

**AVALIAÇÃO CLÍNICA, MORFOLÓGICA E MOLECULAR
DO CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL COM
ENVOLVIMENTO MANDIBULAR**

ÉERICA FERNANDA PATRICIO DA SILVA

**Tese apresentada ao Programa de PósGraduação em Oncologia
da Fundação Antônio Prudente para a obtenção do título de
Doutor em Ciências**

Área de Concentração - Oncologia

Orientador: Prof. Dr. Fabio de Abreu Alves

Co-Orientador: Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski

São Paulo

2021

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pelo Ensino Apoio ao aluno da Fundação Antônio Prudente*

S586 Silva, Érica Fernanda Patricio da
Avaliação clínica, histomorfométrica e molecular do carcinoma epidermoide oral com envolvimento mandibular / Érica Fernanda Patricio da Silva – São Paulo, 2021.
69p.
Tese (Doutorado)-Fundação Antônio Prudente.
Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração - Oncologia.
Orientador: Fabio de Abreu Alves

Descritores. 1. Carcinoma de Células Escamosas/Carcinoma, Squamous Cell.
2. Receptor Ativador de Fator Nuclear kappa-B/Receptor Activator of Nuclear Factor-kappa B. 3. Osteoprotegerina/Osteoprotegerin. 4. Interleucina-6/Interleukin-6. 5. Prognóstico/Prognosis. 6. Mandíbula/Mandible.

Elaborado por Suely Francisco CRB 8/2207

*Todos os direitos reservados à FAP. A violação dos direitos autorais constitui crime, previsto no art. 184 do Código Penal, sem prejuízo de indenizações cabíveis, nos termos da Lei nº 9.610/08.

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a todos os pacientes e profissionais da Instituição, não só aqueles que de alguma forma permitiram diretamente a realização desta pesquisa, mas à todos que permitiram que durante esta trajetória eu me tornasse uma pessoa melhor e uma profissional mais competente e humana.

AGRADECIMENTOS

Em primeiro lugar, agradeço a **Deus**, que me faz enxergar diariamente que os seus planos são melhores que os meus, e durante a minha trajetória colocou pessoas maravilhosas na minha vida, tornando toda a jornada mais leve e repleta de aprendizados.

Agradeço à minha mãe **Elisa**, sem ela literalmente nada disso seria possível. Sou grata pelo apoio incondicional na busca pelos meus sonhos, pelo colo nos momentos difíceis e acima de tudo por ser o meu exemplo de força e determinação na vida. À minha tia, **Toninha**, que participou da minha construção pessoal, me ensinou valores e princípios. Me incentivou e incentivava a ser uma pessoa e profissional melhor diariamente. Ao meu tio, **Norberto**, por ele estar sempre ao meu lado, sendo muito mais que tio, sendo pai, amigo, colega de profissão, conselheiro e inspiração. Vocês 3 sem dúvidas são os responsáveis pela pessoa que me tornei e por tudo que realizei até hoje. Amo vocês.

Bruno, que quando entrei no doutorado era meu namorado, se tornou meu noivo no decorrer do caminho e hoje sem dúvidas concluiu essa Tese com o apoio incondicional do meu “marido”. Obrigada por ter encarado essa jornada ao meu lado, apoiado meus sonhos, vivido todos os bons e maus momentos decorrentes da trajetória e acima de tudo por acreditar muito mais em mim do que eu mesma acredito. Te amo.

Ao meu irmão, sogra, cunhados e afilhado por entenderem as ausências e atrasos, pela torcida, pelos momentos compartilhados, por todo amor e compreensão.

Aos meus amigos de sempre para sempre, **Anna, Ana Paula, Bianca, Carla, Ingrid e Gustavo**, que estiveram 100% presentes durante esse doutorado, por escolha própria ou porque eu falava dele a cada reunião e encontro. Obrigada por aturarem toda a minha empolgação diante de uma nova descoberta, meus momentos *drama queen*, e minha falta de conhecimento da cultura pop da década de 80. À **Paula**, pelo ouvido sempre disponível, pelas palavras de conforto e pelas risadas de desespero e ao seu marido, **Rafael** por sempre ter uma piada ou pilúla de ensinamento para me fornecer nos piores momentos. Ao Durval e Dominique pela amizade, pelos bons momentos e pelas palavras de força sempre que eu imaginei que nada daria certo. Muito Obrigada!

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Fábio Alves**, obrigada por ter aberto as portas do A.C. Camargo Cancer Center e do Departamento de Estomatologia para mim. Por todos os ensinamentos ao longo desses 4 anos, por ter confiado a mim a realização deste trabalho, pelo

apoio nos momentos difíceis, pelos puxões de orelha que sem dúvidas me fizeram crescer, por todo o conhecimento de profissão e vida que o senhor me proporcionava a cada encontro, e acima de tudo pela amizade durante toda a jornada.

Ao **Prof. Dr. Luiz Paulo Kowalski**, meu co-orientador, por abrir as portas do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço para mim e para que essa pesquisa fosse realizada. Ao **Dr. Hugo Fonta Köhler**, por todos os ensinamentos e colaboração para a realização do levantamento retrospectivo da pesquisa. Sua prontidão em me ensinar as abreviações, explicar termos cirúrgicos ou discutir resultados foram fundamentais para a conclusão deste estudo.

Ao **Dr. Gustavo Davi Rabelo**, por dividir o seu estudo e amor pelas células ósseas comigo. Se não fosse você jamais teria conhecido e entendido a complexidade e beleza envolvidos na reabsorção óssea. Obrigada por acreditar que eu seria capaz de participar deste e dos seus outros estudos em andamento na Instituição.

À **Dra. Graziella**, obrigada por todo o conhecimento compartilhado, por ser uma inspiração de mulher na nossa área e pela amizade desenvolvida durante esses 4 anos. Você sem dúvidas é um Anjinho que Deus colocou na minha vida, não tenho palavras para agradecer aquele café que tomamos juntas e resultou em um diagnóstico certo. Obrigada Amiga.

Aos titulares do Departamento de Estomatologia - **Dr. André Carolli, Dra. Stella, Dra. Juliane**, e em especial aos que estiveram mais presentes durante esta trajetória, **Dr. Rodrigo**, pelas cirurgias partilhadas, pelos conselhos, pelo café partilhado e pela amizade criada. E ao **Dr. Divaldo**, que sempre se mostrou sensível a todas minhas alterações de humor, sabendo dar no momento exato uma palavra de carinho e conforto. O senhor esteve comigo nas aulas de quarta, na minha consulta com Dr. Mauro e comemorando muitas realizações durante esse período.

A todos os meus colegas da Pós-Graduação, em especial aos que se tornaram amigos, **Leticia e Teresa**, pela amizade, conversas, desabafos, créditos compartilhados, papers escritos, apoio nos momentos difíceis e por todos os momentos de descontração. Nosso trio!

À todos os residentes do Departamento de Estomatologia, que convivi durante este período, em especial **Camila, Gabi, Juzinha e Daphine**. Muito obrigada, por toda disponibilidade em me ajudar, em me ensinar como acessar exames e prontuários, pela amizade criada, pelos momentos compartilhados, choros, risadas e “Marcio”.

Agradeço ao **Dr. Clovis Pinto**, e todo Departamentos de Anatomia Patológica pelo auxílio no decorrer do projeto. A equipe do **Laboratório de Histologia-IHQ-TMA**, pela ajuda na localização dos casos incluídos no projeto e na confecção de novas lâminas para análise.

Agradeço ao **Grupo da Patologia Investigativa do CIPE** em especial a **Dra. Cláudia Malheiros Coutinho-Camilo** e a técnica **Katia Klug**, por participarem do projeto, me receberem no laboratório durante a Pandemia para a realização das etapas laboratorias. Por todos os experimentos realizados, placas repetidas, rezas pré análise das curvas, por tornarem tudo tranquilo e claro como jamais imaginei que seria. Sem dúvidas minha estadia ai já me deixa com saudades.

Agradeço ao **Biobanco da Instituição**, principalmente a responsável, **Eloisa H. R. Olivierie** a técnica **Ana Paula Mitsue Suenaga** por toda colaboração no projeto, por todas as explicações e acima de tudo pela boa vontade, bom humor e sorrisinho no rosto que me atendiam todas as vezes que eu aparecia para solicitar alguma coisa com prazo de entrega de 1 dia.

Ao Departamento de Estatística da Instituição, especialmente a **Barbara Beltrame Bettim**, por todas as análises realizadas e disponibilidade em me explicar várias vezes os testes estatísticos realizados e a correta interpretação dos resultados.

À todas as **funcionárias da Pós-Graduação, escritório de projetos e Centro Internacional de Pesquisa e Ensino** pela presteza, competência e auxílio que foram essenciais para o bom funcionamento deste doutorado. Em especial a **Luciana Pitombeira**, por achar soluções para os meus maiores problemas e a **Suely Francisco**, por conseguir fazer milagre para a entrega desta Tese.

Agradeço em nome da **Prof. Dra. Paula Dechichi**, do Instituto de Ciências Biomédicas da **Universidade Federal de Uberlândia** pela viabilização de alguns experimentos realizados no decorrer do projeto.

À minha banca de qualificação **Dr. Fábio Daumas Nunes** e **Dr. Mauro Kazuo Ikeda**, agradeço por todas as correções e sugestões, que foram importantes para melhorar este trabalho. E em especial ao **Dr. Mauro**, agradeço por toda a paciência que teve comigo como sua paciente e pelos conselhos e orientações que recebi a cada encontro no Hospital.

Ao **Conselho de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)**, pelo auxílio pecuniário recebido através do Edital Universal (número 442778/2014-7), e à **Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES)**, pelo apoio financeiro que me possibilitou a realização deste trabalho.

RESUMO

Silva EFP. **Avaliação clínica, morfológica e molecular do carcinoma epidermoide oral com envolvimento mandibular.** [Doutorado] São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2021.

O carcinoma epidermoide (CEC) é a neoplasia maligna mais frequente em cavidade oral, representando aproximadamente 90% de todos os cânceres da boca. Esta neoplasia tem origem no epitélio de revestimento bucal, e a depender do subtipo e da sua localização, pode apresentar tendência marcante de invasão do tecido ósseo adjacente. Existe uma interação entre osso e neoplasia, e atenção principal deve ser dada aos reguladores relacionados à osteoclastogênese. As moléculas RANK/RANKL/OPG são fundamentais neste processo, e juntamente com a IL-6, promovem formação e ativação de osteoclastos, com conseqüente promoção da invasão mandibular. Neste sentido, o objetivo do estudo foi avaliar as características clínicas, radiográficas e histopatológicas dos pacientes submetidos a mandibulectomia para tratamento do carcinoma epidermoide oral, e correlacionar/associar com a expressão gênica na neoplasia de marcadores reguladores da invasão óssea. Foi realizado um estudo retrospectivo de pacientes tratados com algum tipo de mandibulectomia no A.C. Camargo Cancer Center durante o período de 1990 a 2015. Um total de 220 casos foi selecionado, e destes, foram extraídos 40 casos, posteriormente submetidos às etapas de análise molecular. A análise molecular foi realizada por PCR quantitativa em tempo real (qPCR), por meio da mensuração de mRNA para os genes estudados, calibrados pelo gene endógeno GAPDH e por um *pool* de controle composto por RNA não neoplásico. Dos 220 pacientes incluídos na pesquisa, 161 eram do sexo masculino, a idade média foi de 60 anos, e 53,6% eram etilistas e 66,8% tabagistas. A invasão óssea da mandíbula foi observada através do laudo anatomopatológico em 77 pacientes, e foi associada à presença de margens comprometidas/exúguas e a localização da lesão (gengiva inferior, rebordo e região retro-molar). Ao final do estudo, 127 pacientes foram a óbito, e a média de sobrevivência foi de 96,92 meses. Parâmetros clínicos, dos exames de imagem e histopatológicos foram significativamente associados com a sobrevivência global, principalmente - tamanho do tumor, infiltração perineural, invasão óssea (imagem e anatomopatológico). Na análise multivariada, apenas invasão óssea e infiltração perineural aumentaram o risco de óbito nos pacientes. Na análise molecular de expressão gênica foi possível avaliar que das 36 amostras do gene

RANK, 16 eram downreguladas. Para RANKL, das 37 amostras, 28 estavam super expressas. Das 35 do gene da IL-6, 19 amostras eram downreguladas. E por fim, das 37 amostras do gene da OPG, 16 tinham expressão normal. A avaliação de associação entre a expressão dos genes analisados demonstrou que o gene da IL-6 está associado a presença de invasão óssea, e que existe uma associação significativa entre as expressões do RANK, RANKL, OPG e IL-6. Maior sobrevida dos pacientes foi associada significativamente a uma expressão mais baixa de IL-6 (108,5 meses). Conclui-se que a invasão mandibular interfere na sobrevida global dos pacientes, e que este mecanismo de invasão óssea está associado com a expressão gênica dos genes RANK, RANKL, OPG e IL-6. A IL-6 downregulada nas células malignas está associada com maior sobrevida.

Descritores: Carcinoma de Células Escamosas. Receptor Ativador de Fator Nuclear kappa-B. Osteoprotegerina. Interleucina-6. Prognóstico. Mandíbula.

ABSTRACT

Silva EFP. **[Clinical, morphological and molecular evaluation of oral squamous cell carcinoma with mandibular invasion]**. [Doutorado] São Paulo; Fundação Antônio Prudente; 2021.

Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) is the most frequent malignant neoplasm in the oral cavity, representing 90% of all oral cancers. The tumor usually arises within the epithelium lining of the oral cavity, and in cases of certain subtype or location may reveal a tendency for invasion of the surrounding bone tissue. There is a relation between tumor and bone, and more attention should be given to the events related to osteoclastogenesis. The molecules RANK/RANKL/OPG are crucial in this process, and together with IL-6, promotes the formation and activation of osteoclasts, with influence on the mandibular invasion process. In this way, the aim of this study was to evaluate the clinical, demographic, imaging, and histopathology data of patients diagnosed with OSCC treated by mandibulectomy. Also, analyze the gene expression condition of the genes RANK, RANKL, OPG, and IL-6 on the tumor. A retrospective study was conducted on patients treated with mandibulectomy at the A.C.Camargo Cancer Center, between 1990 and 2015. Two hundred and twenty cases were retrieved, and 40 of them were selected for gene expression analysis. The mRNA expressions of the selected genes were determined by real-time polymerase chain reaction, extracted from the tumor, and calibrated by endogenous GAPDH and a control pool of non-neoplastic RNA. Among 220 patients, 161 were male, with a mean age of 60 years. 53.6% were alcohol users and 66.8% tobacco users. Mandible bone invasion was reported on 77 histopathology reports and associated with compromised margins and the site of the lesion (gingiva, alveolar ridge, and retromolar region). One hundred and twenty-seven patients died of the disease, and the mean overall survival rate was 96.92 months. Overall survival was associated with clinical, imaging, and pathological parameters, especially, tumor size, perineural growth, and bone invasion (both imaging and pathologic). Multivariate analysis revealed higher risk of death only to bone invasion and perineural growth. Gene expression analysis revealed - 16 downregulation of 36 RANK samples evaluated; 28 overexpression of 37 RANKL samples evaluated; 19 downregulation of 35 IL-6 analyzed, and 16 normal expression of 37 OPG samples evaluated. Association analysis revealed that IL-6 expression is associated with bone

invasion, and there is also a significant association among the expression of RANK, RANKL, OPG, and IL-6. Higher overall survival rate was associated with an IL-6 down expression (108;5 months). In conclusion, mandibular invasion interferes with the patient's overall survival rate, and the bone invasion mechanism is associated with gene expression of RANK, RANKL, OPG, and IL-6 on the tumor. IL-6 in downregulation expressed by malignant cells is associated with higher overall survival rates.

Keywords: Carcinoma, Squamous Cell. Receptor Activator of Nuclear Factor-kappa B. Osteoprotegerin. Interleukin-6. Prognosis. Mandible.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	Papel do sistema RANK/RANKL/OPG no metabolismo ósseo	3
Figura 2	Fluxograma esquemático exibindo o número de casos avaliados em cada uma das etapas do estudo	19
Figura 3	Desenho esquemático que mostra a interdependência entre as etapas realizadas no estudo	20
Figura 4	Seleção da referência para a normalização dos resultados de expressão gênica	22
Figura 5	Visão geral dos experimentos de biologia molecular realizados no projeto	23
Figura 6	Avaliação da Função de sobrevivência em meses para 218 pacientes incluídos no projeto	32
Figura 7	Avaliação da função de sobrevivência em meses em relação ao tamanho do tumor	34
Figura 8	Avaliação da função de sobrevivência em meses em relação ao comprometimento linfonodal clínico	34
Figura 9	Avaliação do estadiamento clínico dos pacientes e a função de sobrevivência em meses	35
Figura 10	Avaliação da função de sobrevivência em meses em relação ao diagnóstico de invasão óssea proveniente do laudo do exame de imagem	35
Figura 11	Avaliação do comprometimento das margens cirúrgicas em relação a função de sobrevivência em meses	36
Figura 12	Análise da presença de Invasão óssea em relação a sobrevida dos pacientes em meses	36

Figura 13	Avaliação da invasão da musculatura esquelética e sobrevida em meses.....	37
Figura 14	Avaliação da infiltração perineural correlacionada à sobrevida em meses.....	37
Figura 15	Avaliação da embolização linfática correlacionada a sobrevivência em meses	38
Figura 16	Avaliação da função de sobrevivência em meses em relação a presença de ruptura capsular.....	38
Figura 17	Avaliação da função de sobrevivência em meses em relação as características patológicas do tumor.....	39
Figura 18	Avaliação da função de sobrevivência em meses em relação ao comprometimento linfonodal patológico.....	39
Figura 19	Avaliação da expressão gênica, dos genes avaliados categorizada.....	42
Figura 20	Gráfico boxplot do gene RANKL realizado para 19 amostras com invasão óssea e 18 amostras sem invasão óssea.....	47
Figura 21	Gráfico boxplot do gene RANK realizado para 19 amostras com invasão óssea e 17 amostras sem invasão óssea.....	47
Figura 22	Gráfico boxplot do gene OPG realizado para 19 amostras com invasão óssea e 18 amostras sem invasão óssea.....	48
Figura 23	Gráfico boxplot do gene IL-6 realizado para 18 amostras com invasão óssea e 17 amostras sem invasão óssea.....	48
Figura 24	Avaliação da sobrevida em meses em relação a expressão do gene RANKL ...	51
Figura 25	Avaliação da sobrevida em meses em relação a expressão do gene RANK.....	51
Figura 26	Avaliação da sobrevida em meses em relação a expressão do gene OPG.....	52
Figura 27	Avaliação da sobrevida em meses em relação a expressão do gene IL-6.....	52

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	TNM correspondente ao ano do diagnóstico	18
Tabela 2	TNM 8a edição	18
Tabela 3	Estadiamento Clínico.....	18
Tabela 4	Sequência de nucleotídeos dos genes estudados	22
Tabela 5	Características clínicas e demográficas dos 220 pacientes incluídos no projeto.....	26
Tabela 6	Características provenientes do laudo anatomopatológico dos 220 pacientes incluídos no projeto	27
Tabela 7	Características dos tratamentos realizados pelos 220 pacientes incluídos no projeto, recorrências e última informação coletada.....	28
Tabela 8	Associação entre invasão óssea observada no exame de imagem e no anatomopatológico.....	29
Tabela 9	Associação da invasão óssea diagnosticada no laudo anatomopatológico e as características microscópicas das margens cirúrgicas.....	29
Tabela 10	Associação da localização da lesão e o diagnóstico de invasão óssea no laudo anatomopatológico.....	30
Tabela 11	Análise da maior medida da neoplasia (medida 1), da profundidade de invasão da lesão (medida 3) e o diagnóstico de invasão óssea após análise anatomopatológica.....	30
Tabela 12	Análise da maior medida da neoplasia (medida 1) com invasão óssea e o comprometimento linfonodal	31

Tabela 13	Análise da profundidade de invasão da neoplasia (medida 3) com invasão óssea e o comprometimento linfonodal.....	31
Tabela 14	Análise da invasão óssea e o estadiamento clínico dos pacientes incluído no projeto.....	32
Tabela 15	Análise da sobrevida em relação as variáveis TN clínico, laudo do exame de imagem, margens cirúrgicas, invasão óssea, invasão muscular esquelética, infiltração perineural, embolização linfática, ruptura capsular, TN patológico.....	33
Tabela 16	Modelo de Regressão de Cox simples da sobrevida com as variáveis TN clínico, TN patológico, estadiamento clínico, laudo de invasão óssea no exame de imagem, invasão óssea laudo anatomopatológico, invasão muscular esquelética, infiltração perineural, embolização linfática, ruptura capsular e margens cirúrgicas.....	40
Tabela 17	Modelo de regressão de COX múltiplo da sobrevida com as variáveis, invasão óssea, invasão muscular esquelética, infiltração perineural, embolização linfática e T clínico.....	41
Tabela 18	Resultado do teste do gene endógeno no NormFinder.....	41
Tabela 19	Expressão relativa dos genes estudados no projeto nas amostras de neoplasia (CEC) avaliadas.....	42
Tabela 20	Associação da expressão relativa dos genes estudados no projeto no grupo com invasão óssea e sem invasão óssea, mostrando associação significativa para o gene IL-6.....	43
Tabela 21	Análise molecular entre expressão gênica da OPG e demais parâmetros clínicos e patológicos.....	43
Tabela 22	Análise molecular entre expressão gênica da IL-6 e demais parâmetros clínicos e patológicos.....	44

Tabela 23	Análise molecular entre expressão gênica do RANK e demais parâmetros clínicos e patológicos.....	44
Tabela 24	Análise molecular entre expressão gênica do RANKL e demais parâmetros clínicos e patológicos.....	45
Tabela 25	Análise da associação da expressão do RANK, RANKL, OPG e IL-6.....	46
Tabela 26	Correlação entre expressão gênica e sobrevida média dos pacientes	49
Tabela 27	Pacientes com a expressão da IL-6 normal e que foram à óbito	50

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CEC	Carcinoma epidermóide
Covid-19	Do inglês, Corona Virus Disease (Doença do Coronavírus), “19” se refere a 2019
Feedback	Do inglês, retroalimentação
GLOBOCAN	Do inglês, The Global Cancer Observatory, Observatório Global do Câncer.
H&E	Hematoxilina e Eosina
HSC	Célula-tronco hematopoiética
IL-11	Interleucina 11
IL-6	Interleucina 6
INCA	Instituto Nacional do Câncer
M-CSF	Fator de estimulação de colônia de macrófagos
MSC	Célula-tronco mesenquimal
NF-kB	Fator nuclear Kappa B
OPG	Osteoprotegerina
PGE2	Prostaglandina E 2
PTH	Hormônio da paratireoide
qPCr	Amplificação por PCR quantitativa em tempo real
Qtx	Quimioterapia
RANK	Receptor ativador do fator nuclear Kappa B
RANKL	Ligante do receptor ativador do fator nuclear Kappa B
RGH	Número de indentificação do paciente
RM	Ressonância magnética
Rtx	Radioterapia
sRank	RANK solúvel
STATs	Do inglês, <i>signal transducers and activators of transcription</i> , traduzido como transdutores de sinal e ativadores de transcrição
TC	Tomografia computadorizada
TCFC	Tomografia computadorizada de feixe conico
TCLE	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
TNF	Fator de Necrose Tumoral

TNM	Do inglês, <i>Tumor-Node-Metastasis</i> - Sistema de estadiamento clínico que avalia o tamanho do tumor, envolvimento do linfonodo regional e presença de metástase à distância
TRAP	Fosfatase ácida resistente ao tartarato
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	1
1.1	Carcinima epidermóide oral (CEC).....	1
1.2	Osteoclastogênese e Reabsorção Óssea.....	2
1.2.1	Células ósseas	2
1.2.2	Fisiologia do sistema RANK/RANKL/OPG.....	4
1.2.3	IL-6 em condições fisiológicas.....	5
1.3	Invasão Mandibular	5
1.3.1	Aspectos clínicos e anatomopatológicos da invasão mandibular pelo CEC	5
1.3.2	Mecanismos celulares e moleculares da invasão.....	7
1.3.2.1	Sinalização RANK/RANKL/OPG na neoplasia.....	8
1.3.2.2	Sinalização IL-6 na neoplasia.....	10
1.4	Tratamento e prognóstico do CEC	10
1.5	Justificativa	13
2	OBJETIVOS	15
2.1	Objetivo Geral.....	15
2.2	Objetivos Específicos	15
3	MATERIAL E MÉTODOS	16
3.1	Característica do estudo.....	16
3.2	Etapas laboratoriais.....	18
3.2.1	Casuística.....	18
3.2.2	Análise da expressão gênica	20
3.2.2.1	Extração do RNA total.....	20
3.2.2.2	Amplificação por PCR quantitativa em tempo real (qPCR).....	21
3.3	Análise estatística	24
4	RESULTADOS	25
4.1	Parâmetros clínicos.....	25
4.1.1	Dados clínicos, radiográficos e histopatológicos.....	25

4.1.2	Associação com invasão óssea	28
4.1.3	Associação entre invasão óssea (laudo anatomopatológico) com as margens cirúrgicas.....	29
4.1.4	Associação da localização do tumor com a invasão óssea	29
4.1.5	Associação das medidas da neoplasia (laudo anatomopatológico) com a invasão óssea.....	30
4.1.6	Associação entre estadiamento e invasão óssea	31
4.1.7	Avaliação da sobrevida global.....	32
4.2	Análise molecular	41
5	DISCUSSÃO	53
6	CONCLUSÃO.....	60
7	REFERÊNCIAS.....	61

ANEXOS

Anexo 1 Carta de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP

Anexo 2 Termo de dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE

APÊNDICE

Apêndice 1 Ficha para coleta de dados-REDCap

1 INTRODUÇÃO

1.1 CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL (CEC)

O CEC é a neoplasia maligna mais comum das vias aéreas digestivas superiores ¹, excluindo o câncer de pele não melanoma, sendo responsável por 30% de todos os cânceres desta região ². Clinicamente, tem em sua apresentação mais clássica uma lesão ulcerada, com bordas endurecidas e elevadas. Histologicamente, 95% dos casos são originados do epitélio de revestimento, e por isso, denominados carcinoma espinocelular ou carcinoma de células escamosas ou carcinoma epidermóide (CEC) ³, cuja principal característica é a proliferação de células epiteliais de forma desordenada invadindo o tecido conjuntivo subjacente em forma de cordões ou ilhas ⁴. Na cavidade bucal, a região mais acometida é a língua (principalmente as bordas), seguida de assoalho de boca e lábio inferior ⁵.

