

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

CAMILA WEISSHEIMER

CORRELAÇÃO DA IMUNOMARCAÇÃO DE TGF- β 1 COM PROLIFERAÇÃO
CELULAR EM CARCINOMAS ESPINOCELULARES DE BOCA COM DIFERENTES
PROGNÓSTICOS

Porto Alegre

2015

CAMILA WEISSHEIMER

CORRELAÇÃO DA IMUNOMARCAÇÃO DE TGF- β 1 COM PROLIFERAÇÃO
CELULAR EM CARCINOMAS ESPINOCELULARES DE BOCA COM DIFERENTES
PROGNÓSTICOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao
Curso de Graduação em Odontologia da
Universidade Federal do Rio Grande do Sul,
como requisito parcial para obtenção do título de
cirurgião dentista.

Orientador: Prof. Dr. Manoel Sant'Ana Filho

Porto Alegre

2015

CIP - Catalogação na Publicação

Weissheimer, Camila

CORRELAÇÃO DA IMUNOMARCAÇÃO DE TGF BETA-1 COM
PROLIFERAÇÃO CELULAR EM CARCINOMAS ESPINOCELULARES
DE BOCA COM DIFERENTES PROGNÓSTICOS / Camila
Weissheimer. -- 2015.

39 f.

Orientador: Manoel Sant'Ana Filho.

Trabalho de conclusão de curso (Graduação) --
Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Faculdade
de Odontologia, Curso de Odontologia, Porto Alegre,
BR-RS, 2015.

1. Câncer bucal. 2. Carcinoma espinocelular. 3.
Prognóstico. 4. TGF beta-1. I. Sant'Ana Filho,
Manoel, orient. II. Título.

AGRADECIMENTOS

Gostaria de agradecer à minha família, principalmente a meus pais e meu irmão, que, apesar da distância, deram-me todo apoio e força nesses cinco anos de graduação, durante todas as dificuldades e desafios que enfrentei e decisões que tomei, incentivando-me a buscar meus objetivos profissionais.

Agradeço também ao meu namorado Rodrigo, por estar ao meu lado em todos os momentos, me apoiando e me incentivando.

Gostaria de agradecer muito à minha orientadora Manoela Domingues Martins, que, mesmo estando longe nesse último ano, continuou me dando toda ajuda, atenção e carinho que teve por mim durante os três anos que fiz Monitoria e Iniciação Científica em Patologia Bucal sob sua orientação. Também agradeço ao Professor Manoel Sant'Ana Filho que, durante a ausência da professora Manoela, aceitou me orientar na finalização desse trabalho.

Um agradecimento especial também à mestrande Liana Preto Webber que me ajudou e esteve ao meu lado durante todas as etapas de produção desse trabalho, me coorientando sempre com muita dedicação, eficiência e companheirismo.

RESUMO

WEISSHEIMER, Camila. **Correlação da imunomarcção de TGF- β 1 com proliferao celular em carcinomas espinocelulares de boca com diferentes prognsticos**. 2015. 39 f. Trabalho de Concluso de Curso (Graduao) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

O carcinoma espinocelular (CEC) representa cerca de 95% dos casos de cncer de boca e, mesmo com os avanos nos ltimos anos, ainda apresenta altas taxas de mortalidade. Muitos fatores de crescimento j foram relacionados com o aumento da capacidade de invaso e progresso em diversos stios tumorais, dentre eles, o Fator Transformador de Crescimento Beta-1 (TGF- β 1). TGF- β 1 \acute{e} uma citocina que desempenha um duplo papel na carcinogese. Parece atuar como inibidor da proliferao celular nas fases iniciais, mas, em estgios mais avanados, pode contribuir para o crescimento tumoral e invaso dos tecidos. O objetivo do presente estudo foi analisar a imunomarcção do TGF- β 1 como marcador prognstico de CEC de boca, alm de correlacion-la com aspectos clnicos, demogrficos e com o perfil proliferativo do tumor, determinado pela expresso de KI-67. Foram selecionados os pronturios mdicos de 74 pacientes com diagnstico histopatolgico de CEC diagnosticados no Servio de Patologia do Hospital de Clnicas de Porto Alegre (HCPA), atendidos no perodo de janeiro 2001 a dezembro de 2009. Os pronturios foram avaliados manualmente e foram coletadas informaes quanto aos dados demogrficos, fatores de risco, caractersticas clnicas do tumor, tratamento e sobrevida. Os casos foram separados em 34 pacientes com prognstico favorvel (sobrevida maior que 5 anos) e 40 pacientes com prognstico desfavorvel (sobrevida menor que 5 anos). Alm disso, foram includos 9 casos de mucosa bucal com aspecto de normalidade, provenientes de casos de mucocele, para fins de comparao. Foram realizadas a graduao histolgica dos tumores e as reaes imunoistoqumicas para TGF- β 1 e Ki-67. A existncia de associao entre as variveis independentes e os desfechos foi avaliada por meio dos testes qui-quadrado, Kruskal-Wallis e Anova. Foram construdas as curvas de sobrevida pelo mtodo de Kaplan-Meier. Em todos os testes foi utilizado o software SPSS 19 e o nvel de significncia estabelecido foi de 5%. De todos os CEC analisados, 43,2% dos casos apresentaram marcao positiva em mais de 50% das clulas para o TGF- β 1. No houve diferena estatstica na marcao de TGF- β 1 relacionada com prognstico e com graduao histopatolgica, por m foi observado um aumento do TGF- β 1 em CEC quando comparado a mucosa bucal normal. O ndice de marcao do Ki-67 em CEC com prognstico favorvel foi de 49,85 (\pm 16,34) e de 51,16 (\pm 19,91) com prognstico desfavorvel. Foi encontrada diferena entre os escores mais altos (1 e 2) de TGF- β 1 e menor mdia de Ki-67 ($p=0,01$), assim como entre o tipo de tratamento e maior tempo de sobrevida ($p=0,01$). Conclui-se que o TGF- β 1 e o Ki-67 esto altamente expressos nos CEC de boca em comparao com a mucosa normal, contudo no podem ser relacionados com o prognstico dessas leses. No entanto, TGF- β 1 est associado com uma diminuio da taxa de proliferao celular em CEC de boca.

Palavras-chave: Cncer bucal. Carcinoma espinocelular. Prognstico. TGF- β 1.

ABSTRACT

WEISSHEIMER, Camila. **Correlation of immune TGF- β 1 marking with cell proliferation in oral squamous cell carcinomas with different prognostic.** 2015. 39 f. Final Paper (Graduation) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2015.

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) represents about 95% of cases of oral cancer and even with advances in recent years still has high mortality rates. Many growth factors have been associated with increased of invasion ability and tumor progression in various places, among them, the Transforming Growth Factor beta-1 (TGF- β 1). TGF- β 1 is a cytokine that plays a dual role in carcinogenesis. It seems to act as an inhibitor of cell proliferation in the early stages, but, at later stages, can contribute to tumor growth and invasion of tissue. The aim of this study was to evaluate the immunohistochemistry of TGF- β 1 as a prognostic marker of OSCC, and to correlate with clinical, demographic and proliferative tumor profile, determined by the expression of KI-67. The medical records of 74 patients were selected with histopathological diagnosis of OSCC diagnosed in pathology service of Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA), treated between January 2001 to December 2009. The records were manually evaluated and information was collected regarding demographic data, risk factors, clinical features of the tumor, treatment and survival. The cases were separated in 34 patients with good prognosis (survival higher than 5 years) and 40 patients with poor prognosis (survival less than 5 years). In addition, it was included 9 cases of oral mucosa with normal aspect, from Mucoceles cases, for comparison purposes. Histologic grading of tumors and immunohistochemical reactions for TGF- β 1 and Ki-67 was performed. The presence of association between independent variables and the outcome was evaluated using the chi-square test, Kruskal-Wallis and ANOVA. The survival curves were made using the Kaplan-Meyer method. In all tests we used the SPSS 19 software and the level of significance was 5%. In all OSCC analyzed, 43.2% of the cases showed positive labeling of TGF- β 1 in more than 50% of the cells. There was no statistical difference in TGF- β 1 marking related to prognosis and histological grade, however there was an increase in the TGF- β 1 labeling in OSCC compared to normal oral mucosa. The labeling index of Ki-67 in CEC with a favorable prognosis was 49.85 (\pm 16.34) and 51.16 (\pm 19.91) with poor prognosis. Difference was found between the highest scores (1 and 2) of TGF- β 1 and lower average Ki-67 ($p = 0.01$), as well as between the type of treatment and longer survival time ($p = 0.01$). We conclude that TGF- β 1 and Ki-67 are highly expressed in the OSCC compared to normal oral mucosa, but they may not be related to the prognosis of these lesions. However, TGF- β 1 is associated with a decrease in cell proliferation rate in OSCC.

Keywords: Oral cancer. Squamous cell carcinoma. Prognosis. TGF- β 1.

SUMÁRIO

1 ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA.....	6
2 OBJETIVOS	9
2.1 OBJETIVO GERAL	9
2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	9
3 ARTIGO CIENTÍFICO	10
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS.....	32
REFERÊNCIAS	33
ANEXO A - CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA	37
ANEXO B - FICHA DE LEVANTAMENTO DE DADOS	39

1 ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA

O carcinoma espinocelular (CEC) representa cerca de 95% das neoplasias malignas que acometem a boca (ZINI; CZERNINSKI; SGAN-COHEN, 2010; JEMAL et al., 2007; PARKIN et al., 2005; JEMAL et al., 2002). Estima-se que, anualmente, ocorram cerca de 550.00 novos casos de CEC de boca no mundo (FERLAY et al., 2010; CONWAY et al., 2009), sendo essa a sexta localização mais comum de neoplasias em homens. Apesar das inovações em ciência básica e em pesquisa clínica observadas nos últimos anos, apenas 30 a 50% dos doentes estarão vivos após três anos, indicando uma taxa de sobrevida global baixa (HASSONA et al., 2013; OHTA et al., 2013; HALL et al., 2013; ANDISHEH-TADBIR; MEHRABANI; HEYDARI, 2008; HADDAD; SHIN, 2008; VALLECILLO et al., 2007;).

A carcinogênese do CEC de cabeça e pescoço é um processo complexo de múltiplas etapas determinadas por diversos fatores genéticos e epigenéticos (CHEN et al., 2013; MARTINS; CASTILHO, 2013; MASCOLO et al., 2012) que resultam na formação e crescimento tumoral (CHEN et al., 2011; CALIFANO et al., 1996). Diferentes fatores têm sido avaliados como marcadores prognósticos no CEC de boca, incluindo a localização do tumor, a classificação TNM (estadiamento clínico), a graduação histopatológica, o tratamento realizado e biomarcadores de proteínas envolvidas nos mecanismos de carcinogênese.

