

PREDIÇÃO DE RISCO DE FALHA CLÍNICA BASEADA NA DETECÇÃO DE BIOMARCADORES TUMORAIS EM CÂNCER DE CAVIDADE BUCAL

WILBER EDISON BERNAOLA PAREDES

**Tese apresentada à Fundação Antônio Prudente para
obtenção do título de Doutor em Ciências**

Área de Concentração: Oncologia

Orientador: Dr. Antônio Cássio de Assis Pellizzon

Co-Orientadora: Dra. Cláudia Malheiros Coutinho
Camillo

São Paulo

2023

FICHA CATALOGRÁFICA

Bernaola-Paredes, Wilber Edison

Predição de risco de falha clínica baseada na detecção de biomarcadores tumorais em câncer de cavidade bucal / Wilber Edison Bernaola Paredes - São Paulo, 2021.

94f.

Tese (Doutorado) - Fundação Antônio Prudente. Curso de Pós-Graduação em Ciências - Área de concentração: Oncologia

Orientador: Antônio Cássio Assis Pellizzon

1. Carcinoma de células escamosas da boca.
2. Biomarcadores tumorais. 3. Genes codificadores dos receptores de fator de crescimento epidérmico. 4. E-Caderinas 5. Recorrência
6. Genes supressores de tumor. 7. Proteínas supressoras de tumor.

CDU 616

SUPORTE À PESQUISA POR AGÊNCIA DE FOMENTO

Este trabalho recebeu apoio do Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), através do outorgamento de bolsa de Doutorado e o auxílio à Pesquisa com número de protocolo 140071/2019-9 ao aluno Wilber Edison Bernaola Paredes.

DEDICATÓRIA

Dedico este manuscrito a todos os que lutam pelo combate ao câncer no Mundo, aos meus avós que já se foram e que também fizeram parte desta luta. Aos que acreditam na vida e na esperança de que dias melhores estão por vir...

AGRADECIMENTOS

Agradeço aos meus pais Robert Wilber e Rosa Sofia, pilares fundamentais na minha vida, e que me deram asas para voar e continuar a construir o meu caminho, a minha felicidade diária e que sempre estão e estarão presente em cada batalha, conquistas e derrotas porque eles me ensinaram o sentido de viver. Gratidão eterna.

À minha família que de perto ou de longe sempre me acompanharam na minha caminhada, de alguma forma fizeram parte desta história e apoiaram sempre as minhas aventuras pessoais e acadêmicas neste mundo.

Ao meu orientador Dr. Antônio Cássio Assis Pellizzon, pela confiança e todo o suporte oferecido antes e durante a execução deste projeto de pesquisa. Por ter acreditado em mim e nas minhas capacidades, pelo incentivo e pela liberdade de escolha, de decisão, que sempre em conjunto tínhamos a fazer. Dr. Cássio, o senhor é uma referência pessoal e profissional que eu levarei comigo no decorrer da vida. Gratidão.

À minha co-orientadora Dra. Cláudia Malheiros Coutinho Camillo, por ter aceitado co-orientar este estudo sem hesitação na primeira vez que eu pessoalmente fui lhe solicitar essa contribuição valiosa. Agradeço por todo o conhecimento repassado, pelas oportunidades oferecidas dentro do seu laboratório e com o grupo de colegas que a senhora coordena no Centro Internacional de Pesquisa (CIPE), já que para mim foi um acréscimo tanto como aluno como jovem pesquisador. Gratidão.

Aos Doutores Clóvis Antônio Lopes Pinto e Felipe D Almeida Costa do Departamento de Anatomia Patológica, que foram grandes colaboradores neste projeto e que providenciaram todas as ferramentas para realização das análises a serem apresentadas nesta tese, além do conhecimento valioso no que diz respeito à Anatomia Patológica no Câncer Oral.

Aos residentes do Departamento de Radioterapia Kairton Pereira da Silva e Cecília Felix Penido Mendes de Sousa que de alguma forma contribuíram na coleta dos dados deste estudo e que sempre se mostraram atenciosos e dispostos a colaborar comigo.

A todos os titulares médicos do Departamento de Radioterapia que de alguma forma contribuíram neste estudo, especialmente à Dra. Carolina Humeres Abrahão, pela valiosa ajuda e disposição e todo o conhecimento repassado na coleta e análise de resultados.

A toda equipe de enfermagem, técnicos e pessoal administrativo do Departamento de Radioterapia, em especial à Kátia Trigo, Rosemari Bellas, Alessandra Marcicano e Maria Eugênia Soares do hospital pela atenção, ajuda e suporte durante o decorrer do desenvolvimento do estudo.

À equipe do grupo de pesquisa sob coordenação da Dra. Cláudia Malheiros, às colegas de Pós-Graduação Milena Antunes, Agatha Nagli e Carolinne Oliveira pela ajuda e suporte e em especial à Katia Klug por toda paciência, conhecimento e atenção oferecida durante a minha estadia no centro Internacional de Pesquisa (CIPE).

À toda equipe do Laboratório de Imunoistoquímica do hospital, à Keila, Nathalia e Severino por todo apoio, suporte e ajuda durante o desenvolvimento do projeto de pesquisa.

A todos os colegas de Pós-Graduação, residentes do Departamento de Radioterapia, da Cirurgia de Cabeça e Pescoço & Otorrinolaringologia, da Oncologia Clínica, da Anatomia Patológica entre outros que contribuíram direta ou indiretamente no desenvolvimento deste estudo.

A toda equipe do Ensino do A.C. Camargo Cancer Center pelo suporte, orientação e paciência durante o decorrer dos quatro anos, especialmente à Deborah Queiroz, Cássia Regina, Luciana Pitombeira, Adriana Araújo e todos que fizeram e facilitaram a minha estada a mais tranquila possível.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) do Brasil pelo financiamento, apoio e incentivo para o desenvolvimento deste estudo no decorrer dos trinta e seis meses, assim como para as outras atividades acadêmicas realizadas durante este tempo.

A todos os amigos, colegas e companheiros de profissão que estiveram comigo neste tempo e que contribuíram seja intelectual ou emocionalmente para conclusão e concretização deste sonho. Meu Muito Obrigado de coração!

RESUMO

Bernaola-Paredes WE. **Predição de risco de falha clínica baseada na detecção de biomarcadores tumorais em câncer de cavidade bucal.** São Paulo, 2022. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

INTRODUÇÃO: O carcinoma de células escamosas da cavidade oral (CEC) abrange uma ampla diversidade de células neoplásicas que possuem características moleculares heterogêneas quando expressadas pelo tumor, cuja detecção primária pode se tornar uma ferramenta útil tanto no diagnóstico inicial quanto no prognóstico nos pacientes portadores deste câncer. Os principais biomarcadores tumorais (BmTs) descritos e associados à carcinogênese do câncer de cavidade oral são: p53, p16, Ciclina-D1, EGFR e a E-caderina.

OBJETIVO: O objetivo deste estudo foi avaliar o risco de recorrência a partir da detecção dos BmTs p16, p53, E-caderina, Ciclina-D1 e EGFR nos pacientes portadores de CEC submetidos ao tratamento multimodal. **MATERIAL E MÉTODOS:** Foram selecionados 100 pacientes com diagnóstico de CEC de cavidade oral e submetidos ao tratamento multimodal, os quais foram separados em dois grupos: A) Pacientes com CEC de assoalho de boca; B) Pacientes com CEC de língua, ambos os grupos tratados de forma multimodal. Após seleção foi realizada a análise por imunohistoquímica (IHQ) da expressão dos 05 biomarcadores acima descritos. Da mesma forma, foi realizada a análise dos dados demográficos e clínicos, além dos critérios morfológicos inerentes ao tumor para determinação dos fatores preditivos e prognósticos independentes. **RESULTADOS:** Após a análise retrospectiva dos dados da população de estudo, 51 pacientes (51%) apresentaram CEC na região do assoalho de boca e 49 (49%) na língua, com maior proporção de homens do que mulheres (69 % vs. 31%) e com idade maior ou igual a 60 anos (mediana: 62 anos/ R: 29-86 anos). A mediana de acompanhamento dos pacientes foi de 28 meses (R: 0-71 meses/média: 26 /DP: +-14,04) e do aparecimento da recorrência foi de 12 meses (mediana: 9 meses/ R: 0-37 meses). A maioria apresentou o estadiamento clínico-patológico inicial I e II (63,6%), pior padrão de infiltração tipo 3-5 (70,5%) e com presença de extensão extracapsular (EEC) (57,5%). Por outro lado, 21 pacientes (21,2%) expressaram p16, 87 (87,9%) a Ciclina-D1, 63 (63%) p53, 53 (53,5%) a E-

caderina e 66 (66%) o EGFR. Após aplicação do teste Qui-quadrado foi observada associação estatisticamente significativa entre a expressão do p53 e o sexo (p: 0,01), p53 e tabagismo/etilismo (p: 0,04) e a expressão da E-caderina associada à presença de infiltrado linfoide (p: 0,03). Para análise da Sobrevida Global (SG) foi aplicado o teste de Kaplan Meier, sendo que a média foi de 53 meses (R: 42-61 meses). Na análise da Sobrevida Livre de Doença (SLD) a média foi de 31 meses (R: 27-24 meses). Finalmente, foi realizada a análise multivariada de Cox para cálculo da razão de risco (RR), onde foram observados para o EGFR RR: 4,97 (p: 0,016/R: 1,34-18,30) e a E-caderina RR: 0,294 (p: 0,056/ R: 0.084-1.03).

CONCLUSÃO: A expressão de EGFR resultou como potencial biomarcador preditivo de risco de recorrência nos pacientes com CEC de cavidade oral e submetidos à abordagem multimodal, enquanto a E-caderina comportou-se como provável fator protetor contra o risco de recorrência neste mesmo grupo. Contudo, uma avaliação com maior coorte de pacientes se torna necessária para melhor compreensão do papel de outros BmTs, bem como a validação destes resultados na prática clínica.

SUMMARY

Bernaola-Paredes WE. **Biomarkers analysis for risk prediction of clinical failure in patients diagnosed with oral cavity cancer.** São Paulo, 2022. [Tese de Doutorado-Fundação Antônio Prudente].

INTRODUCTION: Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) is the sixth most common cancer worldwide, characterized by heterogeneous cellular and histological features observed by different molecular parameters. The main biomarkers (BKs) associated with oral cavity tumorigenesis are p53, EGFR, Cyclin-D1, p16 and E-cadherin and their expression is associated with poor prognosis and multiples relapses, besides other histopathological prognostic factors associated to lower rates of overall (OS) and disease-free survival (DFS).

OBJECTIVE: This study aims to confirm through histopathological assessment (HP) based on morphological tumor criteria and immunohistochemistry analysis (IHC) of the BKs the association with increased local recurrence in patients diagnosed with OSCC submitted to multimodal treatment at A.C. Camargo Cancer Center. **MATERIAL AND METHODS:** One hundred patients diagnosed with OSCC submitted to multimodal treatment during 2013-2017 were evaluated and distributed in two groups according to the primary local tumor: A) Patients with OSCC in the floor of the mouth and B) tongue OSCC, both groups treated with only surgery, surgery plus radiotherapy (RT) and/or surgery with RT and chemotherapy. IHC and HP analysis were performed of surgical specimen for detection of these five BKs such as EGFR, p53, E-cadherin, p16 and Cyclin D1. Moreover, after HP for morphological tumor featuring prognostic factors such as clinic-pathological staging, free surgical margins, extra-capsular extension of lymph nodes, perineural and angiolymphatic invasion, depth of pattern infiltration were described. Demographic and clinical data were collected, and the non-parameter Chi-square statistical test was performed for determining association between them. OS and DFS rates were calculated using Kaplan Meier test and logRank test for univariate statistical analysis. Cox regression model was done, and the hazard ratio was established for each independent factor to predict clinical failure ($p \leq 0.05$). **RESULTS:** From 100 patients analyzed, 61% were male and 39% female. Regarding local primary tumor, 51% presented OSCC in the floor of the mouth and 49% in the tongue with a mean age of 62 years (R: 29-86). The median of follow-up was 28 months (mean: 26 / SD: +14,04 / R: 0-71)

and the mean of recurrence appearance was 12 months (median: 9/ R: 0-37). Most patients showed an initial stage (I-II) (63.6%), Worst pattern of invasion (WPOI) 3-5 (70.5%), extracapsular extension (EE) (57.5%). Regarding BKs expression, 21.2% p16, 87.9% Cyclin-D1, 63% p53, 53.5% E-cadherin, and 66% EGFR. It was observed a statistically significant association between p53 expression and for both sex (p: 0.01), p53 and smoking/alcohol consumption (p:0.04). E-cadherin was associated with lymph node infiltration (p: 0.03). The median OS was 80% vs 60% in 03 years (R: 42-61; I/II vs. III-IV p: 0.06); for DFS was 50% (p: 0.22; I/II vs. III/IV) in 05 years (R: 27-24). Cox regression showed that EGFR expression HR: 4.9 (p: 0.02/ R: 1.34-18.30) and E-cadherin HR: 0.3 (p: 0.06/R: 0.084-1.03) and EE as morphological tumor criteria (HR: 3.68 / p: 0.056 / R: 1.00-13.48) are independent factors for prediction of clinical failure. **CONCLUSION:** EGFR expression is a potential biomarker for prediction of oral cancer recurrence in patients submitted to multimodal management; however, the loss of E-cadherin expression was considered as a protective factor against OSCC recurrence for this group. Furthermore, longitudinal studies must be performed to validate these results in the clinical practice.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1.** Via de sinalização da E-caderina na carcinogênese oral e no processo de transição epitélio mesênquima..... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 2.** Via de sinalização do receptor do fator de crescimento epidermal humano (EGFR) na carcinogênese oral..... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 3.** Via de sinalização da Ciclina-D1 e o ciclo de regulação na sua degradação com fins terapêuticos..... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 4.** Diagrama da malignização e transformação dos queratinócitos causado pelas oncoproteínas provenientes do vírus do papiloma humano (HPV), E6 e E7**Erro! Indicador não definido.**
- Figura 5.** Via de sinalização do TP53 e apoptose celular..... **Erro! Indicador não definido.**
- Figura 6.** Imagem para cálculo de planejamento realizada para aplicação de RT através da técnica de 2D em paciente portador de CEC de cavidade oral.22
- Figura 7.** Planos conformados para irradiação de leito tumoral e drenagem bilateral através da técnica 3D conformada em paciente portador de CEC de cavidade oral.23
- Figura 8.** TC de planejamento para aplicação de RT através da técnica de IMRT em paciente portador de CEC de cavidade oral.....23