No mundo, em 2020 segundo o Globocan, foram diagnosticados 377 mil novos casos, sendo 264 mil em homens e 113 mil em mulheres, e 177 mil óbitos, sendo a maior incidência da doença ocorrendo na Ásia, em torno de 65,8% (248 mil pessoas) ^{6,7}. De acordo com as estimativas do Instituto Nacional de Câncer no Brasil, o INCA, para o triênio 2020-2022, um total de 15.190 novos casos são diagnosticados a cada ano com 6.455 óbitos ⁵. Um estudo americano que avaliou os impactos da pandemia da Covid-19 no diagnóstico e tratamento do câncer demonstrou uma redução de 46% de casos nos Estados Unidos, 40% na Holanda, chegando a 70% na redução de diagnóstico e tratamento no Reino Unido ⁸, fato que vai de encontro a redução no número de casos no Brasil. No geral, sua prevalência é 2,5 vezes maior no sexo masculino, acometendo principalmente pacientes na faixa dos 50-60 anos ⁹.

Os principais fatores de risco associados a doença incluem o tabagismo e o etilismo, sendo responsáveis por 80% do risco de se desenvolver a doença ¹⁰, e a associação destes dois hábitos é responsável por um risco 30 vezes maior, quando comparado aos indivíduos sem esses hábitos ^{11,12}. Outros fatores de risco incluem - dieta, nutrição inadequada, exposição ao sol (para o câncer de lábio), infecção pelo HPV (para o câncer de orofaringe) e susceptibilidade genética ¹³⁻¹⁵.

A classificação dos CECs, assim como das outras neoplasias malignas, é realizada através do sistema de estadiamento clínico TNM, permitindo a padronização da doença de acordo com o tamanho do tumor no sítio primário (T), acometimento de linfonodos regionais

(N) e presença de metástases à distância (M), seguido de números que classificam cada um desses parâmetros. O estadiamento representa uma quantificação dos parâmetros clínicos, definindo o estágio clínico do paciente e direcionando a melhor opção de tratamento e uma indicação do seu prognóstico ^{16,17}.

Ainda sobre a classificação, esta leva em consideração também a progressão da lesão e o comprometimento de tecidos adjacentes. A doença apresenta comportamento invasivo, e com frequência, devido à sua progressão pode infiltrar os tecidos subjacentes como - músculos, nervos e osso. Dependendo da sua localização e do seu subtipo histológico, pode apresentar uma tendência marcante de invasão do tecido ósseo adjacente. O envolvimento ósseo pode variar de 12% a 67,5% dos casos, resultando em um pior prognóstico ^{18,19}.

Os tumores são classificados como T4 quando ocorre acometimento de estruturas adjacentes (4a – invasão de osso cortical, músculos da língua, seio maxilar e/ou pele; 4b – invasão do espaço mastigatório, pilar pterigoideo, base do crânio, ou, casos que envolvam a carótida e/ou fáscia pré-vertebral)¹⁷. De acordo com o sítio primário e o grau de diferenciação, a neoplasia apresenta um padrão de dispersão particular, influenciando na tomada de decisões e no prognóstico ²⁰⁻²². A invasão óssea está incluída neste processo de classificação, e deve ser estudada com vistas a identificação da participação das células ósseas e outros reguladores no mecanismo de reabsorção do osso quando a neoplasia progride.

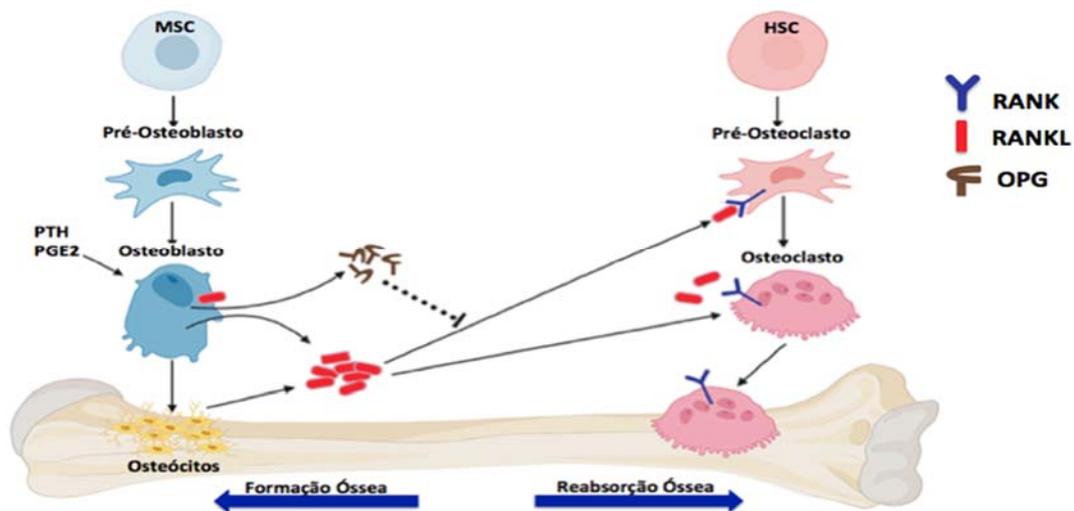
1.2 OSTEOCLASTOGÊNESE E REABSORÇÃO ÓSSEA

1.2.1 Células ósseas

As principais células ósseas são os osteoblastos, osteoclastos, osteócitos e células progenitoras, que possuem funções de regulação, formação e reabsorção óssea. Os osteoblastos têm sua origem nas células mesenquimais indiferenciadas e pluripotenciais, e quando atingem a superfície óssea, são consideradas células maduras, e apresentam como características morfológicas um formato cubóide, polarização nuclear e geralmente são encontradas dispostas em paliçada. Não possuem capacidade de divisão celular, mas são células metabolicamente muito ativas, tendo papel fundamental na formação do tecido ósseo e na diferenciação e atividade dos osteoclastos. Em suma, são responsáveis pela sintetização e mineralização de matriz óssea. Possuem receptores para muitos hormônios, fatores de crescimento e citocinas que controlam a reabsorção óssea, e apresentam em sua membrana plasmática algumas moléculas, em especial RANKL e OPG, que atuam como ativadores e

inibidores, respectivamente, da formação e atividade de osteoclastos. Portanto, existe um consenso de que são as células osteoblásticas, e não os osteoclastos, que desencadeiam o processo de reabsorção óssea ²³.

Os osteoclastos são derivados de células tronco-hematopoiéticas, caracterizados como células gigantes, multinucleadas, diferenciadas terminalmente, com um tempo de vida curto, que sofrem apoptose rápida na ausência de algumas citocinas e com capacidade de reabsorver tecido mineralizado ^{24,25}. A reabsorção óssea osteoclástica consiste em várias etapas - a proliferação de precursores de osteoclastos que pertencem às células hematopoiéticas, diferenciação de progenitores em pré-osteoclastos mononucleares, fusão destes em osteoclastos multinucleados, mudança fenotípica com a formação da zona clara (anel de actina) e alteração citoesquelética com a formação de bordas em escovas (ativação durante a reabsorção), e por fim, apoptose ²⁶. Para o desenvolvimento e ativação dos osteoclastos, a dita osteoclastogênese, são necessárias 3 proteínas cruciais - o receptor ativador do ligante NF- κ B (RANKL), seu receptor RANK e seu receptor chamariz, osteoprotegerina (OPG) ²⁷, que estão envolvidas no metabolismo ósseo em condições patológicas e normais ²⁸ (**Figura 1**).



Fonte - Adaptado de Ming et al. ²⁹

Figura 1 - Papel do sistema RANK/RANKL/OPG no metabolismo ósseo. O RANKL é secretado pelos osteoblastos e osteócitos quando estimulado pelo hormônio da paratireoide (PTH) e prostaglandina 2 (PGE2). Este liga-se ao RANK na membrana dos pré-osteoclastos, promovendo a osteoclastogênese e posterior ativação dos osteoclastos, resultando na reabsorção óssea pelo osteoclasto maduro. A ligação da OPG ao RANKL inibe a sinalização do RANK e conseqüentemente a reabsorção óssea.

HSC= célula-tronco hematopoiética; MSC= célula-tronco mesenquimal.

A via de sinalização RANKL/RANK, juntamente com o fator de estimulação de colônia de macrófagos (M-CSF), regula a diferenciação de osteoclastos dos progenitores de monócitos / macrófagos ^{27,28}, enquanto a adição de OPG a esse sistema impede a osteoclastogênese ³⁰. O RANKL é produzido por células ósseas ou é advindo do ligamento periodontal em resposta a forças mecânicas. Seu receptor de membrana RANK é encontrado em células precursoras de osteoclastos. Vários tipos de células produzem osteoprotegerina (OPG), uma citocina com afinidade ao RANKL e efeito inibitório sobre ele ³⁰. O equilíbrio entre formação e reabsorção óssea está na dependência das flutuações locais do RANKL/OPG.

A presença de altos níveis de RANKL favorecem a osteoclastogênese, enquanto uma maior expressão da OPG resulta na diminuição deste fenômeno, portanto, o sistema RANK/RANKL/OPG desempenha um papel regulador fundamental sobre a osteoclastogênese. Faz-se necessário entender os mecanismos principais relacionados à osteoclastogênese, para posteriormente, entender como este funciona em condições fisiológicas e patológicas durante a reabsorção óssea.

1.2.2 Fisiologia do sistema RANK/RANKL/OPG

RANK, também conhecido como receptor ativador do fator nuclear kappa B, é uma proteína transmembrana tipo I, membro da superfamília de receptores do TNF, localizado na superfície de progenitores de osteoclastos hematopoiéticos, osteoclastos maduros, células dendríticas, entre outras ³¹. É uma proteína receptora responsável pelo controle da osteoclastogênese ³² e metabolismo do cálcio, não apresenta atividade enzimática intrínseca, sua ativação e função que resultam na formação de osteoclastos funcionais só ocorrem após a ligação deste com o RANKL ³³.

RANKL, ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B, é uma proteína transmembrana do tipo II, membro da família de ligantes do TNF, que é expressa em células como osteoblastos e células T, sendo um requisito para o desenvolvimento de osteoclastos ²⁷. Desempenha papel fundamental na regulação da diferenciação dos osteoclastos, sendo indispensável para a ocorrência de osteoclastogênese ³⁴⁻³⁶. O RANKL é produzido no osso trabecular, na medula óssea, na placa epifisária, no periósteo, no baço, no timo e nos nódulos linfáticos ^{37,38}. A deficiência em RANKL leva a ausência completa de osteoclastos multinucleados, demonstrando a importância desta molécula para formação de osteoclastos e o desenvolvimento imunológico. Sua expressão pode ser regulada positivamente por fatores de

reabsorção óssea, tais como a IL-6, sendo que esta coordena indiretamente a osteoclastogênese³⁹.

A osteoprotegerina (OPG), também conhecida como fator inibidor dos osteoclastos, foi inicialmente descoberta em 1997⁴⁰, é um membro da superfamília de receptores TNF, assim como o RANK, mas, ao contrário de todos os outros membros da família, não possui um domínio transmembrana e representa um receptor de TNF segregado⁴¹. É produzida e liberada pelos osteoblastos ativados e expressa por células estromais, por osteoblastos, por osteócitos e por fibroblastos.

A molécula de OPG apresenta uma sequência homóloga ao RANK, portanto, demonstrando alta afinidade para o ligante RANKL, impedindo com isso a ligação do RANK e conseqüentemente, sua ativação e a interação RANK/RANKL e inibição da diferenciação osteoclástica^{34,35}. A ligação RANKL/OPG inibe a estimulação da osteoclastogênese, inibindo assim a reabsorção óssea⁴², ou seja, desempenhando um papel importante na regulação do metabolismo ósseo, uma vez que inibe a maturação e ativação dos osteoclastos.

1.2.3 IL-6 em condições fisiológicas

A interleucina (IL) 6, é uma citocina potente, pró-inflamatória, que possui uma infinidade de funções fisiológicas, incluindo a diferenciação de linfócitos, proliferação e sobrevivência celular, atua nas vias de apoptose, tem efeitos no metabolismo ósseo e no metabolismo geral, e algumas funções endócrinas⁴³. Sua secreção é induzida pelo fator de necrose tumoral- α (TNF- α), prostaglandina 2 (PGE2) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), entre outros^{44,45}. É uma citocina que estimula a reabsorção óssea osteoclástica por induzir a expressão de RANKL em osteoblastos⁴⁶, criando um microambiente adequado para osteoclastogênese^{39,47}.

1.3 INVASÃO MANDIBULAR

1.3.1- Aspectos clínicos e anatomopatológicos da invasão mandibular pelo CEC

Um das características anatômicas da cavidade oral é que a mucosa alveolar e a gengiva se encontram em íntima proximidade com o osso da mandíbula, permitindo que, nos casos de CEC acometendo estas regiões, a lesão infiltre facilmente o osso. Brown et al.²⁰ relataram que a entrada do tumor no osso aconteceu na região de contato em 13 pacientes, e que em 50% dos casos a invasão óssea em região desdentada de mandíbula ocorreu pela face

oclusal superficial. Inicialmente, acreditava-se que a invasão ocorria pelo envolvimento através das vias linfáticas no periósteo mandibular^{15,48}, no entanto, na atualidade já se encontra bem estabelecido que a invasão ocorre por extensão direta do tumor e não por disseminação linfática^{49,50}.

A ocorrência de invasão óssea é um fator importante para a escolha do tratamento adequado para cada paciente^{49,51}. Porém, o diagnóstico pré-operatório é desafiador, principalmente por ser realizado com base em exames de imagem, cuja sensibilidade e especificidade para o diagnóstico da invasão óssea são variáveis. Em revisão sistemática realizada por Uribe et al.⁵¹ em 2013, foi observado uma precisão diagnóstica da invasão mandibular de moderada para alta, com valores de sensibilidade de 94% para ressonância magnética (RM), 91% para tomografia computadorizada de feixe cônico (TCFC), 83% para tomografia computadorizada (TC) e 55% para radiografia panorâmica, e com valores de especificidade de 100% (TC, RM, TCFC) e 91,7% (radiografia panorâmica), respectivamente.

O CEC de cavidade oral que apresenta invasão óssea é classificado como T4 desde 1977, conforme a primeira edição do manual de estadiamento do câncer, *AJCC Cancer Staging Manual* (American Joint Committee on Cancer). Contudo, mesmo com tantos estudos e relatos na literatura, ainda hoje, existem controvérsias quanto a esta classificação⁵². A oitava edição do *AJCC Cancer Staging Manual* e da União Internacional Contra o Câncer (UICC) a classifica a invasão mandibular por carcinoma da cavidade oral em T4a¹⁷, ainda, afirmam que a erosão superficial do osso mandibular ou do alvéolo dentário, por um primário gengival por exemplo, não é suficiente para classificar um tumor como T4. Estes fatores devem ser considerados, uma vez que, permite que lesões com essas características não sejam automaticamente enquadradas nesta classificação, e a depender da concomitância com outros achados, poderia dispensar o paciente de uma terapia adjuvante³¹.

A definição histopatológica da invasão óssea mandibular é dada pela extensão da neoplasia no osso além do periósteo. A invasão do osso cortical, em sua fase inicial, é caracterizada pela reabsorção óssea abaixo do periósteo, com presença de áreas focais contendo células neoplásicas, destruindo cortical e podendo atingir os espaços medulares¹². A profundidade da invasão óssea se mostrou como um fator importante para o prognóstico dos pacientes, sendo que a invasão óssea medular está associada a pior prognóstico, independente do tamanho do tumor⁵⁴.

Na década de 1980, a invasão foi categorizada em dois padrões distintos^{24,48}, o erosivo e o infiltrativo. O padrão erosivo, também chamado de reabsortivo ou compressivo, é caracterizado pela presença de uma frente ampla de massa tumoral coesa

empurrando/invadindo o tecido conjuntivo entre o tumor e o osso ^{39,55}, a interface entre tumor e osso é nítida nos casos mais avançados, onde há reabsorção óssea osteoclástica e fibrose ao longo do fronte de invasão, com ausência de ilhas de osso dentro da massa tumoral ²¹. Ainda, apresenta uma faixa de células do estroma separando a mandíbula da neoplasia, o que dificulta histologicamente a classificação deste tipo de invasão óssea. Em muitos casos, o contato direto entre as células do carcinoma e o osso não está presente ⁵³, e nos estágios avançados, a reabsorção óssea aparece bem definida nos exames de imagem, sendo passível a realização do diagnóstico radiográfico de invasão ^{19,24}. O padrão de invasão erosivo muitas vezes pode ser erroneamente classificado, tanto nos exames de imagem, quanto em laudos anatomopatológicos, e isso ocorre por uma falta de definição específica para o mesmo, sendo muitas vezes descrito de forma superficial e inespecífica, como uma adjacência à mandíbula ⁵³.

O tipo infiltrativo é mais agressivo, revelando destruição do tecido conjuntivo, e exibindo uma frente tumoral irregular com projeções finas ou em formato de ilhas tumorais que se estendem para dentro do osso, apresentando também ilhas ósseas residuais dentro do tumor, e penetração dos canais de Havers na porção cortical ^{39,53,55}. Apresenta uma pequena atividade de osteoclastos, estroma mixóide com abundantes fibras reticulares e poucas fibras de colágeno ⁵⁶. Aparece irregular e mal definido no exame de imagem ^{19,24}, e está correlacionado a uma maior propensão ao desenvolvimento de recorrência primária, regional e distante ³⁹. A maioria (94%) das invasões ósseas pelo CEC que atingem a porção medular do osso são do padrão infiltrativo ²¹.

Alguns tumores podem exibir ambos os padrões de invasão em diferentes regiões da interface tumor-osso, sendo classificados como padrão misto ⁴¹. A invasão mista é caracterizada como intermediária entre os tipos de invasão erosiva e infiltrativa, e por vezes, não permite adequado diagnóstico radiográfico ^{21,57}.

A sobrevida livre de doença em 3 anos para o padrão infiltrativo é 2,4 vezes menor quando comparada ao padrão erosivo ^{21,31}. Em estudo realizado por Yue et al. ¹⁹ foi observado predominância do padrão infiltrativo (81,48%), em relação ao padrão erosivo (18,5%).

1.3.2 Mecanismos celulares e moleculares da invasão

A interação entre osso e neoplasia libera a ativação de vias de sinalização para o início do processo de reabsorção óssea, com consequente progressão da doença, no entanto, o mecanismo preciso ainda não se encontra completamente esclarecido, podendo estar associado a um aumento da atividade osteoclástica e/ou osteoblástica ²⁶. A reabsorção óssea é

uma etapa importante na progressão do CEC e nas metástases em vários tipos de neoplasias^{25,31,55}. Além do sistema RANK/RANKL/OPG já descrito anteriormente, sabe-se também do papel da inflamação e seus mecanismos regulatórios para ativação de osteoclastos, com consequente invasão óssea.

O CEC é frequentemente cercado por um microambiente inflamatório rico em citocinas inflamatórias, fatores de crescimento e quimiocinas, que promovem ativamente o crescimento celular⁵⁸. Vários estudos demonstraram que as células tumorais produzem diversas citocinas, incluindo IL-6, e que o próprio osso também constitui um depósito de citocinas e fatores de crescimento, fornecendo ambiente propício para o crescimento celular⁵⁸, e consequentemente destruição óssea associada ao cancer. Além das células ósseas, as células tumorais próximas ao osso também expressam RANK, RANKL e OPG^{47,59,60}.

1.3.2.1 Sinalização RANK/RANKL/OPG na neoplasia

O papel do RANK/RANKL na invasão óssea pelo CEC ainda não é completamente claro, o que se sabe é que essas moléculas ao se ligarem promovem a proliferação de osteoclastos, e que a reabsorção óssea realizada por estes é um passo importante no processo de invasão e metástase óssea²⁶. O RANKL participa da osteoclastogênese⁶¹, e um efeito semelhante a esse ocorre proveniente de fatores derivados de células neoplásicas^{62,63}, que regulam não só osteoclastogênese, mas também a função de osteoclastos através do RANKL por mecanismos dependentes e independentes. A expressão de RANKL pode ser regulada positivamente por fatores de reabsorção óssea, tais como a IL-6, sendo que esta coordena indiretamente a osteoclastogênese, e se encontra aumentada durante os processos de inflamação crônica, possuindo uma forte relação com muitos tipos de neoplasias malignas^{39,64}. O contato entre osso e tumor também favorece a produção de RANK através de células estromais fibroblásticas, desempenhando papel crítico na reabsorção óssea³¹. Os níveis de RANKL estão aumentados nas lesões osteolíticas associadas a neoplasias^{30,31}.

Alguns estudos estabeleceram que a inibição da sinalização RANKL/RANK diminui a progressão da lesão e a reabsorção óssea^{30,57}, sendo que o aumento da expressão de RANKL no ambiente neoplásico é um fator promotor do desenvolvimento da invasão óssea³¹. Chuang et al.⁶⁵ identificaram forte marcação citoplasmática para RANKL nas células neoplásicas do CEC, com e sem invasão óssea, e esta proteína também foi identificada no citoplasma de osteoclastos de todos os casos em que houve invasão óssea. Um padrão similar de marcação também foi encontrado para a proteína RANK nas células neoplásicas dos CECs.

A expressão de OPG na área de invasão óssea permanece controversa. Alguns estudos demonstraram que quando avaliada em pacientes com CEC, foi um marcador preditivo para invasão óssea na área do fronte de invasão⁵⁵ podendo desempenhar um papel importante na invasão óssea^{15,59}, associado a uma expressão mais elevada desta proteína na invasão óssea infiltrativa em relação a erosiva⁶⁰. A regulação positiva da OPG em casos de CEC oral com invasão óssea⁶⁶, sugere que um aumento desta proteína leva ao esgotamento da apoptose celular e promove a sobrevivência de células tumorais^{33,63,67}. Seus níveis estão aumentados nas lesões osteoblásticas⁵⁹.

O mecanismo da invasão óssea envolve a expressão de interleucina 6 (IL-6), interleucina 11 (IL-11) e proteína relacionada ao hormônio da paratireoide, o que leva à regulação positiva de RANKL e regulação negativa da OPG e, em última análise, ao aumento da diferenciação dos osteoclastos. O aumento da diferenciação e ativação dos osteoclastos, mediado pelas moléculas mencionadas acima, sugere que os osteoclastos estão diretamente envolvidos no processo de invasão^{13,31}. Tada et al.⁶⁸ relataram que células de CEC induziram a osteoclastogênese pela inibição da osteoprotegerina (OPG), e que esta regula não somente a osteoclastogênese, como também, a função dos osteoclastos.

A desregulação do equilíbrio funcional da tríade RANK/RANKL/OPG é responsável pela osteólise associada ao desenvolvimento de tumores malignos em sítios ósseos^{30,57}, levando a um aumento de lesões osteolíticas e progressão de doenças malignas associadas aos ossos⁵⁰. Estudos demonstraram que o sistema RANK/RANKL contribui para metastases ósseas pelas células neoplásicas e que a administração de OPG pode atuar na prevenção das metastases^{30,57}. Apesar disso, ainda não é claro se as células cancerosas expressam diretamente RANKL em sua superfície e em que medida essa expressão contribui para a formação de osteoclastos. Embora essa cascata forneça um novo mecanismo de reabsorção óssea osteoclástica induzida pelo CEC, a indução da síntese de RANKL por fatores derivados do câncer ainda não se encontra totalmente compreendida. A adição de OPG suprime dramaticamente a regulação do CEC oral na diferenciação e função dos osteoclastos *in vitro*, sugerindo que a inibição de RANKL/RANK pode ser uma abordagem terapêutica eficaz para inibir a invasão óssea induzida por CEC oral³¹.

Em resumo, os mecanismos moleculares do sistema RANK/RANKL/OPG (principal via estudada do metabolismo ósseo, reguladora de reabsorção e formação óssea) podem ser considerados biomarcadores para os casos de CEC^{13,31,69}, e que, um bloqueio de RANKL/RANK com RANK solúvel (sRANK) ou OPG inibiria a osteoclastogênese e previniria a destruição óssea pelo câncer^{30,57}.

Além dos reguladores da invasão pela neoplasia, sabe-se que o osso também tem papel crucial em resposta as agressões sofridas na progressão do CEC. Em um estudo pioneiro realizado por Rabelo et al.⁷⁰ no A.C.Camargo Cancer Center, em parceria com a Université de Lyon, foi avaliada a expressão gênica de RANK, RANK-L, OPG e Esclerostina no osso de 20 pacientes com CEC, em duas regiões da mandíbula, uma próxima a interface osso/neoplasia e a outra o mais distante possível da neoplasia, nas margens da ressecção. A comparação das duas regiões evidenciou que o osso próximo ao tumor apresentou alteração da sua microarquitetura. Níveis elevados de OPG foram correlacionados com maior densidade e menor porosidade, e, mudanças nos níveis de RANK e RANKL, sugeriram mudanças na expressão pelas células ósseas quando o osso é invadido.

1.3.2.2 Sinalização IL-6 na neoplasia

A IL-6 é liberada pelas células inflamatórias e pelas células neoplásicas⁷¹, estimulando a expressão de RANKL em células osteoblásticas, e conseqüentemente ativando a reabsorção óssea pelos osteoclastos^{46,47,63,72}. Quando avaliada a sua expressão em relação a invasão óssea mandibular, estava mais expressa em neoplasias que infiltram o osso quando comparada a lesões superficiais⁵⁵. A expressão de níveis séricos elevados de IL-6 em pacientes com CEC oral está correlacionada a resultados clínicos como recorrência⁷³.

Numerosos tipos de células respondem a IL-6 e sua presença nos tecidos é uma ocorrência normal, mas sua produção não controlada levando à inflamação crônica subsequente exibe uma forte associação com muitos tipos de câncer^{45,74}. É uma das responsáveis pela ativação de fatores de transcrição intracelular por fosforilação, como STAT1 e STAT3, sendo que o nível elevado destas foi observado em vários tumores, o que acaba portanto ligando a IL-6 à tumorigênese^{74,75}. O consumo de tabaco, o principal fator de risco para o CEC, pode estar associado a níveis elevados de IL-6 na saliva, sendo que estes também se encontram elevados na saliva e no sangue com a gravidade da displasia, e metástases ocorrem preferencial em ambiente rico em IL-6⁷³⁻⁷⁶.

