser notado, não houve correlação entre a expressão nuclear da proteína nas áreas de superfície tumoral e do front de invasão com as variáveis analisadas. Porém, observa-se a maior expressão da proteína na nas regiões com tumores T1/T2, em 55% (superfície tumoral) e 71% (front de invasão) dos casos, e sem o comprometimento dos linfonodos em 64% das amostras.

Tabela 4. Correlação entre a expressão de ciclina D1 na superfície tumoral e no front de invasão com as características clínico-patológicas dos pacientes diagnosticados com CE da cavidade bucal.

Variáveis	Expressão de Ciclina D1					
	Superfície tumoral			Front de invasão		
	alta n (%)	baixa n (%)	<i>p</i>	alta n (%)	baixa n (%)	<i>p</i>
Tamanho do tumor primário (T)						
T1/T2	25 (24%)	32 (32%)	0,433	10 (32%)	12 (39%)	0,433
T3/T4	24 (23%)	22 (21%)		6 (19%)	3 (10%)	
Comprometimento linfonodal						
N+	21 (20%)	16 (16%)	0,217	7 (23%)	4 (13%)	0,458
N0	28 (27%)	38 (37%)		9 (29%)	11 (36%)	
Estadio clínico						
I/II	20 (19%)	27 (26%)	0,429	7 (23%)	9 (29%)	0,479
III/IV	29 (29%)	27 (26%)		9 (29%)	6 (19%)	
Gradação tumoral						
Bem diferenciada	23 (21%)	22 (20%)	0,061	3 (10%)	7 (23%)	0,163
Moderadamente diferenciada	32 (30%)	26 (24%)		10 (32%)	9 (29%)	
Pouco diferenciada	0 (0%)	5 (5%)		2 (6%)	0 (0%)	
TIL						
Baixo	17 (16%)	10 (9%)	0,347	4 (13%)	4 (13%)	0,429
Moderado	27 (26%)	30 (29%)		8 (27%)	5 (17%)	
Alto	10 (9%)	12 (11%)		3 (10%)	6 (20%)	
Padrão de invasão						
I	12 (12%)	8 (8%)	0,797	3 (10%)	1 (3%)	0,696
II	26 (27%)	29 (28%)		8 (26%)	11 (35%)	
III	9 (9%)	10 (10%)		3 (10%)	3 (10%)	
IV	4 (4%)	4 (4%)		1 (3%)	1 (3%)	
Invasão vascular						
Sim	39 (41%)	40 (42%)	0,616	12 (44%)	12 (44%)	0,586
Não	9 (10%)	7 (7%)		2 (7%)	1 (5%)	
Invasão linfática						
Sim	17 (24%)	14 (20%)	0,470	7 (39%)	3 (17%)	0,897
Não	18 (26%)	21 (30%)		4 (22%)	4 (22%)	
Invasão perineural						
Sim	15 (34%)	11 (26%)	0,494	6 (35%)	4 (24%)	0,906
Não	8 (19%)	9 (21%)		4 (24%)	3 (17%)	

Teste Qui Quadrado; * $p \leq 0,05$.

Agrupando as modalidades terapêuticas empregadas nos pacientes com CE da cavidade bucal em três grupos, analisamos sua correlação com as variáveis clínico-patológicas estudadas, com a finalidade de verificar sua aplicação como indicadores de prognóstico (Tabela 5). Dados completos sobre a terapia instituída foram obtidos de 91 indivíduos. Neste grupo, verificamos que o tratamento radioquimioterápico foi correlacionado com estadios mais avançados e maior número de óbitos registrados no período do estudo ($p = 0,004$). Os indivíduos que foram submetidos ao tratamento radioterapia e quimioterapia (38%) apresentaram as maiores taxas de recidiva do tumor (9%).

Tabela 5. Relação entre a modalidade terapêutica empregada e os indicadores de prognóstico.

Modalidade terapêutica	Estadiamento clínico ^a			Sítio Anatômico ^a			Óbito ^a		Recidiva ^a	
	n (%)		<i>p</i>	n (%)		<i>p</i>	n (%)	<i>p</i>	n (%)	<i>p</i>
	I/II	III/IV		Língua	Outros sítios					
Cirurgia Exclusiva	22 (24%)	4 (5%)		6 (7%)	23 (25%)		6 (14%)		6 (30%)	
Cirurgia + Radioterapia + Quimioterapia	13 (15%)	14 (16%)	0,000*	10 (11%)	17 (19%)	0,294	11 (28%)	0,002*	6 (30%)	0,978
Radioterapia + Quimioterapia	4 (5%)	30 (35%)		13 (14%)	22 (24%)		23 (58%)		8 (40%)	

Teste Qui Quadrado; * $p \leq 0,05$; ^a Não informados: Estadiamento clínico (n = 21); Sítio anatômico (n = 23); Óbito (n = 19); Recidiva (n = 1).

Avaliando os dados relativos à sobrevida em um tempo médio de 24 meses, identificamos que, na análise univariada, as variáveis maior tamanho do tumor primário e comprometimento linfonodal estavam associados a menor taxa de sobrevida global (SG). Em que aproximadamente metade dos pacientes com o maior tamanho do tumor primário (T4) e acometimento linfonodal regional (N+), no período de 12 meses, vieram a óbito. Como pode ser observado nas curvas de sobrevida representadas na Figura 7.

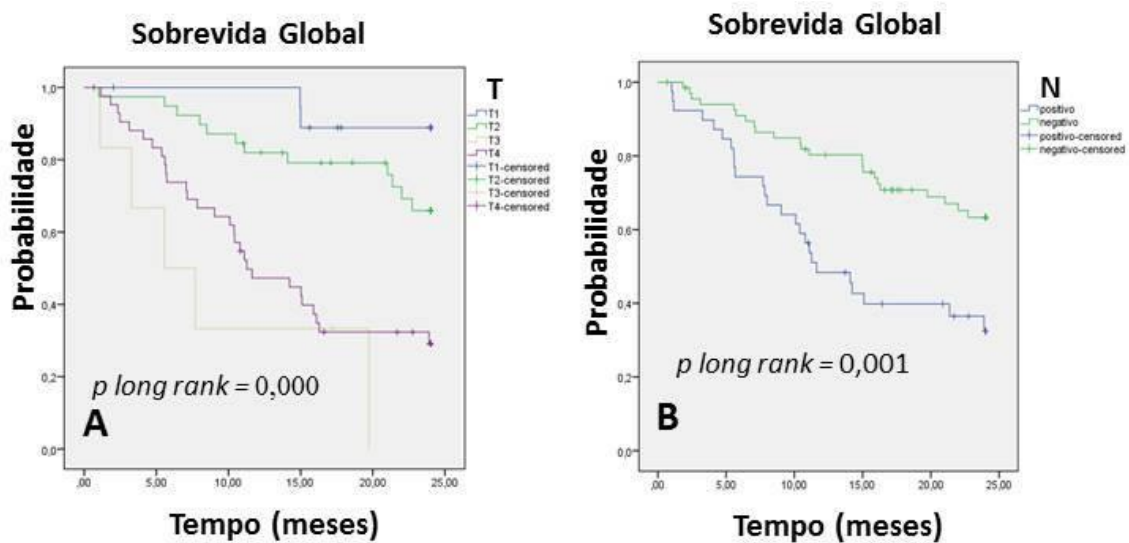


Figura 7- Curva de sobrevida global (SG) com tamanho do tumor primário (T) e comprometimento linfonodal (N). (A) Associação com T ($p = 0,000$). (B) Associação com N ($p = 0,001$). Modelo de Kaplan-Meier ($p \leq 0,05$).

Tendo por desfecho final a ocorrência da recidiva, a sobrevida livre de doença (SLD) foi correlacionada com a variável etilismo ($p = 0,048$), estando a curva representada na Figura 8. Verifica-se que 5% dos pacientes que possuíam o hábito etilista recidivaram em um período de 12 meses, aproximadamente, em um intervalo de tempo de 24 meses.