Figura 9. Análise por Imunoistoquímica (IHQ) para detecção do biomarcador tumoral E-caderina..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 10 . Análise por IHQ da E-caderina de outra amostra de paciente portador de CEC de cavidade oral **Erro! Indicador não definido.**

Figura 11. Análise por IHQ para detecção do biomarcador tumoral Ciclina D1**Erro! Indicador não definido.**

Figura 12. Análise por IHQ do biomarcador tumoral p53 **Erro! Indicador não definido.**

Figura 13. Análise por IHQ do biomarcador p16..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 14. Análise por IHQ do biomarcador tumoral EGFR..... **Erro! Indicador não definido.**

Figura 15. Curva de Sobrevida Global (SG) dos pacientes portadores de CEC de cavidade oral submetidos à terapia uni ou multimodal durante o período de 2013-201764

Figura 16. Curva de SG em função do estadiamento clínico-patológico dos pacientes analisados portadores de CEC de cavidade oral65

Figura 17. Curvas de SG em função da abordagem uni- ou multimodal dos pacientes portadores de CEC de cavidade oral tratados entre 2013-2017..... 66

Figura 18. Curva de SG em função da expressão do EGFR nos pacientes portadores de CEC de cavidade oral tratados durante 2013 -2017.....67

Figura 19. Curva de SG em função da expressão da E-caderina nos pacientes portadores de câncer oral e tratados durante 2013-2017	68
Figura 20. Curva de SG em função da expressão do p53.....	69
Figura 21. Curva de SG em função da expressão do p16.....	70
Figura 22. Curva de SG em função da expressão da Ciclina-D1.....	71
Figura 23. Curva de SG em função do Pior Padrão de Infiltração (PPI) do tumor primário. ...	72
Figura 24. Curva de SG em função da IP detectada no tumor primário	73
Figura 25. Curva de SG em função do número de linfonodos (LNDs) acometidos pelo tumor primário	74
Figura 26. Curva de Sobrevida Livre de Doença (SLD) dos pacientes portadores de CEC de cavidade oral submetidos à terapia uni ou multimodal durante o período de 2013-2017.....	75
Figura 27. Curva de SLD em função ao gênero dos pacientes incluídos.....	76
Figura 28. Curva de SLD em função da idade (em anos) da população de estudo.....	77
Figura 29. Curva de SLD em função do local do tumor primário	78
Figura 30. Curva de SLD em função do Tabagismo-Etilismo da população analisada	79

Figura 31. Curva de SLD em função da terapêutica realizada: monoterapia/multimodal	80
Figura 32. Curva de SLD em função da dose total (Gy) na RT+	81
Figura 33. Curva de SLD em função do volume irradiado na RT+	82
Figura 34. Curva de SLD em função do intervalo de tempo entre a Cx. e a RT+	83
Figura 35. Curva de SLD em função da técnica de RT+ empregada.....	84
Figura 36. Curva de SLD e o tempo de RT+ realizada.....	85
Figura 37. Curva de SLD e QT realizada após e/ou em concomitância à RT.....	86
Figura 38. Curva de SLD em função do tamanho do tumor primário após análise anatomopatológica (AP).....	87
Figura 39. Curva de SLD em função da detecção do número de LNDs acometidos.....	88
Figura 40. Curva de SLD em função do estadiamento clínico (cT).....	89
Figura 41. Curvas de SLD em função do pior padrão de infiltração tumoral.....	90
Figura 42. Curva de SLD em função do PPI (primeira categoria)	91
Figura 43. Curva de SLD e PPI recategorizado (segunda categoria).....	92

Figura 44. Curva de SLD em função da EEC tumoral detectada na AP.	93
Figura 45. Curva de SLD em função da Invasão Perineural (IPN) detectada	94
Figura 46. Curva de SLD em função das margens cirúrgicas obtidas após ressecção tumoral	95
Figura 47. Curva de SLD em função dos LNDs analisados após análise AP.	96
Figura 48. Curva de SLD em função da detecção do EGFR subdividido em dois grupos EGFR 1 e 2.	97
Figura 49. Curva de SLD em função da detecção da E-caderina.	98
Figura 50. Curva de SLD em função da detecção da Ciclina D1	99
Figura 51. Curva de SLD em função da detecção do p53.....	100
Figura 52. Curva de SLD em função da detecção do p16.....	101
Figura 53. Curva de SLD em função do agrupamento dos BmTs EGFR e E-caderina.....	102

LISTA DE TABELAS

Tabela 1. Descrição dos anticorpos, clones, fornecedor, diluição de uso, recuperação antigênica, controle positivo e o padrão de marcação	19
Tabela 2. Análise descritiva das variáveis demográficas, os critérios morfológicos, a terapêutica realizada e o status dos pacientes após atendimento no A.C. Camargo Cancer Center no período de 2013-2017	26
Tabela 3. Análise descritiva das variáveis associadas à Radioterapia (RT) realizada nos pacientes atendidos no A.C. Camargo Cancer Center de 2013-2017	30
Tabela 4. Análise descritiva da expressão dos biomarcadores tumorais (BmTs)	40
Tabela 5. Análise da associação entre a idade (em anos) dos pacientes ao diagnóstico de câncer oral e os critérios morfológicos tumorais.....	42
Tabela 6. Análise da associação da idade (em anos) dos pacientes ao diagnóstico de câncer e oral e a Radioterapia adjuvante (RT+).....	44
Tabela 7. Análise da associação entre o sexo (gênero) dos pacientes portadores de CEC de cavidade oral e tratados através da Radioterapia adjuvante (RT+).....	46
Tabela 8. Análise de associação entre o local do tumor primário e os critérios morfológicos tumorais.....	49

Tabela 9. Análise da associação entre Dados demográficos, da topografia do tumor primário e da terapêutica versus os BmTs analisados dos pacientes atendidos no A.C. Camargo Cancer Center durante 2013-2017	52
Tabela 10. Análise da associação entre os critérios morfológicos tumorais vs. os BmTs analisados nos pacientes atendidos no A.C. Camargo Cancer Center no período de 2013-2017	54
Tabela 11. Análise da associação entre a Radioterapia adjuvante (RT+) versus os BmTs analisados nos pacientes atendidos no A.C. Camargo Cancer Center no período de 2013-2017	56
Tabela 12. Análise da associação entre a Radioterapia adjuvante (RT+) versus os Critérios morfológicos tumorais analisados nos pacientes portadores de CEC de cavidade oral e atendidos no A.C. Camargo Cancer Center no período de 2013-2017	60
Tabela 13. Regressão de Cox - análise multivariada (MODELO 1)	103
Tabela 14. Regressão de Cox - análise multivariada (MODELO 2)	104
Tabela 15. Regressão de Cox - análise multivariada (MODELO 3)	105

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

CCP	Câncer de cabeça e pescoço
BmTs	Biomarcadores tumorais
CEC	Carcinoma de células escamosas
INCA	Instituto Nacional do Câncer
SG	Sobrevida Global
SLD	Sobrevida Livre de Doença
HPV	Human Papilloma Virus (Vírus do Papiloma Humano)
PDGFR	Receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas
FGFR	Receptor de fator de crescimento de fibroblasto
TEM	Transição epitélio mesênquima
pRB	Proteína do Retinoblastoma
GST	Gene supressor tumoral
EEC	Extensão extracapsular
IP	Invasão perineural
IA	Invasão angiolímfática
PPI	Pior padrão de infiltração
LNDs	Linfonodos
RT	Radioterapia
IMRT	Intensity Modulated Radiation Therapy
Cx.	Cirurgia
Gy	Gray
CL	Controle local
CLR	Controle locorregional
MR	Metástase recorrente
SLP	Sobrevida Livre de Progressão
SLDE	Sobrevida Livre de doença específica

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	Câncer de cabeça e pescoço	1
1.2	Via de sinalização da E-Caderina	4
1.3	Via de sinalização do receptor do Fator de Crescimento Epidermal (EGFR)	6
1.4	Via de sinalização da Ciclina-D1	8
1.5	Via de sinalização da Onco-proteína p16 na carcinogênese oral	11
1.6	Via de sinalização do gene supressor tumoral p53	13
1.7	Justificativa	15
2	OBJETIVOS	16
2.1	Objetivos gerais	16
2.2	Objetivos específicos	16
3	MATERIAL E MÉTODOS	17
3.1	Tipo de estudo e desenho metodológico	17
3.2	População e amostra do estudo	17
3.3	Análise de imunoistoquímica para detecção dos biomarcadores tumorais	18
3.4	Dados demográficos e critérios morfológicos tumorais analisados	21
3.5	Variáveis associadas à RT+ analisadas	21
3.6	Variáveis analisadas para detecção da recorrência (falha clínica)	23
3.7	Análise estatística	23
4	RESULTADOS	25
4.1	Análise descritiva	25
4.2	Análise descritiva e de correlação dos BmTs após detecção por IHQ	32
4.3	Análise de correlação e/ou associação entre as variáveis através do teste Qui-quadrado	41
4.4	Análise de Sobrevida global (SG)	64
4.5	Análise da Sobrevida livre de doença (SLD)	75
4.6	Análise multivariada de regressão de COX	103

5	DISCUSSÃO	106
6	CONCLUSÕES	113
7	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	114

ANEXOS

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

1 INTRODUÇÃO

1.1 CÂNCER DE CABEÇA E PESCOÇO

O câncer de cabeça e pescoço (CCP) representa 6% de todos os novos casos de câncer diagnosticados mundialmente. Posiciona-se no sexto lugar dos cânceres que acometem o epitélio das estruturas anatômicas da região do aparelho digestivo superior, sendo o câncer de cavidade oral o mais frequente dentre os locais afetados. O CCP causa 350.000 mortes por ano no mundo e são diagnosticados aproximadamente 650.000 casos novos anualmente (BASHEETH e PATIL 2019), (JOHNSON et al. 2020a). No Brasil, a estimativa para cada ano do triênio 2020-2022 aponta que ocorrerão 625 mil casos novos de câncer, sendo que o número de casos novos de câncer de cavidade oral será de 11.180 casos em homens e 4.010 em mulheres. O risco estimado para homens é de 10,69 novos casos a cada 100 mil homens, ocupando a quinta posição, e 3,71 novos casos para cada 100 mil mulheres, sendo o décimo terceiro mais frequente entre todos os cânceres, segundo os dados do Instituto Nacional do Câncer (INCA)(DA SILVA 2020).

1.1.1. Tratamento do CCP: atualidades e diferentes abordagens

O tratamento do CCP baseia-se em uma abordagem multimodal na qual faz-se uso de várias terapias de forma concomitante que irá depender do estadiamento clínico-patológico da doença e do estado sistêmico do paciente. A abordagem multimodal realizada consta da ressecção cirúrgica, a Radioterapia (RT) e a Quimioterapia (QT) adjuvante, não necessariamente nessa ordem, já que as características histopatológicas e os critérios morfológicos inerentes ao tumor primário determinarão o melhor estabelecimento do esquema terapêutico. Recentemente, novas terapêuticas têm-se desenvolvido para aumento de taxas de sobrevida e controle local da doença, tais como inibidores de checkpoints, terapias alvo, imunoterapia associadas ou não a novas técnicas de RT (JOHNSON et al. 2020b).

Estima-se que 43-85% dos pacientes com CCP serão tratados com RT. A RT adjuvante tem mostrado resultados clínicos satisfatórios no que diz respeito ao controle local e locorregional da doença. Avanços recentes nas técnicas de RT tais como a Radioterapia com

modulação da intensidade do feixe (IMRT) permitiram uma redução da dose em tecidos normais adjacentes e também uma melhora considerável no que diz respeito à redução dos efeitos deletérios nas áreas circunvizinhas além de melhores resultados clínicos nos pacientes portadores de tumores primários avançados. A distribuição da dose total no campo irradiado e o fracionamento da dose são estratégias que também visam poupar os tecidos adjacentes sem alterar o plano terapêutico inicial e por consequência, evitar que o paciente seja tratado de forma ineficaz (JOHNSON et al. 2020a), (LEE et al. 2018), (OWOSHO et al. 2016).

O subtipo histológico mais frequente é o carcinoma de células escamosas (CEC) na cavidade oral, associado a diminuição da sobrevida global (SG) quando detectado de forma tardia. Embora a SG em até 05 anos em estágios iniciais (I e II) seja de 50% nos pacientes portadores de CEC, os pacientes que apresentam doença avançada mostram uma piora tanto na taxa de SG quanto na Sobrevida Livre de Doença (SLD)(BASHEETH e PATIL 2019).

A recorrência local ou locorregional é definida pelo crescimento populacional de células tumorais na região ou campo da ressecção ou irradiação. Os segundos tumores primários aparecem na mesma área anatômica, mas separados da borda inicial da ressecção e/ou localizados a 2cm de distância do epitélio sadio, ou o seu aparecimento acontece três anos após o tratamento do tumor primário (TORATANI et al. 2019).