1.4 TRATAMENTO E PROGNÓSTICO DO CEC

O objetivo primordial de qualquer tratamento oncológico é a erradicação completa da doença, e as opções terapêuticas incluem um ou mais tratamentos combinados com cirurgia, como exemplo a quimioterapia e radioterapia. A escolha da forma apropriada de tratamento é

realizada de acordo com diversos fatores, incluindo a localização do tumor, estágio, estadiamento patológico, infiltração extracapsular dos linfonodos, envolvimento da margem, e a capacidade do paciente tolerar ou querer ser submetido ao tratamento proposto ⁷⁷.

A cirurgia de ressecção permite realizar uma análise histopatológica dos casos com maior amplitude, representando não só uma forma de tratamento, como também uma ferramenta para identificar e aprofundar o diagnóstico, avaliando melhor os tecidos adjacentes, a presença de metástases e o comprometimento linfonodal. A avaliação pré-operatória da invasão mandibular é um dos fatores importantes para a seleção da estratégia inicial de tratamento, do tipo de cirurgia a ser realizada, sendo que o diagnóstico preciso é frequentemente difícil e desafiador, baseado principalmente nos exames de imagem ⁷⁸.

A extensão da ressecção mandibular é variável, e está relacionada a obtenção de margem de ressecção adequada para o controle oncológico, podendo representar um difícil consenso entre os cirurgiões de cabeça e pescoço, no que se trata dos limites a serem removidos ¹⁹. Enquanto a opção mais conservadora, a mandibulectomia marginal, apresenta controvérsia quanto ao fornecimento de margem de ressecção oncológica satisfatória, a mandibulectomia segmentar pode resultar em um declínio nas funções e na qualidade de vida, principalmente relacionada ao desafio de estabelecer uma reabilitação oral ^{19,79,80}. A decisão entre as duas modalidades terapêuticas é geralmente baseada em se utilizar o status de margem, sendo bem estabelecido que as margens positivas são consideradas um fator de mau prognóstico. Existem várias escolas de pensamentos sobre as distâncias adequadas das margens cirúrgicas em relação aos tecidos da mucosa, e as evidências sobre margem óssea adequada permanecem esparsas ⁸¹.

Lubek e Magliocca ⁵⁷ sugeriram que uma margem óssea adequada deve ser de 0,5–1 cm do osso envolvido ou suspeito, ou a remoção de dois dentes de cada lado do osso envolvido. Porém, a disseminação microscópica da lesão é uma das principais razões para a presença de margens positivas, mesmo quando a distância macroscópica é respeitada pelo cirurgião, uma vez que, é muito difícil distinguir entre invasão periosteal e cortical. O diagnóstico microscópico trans-operatório do osso requer um processo de descalcificação de 7 a 10 dias, inviabilizando a capacidade de se avaliar a invasão cortical no intra-operatório ^{21,82}, gerando um grande dilema entre cirurgias mais conservadoras ou mais radicais, visto a possibilidade de uma cirurgia de revisão e da intensificação do tratamento adjuvante ser indicada.

A mandibulectomia segmentar consiste na ressecção do ramo ascendente da mandíbula, podendo se estender até a região mental (hemimandibulectomia), removendo

todo um segmento ósseo incluindo a lâmina basal da mandíbula ⁸³. Esta é selecionada para os casos em que há evidência de invasão óssea extensa, envolvimento do osso medular ou ou falha na preservação da altura cortical maior que 1 cm ^{19,79,80}. Quando comparada com a mandibulectomia marginal, demonstrou 73% de melhora na sobrevida livre de doença ⁸³. Nos casos em que é diagnosticado por exames de imagens ou no trans-operatório apenas a invasão do periosteio mandibular ou uma erosão cortical, a mandibulectomia marginal é considerada oncológicamente correta ^{21,83}. Esta, é definida como uma ressecção conservadora com a manutenção da continuidade mandibular, preservando a integridade e a função. Uma borda inferior mandibular residual vertical de pelo menos 1 cm é necessária não apenas para permitir as forças de carga mastigatória, mas também, para prevenir o risco subsequente de fratura mandibular ¹⁹. Esta abordagem é indicada para CECs superficiais da cavidade oral com apenas invasão cortical ⁸⁰ e em lesões do tipo erosivo ²⁰. As vantagens dessa opção terapêutica é a preservação da continuidade mandibular resultando em melhora na qualidade de vida. As contraindicações à mandibulectomia marginal são bem definidas, incluindo envolvimento maciço de tecidos moles ao redor da mandíbula, irradiação prévia, invasão óssea evidente no exame de imagem e envolvimento do canal mandibular ¹⁹.

Pacientes em estágios avançados ou com prognóstico ruim geralmente são submetidos a tratamentos mais complexos, que podem afetar a mastigação, deglutição, fala e respiração ⁸⁴. Também, a radioterapia e a quimioterapia podem alterar a qualidade de vida ^{78,85}.

Apesar da invasão óssea ser associada a um pior prognóstico, este na verdade é determinado de forma multifatorial, incluindo variáveis como o status da margem (osso e tecido mole), padrão de invasão óssea, envolvimento do osso medular e envolvimento linfonodal, entre outros ⁴¹. O prognóstico para pacientes com CEC de boca está diretamente relacionado com o tamanho do tumor, envolvimento linfonodal, e presença de metástases à distância, sendo esta última agravante importante para pior prognóstico ⁸⁶. O tratamento também é considerado um importante fator prognóstico, sendo que usualmente a radioterapia isolada ou associada à quimioterapia é utilizada em tumores avançados, não-ressecáveis ou pacientes não indicados para cirurgia. A combinação de quimioterapia, radioterapia e cirurgia, apesar de ser uma terapia agressiva, pode ser indicada em alguns casos e pode aumentar as taxas de sobrevida ⁸⁶. Em estudo realizado por Sasaki et al. ⁸⁶ foi observado correlação entre invasão perineural ⁸⁷, embolia linfática e linfonodos positivos com pior prognóstico ⁸⁸. Em pacientes estágio III-IV foi relatada uma melhora dos pacientes tratados com a combinação de cirurgia e quimiorradioterapia, aumentando a sobrevida global de 48,7% entre os anos de 2001-2006 para 63,2% entre 2007-2012, sendo que em 5 anos após o diagnóstico a sobrevida

condicional livre doença aumentou em 19% em relação aos anos pregressos, mostrando com isso que com o passar do tempo as chances de sobrevivência aumentam ¹⁵.

A invasão óssea é um achado comum em estágio clínico avançado, com importantes efeitos adversos relacionados à funcionalidade do paciente e a sobrevida. Em estudo retrospectivo realizado por Ahmad et al. ³ foram revisados os prontuários de 108 pacientes com CEC de cavidade oral atendidos na Universidade do Missouri, durante o período de 2005-2015, e destes, 74 apresentaram invasão mandibular. Há um crescente corpo de evidências que apóia a invasão do osso medular associada a pior prognóstico, independentemente do tamanho do tumor ^{54,77}, enquanto, tumores pequenos com margens livres de ressecção, apresentam um prognóstico favorável mesmo na presença de invasão óssea cortical ⁸⁹.

Os padrões histológicos, erosivos e infiltrativos de invasão mandibular foram observados como marcadores independentes de prognóstico, com o padrão infiltrativo sendo associado a pior sobrevida livre de doença uma vez que o mesmo está associado à invasão medular, margens positivas de osso e tecido mole e histórico de falha no tratamento ^{12,41}. O padrão de invasão infiltrativa foi associada a maior risco de recorrência local e menor sobrevida específica da doença, em comparação com invasão erosiva ou mista ^{31,41,50}. A infiltração do osso medular esta diretamente associada a menor sobrevida, e a frequência com que ocorre depende do tipo histológico do CEC, estudos relatam uma taxa em torno de 94-95% para o tipo infiltrativo e de 64-75% pro tipo erosivo ^{12,21}, sendo relatada que a sobrevida livre de doença em 3 anos foi 3 vezes menor para o padrão infiltrativo quando comparado ao erosivo ^{39,41}.

Apesar de todos os avanços diagnósticos e terapêuticos atuais, a taxas sobrevivência sofreram melhora discreta, sendo que em 2009 era relatada taxa abaixo dos 50% e hoje está pode chegar a até 63,2% dependendo do estadiamento e tratamento empregado ^{15,90}. Sendo que pacientes com estadiamento linfonodal avançado (número, tamanho e localização dos gânglios linfáticos do pescoço) possuem um prognostico pior ²², e a presença de uma recidiva loco-regional faz com que as taxas de sobrevivência diminuam de 90% para 30% ⁹¹.

1.5 JUSTIFICATIVA

O CEC de boca é a neoplasia maligna mais comum da região de vias aéreas digestivas superiores e pode acometer diversos sítios dentro da cavidade oral, comprometendo

inúmeras estruturas anatômicas. Quando a neoplasia invade o osso mandibular, o prognóstico destes pacientes costuma ser desfavorável, principalmente nos casos de invasão óssea acometendo a porção medular. Ainda, a reabilitação destes pacientes após o término do tratamento é bastante complexa devido as perdas estruturas e efeitos colaterais do tratamento oncológico, comprometendo sensivelmente a qualidade de vida.

Diversos trabalhos têm demonstrado as características da invasão óssea, os genes envolvidos na facilitação deste processo e a influência destes no tratamento e sobrevida destes pacientes. Contudo, poucos estudos têm avaliado o papel de marcadores sabidamente reguladores do metabolismo ósseo, advindo das células neoplásicas. As células ósseas recebem sinalização das células malignas no processo de invasão, dessa forma, justifica-se a realização de um estudo com o objetivo de entender se marcadores genéticos ligados ao metabolismo ósseo também se fazem presentes e participantes na carcinogênese e progressão tumoral. Entender estes mecanismos poderia direcionar melhores condutas, visando atenuar e/ou desacelerar o processo de invasão óssea e suas repercussões.

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

Avaliar as características clínicas dos pacientes submetidos a mandibulectomia para tratamento do carcinoma epidermóide oral, e a expressão gênica de marcadores reguladores da invasão óssea pela neoplasia.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Realizar levantamento dos dados clínicos, radiográficos e histopatológicos dos pacientes com CEC tratados com mandibulectomia no A.C.Camargo Cancer Center.
- Avaliar a expressão gênica de marcadores biológicos na neoplasia correlacionados com a osteoclastogênese, utilizando técnica de qPCR para RANK, RANKL, OPG e IL-6.
- Correlacionar e associar os achados nas análises descritas anteriormente com as informações clínico-demográficas, imaginológicas, fatores prognósticos e de demais dados inerentes à neoplasia (grau de diferenciação histológica, sítio de acometimento e demais características).

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CARACTERÍSTICA DO ESTUDO

Foi realizado levantamento retrospectivo de todos os pacientes com CEC de boca tratados com cirurgia de ressecção da mandíbula no A.C.Camargo Cancer Center durante o período de 1990 a 2015. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética e Pesquisa em Seres Humanos da Instituição (CEP), registrado sobre número CAAE 32909914.6.0000.5432 e sob parecer de n°. 2297/16 (**Anexo 1**). E possui dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) por se tratar de estudo retrospectivo (**Anexo 2**).

Para o estudo foram estabelecidos os seguintes critérios:

Critérios de Inclusão:

- Pacientes diagnosticados com CEC de boca submetidos a algum tipo de mandibulectomia.

Critérios de Exclusão:

- Uso prolongado (por mais de 3 meses) de medicamentos que alteravam o *turnover* ósseo, como os corticosteroides; bisfosfonatos ou Denosumab.
- Pacientes submetidos à radioterapia na região de cabeça e pescoço previamente à cirurgia de mandibulectomia.
- Menores de 18 anos de idade.

Dados demográficos, clínicos, imaginológicos e histopatológicos de cada paciente foram coletados dos prontuários arquivados no H2tc do A.C.Camargo Cancer Center e sumarizados em ficha clínica desenvolvida para o estudo (**Apêndice 1**).

Para a localização e seleção destes pacientes, foram realizadas as seguintes etapas:

- **Primeira etapa** - Com o auxílio do programa Institucional Recruit, que realizou um *screening* de todo o banco de dados da Instituição, foi adicionado o filtro do período de 1990-2015 e o cruzamento das seguintes combinações de palavras - Carcinoma de células escamosas + Mandíbula (1000 prontuários); Carcinoma de células escamosas + Mandibulectomia (1000 prontuários); Carcinoma Epidermóide + Mandíbula (1000 prontuários); Carcinoma Epidermóide + Mandibulectomia (1001 prontuários); Carcinoma Escamocelular + Mandíbula (1000 prontuários); Carcinoma Escamocelular +

Mandíbulectomia (1000 prontuários); Carcinoma Espinocelular + Mandíbula (1000 prontuários).

- **Segunda etapa** - Eliminação de todos os RGHs (número de indentificação de cada paciente atendido no hospital) repetidos encontrados nas 7 listas criadas a partir da busca feita no Recruit.

- **Terceira etapa** - Dos RGHs provenientes da busca pelo Recruit, foi adicionada uma lista de pacientes que foram incluídos em um estudo retrospectivo anterior (1990-2003), realizado pelo Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia da Instituição, com o auxílio do Dr. Hugo Fontan Kohler.

- **Quarta etapa** - Nesta etapa a confirmação dos casos foi realizada por meio de acesso individual e manual de cada prontuário eletrônico, para a confirmação do diagnóstico de CEC oral, além da realização de tratamento cirúrgico incluindo alguma modalidade de mandíbulectomia. Estas informações foram obtidas no programa H2tc, que é um banco de dados que possibilita o acesso aos prontuários eletrônicos, documentos digitalizados e todas as informações dos pacientes atendidos na instituição.

- **Quinta etapa** - Para registrar todas as informações coletadas, criamos um banco de dados usando o sistema *Research Electronic Data Capture* (REDCap), onde inserimos campos com todas as informações pertinentes do projeto (**Apêndice 1**). A partir dele, todos os dados foram exportados para o software IBM SPSS versão 25.

- **Sexta etapa** - Coleta do TNM clínico (**Tabela 1**) e histopatológico do prontuário e posterior reclassificação destes segundo o TNM 8ª edição (**Tabela 2**) e estadiamento clínico, com base nos dados provenientes da ficha anatomopatológica (**Tabela 3**).

- **Sétima etapa** - Abastecimento do banco de dados do projeto, com um novo acesso aos prontuários, buscando o maior número de informações necessárias para o completo preenchimento da ficha. Além da leitura individual dos prontuários no H2tc, algumas informações, especialmente àquelas referentes aos exames de imagens, foram obtidas com o auxílio do setor de Tecnologia da Informação e do Departamento de Imagem.

Tabela 1 - Data do diagnóstico e a versão TNM correspondente (AJCC Cancer Staging Manual Editions).

Edição	Publicação	Data do diagnóstico
1 st	1977	1978-1983
2 nd	1983	1984-1988
3 rd	1988	1989-1992
4 th	1992	1993-1997
5 th	1997	1998-2002
6 th	2002	2003-2009
7 th	2009	2010-2016
8 th	2016	2017

Tabela 2 - Critérios aplicados para a reclassificação dos casos incluídos no projeto para a classificação TNM 8^a Edição.

T	Maior medida da neoplasia	Profundidade de invasão
T1	<2	<0,5
T2	<4	<1
T3	>4	>1

T4 - Não sofreu alteração
N1 - com ruptura capsular → N2a

Tabela 3 - Critérios utilizados com base no 8^a Edição para o Estadiamento Clínico.

EC	T	N
EC I	T1	N0
EC II	T2	N0
EC III	T1/T2	N1
	T3	N0/N1
EC IV	T4	N qq
	Tqq	N2/N3

qq= qualquer

3.2 ETAPAS LABORATORIAIS

3.2.1 Casuística

No universo dos casos levantados no estudo de coorte, foram selecionados 220 pacientes, dos quais foi realizado o levantamento dos dados clínicos, radiográficos e histopatológicos. Destes, foi necessário averiguar a disponibilidade de amostras de macromoléculas junto ao Biobanco da Instituição, juntamente com a disponibilidade de material para análise no serviço de Anatomia Patológica. Um total de 60 pacientes possui material passível de análise (RNA e blocos em parafina). Por meio do teste estatístico Propensity Score (escore de propensão) ⁹², utilizando de uma análise pareada com as

variáveis idade, sexo e ano da cirurgia, foi então obtida a seleção de 40 casos, divididos em dois grupos - 1) 20 pacientes com invasão óssea comprovada no laudo anatomopatológico; e 2) 20 pacientes sem invasão óssea comprovada no laudo anatomopatológico (**Figuras 2 e 3**).

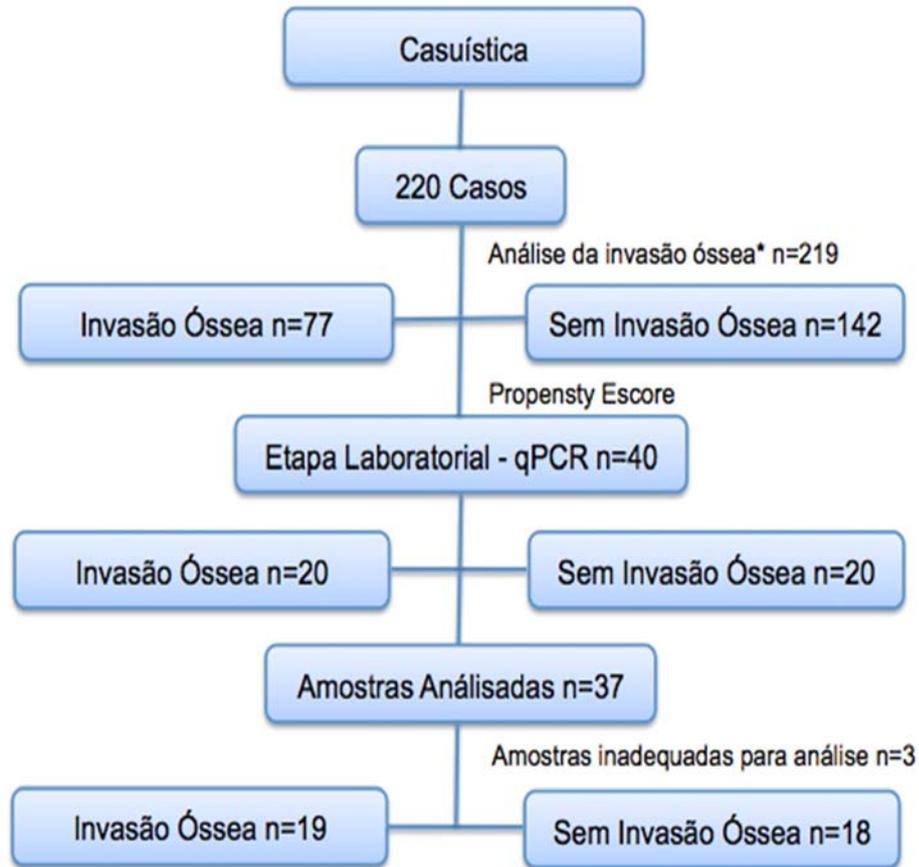


Figura 2 - Fluxograma esquemático exibindo o número de casos avaliados em cada uma das etapas do estudo. A análise da invasão óssea contida no laudo anatomopatológico para 219 pacientes, com a posterior realização do teste estatístico Propensity Score visando a seleção das amostras incluídas na etapa laboratorial, com exclusão de 3 amostras inadequadas para as análises laboratoriais (n=37).

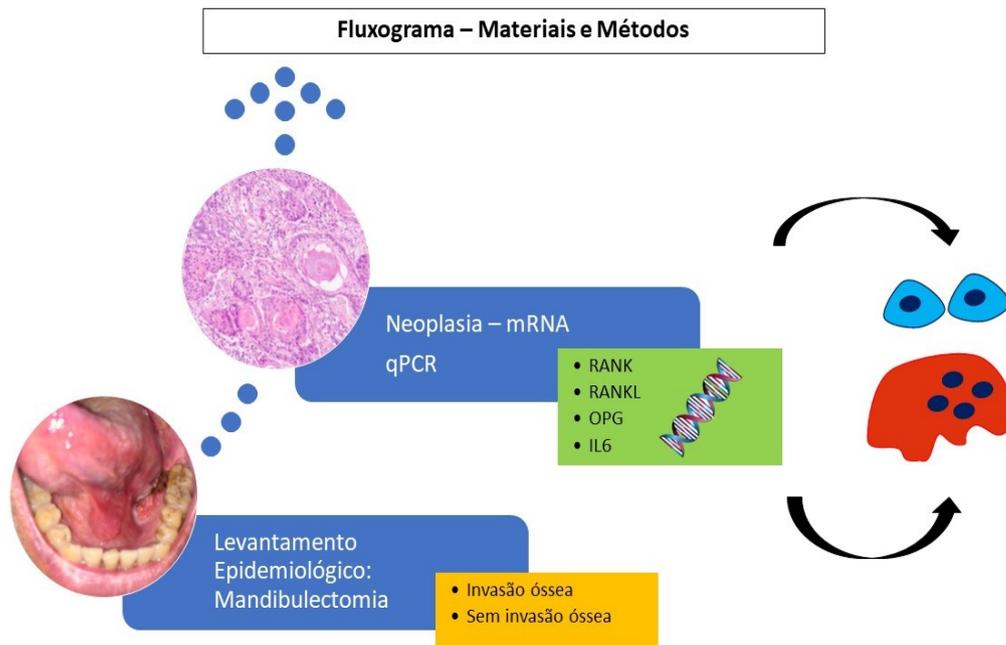


Figura 3 - Desenho esquemático que mostra a interdependência entre as etapas realizadas no estudo. A análise molecular (no topo), foi realizada nas amostras de CEC, escolhidas no levantamento dos dados clínicos, radiográficos e histopatológicos (abaixo). Na avaliação molecular, o objetivo era avaliar os casos com invasão óssea comprovada, confrontando com os casos sem invasão mandibular, deste modo, foi possível chegar nestes casos pelo levantamento dos dados clínicos, radiográficos e histopatológicos das mandibulectomias realizadas na instituição. Na parte direita da figura notam-se os dois tipos de células ósseas que estão relacionadas diretamente com a invasão óssea, os osteoclastos (em vermelho) e osteoblastos (em azul). A intenção era identificar a expressão gênica dos 4 genes (quadro verde) na neoplasia, uma vez que já se sabe que mecanismos desencadeados pelas células ósseas na presença destas moléculas poderiam influenciar na invasão óssea, e que estes mecanismos poderiam vir diretamente do tumor.

3.2.2 Análise da Expressão Gênica

3.2.2.1 Extração do RNA Total

As amostras de tecido armazenadas pelo Biobanco do A.C. Camargo Cancer Center, são coletadas no centro cirúrgico e os tecidos são imediatamente acondicionados em criotubos e congelados em nitrogênio líquido. Quando o tecido congelado é solicitado para alguma pesquisa, passa por um critério de qualidade no qual há a inclusão da amostra em TissueTek e é feito um corte em criogenia para confecção da lâmina coradas em Hematoxilina e Eosina (H&E). Essa lâmina é avaliada pelo patologista responsável pelo projeto que analisa a histologia e marca na lâmina a região de interesse do estudo para posterior extração de RNA, e delimita a região a ser eliminada do material excedente (não neoplásico).

Somente as amostras com porcentagem acima de 80% ou mais de células malignas entraram no critério do presente estudo e seguiram para posterior extração do RNA. O tecido não-neoplásico, fibrose, tecido adiposo ou outros contaminantes foram eliminados pela dissecação manual, realizada com auxílio de bisturi⁹³. O RNA foi processado de acordo com o protocolo operacional padrão do Biobanco⁹⁴. O material correspondente a neoplasia (30mg) foi homogeneizado no equipamento Precellys® (Bertin Technologies, Montigny-le-Bretonneux, França) com 400 ul do tampão RLT com β -Mercaptoethanol (β -ME) de acordo com as recomendações do fabricante para o Kit de extração QIASymphony (Qiagen, CA, EUA). A extração é realizada de forma automatizada no equipamento QIASymphony (Qiagen, CA, EUA) utilizando o protocolo miRNA CT 400V8, que permite a recuperação do RNA total, inclusive o miRNA. A pureza do RNA é avaliada no equipamento Nanodrop™ ND-1000 (Thermo Scientific, DE, EUA), a concentração no Qubit (Thermo Scientific) e a integridade determinada pelo equipamento TapeStation 4200 (Agilent Technologies, CA, EUA). O TapeStation fornece um número de integridade do RNA (*RIN-RNA Integrity Number*) que varia de 1 a 10, onde 1 refere-se a um RNA degradado e 10 um RNA íntegro, sendo que nesse estudo foram utilizadas apenas amostras com o RIN maior ou igual a 4. Estas etapas foram realizadas pelo Biobanco da Instituição, e posteriormente foram disponibilizadas as alíquotas para realização deste projeto. A alíquota de RNA total foi incubada em solução 20 mM de Tris HCl pH 8.4 2 mM MgCl₂, 50 mM de KCl e 1U de DNase I (Invitrogen)/1ug de RNA a temperatura ambiente por 15 minutos. A enzima foi posteriormente inativada pela adição de 2,5 mM de EDTA e incubação a 65°C por 10 minutos. Após o período de incubação, as amostras foram precipitadas por 16 horas a - 20°C em solução de acetato de sódio 0,2 M e 2,5 volumes de etanol absoluto e centrifugadas a 10000 rpm por 15 minutos, sendo o sobrenadante desprezado e o precipitado lavado com etanol 75% e centrifugado a 10000 rpm por 15 minutos. O precipitado foi então seco e ressuspensão em água livre de DNase/RNase

3.2.2.2 Amplificação por PCR quantitativa em tempo real (qPCR)

O volume final de reação foi de 20 μ L, sendo que cada tubo continha 10 μ L de TaqMan® Universal PCR Master Mix II, 4,0 μ L de água ultrapura, 5,0ul (10ng) do cDNA e 1 μ L de TaqMan Gene Expression Assay, específico para cada gene e disponíveis comercialmente (Applied Biosystems)⁵¹. A sequência de nucleotídeos usada no estudo foi obtida na base de dados Gene (PubMed), o número de pares de base e a referência comercial dos mesmos estão na **Tabela 4**. Os experimentos foram realizados em duplicata.

Tabela 4 - Sequência de nucleotídeos dos genes estudados.