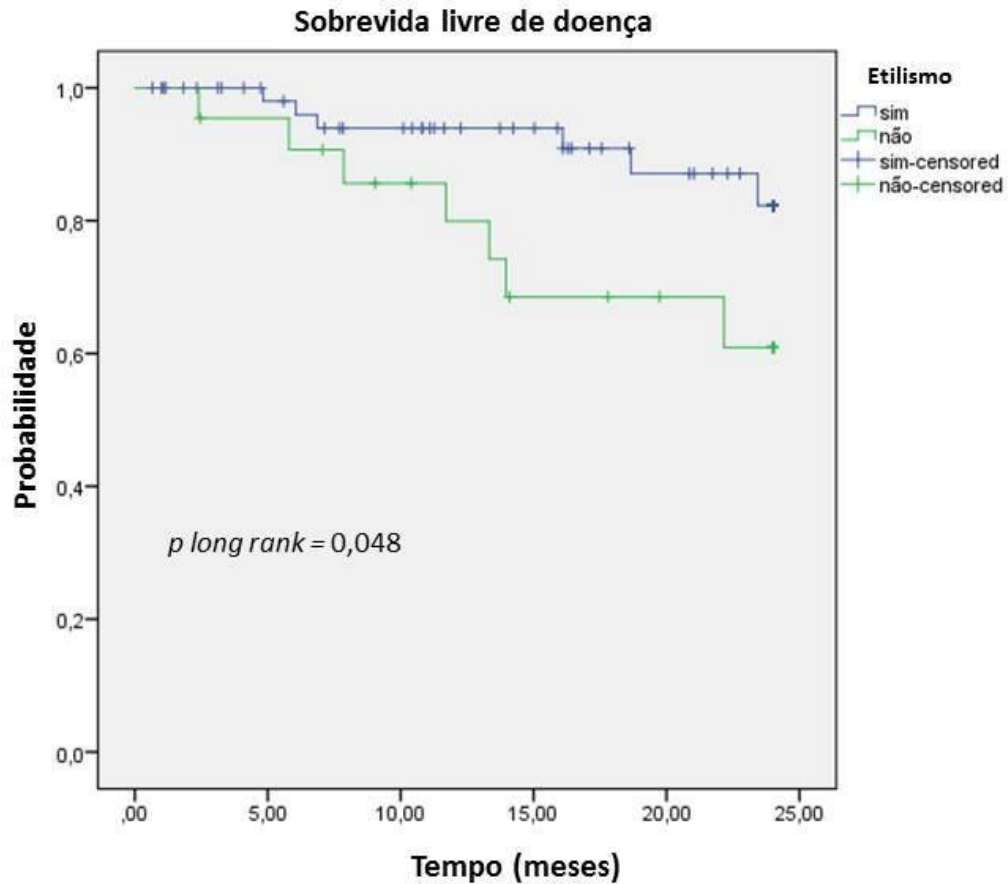


Figura 8- Curva de sobrevida livre de doença (SLD) com etilismo pelo método de Kaplan-Meier ($p \leq 0,05$).

A análise de Regressão Multivariada de Cox confirmou que os parâmetros maior tamanho do tumor (T) e acometimento linfonodal (N+) são fatores prognósticos independentes significativos ($p = 0,004$; $p = 0,066$) para SG, que podem aumentar o risco a óbito do paciente em até 2 vezes. Enquanto, o etilismo é um fator independente para SLD ($p = 0,078$) aumentando a chance de recidiva em mais de uma vez, como pode ser observado na Tabela 6.

Tabela 6. Análise regressiva multivariada da Sobrevida Global e Livre de Doença (n=115).

Variáveis	Categoria	Sobrevida Global		Sobrevida Livre de Doença	
		HR (IC 95%)	p value	HR (IC 95%)	p value
Etilismo	Sim/Não	a	a	1,28 (0,87-12,18)	0,078**
T	T1/T2/T3/T4	1,51 (1,61-13,15)	0,004*	a	a
N	N0/ N+	1,58 (0,18-1,05)	0,066*	a	a

^aVariável não incluída na análise; *SG: $p \leq 0,2$; **SLD: $p \leq 0,1$.

A expressão de Ciclina D1 no tumor não mostrou ser um fator de prognóstico significativo para as curvas de sobrevida global e sobrevida livre de doença (Figura 9).

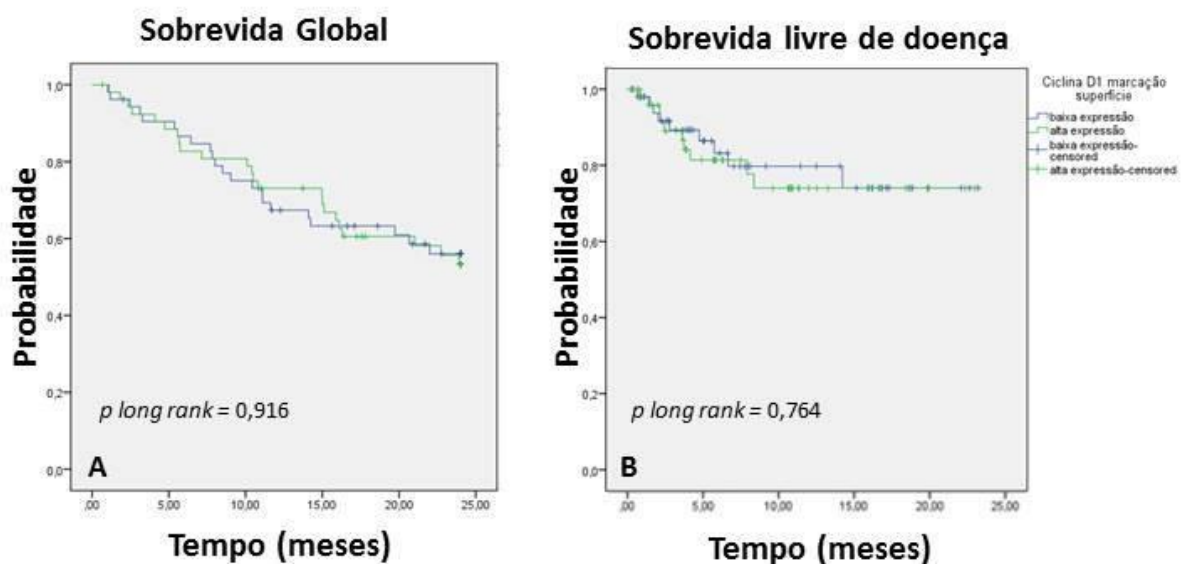


Figura 9 - Curva de sobrevida global (SG) e livre de doença (SLD) com a expressão da ciclina D1 categorizadas em alta e baixa no tumor pelo método de Kaplan-Meier ($p \leq 0,05$).

Quando avaliado os possíveis indicadores de prognóstico gradação tumoral, padrão de infiltração linfocitário tumoral, padrão de invasão tumoral, invasão vascular, linfática, perineural e resposta ao tratamento não foi possível estabelecer correlação com as curvas de sobrevida global e sobrevida livre de doença.

5 DISCUSSÃO

Em nosso estudo verificamos que a expressão da ciclina D1 pode estar relacionada com o início do desenvolvimento da neoplasia, visto que os resultados demonstram maior porcentagem na marcação da expressão da proteína em casos com tumores menores (T1/T2) e sem comprometimento linfonodal, tanto na superfície tumoral quanto no front de invasão. No entanto, observamos maior quantidade de casos com estadiamentos avançados, o que pode explicar a falta de correlação entre a expressão da proteína com os possíveis indicadores de prognóstico.

Jirawatnotai e Sittithumcharee (2016) relataram que a superexpressão de ciclina D1 em tumores está associada com as mutações gênicas, em que a alta expressão da proteína funciona como uma força motriz para a proliferação das células neoplásicas. Choi e Sicinski (2013) demonstraram a importância da função de ciclina D1 no início da tumorigênese através do estudo com camundongos deficientes em ciclina D1 (*ccnd1* - / -), resistentes à formação de neoplasias induzidas por *ras*- e *erbb2*. Os resultados apontaram que a expressão de ciclina D1 é necessária para o desenvolvimento de neoplasias malignas induzidas por oncogenes.

Na análise da progressão tumoral não foi possível notar correlação entre a expressão da ciclina D1 com as regiões de Tumor x Displasia e Displasia X Epitélio adjacente ao tumor podendo ser devido ao n de amostras. Entretanto, constata-se a expressão de ciclina D1 nas regiões com displasia e na superfície tumoral, e sua importância na progressão inicial da tumorigênese. Turatti et al. (2005) observaram a expressão de ciclina D1 na maior parte dos casos de CE da cavidade bucal (67%) e em alguns com displasia moderada a grave (8,6%), indicando que os principais componentes do fator de transcrição de ciclina D1 estavam alterados no epitélio displásico e no carcinoma. Ramakrishna et al. (2013) examinaram a expressão de ciclina D1 em mucosas bucais normais de não tabagistas e tabagistas, e no tecido displásico. Esses autores obtiveram como resultado a maior expressão de ciclina D1 nos casos de displasia epitelial quando comparada ao epitélio normal, não havendo correlação de ciclina D1 com o grau de displasia, ou mesmo com o hábito tabagista.