Na década passada, houve melhora no monitoramento do CEC de cavidade oral devido a evolução na detecção de lesões pré-cancerígenas, rastreamento, diagnóstico primário e na terapêutica. Mesmo assim, ainda existem tumores que apresentam estadiamento clínico e características histopatológicas similares, podendo comprometer a avaliação clínica e desencadear futuras recorrências locorregionais e/ou metástases à distância. Diante disso, surgiu a necessidade de explorar novas técnicas complementares, como a avaliação molecular de biomarcadores, permitindo a melhor compreensão do comportamento tumoral em um menor período com finalidade prognóstica (resposta ao tratamento) e preditiva (chance de recorrência locorregional e metástase) (KREPPEL et al. 2016).

1.1.2 Alterações moleculares no CCP

Os biomarcadores tumorais (BmTs), geralmente proteínas, são mensuráveis e os dados gerados permitem análises qualitativas e quantitativas de células tumorais que indicam possíveis graus de diferenciação em comparação as células saudáveis (BASHEETH e PATIL 2019) , (SOLOMON et al. 2016), (KREPPEL et al. 2016). Os BmTs apresentam um papel importante na prevenção secundária de eventos na carcinogênese. A diferenciação tumoral pode ser quantificada por meio de testes bioquímicos e imunológicos representados por estes biomarcadores. Muitos deles têm potencial prognóstico nos casos de lesões pré-cancerígenas, como fatores preditivos no crescimento tumoral e a capacidade biológica determinada de invasão e potencial metastático, e finalmente como fatores preditivos da recorrência locorregional (ALMANGUSH et al. 2017), (KREPPEL et al. 2016), (SINEVICI e O'SULLIVAN 2016).

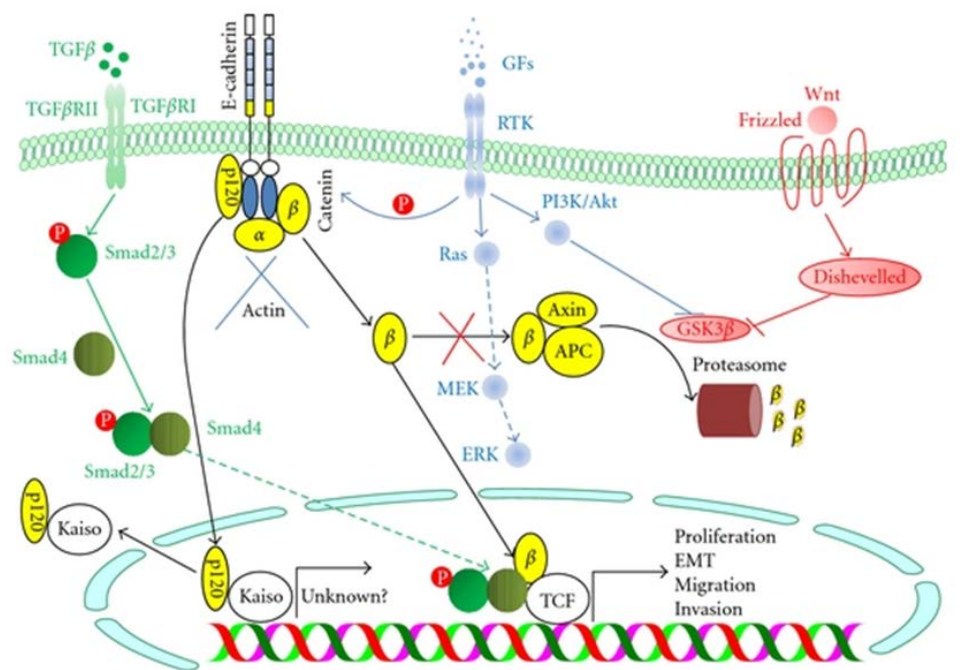
Os estudos a partir da expressão gênica destes BmTs associada à presença do CEC na região da cavidade oral aumentaram consideravelmente a acurácia no rastreamento, diagnóstico, tratamento e prognóstico, permitindo a melhora nas taxas de SG e SLD nos últimos anos (aumento de até 50% e 40% em 05 anos e 03 anos respectivamente) (BASHEETH e PATIL 2019), (TORATANI et al. 2019); no entanto, a validação na prática clínica para todos eles ainda não se tornou uma realidade palpável devido à falta de estudos que abranjam coortes populacionais maiores que justifiquem o seu uso diário. No entanto, ao analisar esses fatores como possíveis agentes preditivos da recorrência locorregional após o tratamento uni ou multimodal realizado a literatura apresenta dados limitados.

Dentre estes BmTs descritos e a análise das suas variações (mutações) destacam-se o receptor do fator de crescimento epidermal (*epidermal growth factor receptor* - EGFR) (CHUERDUANGPHUI et al. 2017); mutações do gene supressor de tumor p53; a Ciclina-D1 que é a proteína reguladora do ciclo celular que participa na fase de transição da fase G1 à fase S, (NAZAR et al. 2020), (RAMOS-GARCÍA et al. 2019) , (RAMOS-GARCIA et al. 2018), (NOORLAG et al. 2017), (ZHAO et al. 2014); a onco-proteína p16 que é o BmT associado à presença de tumores HPV-positivo com menor prevalência na cavidade oral, e a proteína E-caderina, a qual é detectada em casos de metástase do tumor primário nos linfonodos locorregionais (BASHEETH e PATIL 2019) , (SOLOMON et al. 2016), (SZENTKÚTI et al. 2015).

1.2 VIA DE SINALIZAÇÃO DA E-CADERINA

A E-caderina é uma proteína transmembrana de adesão celular e que quando ocorre a mudança de expressão desta para a N-caderina durante a transição epitélio-mesênquima, do inglês *Epithelial Mesenchymal Transition* - EMT, este processo parece promover a migração e invasão celular, correlacionando-se com um pior prognóstico. Foi demonstrado que o repressor transcricional Twist está envolvido na indução de N-caderina, além da supressão na expressão E-caderina. O comportamento agressivo das células cancerígenas durante a troca de Caderinas pode ser justificada pelas interações entre N-caderina, o Receptor de fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGFR) e o Receptor de fator de crescimento de fibroblasto (FGFR). A interação entre a N-caderina e o PDGFR resulta na indução de vários eventos celulares importantes para a EMT, incluindo a reorganização, proliferação e migração de actina. Em contrapartida, a interação entre N-caderina e o FGFR pode impedir a internalização do FGFR ao se ligar ao FGF, resultando na ativação da proteína mitôgena-ativadora de quinase (MAPK) prolongada também como aumento da mobilidade, secreção de metaloproteinase (MMP) e invasão das células cancerígenas. Além disso, a N-caderina pode regular a expressão de FGFR, responsável pela resistência celular ao processo de apoptose entre células metastáticas que se dissociam do epitélio. Assim como a clivagem proteolítica da E-caderina, o processamento proteolítico de N-caderina pela proteína ADAM10 e γ -secretasa pode gerar um domínio extracelular e um fragmento intracelular com potencial de sinalização celular. Estudos mostram que o fragmento citoplasmático da N-caderina pode se ligar ao fator de transcrição da proteína de vinculação de elementos cíclicos AMP cíclicos responsivos e induzir sua degradação nos proteossomos (KRISANAPRAKORNKIT e IAMAROON 2012). A via de sinalização da E-caderina e o processo

da transição Epitélio-Mesênquima (TEM) está representado na **!Error! No se encuentra el origen de la referencia..**



Fonte: Krisanaprakornkit e Iamaroon 2012

Figura 1. Via de sinalização da E-caderina na carcinogênese oral e no processo de transição epitélio mesênquima. O papel crucial da E-caderina, β-catenina, e a transformação do fator de crescimento β (TGFβ) e as vias de sinalização WNT no processo de transição epitélio-mesênquima (TEM). Após a perda da expressão da E-caderina e a β-catenina, a E-caderina é realocada na membrana citoplasmática, e a outra é liberada e acumulada no citoplasma. Em circunstâncias normais, a β-catenina é liberada rapidamente e degradada por proteossomos no complexo adenomatous polyposis coli (APC)/axin/glicogen-sintetase quinase 3β (GSK3β). No entanto, como em vários casos de outros cânceres, o APC não é funcional ou a atividade de GSK3β é diminuída pela ativação da via de sinalização WNT e, portanto, promove a migração da β-catenina para o núcleo, com a função de cofator para o fator de transcrição de células T (TCF). Assim, sua atividade

transcricional é potencializada com as proteínas SMAD 2 e 3 fosforiladas, promovida pela sinalização TGF β , levando à proliferação de tumores, EMT, migração e invasão das células cancerígenas.

Um estudo recente mostrou que a expressão aberrante da E-caderina em tumores de cavidade oral pode estar associada a um pior prognóstico, principalmente se associada a metástases locorregionais e/ou a distância por apresentar baixas taxas de SG e SLD. A localização intracelular da expressão acentuada de E-caderina também foi analisada, onde a detecção intracitoplasmática da proteína pode estar associada a diminuição da sobrevida em relação ao câncer (YAZDANI et al. 2018). Um outro estudo investigou a expressão aberrante de E-caderina por meio da técnica de imunistoquímica em subgrupos associados ao tipo de tratamento realizado, a subpopulação do estudo (asiática comparada a outras) e ao local do tumor primário (cavidade oral e outras topografias), que apresentou maior risco de recorrência da doença (HR=2.533; 95%, intervalo de confiança (IC)= 1.971-3254) , (ZHAO et al. 2012).

1.3 VIA DE SINALIZAÇÃO DO RECEPTOR DO FATOR DE CRESCIMENTO EPIDERMAL(EGFR)

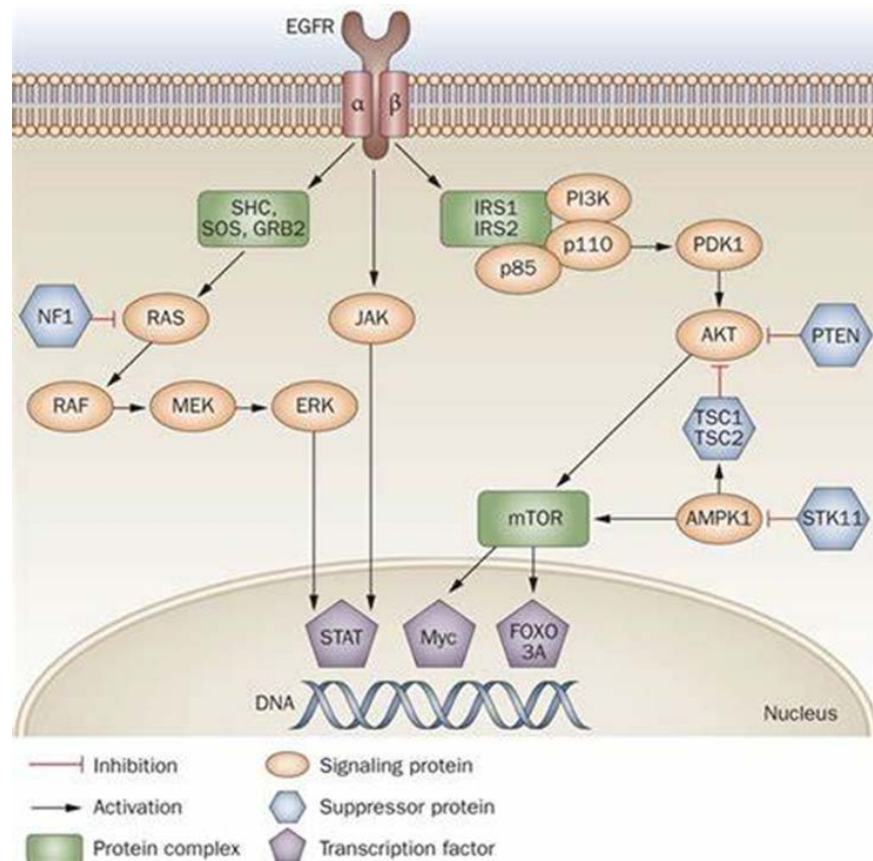
O EGFR, do inglês *Epidermal-growth fator receptor*, é um receptor do fator de crescimento epidermal membro da família HER/ErbB RTK, que são classificados em quatro proteínas distintas: EGFR (ErbB1, Her1), HER2 (EGFR2, Her2/neu), HER3 (EGFR3, ErbB3) e HER4 (EGFR4 ou ErbB4) (DE KORT et al. 2021), (HARRIS e MCCORMICK 2010). A estrutura geral desses receptores é composta por um domínio extracelular glicosilado, uma porção transmembrana hidrofóbica, uma porção intracelular com segmento de justa-membrana (JM), uma proteína de domínio quinase e uma cauda com terminal carbóxilo. O domínio extracelular contém quatro partes, que incluem: segmentos ricos em leucina conhecidos por participar como ligante vinculante (domínios I e III); e setores com numerosos resíduos de cisteína que estão envolvidos em dissulfeto com a formação de vínculo (domínios II e IV). Além disso, o domínio II participa da formação homodímeros e heterodímeros com HER/ membros da família ErbB. A capacidade estrutural dessas proteínas como homodímeros e heterodímeros em diferentes combinações permite o EGFR iniciar cascatas de sinalização complexas (LEEMANS et al. 2018), (STONE et al. 2014) , (HARRIS e MCCORMICK 2010).