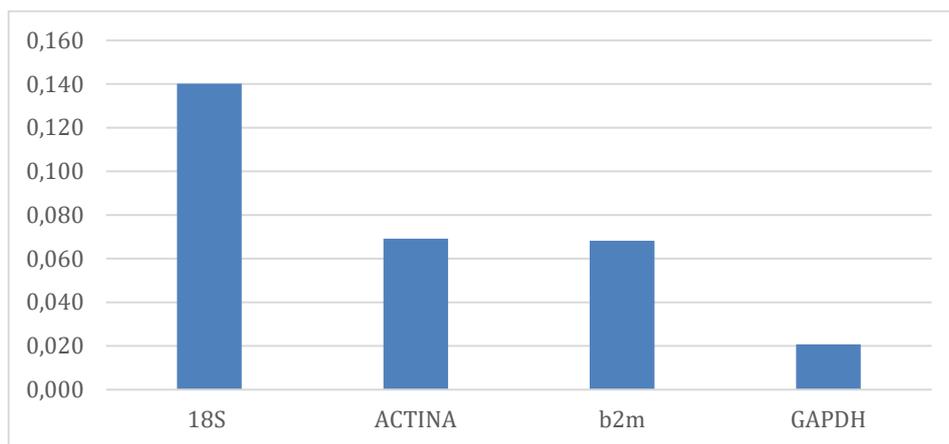
Gene	Pb	Refcom
GAPDH - glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase	122	Hs99999905_m1
RANKL- tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 11	67	Hs00243522_m1
RANK- tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11a, NFKB activator	75	Hs00921372_m1
OPG- tumor necrosis factor receptor superfamily, member 11b	74	Hs00900358_m1
IL-6- Interleukin 6	95	Hs00174131_m1

pb = número de pares de bases.

Refcom = Referência comercial (Applied Biosystems).

A amplificação foi feita em 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, precedidos por um período de 50°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos, no aparelho 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems).

O nível de expressão de cada gene foi quantificado relativamente à expressão de um controle (referência), selecionado utilizando-se a ferramenta NormFinder. Para essa análise foram utilizadas 14 amostras de neoplasia e 1 *pool* composto por 12 amostras de tecido não neoplásico dos mesmos pacientes. Foram testados os genes da β -actina, 18S, gliceraldeído 3-fosfato desidrogenase (GAPDH), β -2-microglobulina (B2M). Sendo selecionado o gene GAPDH como referência (**Figura 4**).



Fonte - Modificado de <https://moma.dk/normfinder-software> (2003).

Figura 4 - Seleção da referência para a normalização dos resultados de expressão gênica. Resultado da análise de seleção do gene mais estável para a normalização dos experimentos de qPCR em tempo real utilizando amostras neoplásicas e não neoplásicas.

Foi realizada a quantificação da expressão de cada gene relativamente à expressão de um *pool* composto pelas 12 amostras. Amostras que apresentaram Ct superior a 37 foram excluídas da análise. O resultado final (Rq gene) foi então expresso como um aumento ou diminuição da expressão do gene em n-vezes quando comparado ao controle e ao calibrador, da seguinte forma:

- $Rq_{\text{gene}} = 2^{-(\Delta Ct_{\text{amostra}} - \Delta Ct_{\text{calibrador}})}$, onde ΔCt da amostra e do calibrador são determinados subtraindo-se o valor médio de Ct do gene estudado do valor médio de Ct do gene utilizado com referência.

Para a determinação de aumento ou diminuição da expressão dos genes nas amostras tumorais em comparação com as amostras não neoplásicas foi utilizado o seguinte valor:

- * Diminuição de expressão - Expressão (Rq) $\leq 0,5$,
- * Aumento de expressão - Expressão (Rq) $\geq 2,0$,
- * Expressão Normal - Expressão (Rq) $>0,5$ e <2 .

As amostras com expressão relativa com valores entre 0,5 e 2,0 não foram consideradas com expressão alterada em relação ao tecido não neoplásico. Uma visão geral dos procedimentos realizados neste estudo pode ser observada na **Figura 5**.

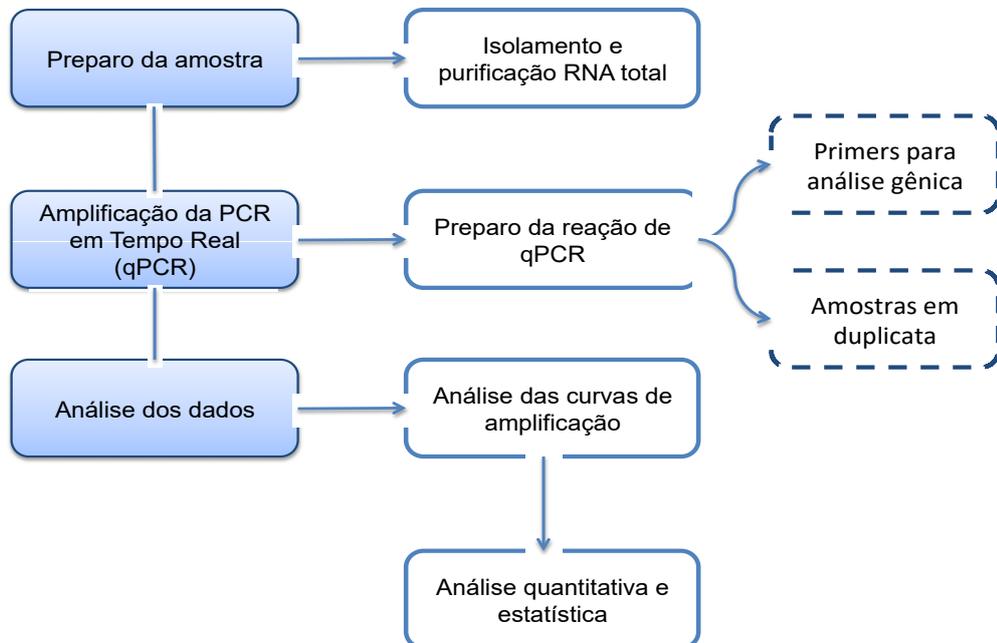


Figura 5 - Visão geral dos experimentos de biologia molecular realizados no projeto.

3.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Foi realizada uma análise descritiva das variáveis qualitativas, com a apresentação das distribuições de frequência absoluta (n) e relativa (%). Para as variáveis quantitativas, foi realizada a análise das principais medidas, como a média, desvio padrão, mediana, valores mínimo e máximo.

Os cruzamentos entre variáveis qualitativas foram avaliados pelo teste qui-quadrado ou fisher quando apropriado. Para comparar variáveis de grupo em relação à distribuição de variáveis quantitativas, o teste t-Student para grupos independentes ou o teste não-paramétrico de Mann-Whitney foi utilizado.

O cruzamento das variáveis de interesse e análise de sobrevida global foram realizados com estimador de Kaplan-Meier, para estimar as curvas de sobrevivência. A comparação dos grupos em relação à sobrevida foi realizada pelo teste de log-rank. O modelo de Regressão de Cox foi utilizado para avaliação de *Hazard ratio* (HR) de forma simples e múltipla. As suposições de riscos proporcionais foram verificadas através dos resíduos de Schoenfeld.

O nível de significância adotado foi de 5% para todos os testes. As análises estatísticas foram realizadas utilizando o software IBM SPSS versão 25.

4 RESULTADOS

4.1 PARÂMETOS CLÍNICOS

4.1.1 Dados clínicos, radiográficos e histopatológicos

O levantamento de todos os casos que atendiam os critérios de inclusão do projeto resultou em 220 pacientes. Para cada um deles foi preenchida a ficha clínica do projeto (**Apêndice 1**) com o máximo de informações disponíveis.

Analisando as características demográficas e clínicas dos pacientes, foi possível observar uma predominância do sexo masculino, 2,73 vezes a mais que o sexo feminino, com idade média de 60 anos ($\pm 11,9$). A frequência de hábitos nocivos foi de 66,8% para o tabagismo e 53,6% para o etilismo. Com relação a neoplasia, o tempo de queixa foi de aproximadamente 5 meses, e as áreas mais acometidas foram gengiva inferior, seguida de assoalho, região retromolar e língua. Os tipos de mandibulectomia realizadas foram segmentar (35,4%), marginal (34,1%), hemimandibulectomia (29,5%) e mandibulectomia total (1%). Com relação aos exames de imagens, 60,5% dos pacientes tinham o exame ou o laudo do mesmo disponível para análise (**Tabela 5**).

Tabela 5 - Características clínicas e demográficas dos 220 pacientes incluídos no projeto.

Característica	Número de casos (%)
Sexo	
Masculino	161 (73,2)
Feminino	59 (26,8)
Tabagismo	
Não	47 (21,4)
Sim	116 (52,7)
Ex. Fumante	31 (14,1)
<i>Missing</i>	26 (11,8)
Etilismo	
Não	73 (33,2)
Sim	103 (46,8)
Ex. Etilista	15 (6,8)
<i>Missing</i>	29 (13,2)
Localização	
Gengiva inferior	61 (27,7)
Assoalho	56 (25,5)
Retromolar	37 (16,8)
Língua	27 (12,3)
Rebordo inferior	17 (7,7)
Outras	22 (10)
Idade	
Máxima	94
Miníma	28
Média	60
Tempo de história (meses)	
Máxima	25
Miníma	1
Média	4,95
Exame de Imagem (n=137)	
Ct	113 (51,4)
Rnm	2 (0,9)
RX	18 (8,2)
Realizado fora da instituição	4 (1,8)
<i>Missing</i>	83 (37,7)
Laudo (n=133)	
Sem Invasão	70 (52,6)
Com Invasão	63 (47,4)
Tipo de cirurgia	
Marginal	75 (34,1)
Segmentar	78 (35,4)
Hemi-mandibulectomia	65 (29,5)
Mandibulectomia total	2 (1)

Missing= casos que não possuíam informações disponíveis.

As análises das informações referentes ao laudo anatomopatológico mostram que quase 100% dos pacientes incluídos no estudo foram submetidos ao esvaziamento linfonodal (215), e destes, apenas 48% apresentaram linfonodos positivos/comprometidos e 28,2% com

ruptura capsular. Em relação às margens cirúrgicas, 13,6% dos pacientes apresentaram margens exíguas ou comprometidas, e mais de 80% dos pacientes não apresentaram embolização sanguínea ou linfática. A avaliação da invasão óssea só foi possível para 219 pacientes, sendo que destes, 35% tiveram invasão óssea da mandíbula confirmada em análise histopatológica (**Tabela 6**).

Tabela 6 - Características provenientes do Laudo anatomopatológico dos 220 pacientes incluídos no projeto.

Características	Número de casos (%)
Esvaziamento	
Sim	215 (97,7)
Não	5 (2,3)
Invasão óssea (n=219)	
Não	142 (64,5)
Sim	77 (35)
Ruptura Capsular (n=107)	
Não	45 (20,5)
Sim	62 (28,2)
Tipo Histológico	
Bem diferenciado	78 (35,5)
Moderadamente diferenciado	117 (53,2)
Pouco diferenciado	24 (10,9)
Não especificado	1 (0,5)
Margens	
Livres	188 (85,5)
Comprometidas	25 (11,4)
Exíguas	7 (3,2)
Presença de Inflamação (n=216)	
Não detectada	123 (55,9)
Leve	33 (15)
Moderada	40 (18,2)
Intensa	20 (9,1)
Infiltração Perineural (n=215)	
Não	105 (47,7)
Sim	110 (50)
Invasão Muscular Esquelética (n=206)	
Não	73 (33,2)
Sim	133 (60,5)
Embolização Linfática (n=218)	
Não	187(85)
Sim	31 (14,1)
Embolização Vascular (n=216)	
Não	202 (91,8)
Sim	14 (6,4)

O tratamento complementar mais frequente foi a Radioterapia (Rtx), contemplando 66,4% dos casos. Um número menor de pacientes submeteu-se a Quimioterapia (Qtx), representando 23,8% dos casos. A avaliação da recorrência tumoral demonstrou que praticamente metade dos pacientes apresentou algum tipo de recorrência (47,7%). Recorrência local foi observada em 51 pacientes (23,2%), regional em 23 (10,4%) e a distância em 49 pacientes (22,3%). Considerando somente a recorrência local, 43 pacientes apresentaram uma, 5 pacientes tiveram duas e 3 pacientes desenvolveram mais de 2 recorrências do tipo local. Dos 49 pacientes (22,3%) que apresentaram metástase à distância, o pulmão foi órgão mais acometido (31 pacientes) (**Tabela 7**).

Tabela 7 - Características dos tratamentos realizados pelos 220 pacientes incluídos no projeto, recorrências e última informação coletada.

Características	Número de casos (%)
Rtx (n=215)	
Não	69 (31,4)
Sim	146 (66,4)
Qtx (n=207)	
Não	155 (70,5)
Sim	52 (23,6)
Recorrência	
Não	115 (52,3)
Sim	105 (47,7)
Recorrência Localização*	
Local	51 (23,2)
Regional	23 (10,4)
Distância	49 (22,3)
Última informação	
Vivo s/ doença	72 (32,7)
Vivo c/ doença	14 (6,4)
Morto pela doença	105 (47,7)
Morto durante tratamento	7 (3,2)
Morto por outra causa	15 (6,8)
Perdido de vista	7 (3,2)

* Mais de um local pode ter sido acometido simultaneamente

4.1.2 Associação com invasão óssea

Foi avaliada a associação da invasão óssea descrita nos exames de imagem com a invasão descrita no exame anatomopatológico (considerado este o padrão ouro). Esta informação foi adquirida de 133 pacientes, e a concordância foi observada em 76% dos casos que apresentavam invasão óssea e de 67,8% naqueles sem invasão óssea. Foi realizado teste

de Qui-quadrado ($p < 0,00$), demonstrando associação entre as variáveis e medida de concordância de Kappa, que se demonstrou moderada (0,431) (**Tabela 8**).

Tabela 8 - Associação entre invasão óssea observada no exame de imagem e no anatomopatológico e medida de concordância de Kappa (n=133 pacientes).

		Invasão óssea descrita no exame de Anatomia Patológica			p	Kappa
		Não	Sim	Total		
Laudo do Exame de Imagem	Não	59 (67,8%)	11 (24%)	70 (52,7%)	<0,00*	0,431
	Sim	28 (32,2%)	35 (76%)	63 (47,3%)		
	Total	87 (100%)	46 (100%)	133 (100%)		

Teste qui-quadrado e correção de continuidade. *Significância com $p < 0,05$.
Concordância de Kappa r moderada= 0,41-0,60 - Landis e Koch (1977)

4.1.3 Associação entre invasão óssea (laudo anatomopatológico) com as margens cirúrgicas

Dos 219 pacientes avaliados, 77 pacientes apresentavam invasão óssea e 142 não possuíam invasão relatada no laudo histopatológico. Dos 77 pacientes com invasão, 60 apresentaram margens livres e 17 margens comprometidas ou exíguas, enquanto, dos 142 pacientes sem invasão óssea, 127 apresentavam margens livres e 15 comprometidas ou exíguas. O teste exato de Fisher, demonstrou associação significativa entre invasão óssea e margens cirúrgicas. A porcentagem de pacientes com invasão óssea que apresentaram margens cirúrgicas livres foi de 77,9%, enquanto para pacientes sem invasão, essa chegou a 89,4% (**Tabela 9**).

Tabela 9 - Associação da invasão óssea diagnosticada no laudo anatomopatológico e as características microscópicas das margens cirúrgicas.

		Invasão óssea			p
		Não	Sim	Total	
Margens	Livres	127 (89,4%)	60 (77,9%)	187 (85,4%)	0,05*
	Comprometidas/ Exíguas	15 (10,5%)	17 (22,1%)	32 (14,6%)	
Total		142 (100%)	77 (100%)	219 (100%)	

Qui-quadrado e Teste exato de Fisher. * Significância com $p < 0,05$.

4.1.4 Associação da localização do tumor com a invasão óssea

A localização das lesões foi categorizada em dois grupos, língua/assoalho e outras localizações (gengiva inferior, rebordo e região retro-molar) para a realização das análises. Dos 142 casos sem invasão óssea, 80 perteceram ao grupo “outras localizações”, e 62 ao

grupo língua/assoalho. Dos 77 pacientes com invasão óssea, 56 pertenciam ao grupo outras localizações e 21 ao grupo língua/assoalho, e a associação entre a invasão óssea e a localização da lesão foi significativa (**Tabela 10**).

Tabela 10 - Associação da localização da lesão e o diagnóstico de invasão óssea no laudo anatomopatológico.

Localização		Invasão óssea			p
		Não	Sim	Total	
Localização	Língua/Assoalho	62 (43,7%)	21 (27,3%)	83 (37,9%)	0,025*
	Outras localizações	80 (56,3%)	56 (72,7%)	136 (62,1%)	
Total		142 (100%)	77 (100%)	219 (100%)	

Teste qui-quadrado. *Significância com $p < 0.05$.

4.1.5 Associação das medidas da neoplasia (laudo anatomopatológico) com a invasão óssea

Foi coletado do laudo histopatológico a maior medida da neoplasia em centímetros (medida 1), um segundo eixo de medida (medida 2, não utilizada neste estudo), e a profundidade de invasão (medida 3). Quando avaliado o grupo com invasão óssea, a menor medida 1 encontrada foi de 1 cm e a maior 12 cm. A profundidade de invasão (medida 3) variou de 0,5 cm, chegando a 6,5 cm. No grupo sem invasão óssea, a menor extensão da lesão (medida 1) foi de 0,4 cm, chegando a 19 cm. Já a profundidade de infiltração (medida 3), neste grupo, variou de 0,14 a 5 cm (**Tabela 11**).

Tabela 11 - Análise da maior medida da neoplasia (medida 1), da profundidade de invasão da lesão (medida 3) e o diagnóstico de invasão óssea após análise anatomopatológica.

	Invasão óssea	N	Mínimo	Média	Máximo	p
Medida 1	Não	142	0,40	3,94	19	0,025*
	Sim	77	1,00	4,76	12	
Medida 3 (p. de invasão)	Não	94	0,14	1,61	5	0,005*
	Sim	52	0,50	2,30	6,5	

Medida em cm

Teste-T. * Significância com $p < 0.05$.

A associação por meio de Teste-t entre a maior medida da neoplasia (medida 1) com invasão óssea e comprometimento linfonodal, mostrou que neoplasias maiores foram associadas com estes parâmetros (**Tabela 12**).

Tabela 12 - Análise da maior medida da neoplasia (medida 1) com invasão óssea (n=219 pacientes) e o comprometimento linfonodal (n=220 pacientes).

Variáveis	Maior medida da Neoplasia (medida 1)				
	N	Média	Mediana	DP	p
Com invasão óssea	77	4,85	4,00	2,35	0,012*
Sem invasão óssea	142	3,96	3,50	2,65	
Linfonodo +	122	4,62	4,00	2,62	0,021*
Linfonodo -	98	3,82	3,50	2,45	

Medida em cm

Teste T. * Significância com $p < 0.05$.

Esta associação também foi realizada para a profundidade da invasão da neoplasia (medida 3), ambas significantes (**Tabela 13**).

Tabela 13 - Análise da profundidade de invasão da neoplasia (medida 3) com invasão óssea e o comprometimento linfonodal (n= 147 pacientes).

Variáveis	Profundidade de invasão (medida 3)				
	N	Média	Mediana	DP	p
Com invasão óssea	53	2,27	1,80	1,52	0,002*
Sem invasão óssea	94	1,61	1,30	1,13	
Linfonodo +	80	2,14	1,70	1,39	0,007*
Linfonodo -	67	1,50	1,20	1,13	

Medida em cm

Teste T * Significância com $p < 0.05$.

4.1.6 Associação entre estadiamento e invasão óssea

A avaliação da invasão óssea foi correlacionada com estadiamento clínico. Dos 219 pacientes, 10 apresentavam EC I, 21 EC II, 33 EC III e 155 EC IV. Dos 31 pacientes classificados nos EC iniciais I e II, 6 já apresentavam invasão óssea. Dos 155 pacientes classificados no EC IV, 87 não apresentaram invasão óssea. A análise de Qui-quadrado de Pearson comparando os estadiamentos mostrou associação entre estadiamentos mais avançados e invasão óssea ($p < 0,00$) (**Tabela 14**).

Tabela 14 - Análise da invasão óssea e o Estadiamento clínico dos pacientes incluído no projeto.

		Estadiamento clínico				Total (%)	p
		EC I (%)	EC II (%)	EC III (%)	EC IV (%)		
Invasão óssea	Não	7 (70)	18 (85,7)	30 (90,9)	87 (56,1)	142 (64,9)	<0,00*
	Sim	3 (30)	3 (14,3)	3 (9,1)	68 (35,1)		
Total		10 (100)	21 (100)	33 (100)	155 (100)	219 (100)	

Teste Qui-quadrado de Pearson. * Significância com $p < 0.05$.

4.1.7 Avaliação da sobrevida global

Foi calculada a sobrevida média dos pacientes incluídos no estudo, através da coleta da última informação disponível em seus prontuários ou registros hospitalares. A informação estava disponível para 218 pacientes, e destes, 127 vieram a óbito até o dia 30 de junho de 2020, sendo 105 em decorrência da doença e 7 durante o tratamento para o câncer. O óbito mais precoce ocorreu no mês que o paciente iniciou o tratamento, enquanto o óbito mais tardio aconteceu 212 meses após a data de início do tratamento. O cálculo para estimativa de sobrevivência média foi de 96,92 ($\pm 6,84$) meses pós cirurgia (**Figura 6**).

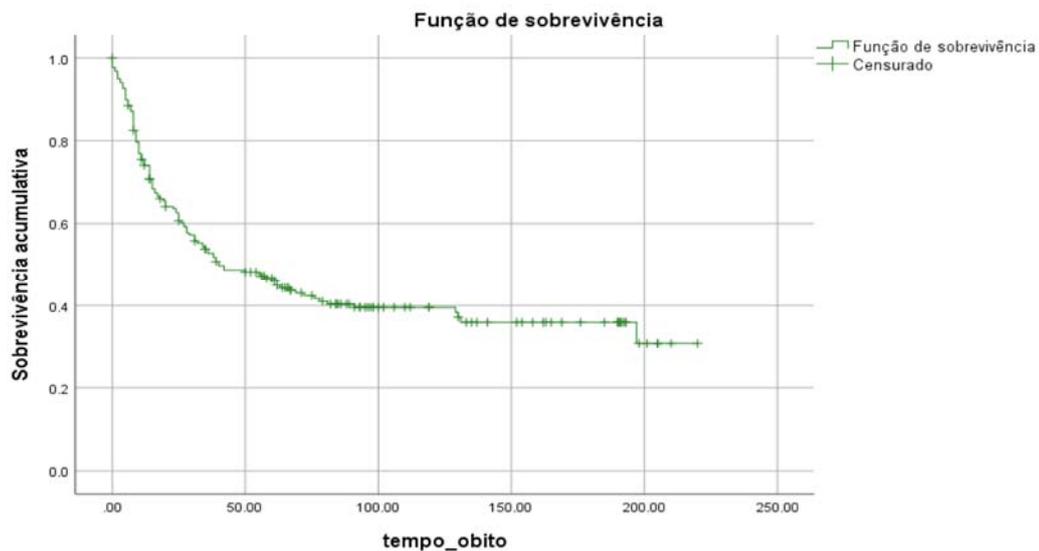


Figura 6 - Avaliação da Função de sobrevivência em meses para 218 pacientes incluídos no projeto.

A análise da sobrevida foi realizada para as variáveis clínicas, tamanho do tumor (T clínico), presença de linfonodos (N clínico) e estadiamento clínico e laudo do exame de imagem. As variáveis provenientes do laudo anatomopatológico selecionadas para análise de

sobrevida foram - margens cirúrgicas, invasão óssea, invasão muscular esquelética, infiltração perineural, embolização linfática, ruptura capsular, tamanho do tumor pós análise anatomopatológica (T patológico) e comprometimento linfonodal (N patológico). A diferença entre essas curvas foi avaliada pelo teste log-rank. (**Tabela 15**).

Tabela 15 - Análise da sobrevida em relação as variáveis TN clínico, estadiamento clínico, invasão no laudo do exame de imagem, margens cirúrgicas, invasão óssea no anatomopatológico, invasão muscular esquelética, infiltração perineural, embolização linfática, ruptura capsular, TN patológico.

		N total	N óbitos	Sobrevida (meses)	DP	95% IC	p
T clínico	T1/T2	68	27	139,2	12	115,7-162,8	<0,00*
	T3/T4	150	100	73,2	7,2	59-87,5	
N clínico	N0	110	58	110,7	9,5	91,9-129,5	0,021*
	N+	108	69	75,4	8,2	59,1-91,6	
Estadiamento clínico	I e II	31	9	161,5	16,1	129,7-193,2	0,001*
	III e IV	187	118	83,7	6,7	70,4-97	
Invasão exame de imagem	Sim	62	41	51,3	7,2	37,1-65,4	0,013*
	Não	70	34	117	12,4	92,6-141,4	
Margens cirúrgicas	Livres	186	105	101,2	7,4	86,7-115,8	0,011*
	Comp.	25	19	29,5	5,9	17,8-41,3	
	Exig.	7	3	103,4	28,9	46,7-160,1	
Invasão óssea	Sim	77	59	40,8	6,3	28,3-53,3	<0,00*
	Não	142	67	121,9	8,5	105,2-138,6	
Invasão muscular	Sim	132	86	77,9	7,9	62,2-93,6	0,002*
	Não	73	34	125,3	11,7	102,3-148,4	
Infiltração perineural	Sim	109	84	54,1	7,4	39,5-68,7	<0,00*
	Não	104	39	141,3	9,7	122,1-160,4	
Embolização linfática	Sim	31	24	57,1	12,8	31,8-82,4	0,013*
	Não	185	101	104,5	7,5	89,7-119,3	
Ruptura capsular	Sim	61	47	46,7	9,9	27,2-66,2	<0,00*
	Não	46	21	121,3	14	93,7-148,9	
T patológico	T1/T2	83	34	137,5	10,7	116,5-158,6	<0,00*
	T3/T4	135	93	67,5	7,6	52,5-82,6	
N patológico	N0	91	46	113,2	10,6	92,2-134,1	0,020*
	N+	127	81	81,5	8,2	65,2-97,7	

Comp.= comprometidas

Exig. = exíguas

Teste Log-Rank. * Significância com p <0.05.

A curva de sobrevida em relação a extensão do tumor primário (T), mostrou que pacientes classificados como T1 e T2 tiveram sobrevida média superior a 10 anos (11 anos e 6 meses), enquanto pacientes T3 e T4, foi de 6 anos e 1 mês (**Figura 7**).