Na prática clínica, o sistema TNM tem sido muito utilizado para auxiliar na decisão terapêutica e como guia prognóstico (BELLO; SOINI; SALO, 2010; VAN DER SCHROEFF; BAATENBURG DE JONG, 2009). Pacientes com tumores T3 e T4 mostram um risco de morte 1,89 vezes maior do que aqueles com um tumor em estágios mais iniciais (OLIVEIRA et al., 2015; VALLECILLO et al., 2007), assim como, pacientes com metástase em linfonodos regionais parecem apresentar um risco de morte 1,6 vezes maior do que aqueles que não apresentam linfonodos comprometidos (N0) (OLIVEIRA et al., 2015; GHOSHAL et al., 2006; MORELATTO et al., 2006; JONES et al., 1994). O prognóstico varia de acordo com o estadiamento inicial dos tumores. No estágio I cerca de 80% dos pacientes apresentam sobrevida de 5 anos, enquanto que no estágio IV apenas 15% (WARNAKULASURIYA, 2009). Apesar de o TNM ser muito utilizado, resultados conflitantes sobre sua validade são apresentados na literatura, pois, em diversos estudos, não é evidenciada correlação significativa entre a classificação TNM e a sobrevida dos pacientes. Mesmo pacientes que exibem tumores pequenos (T1-T2N0M0) podem apresentar recorrências, metástase e morte (SOLAND; BRUSEVOLD, 2013). A principal explicação para a ineficiência deste sistema é porque ele apenas considera as características anatômicas dos tumores, sem considerar as

características biológicas e moleculares e, por conseguinte, é incapaz de individualizar o prognóstico.

Histologicamente, o CEC se caracteriza pela invasão de células epiteliais neoplásicas no tecido conjuntivo. Diversas classificações são utilizadas para caracterizar o CEC, a mais utilizada é a classificação de Bryne. Essa classificação é realizada segundo critérios como grau de ceratinização, pleomorfismo nuclear, padrão de invasão e infiltrado linfoplasmocitário, e avaliam as células da zona de invasão tumoral, determinando o grau de malignidade do tumor.

Nos últimos anos, avanços importantes têm sido demonstrados na identificação de biomarcadores que avaliem a agressividade e o prognóstico dos CEC de cabeça e pescoço. Assim, com estes biomarcadores, no momento do diagnóstico, pretende-se identificar um subconjunto de pacientes que requerem abordagens terapêuticas mais agressivas/complementares, tais como radioterapia, quimioterapia e terapias alvo. Na busca desses biomarcadores, uma das principais ferramentas tem sido a utilização da imunistoquímica, que permite a identificação do padrão de expressão de diferentes proteínas teciduais aliada a análise da morfologia tumoral e outros aspectos microscópios importantes, como invasão neural, área de invasão do tumor, margens etc. Além disso, pode-se utilizar espécimes fixados em formalina e embebidos em parafina que estão armazenados durante um longo período de tempo, permitindo assim estudos retrospectivos de grandes populações (OLIVEIRA; RIBEIRO-SILVA, 2011). Dentre os marcadores imunistoquímicos mais pesquisados estão os relacionados aos genes supressores de tumor, oncogenes, marcadores de proliferação celular, apoptose, angiogênese e moléculas de adesão (OLIVEIRA; RIBEIRO-SILVA, 2011; MASSANO et al., 2006), sendo os mais relatados na literatura o p53, Ki67 e EGFR. Porém, resultados divergentes em pequenas coortes indicam que nenhum marcador pode ser recomendado até o momento (SOLAND; BRUSEVOLD, 2013). Os resultados discrepantes na literatura apontam para a necessidade de se estudar novos marcadores prognósticos em CEC de boca. Nesse sentido, a análise de fatores de crescimento, tais como o fator de crescimento e transformação beta-1 (TGF- β 1), seus receptores e os eventos bioquímicos por eles ativados podem fornecer importantes informações no prognóstico do CEC e constituir novo alvo terapêutico para essas lesões.

Originalmente, os membros da família de TGF- β (β 1, β 2 e β 3) foram descritos como fatores que induzem a transformação celular, porém esses fatores também regulam a proliferação, migração, diferenciação celular e processos de reparo (BIERIE; MOSES, 2006). Quando o TGF- β estimula o crescimento de células mesenquimais, o mesmo age de forma a

inibir o crescimento e a diferenciação de células epiteliais, podendo ainda induzir a desdiferenciação, assim como a transição epitélio-mesenquimal (HE; BAZAN, 2008; WILKINS-PORT; HIGGINS, 2007). Apesar do TGF- β 1 agir inibindo a proliferação de células epiteliais, paradoxalmente é encontrado em altas concentrações em células tumorais nos estágios mais tardios, parecendo promover invasão celular e metástases, angiogênese e síntese de proteínas da matriz extracelular, facilitando a migração ou participando da regulação da resposta imune por meio de sinalização autócrina, e contribuindo para a progressão do câncer (GIEHL; IMAMICHI; MENKE, 2007; DUMONT; ARTEAGA, 2003; WAKEFIELD; ROBERTS, 2002; AKHURST; DERYNCK, 2001). O TGF- β 1 também tem mostrado papel na redução da resposta imunológica (BECK; SCHREIBER; ROWLEY, 2001), estimulação da angiogênese (BERTOLINO et al., 2005; DERYNCK; AKHURST; BALMAIN, 2001; CHOI; CHOI; PARK, 1997), aumento da síntese de enzimas proteolíticas (KIM et al., 2004; SEOMUN et al., 2001) e estimulação da deposição de matriz extracelular (MEC) no microambiente tumoral (CHENG; LOVETT, 2003). Além disso, dados de estudos clínicos estão associados positivamente à expressão de TGF- β 1 *in vivo* com o aumento da capacidade de invasão de tumores de mama (GORSCH et al., 1992) e próstata (THOMPSON et al., 1992), e com redução da sobrevida em carcinomas pancreáticos (FRIESS et al., 1993).

Estudos prévios demonstram que o TGF- β 1 tem um papel pró-carcinogênico em tumores sólidos como os de cabeça e pescoço (HAWINKELS et al., 2009; MINCIONE et al., 2008; KOMINSKY et al., 2007; PARDALI; MOUSTAKAS, 2007; LOGULLO et al., 2003; GORCH et al., 1992). Em estágios iniciais da carcinogênese, quando ainda há uma resposta normal das células epiteliais ao TGF- β 1, ele parece atuar como supressor da progressão tumoral (SALVADORI et al., 2014; CHEN et al., 2011). Entretanto, nos estágios tardios, parece promover invasão celular e metástases, angiogênese e síntese de proteínas da matriz extracelular ou participar da regulação da resposta imune por meio de sinalização autócrina (OHYAMA et al., 2013; CAMPISI, 2001). Nosso grupo demonstrou o papel do TGF- β 1 na carcinogênese labial (SALVADORI et al., 2014) e bucal (WAGNER et al., 2015), porém estudos sobre a importância desse marcador no estabelecimento do prognóstico dos CEC de boca são escassos.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL:

O objetivo do presente estudo foi verificar o papel da imunomarcção do TGF- β 1 como marcador prognóstico de carcinomas espinocelulares de boca e correlacioná-lo com o perfil proliferativo do tumor.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS:

- a) Correlacionar os dados de sobrevida dos pacientes com a imunomarcção do TGF- β 1;
- b) correlacionar o estadiamento clínico dos CEC (TNM) com a imunomarcção do TGF- β 1 e com o prognóstico;
- c) correlacionar a graduação histopatológica com a imunomarcção do TGF- β 1 e com o prognóstico;
- d) correlacionar o perfil de recidiva com a imunomarcção do TGF- β 1 e com o prognóstico;
- e) correlacionar os dados de fatores de risco (fumo e álcool) com a imunomarcção do TGF- β 1 e com o prognóstico.

3 ARTIGO CIENTÍFICO

IMUNOMARCAÇÃO DE TGF- β 1 E PROLIFERAÇÃO CELULAR EM CARCINOMAS ESPINOCELULARES DE BOCA COM DIFERENTES PROGNÓSTICOS.

Camila Weissheimer^{1§}, Liana Preto Webber^{1§}, Jean Nunes dos Santos², Manoel Sant'Ana Filho¹, Luise Meurer³, Marco Antônio Trevizani Martins¹, Manoela Domingues Martins¹

¹ Departamento de Patologia Oral, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

² Departamento de Patologia Oral, Laboratório de Patologia Cirúrgica Oral, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, Bahia, Brasil

³ Departamento de Patologia, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, Rio Grande do Sul, Brasil.

§ Contribuição equivalente

Autor Correspondente:

Manoela Domingues Martins

Universidade Federal do Rio Grande do Sul

Faculdade de Odontologia

Rua Ramiro Barcelos, 2492, sala 503

CEP: 90035-003

Santana, Porto Alegre RS, Brazil

Phone: 55-51-33085011

manomartins@gmail.com

*** A ser submetido ao periódico Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics – Fator de Impacto 1.46 – Qualis Capes 2015 – A2

RESUMO

Objetivo: O objetivo do presente estudo foi verificar o papel da imunomarcção do TGF- β 1 como marcador prognóstico de CEC de boca e relacioná-lo com as características clínicas e demográficas da amostra e com o perfil proliferativo do tumor, através da expressão de Ki-67.

Materiais e Métodos: Foram selecionados os prontuários médicos de 74 pacientes com diagnóstico histopatológico de CEC diagnosticados no Serviço de Patologia do HCPA atendidos no período de janeiro 2001 a dezembro de 2009. Os prontuários foram avaliados manualmente e foram coletadas informações quanto aos dados demográficos, fatores de risco, características clínicas do tumor, tratamento e sobrevida. Os casos foram separados em 34 pacientes com prognóstico favorável (sobrevida maior que 5 anos) e 40 pacientes com prognóstico desfavorável (sobrevida menor que 5 anos). As lesões foram classificadas pelo padrão histológico e foram realizadas as reações imunoistoquímicas para TGF- β 1 e Ki-67. Foram incluídos 9 casos de mucosa bucal com aspecto de normalidade, provenientes de mucocele, para fins de comparação. A existência de associação entre as variáveis independentes e os desfechos foi avaliada por meio dos testes qui-quadrado, Kruskal-Wallis e Anova. Foram construídas as curvas de sobrevida pelo método de Kaplan-Meier. Em todos os testes foi utilizado o software SPSS 19 e o nível de significância estabelecido foi de 5%.

Resultados: De todos os CEC analisados, 43,2% dos casos apresentaram marcação positiva de TGF- β 1 em mais de 50% das células. Não houve diferença estatística na marcação de TGF- β 1 relacionada com prognóstico e graduação histopatológica. O índice de marcação do Ki-67 em CEC com prognóstico favorável foi de 49,85 (\pm 16,34) e de 51,16 (\pm 19,91) nos casos de prognóstico desfavorável. Foi encontrada diferença estatisticamente significativa na expressão de ambos os marcadores em CEC de boca em comparação à mucosa bucal normal. Além disso, houve diferença entre os escores mais altos (1 e 2) de TGF- β 1 e menor média Ki-67 ($p = 0,01$), assim como os pacientes que foram submetidos ao tratamento cirúrgico apresentaram maior tempo de sobrevida ($p = 0,01$).