Em relação ao tratamento do câncer, a família HER/ErbB são alvos promissores, visto que desenvolvem diversas funções na progressão do câncer, bem como a superexpressão e/ou mutação no processo de carcinogênese em diferentes tumores, incluindo o de pulmão, mama, pâncreas, câncer de esôfago, colorretal e cabeça e pescoço. Especificamente o receptor EGFR tem sido destacado por desempenhar um papel importante no desenvolvimento e crescimento das células tumorais, assim como múltiplas respostas celulares, tais como a diminuição da apoptose e proliferação aberrante de células cancerígenas (HARRIS e MCCORMICK 2010). O EGFR media essas respostas celulares por diferentes vias de sinalização, como a via da proteína fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K/Akt) e as vias da proteína quinase ativadora de mitôgena (MAPK). O caminho PI3K/Akt é conhecido por ter um papel importante na mediação da sobrevivência celular, enquanto a via MAPK é associado à proliferação celular (CHOI et al. 2021), (CHIANG et al. 2020), (CHUERDUANGPHUI et al. 2017). Essas vias regulam principalmente a angiogênese, adesão, motilidade celular e migração, desenvolvimento, diferenciação, organogênese e a sobrevivência das células cancerígenas (STONE et al. 2014).

Múltiplos tratamentos têm sido desenvolvidas baseadas na inibição dos receptores do EGFR, onde a expressão deste biomarcador está associada à progressão e desenvolvimento de metástases à distância dos tumores de cabeça e pescoço (CHIANG et al. 2020), como exemplo a cisplatina e o Cetuximab que vem mostrando ganho nas taxas de SG e SLD em um período de cinco anos após tratamento. No entanto, casos de resistência à terapia baseada na Cisplatina pelas células tumorais com a expressão do EGFR tem causado falha no tratamento clínico e, como consequência, recidiva local e locorregional. Um recente estudo mostrou que a junção entre Cisplatina e Cetuximab pode sensibilizar as células resistentes através da inibição do processo carcinogênico da transição epitélio-mesênquima (TEM). Os resultados mostraram que esta combinação inibe a proliferação e motilidade celular, além da expressão de N-caderina, mas induziu a expressão de outras proteínas, tais como a E-caderina e a claudina-1, que foram associadas a falha a distância. Mesmo ao observar a ausência do processo de apoptose destas células resistentes, o uso desta combinação pode auxiliar no tratamento do câncer oral por inibir a motilidade celular e o processo TEM (CHOI et al. 2021).

Uma recente revisão sistemática sobre potenciais terapias alvo baseada na detecção de biomarcadores associadas à via EGFR-PI3K-AKT-mTOR avaliou estudos pré-clínicos e

clínicos, mostrando que ainda não há consenso na literatura sobre os possíveis biomarcadores e as eventuais terapias pela detecção do EGFR. A expressão deste biomarcador pode direcionar a conduta terapêutica, reduzindo custos e aumentando a efetividade do tratamento com menos efeitos colaterais (DE KORT et al. 2021). A via de sinalização do EGFR e o mecanismo de ação dos anticorpos monoclonais anti-EGFR estão representados na **!Error! No se encuentra el origen de la referencia..**



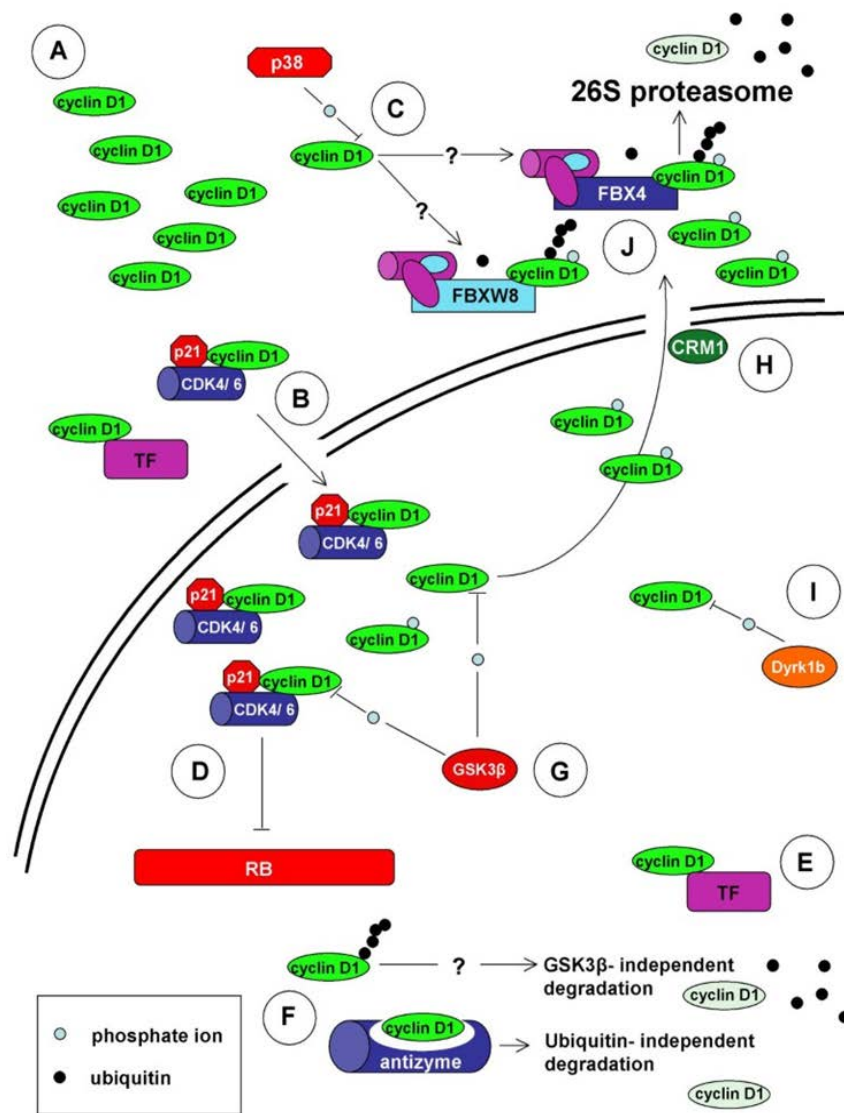
Fonte: Harris e McCormick 2010

Figura 2. Via de sinalização do receptor do fator de crescimento epidermal humano (EGFR) na carcinogênese oral. O EGFR media essas respostas celulares por diferentes vias de sinalização, como a via da proteína fosfatidilinositol 3-quinase (PI3K/Akt) e as vias da proteína quinase ativadora de mitôgena (MAPK). O caminho PI3K/Akt é conhecido por ter um papel importante na mediação da sobrevivência celular, enquanto a via MAPK é associado à proliferação celular.

1.4 VIA DE SINALIZAÇÃO DA CICLINA-D1

A proteína Ciclina-D1 é um proto-oncogene importante regulador da progressão de fase G1 a S do ciclo celular em diferentes tipos de células. Em conjunto com seus receptores de ligação Ciclina dependente quinase 4 e 6 (CDK4 e CDK6), a Ciclina-D1 forma complexos ativos que promovem a progressão do ciclo celular por fosforilados e desencadear a inativação da proteína retinoblastoma (RB), uma proteína supressora tumoral de ampla relevância clínica. Estudos recentes demonstraram que a Ciclina-D1 atua como modulador transcricional, regulando a atividade de vários fatores de transcrição e histona de-acetilasa (HDAC3) independente da atividade CDK4. Por outro lado, a Ciclina-D1 mostra-se instável com a meia-vida curta e é degradada principalmente pelo proteossomos 26S dependente da ubiquitina (ALAO 2007).

A Ciclina-D1 é importante para o desenvolvimento e progressão de várias neoplasias, incluindo às da mama, esôfago, bexiga, pulmão e na região da CP. A superexpressão da Ciclina -D1 tem sido associada à resistência endócrina nas células neoplásicas de mama. Da mesma forma, a superexpressão da Ciclina-D1 ocorre com frequência em alguns cânceres, como de mama e CP, mas não ocorre apenas como consequência da amplificação genética. Em vez disso, o aumento dos níveis de Ciclina-D1 resulta da regulação defeituosa no nível pós-translacional. Diversas intervenções terapêuticas têm sido observadas para induzir a degradação da Ciclina-D1 in vitro, onde são aplicadas terapias de inibidores de checkpoints em pacientes com doença localmente avançada. O aumento da expressão da Ciclina-D1 nas células tumorais está associado ao pior prognóstico que promove a proliferação celular aberrante e crescimento tumoral acelerado (RAMOS-GARCÍA et al. 2019), (RAMOS-GARCÍA et al. 2018), (RAMOS-GARCIA et al. 2018), (NOORLAG et al. 2017), (ALAO 2007). A via de sinalização da Ciclina-D1 está representada na **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..**

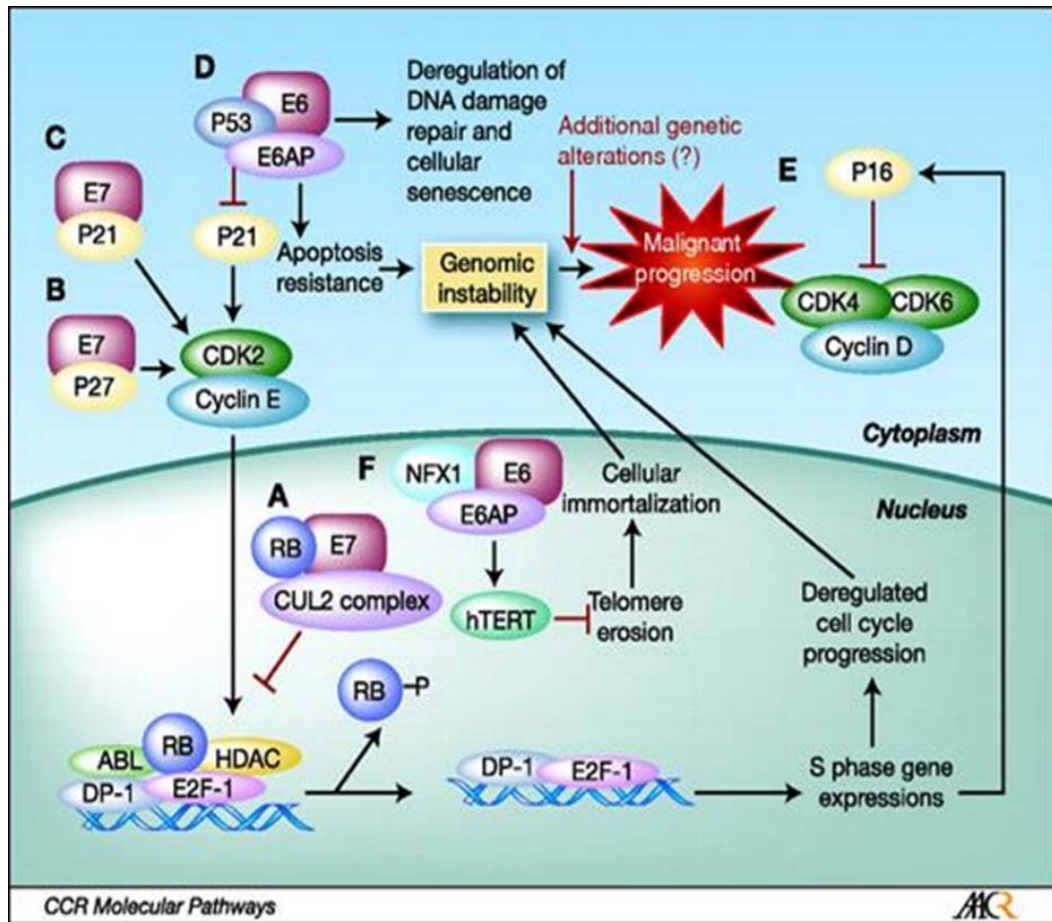


Fonte: Alao 2007

Figura 3. Via de sinalização da Ciclina-D1 e o ciclo de regulação na sua degradação com fins terapêuticos. A) A Ciclina-D1 não contém sinal de localização nuclear (SLN) e seu sequestro pode acumular-se dentro do citoplasma. B) A Ciclina-D1 citoplasmática é transportada para o núcleo associado a seus ligantes circulantes, por exemplo, CDK4 e com outros fatores de transcrição. C) A proteína p38SAPK2 fosforila Ciclina-D1 no resíduo de treonina 286 (T286) e induz sua degradação proteossômica. D/E) Dentro do núcleo, os complexos de quinase dependente ativam a Ciclina-D4 (CDK4) ou CDK6- Ciclina- D1 as quais fosforilam a proteína retinoblastoma (RB). A Ciclina- D1 pode influenciar na atividade de fatores de transcrição independentemente de CDK4/6. F) A Ciclina-D1 livre é degradada pela via de degradação da ubiquitina 26S. G/H) GSK3 β fosforila a Ciclina-D1 em T286 que facilita sua translocação nuclear pela translocação em CRM1. GSK3 β influencia a estabilidade da Ciclina-D1, uma vez que a forma fosforilada da Ciclina-D1 é posteriormente degradada dentro do citoplasma. I/J) Degradação da Ciclina-D1 proteossomal com finalidade de futuros alvos terapêuticos.