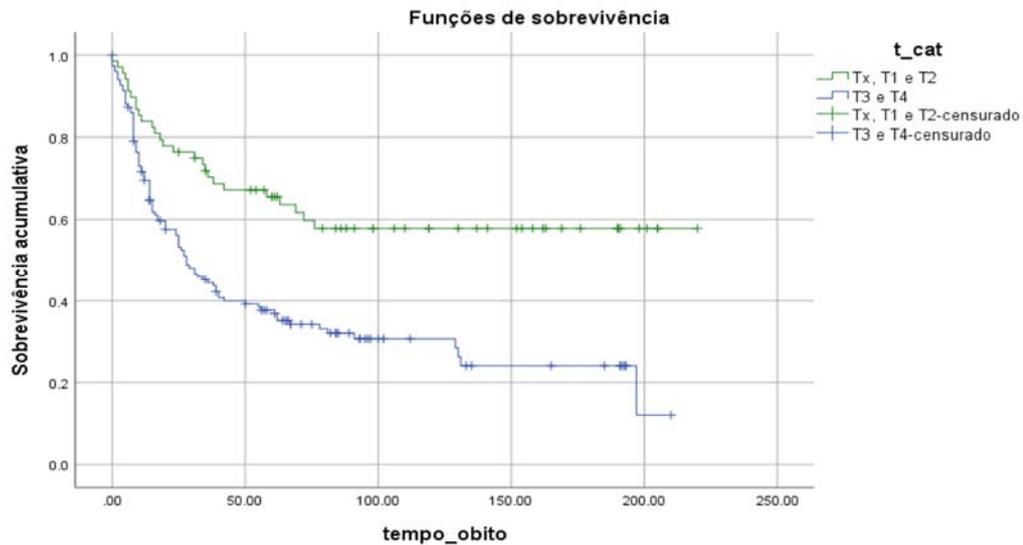


Figura 7 - Avaliação da função de sobrevivência em meses em relação ao tamanho do tumor (Log-Rank <0,00).

A avaliação dos linfonodos (N) mostrou que pacientes N0 tiveram sobrevida média de 9 anos e 2 meses, enquanto pacientes com linfonodos positivos decaiu para 3 anos (**Figura 8**).

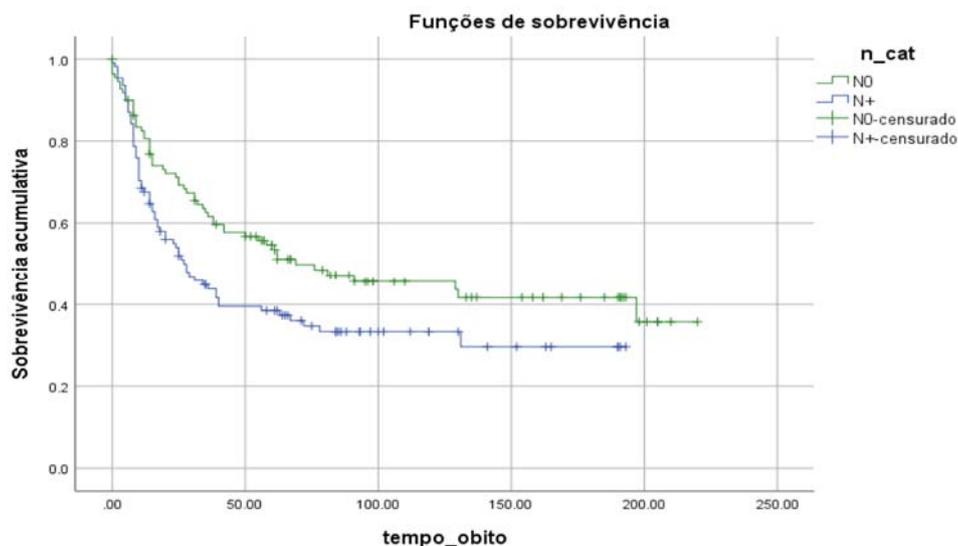


Figura 8 - Avaliação da função de sobrevivência em meses em relação ao comprometimento linfonodal clínico (Log-Rank 0,021).

A avaliação da sobrevida em relação ao estadiamento clínico mostrou que pacientes classificados como EC I e EC II viveram quase o dobro (13 anos e 4 meses) que os classificados como EC III e EC IV (6 anos e 9 meses) (**Figura 9**).

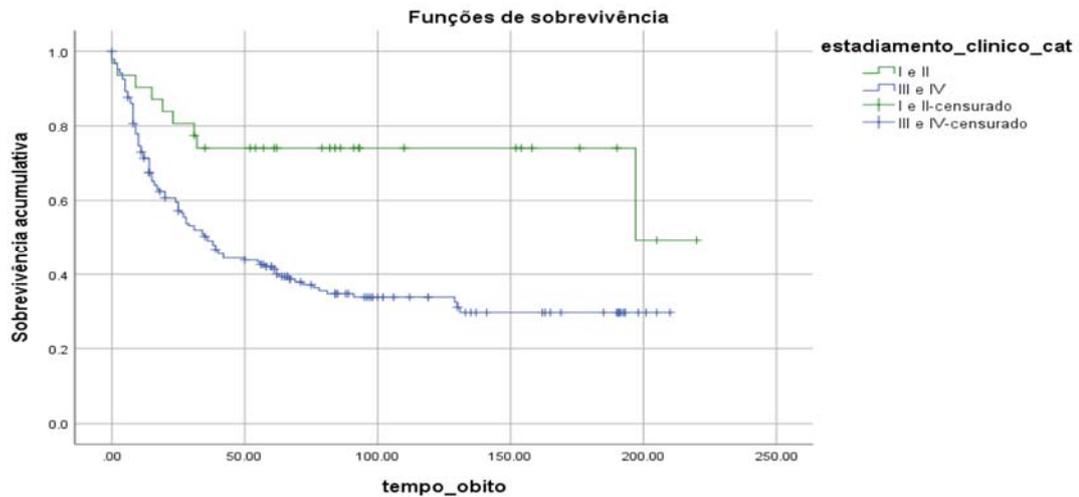


Figura 9 - Avaliação do estadiamento clínico dos pacientes e a função de sobrevivência em meses (Log-Rank 0,001).

Pacientes sem invasão óssea diagnosticada no exame de imagem apresentaram sobrevivência média maior, de aproximadamente 117 meses, quando comparados aos pacientes com laudo dos exames de imagem que comprovavam invasão óssea, sendo de aproximadamente 51,3 meses (**Figura 10**).

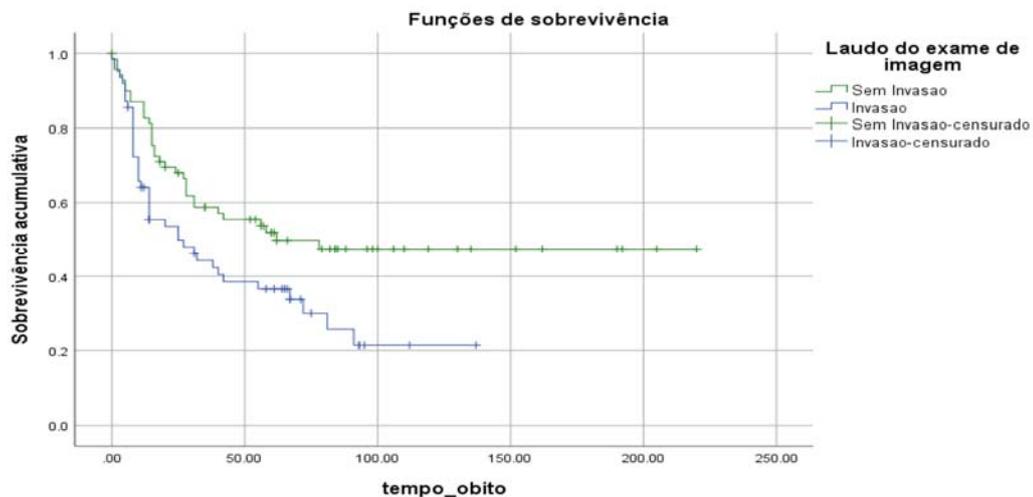


Figura 10 - Avaliação da função de sobrevivência em meses em relação ao diagnóstico de invasão óssea proveniente do laudo do exame de imagem (Log-Rank $p=0,013$).

Observou-se associação entre sobrevida e margens cirúrgicas. Pacientes que tiveram margens cirúrgicas livres de comprometimento tiveram a sobrevida média de 8 anos e 4 meses, enquanto os que apresentaram margens comprometidas foi de 2 anos e 4 meses (Figura 11).

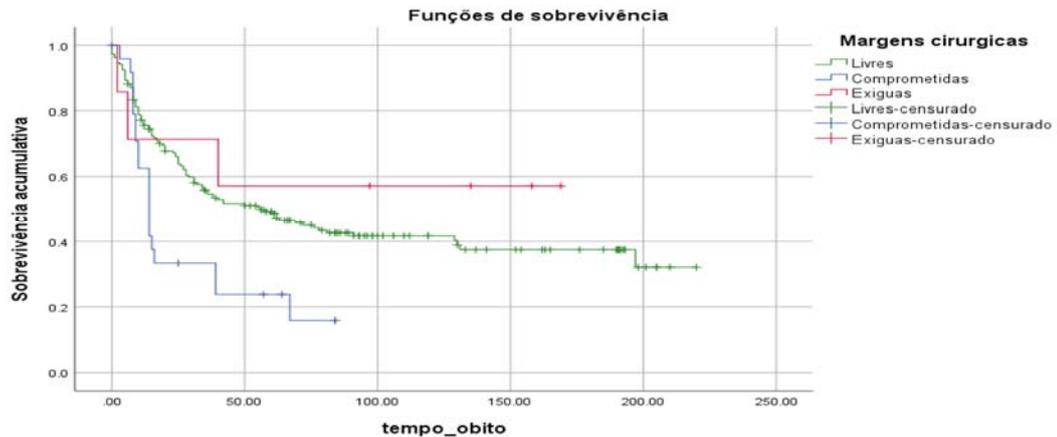


Figura 11 - Avaliação do comprometimento das margens cirúrgicas em relação a função de sobrevivência em meses (Log-Rank 0,011).

A avaliação da invasão óssea no laudo anatomopatológico mostrou que o comprometimento ósseo pela neoplasia afetou a sobrevivência dos pacientes, caindo de 10 anos e 1 mês para os pacientes que não apresentaram o osso mandibular acometido para 3 anos e 4 meses naqueles que possuíam a invasão óssea (Figura 12).

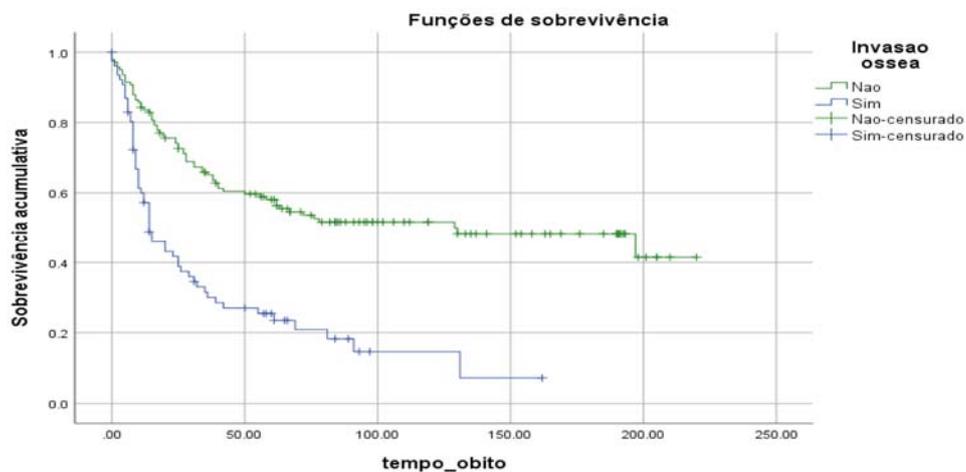


Figura 12 - Análise da presença de Invasão óssea em relação a sobrevida dos pacientes em meses (Log-Rank <0,00).

Pacientes que não tiveram invasão da musculatura esquelética pelo carcinoma apresentaram aproximadamente 4 anos a mais de sobrevida média quando comparado com os pacientes com invasão muscular (**Figura 13**).

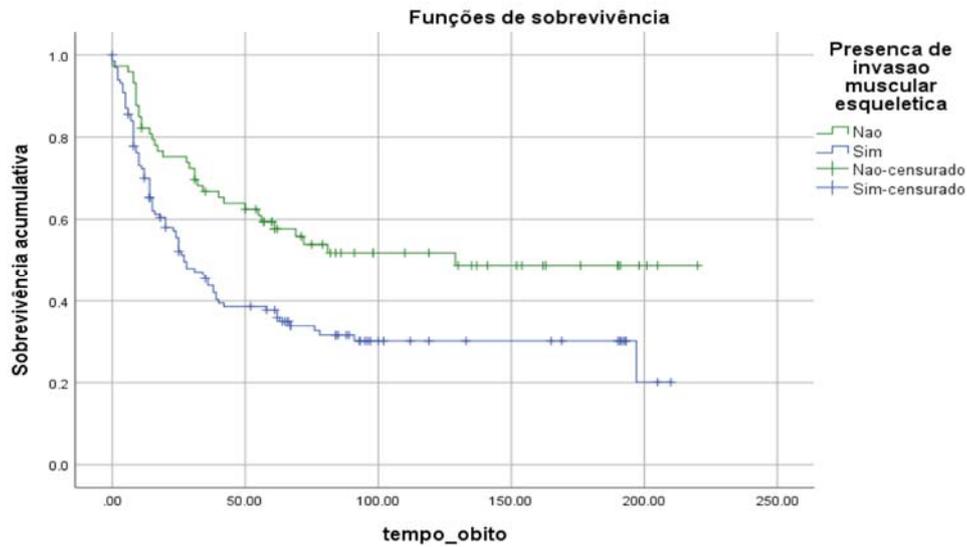


Figura 13 - Avaliação da invasão da musculatura esquelética e sobrevida em meses (Log-Rank 0,002).

Pacientes com infiltração perineural tiveram uma sobrevida média de 54,1 meses, sendo muito maior para os pacientes sem infiltração, de aproximadamente 141,3 meses (**Figura 14**).

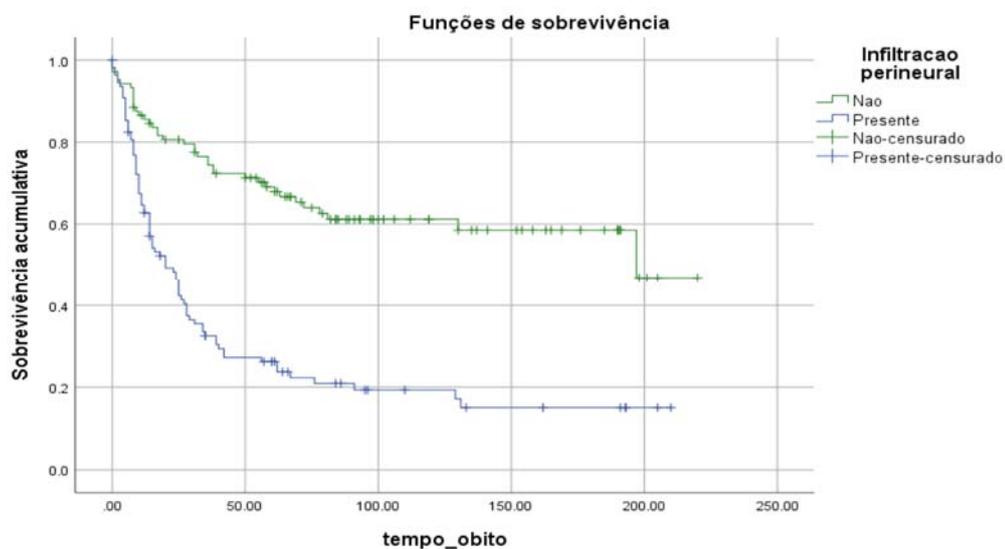


Figura 14 - Avaliação da infiltração perineural correlacionada à sobrevida em meses (Log-Rank <0,00).

A embolização linfática reduziu em (57,1 meses) a sobrevida média dos pacientes, em relação aos que não a apresentaram (104,5 meses) (**Figura 15**).

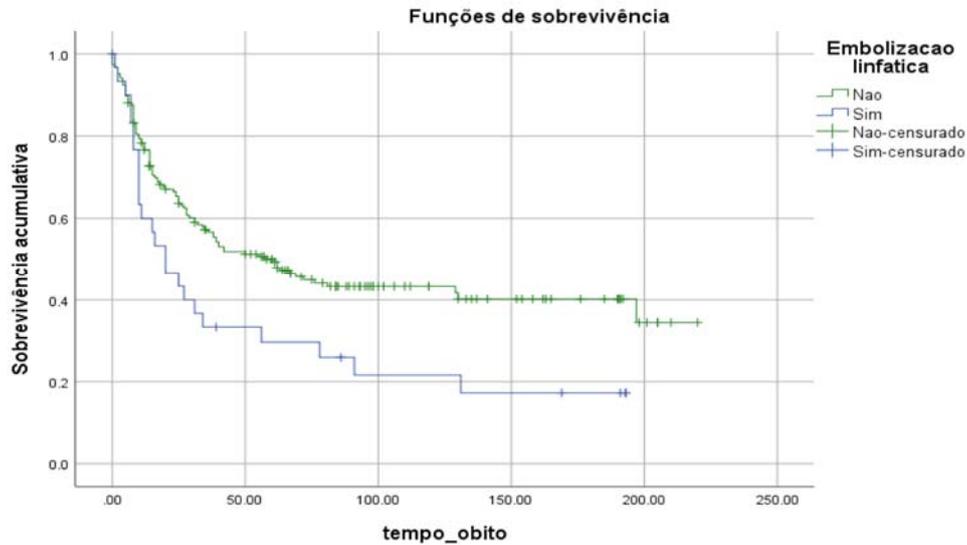


Figura 15 - Avaliação da embolização linfática correlacionada a sobrevivência em meses (Log-Rank 0,013).

A análise do comprometimento linfonodal mostrou que a presença de ruptura capsular reduziu a sobrevida global dos pacientes comparados aos que não apresentaram este achado (**Figura 16**).

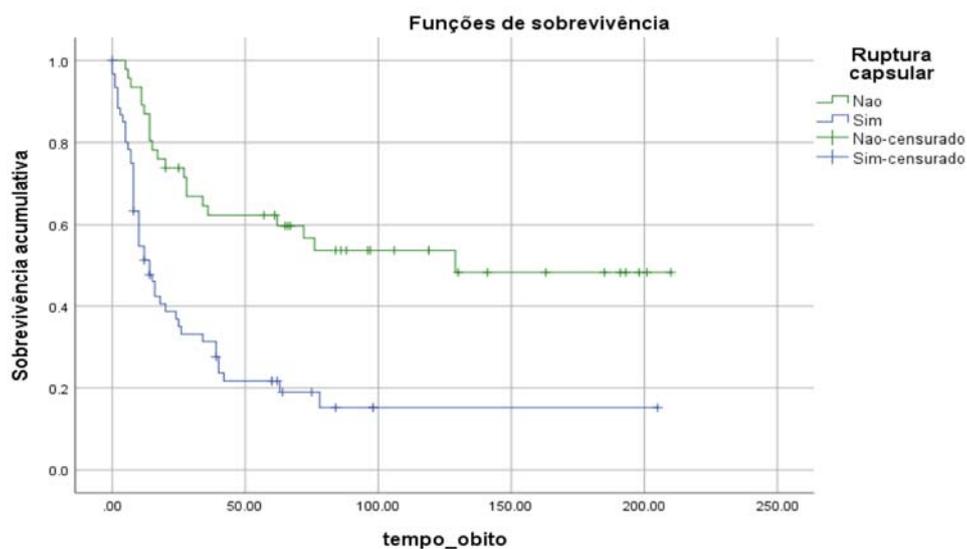


Figura 16 - Avaliação da função de sobrevivência em meses em relação a presença de ruptura capsular (Log-Rank <math><0,00</math>).

A avaliação do TNM patológico (pTNM), mostrou associação com a sobrevida dos pacientes tanto em relação às características do tumor, quanto ao comprometimento linfonodal. Pacientes estadiados como pT1/pT2 apresentaram sobrevida média de 11 anos e 4 meses, enquanto para os pT3/pT4 foi de 5 anos e 6 meses (**Figura 17**).

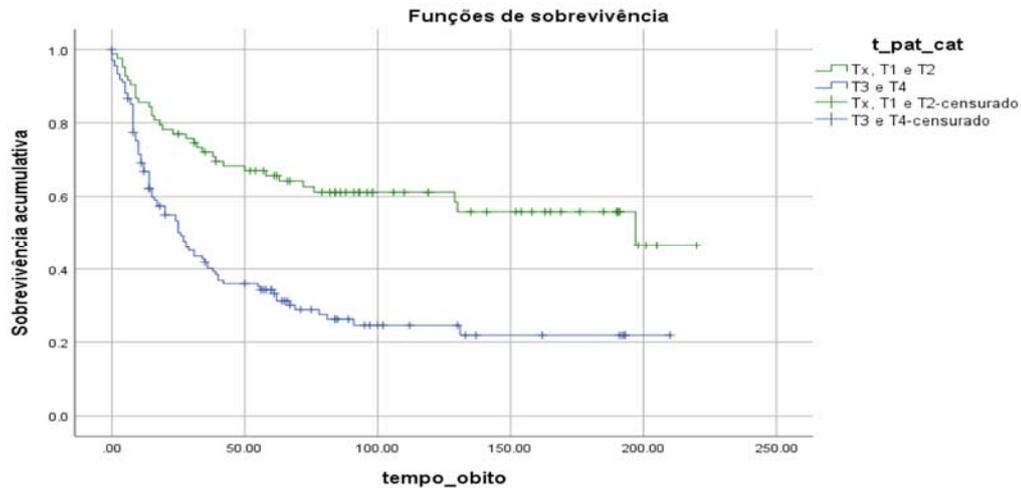


Figura 17 - Avaliação da função de sobrevivência em meses em relação às características patológicas do tumor (Log-Rank <0,00).

Pacientes pN0 tiveram uma sobrevida de 31,7 meses a mais que os com comprometimento linfonodal (N+) (**Figura 18**).

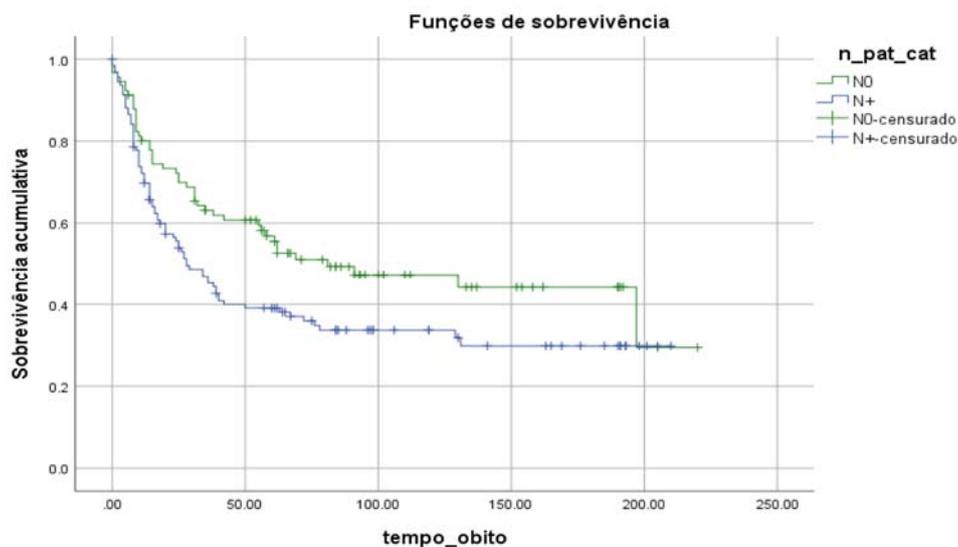


Figura 18 - Avaliação da função de sobrevivência em meses em relação ao comprometimento linfonodal patológico (Log-Rank 0,020).

Após análise da sobrevida, foi aplicado o Modelo de Regressão de COX simples. Este, mostrou o risco que cada categoria apresentava de atingir o desfecho escolhido no estudo (óbito). Pacientes categorizados como T3 e T4, tanto na classificação clínica como na patológica, apresentaram um risco respectivamente de 2,37 e 2,57 vezes maior de ir a óbito quando comparado com pacientes T1 e T2. O risco também foi maior para os pacientes com linfonodos positivos (N+), para os estadiados como EC III e EC IV, e para aqueles com presença de invasão óssea no laudo de imagem. A presença de invasão óssea no laudo anatomopatológico elevou em 2,73 vezes o risco dos pacientes irem a óbito, quando comparados aos pacientes sem invasão. Para outros achados, os riscos foram - infiltração perineural com 3,33 vezes, embolização linfática de 1,74 vezes, invasão da musculatura esquelética de 1,87 vezes, e ruptura capsular de 3,07 vezes (**Tabela 16**).

Tabela 16 - Modelo de Regressão de Cox simples da sobrevida com as variáveis TN clínico, TN patológico, estadiamento clínico, laudo de invasão óssea no exame de imagem, invasão óssea no laudo anatomopatológico, invasão muscular esquelética, infiltração perineural, embolização linfática, ruptura capsular e margens cirúrgicas.

	T1/T2 (ref.)	T3/T4	HR*	95% IC	p
T clínico	68	150	2,37	1,54-3,64	<0,00*
T patológico	83	135	2,57	1,72-3,84	<0,00*
	N0 (ref.)	N+	HR*	95% IC	p
N clínico	110	108	1,50	1,05-2,14	0,023*
N patológico	91	127	1,52	1,06-2,19	<0,022*
	EI/EII (ref.)	EIII/EIV	HR*	95% IC	p
Estadiamento clínico	31	187	2,98	1,51-5,88	0,002
	Não (ref.)	Sim	HR*	95% IC	p
Invasão óssea no exame de imagem	70	63	1,75	1,11-2,77	0,016*
Invasão óssea histopatológico	142	77	2,73	1,91-3,92	<0,00*
Invasão muscular	73	132	1,87	1,26-2,79	0,002*
Infiltração perineural	104	109	3,33	2,27-4,91	<0,00*
Embolização linfática	185	31	1,74	1,11-2,71	0,015*
Ruptura capsular	46	61	3,07	1,81-5,20	<0,00*
	Livres (ref.)	Comp.	HR*	95% IC	p
Margens cirurgicas	186	32	1,56	0,98-2,48	0,057

Comp.= margens comprometidas e exíguas. Ref.= variável de referência para a análise. Regressão de Cox univariada. * Significância com $p < 0.05$.

Uma vez que a análise univariada se mostrou significativa nas variáveis analisadas, optou-se por realizar uma seleção destas para aplicação do modelo de regressão de COX multivariado. No método de seleção, depois de 7 etapas de cruzamentos, apenas 4 variáveis foram selecionadas para aplicação do modelo multivariado. Por fim, neste modelo foi encontrado que invasão óssea e infiltração perineural foram significativas para o desfecho óbito (**Tabela 17**).