Conclusão: Conclui-se que o TGF- β 1 e o Ki-67 estão altamente expressos nos CEC de boca em relação aos casos de mucosa normal, contudo não podem ser relacionados com o prognóstico dessas lesões. No entanto, TGF- β 1 está associado com uma diminuição da média de Ki-67, indicando que o TGF- β 1 está tentando conter a proliferação celular.

Palavras-chave: câncer bucal, carcinoma espinocelular, prognóstico, TGF- β 1.

INTRODUÇÃO

O carcinoma espinocelular (CEC) representa cerca de 95% das neoplasias malignas que acometem a boca.¹⁻⁴ Além dos altos índices de prevalência, o CEC de boca tem mostrado um prognóstico desfavorável, com valores de cinco anos de sobrevivência de menos de 50%, produzindo altas taxas de mortalidade e morbidade no Brasil e no mundo.^{5,6}

Diferentes fatores têm sido avaliados como marcadores prognósticos no CEC de boca, incluindo a localização do tumor, a classificação TNM (estadiamento clínico), a graduação histopatológica, o tratamento realizado e biomarcadores de proteínas envolvidas nos mecanismos de carcinogênese. Dentre todos citados acima, a classificação TNM é a mais utilizada na prática clínica, porém, em diversos estudos, não é evidenciada correlação significativa entre a classificação TNM e a sobrevida dos pacientes. Isso porque mesmo pacientes que exibem tumores pequenos (T1-T2N0M0) podem apresentar recorrências, metástase e morte.⁷ A principal explicação para a ineficiência deste sistema é porque ele apenas considera as características anatômicas dos tumores, sem considerar as características biológicas e moleculares e, por conseguinte, é incapaz de individualizar o prognóstico.

A classificação de Bryne é utilizada para caracterização histológica do CEC. Essa classificação é realizada segundo critérios como grau de ceratinização, pleomorfismo nuclear, padrão de invasão e infiltrado linfoplasmocitário, e avaliam as células da zona de invasão tumoral, determinando o grau de malignidade do tumor.

Dessa forma, a busca pela identificação de biomarcadores que avaliem a agressividade e o prognóstico dos CEC de cabeça e pescoço se faz necessária. Assim, com esses biomarcadores, no momento do diagnóstico, pretende-se identificar um subconjunto de pacientes que requerem abordagens terapêuticas mais agressivas/complementares, tais como radioterapia, quimioterapia e terapias alvo. Na busca desses biomarcadores, uma das principais ferramentas tem sido a utilização da imunistoquímica, que permite a identificação do padrão de expressão de diferentes proteínas teciduais aliada a análise da morfologia tumoral e outros aspectos microscópios importantes, como invasão neural, área de invasão do tumor, margens etc. Além disso, pode-se utilizar espécimes fixados em formalina e embebidos em parafina que estão armazenados por um longo período de tempo, permitindo assim estudos retrospectivos de grandes populações.⁸ Dentre os marcadores imunistoquímicos mais pesquisados estão os relacionados aos genes supressores de tumor, oncogenes, marcadores de proliferação celular, apoptose, angiogênese e moléculas de adesão,^{8,9} sendo os mais relatados na literatura o p53, Ki67 e EGFR. Porém, resultados divergentes em pequenas coortes indicam que nenhum marcador pode ser recomendado até o

momento.⁷ Os resultados discrepantes na literatura apontam para a necessidade de se estudar novos marcadores prognósticos em CEC de boca. Nesse sentido, a análise de fatores de crescimento, tais como o fator de crescimento e transformação beta-1 (TGF- β 1), seus receptores e os eventos bioquímicos por eles ativados podem fornecer importantes informações no prognóstico do CEC e constituir novo alvo terapêutico para essas lesões.

A superfamília dos TGF- β inclui mais de 100 diferentes proteínas e um número superior a 40 tem sido descrito em mamíferos. As 3 isoformas de TGF- β em mamíferos (β 1, β 2 e β 3) induzem uma série de efeitos celulares tanto na formação dos organismos quanto em organismos adultos,^{10,11} regulando a proliferação, migração, diferenciação celular e processos reparadores.¹² Apesar do TGF- β 1 agir inibindo a proliferação de células epiteliais, paradoxalmente é encontrado em altas concentrações em células tumorais, contribuindo para a progressão do câncer, facilitando a migração e metástase em estágios mais tardios.^{11,13-15} Foram evidenciadas altas concentrações deste fator de crescimento em câncer colorretal,¹⁶ carcinomas gástricos,¹⁷ carcinomas renais¹⁸ e CEC de cabeça e pescoço.¹⁹ Além disso, dados de estudos clínicos estão associados positivamente à expressão de TGF- β 1 *in vivo* com o aumento da capacidade de invasão de tumores de mama²⁰ e próstata,²¹ e com redução da sobrevida em carcinomas pancreáticos.²²

Estudos prévios demonstram que o TGF- β 1 tem um papel pró-carcinogênico em tumores sólidos como os de cabeça e pescoço.^{16,18-20,23-25} Em estágios iniciais da carcinogênese, quando ainda há uma resposta normal das células epiteliais ao TGF- β 1, ele parece atuar como supressor da progressão tumoral.^{26,27} Porém, nos estágios tardios, parece promover invasão celular e metástases, angiogênese e síntese de proteínas da matriz extracelular ou participar da regulação da resposta imune por meio de sinalização autócrina.^{28,29} Nosso grupo demonstrou o papel do TGF- β 1 na carcinogênese labial²⁷ e bucal,³⁰ porém, estudos sobre a importância desse marcador no estabelecimento do prognóstico dos CEC de boca são escassos. Diante disso, o objetivo do presente estudo foi verificar o papel da imunomarcagem do TGF- β 1 como marcador prognóstico de carcinomas espinocelulares de boca e correlacioná-lo com as características clínicas e demográficas, e com o perfil proliferativo do tumor.

MATERIAIS E MÉTODOS

Amostra

A partir dos critérios de inclusão (75% das informações disponíveis nos prontuários e blocos de parafina disponíveis para o estudo), foram selecionados 74 prontuários médicos e blocos de parafina de pacientes diagnosticados com carcinoma espinocelular (CID.C02) primário na região bucal, no período de janeiro de 2001 a dezembro de 2009, no Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (HCPA).

Foram coletadas informações quanto aos dados demográficos, fatores de risco, características clínicas do tumor, tratamento, recidiva e sobrevida. Foram incluídos 9 casos que continham epitélio de revestimento da mucosa bucal com aspecto de normalidade, provenientes de casos de mucocele, para fins de comparação com CEC.

O presente estudo foi conduzido segundo os critérios éticos da Declaração de Helsinki e foi aprovado no comitê de ética do Hospital de Clínicas de Porto Alegre (GPPG 12-0163).

Análise Histopatológica

As lâminas de CEC foram coradas em hematoxilina e eosina (h&e). Após, foi realizada a graduação histopatológica segundo os critérios descritos por Bryne et al.³¹ Foi realizado consenso entre dois patologistas experientes cegados para dados clínicos e o prognóstico.

Análise Imunoistoquímica

Cortes histológicos de 3µm, em lâminas silanizadas, foram desparafinizados em xilol, reidratados em álcool e imersos em solução de peróxido de hidrogênio a 0,3% em metanol para bloqueio da peroxidase endógena. A seguir, os cortes foram lavados em solução tampão fosfato e posteriormente submetidos à recuperação antigênica. Para o TGF-β1, foi realizada recuperação enzimática com pepsina pH1,8 a 1% em estufa a 37°C por 60 minutos. Para o Ki-67, foi feita a recuperação com solução de baixo pH (10 ml de solução pH=6,0 + 90ml H₂O) em 80° C por 18 horas (overnight). Após, foi incubado o anticorpo primário anti-TGF-β1 (sc-146, SantaCruz Biotechnology; 1:100) por 18 horas (“overnight”) e Ki-67 (clone MIB1, DAKO, Carpinteria, USA, 1:50) por 1h. O sistema de detecção empregado foi do tipo polimérico (Envision + Dako, Carpinteria, CA, USA). As revelações das reações foram realizadas através de solução cromógena, contendo 0,03% de 3-31-diaminobenzidina (DAB, DakoCytomation, USA) e contra-coradas com solução de hematoxilina de Mayer. Todas as reações foram acompanhadas de controles positivos de acordo com as instruções do

fabricante. Para o controle negativo, os anticorpos primários foram substituídos por albumina sérica bovina (BSA) a 1% diluída em tampão TRIS-HCL, pH 7,4. Apenas coloração marrom citoplasmática de células foi observada para o TGF- β 1 e coloração nuclear para o Ki-67, independentemente da intensidade da coloração, e foram consideradas como positivas.

Todas as análises foram feitas por pesquisadores cegados quanto aos aspectos clínicos e o prognóstico. Foi realizada uma análise semi-quantitativa nas lâminas imunomarcadas com TGF- β 1, por dois patologistas em consenso, em um aumento de 400x, usando escores baseados na porcentagem de células neoplásicas marcadas. Cada caso foi classificado segundo o seguinte escore: escore 0 (0 a 10% de células positivas), escore 1 (10 a 50%) e escore 2 (acima de 50% de células positivas).²⁷

O índice proliferativo do tumor foi determinado pela expressão de Ki-67 na amostra. Foi realizada uma análise quantitativa dos cortes histológicos imunomarcados pelo Ki-67 seguindo a metodologia descrita por Martinez et al.³² Foi realizada a captura de imagens das lâminas por intermédio de microscópio de luz convencional CX41RF model (Olympus Latin America, Inc., Miami, Florida, USA) contendo uma câmera QColor 5, Coolet, RTV (Olympus Latin America, Inc., Miami, Florida, USA) acoplada e conectada a um computador Dimension 5150 (Dell, Porto Alegre, RS, Brazil). As imagens foram analisadas pelo software QCapture version 2.81 (Quantitative Imaging Corporation, Inc.; Surrey, DC, Canada) e contadas com o auxílio do programa ImageJ (Instituto Nacional de Saúde Mental, Bethesda, Maryland, EUA). O número e percentual de células positivas foram avaliados em cada caso. Foram contadas 1000 células em um aumento de 400x e o resultado foi apresentado como percentual de células positivas/1000células (média e desvio padrão).

Análise Estatística

Foi realizada inicialmente uma análise descritiva para as variáveis consideradas, calculando média, desvio padrão, máximo, mínimo e mediana para as variáveis quantitativas, e frequência e porcentagem para as variáveis qualitativas. A existência de associação entre as variáveis independentes e os desfechos foi avaliada por meio do teste qui-quadrado com o software SPSS 19. Foram realizados os testes Anova e Kruskal-Wallis para comparação de médias. A sobrevida foi calculada pelo método de Kaplan-Meier e as curvas de sobrevida foram comparadas usando o teste estatístico de log-rank. Em todos os testes, foi utilizado o nível de significância de 5% ou o p-valor correspondente.

RESULTADOS

Características clínicas e demográficas de CEC nos diferentes prognósticos

Dentre todos os casos de CEC avaliados (n=74), 34 pacientes foram considerados com prognóstico favorável, pois apresentaram sobrevida maior que 5 anos e não apresentaram recidiva e; 40 pacientes foram considerados com prognóstico desfavorável, pois tiveram sobrevida menor que 5 anos e/ou apresentaram recidiva.