Haken et al. (2014) evidenciaram uma superexpressão de ciclina D1 (moderada e forte) em 46% dos tumores de cabeça e pescoço analisados, além de demonstrarem um potencial valor de prognóstico a partir da amplificação do gene CCND1 e da expressão de ciclina D1 na sobrevida global dos pacientes com CE da cavidade bucal. Noorlag et al. (2016) identificaram a expressão de ciclina D1 como um biomarcador para metástase nodal oculta em CE da cavidade bucal precoce. Entretanto, em nosso trabalho não houve associação da expressão da proteína com as características clínico-patológicas avaliadas.

Baseado nos resultados obtidos neste trabalho e nos supracitados nota-se que a superexpressão de ciclina D1 nem sempre está relacionada com as variáveis clínico-patológicas estudadas. Ou mesmo, que essas modificações observadas no microambiente tumoral pela expressão da proteína possam necessariamente levar a evidentes transformações clínico-morfológicas ou histopatológicas.

No trabalho observamos a maior ocorrência de baixo grau de infiltrado linfocitário tumoral (TIL) em indivíduos tabagistas. O que pode ser explicado pela exposição contínua das substâncias tóxicas, muitas delas carcinogênicas, presentes no tabaco provocando agressões, lesões e mutações nas células da cavidade bucal, principalmente em células apresentadoras de antígenos. Isto contribui para a imunossupressão da imunidade celular responsável pela defesa do organismo no desenvolvimento da neoplasia, fato que corrobora com achados de Shalpour e Karin (2015) e Costa et al. (2016).

Gomes et al. (2015), Souto et al. (2011) e Souto et al. (2014) demonstram o efeito de agentes exógenos, como a radiação ultravioleta e o hábito tabagista, na depleção das células dendríticas (DCs), na diminuição do infiltrado inflamatório e na modulação da resposta imune diferenciada em indivíduos com câncer de lábio, gengivite crônica e periodontite crônica, respectivamente. Como também analisado por Costa et al. (2013), em que foram encontradas uma predominância de macrófagos do fenótipo M2 no microambiente tumoral de indivíduos com CE da cavidade bucal, o que pode contribuir para a imunossupressão local, via produção de TGF- β , e consequente aumento do comprometimento linfonodal e menor tempo de sobrevida do paciente.

Abbas et al. (2013) abordam a imunidade adaptativa (linfócitos T CD8+ ou T citotóxicos) como o principal processo de defesa do organismo ao desenvolvimento do câncer. Todavia, esses autores notaram certa deficiência na imunidade celular em indivíduos com CE da cavidade bucal quanto a alterações na quimiotaxia dos monócitos e na interação entre os monócitos apresentadores de antígenos e os linfócitos, o que ocasiona o crescimento neoplásico. Srinivas et al. (2012) evidenciaram uma quimiotaxia neutrofílica lenta em indivíduos tabagistas quando comparados com não-tabagistas em pacientes com periodontite crônica.

Como observado em nosso estudo, 42% dos pacientes eram tabagistas e etilistas concomitantes, fato que pode intensificar a correlação encontrada entre o baixo grau de infiltrado linfocitário tumoral e o hábito tabagista. Visto que, a ingestão de bebida alcoólica, pode atuar como um imunossupressor na resposta inflamatória e um solvente responsável pela maior absorção dos carcinógenos encontrados no tabaco pela mucosa bucal, o que leva ao aumento do efeito destas substâncias no processo de tumorigênese. Fato evidenciado por Ferreira e Rocha (2010) e INCA (2014), em que exibem o álcool como um possível supressor imunológico, solvente e potencializador das substâncias cancerígenas presentes no cigarro. Segundo Perez-Ordoñez, Beauchemin e Jordan (2006), a maior ocorrência de CE da cavidade bucal têm sido associado com o tabagismo, logo, considerado um dos fatores principais de risco para sua ocorrência.

Ademais, nota-se elevada presença de altas concentrações de infiltrado linfocitário em tumores menores (T1/T2) e estadios iniciais (I/II). Fato que pode ser explicado devido a mutações geradas nas células da cavidade bucal que muitas vezes conseguem evadir aos mecanismos de reparo do DNA levando à proliferação dessas células alteradas, e assim o desenvolvimento da neoplasia. Com o início e progressão do câncer tem-se a resposta da imunidade celular, o que acarreta no aumento do infiltrado linfocitário, principalmente linfócitos T CD8+, na região de proliferação neoplásica, retardando o crescimento tumoral. Cho et al. (2011) observaram em seu trabalho a correlação entre o elevado grau de infiltrado inflamatório (linfócitos T CD8) com tumores menores e estadios iniciais, o que corrobora com o nosso estudo. Logo, o aumento do nível de infiltrado linfocitário em tumores menores e estadios iniciais podem estar relacionados ao aumento da

resposta imunológica primária e, com isso a diminuição da taxa de proliferação tumoral. Affonso et al. (2015) abordam em seu estudo a utilização da intensificação da atividade do infiltrado linfocitário tumoral como possível indicador de prognóstico, visto sua relação com o risco de metástases linfonodais, o grau de malignidade tumoral e estadiamento inicial.

Clark e Vignjevic (2015) demonstram que o estroma tumoral em conjunto com o infiltrado linfocitário, responsável pela liberação de substâncias no microambiente tumoral que funcionam como sinais extracelulares, desempenham importante função na regulação do padrão de invasão tumoral. Nota-se neste trabalho a correlação entre o padrão de invasão tumoral do tipo IV com o maior tamanho do tumor (T3/T4) e o estadio avançado (III/IV), características que podem estar associadas à agressividade tumoral.

Alaeddini e Etemad-Moghadam (2016) observaram o aumento da probabilidade de invasão tumoral em neoplasias de alto risco (T3/T4 e estadios avançados) quando comparados com aqueles de menor risco. Marsh et al. (2011), também, obtiveram associação entre a quantidade de óbitos com o estadio avançado e o padrão de invasão tumoral do tipo IV em CE da cavidade bucal. Suresh et al. (2015) analisaram em seu trabalho a utilização de possíveis fatores clínicos-patológicos e biomarcadores no papel de preditor de metástases cervicais em pacientes com CECP, como resultado, obtiveram significância entre o padrão de invasão do tipo IV com a maior probabilidade de metástase linfonodal. No entanto, em nosso estudo o padrão de invasão tumoral não apresentou correlação com nenhuma outra variável.

Outro parâmetro analisado, no estudo, que apresentou correlação foi à invasão perineural com o menor tamanho do tumor primário (T1/T2). A presença de invasão perineural em tumores T1 e T2 tem sido associada ao acometimento de linfonodos, menor sobrevida e pior prognóstico (LEIBIG et al., 2009), e pode ser visualizada na ausência de invasão linfática ou vascular. No entanto no presente estudo não houve correlação com o comprometimento dos linfonodos e outras variáveis, possivelmente devido a menor quantidade de casos com peças tumorais e com acometimento linfonodal.

Os mecanismos pelo qual ocorre a invasão perineural ainda não estão bem estabelecidos, porém teorias são propostas. Bindmadi e Basile (2011) propõem que o espaço perineural proporciona um microambiente favorável para o desenvolvimento de células advindas de malignidades que apresentam afinidade com o sistema nervoso. Provavelmente ocasionado por fatores celulares que atraem as células neoplásicas, e assim, estimulam sua progressão celular ao longo dos nervos, sendo considerada uma forma de metástase tumoral. Em CE da cavidade bucal a incidência de invasão perineural é elevada, sendo uma característica patológica significativa nas neoplasias de cabeça e pescoço (KURTZ et al., 2005).