Tabela 17 - Modelo de regressão de COX múltiplo da sobrevida com as variáveis, invasão óssea, invasão muscular esquelética, infiltração perineural, embolização linfática e T clínico.

	Ref.	HR*	95%IC	p
Invasão óssea no anatomopatológico	Não	2,54	1,72-3,76	<0,00*
Invasão muscular	Não	1,45	0,92-2,27	0,103
Infiltração perineural	Não	3,00	1,97-4,59	<0,00*
T clínico	T1/T2	1,54	0,96-2,47	0,071

Regressão de Cox multivariada. * Significância com $p < 0.05$.

4.2 ANÁLISE MOLECULAR

A escolha do gene GAPDH foi feita com a utilização do programa NormFinder (**Tabela 18**), após a realização de qPCRs para testar o nível de expressão dos seguintes genes:

Tabela 18 - Resultado do teste do gene endógeno no NormFinder.

Gene name	Stability value
18S	0,140
ACTINA	0,069
GAPDH	0,021
b2m	0,068
Best gene	GAPDH

Foram excluídas do experimento 3 amostras por não se mostrarem adequadas, e realizado o qPCR das 37 amostras restantes. Os resultados obtidos foram estratificados, avaliando o nível de expressão de cada gene alvo do estudo, em relação ao GAPDH, como sendo downregulados (DOWN), superexpressos (UP) e com expressão normal (SEM ALTERAÇÃO) (**Figura 19**).

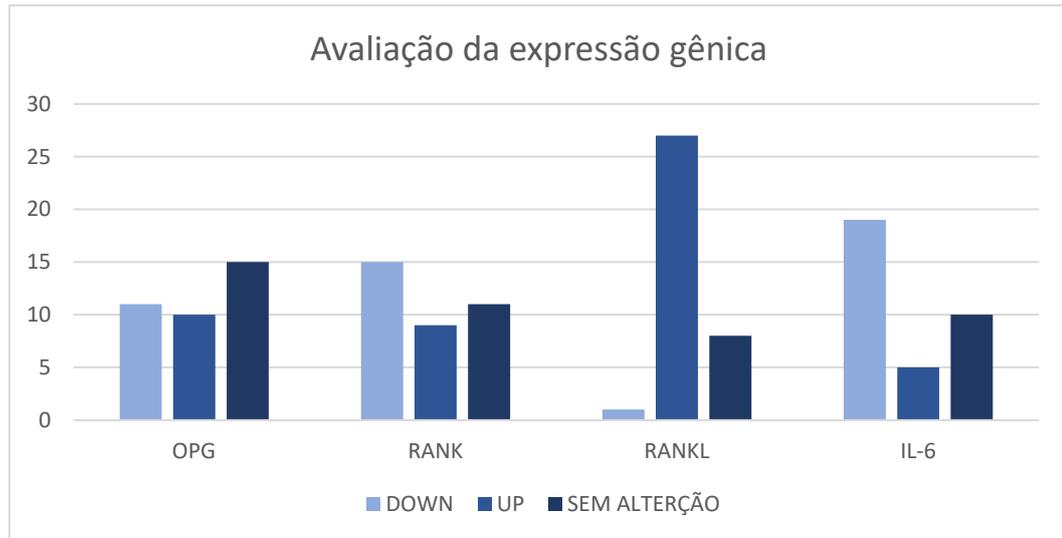


Figura 19 - Avaliação da expressão gênica dos genes avaliados.

Após a realização do qPCR das 37 amostras, 1 amostra apresentou amplificação tardia (acima do ciclo 37) para o gene RANK e o mesmo ocorreu para duas amostras em relação a amplificação para o gene da IL-6. Foi feita a categorização da expressão relativa de cada um dos genes segundo a metodologia proposta (**Tabela 19**).

Tabela 19 - Expressão relativa dos genes estudados no projeto nas amostras de neoplasia (CEC) avaliadas.

	RANK (n=36)	RANKL (n=37)	IL-6 (n=35)	OPG (n=37)
Down	16 (44,5%)	1 (2,7%)	19 (54,3%)	11 (29,8%)
UP	9 (25%)	28 (75,7%)	5 (14,3%)	10 (27%)
Sem alteração	11 (30,5%)	8 (21,6%)	11 (31,4%)	16 (43,2%)

Número de amostras analisadas para cada um dos genes estudados e suas expressões.

Com a categorização dos genes, também foi analisada a expressão de cada um deles considerando os grupos de pacientes com invasão óssea no laudo anatomopatológico e sem invasão óssea, mostrando que o gene da IL-6 foi associado com a invasão óssea (**Tabela 20**).

Tabela 20 - Associação da expressão relativa dos genes estudados com a invasão óssea.

		Com invasão óssea	Sem invasão óssea	Total	p
RANK	<= 0,5	9 (47,38%)	7 (41,2%)	16	0,91
	0,5-2	5 (26,31%)	6 (35,3%)	11	
	>=2,0	5 (26,31%)	4 (23,5%)	9	
RANKL	<= 0,5	0 (0)	1 (5,6%)	1	0,07
	0,5-2	2 (10,5%)	6 (33,3%)	8	
	>=2,0	17 (89,5%)	11 (61,1%)	28	
IL-6	<= 0,5	6 (33,3%)	13 (76,5%)	21	0,04*
	0,5-2	8 (44,5%)	3 (17,6%)	11	
	>=2,0	4 (22,2%)	1 (5,9%)	5	
OPG	<= 0,5	4 (21,1%)	7 (38,9%)	11	0,30
	0,5-2	8 (42,1%)	8 (44,4%)	16	
	>=2,0	7 (36,8%)	3 (16,7%)	10	

Teste T * Significância com $p < 0.05$.

Posteriormente foi realizado cruzamento de cada um dos genes com as variáveis clínicas e histopatológicas que poderiam apresentar correlação com a progressão do tumor e invasão óssea. As variáveis escolhidas para o cruzamento foram - tipo histológico da neoplasia, invasão óssea, recidiva e presença de inflamação (**Tabelas 21-24**).

Tabela 21 – Associação entre expressão gênica da OPG e demais parâmetros clínicos e patológicos.

	Expressão gênica OPG			p
	Downregulado	Normal	Superexpresso	
<u>Tipo histológico</u>				
Bem diferenciado	4	6	4	0,06
Moderadamente diferenciado	7	9	2	
Pouco diferenciado	0	1	4	
<u>Invasão óssea</u>				
Sim	4	8	7	0,3
Não	7	8	3	
<u>Recidiva</u>				
Sim	5	8	5	0,92
Não	6	7	5	
<u>Inflamação</u>				
Indetectável	3	9	8	0,19
Leve	1	3	0	
Moderada	5	3	1	
Intensa	2	1	1	

Teste Qui-quadrado e Teste exato de Fisher. * Significância com $p < 0.05$.

Tabela 22 – Associação entre expressão gênica da IL-6 e demais parâmetros clínicos e patológicos.

	Expressão gênica IL-6			p
	Downregulado	Normal	Superexpresso	
<u>Tipo histológico</u>				
Bem diferenciado	8	3	3	0,57
Moderadamente diferenciado	8	7	1	
Pouco diferenciado	3	1	1	
<u>Invasão óssea</u>				
Sim	6	8	4	0,04*
Não	13	3	1	
<u>Recidiva</u>				
Sim	10	5	2	1
Não	9	5	3	
<u>Inflamação</u>				
Indetectável	10	3	5	0,25
Leve	2	2	0	
Moderada	4	5	0	
Intensa	3	1	0	

Teste Qui-quadrado e Teste exato de Fisher. * Significância com $p < 0.05$.

Tabela 23 – Associação entre expressão gênica do RANK e demais parâmetros clínicos e patológicos.

	Expressão gênica RANK			p
	Downregulado	Normal	Superexpresso	
<u>Tipo histológico</u>				
Bem diferenciado	5	4	5	0,36
Moderadamente diferenciado	10	5	2	
Pouco diferenciado	1	2	2	
<u>Invasão óssea</u>				
Sim	9	5	5	0,91
Não	7	6	4	
<u>Recidiva</u>				
Sim	7	6	5	0,75
Não	9	5	3	
<u>Inflamação</u>				
Indetectável	7	7	6	0,7
Leve	2	2	0	
Moderada	4	2	2	
Intensa	3	0	1	

Teste Qui-quadrado e Teste exato de Fisher. * Significância com $p < 0.05$.

Tabela 24 – Associação entre expressão gênica do RANKL e demais parâmetros clínicos e patológicos.

	Expressão gênica RANKL			p
	Downregulado	Normal	Superexpresso	
<u>Tipo histológico</u>				
Bem diferenciado	0	5	9	0,43
Moderadamente diferenciado	1	3	14	
Pouco diferenciado	0	0	5	
<u>Invasão óssea</u>				
Sim	0	2	17	0,07
Não	1	6	11	
<u>Recidiva</u>				
Sim	1	4	13	1
Não	0	4	14	
<u>Inflamação</u>				
Indetectável	1	2	17	0,09
Leve	0	1	3	
Moderada	0	2	7	
Intensa	0	3	1	

Teste Qui-quadrado e Teste exato de Fisher. * Significância com $p < 0.05$.

Foi realizada a análise de associação da expressão de cada um dos genes e sua respectiva classificação com os demais genes analisados, por meio da aplicação do teste exato de Fisher. O cruzamento do gene RANKL com os outros genes estudados apresentou associação significativa com o RANK ($p=0,001$), com o da IL-6 ($p=0,016$) e da OPG ($p<0,00$). Realizando o mesmo tipo de cruzamento com o gene RANK, este também mostrou associação significativa com a IL-6 ($p=0,019$) e OPG ($p<0,00$). A expressão da IL-6 e do gene OPG também demonstrou significância ($p=0,026$). Ficou evidente a associação da expressão desses genes na neoplasia (**Tabela 25**).

Tabela 25 – Análise da associação da expressão dos genes RANK, RANKL, OPG e IL-6.

RANKL	RANK (p <0,00)	OPG (p <0,00)	IL-6 (p =0,016)
Down	Down 1(6,3%) Normal 0 Up 0	Down 1 (9,1%) Normal 0 Up 0	Down 1 (5,3%) Normal 0 Up 0
Normal	Down 8 (50%0 Normal 0 Up 0	Down 7 (63,6%) Normal 1 (6,3%) Up 0	Down 8 (42,1%) Normal 0 Up 0
Up	Down 7 (43,8%) Normal 11 (100%) Up 9 (100%)	Down 3 (27,3%) Normal 15 (93,8%) Up 10 (100%)	Down 10 (52,6%) Normal 11 (100%) Up 5 (100%)
	RANK	OPG (p <0,00)	IL-6 (p =0,019)
	Down	Down 10 (62,5%0 Normal 5 (31,3%) Up 1 (6,3%)	Down 12 (75%) Normal 4 (25%) Up 0
	Normal	Down 1 (9,1%) Normal 8 (72,7%) Up 2 (18,2%)	Down 6 (54,5%) Normal 2 (18,2%) Up 3 (27,3%)
	Up	Down 0 Normal 3 (33,3%) Up 6 (66,7%)	Down 1 (14,3%) Normal 4 (57,1%) Up 2 (28,6%)
		OPG	IL-6 (p =0,026)
		Down	Down 9 (47,4%) Normal 2 (18,2%) Up 0
		Normal	Down 8 (42,1%) Normal 6 (54,5%) Up 1 (20%)
		UP	Down 2 (10,5%) Normal 3 (27,3%) Up 4 (80%)

Teste Qui-quadrado e Teste exato de Fisher. * Significância com p <0.05. Análises das variáveis discriminadas em cinza no quadro.

Com os valores da expressão relativa (RQ) dos genes estudados foi realizado gráfico boxplot para visualizar a distribuição e valores discrepantes de cada dos genes avaliados no grupo com invasão óssea e sem invasão óssea (**Figuras 20-23**).

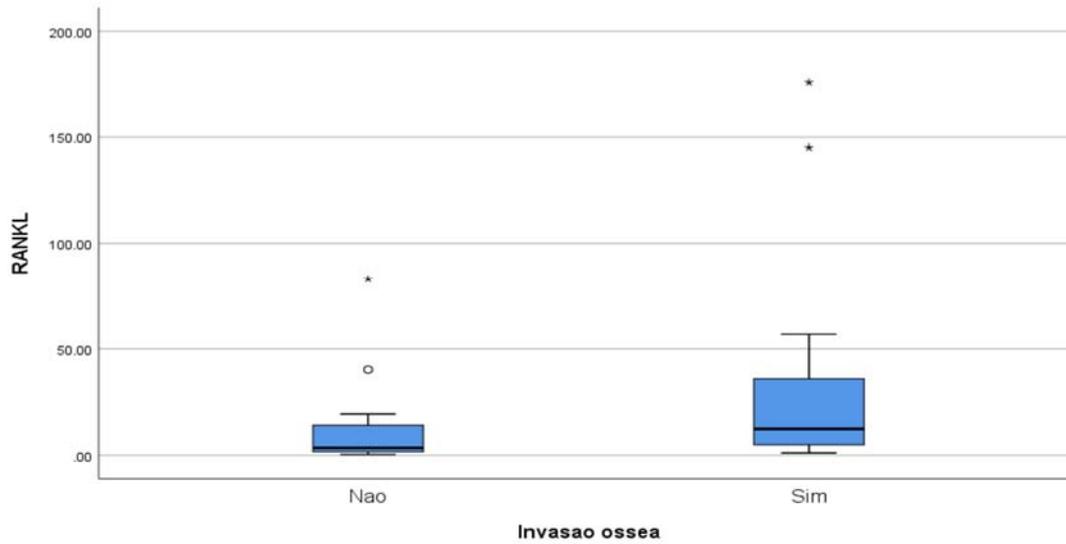


Figura 20 - Gráfico boxplot do gene RANKL realizado para 19 amostras com invasão óssea e 18 amostras sem invasão óssea.

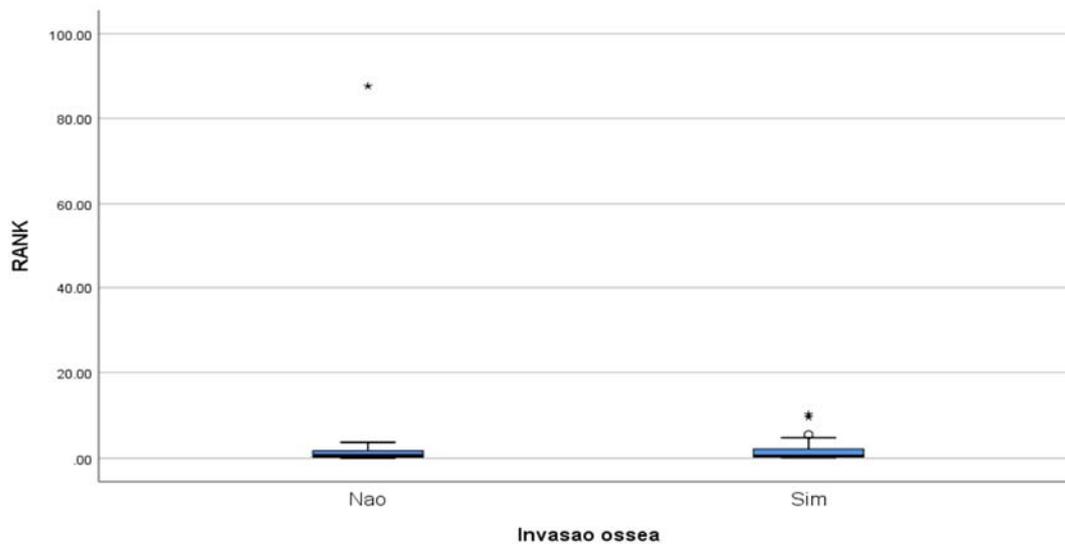


Figura 21 - Gráfico boxplot do gene RANK realizado para 19 amostras com invasão óssea e 17 amostras sem invasão óssea.

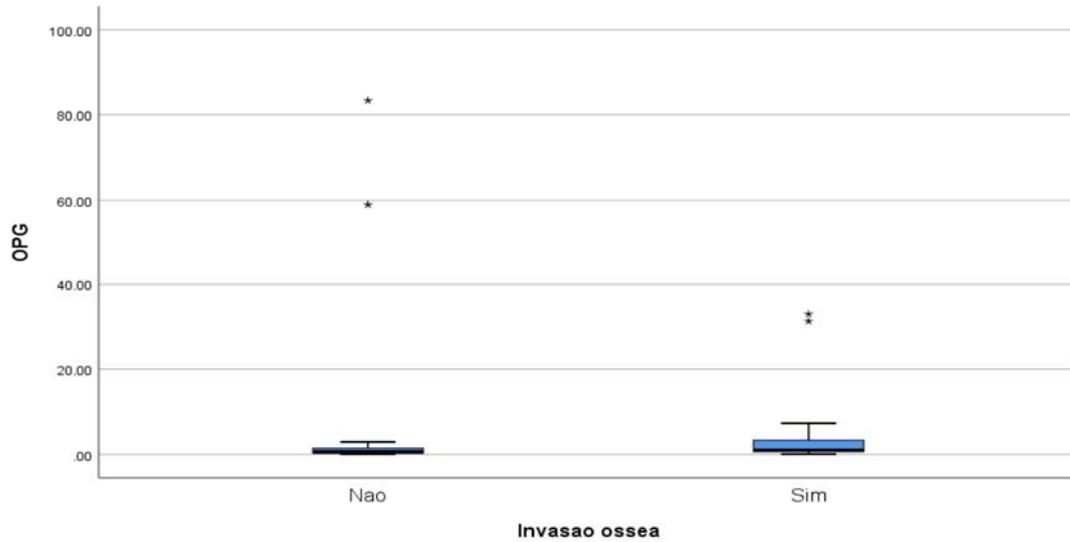


Figura 22 - Gráfico boxplot do gene OPG realizado para 19 amostras com invasão óssea e 18 amostras sem invasão óssea.

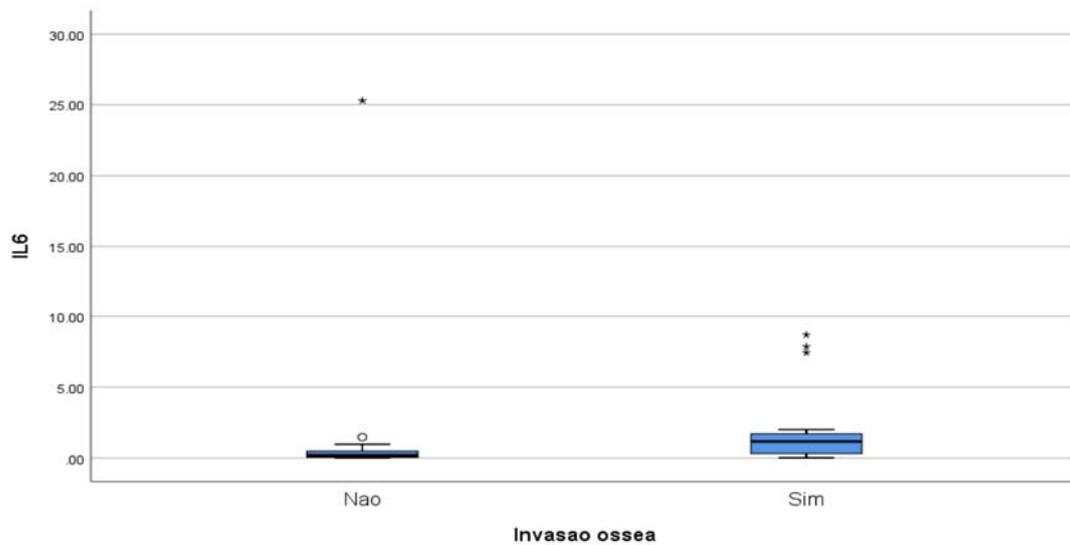


Figura 23 - Gráfico boxplot do gene IL-6 realizado para 18 amostras com invasão óssea e 17 amostras sem invasão óssea.

Para concluir a análise estatística, foi realizada a correlação da expressão de cada um dos genes pesquisados com a sobrevida dos pacientes (**Tabela 26**), e posteriormente a confecção das curvas de sobrevivência (**Figuras 24-27**).

Tabela 26 – Correlação entre expressão gênica e sobrevida média dos pacientes.

Gene	Expressão	N total	N óbitos	Sobrevida (meses)	DP	95% IC	p
RANK	Down	16	9	88,3	24,7	41,8-134,8	0,94
	Normal	11	6	60,4	11,4	38,1-82,8	
	Up	9	6	63	20,8	22,3-103,8	
RANKL	Down	1	1	78	0	78-78	0,24
	Normal	8	3	138,4	31,3	77,1-199,9	
	Up	28	18	58,4	12	35-82	
OPG	Down	11	5	120	27,2	66,6-173,4	0,26
	Normal	16	10	44,1	10,4	23,6-64,5	
	Up	10	7	63,1	18,5	26,7-99,4	
IL-6	Down	19	9	108,5	21,5	66,3-150,6	0,05*
	Normal	11	8	24,7	6,2	12,5-36,8	
	Up	5	3	82,1	25,7	31,6-132,5	

Teste de Log Rank* Significância com $p \leq 0.05$.

A análise da expressão do IL-6 dentro dos padrões de normalidade mostrou uma sobrevida média inferior (24,7 meses), quando comparado a expressão downregulada (108,5 meses) e up (82,1 meses). Dos 11 pacientes que apresentaram a expressão normal de IL-6, 8 foram a óbito, sendo 6 por conta da doença. Estes resultados foram interpretados com cautela, e fez-se necessário abordar quais outras informações relevantes para a provável diminuição na expectativa de vida destes pacientes tivessem que ser avaliados. Estas informações foram discriminadas na **Tabela 27**, e foi possível observar que 83,3% apresentavam margens comprometidas ou exíguas e tinham hábitos nocivos, ainda, esta mesma porcentagem foi encontrada para os que tiveram tratamento com mandibulectomia do tipo segmentar, evidenciando serem casos mais avançados e/ou agressivos.

Tabela 27 – Pacientes com a expressão normal da IL-6 e que foram à óbito.

Idade (anos)	Tempo da história	Hábitos	Localização	Invasão óssea	Margens	Cirurgia	Medida 1	Medida 3	Rtx
42	8 meses	E.	retromolar	Sim	comprometidas	Marginal	6,5 cm	3 cm	Sim
47	8 meses	-	geng. inf.	Sim	comprometidas	Segmentar	4,5 cm	2 cm	Sim
50	4 meses	T.	rebordo	Sim	comprometidas	Hemimand.	6,5 cm	6,5 cm	Sim
63	2 meses	E./T.	geng. inf.	Sim	exiguas	Hemimand.	8,5 cm	5 cm	Sim
51	5 meses	E./T.	assoalho	Não	comprometidas	Segmentar	2 cm	2 cm	Sim
85	4 meses	E./T.	retromolar	Sim	livres	Hemimand.	3,5 cm	3 cm	Sim

T= tabagista; E=etilista

Medida 1= maior tamanho da neoplasia

Medida 3= profundidade de invasão da neoplasia.

Pacientes com o gene RANKL expresso dentro dos padrões de normalidade sobreviveram em média 138 meses, com 78 meses para aqueles que apresentaram com baixa expressão e média de 58 meses para os pacientes que exibiram super expressão do RANKL.

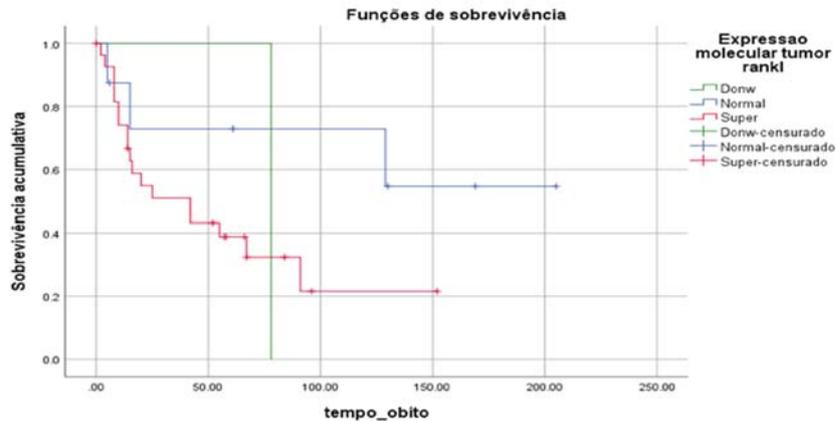


Figura 24 - Avaliação da sobrevida em meses em relação a expressão do gene RANKL (Log-Rank 0,24).

A avaliação da expressão do RANK mostrou que pacientes que apresentaram este gene downregulado tiveram sobrevida média de 88 meses, enquanto para os que o apresentaram super expresso a média foi e 63 meses, e de 60 meses quando o mesmo se apresentava dentro da normalidade.

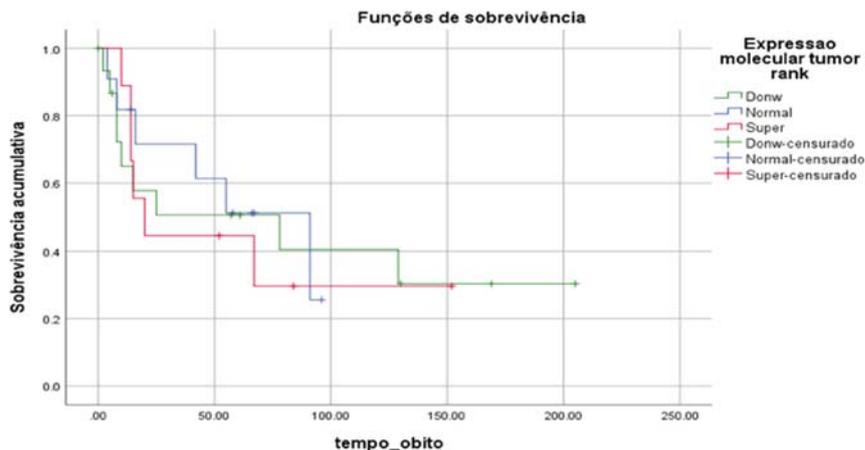


Figura 25 - Avaliação da sobrevida em meses em relação a expressão do gene RANK (Log-Rank 0,94).

Pacientes com expressão downregulada da OPG mostraram uma sobrevida média maior (120 meses), comparados àqueles com a expressão normal (44 meses) ou superexpressão (63 meses).