Na Tabela 1 estão demonstradas as características clínicas e demográficas da amostra com relação ao prognóstico. A média de idade dos pacientes foi de 56,2 anos ($\pm 8,689$). Houve uma maior prevalência de pacientes diagnosticados com CEC do sexo masculino, independente do prognóstico. Todos os pacientes da amostra eram fumantes, com exceção de um paciente do grupo prognóstico desfavorável. Com relação ao consumo de álcool, 26 (83,9%) e 23 (85,2%) pacientes eram etilistas em prognóstico favorável e desfavorável, respectivamente.

Quanto ao sítio, houve maior prevalência de CEC em palato em ambos os prognósticos, assim como a presença de sintomatologia dolorosa. Com relação à classificação TNM, independentemente do prognóstico, a maior parte dos pacientes foi diagnosticada com CEC nos estágios III e IV. Ao analisarmos os dados relacionados ao tratamento, observamos que a maioria dos pacientes foi submetida à associação de cirurgia e radioterapia. Os pacientes que foram submetidos a tratamento cirúrgico estavam mais concentrados no grupo com prognóstico favorável (44,1%), com uma diferença estatisticamente significativa ($p = 0.01$) em relação ao grupo com prognóstico desfavorável.

Tabela 1. Características demográficas e clínicas dos pacientes com CEC com prognóstico favorável e desfavorável.

Características Demográficas e Clínicas	Prognóstico Favorável	Prognóstico Desfavorável	Valor <i>p</i>
Sexo			
Masculino	27 (79,4%)	36 (90,0%)	0.32
Feminino	7 (20,6%)	4 (10,0%)	
Fumo			
Sim	31 (100%)	31 (96,9%)	>0.99
Não	0 (0%)	1 (3,1%)	
Álcool			
Sim	26 (83,9%)	23 (85,2%)	>0.99
Não	5 (16,1%)	4 (14,8%)	
Dor			
Sim	22 (88%)	30 (85,7%)	>0.99
Não	3 (12%)	5 (14,3%)	
Sítio			
Assoalho	8 (23,5%)	12 (31,6%)	0.74
Língua	7 (20,6%)	7 (18,4%)	
Palato	13 (38,2%)	14 (36,8%)	
Retromolar	5 (14,7%)	4 (10,5%)	
Mucosa jugal	1 (2,9%)	0 (0%)	
Rebordo alveolar	0 (0%)	1 (2,6%)	
TNM			
0/I/II	9 (27,3%)	4 (10,3%)	0.07
III/IV	24(72,7%)	35 (89,7%)	
Tratamento			
Cirurgia	15 (44,1%)	6 (15%)	0.01
RxT	0 (0%)	3 (7,5%)	
Cirurgia e RxT	18 (52,9%)	22 (55%)	
Cirurgia e QT	0 (0%)	3 (7,5%)	
RxT e QT	1 (2,9%)	2 (5,0%)	
Cirurgia, QT e RxT	0 (0%)	4 (10%)	

Teste de qui-quadrado

QT=quimioterapia RxT=radioterapia

Análise histopatológica

A análise histopatológica foi realizada em todos os casos de CEC segundo os critérios de Bryne et al.³¹ e estão demonstradas na Tabela 2 de acordo com o prognóstico. Entre os casos com prognóstico favorável, 9 pacientes (26,5%) foram classificados em baixo grau de malignidade, 20 (58,8%) em moderado grau de malignidade e 5 (14,7%) em alto grau de malignidade. Entre os casos com prognóstico desfavorável, 12 pacientes (29,3%) foram classificados em baixo grau de malignidade, 27 (65,9%) em moderado grau de malignidade e 1 (4,9%) em alto grau de malignidade. Não houve associação entre o grau de malignidade do tumor e o prognóstico.

Tabela 2. Classificação histopatológica dos casos de CEC de acordo com Bryne e prognóstico.

	Prognóstico Favorável	Prognóstico Desfavorável	Valor p
Baixo	9 (26,5%)	12 (30%)	0.35
Moderado	20 (58,8%)	27 (67,5%)	
Alto	5 (14,7%)	1 (2,5%)	

Teste qui-quadrado

Análise Imunoistoquímica

As tabelas 3 e 4 mostram os resultados da análise imunoistoquímica de TGF- β 1 e KI-67 nos casos de mucosa normal e nos casos de CEC nos diferentes prognósticos.

TGF- β 1

Todos os casos de CEC, independente do prognóstico, foram positivos para imunomarcção de TGF- β 1 (Figura 1). Dentre os casos de mucosa normal, 8 (88,9%) foram classificados em escore 0 de TGF- β 1 e apenas 1 (11,1%) foi classificado em escore 1, sendo que não houve casos de mucosa normal classificados em escore 2. Dentre todos os casos de CEC, 12 (16,4%) foram classificados em escore 0, 31 (42,5%) foram classificados em escore 1 e 30 (41,1%) foram classificados em escore 2. Observou-se uma maior expressão de TGF- β 1 em CEC quando comparado com a mucosa normal, com diferença estatisticamente significativa ($p = 0.00$) (Figura 1 A, B e C).

Não foram encontradas associações estatisticamente significativas entre a imunomarcção de TGF- β 1 e as características demográficas e clínicas da amostra.

Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa na expressão de TGF- β 1 entre os casos de CEC com diferentes prognósticos, porém, entre os casos de prognóstico desfavorável, observamos uma maior concentração de casos no grupo classificado como escore 2 de TGF- β 1 (50%) e uma menor concentração de casos no grupo classificado como escore 0 (18,4%).

Não houve associação entre os escores de TGF- β 1 com a classificação histopatológica do tumor.

Ki-67

Todos os casos de CEC com prognóstico favorável e desfavorável, assim como os casos de mucosa normal foram positivos para imunomarcção de Ki-67 (Figura 1). Os casos de mucosa normal apresentaram uma média de Ki-67 de 8,6 (\pm 2,76). Os casos de CEC com prognóstico favorável mostraram média de 49,85 (\pm 16,34) e os com prognóstico desfavorável de 51,16 (\pm 19,73). Houve uma maior expressão de Ki-67 em CEC quando comparado com a mucosa normal, com diferença estatisticamente significativa ($p = 0.00$) (Figura 1 D, E e F). Porém, não foi evidenciada diferença estatisticamente significativa entre as médias de Ki-67 nos diferentes prognósticos. Da mesma forma, não houve associação significativa entre a expressão de Ki-67 e a classificação histopatológica do tumor, porém foi detectada maior média de Ki-67 nos casos classificados em alto grau de malignidade ($52,95 \pm 19,36$). Os casos de CEC diagnosticados em estágios avançados (TNM III e IV) tiveram uma média maior de expressão de Ki-67 ($50,88 \pm 18,27$), porém, sem diferença estatisticamente significativa com relação aos casos de CEC em estágio iniciais (TNM I e II).

Tabela 3. Análise da imunomarcção de TGF- β 1 e Ki-67 de acordo com o prognóstico.

	Mucosa Normal	Prognóstico Favorável	Prognóstico Desfavorável	Valor <i>p</i>
TGF-β1				
< 10%	8 (88,9%) [#]	9 (27,3%)	7 (18,4%)	
10-50%	1 (11,1%)	11 (33,3%) [#]	12 (31,6%)	0.00 [*]
> 50%	0 (0,0%)	13 (39,4%)	19 (50%) [#]	
Ki67				
Média	8,6 (\pm 2,76) ^a	49,85 (\pm 16,34) ^b	51,16 (\pm 19,73) ^b	0.00 ^{**}

^{*}Teste de qui-quadrado ^{**} Teste Anova [#]análise de resíduos > 1,96, (a) diferença entre os grupos

Associação entre Ki-67 e TGF- β 1

Foi avaliada a associação entre a marcação de TGF- β 1 com o índice proliferativo do tumor (Ki-67). Foi observado que entre o escore 1 (10-50%) e o escore 2 (>50%) de TGF- β 1 houve uma redução da média de Ki-67 estatisticamente significativa ($p=0.01$). Os dados da correlação de Ki-76 com TGF- β 1 estão expressos na Tabela 4.

Tabela 4. Relação entre as médias de Ki-67 e os escores de TGF- β 1 em CEC de boca.

	Média Ki-67	Valor <i>p</i>
TGF- β1		
< 10%	53,28 (\pm 20,27)	
10-50%	59,08 (\pm 17,89)	0.01
> 50%	44,48 (\pm 15,31)	