Rahima et al. (2004), Leibig et al. (2009), Marchesi et al. (2010) e Tai et al. (2013) evidenciam a associação desse parâmetro com um pior prognóstico em diversas neoplasias malignas e um determinante para a agressividade relacionada ao aumento do espessamento tumoral. Tai et al. (2012) e Yeh et al. (2014) demonstraram que a invasão perineural impacta negativamente casos iniciais que apresentam o menor tamanho do tumor (T1) em CE da cavidade bucal, além de estar correlacionada a metástase do linfonodo regional, a recidiva do pescoço e a baixa sobrevivência no início do carcinoma. Com isso, os dados aqui apresentados deverão ser melhor investigados em estudos futuros para a melhor compreensão da progressão tumoral.

Em relação à modalidade terapêutica instituída, foi possível observar no estudo a correlação entre o tratamento radioquimioterápico realizado pelos pacientes com o estadiamento avançado da doença, fator prognóstico já bem estabelecido na literatura, levando ao maior número de óbitos devido à agressividade da doença (INCA, 2001; da SILVA et al., 2015; NANDAKUMAR, 2016).

Os resultados obtidos a partir da curva de sobrevida global mostram que a avaliação do maior tamanho do tumor e o acometimento linfonodal estão correlacionados a um pior prognóstico dos pacientes com CE da cavidade bucal. A análise multivariada confirma os achados, verificando-se o aumento do risco de óbito em até duas vezes para os fatores maior tamanho do tumor e linfonodos positivos, dados já bem fundados na literatura (INCA, 2001).

Na sobrevida livre de doença nota-se o risco aumentado de recidiva da doença em indivíduos que apresentam o hábito etilista. Califano et al. (2000) e Perez-Ordoñez et al. (2006) abordam que a exposição prolongada às substâncias tóxicas e carcinogênicas presentes no álcool e no tabaco levam à transformações celulares neoplásicas, o que corrobora com as modificações genéticas pré-malignas encontradas na mucosa adjacente ao carcinoma primário, podendo estar correlacionado a alta frequência de recidiva local observada no CE da cavidade bucal.

6 CONCLUSÃO

A expressão da ciclina D1 não mostrou ser um bom marcador de progressão tumoral e prognóstico, visto a falta de associação com as características clínico-patológicas e a análise de sobrevida. No entanto, são necessários mais estudos com maior número de pacientes com estadios iniciais para a melhor compreensão de seu papel na progressão tumoral em carcinoma epidermóide da cavidade bucal.

A partir da análise dos possíveis fatores de prognóstico, conclui-se que o baixo padrão de infiltração linfocitária tumoral (TIL) teve correlação com o hábito tabagista, e o alto TIL com o menor tamanho do tumor e o estadios inicial da doença. O padrão de invasão tumoral do tipo IV apresentou relação com o maior tamanho do tumor e o estadiamento avançado, e a presença de invasão perineural associação com o menor tamanho do tumor.

A menor sobrevida global mostrou relação com o maior tamanho do tumor e o acometimento linfonodal, enquanto, a sobrevida livre de doença exibiu associação com o hábito etilista, em que indivíduos etilistas recidivaram em um tempo menor. Correlações confirmadas pela análise multivariada.

7 REFERÊNCIAS

- ABBAS, A.K.; BENOIST, C.; BLUESTONE, J.A.; CAMPBELL, D.J.; GHOSH, S.; HORI, S. *et al.* Regulatory T cells: recommendations to simplify the nomenclature **Nat Immunol**, v. 14, p. 307–308, 2013.
- AFFONSO, V.R.; MONTOROA, J.R.M.C.; FREITAS, L.C.C.; SAGGIORO, F.P.; SOUZA, L.; MAMEDE, R.M. Peritumoral infiltrate in the prognosis of epidermoid carcinoma of the oral cavity. **Braz J Otorhinolaryngol**. v. 81, n. 4, p. 416-421, 2015.
- ALAEDDINI, M.; ETEMAD-MOGHADAM, S. Correlation between invasion mode and the histologic risk assessment model in oral squamous cell carcinoma. **Oral Maxillofac Surg**. v. 20, n. 4, p. 353-358, 2016.
- ALVARENGA, L. M.; RUIZ, M. T.; BERTELLI, E. C. P.; RUBACK, M. J. C.; MANIGLIA, J. V.; BERTOLLO, E. M. G. Avaliação epidemiológica de pacientes com câncer de cabeça e pescoço em um hospital universitário do noroeste do estado de São Paulo. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologista**, v. 74, n. 1, p. 68-73, 2008.
- ALTIERI, D. C. Validating survivin as a cancer therapeutic target. **Nature reviews. Cancer**, v. 3, n. 1, p. 46–54, 2003.
- ALTIERI, D. C. Survivin and Iap Proteins in Cell Death Mechanisms. **NIH Public Access**, v. 430, n. 2, p. 199–205, 2011.
- ALVES, V. T. E.; SILVA, H. A. B.; FERREIRA, M. S.; KAJIHARA, G.; FUKUSHIMA, H.; OLIVEIRA, F. S.; DOMANESCHI, C.; NUNES, F. D.; HOLZHAUSEN, M. Oral câncer related aspects of interest in periodontics. **Brazilian Journal Periodontology**, v. 23, n. 4, p. 31-37, 2013.
- ANDRADE, M. C.; FERREIRA, S. B. P.; GONÇALVES, L. C.; et al. Cell surface markers for T and B lymphocytes activation and adhesion as putative prognostic biomarkers for head and neck squamous cell carcinoma. **Human Immunology**, v. 74, p. 1563–1574, 2013.
- BARNES, L.; EVESON, J. W.; REICHART, P.; SIDRANSKY, D. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. **WHO Classification of Tumour**, n. 9, p. 163–175, 2005.
- BAUMAN, J. E.; MICHEL, L. S.; CHUNG, C. H. New promising molecular targets in head and neck squamous cell carcinoma. **Current Opinion Oncology**, v. 24, p. 235-242, 2012.
- BINMADI, N. O.; BASILE, J. R. Perineural invasion in oral squamous cell carcinoma: a discussion of significance and review of the literature. **Oral Oncol**. v. 47, n. 11, p. 1005-1010, 2011.
- BRANDWEIN-GENSLER, M.; TEIXEIRA, M. S.; LEWIS, C. M.; LEE, B.; ROLNITZKY, L.; HILLE, J. J.; GENDEN, E.; URKEN, M. L.; WANG, B. Y. Oral

squamous cell carcinoma: histologic risk assessment, but not margin status, is strongly predictive of local disease-free and overall survival. **Am J Surg Pathol.** v. 29, n. 2, p. 167-78, 2005.

BRENER, S.; JEUNON, F. A.; BARBOSA, A. A.; GRANDINETTI, H. A. M. Carcinoma de células escamosas bucal: uma revisão de literatura entre o perfil do paciente, estadiamento clínico e tratamento proposto. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 53, n. 1, p. 63-69, 2007.

BRYNE, M.; KOPPANG, H. S.; LILLENG, R.; KJAERHEIM, A. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. **The Journal of pathology**, v. 166, n. 4, p. 375–381, 1992.

CALIFANO, J, et al. Genetic progression and clonal relationship of recurrent premalignant head and neck lesions. **Clin Cancer Res** v. 6, n. 2, p. 347–352, 2000.

CASIMIRO, M.C.; DI SANTE, G.; CROSARIOL, M.; LORO, E.; DAMPIER, W.; ERTEL, A.; YU, Z.; SARIA, E.A.; PAPANIKOLAOU, A.; LI, Z.; WANG, C.; ADDYA, S.; LISANTI, M.P.; FORTINA, P.; CARDIFF, R.D.; TOZEREN, A.; KNUDSEN, E.S.; ARNOLD, A.; PESTELL, R.G. Kinase-independent role of cyclin D1 in chromosomal instability and mammary tumorigenesis, **Oncotarget** v. 6, p. 8525–8538, 2015.

CHO, Y.A.; YOON, H.J.; LEE, J.; HONG, S.P.; HONG, S.D. Relationship between the expressions of PD-L1 and tumor-infiltrating lymphocytes in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncology** v. 47, p. 1148–1153, 2011.

CHOI, Y. J.; SICINSKI, P. Unexpected outcomes of CDK4/6 inhibition. **Oncotarget.** v. 4, p. 176–177, 2013.

CHUANG, S. C.; JENAB, M.; HECK, J. E.; BOSETTI, C.; TALAMINI, R.; MATSUO, K.; et al. Diet and the risk of head and neck cancer: a pooled analysis in the INHANCE consortium. **Cancer Causes Control**, v. 23, n. 1, p. 69-88, 2012.