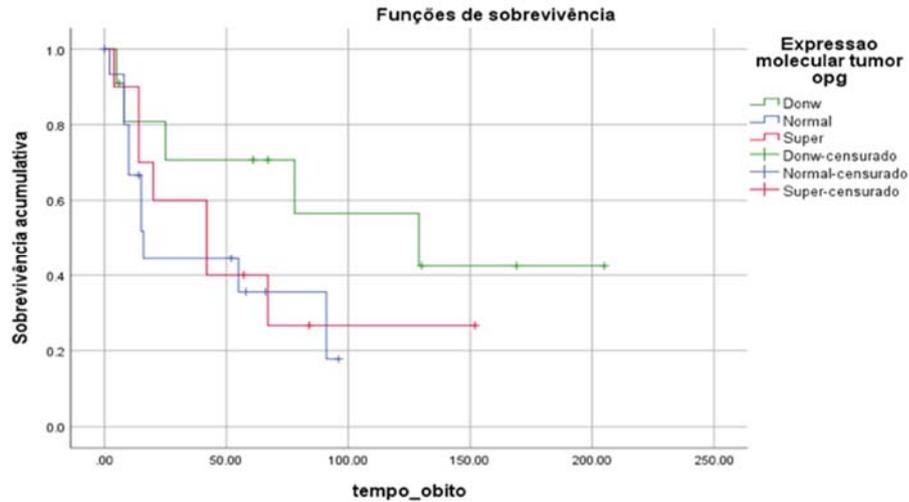


Figura 26 - Avaliação da sobrevida em meses em relação a expressão do gene OPG (Log-Rank 0,94).

Os pacientes com expressão do gene da IL-6 dentro dos padrões de normalidade apresentaram sobrevida média de 24 meses, enquanto nos casos superexpressos e com baixa expressão esta foi de 82 e 108 meses em média, respectivamente. A expressão do gene IL-6 foi o único que apresentou associação estatisticamente significativa com a sobrevida ($p=0,05$).

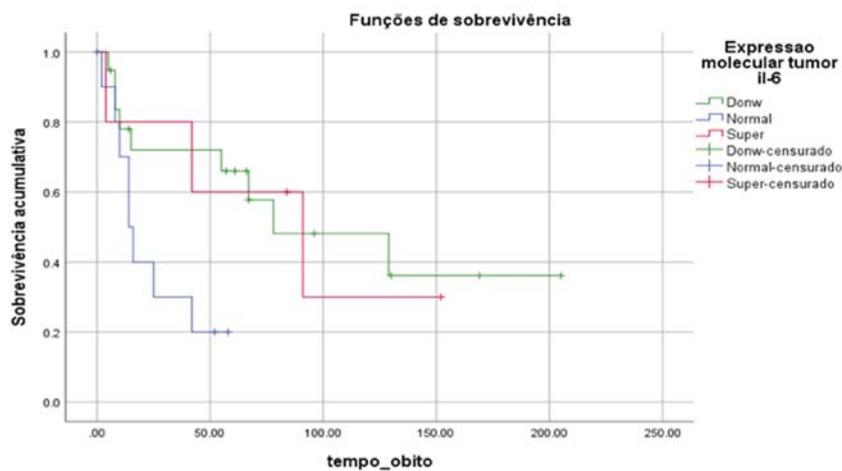


Figura 27 - Avaliação da sobrevida em meses em relação a expressão do gene IL-6 (Log-Rank 0,05).

5 DISCUSSÃO

A análise retrospectiva dos casos cirúrgicos de CEC de boca que envolveram mandibulectomia realizados no A.C.Camargo Cancer Center em um período de 25 anos culminou na identificação de 220 pacientes tratados com a remoção de componente ósseo mandibular no tratamento do CEC oral. Nestes pacientes, foi possível identificar que existe uma relação entre a sobrevida global dos mesmos e diversos parâmetros, incluindo a invasão óssea. Na invasão óssea pela neoplasia, foi identificado que genes já sabidamente envolvidos no metabolismo ósseo também estão expressos no tumor, e foram associados com a progressão da neoplasia.

Em relação à análise dos pacientes atendidos neste centro de referência, foi identificada concordância com outros estudos no que se refere à prevalência do CEC. Em um estudo anterior, no período de 2001 a 2012, 505 pacientes foram tratados e diagnosticados com CEC oral no A.C.Camargo Cancer Center, e foi descrito que 2,5 vezes mais homens foram afetados quando comparados às mulheres, e metade dos pacientes eram maiores de 60 anos de idade⁹. Estes achados corroboram com àqueles encontrados neste estudo, que revelou dentro do universo da amostra analisada uma predominância do sexo masculino de 73,2%, sendo 2,73 vezes maior que no sexo feminino, com idade média de 60 anos.

De forma geral, a região mais acometida pelo CEC oral é a língua (40%), seguida pela região de assoalho bucal (30%) e lábio inferior⁵. Esta prevalência é calculada com base em todos os casos de CEC, diferente deste estudo, que identificou as regiões mais acometidas como gengiva inferior (27,7%), seguida de assoalho (25,5%) e região retromolar (16,8%). Esta discordância provavelmente é decorrente do fato que o grupo de pacientes estudados tiveram como critério de inclusão a realização de mandibulectomia, restringindo com isso as áreas da lesão inicial, por exemplo, lesões menores de língua e lábio não foram selecionadas por não serem tratadas com remoção de parte da mandíbula.

A invasão óssea da mandíbula pela neoplasia influencia no estadiamento e tratamento do CEC, estando associada aos casos mais avançados. Yue et al.¹⁹ fizeram um estudo com 44 pacientes submetidos ao tratamento do CEC com mandibulectomia, e encontraram 27 casos com invasão óssea (61,4%) e 17 casos sem de acordo com análise histopatológica. Ahmad et al.³ realizaram um levantamento de 2005-2015 resultando em 108 pacientes que fizeram algum tipo de mandibulectomia no tratamento para o CEC, e destes, 74 (68,5%) apresentavam

invasão óssea comprovada após análise histopatológica. Na análise retrospectiva realizada neste estudo, foi encontrado que dentro dos 220 pacientes que realizaram algum tipo de mandibulectomia, 77 (35%) apresentaram invasão óssea em laudo anatomopatológico. Observamos menor prevalência de invasão dos tumores quando comparada aos outros estudos. Alguns fatores como extensão tumor (tumores mais avançados) e que necessitam de margem cirúrgica adequada a sua extensão possa justificar este dado. A grande maioria dos nossos casos eram tumores avançados.

Ainda sobre invasão mandibular, sua comprovação não se limita ao exame anatomopatológico, e os exames de imagem são essenciais, principalmente, na fase de diagnóstico e de avaliação pré-operatória, permitindo a seleção da melhor estratégia para tratamento cirúrgico a ser realizado⁷⁸. Esta informação (invasão óssea) é difícil e desafiadora de ser avaliada dependendo do tipo de invasão pelo CEC (erosiva ou infiltrativa)^{19,24}, do estágio da doença e do exame de imagem realizado (em razões da sensibilidade e especificidade). Neste estudo, o laudo do exame de imagem estava disponível em 133 pacientes, e destes, em 59 não foi relatada invasão óssea, porém, após análise anatomopatológica, 11 destes (24%) foram diagnosticados com invasão mandibular. A concordância entre os dois laudos para a ausência de invasão óssea foi de 67,8% e para presença foi de 76%, revelando uma concordância moderada. Sabe-se que nenhuma das modalidades dos exames de imagem é completamente precisa no quesito identificação de invasão óssea, e principalmente nos casos iniciais e limítrofes, fica difícil comprovar que a invasão está presente. No nosso estudo, 28 pacientes com o laudo de envolvimento ósseo nos exames de imagem pré-operatorios não tiveram a invasão diagnosticada microscopicamente pelo patologista, corroborando com a dificuldade da detecção desta na análise imagiológica.

Depois de detectada a presença ou não da invasão óssea, o cirurgião precisa escolher o tipo de mandibulectomia com base em critérios como - tamanho e localização do tumor; condição sistêmica; obtenção de margens cirúrgicas adequadas; maior preservação de tecido duro e mole, com vistas a fornecer melhores resultados funcionais e estéticos possíveis^{53,83}; padrão de invasão da lesão, se infiltrativo ou erosivo^{50,56}; se a invasão está confinada ao osso cortical ou atingiu a medular; dentre outros. A porcentagem de mandibulectomias segmentares relatada pela literatura atual varia de 30% a 43%, e para mandibulectomia marginal varia de 55,5% a 70%^{53,79}. Os achados deste estudo diferem em partes da literatura, com porcentagem de cirurgia marginal (34,1%) inferior a modalidade segmentar (35,4%), ainda, quando levado em consideração a porcentagem de pacientes que realizaram hemimandibulectomia, esta porcentagem de cirurgia segmentar aumenta para 69,4%. As diferenças

nas proporções de modalidade cirúrgicas relatadas na literatura e as encontradas podem ser explicadas por alguns fatores, com as características avançadas da própria doença. Dos pacientes incluídos no estudo, 150 eram classificados como T3/T4 segundo o TNM 8ª edição, e 187 eram estadiamento clínico III/IV, ainda com 50% apresentando infiltração perineural e 60,5% invasão da musculatura esquelética. Não houve diferença na sobrevida entre a modalidade cirúrgica de mandibulectomia marginal e segmentar, dado que vai de encontro ao relatado por Patel et al.⁷⁹ que observaram que pacientes T4, mesmo com envolvimento medular da mandíbula, não apresentaram diferença na sobrevida quando comparada as duas opções cirúrgicas.

Sobre o comprometimento das margens cirúrgicas, sabe-se que a positividade desta condição, quando encontrada, tem influência direta na sobrevida dos pacientes⁸³. No presente estudo, quando avaliada a associação entre as margens cirúrgicas comprometidas e a presença de invasão óssea, ficou evidente que esta está associada com uma frequência maior de margens positivas. Além do comprometimento das margens, outros fatores também são influentes na sobrevida global dos pacientes pós-tratamento.

Dentre os fatores que podem influenciar no prognóstico de pacientes com CEC oral, os mais clássicos são o tamanho do tumor, o comprometimento linfonodal e as margens cirúrgicas comprometidas, associados a pior prognóstico^{86,88}. Alguns autores focam na invasão óssea, considerado como um importante fator de prognóstico, independente do tamanho da neoplasia⁵⁴, ainda, associam a invasão óssea medular a um pior prognóstico, enquanto a invasão óssea cortical não apresenta influência no mesmo^{77,89}. Neste estudo, foi realizada correlação entre os fatores que influenciam diretamente o prognóstico, sendo tamanho da neoplasia, comprometimento linfonodal, profundidade de invasão da lesão e invasão óssea. A presença de linfonodos cervicais comprometidos e a invasão óssea pela neoplasia foram associados a lesões mais extensas e com maior profundidade de invasão.

Pacientes com CEC em estágio avançado ou com prognóstico ruim, geralmente são submetidos a tratamentos mais complexos⁶⁰. Neste trabalho o tratamento adjuvante mais realizado para controle da doença foi a radioterapia, por 66,4% dos pacientes, fato que vai de encontro a abordagem convencionalmente recomendada, com excisão da neoplasia e radioterapia pós-operatória^{18,53}. Alguns autores⁷⁸ indicam a combinação de quimioterapia no tratamento de lesões com envolvimento ósseo, na tentativa de prevenir recorrência do tumor loco-regional ou à distância. Em nosso estudo, somente 52 pacientes (23,8%) realizaram quimioterapia.

A sobrevida global média dos pacientes após a cirurgia de ressecção do CEC foi de

96,92 ($\pm 6,84$) meses, sendo que até a conclusão da pesquisa em junho de 2020, 57,7% dos pacientes tinham falecido pela doença. A sobrevida global de 5 anos foi de 71,8%, valor superior ao encontrado por outro trabalho na instituição entre o período de 2001-2012, que foi de 52%⁹.

Atualmente, há controvérsia a respeito da invasão mandibular como um fator prognóstico independente. Quando analisada de forma isolada, a invasão óssea apresentou grande influência no prognóstico dos pacientes, ou seja, os que tiveram invasão óssea apresentaram sobrevida global significativamente reduzida de 40,8 meses, em comparação com pacientes sem invasão óssea, que apresentaram 121,9 de sobrevida. Além da invasão óssea microscópica, preditores significativos de redução da sobrevida global, na análise univariada, foram - características clínicas da neoplasia (tamanho clínico do tumor, presença de linfonodos e estadiamento clínico), características de invasão óssea no exame de imagem e as características anatomopatológicas (margens cirúrgicas, invasão muscular esquelética, infiltração perineural, embolização linfática, ruptura capsular e TN patológico). A análise multivariada foi realizada por meio de seleção intencional de co-variáveis e demonstrou que a invasão óssea e a infiltração perineural foram significativas na sobrevida dos pacientes. A presença de invasão óssea demonstrou ser um risco 2,54 vezes maior do paciente ir a óbito, enquanto para invasão perineural esse risco foi ainda mais elevado, sendo que pacientes que apresentaram esta condição tiveram um risco 3 vezes maior de ir a óbito.

A infiltração perineural é definida como a disseminação do tumor e a capacidade das células tumorais de penetrar ao redor ou através do tecido nervoso, podendo fazer com que o tumor se espalhe para áreas distantes da localização primária da neoplasia⁸⁷. A infiltração perineural é mais frequentemente relacionada a tumores com padrão de invasão óssea infiltrativo, e a menos que a lesão seja muito extensa, os casos com o tipo erosivo geralmente não apresentam envolvimento perineural⁷⁷. A presença desta condição tem sido associada ao risco de recorrências locais, metástase nodal, ruptura capsular e diminuição da sobrevida global^{54,55}. Em nossa análise, a associação da sobrevida global dos pacientes com a infiltração perineural demonstrou que aqueles sem infiltração perineural tiveram uma sobrevida média de 141,43 meses, enquanto os que possuíam infiltração tiveram a sobrevida diminuída para 54,1 meses, mostrando que os nossos achados vão de encontro aos relatados na literatura. A presença da infiltração perineural encontrada em estudos clínicos normalmente varia de 2 a 30%, já sido relatado uma taxa de 82% em estudos específicos⁸⁷. Nesta pesquisa a taxa foi de 51,2%, e a porcentagem de óbitos neste grupo foi de 77,1%, mais do que o dobro do grupo de pacientes que não apresentaram infiltração (37,5%).

A invasão óssea é considerada um fator prognóstico independente somente quando avaliado o tipo de invasão óssea, se infiltrativo ou erosivo, e a profundidade de invasão, se cortical ou medular ^{53,88}. Quando a avaliação é dicotômica apenas relatando presença ou ausência de invasão, não foi encontrada correlação com a sobrevida ⁸⁸. Diferente do trabalho relatado anteriormente, neste estudo foi encontrada significância quando associada presença ou ausência da invasão óssea microscópica com a sobrevida, caracterizando a invasão óssea no exame anatomopatológico como um fator prognóstico significativo.

Além dos preditores relacionados ao prognóstico, sabe-se que outros fatores influenciam no desfecho dos pacientes com CEC oral, e que as taxas de mortalidade destes pacientes ainda são altas. Em parte, este fenômeno ocorre por conta da agressividade da neoplasia e/ou pela necessidade de tratamentos que impactam na qualidade de vida do doente, justificando a busca por melhores métodos de avaliação diagnóstica e prognóstica, encorajando a busca por marcadores moleculares ⁷¹. Estes marcadores podem auxiliar no diagnóstico e monitoramento da progressão da doença, estimando por exemplo, fenômenos ligados a invasão óssea e a disseminação perineural.

O CEC fornece um microambiente adequado para a osteoclastogênese, através da produção de diversas citocinas inflamatórias (dentre elas a IL-6), que regulam indiretamente as vias de sinalização para formação e ativação de osteoclastos, ainda, em conjunto com alterações que vão repercutir direta e indiretamente no equilíbrio do sistema RANK/RANKL/OPG ⁸⁷. A compreensão das vias de sinalização ativadas no processo de invasão óssea pode contribuir para melhor diagnóstico e instituição de terapias específicas, visando diminuir, estacionar ou até mesmo prevenir a invasão óssea, por meio de uma inibição da diferenciação e função dos osteoclastos, pelo bloqueio do RANK/RANKL ³¹. Alguns estudos, tanto em modelos experimentais como em pacientes, relatam que a invasão óssea pelo CEC oral é mediada por RANK/RANKL, e que a inibição do RANKL pela OPG ou com administração de RANK solúvel poderia prevenir o comprometimento ósseo ^{30,31,59}.

Além do sistema RANK/RANKL/OPG, células neoplásicas produzem várias citocinas participantes da invasão óssea, entre elas a IL-6, que tem sua expressão na superfície do tumor correlacionada com a invasão óssea ³⁹ e com a indução da expressão de RANKL em osteoblastos ^{31,71}. As células neoplásicas do CEC oral, com ou sem envolvimento ósseo, apresentam potencial de expressão da tríade com posterior indução da osteoclastogênese ³¹, sendo um pré-requisito, a proximidade entre neoplasia e estruturas ósseas ^{20,56}.

A expressão de RANKL está fortemente associada a lesões invasivas ^{31,58}, e já foi detectada sua expressão por células neoplásicas ⁷¹. Neste estudo, não foi possível associar um

aumento da sua expressão com a invasão óssea pela neoplasia. Apesar disso, em 75,7% das amostras analisadas o RANKL encontrava-se na condição superexpresso. Quando avaliados os *subsets* com e sem invasão óssea, a superexpressão foi de 89,5% dos casos com invasão microscópica detectada e 61,1% sem invasão. Estudo avaliando a expressão da RANKL por imunistoquímica no CEC revelou marcação similar para esta proteína nos pacientes com e sem invasão óssea ⁶⁵. Ainda em nossos resultados, o prognóstico dos pacientes também não apresentou associação significativa com a expressão gênica de RANKL, mas observamos que a superexpressão foi concomitante a um pior prognóstico (58 meses), quando avaliada de forma isolada e em relação a expressão normal do mesmo (138 meses).

Várias neoplasias expressam RANK, e sua produção também é favorecida pela interface osso-neoplasia, desempenhando papel crítico na reabsorção óssea ^{31,60}. A sinalização RANK/RANKL contribui para a osteoclastogênese e regulação das funções das células cancerosas ⁶⁰. A expressão do gene RANK nesta pesquisa mostrou que na maioria dos casos foi encontrada a condição de downregulação, independente da presença ou ausência da invasão óssea. Na análise realizada por Rabelo et al. ⁷⁰ também foi investigada a expressão do RANK, neste caso em amostras ósseas próximas ao tumor, e os autores também encontraram este gene downregulado. Apesar dos resultados relacionados ao gene RANK não serem similares a alguns estudos, a nossa avaliação foi realizada na neoplasia e não possuímos a informação da proximidade do local de coleta da amostra do CEC com a estrutura óssea mais próxima.

Chuang et al. ⁶⁵ avaliaram por imunistoquímica o sistema RANK/RANKL/OPG, e constataram que uma expressão baixa da proteína OPG tanto nos casos com invasão como nos sem invasão óssea. Estes achados vão de encontro com os nossos resultados, onde 43,2% das amostras analisadas não apresentavam alterações na expressão do gene da OPG, independente da presença de invasão óssea microscópica. Este resultado é condizente com o esperado, uma vez que a expressão desta proteína costuma estar aumentada em lesões osteblásticas ^{31,58}.

A expressão regulada para baixo da IL-6 estava presente em 76,5% dos pacientes sem invasão óssea. Diferente dos outros genes analisados, o a variação da expressão da IL-6 na neoplasia está associada com a presença ou ausência da invasão óssea microscópica ($p=0,04$). Estudos anteriores demonstraram a presença da IL-6 principalmente na interface tumor-osso ⁶⁴ e em osteoclastos na superfície óssea reabsorvida ⁷¹. Níveis elevados desta proteína estão associados com CEC de cabeça e pescoço, crescimento da neoplasia, comprometimento linfonodal ^{64,73}, sendo considerada um marcador de recorrência tumoral e pior prognóstico ^{71,76}. Em nossa análise da sobrevida global com o controle estatístico dos outros fatores

diagnósticos, ficou evidenciado que a expressão downregulada desse gene teve influência para melhor sobrevida dos pacientes (108,5 meses, $p=0,05$).

A correlação positiva entre a expressão gênica de RANK, RANKL, OPG e IL-6 encontrada neste estudo sugere um processo bem coordenado, onde uma autoregulação da via acontece na neoplasia. Não foi possível observar a superexpressão significativa de nenhum dos genes analisados, mas foi observada uma tendência de superexpressão do RANKL, o que indica que um provável mecanismo regulador da osteoclastogênese por ação das células neoplásicas. Sabe-se que esta proteína é sintetizada primariamente por osteoblastos e osteócitos, fato interessante, pois pode sugerir uma possível mimetização do controle osteometabólico pelas células malignas. Talvez, a alteração na expressão gênica desses genes clássicos das vias de sinalização ósseas poderia estar mais evidente se tivéssemos trabalhado com amostras coletadas na interface osso/neoplasia.

6 CONCLUSÃO

Conclui-se que os pacientes submetidos a mandibulectomia para tratamento do carcinoma epidermóide oral foram em sua maioria do sexo masculino, com idade média de 60 anos e estadiamento clínico avançado. A mandibulectomia foi em sua maioria do tipo segmentar. A invasão óssea microscópica e a infiltração perineural foram consideradas como fatores preditivos para maior risco de óbito. A invasão mandibular interfere na sobrevida global dos pacientes, e existe uma associação entre o mecanismo de invasão óssea e a expressão gênica de RANK, RANKL, OPG e IL-6 pela neoplasia. A condição de expressão do gene da IL-6 em subexpressão nas células malignas está associada com maior sobrevida.

7 REFERÊNCIAS

- 1 Warnakulasuriya S. Causes of oral cancer - An appraisal of controversies. *Br Dent J.* 2009; 207(10):471–5.
- 2 Chi AC, Day TA, Neville BW. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma: an update. *CA Cancer J Clin.* 2015; 65:401-421.
- 3 Ahmad JG, Namin AW, Jorgensen JB, Zitsch RP 3rd, Layfield LJ. Mandibular Invasion by Oral Squamous Cell Carcinoma - Clinicopathologic Features of 74 Cases. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 2019 Jun; 160(6):1034-1041.
- 4 Fuentes B, Duaso J, Droguett D, Castillo C, Donoso W, Rivera C, et al. Progressive Extracellular Matrix Disorganization in Chemically Induced Murine Oral Squamous Cell Carcinoma. *ISRN Pathol.* 2012; 2012:1–7.
- 5 Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer José de Alencar Gomes da Silva. Estimativa/2020 Incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro - INCA; 2019.
- 6 International Agency for Research on Cancer-IARC. Global cancer observatory - cancer today. Lyon. Disponível em: <https://gco.iarc.fr/today>. [2021 fev 8].
- 7 Bray F, Ferlay J, Soerjomataram I, Siegel RL, Torre LA, Jemal A. Global cancer statistics 2018: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin.* 2018 Nov;68(6):394-424.
- 8 Kaufman HW, Chen Z, Niles J, Fesko Y. Changes in the Number of US Patients With Newly Identified Cancer Before and During the Coronavirus Disease 2019 (COVID-19) Pandemic. *JAMA Netw Open.* 2020 Aug 3;3(8):e2017267.
- 9 Kowalski LP, Oliveira MM, Lopez RVM, Silva DRME, Ikeda MK, Curado MP. Survival trends of patients with oral and oropharyngeal cancer treated at a cancer center in São Paulo, Brazil. *Clinics (Sao Paulo).* 2020 Apr 6;75:e1507.
- 10 Asthana S, Vohra P, Labani S. Association of smokeless tobacco with oral cancer - a review of systematic reviews. *Tob Prev Cessat.* 2019 Oct 8;5:34.
- 11 American Cancer Society-ACS. Cancer facts & figures 2019. Atlanta: American Cancer Society, 2019. Disponível em: <https://bit.ly/3eoJK9k>. [2021 fev 8].
- 12 Kumar M, Nanavati R, Modi T, Dobariya C. Oral cancer: Etiology and risk factors: a review. *J Cancer Res Ther.* 2016 Apr-Jun;12(2):458-63.
- 13 Kowalski LP. Head and neck cancer. *BMC Proc.* 2013 Apr 4;7(Suppl 2):K12.

- 14 Galvão De Podestá OP, Peres SV, Salaroli LB, Cattafesta M, Vasconcelos De Podestá JR, Ventrin von Zeilder SL, et al. Consumption of minimally processed foods as protective factors in the genesis of squamous cell carcinoma of the head and neck in Brazil. *PLoS One*. 2019 Jul 25;14(7):e0220067.
- 15 Chow LQM. *Head and Neck Cancer*. *N Engl J Med*. 2020 Jan2;382(1):60-72.
- 16 Amin MB, Greene FL, Edge SB, Compton CC, Gershewald JE, Brookland RK, et al. The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. *CA Cancer J Clin*. 2017 Mar;67(2):93-99.
- 17 Huang SH, O'Sullivan B. Overview of the 8th Edition TNM Classification for head and neck cancer. *Curr Treat Options Oncol*. 2017 Jul;18(7):40.
- 18 Hoffmannová J, Foltán R, Vlk M, Sipos M, Horká E, Pavlíková, et al. Hemimandibulectomy and therapeutic neck dissection with radiotherapy in the treatment of oral squamous cell carcinoma involving mandible: a critical review of treatment protocol in the years 1994-2004. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2010 Jun; 39(6):561-7.
- 19 Yue LE, Sharif KF, Sims JR, Sandler ML, Baik FM, Sobotka S, et al. Oral squamous carcinoma: Aggressive tumor pattern of invasion predicts direct mandible invasion. *Head Neck*. 2020 Nov;42(11):3171-3178.
- 20 Brown JS, Lowe D, Kalavrezos N, D'Souza J, Magennis P, Woolgar J. Patterns of invasion and routes of tumor entry into the mandible by oral squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2002 Apr;24(4):370-83.
- 21 Shah JP, Gil Z. Current concepts in management of oral cancer--surgery. *Oral Oncol*. 2009 Apr-May;45(4-5):394-401.
- 22 Chen YL, Kuo SW, Fang KH, Hao SP. Prognostic impact of marginal mandibulectomy in the presence of superficial bone invasion and the nononcologic outcome. *Head Neck*. 2011 May;33(5):708-13.
- 23 Qing H, Ardeshirpour L, Pajevic PD, Dusevich V, Jähn K, Kato S, et al. Demonstration of osteocytic perilacunar/canalicular remodeling in mice during lactation. *J Bone Miner Res*. 2012 May;27(5):1018-29.
- 24 Jimi E, Furuta H, Matsuo K, Tominaga K, Takahashi T, Nakanishi O. The cellular and molecular mechanisms of bone invasion by oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis*. 2011 Jul;17(5):462-8.