Teste de Kruskal-Wallis

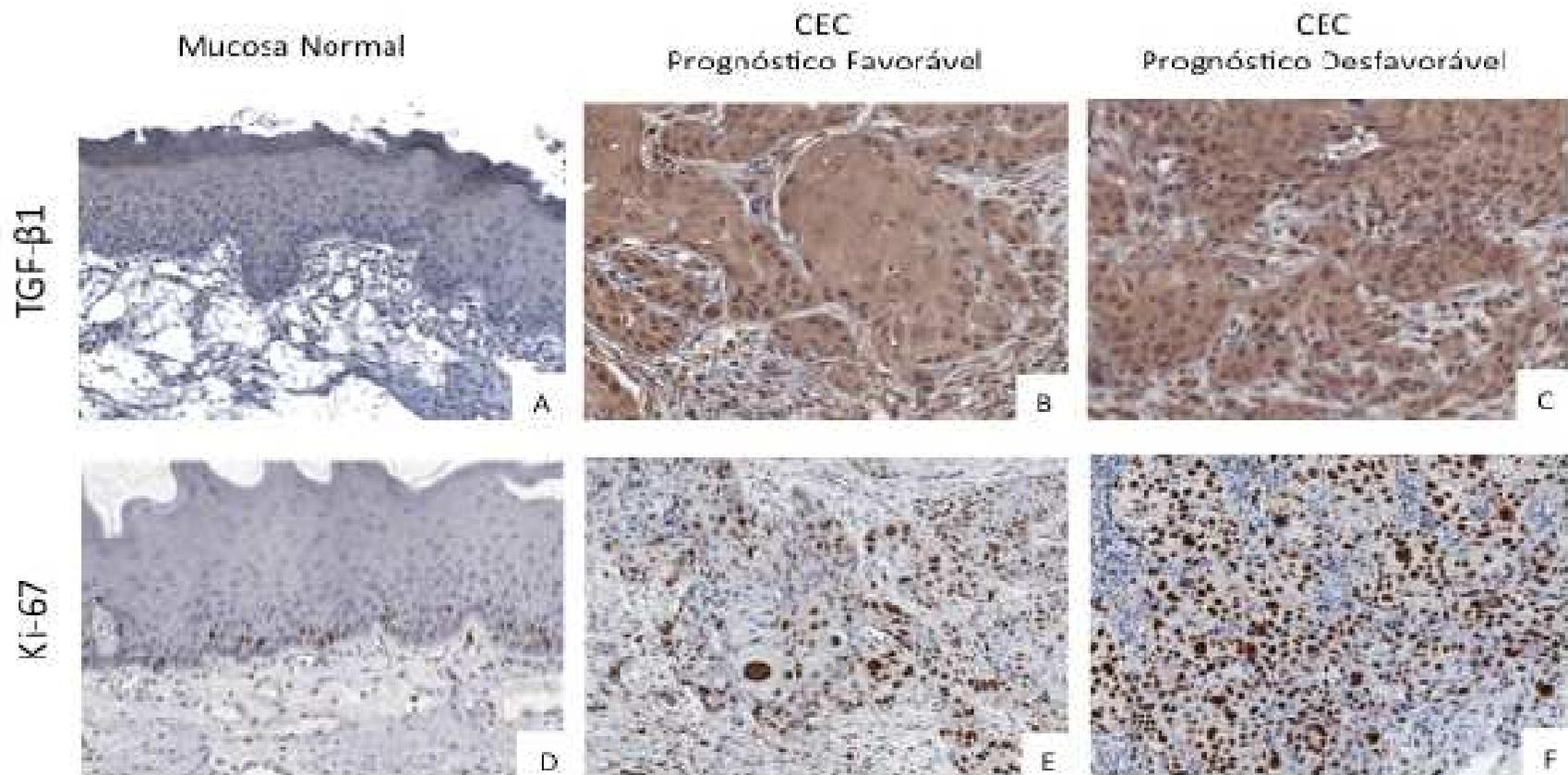


Figura 1. Imunomarcção de TGF-β1 e Ki-67 em mucosa normal e em CEC com diferentes prognósticos. (A) Ausência de TGF-β1 na mucosa bucal normal (100x), (B) e (C) Imunomarcção de TGF-β1 (escore 2) nos CEC com diferentes prognósticos (200x). (D) Ki-67 em mucosa normal (100x). (E) e (F) Aumento no número de células marcadas por Ki-67 em CEC com diferentes prognósticos quando comparado à mucosa bucal normal (200x).

Evolução

Durante o período de acompanhamento, 34 pacientes apresentaram recidiva com uma média de tempo de 22,71 meses após o diagnóstico do tumor. Dezenove pacientes morreram por causa do tumor com uma média de idade de 57,42 anos e com uma média de tempo de 21,32 meses após o diagnóstico do tumor. As curvas de sobrevida de Kaplan-Meier estão representadas na Figura 2. Foi realizado o teste de log-rank e observamos que houve associação estatisticamente significativa ($p=0.01$) entre a sobrevida e o tipo de tratamento ao qual o paciente foi submetido, com uma sobrevida maior relacionada ao tratamento cirúrgico. Com relação ao estadiamento clínico, a sobrevida foi maior nos casos iniciais (estágio I e II), porém sem um resultado estatisticamente significativo ($p=0.06$). Ao compararmos as curvas de sobrevida com os escores de TGF- β 1, observamos uma diminuição da sobrevida à medida que aumenta a expressão de TGF- β 1 na amostra, porém sem uma diferença estatisticamente significativa ($p=0.41$).

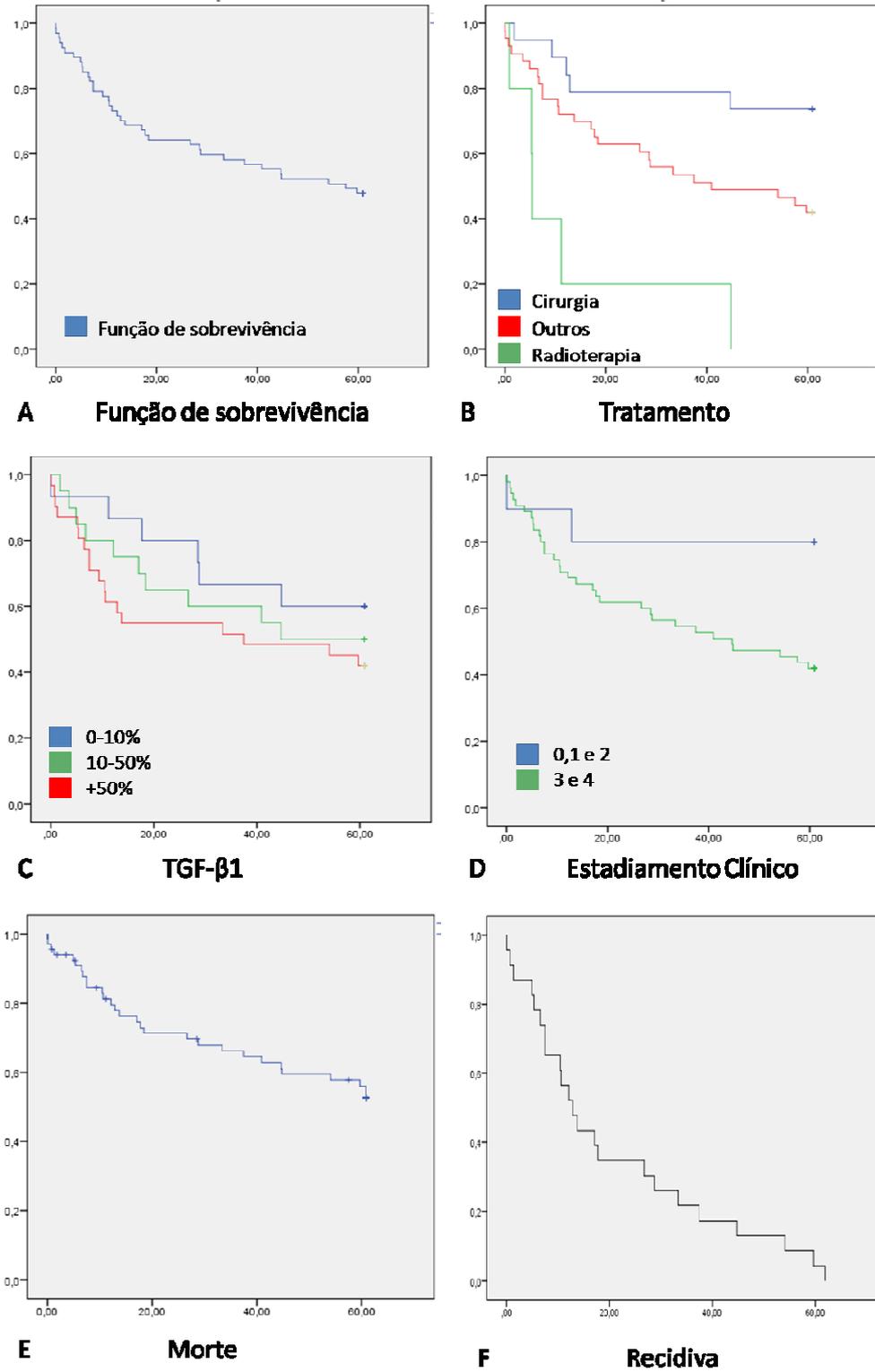


Figura 2. Análise de Kaplan-Meier da sobrevivência de CEC (A) e; de acordo com o Tratamento (B); expressão de TGF- β 1 (C); Estadiamento Clínico (D); Morte (E); Recidiva (F).

DISCUSSÃO

A carcinogênese do CEC de cabeça e pescoço é um processo complexo de múltiplas etapas determinadas por diversos fatores genéticos e epigenéticos³³⁻³⁵ que resultam na formação e crescimento tumoral.^{26,36} O estudo do CEC de boca é extremamente importante, devido à sua alta morbidade e mortalidade.^{1,37} Vários biomarcadores vêm sendo avaliados nos CEC de boca na busca da melhor compreensão do comportamento tumoral.^{8,9} No presente estudo foi avaliado o papel do TGF- β 1, que é um potente inibidor do crescimento epitelial, e sua relação com a proliferação celular e o prognóstico de CEC de boca.

O TGF- β 1 é um membro de uma grande família de citocinas que regulam uma variedade de processos celulares, incluindo a proliferação, diferenciação, motilidade, produção da matriz extracelular, angiogênese e resposta imune.^{11,13-15} Existem evidências de que alterações na via de sinalização do TGF- β 1 contribuem para o desenvolvimento de diversos tipos de câncer.^{38,39} No entanto, efeitos contrastantes têm sido descritos, indicando uma dupla função do TGF- β 1 na carcinogênese. Nos estágios mais precoces, o TGF- β 1 parece atuar como um inibidor de crescimento do tumor, porém, em estágios mais avançados da carcinogênese, contribui para a progressão do tumor e invasividade.¹³ Em alguns estudos, o aumento dos níveis de TGF- β 1 tem sido associado a um pior prognóstico do câncer.¹⁸ Em outras investigações, no entanto, uma diminuição no nível de TGF- β 1 tem sido associada com a progressão do tumor, a perda de diferenciação das células tumorais e um comportamento mais agressivo.^{23,40} No presente estudo, todos os casos de CEC foram positivos para o TGF- β 1, sendo que 43,2% dos casos apresentaram marcação positiva em mais de 50% das células neoplásicas. Além disso, essa marcação nos CEC de boca foi significativamente maior que a observada nas células epiteliais da mucosa bucal normal, demonstrando um papel pró-tumorigênico desta proteína na carcinogênese bucal. Polimorfismo de TGF- β 1 tem sido associado ao aumento da suscetibilidade ao CEC de boca, sendo que indivíduos que carregam esses alelos têm um risco aumentado em 2,73 vezes de desenvolver câncer.⁴¹ Maior expressão de TGF- β 1 foi demonstrada em carcinoma coloretal,¹⁶ gástrico¹⁷ e renal,¹⁸ além de ter sido relacionada com maior invasividade em tumores de mama^{20,42} e próstata,^{21,43} e com redução de sobrevida em carcinoma de pâncreas.²² Estes dados corroboram a hipótese de que, durante a transformação neoplásica, ocorre uma perda da função inibitória do TGF- β 1 devido à diminuição na regulação dos seus receptores ou alteração nas SMADS nas células. As principais mutações da via de sinalização do TGF- β 1 são em genes que regulam *TGFBR2*, *TGFBR1*, *SMAD4* e *SMAD2*.⁴⁴⁻⁴⁶

O antígeno Ki-67 vem sendo utilizado na rotina da patologia como marcador nuclear de células em proliferação, refletindo a fração total de proliferação celular no tecido.⁴⁷ Isso porque esta proteína é observada em células em proliferação celular nas fases G1, S, G2 e mitoses do ciclo celular.⁴⁸ O papel desta proteína como marcador prognóstico em carcinoma de boca ainda não está completamente definido e variações metodológicas podem ser responsáveis pelos diferentes resultados observados pelos autores. Todavia, tem sido relatado um aumento da marcação de Ki-67 em lesões potencialmente malignas e malignas da mucosa bucal,⁴⁹⁻⁵¹ ao mesmo tempo que esse marcador está associado com uma redução do índice de sobrevivência dos pacientes com carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço e com um maior risco de metástase regional.^{52,53} No presente estudo houve um aumento da marcação de TGF- β 1 e de Ki-67 nos CEC de boca quando comparados a mucosa bucal normal, indicando que o TGF- β 1 perdeu a sua capacidade original de inibir a proliferação celular. Porém, analisando a relação entre KI-67 e os diferentes escores de TGF- β 1 apenas na amostra de CEC, observamos uma relação inversa. Os casos de CEC com maior média de células positivas para o Ki-67 apresentavam menor escore de TGF- β 1 e vice-versa. Resultados semelhantes foram observados pelo nosso grupo em um estudo anterior em CEC de lábio²⁷, em que os tumores bem diferenciados (grau I: menor grau de malignidade) apresentavam menor Ki-67 e mais TGF- β 1, enquanto que CEC com alto grau de malignidade apresentavam maior Ki-67 e menor TGF- β 1. Outros estudos também demonstraram diminuição dos níveis de TGF- β 1 com a progressão do tumor e perda de diferenciação.^{23,40} Esses resultados indicam que, apesar de alterado, o TGF- β 1 tenta conter a proliferação celular. Novos estudos associando o TGF- β 1 com outras proteínas envolvidas nessa via de sinalização se fazem necessários para compreender melhor seu papel na carcinogênese e na progressão tumoral.