CLARK, A.G.; VIGNJEVIC, D.M. Modes of cancer cell invasion and the role of the microenvironment. **Curr Opin Cell Biol.** v. 36, p. 13-22, 2015.

COSTA, N.L.; VALADARES, M.C.; SOUZA, P.P.; MENDONÇA, E.F.; OLIVEIRA, J.C.; SILVA, T.A et al. Tumor-associated macrophages and the profile of inflammatory cytokines in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol.** v. 49, n. 3, p. 216-23, 2013.

COSTA, N.L.; Goncalves, A.S.; Martins, A.F.L; Arantes, D.A.C; Silva, T.A.; Batista, A.C. Characterization of dendritic cells in lip and oral cavity squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med.** v. 45, n. 6. p. 418-424, 2016.

DA SILVA, S. D.; MORAND, G. B.; ALOBAID, F. A.; HIER, M. P.; MLYNAREK, A. M.; ALAOUI-JAMALI, M. A.; KOWALSKI, L. P. Epithelial-mesenchymal transition (EMT) markers have prognostic impact in multiple primary oral squamous cell carcinoma. **Clin Exp Metastasis.** v. 32, n. 1, p. 55-63, 2015.

DORSEY, K.; AGULNIK, M. Promising New Molecular Targeted Therapies in Head and Neck Cancer. **Drugs**, v.73, p.315–325, 2013.

FARNEBO, L.; TIEFENBOCK, K.; ANSELL, A.; THUNELL, L.K.; GARVIN, S.; ROBERG, K. Strong expression of survivin is associated with positive response to radiotherapy and improved overall survival in head and neck squamous cell carcinoma patients. **International Journal Cancer**, v.133, p. 1994–2003, 2013.

FERLAY, J.; SOERJOMATARAM, I.; DIKSHIT, R.; ESER, S.; MATHERS, C.; REBELO, M.; PARKIN, D.M.; FORMAN, D.; BRAY, F. Cancer incidence and mortality worldwide: sources, methods and major patterns in GLOBOCAN 2012. **Int J Cancer**.v. 136, n. 5, p.359-386, 2015.

FERNANDES, G. M.; BERGMANN, A.; OLIVEIRA, J. F. Análise epidemiológica de população com câncer de cabeça e pescoço: influência sobre as complicações pós operatórias. **Revista Brasileira de Cirurgia de Cabeça e Pescoço**, v. 42, n. 3, p. 140-149, 2013.

FERREIRA, C. DA S.; MAGANHIN, C. C.; SIMÕES, R. DOS S.; et al. Melatonin: cell death modulator. **Revista da Associação Médica Brasileira**, v. 56, n. 6, p. 715–718, 2010.

FERREIRA, C. G.; ROCHA, J. C. Oncologia Molecular. São Paulo: **Atheneu**, 2010.

GALBIATTI, A. L. S. et al. Head and neck cancer: Causes, prevention and treatment. **Brazilian Journal of Otorhinolaryngology**, v. 79, n. 2, p. 239–247, 2013.

GILLISON, M.; BROUTIAN, T.; PICKARD, R.; TONG, Z.; XIAO, W.; KAHLE, L. Prevalence of oral HPV infection in the United States, 2009–2010. **JAMA**, v.307, p.693–703, 2012.

HANKEN, H.; GRÖBE, A.; CACHOVAN, G.; SMEETS, R.; SIMON, R.; SAUTER, G.; HEILAND, M.; BLESSMANN, M. CCND1 amplification and cyclin D1 immunohistochemical expression in head and neck squamous cell carcinomas. **Clin Oral Investig**. v. 18, n. 1, p. 269-76, 2014.

HAN, S.; CHEN, Y.; GE, X.; et al. Epidemiology and cost analysis for patients with oral cancer in a university hospital in China. **BMC public health**, v. 10, p. 196, 2010.

HENNESSEY, P. T.; WESTRA, W. H.; CALIFANO, J. A. Human papillomavirus and head and neck squamous cell carcinoma: recent evidence and clinical implications. **Journal of dental research**, v. 88, p. 300–306, 2009.

HIRSCHOWITZ, L.; GANESAN, R.; NAVEENA, S.; MCCLUGGAGE, W. G. Standards and datasets for reporting cancers Dataset for histological reporting of vulval neoplasms (3rd edition). **The Royal College of Pathologists**, v. G071, n. April 2011, p. 1–26, 2010.

HO, Y.; TSAO, S.W.; ZEN, G.M.; LUI, V.W.Y. STAT3 as a therapeutic target for Epstein-Barr virus (EBV) – associated nasopharyngeal carcinoma. **Cancer Lett**, v.330, p.141–9, 2013.

HSU, H.W.; WALL, N.R.; HSUEH, C.T.; KING, S.; FERRIS, R.L.; CHEN, C.S.; MIRSHAHIDI, S. Combination antiangiogenic therapy and radiation in head and neck cancers. **Oral Oncology**, v.50, p.19-26, 2014.

HUTAJULU, S.; KURNIANDA, J.; TAN, I. B.; MIDDELDORP, J. M. Therapeutic implications of Epstein – Barr virus infection for the treatment of nasopharyngeal carcinoma. **Therapeutics and Clinical Risk Management**, v. 10, p. 721–736, 2014.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (Brasil). Carcinoma Epidermóide da Cabeça e do Pescoço. **Revista Brasileira de Cancerologia**; 47 (4): 361-76, 2001.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (Brasil). A situação do câncer no Brasil. Rio de Janeiro, **Inca**. p.48–50, 2006.

Instituto Nacional de Câncer (Brasil). Fisiopatologia do câncer. In INCA (Org.) **Ações de enfermagem para o controle do câncer: uma proposta de integração ensino-serviço**. Rio de Janeiro: 3 Ed. Rev. Atual. Ampl.,p. 49-77, 2008.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (Brasil). Estimativa 2014: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: **INCA**, 2014.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA (Brasil). Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: **INCA**, 2015.

IRIMIE, A. I.; BRAICU, C.; COJOCNEANU-PETRIC, R.; BERINDAN-NEAGOE, I.; CAMPIAN, R. S. Novel technologies for oral squamous carcinoma biomarkers in diagnostics and prognostics. **Acta Odontol Scand**. v. 73, n. 3, p. 161-168, 2015.

JAISWAL, P. K.; GOEL, A.; MITTAL, R. D. Survivin: A molecular biomarker in cancer. **Indian Journal of Medical Research**, v. 141, n. April, p. 389–397, 2015.

JIN KWON, O.; JE PARK, J.; HYUCK KO, G.; et al. Prognostic evaluation of percentage variation of metabolic tumor burden calculated by dual-phase 18FDG PET-CT imaging in patients with head and neck cancer. **Head & neck**, v. 55, n. 7, p. 691–696, 2014.

JIRAWATNOTAI, S.; SITTITHUMCHAREE, G. Paradoxical roles of cyclin D1 in DNA stability. **DNA Repair** v. 42, p. 56–62, 2016.

KARASIK, D.; NEWMAN, A. Models to Explore Genetics of Human Aging. In: P. Gil Atzmon (Ed.); **Longevity Genes**. p.141–161, 2015, Springer New York.

KNUDSEN, K.E.; DIEHL, J.A.; HAIMAN, C.A.; KNUDSEN, E.S. Cyclin D1: polymorphism, aberrant splicing and cancer risk, **Oncogene** v. 25, p. 1620–1628, 2006.

KUNDU, S.K.; NESTOR, M. Targeted therapy in head and neck cancer. **Tumor Biology**, v.33, p.707-721, 2012.

KURTZ, K. A.; HOFFMAN, H. T.; ZIMMERMAN, M. B, et al. Perineural and vascular invasion in oral cavity squamous carcinoma: increased incidence on re-review of slides and by using immunohistochemical enhancement. **Arch Pathol Lab Med**. v.129, p. 354-359, 2005.

LEMONS JUNIOR, C. A; ALVES, F. A; TORRES-PEREIRA, C. C; BIAZEVIC, M. G. H; PINTO JÚNIOR, D. S; NUNES, F. D. Oral cancer based on scientific evidences.

Revista da Associação Paulista de Cirurgiões Dentistas, v. 67, n. 3, p.178-86, 2013.

LEEMANS, C.R.; BRAAKHUIS, B.J.M.; BRAKENHOFF, R.H. The molecular biology of head and neck cancer. **Nat Rev Cancer**. v. 11, n. 1, p. 9-22, 2011.