1.5 VIA DE SINALIZAÇÃO DA ONCO-PROTEÍNA P16 NA CARCINOGENESE ORAL

A expressão da proteína p16 está associada à infecção primária pelo vírus do papiloma humano (*Human Papilloma Virus* - HPV), onde os pacientes HPV positivos apresentam ampla expressão desta proteína devido à ação conjunta das oncoproteínas E6 e E7 próprias deste vírus responsáveis por inibir os genes supressores tumorais, tais como o p53 e a proteína do retinoblastoma (pRb). A E6 promove a degradação da proteína p53 responsável por regular o crescimento celular e a apoptose após dano do DNA. Por consequência, a E7 aumenta a degradação da proteína intracelular pRb que permite maior regulação da p16 e baixa regulação da Ciclina-D1. Alterações nas vias do p53 e da pRb promove a fase S do ciclo celular. As células tumorais com aumento da expressão da p16 e diminuição ou ausência na expressão da Ciclina-D1, pRb e p53 está correlacionado com a alta infecção pelo HPV (PLATH et al. 2018), (SOLOMON et al. 2016), (CHUNG e GILLISON 2009). A via de sinalização do p16 nas células infectadas está representada na **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia..**

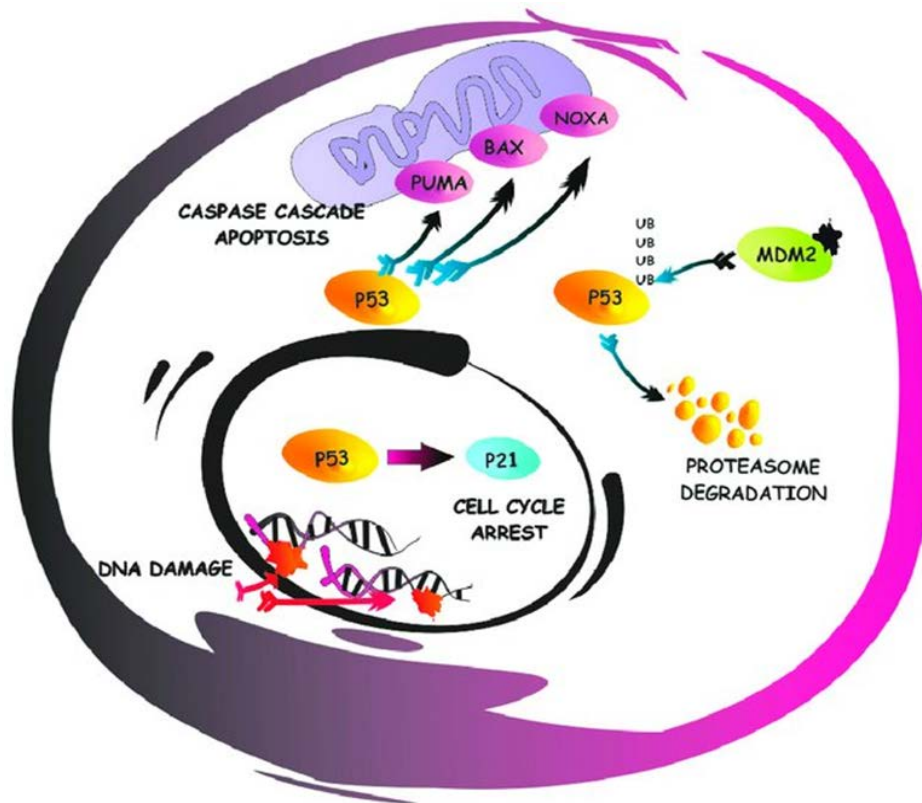


Fonte: Chung e Gillison 2009

Figura 4. Diagrama da malignização e transformação dos queratinócitos causado pelas oncoproteínas provenientes do vírus do papiloma humano (HPV), E6 e E7. A) Processo de ubiquitinação causada pela proteína E7 ligada ao complexo ubiquitina colina 2 para degradação da proteína do retinoblastoma (pRb). B) Interação entre a E7 e a proteína p27 que promove a inibição do ciclo celular e contribui com a carcinogênese oral. C) Interação entre as proteínas E7 e p21 que inibe o ciclo celular e a carcinogênese. D) Degradação do gene supressor tumoral p53 através da ubiquitinação da E6 a ligasa E6AP E) Aumento da expressão do p16 devido à expressão diminuída de pRb.

1.6 VIA DE SINALIZAÇÃO DO GENE SUPRESSOR TUMORAL P53

As mutações deletérias do gene p53 que, em condições de normalidade, atua como gene supressor tumoral (GST) e regulador positivo da via de apoptose, estão associadas à baixa taxa de SG, além de comprometer a resposta no tratamento quimioterápico. Alterações gênicas do tipo *mysense* do gene p53 têm sido descritas como indicadores de proliferação de células com alto potencial de malignidade, influenciando nos padrões de invasividade e resistência aos tratamentos alvos, imunoterapia e quimioterapia. A detecção de mutações deletérias e a sua correlação com parâmetros clínicos e histopatológicos específicos podem ser uma ferramenta prognóstica viável e eficiente para a estratificação dos casos de CEC na cavidade oral (YOGOSAWA e YOSHIDA 2018), (RAGOS et al. 2018), (CARRÀ et al. 2016). A via de sinalização do p53 apresenta-se na **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** a seguir:



Fonte: Chung e Gillison 2009

Figura 5. Via de sinalização do TP53 e apoptose celular. Uma representação simplificada da via de sinalização apoptótica e p53 com regulação negativa por E3 ubiquitina-proteína ligase e a Mdm2. Sob condições de estresse, a p53 promove a transcrição de alvos e a elevação dos níveis da proteína p21(CDKN1A) que promove a parada do ciclo celular ou induz a apoptose celular. Ub: ubiquitina; PUMA: p53 modulador de apoptose regulado positivamente por p53; BAX: Proteína X associada ao BCL-2; NOXA: phorbol-12-myristate-13-proteína induzida por acetato 1 (também conhecida como PMAIP1).

O desenvolvimento de novas tecnologias baseadas na análise do perfil molecular dos tumores de CP permite melhor compreensão das alterações biológicas, além de proporcionar melhorias no diagnóstico, baixa taxa de recorrência e aumento de sobrevivência do paciente antes e após a realização do tratamento adotado. Contudo, há poucos estudos que determinam a especificidade e sensibilidade de técnicas que avaliam as variações biológicas a nível molecular, especialmente tumores submetidos a alguma terapia, que possam determinar o risco de o paciente apresentar falhas locais do tratamento, tais como recorrências ou segundos tumores primários (LIAO et al. 2019), (CHUNG et al. 2011).

1.7 JUSTIFICATIVA

O presente estudo contribuirá para os avanços no diagnóstico e tratamento dos pacientes portadores de câncer oral em estágios localmente avançados ou em tumores recorrentes a partir da detecção primária de potenciais biomarcadores (BmTs) preditores que serão apresentados no decorrer deste estudo, e desta forma irá se estabelecer um prognóstico mais preciso com a expressão deles. Embora existam dados descritos amplamente na literatura contemporânea sobre o papel das proteínas e os mecanismos envolvidos na tumorigênese e carcinogênese precisa-se de maiores dados fidedignos para serem validados na prática clínica com respeito à predição da doença localmente avançada, recorrente e de disseminação a distância (metástase).

Por outro lado, foram apresentadas de forma inédita as taxas de recorrência a partir do cálculo da Sobrevida Livre de Doença (SLD) na população incluída neste estudo, assim como a correlação desta sobrevida em função dos dados demográficos, critérios morfológicos tumorais e da terapêutica realizada, e finalmente dos biomarcadores tumorais (BmTs) expressados e analisados.

2. OBJETIVOS

2.1 OBJETIVOS GERAIS

Correlacionar o risco de falha clínica (recorrência) a partir da detecção dos biomarcadores tumorais (BmTs) nos pacientes diagnosticados e tratados com câncer de cavidade bucal no A.C. Camargo Cancer Center no período de 2013-2017.

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Determinar por imunohistoquímica (IHQ) a expressão dos BmTs: p16, p53, Ciclina-D1, E-caderina e EGFR;
- Determinar a associação entre a expressão dos BmTs e os dados demográficos dos pacientes, os critérios morfológicos associados ao tumor primário, a terapêutica e de forma particular, a Radioterapia adjuvante (RT+);
- Determinar a sobrevida livre de doença (SLD) através do teste de Kaplan Meier em função do tempo de aparecimento da recorrência;
- Avaliar a relação entre a SLD e os dados demográficos (sexo, idade, local do tumor primários e hábitos);
- Avaliar a relação entre a SLD e o estadiamento clínico-patológico e os critérios morfológicos associados ao tumor primário: invasão perineural, pior padrão de infiltração, invasão angiolinfática, extensão extracapsular, linfonodos, margens cirúrgicas;
- Avaliar a relação entre SLD e cada um dos BmTs analisados;
- Determinar a razão de risco de falha clínica (recorrência) para cada BmT analisado.

3. MATERIAL E MÉTODOS

3.1 TIPO DE ESTUDO E DESENHO METODOLÓGICO

Trata-se de um estudo observacional, descritivo, de coorte retrospectiva.

3.2 POPULAÇÃO E AMOSTRA DO ESTUDO

Após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) do A.C. Camargo Cancer Center, com número de protocolo N° 2814/19, foi realizada a análise retrospectiva dos prontuários clínicos eletrônicos dos pacientes com diagnóstico inicial de Carcinoma de Células escamosas (CEC) de cavidade oral como tumor primário atendidos entre Janeiro 2013 e Dezembro 2017, nos quais os biomarcadores descritos foram analisados e detectados através de análise histopatológica e de imunoistoquímica por dois patologistas (de forma cega) do Departamento de Anatomia Patológica da Instituição, pelo qual constituiu-se uma amostra de conveniência devido á que estes BmTs não são analisados na rotina departamental.

Além disso, e para a coleta dos dados demográficos, dos critérios morfológicos tumorais e da terapêutica uni- ou multimodal realizada forma usadas as bases de dados provenientes das plataformas institucionais (RECRUIT, H2TC, TASY) e para a avaliação da Radioterapia adjuvante (RT+) realizada em particular foi usada a plataforma institucional ECLIPSE (CITRIX).

Posteriormente foram estabelecidos os critérios de inclusão e exclusão para conformação dos grupos de estudo sendo descritos a seguir:

3.2.1 Critérios de inclusão:

- Pacientes com diagnóstico primário de câncer oral na região de assoalho de boca e língua nas suas diferentes topografias: dorsal, ventral e bordas laterais.

- Pacientes diagnosticados e tratados exclusivamente no A.C. Camargo Cancer Center durante o período de 2013 a 2017 com exame clínico, radiográfico, histopatológico e terapêutico.
- Pacientes com tempo de acompanhamento (follow-up) de no mínimo 30 meses (dois anos e meio) no A.C. Camargo Center e com confirmação através de exame clínico, radiográfico e histopatológico de recorrência local, locorregional e/ou disseminação à distância.
- Pacientes sem histórico de re-irradiação na região de CP e/ou que foram submetidos a múltiplas cirurgias.

3.2.2. Critérios de exclusão

- Pacientes com análises histopatológicas feitas fora da instituição e/ou que não passaram por revisão de lâmina no Departamento de Anatomia Patológica.

A partir dos critérios descritos anteriormente foram conformados dois grupos a partir da localização primária do tumor descritos a seguir:

- **Grupo A:** 51 Pacientes portadores de CEC de cavidade oral na região de assoalho de boca (não língua);
- **Grupo B:** 49 Pacientes portadores de CEC de cavidade oral da região da língua (bordas laterais, região dorsal e região ventral).

3.3 ANÁLISE DE IMUNOISTOQUÍMICA PARA DETECÇÃO DOS BIOMARCADORES TUMORAIS

(BmTs)

Para a obtenção dos dados pertencentes aos critérios morfológicos foi realizada a análise anatomopatológica das peças cirúrgicas removidas provenientes do tumor primário e também se realizou a análise de imunoistoquímica (IHQ) para detecção da presença dos cinco (05) BmTs em ambos os grupos estabelecidos neste estudo: p16, p53, Ciclina-D1, E-caderina e EGFR. A técnica de IHQ foi realizada seguindo o protocolo descrito abaixo:

Os cortes estendidos em lâminas de vidro e provenientes das amostras obtidas de cada grupo de estudo seguiram o processo de desparafinação que foi realizada em três banhos de xilol por 15 minutos. Em seguida os cortes foram hidratados em uma série

descendente de etanol, a partir de três passagens em etanol absoluto, seguido por etanol 95% e 85% durante 5 minutos cada. Com a finalidade de remover-se o pigmento do fixador, os cortes foram imersos em hidróxido de amônia a 10% em solução alcoólica a 95% durante 10 minutos. Posteriormente, as amostras foram lavadas em água destilada durante 10 minutos.

Os cortes histológicos foram submetidos à recuperação antigênica de acordo com a padronização de cada anticorpo e em seguida lavados em água destilada. Para cada BmT analisado foram usados os clones dos anticorpos cujos detalhes encontram-se na **Tabela 1**.

Tabela 1. Descrição dos anticorpos, clones, fornecedor, diluição de uso, recuperação antigênica, controle positivo e o padrão de marcação

Biomarcador tumoral	Clone	Fornecedor	Diluição	Recuperação antigênica	Controle positivo	Padrão de marcação
p16	E6H4	Roche	Pronto para uso	Protocolo automatizado (Ventana Roche)	Tonsila Útero	Núcleo e/ou Citoplasma
p53	Policlonal	Roche	Pronto para uso	Protocolo automatizado (Ventana Roche)	Intestino	Núcleo
Ciclina-D1	Policlonal	Roche	Pronto para uso	Protocolo automatizado (Ventana Roche)	Tonsila	Núcleo
E-caderina	A-10	Roche	Pronto para uso	Protocolo automatizado (Ventana Roche)	Carcinoma ductal de mama	Membrana e citoplasma
EGFR	Ma552	Roche	Pronto para uso	Protocolo automatizado (Ventana Roche)	Pele	Membrana

O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com dois banhos de quinze minutos cada um em solução peróxido de hidrogênio a 6% e metanol (1:1 v/v). Os cortes foram lavados em água corrente por 10 minutos e, posteriormente, imersos em três banhos de solução de Tris pH=7,4, durante cinco minutos cada.

As lâminas foram submetidas à incubação com solução bloqueadora de proteínas inespecíficas e posteriormente foram incubadas com os anticorpos primários. Para revelação

foi utilizado o cromógeno diaminobenzidina (DAB) por 5 minutos. Após a lavagem, os cortes foram contra-corados com hematoxilina (H) de Mayer previamente filtrada por 2 minutos. Finalizada a coloração, os cortes foram desidratados em uma cadeia ascendente de etanol seguindo a sequência de 70%, 90% e 100% durante 2 minutos cada banho e diafanização em xilol (2 banhos de 5 minutos cada). As lâminas foram montadas em Permount (*Fisher Scientific, Fair Law, NJ/USA*) para exame em microscopia de luz.