A análise dos dados clínico-demográficos dos CEC de boca utilizados neste estudo mostrou resultados semelhantes aos descritos previamente na literatura. Usualmente essas lesões acometem mais homens, acima dos 50 anos, são diagnosticadas em estádios avançados e estão associadas ao consumo de tabaco e álcool.^{37,54-58} Pode-se observar, também, que os pacientes em estágios iniciais (estágios I e II) mostraram tendência a ter maior sobrevida, assim como os pacientes submetidos ao tratamento cirúrgico apresentaram maior sobrevida. Esses resultados corroboram a ideia de que tumores iniciais ainda podem ser removidos cirurgicamente e apresentam melhor prognóstico. A cirurgia combinada a radioterapia neoadjuvante permanecem como as melhores escolhas terapêuticas para o CEC de boca.^{54,59} Novos conceitos envolvendo o uso de quimioterapia antes da radioterapia ou em conjunto ainda estão sendo investigados. Nesse sentido, tem se buscado a associação de dados clínicos

e de sobrevida dos CEC de boca com marcadores biológicos. No presente estudo não foi encontrada associação entre a marcação de TGF- β 1 com os dados clínico-patológicos e de prognóstico. Porém, por estar altamente expresso em CEC de boca, a via do TGF- β 1 pode ser vista como um potencial alvo terapêutico. Ensaios clínicos de fase I demonstraram bons resultados de inibidores de TGF- β 1 em glioma maligno.⁶⁰ Os resultados preliminares de um ensaio clínico de fase II em pacientes com carcinoma hepatocelular também têm demonstrado melhor evolução clínica dos pacientes.

Em conclusão, os resultados do presente estudo sugerem que o TGF- β 1 e o Ki-67 estão altamente expressos nos CEC de boca comparado aos casos de mucosa normal, contudo não podem ser relacionados com o prognóstico dessas lesões. No entanto, TGF- β 1 está associado com uma diminuição da média de Ki-67, indicando que o TGF- β 1 está tentando conter a proliferação celular.

REFERÊNCIAS

1. Zini A, Czerninski R, Sgan-Cohen HD. Oral cancer over four decades: epidemiology, trends, histology, and survival by anatomical sites. *J Oral Pathol Med.* 2010; 39: 299-305.
2. Parkin DM, Bray F, Ferlay J, et al. Global cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 2005; 55: 74-108.
3. Jemal A, Siegel R, Ward E, et al. Cancer Statistics, 2007. *CA Cancer J Clin.* 2007; 57: 43-66.
4. Jemal A, Siegel R, Murray T, et al. Cancer statistics, 2002. *CA Cancer J Clin.* 2002; 52: 23-47.
5. Andisheh-Tadbir A, Mehrabani D, Heydari STJ. Epidemiology of squamous cell carcinoma of the oral cavity in Iran. *J Craniofac Surg.* 2008; 19: 1699-702.
6. Vallecillo M, Romero M, Olmedo M, et al. Factors related to survival from oral cancer in an Andalusian population sample (Spain). *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2007; 12: E518-23.
7. Soland TM, Brusevold IJ. Prognostic molecular markers in cancer – quo vadis? *Histopathology.* 2013; 63: 297-308.
8. Oliveira LR, Ribeiro-Silva A. Prognostic significance of immunohistochemical biomarkers in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2011; 40: 298-307.
9. Massano J, Regateiro FS, Januário G, et al. Oral squamous cell carcinoma: review of prognostic and predictive factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2011; 102: 67-76.
10. Derynck R, Zhang YE. Smad-dependent and Smad-independent pathways in TGF- β family signaling. *Nature.* 2003; 425: 577-584.
11. Giehl K, Imamichi Y, Menke A. Smad4-Independent TGF- β signaling in tumor cell migration. *Cells Tissue Organs.* 2007; 185: 123-130.
12. Bierie B, Moses HL. Tumor microenvironment: TGF- β : the molecular Jekyll and Hyde of cancer. *Nat Rev Cancer.* 2006; 6: 506-520.
13. Akhurst RJ, Derynck R. TGF- β signaling in cancer - a double edged sword. *Trends Cell Biol.* 2001; 11: S44-S51.
14. Wakefield LM, Roberts AB. TGF- β signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. *Curr Opin Genet Dev.* 2002; 12: 22-29.
15. Dumont N, Arteaga CL. Targeting the TGF- β signaling network in human neoplasia. *Cancer Cell.* 2003; 3: 531-536.

16. Hawinkels LJ, Verspaget HW, Van der Reijden JJ, et al. Active TGF- β 1 correlates with myofibroblasts and malignancy in the colorectal adenoma-carcinoma sequence. *Cancer Sci.* 2009; 100: 663-670.
17. Mutoh H, Sashikawa M, Hayakawa H, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 is generated via TGF- β by miofibroblasts in gastric intestinal metaplasia and carcinoma without H. pylori infection. *Cancer Sci.* 2010; 101: 1783-1789.
18. Kominsky SL, Doucet M, Brady K, et al. TGF- β 1 promotes the establishment of renal cell carcinoma bone metastasis. *J Bone Miner Res.* 2007; 22: 37-44.
19. Logullo AF, Nonogaki S, Miguel RE, et al. Transforming Growth Factor (TGF- β 1) expression in head and neck squamous cell carcinoma patients as related to prognosis. *J Oral Pathol Med.* 2003; 32: 139-145.
20. Gorsch SM, Memoli VA, Stukel TA, et al. Immunohistochemical staining for transforming growth factor beta 1 associates with disease progression in human breast cancer. *Cancer Res.* 1992; 52: 6949-52.
21. Thompson TC, Truong LD, Timme TL, et al. Transforming growth factor beta 1 as a biomarker for prostate cancer. *J Cell Biochem Suppl.* 1992; 16H: 54-61.
22. Friess H, Yamanaka Y, Büchler M, et al. Enhanced expression of transforming growth factor beta isoforms in pancreatic cancer correlates with decreased survival. *Gastroenterology.* 1993; 105: 1846-56.
23. Mincione G, Di Marcantonio MC, Artese L, et al. Loss of expression of TGF- β 1, T β RI, and T β RRII correlates with differentiation in human oral squamous cell carcinomas. *Int J Oncol.* 2008; 32: 323-33.
24. Ito K, Kakudo K, Mori I, et al. Neuroendocrine differentiation in a case of actinic cell carcinoma of the parotid gland. *Acta Pathol Jpn.* 1990, 40: 279-87.
25. Pardali K, Moustakas A. Actions of TGF-beta as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer. *Biochim Biophys Acta.* 2006; 1775: 21-62.
26. Chen YK, Yang SH, Huang AH, et al. Aberrant expression in multiple components of the transforming growth factor- β 1-induced Smad signaling pathway during 7, 12-dimethylbenz a anthracene-induced hamster buccal pouch squamous-cell carcinogenesis. *Oral Oncol.* 2011; 47: 262-267.
27. Salvadori G, Dos Santos JN, Martins MA, et al. Ki-67, TGF- β 1, and elastin content are significantly altered in lip carcinogenesis. *Tumour Biol.* 2014; 35: 7635-44.
28. Campisi J. Cellular senescence as a tumour-suppressor mechanism. *Trends Cell Biol.* 2001; 11: 27-31.
29. Ohyama Y, Kawamoto Y, Chiba T, et al. Inhibition of TGF- β and EGF pathway gene expression and migration of oral carcinoma cells by mucosa-associated lymphoid tissue 1. *Br J Cancer.* 2013; 109: 207-14.

30. Wagner VP, Cardoso PR, Dos Santos JN, et al. Immunohistochemical study of TGF- β 1 in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma: correlations between clinicopathological factors and overall survival. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2015; (No prelo).
31. Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, et al. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. *J Pathol.* 1992; 166: 375-81.
32. Martínez A, Brethauer U, Rojas IG, et al. Expression of apoptotic and cell proliferation regulatory proteins in actinic cheilitis. *J Oral Pathol Med.* 2005; 34: 257-62.
33. Chen D, Cabay RJ, Jin Y, et al. MicroRNA Deregulations in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. *J Oral Maxillofac Res.* 2013; 4: e2.
34. Mascolo M, Siano M, Ilardi G, et al. Epigenetic dysregulation in oral cancer. *Int J Mol Sci.* 2012; 13: 2331-53.
35. Martins MD, Castilho RM. Histones: Controlling Tumor Signaling Circuitry. *J Carcinog Mutagen.* 2013; 1: 1-12.
36. Califano J, Van Der Riet P, Westra W, et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res.* 1996; 56: 2488-92.
37. Seoane-Romero JM, Vázquez-Mahía I, Seoane J, et al. Factors related to late stage diagnosis of oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2012; 17: 35-40.
38. Coffey Jr RJ, Bascom CC, Sipes NJ, et al. Selective inhibition of growth-related gene expression in murine keratinocytes by transforming growth factors. *Mol Cell Biol.* 1988; 8: 3088-93.
39. Chambard JC, Pouyssegur J. TGF-s inhibits growth factor induced DNA synthesis in hamster fibroblasts without affecting the early mitogenic events. *J Cell Physiol.* 1988; 135: 101-7.
40. Muro-Cacho CA, Anderson M, Cordero J, et al. Expression of transforming growth factor beta type II receptors in head and neck squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 1999; 5: 1243-8.
41. Carneiro NK, Oda JM, Losi Guembarovski R, et al. Possible association between TGF- β 1 polymorphism and oral cancer. *Int J Immunogenet.* 2013; 40: 292-8.
42. Oda K, Hori S, Itoh H, et al. Immunohistochemical study of transforming growth factor beta, fibronectin, and fibronectin receptor in invasive mammary carcinomas. *Acta Pathol Jpn.* 1992; 42: 645-50.
43. Steiner MS, Barrack ER. Transforming growth factor-beta 1 overproduction in prostate cancer: effects on growth in vivo and in vitro. *Mol Endocrinol.* 1992; 6: 15-25.
44. Chen MF, Wang WH, Lin PY, et al. Significance of the TGF- β 1 IL-6 axis in oral cancer. *Clin Sci.* 2012; 122: 459-472