LIEBIG, C.; AYALA, G.; WILKS, J. A.; BERGER DH, ALBO D. Perineural invasion in cancer: a review of the literature. **Cancer** v. 115, n. 15, p. 3379–91, 2009.

LIEBIG, C.; AYALA, G.; WILKS, J.; VERSTOVSEK, G.; LIU, H.; AGARWAL, N, et al. Perineural invasion is an independent predictor of outcome in colorectal cancer. **J Clin Oncol** v. 27, n. 31, p. 5131–5137, 2009.

MARCHESI, F.; PIEMONTI, L.; MANTOVANI, A.; ALLAVENA, P. Molecular mechanisms of perineural invasion, a forgotten pathway of dissemination and metastasis. **Cytokine Growth Factor Rev**. v. 21, n. 1, p. 77–82, 2010.

MARSH, D.; SUCHAK, K.; MOUTASIM, K. A.; et al. Stromal features are predictive of disease mortality in oral cancer patients. **Journal of Pathology**, v. 223, n. 4, p. 470–481, 2011.

MINETAA, H.; MIURAB, K.; TAKEBAYASHIA, S.; UEDAA, Y.; MISAWAA, K.; HARADAB, H.; WENNERBERGC, J.; DICTORD, M. Cyclin D1 overexpression correlates with poor prognosis in patients with tongue squamous cell carcinoma. **Oral Oncology** v. 36, p. 194-198, 2000.

MONTERO, P. H.; PATEL, S. G. Cancer of the Oral Cavity. **Surg Oncol Clin N Am**, v. 24, n. 3, p. 491–508, 2015.

MONSJOU, H.S.; WREESMANN, V.B.; BREKEL, M.W.M.D.; BALM, A.J.M. Head and neck squamous cell carcinoma in young patients. **Oral Oncology**, v.49, p.1097-1102, 2013.

NANDAKUMAR, A. Survival in Head and Neck Cancers - Results of A Multinstitution Study. **Asian Pac J Cancer Prev** v. 17, n. 4, p. 1745-1754, 2016.

NASSER, W.; FLECHTENMACHER, C.; HOLZINGER, D.; HOFELE, C.; BOSCH, F.X. Aberrant expression of p53, p16INK4a and Ki-67 as basic biomarker for malignant progression of oral leukoplakias. **J Oral Pathol Med**, v. 40, p. 629-635, 2011.

NOGUTI, J.; MOURA, C. F. G. DE; JESUS, G. P. P. DE; et al. Metastasis from oral cancer: an overview. **Cancer genomics & proteomics**, v. 9, n. 5, p. 329–35, 2012.

NOORLAG, R.; BOEVE, K.; WITJES, M. J. H.; KOOLE, R.; PEETERS, T. L. M.; SCHUURING, E.; WILLEMS, S. M.; ES, R. J. J. Amplification and protein overexpression of cyclin D1: Predictor of occult nodal metastasis in early oral cancer. **Head & Neck** v. 39, n. 2, p. 326-333, 2016.

PATEL, S. G.; SHAH, J. P. TNM staging of cancers of the head and neck: striving for an uniformity among diversity. **Cancer Journal for Clinicians**, v. 55, p. 242-258, 2005.

- PEREZ-ORDONEZ, B.; BEAUCHEMIN, M.; JORDAN, R.C. Molecular biology of squamous cell carcinoma of the head and neck. **J Clin Pathol** v. 59, n. 5, p. 445–453, 2006.
- PESTELL, R.G. New roles of cyclin D1, **Am. J. Pathol.** v. 183, p. 3–9, 2013.
- PICKHARD, A.; GRÖBER, S.; HAUG, A. K.; et al. Survivin and pAkt as potential prognostic markers in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 117, n. 6, p. 733–742, 2014.
- QIE, S.; DIEHL, A. Cyclin D1, cancer progression, and opportunities in cancer treatment. **J Mol Med.** v. 94, n. 12, p.1313-1326, 2016.
- RAHIMA, B.; SHINGAKI, S.; NAGATA, M.; SAITO, C. Prognostic significance of perineural invasion in oral and oropharyngeal carcinoma. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.** v. 97,n. 4, p. 423–31, 2004.
- RAMAKRISHNA, A.; SHREEDHAR, B.; NARAYAN, T.V.; MOHANTY, L.; SHENOY, S.; JAMADAR, S. Cyclin D1 an early biomarker in oral carcinogenesis. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology.** v. 17, n. 3, p. 351-357, 2013.
- RAMOS-GARCÍA, P.; GIL-MONTOYA, J.A.; SCULLY, C.; AYÉN, Á.; GONZÁLEZ-RUIZ, L.; NAVARRO-TRIVIÑO, F.; GONZÁLEZ-MOLES, M.Á. An update on the implications of Cyclin D1 in oral carcinogenesis. **Oral Dis.** v. 23, n. 1, 2016.
- RODRIGUES, P. C.; MIGUEL, M. C. C.; BAGORDAKIS, E.; et al. Clinicopathological prognostic factors of oral tongue squamous cell carcinoma: A retrospective study of 202 cases. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 43, n. 7, p. 795–801, 2014.
- SHALAPOUR, S.; KARIN, M. Immunity, inflammation, and cancer: an eternal fight between good and evil. **J Clin Invest.** v. 125, n. 9, p. 3347-3355, 2015.
- SHEN, Y.; ZHANG, S.; SUN, R.; WU, T.; QIAN, J. Understanding the interplay between host immunity and Epstein-Barr virus in NPC patients. **Emerging Microbes & Infections**, v. 4, n. 3, p. e20, 2015.
- SINGH, S.; PILLAI, S.; CHELLAPPAN, S. Nicotinic acetylcholine receptor signaling in tumor growth and metastasis. **Journal Oncology**, v.30, 2011.
- SOUTO, G.R.; SEGUNDO, T.K.; COSTA, F.O.; AGUIAR, M.C.; MESQUITA, R.A. Effect of smoking on Langerhans and dendritic cells in patients with chronic gingivitis. **J Periodontol.** v. 82, n. 4, p. 619-625, 2011.
- SOUTO, G.R.; QUEIROZ-JUNIOR, C.M.; COSTA, F.O.; MESQUITA, R.A. Effect of smoking on immunity in human chronic periodontitis. **Immunobiology.** v. 219, p. 909-915, 2014.
- SRINIVAS, M.; CHETHANA, K.C.; PADMA, R.; SURAGIMATH, G.; ANIL, M.; JAGADISH PAI, B.S.; WALVEKAR, A. A study to assess and compare the peripheral blood neutrophil chemotaxis in smokers and non smokers with healthy periodontium, gingivitis, and chronic periodontitis. **J Indian Soc Periodontol.** v. 16, n. 1, p. 54–58, 2012.

SUCCI, M.; CASTRO, T. B. DE; GALBIATTI, A. L. S.; et al. DNMT3B C46359T and SHMT1 C1420T polymorphisms in the folate pathway in carcinogenesis of head and neck. **Molecular Biology Reports**, p. 581–589, 2014.

SUMARA, I.; GIMÉNEZ-ABIÁN, J.F.; GERLICH, D.; HIROTA, T.; KRAFT, C.; DE LA TORRE, C. et al. Roles of Polo-like Kinase 1 in the Assembly of Functional Mitotic Spindles. **Curr Biol** v. 14, p. 1712-22, 2004.

SURESH, T.N.; HEMALATHA, A.; HARENDRA KUMAR, M.L.; AZEEM MOHIYUDDIN, S.M. Evaluation of histomorphological and immunohistochemical parameters as biomarkers of cervical lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of oral cavity: A retrospective study. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**. v. 19, n. 1, p. 18-24, 2015.

TAI, S. K.; LI, W. Y.; CHU, P. Y.; CHANG, S. Y.; TSAI, T. L.; WANG, Y. F, et al. Risks and clinical implications of perineural invasion in T1-2 oral tongue squamous cell carcinoma. **Head Neck**. v. 34, n. 7, p. 994–1001, 2012.

TAI, S. K.; LI, W. Y.; YANG, M. H.; CHU, P. Y.; WANG, Y. F.; CHANG, P. M. Perineural invasion as a major determinant for the aggressiveness associated with increased tumor thickness in T1-2 oral tongue and buccal squamous cell carcinoma. **Ann Surg Oncol** v. 20, n. 11, p. 3568–3574, 2013.