- 25 Wada A, Tsuchiya M, Ozaki-Honda Y, Kayamori K, Sakamoto K, Yamaguchi A, et al. A new osteoclastogenesis pathway induced by cancer cells targeting osteoclast precursor cells. *Biochem Biophys Res Commun*. 2019 Jan 29;509(1):108-113.
- 26 Semba I, Matsuuchi H, Miura Y. Histomorphometric analysis of osteoclastic resorption in bone directly invaded by gingival squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 1996 Sep;25(8):429-35.
- 27 Dougall WC, Chaisson M. The RANK/RANKL/OPG triad in cancer-induced bone diseases. *Cancer Metastasis Rev*. 2006 Dec;25(4):541-9.
- 28 Quan J, Zhou C, Johnson NW, Francis G, Dahlstrom JE, Gao J. Molecular pathways involved in crosstalk between cancer cells, osteoblasts, and osteoclasts in the invasion of bone by oral squamous cell carcinoma. *Pathology*. 2012 Apr;44(3):221-7.
- 29 Ming J, Cronin SJF, Penninger JM. Targeting the RANKL/RANK/OPG. *Axis for Cancer Therapy*. *Front Oncol*. 2020 Aug 7;10:1283.
- 30 Canon JR, Roudier M, Bryant R, Morony S, Stolina M, Kostenuik PJ, et al. Inhibition of RANKL blocks skeletal tumor progression and improves survival in a mouse model of breast cancer bone metastasis. *Clin Exp Metastasis*. 2008;25(2):119-29.
- 31 Jimi E, Shin M, Furuta H, Tada Y, Kusukawa J. The RANKL/RANK system as a therapeutic target for bone invasion by oral squamous cell carcinoma (Review). *Int J Oncol*. 2013 Mar;42(3):803-9.
- 32 Göbel A, Rachner TD, Hofbauer LC. Extraskelatal effects of RANK ligand. In: Bilezikian JP, Raisz LG, Martin-Third TJ, editors. *Principles of bone biology*. 4th ed. New York: Academic Press; 2020. p.1199-204.
- 33 Feng X, Teitelbaum SL. Osteoclasts: new insights. *Bone Res*. 2013 Mar 29;1(1):11-26.
- 34 Bruzzaniti A, Baron R. Molecular regulation of osteoclast activity. *Rev Endocr Metab Disord*. 2006 Jun;7(1-2):123-39.
- 35 Hofbauer LC, Heufelder AE. Role of receptor activator of nuclear factor-kappaB ligand and osteoprotegerin in bone cell biology. *J Mol Med (Berl)*. 2001 Jun;79(5-6):243-53.
- 36 Takayanagi H. Osteoimmunology - Bidirectional dialogue and inevitable union of the fields of bone and immunity. *Proc Jpn Acad Ser B Phys Biol Sci*. 2020;96(4):159-69.

- 37 Schwartsburd PM. Chronic inflammation as inducer of pro-cancer microenvironment: pathogenesis of dysregulated feedback control. *Cancer Metastasis Rev.* 2003 Mar;22(1):95-102.
- 38 Kawai T, Matsuyama T, Hosokawa Y, Makihira S, Seki M, Karimbux NY, et al. B and T lymphocytes are the primary sources of RANKL in the bone resorptive lesion of periodontal disease. *Am J Pathol.* 2006 Sep;169(3):987-98.
- 39 Gibo T, Yamada SI, Kawamoto M, Uehara T, Kurita H. Immunohistochemical investigation of predictive biomarkers for mandibular bone invasion in oral squamous cell carcinoma. *Pathol Oncol Res.* 2020 Oct;26(4):2381-9.
- 40 Taylor JJ, Preshaw PM. Gingival crevicular fluid and saliva. *Periodontol 2000.* 2016 Feb;70(1):7-10.
- 41 Lerner UH. New molecules in the tumor necrosis factor ligand and receptor superfamilies with importance for physiological and pathologic bone resorption. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004 Jan 1;15(2):64-81.
- 42 Russmueller G, Moser D, Würger T, Wrba B, Christopoulos P, Kostakis G, et al. Upregulation of osteoprotegerin expression correlates with bone invasion and predicts poor clinical outcome in oral cancer. *Oral Oncol.* 2015 Mar;51(3):247-53.
- 43 Kamimura D, Ishihara K, Hirano T. IL-6 signal transduction and its physiological roles: the signal orchestration model. *Rev Physiol Biochem Pharmacol.* 2003;149:1-38.
- 44 Igonin AA, Armstrong VW, Shipkova M, Lazareva NB, Kukes VG, Oellerich M. Circulating cytokines as markers of systemic inflammatory response in severe community-acquired pneumonia. *Clin Biochem.* 2004 Mar;37(3):204-9.
- 45 Nelson WG, De Marzo AM, DeWeese TL, Isaacs WB. The role of inflammation in the pathogenesis of prostate cancer. *J Urol.* 2004 Nov;172(5 Pt 2):S6-11; discussion S11-2.
- 46 Chen Z, Malhotra PS, Thomas GR, Ondrey FG, Duffey DC, Smith CW, et al. Expression of proinflammatory and proangiogenic cytokines in patients with head and neck cancer. *Clin Cancer Res.* 1999 Jun; 5(6):1369-79.
- 47 Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to Virchow? *Lancet.* 2001 Feb 17;357(9255):539-45.
- 48 Singh A, Mair M, Singhvi H, Mahuvakar A, Nair D, Nair S, et al. Incidence, predictors and impact of positive bony margins in surgically treated T4 stage cancers of the oral cavity. *Oral Oncol.* 2019 Mar; 90:8-12.

- 49 Totsuka Y, Usui Y, Tei K, Fukuda H, Shindo M, Lizuka T, et al. Mandibular involvement by squamous cell carcinoma of the lower alveolus: analysis and comparative study of histologic and radiologic features. *Head Neck*. 1991 Jan-Feb; 13(1):40-50.
- 50 Brown J. Mechanisms of cancer invasion of the mandible. *Curr Opin Otolaryngol Head Neck Surg*. 2003 Apr;11(2):96-102.
- 51 Uribe S, Rojas LA, Rosas CF. Accuracy of imaging methods for detection of bone tissue invasion in patients with oral squamous cell carcinoma. *Dentomaxillofac Radiol*. 2013;42(6):20120346.
- 52 Namin AW, Zitsch RP 3rd, Layfield LJ. Variability in pathologic interpretation of mandibular invasion. *Laryngoscope*. 2020 Jul;130(7):1721-1724.
- 53 Fives C, Nae A, Roche P, O'Leary G, Fitzgerald B, Feeley L, et al. Impact of mandibular invasion on prognosis in oral squamous cell carcinoma four centimeters or less in size. *Laryngoscope*. 2017 Apr;127(4):849-54.
- 54 Safi AF, Kauke M, Grandoch A, Nickenug HJ, Zöllner J, Kreppel M. The importance of lymph node ratio for patients with mandibular infiltration of oral squamous cell carcinoma. *J Craniomaxillofac Surg*. 2018 Jun;46(6):1007-12.
- 55 Shaw RJ, Brown JS, Woolgar JA, Lowe D, Rogers SN, Vaughan ED. The influence of the pattern of mandibular invasion on recurrence and survival in oral squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2004 Oct;26(10):861-9.
- 56 Wong RJ, Keel SB, Glynn RJ, Varvares MA. Histological pattern of mandibular invasion by oral squamous cell carcinoma. *Laryngoscope*. 2000 Jan;110(1):65-72.
- 57 Lubek JE, Magliocca KR. Evaluation of the bone margin in oral squamous cell carcinoma. *Oral Maxillofac Surg Clin North Am*. 2017 Aug;29(3):281-92.
- 58 Lee Y, Schwarz E, Davies M, Jo M, Gates J, Wu J, et al. Differences in the cytokine profiles associated with prostate cancer cell induced osteoblast and osteolytic lesions in bone. *J Orthop Res*. 2003 Jan;21(1):62-72.
- 59 Miller RE, Branstetter D, Armstrong A, Kennedy B, Jones J, Cowan L, et al. Receptor activator of NF- κ B ligand inhibition suppresses bone resorption and hypercalcemia but does not affect host immune responses to influenza infection. *J Immunol*. 2007 Jul 1;179(1):266-74.
- 60 Shin M, Matsuo K, Tada T, Fukushima H, Furuta H, Ozeki S, et al. The inhibition of RANKL/RANK signaling by osteoprotegerin suppresses bone invasion by oral squamous cell carcinoma cells. *Carcinogenesis*. 2011 Nov;32:1634-40.

- 61 Halleen JM, Alatalo SL, Suominen H, Cheng S, Janckila AJ, Väänänen HK. Tartrate-resistant acid phosphatase 5b: a novel serum marker of bone resorption. *J Bone Miner Res.* 2000 Jul;15(7):1337-45.
- 62 Guise TA, Mundy GR. Cancer and bone. *Endocr Rev.* 1998 Feb;19(1):18-54.
- 63 Kobayashi K, Takahashi N, Jimi E, Udagawa N, Takami M, Kotake S, et al. Tumor necrosis factor alpha stimulates osteoclast differentiation by a mechanism independent of the ODF/RANKL-RANK interaction. *J Exp Med.* 2000 Jan 17;191(2):275-86.
- 64 Sharma M, Bairy I, Pai K, Satyamoorthy K, Prasad S, Berkovitz B, et al. Salivary IL-6 levels in oral leukoplakia with dysplasia and its clinical relevance to tobacco habits and periodontitis. *Clin Oral Investig.* 2011 Oct;15(5):705-14.
- 65 Chuang FH, Hsue SS, Wu CW, Chen YK. Immunohistochemical expression of RANKL, RANK, and OPG in human oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2009 Nov;38(10):753-8.
- 66 Shin M, Matsuo K, Tada T, Fukushima H, Furuta H, Ozeki S, et al. The inhibition of RANKL/RANK signaling by osteoprotegerin suppresses bone invasion by oral squamous cell carcinoma cells. *Carcinogenesis.* 2011 Nov;32:1634-40.
- 67 Li C, Lin J, Men Y, Yang W, Mi F, Li L. Does medullary versus cortical invasion of the mandible affect prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma? *J Oral Maxillofac Surg.* 2017 Feb;75(2):403-15.
- 68 Tada T, Shin M, Fukushima H, Okabe K, Ozeki S, Okamoto M, et al. Oral squamous cell carcinoma cells modulate osteoclast function by RANKL-dependent and -independent mechanisms. *Cancer Lett.* 2009 Feb 8;274(1):126-31.
- 69 Elmusrati AA, Pilborough AE, Khurram SA, Lambert DW. Cancer-associated fibroblasts promote bone invasion in oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2017 Sep 5;117(6):867-75.
- 70 Rabelo GD, Coutinho-Camillo C, Kowalski LP, Portero-Muzy N, Roux JP, Chavcassieux P, et al. Evaluation of cortical mandibular bone in patients with oral squamous cell carcinoma. *Clin Oral Investig.* 2018 Mar;22(2):783-790.
- 71 Kayamori K, Sakamoto K, Nakashima T, Takayanagi H, Morita K, Omura K, et al. Roles of interleukin-6 and parathyroid hormone-related peptide in osteoclast formation associated with oral cancers: significance of interleukin-6 synthesized by stromal cells in response to cancer cells. *Am J Pathol.* 2010 Feb;176(2):968-80.

- 72 Chen X, Wang L, Zhao K, Wang H. Osteocytogenesis: roles of physicochemical factors, collagen cleavage, and exogenous molecules. *Tissue Eng Part B Rev*. 2018 Jun;24(3):215-25.
- 73 Duffy SA, Taylor JM, Terrell JE, Islam M, Li Y, Fowler KE, et al. Interleukin-6 predicts recurrence and survival among head and neck cancer patients. *Cancer*. 2008 Aug 15;113(4):750-7.
- 74 Hodge DR, Hurt EM, Farrar WL. The role of IL-6 and STAT3 in inflammation and cancer. *Eur J Cancer*. 2005 Nov;41(16):2502-12.
- 75 Quan J, Zhou C, Johnson NW, Francis G, Dahlstrom JE, Gao J. Molecular pathways involved in crosstalk between cancer cells, osteoblasts and osteoclasts in the invasion of bone by oral squamous cell carcinoma. *Pathology*. 2012 Apr;44(3):221-7.
- 76 Gasche JA, Hoffmann J, Boland CR, Goel A. Interleukin-6 promotes tumorigenesis by altering DNA methylation in oral cancer cells. *Int J Cancer*. 2011 Sep 1;129(5):1053-63.
- 77 Politi M, Costa F, Robiony M, Rinaldo A, Ferlito A. Review of segmental and marginal resection of the mandible in patients with oral cancer. *Acta Otolaryngol* 2000;120:569-79.
- 78 Totsuka Y, Usui Y, Tei K, Kida M, Mizukoshi T, Notani K, et al. Results of surgical treatment for squamous carcinoma of the lower alveolus: segmental vs. marginal resection. *Head Neck*. 1991 Mar-Apr;13(2):114-20.
- 79 Patel RS, Dirven R, Clark JR, Swinson BD, Gao K, O'Brien CJ. The prognostic impact of extent of bone invasion and extent of bone resection in oral carcinoma. *Laryngoscope*. 2008 May;118(5):780-5.
- 80 Yamada SI, Kurita H, Tomioka T, Ohta R, Yoshimura N, Nishimaki F, et al. Healthy life expectancy of oral squamous cell carcinoma patients aged 75years and older. *Oral Oncol*. 2017 Jan;64:22-6.
- 81 Namin AW, Bruggers SD, Panuganti BA, Christopher KM, Walker RJ, Varvares MA. Efficacy of bone marrow cytologic evaluations in detecting occult cancellous invasion. *Laryngoscope*. 2015 May;125(5):E173-9.
- 82 Mücke T, Hölzle F, Wagenpfeil S, Wolff KD, Kesting M. The role of tumor invasion into the mandible of oral squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2011 Jan;137(1):165-71.

- 83 Gou L, Yang W, Qiao X, Ye L, Yan K, Li L, et al. Marginal or segmental mandibulectomy: treatment modality selection for oral cancer: a systematic review and meta-analysis. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2018 Jan;47(1):1-10.
- 84 Dziegielewski PT, Ho ML, Rieger J, Singh P, Langille M, Harris JR, et al. Total glossectomy with laryngeal preservation and free flap reconstruction: objective functional outcomes and systematic review of the literature. *Laryngoscope*. 2013 Jan;123(1):140-5.
- 85 Epstein JB, Thariat J, Bensadoun RJ, Barasch A, Murphy BA, Kolnick L, et al. Oral complications of cancer and cancer therapy: from cancer treatment to survivorship. *CA Cancer J Clin*. 2012 Nov-Dec;62(6):400-22.
- 86 Sasaki T, Moles DR, Imai Y, Speight PM. Clinico-pathological features of squamous cell carcinoma of the oral cavity in patients <40 years of age. *J Oral Pathol Med*. 2005 Mar;34(3):129-33.
- 87 Michalek J, Brychtova S, Pink R, Dvorak Z. Prognostic and predictive markers for perineural and bone invasion of oral squamous cell carcinoma. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub*. 2019 Dec;163(4):302-8.
- 88 Ebrahimi A, Murali R, Gao K, Elliott MS, Clark JR. The prognostic and staging implications of bone invasion in oral squamous cell carcinoma. *Cancer*. 2011 Oct 1;117(19):4460-7.
- 89 Vormittag L, Thurnher D, Geleff S, Pammer J, Heiduschka G, Brunner M, et al. Co-expression of Bmi-1 and podoplanin predicts overall survival in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck treated with radio(chemo)therapy. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2009 Mar 1;73(3):913-8.
- 90 Yildiz MM, Petersen I, Eigendorff E, Schlattmann P, Guntinas-Lichius O. Which is the most suitable lymph node predictor for overall survival after primary surgery of head and neck cancer: pN, the number or the ratio of positive lymph nodes, or log odds? *J Cancer Res Clin Oncol*. 2016 Apr;142(4):885-93.
- 91 Lee CC, Lin YS, Kang BH, Chang KP, Chi CC, Lin MY, et al. Incorporation of log odds of positive lymph nodes into the AJCC TNM classification improves prediction of survival in oral cancer. *Clin Otolaryngol*. 2017 Apr;42(2):425-32.
- 92 Fares AF, Araujo DV, Calsavara V, Saito AO, Formiga MN, Dettino AA, et al. Complete metastasectomy in renal cell carcinoma: a propensity-score matched by the International Metastatic RCC Database Consortium prognostic model. *Ecancermedscience*. 2019 Oct 14;13:967.

- 93 Campos AH, Silva AA, Mota LD, Olivieri ER, Prescinoti VC, Patrão D, et al. The value of a tumor bank in the development of cancer research in Brazil: 13 years of experience at the A.C.Camargo hospital. *Biopreserv Biobank*. 2012 Apr;10(2):168-73.
- 94 Olivieri EH, Franco Lde A, Pereira RG, Mota LD, Campos AH, Carraro DM. Biobanking practice: RNA storage at low concentration affects integrity. *Biopreserv Biobank*. 2014 Feb;12(1):46-52.

Anexo 1 – Carta de Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa-CEP



**A.C. Camargo
Cancer Center**

Comitê de Ética em
Pesquisa - CEP

APROVAÇÃO

Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Fundação Antonio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center, em sua última reunião de **24/01/2017**, após analisarem as respostas aos questionamentos realizados em reunião de **22/11/2016**, **aprovaram** a realização do projeto nº **2297/16** intitulado: **“Avaliação clínica histomorfométrica, imunoistoquímica e molecular do carcinoma epidermóide oral com envolvimento mandibular”**.

Pesquisador responsável: **Dr. Fabio de Abreu Alves**

Aluno: **Érica Fernanda Patricio da Silva (Doutorado)**

Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 06 meses em relatório (modelo CEP).

São Paulo, 30 de janeiro 2017.

Atenciosamente,

Dra. Sandra Caires Serrano
2ª Vice-Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa

1/1

Anexo 2 - Termo de dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido-TCLE



**A.C. Camargo
Cancer Center**

TERMO DE DISPENSA DO CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Referente à análise do projeto de pesquisa intitulado: Avaliação clínica, histomorfométrica, imunoistoquímica e molecular do carcinoma epidermoide oral com envolvimento mandibular

Eu, Fabio de Abreu Alves, CRO 83680, Pesquisador Responsável pelo presente Projeto de Pesquisa a ser conduzido na Fundação Antonio Prudente - AC Camargo Cancer Center localizado à Rua prof. Antônio Prudente, 211 – São Paulo – SP – CEP: 01509-900 – Departamento de Estomatologia – São Paulo – SP – CEP: 01509-900 por este termo, solicito ao Comitê de Ética desta instituição a dispensa do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, em razão desta pesquisa apresentar caráter retrospectivo, por se tratar de levantamento de dados junto à prontuários e banco de materiais biológicos. Comprometo-me:

- a preservar a privacidade dos participantes de pesquisa cujos dados serão coletados;
- que as informações serão utilizadas única e exclusivamente para a execução do projeto em questão;
- que as informações somente serão divulgadas de forma anônima, não sendo usadas iniciais ou quaisquer outras indicações que possam identificar o participante da pesquisa.

Esperando ter atendido satisfatoriamente às exigências desse Comitê, aguardamos retorno.

Atenciosamente,

Fundação Antonio Prudente
Dr. Fabio de Abreu Alves - CRO 83680
Departamento de Estomatologia

Fabio de Abreu Alves
Pesquisador Responsável pelo Projeto
Data: 26/09/2016

Rua Professor Antônio Prudente, 211 • Liberdade • São Paulo / SP • CEP 01509-900
(11) 2189-5000 • www.accamargo.org.br

Diretrizes para Projetos Retrospectivos 2016 - Versão 1 (Resolução CNS/MS nº 466/12)

Apêndice 1 - Ficha para coleta de dados – REDCap

A.C.CAMARGO CANCER CENTER
Departamento de Estomatologia/ Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e
Otorrinolaringologia/ Patologia bucal

I. Identificação e dados demográficos:

- 1- I.D..... _ _ _ _
- 2- RGH..... _ _ _ _ _ _ _
- 3- Idade (anos) _ _
- 4- Sexo - (1) masc (2) fem..... _
- 5- Raça - _
- Branca(1) Amarela(2) Negra(3) Outras(4)
- 6- Fumante:..... _
- Não(1) Sim(2) ex-fumante(3)
- 7- Etilista:..... _
- Não(1) Sim(2) ex-etilista(3)
- 8- Tempo de história (meses)..... _

II. Loco-regional:

- 9- Tratamento prévio:..... _ _ _
- Não(1) Cirurgia(2) RxT(3) Químio(4) Cirurgia+RxT(5)
- 10- Localização - _
- Gengiva sup. (1), Gengiva inf. (2), Rebordo (3), Assoalho (4), Língua (5), Região Retro-molar (6) outra (7)
- 11- Tamanho: _____ cm
- 12- Exames de Imagem..... _
- CT(1) RNM(2) RX(3)
- 13- Laudo do Exame de Imagem..... _
- Sem Invasão(1) Invasão(2)
- 14- T1(1) T2(2) T3(3) T4(4) TX(5)..... _
- 15- N0(1) N1(2) N2a(3) N2b(4) N2c(5) N3(6) NX(7).... _
- 16- M0(1) M1(2) MX(3)..... _
- 17- Metástase no diagnóstico..... _
- linfonodos(1) pulmão(2) osso(3) fígado(4) outros(5)

III. Tratamento:

- 18- Data do início do tratamento..... _ / _ / _
- 19- Data da cirurgia - _ / _ / _
- 20- Tipo de cirurgia - _
- Marginal (1), Segmentar (2), Hemi-mandibulectomia (3), Total (4)
- 21- Esvaziamento - _
- Ipsilateral rad.(1),Contra-lateral rad.(2),Ipsilateral sel.(3),Contra-lateral sel.(4)
- 22- RXT - _
- Não (1), Sim (2), Ausência de Informação (3)
- 23- Data do início da RXT - _ / _ / _

- 24- Dose final Gy local:..... _ _ _ _
- 25- Data do final da RXT - _ _ / _ _ / _ _
- 26- QTX adjuvante:..... _
- Não(1) Sim(2)
- 27- Esquema _
- Platina semanal(1) Platina trissemanal(2) Cetuximab(3)
- 28- Número de ciclos - _

IV. Anatomia Patológica:

- 29- Bloco AP n°: _____
- 30- Invasão Óssea - _
- Não (1), Sim (2)
- 31- Medidas da Neoplasia..... _
- 32- Medidas da Neoplasia..... _
- 33- Medidas da Neoplasia..... _
- 34- Lâmina referente a amostra óssea -
- 35- Bloco Ap complementar (osso descalcificado) -
- 36- T1(1) T2(2) T3(3) T4(4) TX(5)..... _
- 37- N0(1) N1(2) N2a(3) N2b(4) N2c(5) N3(6) N3a(7) N3b(8) NX(9).... _
- 38- M0(1) M1(2) MX(3)..... _
- 39- Comprometimento linfonodal ipsilateral:
- a) Total dissecado..... _ _ _ _ _
- b) Número comprometido..... _ _ _ _ _
- 40- Comprometimento linfonodal contra-lateral:
- a) Total dissecado..... _ _ _ _ _
- b) Número comprometido..... _ _ _ _ _
- 41- Ruptura capsular..... _
- Sim(1) Não(2) Ignorado(3)
- 42- Tipo Histológico..... _
- Grau 1(1) Grau 2(2) Grau 3(3) Não especificado (4)
- 43- Margens cirúrgicas - _
- Livres (1) comprometidas (2) Exiguas (3)
- 44- Presença de Inflamação..... _
- Não detectada(1) Leve(2) Moderada(3) Intensa(4)
- 45- Infiltração perineural..... _
- Não(1) Presente(2) Ignorado(3)
- 46- Presença de Invasão Muscular Esquelética..... _
- Não(1) Sim(2)
- 47- Embolização vascular..... _
- Não(1) Sim(2) Não especificada(3)
- 48- Embolização Linfática..... _
- Não(1) Sim(2)
- 49- Embolização Sanguínea..... _
- Não(1) Sim(2)

V. Etapas Laboratoriais:

- 50- Etapas Laboratoriais - _

Não (1), Sim (2)

51- Frente de Invasão Tumoral..... __

Tipo 1(1) Tipo 2(2) Tipo 3(3) Tipo 4 (4) Tipo 5 (5) Não especificada(6)

52- Classificação da Invasão Óssea..... __

Invasivo(1) Erosivo(2) Misto(3)

53- Volume de Osteóide (OV/BV, %)...... __

54- Superfície do Osteóide (OS/BS, %)...... __

55- Espessura do Osteóide (O.Th, μ m)...... __

56- Superfície Reabsorvida (ES/BS, %)...... __

57- Número de Osteoclastos por milímetro de superfície trabecular (N.Oc/BS).....__

58- Profundidade de Reabsorção (E.De, μ m)...... __

Expressão Molecular Tumor:

Donw(0) Normal(1) Super(2)

59- RANK..... __

60- RANKL..... __

61- OLG..... __

62- IL-6..... __

VI. Prognóstico:

63- Recidiva __

Não (1), Sim (2), Ausência de Informação (3)

64- Data da primeira recidiva - __ / __ / __

65- Recidiva/Metástase - __

Não(1) Local(2) Regional(3) Distância(4)

66- Linfonodo:..... __

Não(1) Ipsilateral(2) Contra-lateral(3) bilateral (4)

67- Distância:..... __

M0(1) Pulmão(2) Osso(3) Fígado(4) Outros(4)

68- Quantas recidivas local:..... __

Nenhuma(1) Uma(2) Duas(3) Três(4) Quatro ou mais (5)

69- Segundo tumor primário - __

Não (1), Sim (2), Ausência de Informação (3)

70- Data de diagnóstico do segundo tumor primário - __ / __ / __

71- Diagnóstico (CID) - _____

72- Tratamento da recidiva local:..... __

Não(1) Cirurgia(2) Cirurgia+RTX(3) RTX+QTX(4) Cirurgia+RTX+QTX (5)

73- Data da última informação - __ / __ / __

74- Situação da última informação - __

vivo sem doença(1) vivo com doença(2) morto pela doença(3) morto durante o tratamento(4) morto por outra causa(5) perdido de vista(6)

(definição - para pacientes com menos de 5 anos de seguimento todos os que deixaram de retomar por um período igual ao dobro estipulado. Pacientes assintomáticos perdidos após 5 anos devem ser classificados como Vivos 000, no último seguimento).