As lâminas foram observadas em microscópio de luz convencional. A reação foi considerada positiva quando houve presença da coloração marrom, condição caracterizadora da presença do cromógeno DAB, na reação de IHQ. A análise foi realizada de forma qualitativa, descrevendo a presença ou ausência de marcação e o local da marcação (membrana, núcleo e citoplasma).

3.3.1 BmTs p16, E-caderina, Ciclina-D1 e p53:

- Avaliação da expressão do biomarcador tumoral na amostra histológica previamente selecionada após análise anatomopatológica.
- Avaliação da associação da expressão do BmTs com os dados demográficos do paciente (sexo, idade, localização primária) (análise de correlação entre as variáveis).
- Avaliação da associação (análise de correlação entre as variáveis) da presença do BmTs com os critérios morfológicos associados ao tumor (estadiamento clínico, invasão angiolinfática, invasão vascular, invasão perineural, pior padrão de infiltração, linfonodos comprometidos, margens cirúrgicas, extensão extracapsular dos linfonodos).
- Avaliação da associação (análise de correlação entre as variáveis) da expressão dos BmTs com a RT+ (nos casos realizados) tais como dose total, volume irradiado, intervalo de tempo entre final da cirurgia e início da Radioterapia, técnica de Radioterapia, tempo de tratamento da RT e se houve quimioterapia concomitante à RT.

3.3.2 BmT *Epidermal growth factor receptor* (EGFR):

Para o caso do EGFR, os critérios de avaliação da presença deste biomarcador foram categorizados segundo o grau de expressão (fraco, moderado, forte) conforme a descrição a seguir:

- **Grupo 1 (EGFR1):** os pacientes que apresentaram uma expressão fraca do biomarcador e os que não o apresentaram (negativo).

- **Grupo 2 (EGFR2):** os pacientes que apresentaram uma expressão moderada e os que expressaram de forma forte.

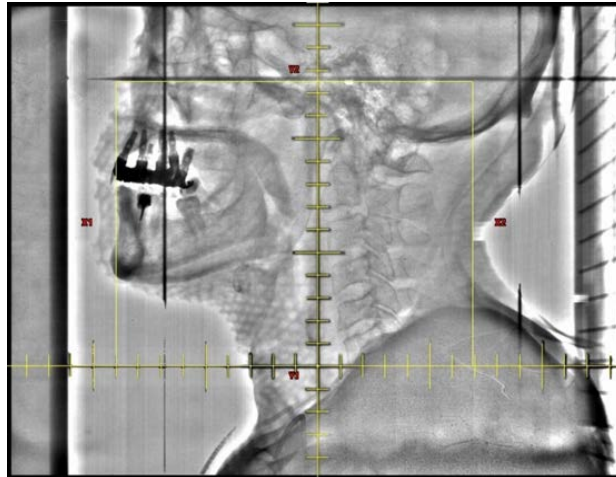
Posteriormente todos os critérios de avaliação que foram descritos para os outros BmTs também foram analisados para o EGFR em ambos os grupos.

3.4 DADOS DEMOGRÁFICOS E CRITÉRIOS MORFOLÓGICOS TUMORAIS ANALISADOS

Foram coletados os dados demográficos dos pacientes, como: gênero, a idade, a data do diagnóstico inicial, a data do início do tratamento, a data da recorrência, a data do óbito e o tipo de tratamento realizado. Também foram coletados os dados clínicos referentes às características morfológicas do tumor, tais como: estadiamento clínico-patológico, invasão angiolinfática, invasão perineural, pior padrão de infiltração, margens cirúrgicas, linfonodos comprometidos e presença ou não de extensão extracapsular (EEC).

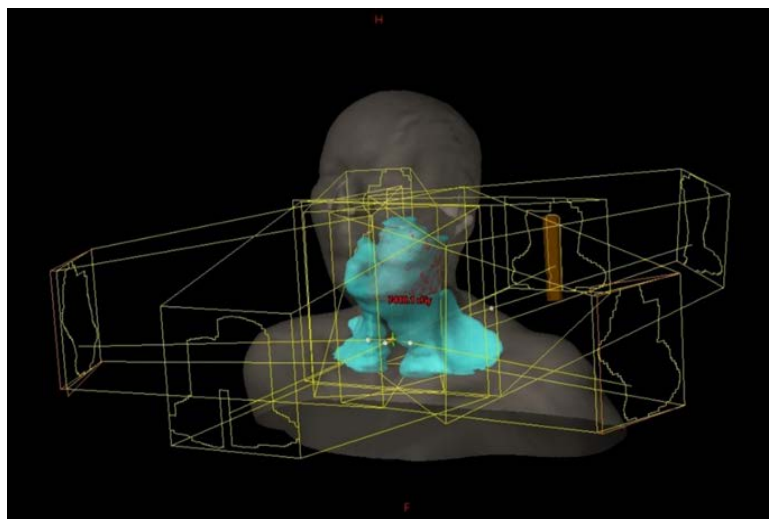
3.5 VARIÁVEIS ASSOCIADAS À RT+ ANALISADAS

No que diz respeito à RT+ realizada foram analisadas as variáveis associadas diretamente ao plano terapêutico estabelecido, tais como a dose total entregue em Gy, o volume alvo irradiado (leito tumoral, drenagem homolateral e bilateral), técnica de RT utilizada (IMRT e/ou outras técnicas), concomitância com quimioterapia (QT), intervalo de tempo transcorrido da cirurgia (Cx.) ao início da RT+, a data de início e término da RT+ e a duração da RT em semanas, coletados a partir da plataforma Departamental ECLIPSE (CITRIX), apresentadas na **Figura 6**, **Figura 7** e **Figura 8**.



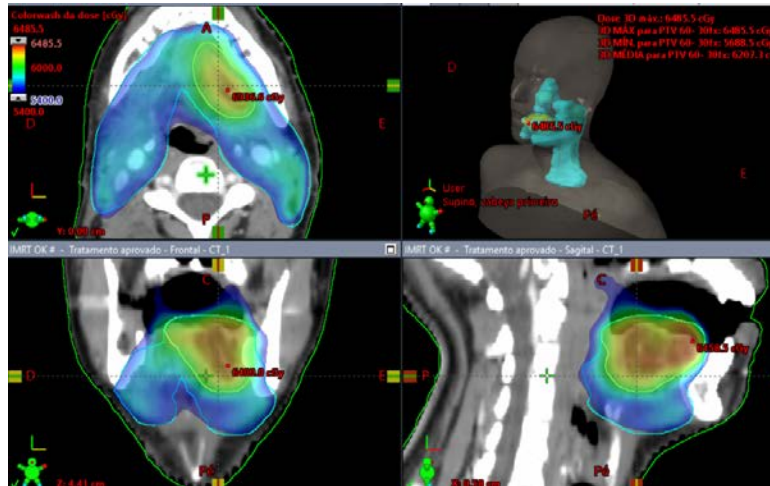
Fonte: Autoria própria (Plataforma ECLIPSE – CITRIX/ Departamento de Radioterapia)

Figura 1. Imagem para cálculo de planejamento realizada para aplicação de RT através da técnica de 2D em paciente portador de CEC de cavidade oral.



Fonte: Autoria própria (Plataforma ECLIPSE – CITRIX/ Departamento de Radioterapia)

Figura 2. Planos conformados para irradiação de leito tumoral e drenagem bilateral através da técnica 3D conformada em paciente portador de CEC de cavidade oral.



Fonte: Autoria própria (Plataforma ECLIPSE – CITRIX/ Departamento de Radioterapia)

Figura 3. TC de planejamento para aplicação de RT através da técnica de IMRT em paciente portador de CEC de cavidade oral. Observa-se diferentes cortes da TC (axial, coronal e sagital) e reconstrução em 3D que mostra a irradiação do leito tumoral e a drenagem homolateral.

3.6 VARIÁVEIS ANALISADAS PARA DETECÇÃO DA RECORRÊNCIA (FALHA CLÍNICA)

- Presença de falha clínica diagnosticada através de exame clínico-histopatológico após tratamento do tumor primário realizado (Sim/Não);
- Tipo de recorrência apresentada: Local / Locoregional / Metástase à distância;
- Tempo de aparecimento da recorrência após tratamento: no mínimo 30 meses.

3.7 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Nos casos de variáveis categóricas, os dados foram relatados através da frequência absoluta e relativa, e para variáveis numéricas foi através de média, mediana, desvio padrão, valor mínimo e máximo. Com a finalidade de avaliar a associação entre variáveis qualitativas

foi aplicado o teste de independência (teste de Qui-quadrado com correção de continuidade ou teste exato de Fisher). Enquanto, para a estimativa da sobrevida global (SG) e a sobrevida livre de doença (SLD) nos pacientes incluídos após terapêutica uni- ou multimodal foi realizado o teste de Kaplan- Meier, sendo que a diferença estatística entre as curvas foi detectada através do teste de Log-Rank.

As curvas de SLD (taxas de recorrência) foram mensuradas pelo tempo de aparecimento da recorrência da doença após o tratamento realizado do tumor primário. Para cada biomarcador descrito e analisado neste estudo foram elaboradas as curvas de SLDs associadas em função da detecção deles, sendo considerado estatisticamente significativo com um valor de $p \leq 0.05$.

A partir dos resultados obtidos após teste de Log-Rank, foram selecionadas as variáveis com valor “p” estatisticamente significativo ($p \leq 0,05$) que estariam associadas de forma direta ao aparecimento da recorrência, principalmente na detecção de algum dos biomarcadores analisados. Além disso, foi construído o modelo de regressão de Cox na análise multivariada, através do cálculo da razão de risco (*RR / hazard ratio - HR*), sendo o valor inferior a 1 considerado como “fator protetor em detrimento do aparecimento do evento” e superior a 1 como “aumento do risco de aparecimento do evento” das variáveis correspondentes aos critérios morfológicos, tais como a extensão extracapsular (EEC), tamanho do tumor, invasão perineural, pior padrão de infiltração. Os BmTs incluídos foram o EGFR e a E-caderina com potenciais indicadores independentes de risco no modelo obtido.

O nível de significância adotado foi de 5% para todos os testes. As análises estatísticas foram realizadas por meio do software SPSS (versão 25).

4. RESULTADOS

4.1 ANÁLISE DESCRITIVA

Foram incluídos 100 pacientes portadores de CEC de cavidade oral e que tiveram a análise IHQ para detecção dos cinco (05) biomarcadores descritos anteriormente. Ao todo, 69% dos pacientes pertenciam ao gênero masculino e 31% ao feminino. Quanto aos locais do tumor primário, observamos que: 51% pacientes apresentaram CEC de assoalho de boca e 49% pacientes foram diagnosticados com CEC de língua (borda lateral, região dorsal e ventral).

A maioria dos pacientes incluídos neste estudo foram homens (69 pacientes) e maiores de 60 anos (61 pacientes), com uma média de idade de 62 anos (DP: +-12,48) ao diagnóstico (mediana: 63 / R: 29-86 anos). A média de tempo de acompanhamento (*follow-up*) foi de 26 meses (DP: +- 14,04) e mediana de 28 meses (R: 0-71 meses), sendo que média do tempo de aparecimento da recorrência foi de 12 meses (DP: +-9,62 meses) e mediana de 9 meses (R: 0-37 meses) e de óbito de pacientes foi de 15 meses (DP: +- 11,88) e mediana de 12 meses (R: 0 – 40 meses).

Por outro lado, o estadiamento clínico-patológico (c-pT) inicial, o que inclui os estágios I e II, foram prevalentes em ambos os grupos, sendo em 56 pacientes inclusos neste grupo. Já em casos com estadiamento avançado, que inclui os subgrupos III e IV, foram detectados em 32 pacientes. Quanto ao tamanho tumoral, a média obtida foi de 3,31 cm entre os tumores analisados após ressecção, com uma profundidade de invasão (DOI) de 13 mm (média), mediana de 11 mm e o número de Linfonodos comprometidos (LNDs) foi de 3,77 (média), sendo que estes pacientes evoluíram para recorrência local/locorregional.