TURATTI, E.; NEVES, A. C.; MAGALHÃES, M. H. C. G.; SOUZA, S. O. M. Assessment of c-Jun, c-Fos and cyclin D1 premalignant and malignant oral lesions. **Journal of Oral Science** v. 47, n. 2, p. 71-76, 2005.


UICC. **TNM: Classification of Malignant**. 7th ed. USA: Wiley-Blackwell, 2009.

YEH, C. F.; LI, W. Y.; YANG, M. H.; CHU, P.; LU, Y. T.; WANG, Y. F, et al. Neck observation is appropriate in T1-2, cN0 oral squamous cell carcinoma without perineural invasion or lymphovascular invasion. **Oral Oncol**. v. 50, n. 9, p. 857–62, 2014.

ZHU, S.; MOTT, R.T.; FRY, E.A.; TANEJA, P.; KULIK, G.; SUI, G.; INOUE, K. Cooperation between Dmp1 loss and cyclin D1 overexpression in breast cancer. **Am. J. Pathol**. v. 183, p. 1339–1350, 2013.

ANEXOS

8.1 Anexo 1



Comitê de Ética em Pesquisa – CIAS
CENTRO INTEGRADO DE ATENÇÃO A SAÚDE
Unimed Vitória

Vitória, 27 de junho de 2011.
Projeto No: **318/2011**
Parecer: 21/2011 Inicial Conclusão

Título: Estudo de Câncer de Cabeça e Pescoço no Brasil
Instituição: Hospital Santa Rita de Cássia
Pesquisador: José Roberto V de Podestá
Grupo e Área Temática Especial: IA

Prezado Pesquisador

Após o recebimento e apreciação do projeto e das respostas as pendências formuladas, seguem as observações deste Comitê:

1. Adequar os objetivos de acordo com hipóteses formuladas em linha com a justificativa do projeto.
Parecer do CEP: pendência atendida
2. Incluir, na metodologia os critérios de seleção (inclusão e exclusão) amostral assim como características outras que sejam pertinentes. Explicitar, ainda na metodologia, o estudo piloto, e sua metodologia.
Parecer do CEP: Pendência atendida. O estudo piloto não foi contemplado na metodologia, mas é citado na página 17.
3. Justificar ausência do cálculo amostral
Parecer do CEP: Pendência atendida. É citado na página 10 (metodologia) que a amostra será de conveniência.
4. Adequar o TCLE à CNS 347/05 de Janeiro 2005 e incluir campos para identificação de quem aplicou o TCLE. É direito inalienável do sujeito de pesquisa saber ou não querer saber sobre seus resultados de exames realizados em sua propriedade biológica, tenha ou não aplicabilidade clínica. Pede-se, portanto, para rever a informação sobre o tema no TCLE.
Parecer do CEP: pendência atendida. TCLE devidamente adequado e, sobe nossa avaliação, dentro dos critérios éticos e alinhados com a resolução 196/1996 e suas complementares.

Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos – CIAS Unimed Vitória
Av. Leão da Silva, 2311, Bairro Itararé Vitória (ES) CEP: 29047-575 – 27 3335-5348 cep@unimedvx.com.br

Página 1 de 2



Comitê de Ética em Pesquisa – CIAS
CENTRO INTEGRADO DE ATENÇÃO A SAÚDE
Unimed Vitória

5. Corrigir o cronograma

Parecer do CEP: pendência atendida. Cronograma corrigido.

6. Incluir Declarações de Infraestrutura de todas as instituições hospitalares participantes, inclusive a do Hospital que assina a Folha de Rosto.

Parecer do CEP: pendência atendida. Declarações entregues.

7. Informar no dossiê se as amostras biológicas permanecerão identificadas e no país ou se serão exportadas e/ou desvinculadas dos respectivos sujeitos.

Parecer do CEP: pendência atendida

CONCLUSÃO

Comunicamos que o Projeto de Pesquisa acima citado, foi considerado:

APROVADO

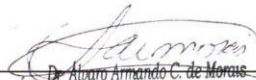
É parecer desse comitê que o referido projeto e demais documentos apresentados, **atende** aos aspectos da Resolução **CNS 196/96** e complementares, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos. Estamos aguardando o parecer final da CONEP.

Foram aprovados os seguintes documentos:

- Projeto de pesquisa versão de 1º de abril de 2011;
- Declaração de infraestrutura versão 27 de abril de 2011;
- Respostas as pendências versão 27 de abril de 2011;

O primeiro relatório de andamento do projeto deverá ser encaminhado a este CEP até o dia 27 de dezembro de 2011.

Atenciosamente,


Dr. Alvaro Assaó de Moraes
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos do CIAS





**CONSELHO NACIONAL DE SAÚDE
COMISSÃO NACIONAL DE ÉTICA EM PESQUISA**

PARECER N.º 681/2011

Registro CONEP 16525 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

CAAE – Não há CAAE ou nº de Folha de Rosto Processo nº 25000.098091/2011-05
Projeto de Pesquisa: "Estudo de Câncer de cabeça e pescoço no Brasil". Termo de
Consentimento Livre e Esclarecido de 10/04/2011.
Pesquisador Responsável: José Carlos de Oliveira
Instituição: ACCG/Instituto Ensino e Pesquisa/Hospital Araújo Jorge (1º CENTRO
BRASILEIRO)
CEP de origem: CEP - ACCG - Instituto de Ensino e Pesquisa/GO
Área Temática Especial: Genética humana
Patrocinador: Não informado.

Sumário geral do protocolo

O câncer de cabeça e pescoço compreende um grupo de neoplasias que surgem na cavidade oral, faringé e laringe. É o sexto tipo de câncer mais comum em todo o mundo, representando cerca de 6% dos casos de câncer. Em todo o mundo, mais de 500.000 novos casos e 300.000 óbitos por câncer de cabeça e pescoço são estimados para ocorrer a cada ano. Este meio milhão de casos inclui 262.700 cânceres da cavidade oral, 117.200 cânceres de faringe e 169.600 cânceres da laringe. As taxas de incidência padronizadas são 15,3 e 4,5 por 100.000 homens e mulheres, respectivamente. As taxas de incidência no Brasil são cerca de 22,1/100.000 e 3,3/100.000 para homens e mulheres, respectivamente.

O tratamento primário varia de acordo com a localização anatômica e estágio da doença. Para a maioria dos tipos de câncer diagnosticados em estádios iniciais, a ressecção cirúrgica é a principal modalidade de tratamento. No entanto, para certos sítios anatômicos, como as amígdalas, a base da língua e o assoalho da boca, bem como para todos os cânceres localmente avançados, radioterapia é usada, isolada ou combinada com cirurgia. A quimioterapia pode ser utilizada em associação com a radioterapia. No entanto, no Brasil, a taxa de sobrevida em 5 anos ainda é inferior a 50%.

Publicações recentes sugerem um papel para infecção por HPV na sobrevida dos pacientes com câncer de cabeça e pescoço (ver abaixo seção sobre HPV). Os Polimorfismos genéticos nos genes de reparo do DNA, os genes do ciclo celular, o metabolismo carcinogênico, e vias de genes do fator de crescimento foram analisados em relação à progressão e sobrevida de pacientes com câncer de vias aerodigestivas superiores (VADS). Polimorfismos nos genes XRCC1, FGFR e CCND1 foram associados com a sobrevida em pacientes com cânceres das VADS em pelo menos 2 estudos. No entanto, Hopkins *et al* criticou que esses estudos eram pequenos (<300 casos), muitas vezes tinham descrições inadequadas da população em estudo, não consideraram as comparações múltiplas de forma apropriada e podiam estar sujeitos a viés de publicação. Assim, não existem no momento estudos de seguimento de pacientes com câncer de cabeça e pescoço, que permitam a avaliação simultânea do papel do fumo, álcool, HPV, genética e tratamento

Situação: Protocolo aprovado com recomendação.