45. Martin D, Abba MC, Molinolo AA, et al. The head and neck cancer cell oncogenome: a platform for the development of precision molecular therapies. *Oncotarget*. 2014; 5: 8906-23.
46. Qiu W, Schönleben F, Li X, et al. Disruption of transforming growth factor beta-Smad signaling pathway in head and neck squamous cell carcinoma as evidenced by mutations of SMAD2 and SMAD4. *Cancer Lett*. 2007; 245: 163-70.
47. Gonzalez-Moles MA, Ruiz-Avila I, Gil-Montoya JA, et al. Analysis of Ki-67 expression in oral squamous cell carcinoma: why Ki-67 is not a prognostic indicator. *Oral Oncol*. 2010; 46: 525-30.
48. Winkinga H, Gerdes J, Traut W. Expression of the proliferation marker Ki-67 during early mouse development. *Cytogenet Genome Res*. 2004; 105: 251-6.
49. Kurokawa H, Matsumoto S, Murata T, et al. Immunohistochemical study of syndecan-1 down-regulation and the expression of the p53 protein or Ki-67 antigen in oral leukoplakia with or without epithelial dysplasia. *J Oral Pathol Med*. 2003; 32: 513–21.
50. Tabor MP, Braakhuis BJ, Van Der Wal JE, et al. Comparative molecular and histological grading of epithelial dysplasia of the oral cavity and the oropharynx. *J Pathol*. 2003; 199: 354–60.
51. Slootweg PJ, Koole R, Hordijk GJ. The presence of p53 protein in relation to Ki-67 as cellular proliferation marker in head and neck squamous cell carcinoma and adjacent dysplastic mucosa. *Eur J Cancer B Oral Oncol*. 1994; 30B: 138–41.
52. Myoung H, Kim MJ, Lee JH, et al. Correlation of proliferative markers (Ki-67 and PCNA) with survival and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma: a clinical and histopathological analysis of 113 patients. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2006; 35: 1005-10.
53. Pereira CS, Oliveira MV, Fraga CA, et al. Impact of the epithelial dysplasia grading and KI-67 proliferation index in the adjacent non-malignant mucosa on recurrence and survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Pathol Res Pract*. 2012; 208: 651-6.
54. Oliveira MLC, Wagner VP, Sant'ana Filho M, et al. A 10-year analysis of the oral squamous cell carcinoma profile in patients from public health centers in Uruguay. *Braz Oral Res*. 2015; (No prelo).
55. Carvalho ALSH, Hildebrand LC, Hass AN, et al. Head and neck squamous cell carcinoma: decline in clinical stage at the time of diagnosis in a reference hospital in southern Brazil. *Applied Cancer Research (Online)*. 2012; 32: 111-115.
56. Kreppel M, Drebber U, Rothamel D, et al. Prognostic impact of different TNM-based stage groupings for oral squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2011; 33: 1467-75.
57. Patel S, Lydiatt W. Staging of head and neck cancers: is it time to change the balance between the ideal and the practical? *J Surg Oncol*. 2008; 97: 653-57.

58. Brandizzi D, Gandolfo M, Velazco M, et al. Clinical features and evolution of oral cancer: A study of 274 cases in Buenos Aires, Argentina. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2008; 13: 544-8.
59. Mishra RC, Singh DN, Mishra TK. Post-operative radiotherapy in carcinoma of buccal mucosa, a prospective randomized trial. *Eur J Surg Oncol*. 1996; 22: 502-4.
60. Rodon J, Carducci MA, Sepulveda-Sánchez JM, et al. First-in-human dose study of the novel transforming growth factor- β receptor I kinase inhibitor LY2157299 monohydrate in patients with advanced cancer and glioma. *Clin Cancer Res*. 2015; 21: 553-60.

4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

A análise de biomarcadores tem se mostrado uma alternativa promissora para a definição do prognóstico e para a melhor escolha do tratamento nos casos de CEC de boca. No presente estudo, não foi encontrada relação entre a marcação de TGF- β 1 e KI-67 com o prognóstico do CEC de boca, porém foi observada uma diminuição da proliferação celular à medida que há um aumento na expressão de TGF- β 1 nas lesões. Novos estudos envolvendo outros possíveis biomarcadores em CEC de boca devem ser realizados para auxiliar na seleção de novos alvos terapêuticos para essas lesões.

REFERÊNCIAS

- AKHURST, R.J.; DERYNCK, R. TGF- β signaling in cancer - a double edged sword. **Trends Cell Biol.**, Cambridge, v. 11, no. 11, p. S44-S51, Nov. 2001.
- ANDISHEH-TADBIR, A.; MEHRABANI, D.; HEYDARI, S.T.J. Epidemiology of squamous cell carcinoma of the oral cavity in Iran. **J. Craniofac. Surg.**, Burlington, v. 19, no. 6, p. 1699-702, Nov. 2008.
- BECK, C.; SCHREIBER, H.; ROWLEY, D. Role of TGF-beta in immune-evasion of cancer. **Microsc. Res. Tech.**, New York, v. 52, no. 4, p. 387-395, Feb. 2001.
- BELLO, I.O.; SOINI, Y.; SALO, T. Prognostic evaluation of oral tongue cancer: means, markers and perspectives (I). **Oral Oncol.**, Oxford, v. 46, no. 9, p. 630-5, Sep. 2010.
- BERTOLINO, P. et al. Transforming growth factor-beta signal transduction in angiogenesis and vascular disorders. **Chest.**, Chicago, v. 128, no. 6 Suppl, p. 585S–590S, Dec. 2005.
- BIERIE, B.; MOSES, H.L. Tumour microenvironment: TGF- β : the molecular Jekyll and Hyde of cancer. **Nat. Rev. Cancer**, London, v. 6, no. 7, p. 506-520, July 2006.
- CALIFANO, J. et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. **Cancer Res.**, Chicago, v. 56, no. 11, p. 2488-92, June 1996.
- CAMPISI, J. Cellular senescence as a tumour-suppressor mechanism. **Trends Cell Biol.**, Cambridge, v. 11, no. 11, p. 27-31, Nov. 2001.
- CHEN, D. et al. MicroRNA Deregulations in Head and Neck Squamous Cell Carcinomas. **J. Oral Maxillofac. Res.**, Kaunas, v. 4, no. 1, p. e2, Apr. 2013.
- CHEN, Y.K. et al. Aberrant expression in multiple components of the transforming growth factor- β 1- induced Smad signaling pathway during 7, 12- dimethylbenz a anthracene- induced hamster buccal pouch squamous-cell carcinogenesis. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 47, no. 4, p. 262-267, Apr. 2011.
- CHENG, S.; LOVETT, D.H. Gelatinase A (MMP-2) is necessary and sufficient for renal tubular cell epithelial – mesenchymal transformation. **Am. J. Pathol.**, Philadelphia, v. 162, no. 6, p. 1937–1949, June 2003.
- CHOI, Y.H.; CHOI, K.C.; PARK, Y.E. Relationship of transforming growth factor beta 1 to angiogenesis in gastric carcinoma. **J. Korean Med. Sci.**, Seoul, v. 12, no. 5, p. 427 – 432, Oct. 1997.
- CONWAY, D.I. et al. Enhancing epidemiologic research on head and neck cancer: INHANCE - The international head and neck cancer epidemiology consortium. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 45, no. 9, p. 743-6, Sep. 2009.
- DERYNCK, R.; AKHURST, R.J.; BALMAIN, A. TGF-beta signaling in tumor suppression and cancer progression. **Nat. Genet.**, New York, v. 29, no. 2, p. 117–129, Oct. 2001.
- DUMONT, N.; ARTEAGA, C.L. Targeting the TGF- β signaling network in human neoplasia. **Cancer Cell**, Cambridge, v. 3, no. 6, p. 531-536, June 2003.

- FERLAY, J. et al. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. **Int. J. Cancer**, Genève, v. 127, no. 12, p. 2893-917, Dec. 2010.
- FRIESS, H. et al. Enhanced expression of transforming growth factor beta isoforms in pancreatic cancer correlates with decreased survival. **Gastroenterology**, Baltimore, v. 105, no. 6, p. 1846-56, Dec. 1993.
- GHOSHAL, S. et al. Carcinoma of the buccal mucosa: analysis of clinical presentation, outcome and prognostic factors. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 42, no. 5, p. 533-39, May 2006.
- GIEHL, K.; IMAMICHI, Y.; MENKE, A. Smad4-Independent TGF- β signaling in tumor cell migration. **Cells Tissue Organs**, Basel, v. 185, no. 1-3, p. 123-130, 2007.
- GORSCH, S.M. et al. Immunohistochemical staining for transforming growth factor beta 1 associates with disease progression in human breast cancer. **Cancer Res.**, Chicago, v. 52, no. 24, p. 6949-52, Dec. 1992.
- HADDAD, R.I.; SHIN, D.M. Recent advances in head and neck cancer. **N. Engl. J. Med.**, Boston, v. 359, no. 11, p. 1143-54, Sep. 2008.
- HALL, B. et al. Targeting of interleukin-13 receptor α 2 for treatment of head and neck squamous cell carcinoma induced by conditional deletion of TGF- β and PTEN signaling. **J. Transl. Med.**, London, v. 11, p. 45, Feb. 2013.
- HASSONA, Y. et al. Progression of genotype-specific oral cancer leads to senescence of cancer-associated fibroblasts and is mediated by oxidative stress and TGF- β . **Carcinogenesis**, New York, v. 34, no. 6, p. 1286-95, June 2013.
- HAWINKELS, L.J.A.C. et al. Active TGF- β 1 correlates with myofibroblasts and malignancy in the colorectal adenoma-carcinoma sequence. **Cancer Sci.**, Tokyo, v. 100, no. 4, p. 663-670, Apr. 2009.
- HE, J.; BAZAN, H.E.P. Epidermal Growth Factor Synergism with TGF- β 1 via PI-3 kinase activity in corneal keratocyte differentiation. **Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.**, St. Louis, v. 49, no. 7, p. 2936-2945, July 2008.
- ITO, K. et al. Neuroendocrine differentiation in a case of acinic cell carcinoma of the parotid gland. **Acta Pathol. Jpn.**, Tokio, v. 40, no. 4, p. 279-87, Apr. 1990.
- JEMAL, A. et al. Cancer statistics, 2002. **CA Cancer J. Clin.**, New York, v. 52, no. 1, p. 23-47, Jan-Feb. 2002.
- JEMAL, A. et al. Cancer Statistics, 2007. **CA Cancer J. Clin.**, New York, v. 57, no. 1, p. 43-66, Jan-Feb. 2007.
- JONES, A.S. Prognosis in mouth cancer: tumour factors. **Eur. J. Cancer B. Oral Oncol.**, Oxford, v. 30B, no. 1, p. 8-15, Jan. 1994.
- KIM, H.S. et al. TGF-beta1 stimulates production of gelatinase (MMP-9), collagenases (MMP-1, -13) and stromelysins (MMP-3, -10, -11) by human corneal epithelial cells. **Exp. Eye Res.**, London, v. 79, no. 2, p. 263-274, Aug. 2004.