Todos os dados demográficos e critérios morfológicos tumorais descritos foram resumidos na **Tabela 2** apresentada a seguir:

Tabela 2. Análise descritiva das variáveis demográficas, os critérios morfológicos, a terapêutica realizada e o status dos pacientes após atendimento no A.C. Camargo Cancer Center no período de 2013-2017

Variáveis demográficas / Critérios morfológicos / Status do paciente	Frequência (n / valor absoluto)	Porcentagem válida %
Sexo		
Masculino	69	69%
Feminino	31	31%
Total	100	100
Idade		
< 60 anos	39	39%
= > 60 anos	61	61%
Total	100	100%
Local		
Cavidade oral	51	51%
Língua	49	49%
Total	100	100%
Tratamento realizado		
Cirurgia exclusiva	29	29%
Cirurgia + Radioterapia (RT)	25	25%
Cirurgia + Quimioterapia (QT)	2	2%
Cirurgia + RT + QT	37	37%
QT + Cirurgia	1	1%
RT + QT + Cirurgia	2	2%
RT + QT (Sem cirurgia)	3	3%
n/d *	1	1%
Total	100	100%
cpT (estadiamento clínico-patológico)		
Tis (in situ)	2	2%
T1	28	28%
T2	26	26%
T3	13	13%
T4	1	1%
T4a	16	16%
T4b	2	2%
n/d*	12	12%
Total	100	100%

Tabela 2. Continuação

Variáveis demográficas / Critérios morfológicos / Status do paciente	Frequência (n / valor absoluto)	Porcentagem válida %
Pior padrão de infiltração (PPI)		
Tipo I	4	4%
Tipo II	14	14%
Tipo III	33	33%
Tipo IV	29	29%
Tipo V	8	8%
n/d*	12	12%
Total	100	100%
Invasão perineural (IP)		
Presente em nervo < 1mm	23	23%
Presente em nervo >=1mm	8	8%
Ausente	61	61%
n/d*	8	8%
Total	100	100%
Invasão angiolinfática (IAL)		
Ausente	84	84%
Presente	5	5%
n/d*	11	11%
Total	100	100%
Margens cirúrgicas		
Livres	81	81%
Comprometidas	11	11%
n/d*	8	8%
Total	100	100%
Linfonodos (LNDs)		
Livres	41	41%
Comprometidos	39	39%
n/d*	10	10%
Total	100	100%
Extensão extracapsular (EEC)		
Ausente	17	17%
Presente	23	23%
Não se aplica (nsa)	60	60%
Total	100	100%

Infiltrado linfoide		
Fraco	33	33%
Moderado	31	31%
Forte	24	24%
n/d*	12	12%
Total	100	100%

Tabela 2. Continuação

Variáveis demográficas / Critérios morfológicos / Status do paciente	Frequência (valor absoluto)	Porcentagem válida %
Recorrência (falha clínica)		
Sim	35	35%
Não	63	63%
n/d*	2	2%
Total	100	100%
Tipo de recorrência		
Local / Locorregional	28	80%
À distância	7	20%
Total	35	100%
Óbito por câncer		
Sim	21	21%
Não	77	77%
n/d*	2	2%
Total	100	100

*, n/d informação não disponível. Para os testes estatísticos somente foram incluídos os casos com informação clínica completa.

Na

Tabela 3 observamos a análise descritiva realizada para as variáveis associadas à RT+ realizada, sendo que, dentro da nossa população de estudo, 64% dos pacientes a fizeram e 36% dos pacientes não receberam RT. Dos pacientes que foram submetidos à RT+, 29 receberam uma dose total menor ou igual a 60Gy (45,3%), e 35 pacientes receberam uma dose superior a 60Gy (54,7%). Por outro lado, no que diz respeito ao volume irradiado (campo de irradiação), uma maior porcentagem teve o leito tumoral irradiado (região remanescente após ressecção cirúrgica), e a drenagem do pescoço bilateral (46 pacientes = 71,9% da população analisada), sendo que o intervalo de tempo entre a cirurgia o início da RT+ foi mais de 60 dias depois (68,4%). Por outro lado, e referente aos pacientes que fizeram RT e que também foram submetidos à Quimioterapia adjuvante (QT+), 38 deles realizaram a QT+ (60,3%) e 25 (39,7%) pacientes não receberam.

Quanto à técnica de RT+ usada nesta população, uma maior porcentagem realizou técnicas convencionais tais como a 2D e 3D (31 pacientes = 48,4%) e a população restante foi submetida à irradiação através de IMRT (33 pacientes = 51,6%). O tempo de duração da RT+ registrado e que prevaleceu foi menor que 6 semanas (39 pacientes = 60,9%) quando comparado ao grupo que fez em um tempo maior que 6 semanas (25 pacientes = 39,1%). E referente ao número de sessões realizadas e de acordo com a dose total entregue, a maior parte da população de estudo realizou mais de 25 frações (62 pacientes = 96,9%).

Tabela 3. Análise descritiva das variáveis associadas à Radioterapia (RT) realizada nos pacientes atendidos no A.C. Camargo Cancer Center de 2013-2017

Variáveis associadas a RT adjuvante (RT+)	Frequência (n/ valor absoluto)	Porcentagem válida (%)
RT realizada		
Fizeram	64	64 %
Não fizeram	36	36 %
Total	100	100%
Dose total (Gy)		
< = 60	29	45,3%
> 60	35	54,7%
Total	64	100%
Volume irradiado		
Leito tumoral	5	7,8 %
Leito tumoral + drenagem homolateral	13	20,3 %
Leito tumoral + drenagem bilateral	46	71,9 %
Total	64	100%
Intervalo de tempo da Cx. até início da RT		
< = 60 dias	18	28,1 %
> 60 dias	39	60,9 %
n/d*	7	11 %
Total	64	100 %

Tabela 3. Continuação

Variáveis associadas a RT adjuvante	Frequência (n/ valor absoluto)	Porcentagem válida (%)
Quimioterapia (QT)		
Sim	38	59,3 %
Não	25	39,1 %
n/d*	1	1,6 %
Total	64	100 %
Finalidade da Quimioterapia (QT)		
QT adjuvante	2	5,3 %
QTccRT	35	92,1 %
n/d*	1	2,6 %
Total	38	100 %
Técnica de RT		
Não IMRT (2D, 3D)	31	48,4 %
IMRT	33	51,6 %
Total	64	100 %
Tempo de tratamento (RT)		
<= 6 semanas	39	60,9 %
> 6 semanas	25	39,1 %
Total	64	100 %
Número de frações (fx.)		
< 25	2	3,1 %
= > 25	62	96,9 %
Total	64	100 %

*, n/d informação não disponível. Para os testes estatísticos somente foram incluídos os casos com informação clínica completa.

4.2 ANÁLISE DESCRITIVA E DE CORRELAÇÃO DOS BMTS APÓS DETECÇÃO POR IHQ

Após detecção dos BmTs nas amostras histológicas dos pacientes tratados com cirurgia, a descrição qualitativa da expressão desses BmTs nos 100 pacientes selecionados é:

Na **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** e **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** observa-se a expressão da proteína E-caderina em padrão membrana em diferentes áreas da região tumoral seja na região central e na região de frente do tumor (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**). Da mesma forma o grau de expressão de fraca, moderada e forte (**¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**) foi estabelecida nos pacientes que a expressaram, sendo que foi um total de 53,5% da população analisada conforme apresenta-se na **Tabela 4.**

A **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.** apresenta a detecção no padrão nuclear da proteína Ciclina-D1 nas diferentes áreas da região tumoral (central, periférica e de frente), sendo que a proteína foi expressa em 87 pacientes (87,9%) conforme apresenta a **Tabela 4.**

Da mesma forma a análise de IHQ para detecção no padrão nuclear da presença do p53 apresenta-se na **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**, no qual observa-se uma acentuada expressão do p53 na região do núcleo central das células tumorais nos pacientes que o expressaram, sendo que 63 deles (63,7%) foram positivos a este biomarcador.

O p16 apresentou uma menor quantidade de pacientes que expressaram no padrão nuclear e citoplasmático nas células tumorais, sendo que em apenas 21 pacientes (21,2%) foi detectado o biomarcador em diferentes áreas tumorais (central e periférica), conforme se observa na **¡Error! No se encuentra el origen de la referencia.**

Finalmente a análise por IHQ do EGFR detectou o biomarcador no padrão de membrana nas células tumorais da camada basal e cuja mensuração baseou-se na perda de expressão e/ou expressão fraca (EGFR1) e expressão de moderada a forte (EGFR2) pelas células tumorais na área central do tumor conforme observa-se na **¡Error! No se encuentra**

el origen de la referencia.. Por outro lado e de forma geral, 66 % da população analisada o expressaram conforme apresentado na **Tabela 4**.

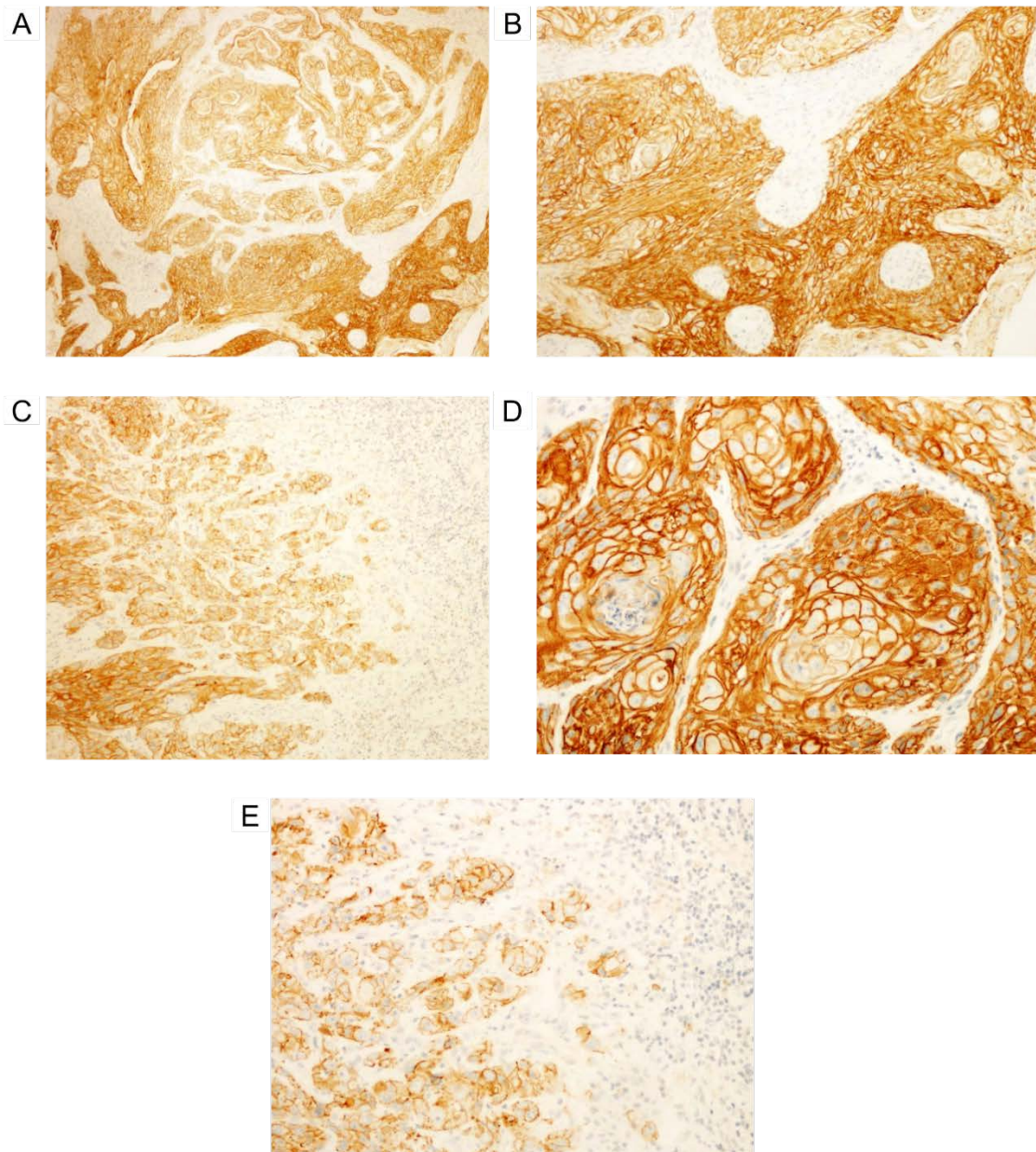


Figura 9. Análise por Imunoistoquímica (IHQ) para detecção do biomarcador tumoral E-caderina. A) Aumento de 40x que mostra a região central do tumor; B) Aumento de 100x que mostra a região central tumoral; C) Aumento de 100x que mostra a região de frente; D) Aumento de 200x que apresenta a região central do tumor; E) Aumento de 200x que apresenta a região de frente tumoral.

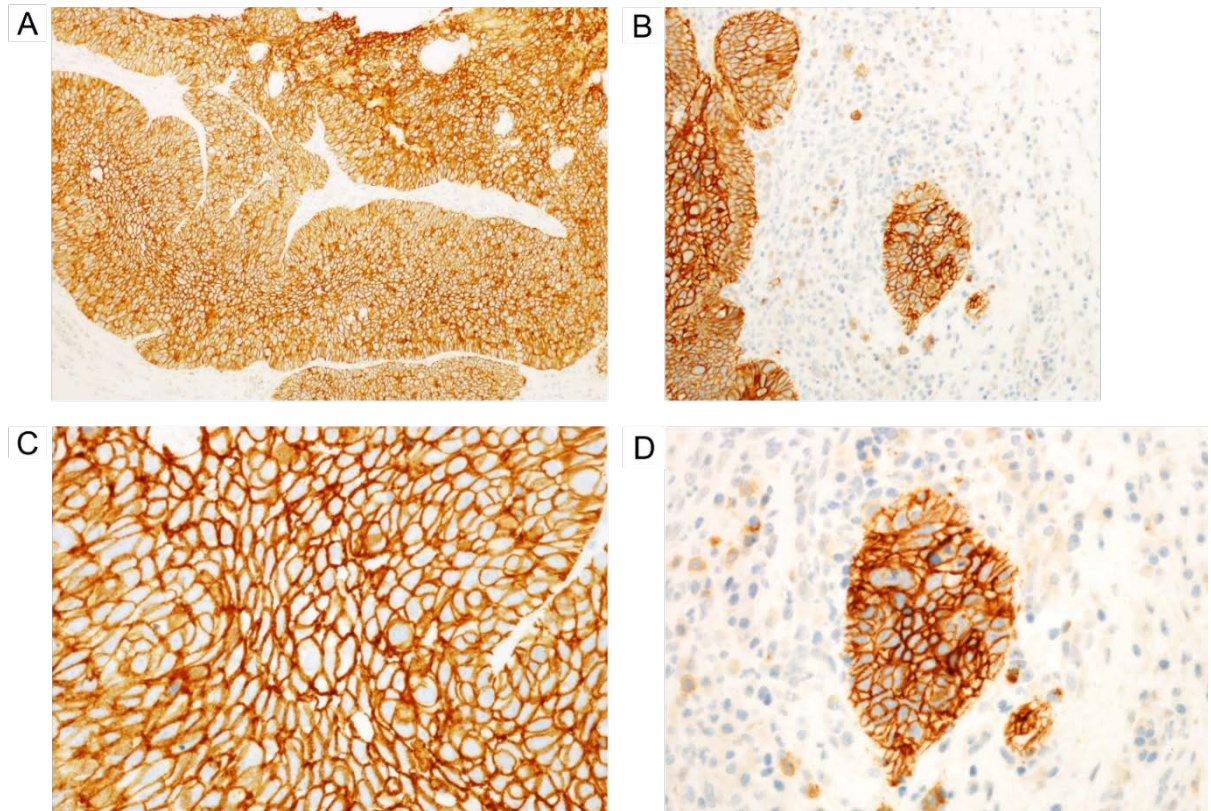


Figura 10. Análise por IHQ da E-caderina de outra amostra de paciente portador de CEC de cavidade oral. A) Expressão moderada da E-caderina no centro do tumor (100x), B) Perda parcial da expressão da E-caderina na frente de invasão tumoral (200x), C) Expressão forte da E-caderina no centro tumoral vista com um aumento da lente de 400x, D) Perda da expressão da E-caderina na região de frente de invasão das células tumorais (400x).