OBS: No Brasil, além do centro em tela, está prevista a participação dos seguintes centros: Hospital do Câncer de Barretos/SP (Dr. André Lopes Carvalho/CEP do Hospital Câncer Barretos); Hospital Erasto Gaertner/PR (Dr. Gyl Henrique Albrecht Ramos e Dra. Paola Pedruzzi/CEP do Hospital Erasto Gaertner); Hospital A C Camargo/SP (Dr. Luiz Paulo Kowalski e Dr. Mauro Kazuo Ikeda/CEP do Hospital do Câncer - A C Camargo/SP); Associação de Combate ao Câncer em Goiás/Hospital Araújo Jorge/GO (Dr. José Carlos de Oliveira e Drª. Maria Paula Curado/Comitê de Ética do Hospital Araújo); Departamento de Otorrinolaringologia UFGO Goiânia/GO (Dr. Claudinei Cândido Costa/CEP do HC da UFG); Faculdade de Medicina do ABC/SP (Dra. Jossi Ledo Kanda/CEP NÃO INFORMADO); Liga Norte-Rio-Grandense Contra o Câncer/RN (Dr. Ricardo José Curioso da Silva e Dr. Luis Eduardo Barbalho de Melo /CEP da Liga Norte-Rio-Grandense Contra o Câncer); Instituto do Câncer do Ceará/CE (Dr. Eric Fernandes de Souza/CEP NÃO INFORMADO); FCECON - Fundação Centro Controle de Oncologia/AM (Dr. Marco Antonio Cruz Rocha e Dr. Jefferson Moreira de Medeiros/CEP NÃO INFORMADO); Hospital Heliópolis/SP (Dr. Carlos Neutzling Lehn/CEP NÃO INFORMADO); Hospital Santa Rita/AFECC - Associação Feminina de Educação e Combate ao Câncer/ES (Dr. Jose Roberto Vasconcelos de Podesta/Comitê de Ética em Pesquisa - CIAO); Pontifícia Universidade Católica de Campinas/SP (Dr. José Francisco de Sales Chagas e Dr. Maria Beatriz Nogueira Pascoal/CEP da PUC Campinas); Hospital Universitário/UnB (Dr. Luiz Augusto Nascimento e Dr. Juliano de Padua Nakashima/Comitê de ética em Pesquisa - Fundação de Ensino e Pesquisa em Ciências da Saúde); Instituto Nacional do Câncer - INCA/RJ (Dr. Fernando Luiz Dias, Dr. Roberto Araujo Lima e Dra. Isabella Costa Santos/Comitê de Ética e Pesquisa do INCA); Instituto Brasileiro de Controle do Câncer/SP (Dra. Adriana Sonderman, Dr. André Bandiera de Oliveira Santos e Dr. Fabio Roberto Pinto/CEP do ICC - Instituto Brasileiro de Controle do Câncer); Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP/SP (Dr. Lenine Garcia Brandão/CEP NÃO INFORMADO); Hospital Amarel Carvalho FUNDAÇÃO AMARAL CARVALHO/SP (José Getúlio Segalla/Comitê de Ética em Pesquisa Fundação Hospital Amarel Carvalho) e Departamento de Otorrinolaringologia e Cirurgia de Cabeça e Pescoço Universidade Federal de São Paulo/UNIFESP/SP (Prof. Dr. Marcos B. Paiva/Comitê de Ética em Pesquisa).

Caso ocorra modificação nessa informação, o CEP do 1º Centro deve ser informado para comunicação à CONEP. O CEP deve enviar cópia dessa comunicação para o pesquisador responsável do seu Centro. Ressalta-se que os centros que não possuem Comitês de Ética em Pesquisa - CEP, devem solicitar a CONEP a indicação de um CEP para a análise do projeto.

NOTA: Caso na execução do protocolo, em um determinado Centro, haja parceria de instituições no recrutamento e/ou atendimento de sujeitos de pesquisa, solicita-se ao CEP correspondente que observe cuidadosamente os seguintes aspectos, conforme exigências éticas explicitadas nos itens III.3.i, V.6, VI.2.h, VI.2.i, VI.3.d e VI.3.g da Resolução CNS 195/96 e Item IV.1.m da Resolução CNS nº 261/97, com vistas à garantia da assistência ao sujeito da pesquisa, sem prejuízo ao Sistema Único de Saúde:

1) formas de recrutamento e referência de sujeitos de pesquisa; se serão pacientes do SUS e ou particulares; em que instituição estão registrados, ou seja, qual instituição assume as responsabilidades inerentes à Instituição de Pesquisa;

2) descrição da infra-estrutura disponível para a realização da pesquisa;

3) vínculos do pesquisador;

4) anuência assinada pela diretoria técnica de instituições parceiras, para assistência dos sujeitos de pesquisa, quando for o caso, com apresentação de convênios ou outras relações envolvendo pessoas jurídicas;

Ressalta-se que, havendo envolvimento do SUS em parcerias com instituições privadas, a avaliação desse aspecto extrapola as atribuições do Sistema CEPs-CONEP, devendo o pesquisador e o responsável pela instituição buscar a manifestação do Poder Público Correlato (estadual ou municipal), por meio da respectiva Assessoria Jurídica, em cumprimento à Lei Orgânica da Saúde 8080/91.

Brasília, 25 de outubro de 2011.

8.2 Anexo 2



National Research Ethics Service

Coventry Research Ethics Committee

2nd floor West Wing
University Hospital
Clifford Bridge Road
Coventry
CV2 2DX

24 February 2010

Telephone: 024 7896 7529
Facsimile: 024 7896 5033

Professor Hisham Mehanna
Institute of Head & Neck Studies & Education
University Hospital
3rd floor opposite Ward 32
Clifford Bridge Road
Coventry CV2 2DX

Dear Professor Mehanna

Study Title: Improving treatment selection using Predictive Classifiers of Treatment Response for Head and Neck Cancers and dysplasia.
REC reference number: 10/H1210/9
Protocol number: Version 1.0

The Research Ethics Committee reviewed the above application at the meeting held on 16 February 2010. Thank you for attending to discuss the study.

Ethical opinion

You advised the Committee you were aiming to develop treatment response classification to help predict response to treatment for two types of patients; first patients who have laryngeal voice box or mouth and throat cancer; second patients with laryngeal and mouth dysplasia. Through using the formula you would be able to predict whether a patient with cancer with these characteristics would be best receiving surgery rather than chemotherapy similarly whether patients with oral dysplasia would better respond to surgery rather than a 'wait and see' approach thus individualising treatment for those patients. By linking a series of chemotherapy and genetic tests on the samples and responses to treatment in relevant cohort of patients you have target diseases or cancers by correlating biomarkers. This was a well known protocol for developing biomarkers and classifications in UK, i.e. biomarker road map.

According to the pilot study out of 100 patients 80 could not now be traced so the Committee wanted to know how you would know how the patients had progressed if you could not contact 80%. You explained that patients had been treated and biopsied in the local hospital then followed up, some died some didn't and you would follow up the local ones. You would ask the local team for patients' tissue and pseudo anonymised outcome data; i.e. link anonymised you had no way of tracking the code.

The local centres were responsible for consenting patients via the operating consent form so the Committee wondered if there was a possibility of tissue from someone who did not consent being included in the study. You stated that where there was agreement they would be included but before September 2006 patients' samples could be used without their express consent provided they were anonymised. Under

This Research Ethics Committee is an advisory committee to West Midlands Strategic Health Authority.

The National Research Ethics Service (NRES) represents the NRES Directorate within the National Patient Safety Agency and Research Ethics Committees in England

Statement of compliance

The Committee is constituted in accordance with the Governance Arrangements for Research Ethics Committees (July 2001) and complies fully with the Standard Operating Procedures for Research Ethics Committees in the UK.

After ethical review

Now that you have completed the application process please visit the National Research Ethics Service website > After Review

You are invited to give your view of the service that you have received from the National Research Ethics Service and the application procedure. If you wish to make your views known please use the feedback form available on the website.

The attached document "After ethical review – guidance for researchers" gives detailed guidance on reporting requirements for studies with a favourable opinion, including:

- Notifying substantial amendments
- Adding new sites and investigators
- Progress and safety reports
- Notifying the end of the study

The NRES website also provides guidance on these topics, which is updated in the light of changes in reporting requirements or procedures.

We would also like to inform you that we consult regularly with stakeholders to improve our service. If you would like to join our Reference Group please email referencegroup@nres.npsa.nhs.uk.

10/H1210/9

Please quote this number on all correspondence

With the Committee's best wishes for the success of this project

Yours sincerely



Mr Stephen Keay
Chairman

Email: pauline.pittaway@uhcw.nhs.uk

Enclosures: List of names and professions of members who were present at the meeting and those who submitted written comments

**After ethical review – guidance for researchers SL-AR2*

Copy to: Mrs Ceri Jones, R&D, UHC&W NHS Trust