KOMINSKY, S.L. et al. TGF- β 1 promotes the establishment of renal cell carcinoma bone metastasis. **J. Bone Miner. Res.**, New York, v. 22, no. 1, p. 37-44, Jan. 2007.

LOGULLO, A.F. et al. Transforming Growth Factor (TGF- β 1) expression in head and neck squamous cell carcinoma patients as related to prognosis. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 32, no. 3, p. 139-145, Mar. 2003.

MARTINS, M.D.; CASTILHO, R.M. Histones: Controlling Tumor Signaling Circuitry. **J. Carcinog. Mutagen.**, Los Angeles, v. 1, no. Suppl 5, p. 1-12, July 2013.

MASCOLO, M. et al. Epigenetic disregulation in oral câncer. **Int. J. Mol. Sci.**, Basel, v. 13, no. 2, p. 2331-53, 2012.

MASSANO, J. et al. Oral squamous cell carcinoma: review of prognostic and predictive factors. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v. 102, no. 1, p. 67-76, July 2006.

MINCIONE, G. et al. Loss of expression of TGF- β 1, T β RI, and T β RII correlates with differentiation in human oral squamous cell carcinomas. **Int. J. Oncol.**, Athenas, v. 32, no. 2, p. 323-33, Feb. 2008.

MORELATTO, R.A.; LOPEZ DE BLANC, S.A. Oral cancer mortality in the province of Cordoba, Argentine Republic in the period 1975-2000: A comparative study with other populations. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal**, Valencia, v. 1, n. 11, p. E230-5, May 2006.

OHTA, M. et al. Positive and negative regulation of podoplanin expression by TGF- β and histone deacetylase inhibitors in oral and pharyngeal squamous cell carcinoma cell lines. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 49, no. 1, p. 20-6, Jan. 2013.

OHYAMA, Y. et al. Inhibition of TGF- β and EGF pathway gene expression and migration of oral carcinoma cells by mucosa-associated lymphoid tissue 1. **Br. J. Cancer**, London, v. 109, no. 1, p. 207-14, July 2013.

OLIVEIRA, L.R.; RIBEIRO-SILVA, A. Prognostic significance of immunohistochemical biomarkers in oral squamous cell carcinoma. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Copenhagen, v. 40, no. 3, p. 298-307, Mar. 2011.

OLIVEIRA, M.L.C. et al. A 10-year analysis of the oral squamous cell carcinoma profile in patients from public health centers in Uruguay. **Braz. Oral Res.**, São Paulo, v. 29, no. 1, 2015. No prelo.

PARDALI, K.; MOUSTAKAS, A. Actions of TGF-beta as tumor suppressor and pro-metastatic factor in human cancer. **Biochim. Biophys. Acta**, Amsterdam, v. 1775, no. 1, p. 21-62, Jan. 2007.

PARKIN, D.M. et al. Global cancer statistics, 2002. **CA Cancer J. Clin.**, New York, v. 55, no. 2, p. 74-108, Mar-Apr. 2005.

SALVADORI, G. et al. Ki-67, TGF- β 1, and elastin content are significantly altered in lip carcinogenesis. **Tumour Biol.**, Tokyo, v. 35, no. 8, p. 7635-44, Aug. 2014.

SEOMUN, Y. et al. Overexpression of matrix metalloproteinase-2 mediates phenotypic transformation of lens epithelial cells. **Biochem. J.**, London, v. 358, no. Pt 1, p. 41–48, Aug. 2001.

SOLAND, T.M.; BRUSEVOLD, I.J. Prognostic molecular markers in cancer – quo vadis? **Histopathology**, Oxford, v. 63, no. 3, p. 297-308, Sep. 2013.

THOMPSON, T.C. et al. Transforming growth factor beta 1 as a biomarker for prostate cancer. **J. Cell Biochem. Suppl.**, New York, v. 16H, p. 54-61, 1992.

VALLECILLO, M. et al. Factors related to survival from oral cancer in an Andalusian population sample (Spain). **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal**, Valencia, v. 12, no. 7, p. E518-23, Nov. 2007.

VAN DER SCHROEFF, M.P.; BAATENBURG DE JONG, R.J. Staging and prognosis in head and neck cancer. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 45, no. 4-5, p. 356-60, Apr-May 2009.

WAGNER, V.P. et al. Immunohistochemical study of TGF- β 1 in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma: correlations between clinicopathological factors and overall survival. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, 2015. No prelo.

WAKEFIELD, L.M.; ROBERTS, A.B. TGF- β signaling: positive and negative effects on tumorigenesis. **Curr. Opin. Genet. Dev.**, London, v. 12, no. 1, p. 22-29, Feb. 2002.

WARNAKULASURIYA, S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 45, no. 4-5, p. 309-16, Apr-May 2009.

WILKINS-PORT, C.E.; HIGGINS, J.P. Regulation of extracellular matrix remodeling following transforming growth Factor- β 1, Epidermal Growth Factor-Stimulated Epithelial-Mesenchymal Transition in human premalignant keratinocytes. **Cells Tissues Organs**, Basel, v. 185, no. 1-3, p. 116-122, 2007.

ZINI, A.; CZERNINSKI, R.; SGAN-COHEN, H.D. Oral cancer over four decades: epidemiology, trends, histology, and survival by anatomical sites. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 39, no. 4, p. 299-305, Apr. 2010.

ANEXO A – CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA

Plataforma Brasil - Ministério da Saúde

Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA / UFRGS

PROJETO DE PESQUISA

Título: CORRELAÇÃO DA IMUNOMARCAÇÃO DE TGF-β1 COM PROLIFERAÇÃO CELULAR EM CARCINOMAS ESPINOCELULARES DE LÍNGUA COM
Área Temática: DIFERENTES PROGNÓSTICOS

Pesquisador: Manoela Domingues Martins

Versão: 2

Instituição: Hospital de Clínicas de Porto Alegre - HCPA / UFRGS

CAAE: 02083012.2.0000.5327

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

Número do Parecer: 36121

Data da Relatoria: 06/06/2012

Apresentação do Projeto:

Trata-se de um estudo retrospectivo. Será realizada uma revisão de prontuários e análise histopatológica. Serão selecionados prontuários médicos de pacientes com laudo histopatológico de carcinoma espinocelular de língua (CID.C02) diagnosticados no período de Janeiro de 2001 a dezembro de 2006 no Serviço de Patologia do Hospital de Clínicas de Porto Alegre. As lâminas de cada caso coradas em H&E serão revisadas por dois patologistas experientes.

Para serem incluídos os prontuários devem estar preenchidos de forma legível e com mais de 70% das informações a serem coletadas disponíveis. As informações da ficha que devem estar presentes são: idade, sexo, fumo (sim ou não), álcool (sim ou não), sítio do tumor, TNM, tratamento, recidiva (sim ou não) e sobrevida. Serão excluídos casos de carcinoma espinocelular extensos que envolvam várias regiões além da língua, por exemplo faringe, e que não seja possível identificar o sítio primário, assim como casos cujo bloco de parafina não esteja disponível ou seja insuficiente para a realização deste estudo.

Objetivo da Pesquisa:

Objetivo Geral

O objetivo do presente estudo será verificar o papel da imunomarcação do TGF-β1 como marcador prognóstico de carcinomas espinocelulares de língua.

Objetivos Específicos

- Verificar se há correlação entre a imunomarcação do TGF-β1 nos cec com diferentes prognósticos e o perfil proliferativo destas lesões.
- Correlacionar os dados de sobrevida dos pacientes com a imunomarcação do TGF-β1.
- Correlacionar o estadiamento clínico dos CEC de língua (TNM) com a imunomarcação do TGF-β1 e com o prognóstico.
- Correlacionar a graduação histopatológica com a imunomarcação do TGF-β1 e com o prognóstico.
- Correlacionar o perfil de recidiva com a imunomarcação do TGF-β1 e com o prognóstico.
- Correlacionar os dados de fatores de risco (fumo) com a imunomarcação do TGF-β1 e com o prognóstico.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Projeto utilizará dados e material biológico armazenado. Os pesquisadores descrevem as formas de preservação da confidencialidade dos participantes. Como benefícios, os pesquisadores mencionam que o trabalho poderá contribuir para o maior conhecimento dos mecanismos de progressão tumoral e sua correlação com a sobrevida dos pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Projeto apresenta-se bastante detalhado, do ponto de vista metodológico.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Pesquisadores apresentam Termo de Compromisso para Uso de Material Biológico.

Recomendações:

Sem outras recomendações.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

- Apresentar o TCUD
Pesquisadores apresentam o documento. Pendência atendida.

- Não foi mencionado o local de realização da análise histopatológica.
Pesquisadores esclarecem o local de realização das análises. Pendência atendida.

Os pesquisadores também detalham os critérios de inclusão e exclusão, conforme recomendação do parecer anterior.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Projeto cadastrado no sistema WebGPPG: 12-0163.

PORTO ALEGRE, 13 de Junho de 2012

Assinado por:
José Roberto Goldim

ANEXO B – FICHA DE LEVANTAMENTO DE DADOS

Ficha de Levantamento de dados:

Prontuário: _____ N° AP _____

Nome do paciente: _____

Idade: _____

Sexo: 1 () masculino 2 () feminino

Ocupação: _____

Cor: 1 () branca 2 () preta 3 () amarela 4 () outra

Residência: 1 () urbana 2 () rural

Fumo: 1 () sim 2 () não

6.1- Tipo: () cigarro () charuto () cachimbo () palheiro () outros.

6.2- Quantidade: _____

6.3- Período de uso: _____

6.4- Ex-fumante há quanto tempo: _____

Alcool: 1 () sim 2 () não

7.1- Tipo: () cerveja () cachaça () whisky () vinho () outros

7.2- Quantidade:

7.3- Período de uso:

7.4- Há quanto tempo parou o uso: _____

Dor: 1 () sim 2 () não

Lesão:

Sítio: 1 () Assoalho 2 () Língua 3 () Palato 4 () Região Retromolar 5 ()

Mucosa Jugal 6 () Rebordo Alveolar 7 () Outros: _____

Aspecto clínico: () mancha branca () mancha vermelha () placa () nódulo () úlcera
() úlcero-vegetante () úlcero-infiltrativo

Tamanho: _____ mm

Tamanho: () Tx () T0 () carcinoma “in situ” () T1 () T2 () T3 () T4

Metástase regional: () NX () N0 () N1 () N2 () N2a () N2b () N2c () N3

Metástase à distância: () MX () M0 () M1

TNM: () Estádio 0 () Estádio I () Estádio II () Estádio III () Estádio IVa () Estádio IVb
() Estádio IVc

Tratamento: 1 () cirurgia 2 () radioterapia 3 () quimioterapia 2 () cirurgia e
radioterapia 4 () cirurgia e quimioterapia 5 () radio e quimioterapia 6 () cirurgia, radio e
quimioterapia

Evolução:

1 () vivo 2 () falecido pelo tumor 3 () falecido por outra causa

Há quantos anos: _____

Recidiva: 1 () sim 2 () não