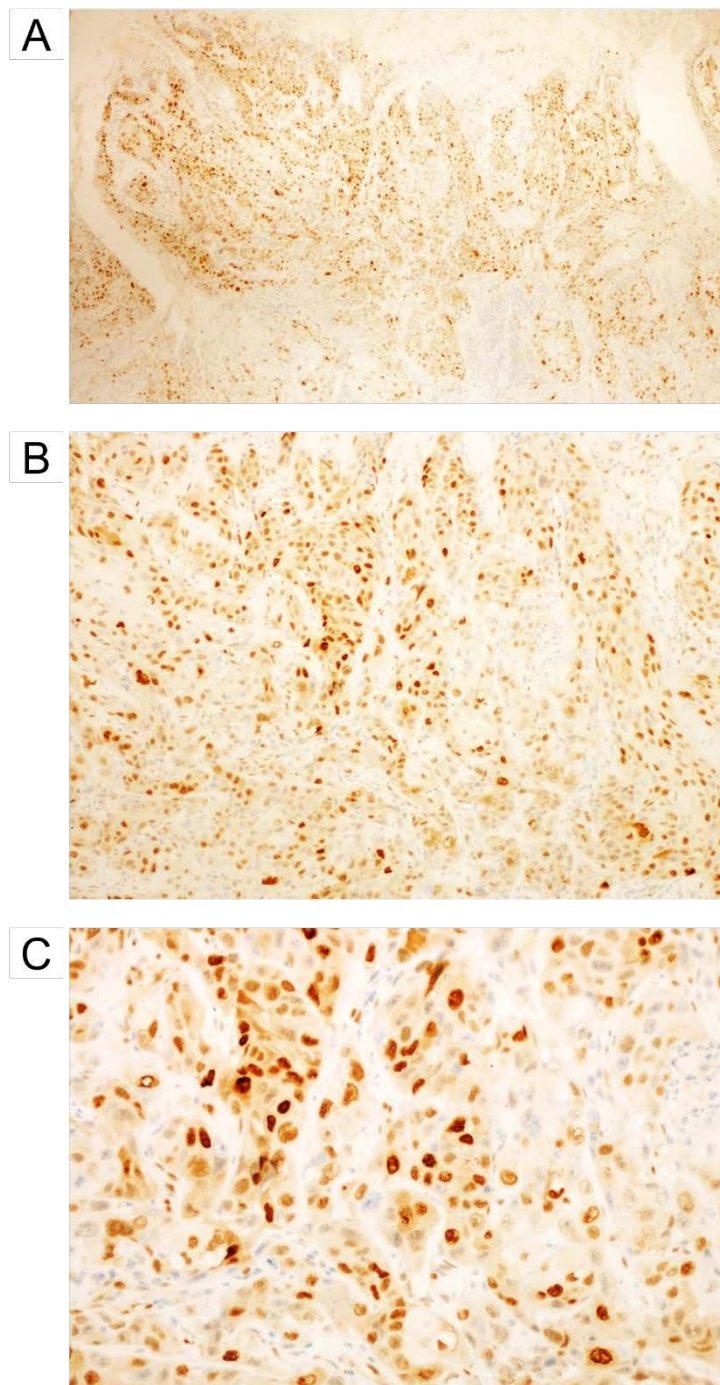


Figura 11. Análise por IHQ para detecção do biomarcador tumoral Ciclina-D1. A) Aumento de 40x que mostra a região central tumoral com expressão do BmT; B) Aumento de 100x da área central tumoral; C) Aumento de 200x que mostra uma área de maior acentuação na expressão do BmT das células tumorais na área central tumoral.

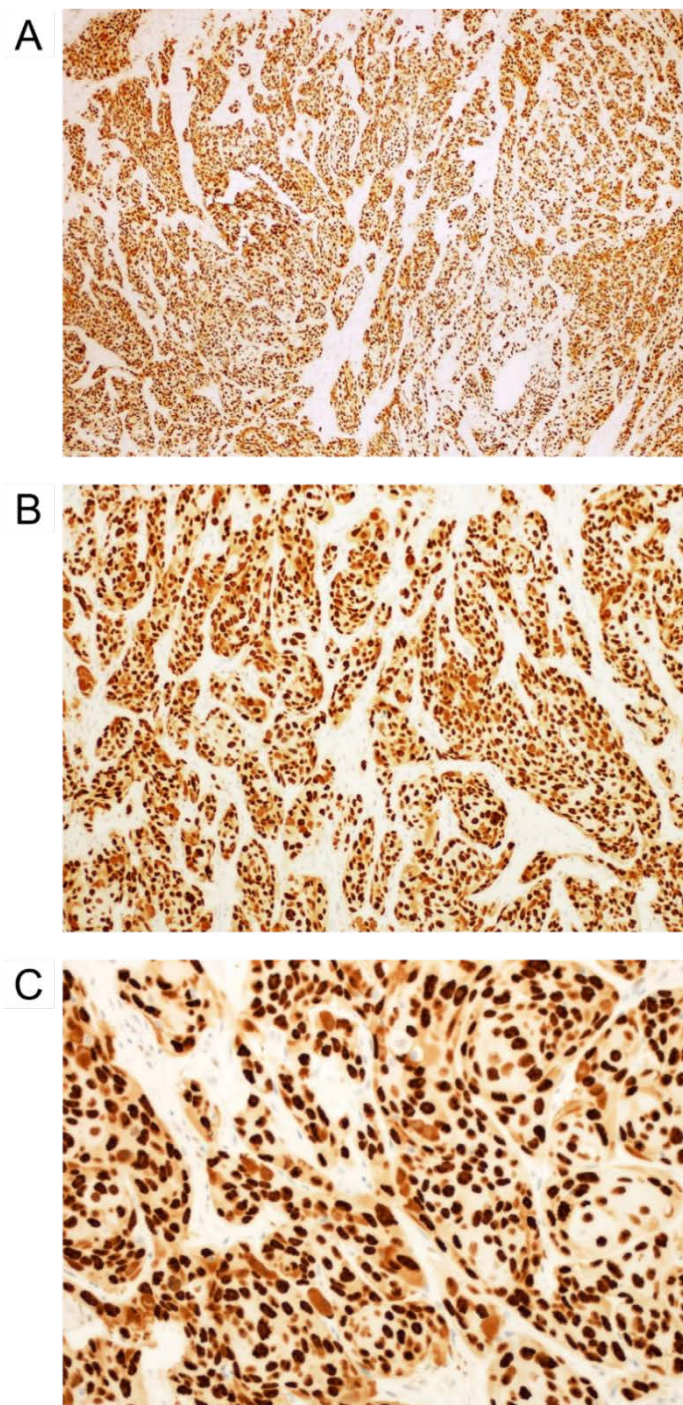


Figura 12. Análise por IHQ do biomarcador tumoral p53. A) Aumento de 10x d a células tumorais distribuídas na região central; B) Aumento de 100x na área central e C) Aumento de 200x da região central que mostras as células tumorais que expressaram o p53 de forma mais intensa na área central.

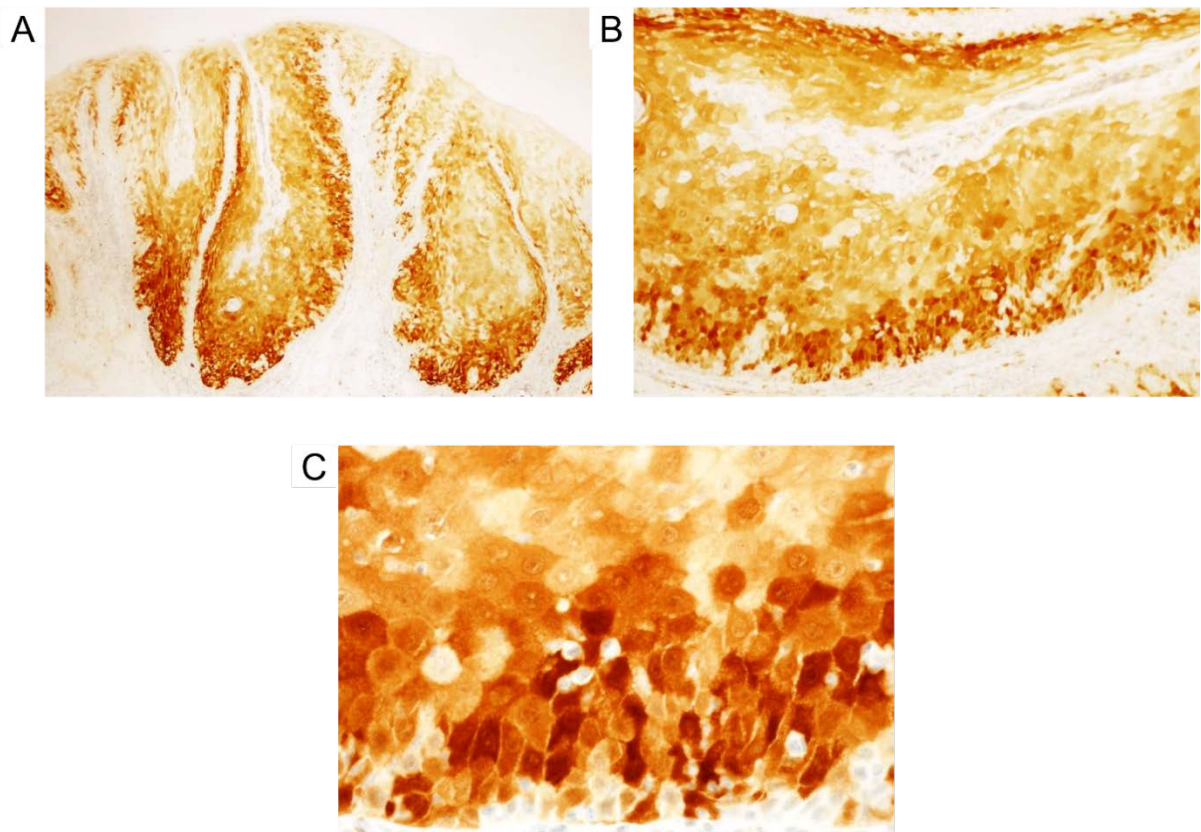


Figura 13. Análise por IHQ do biomarcador p16. A) Expressão do BmT p16 na área central do tumor pelas células tumorais (40x), B) Células tumorais provenientes de CEC de cavidade oral expressam o p16 observado a um maior aumento (100x), C) Maior aumento da lente para visualização da expressão do p16 pelas células tumorais na região central (400x).

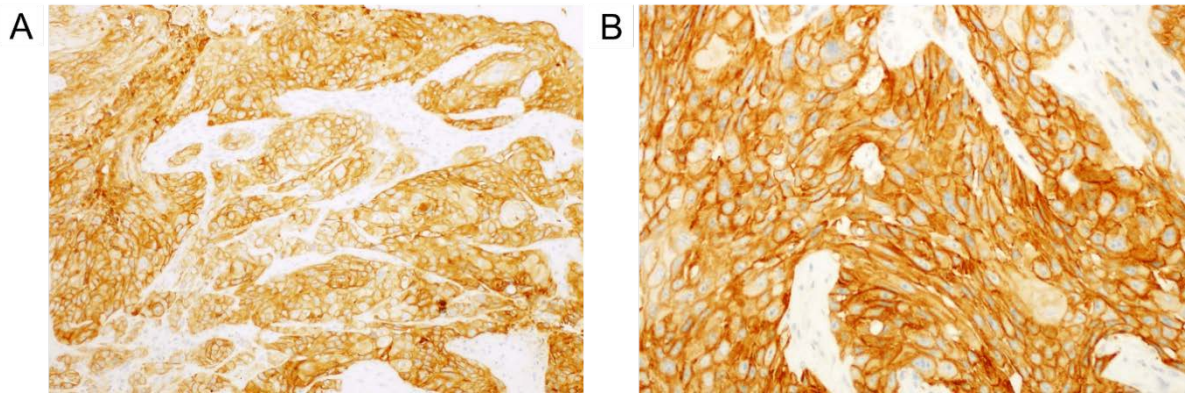


Figura 14. Análise por IHQ do biomarcador tumoral EGFR. A) Aumento de 100x que mostra a expressão de fraca a moderada do EGFR nas células tumorais da região central; B) Aumento de 200x que apresenta as células tumorais da área central que expressaram de forma forte o EGFR.

A **Tabela 4** refere-se a análise descritiva baseada na expressão dos BmTs na população de estudo, sendo que, para p16 foram registrados 21,2% pacientes que tiveram expressão positiva e 78,8% que tiveram ausência de expressão. Para o caso do EGFR, e conforme descrito anteriormente, os casos foram subdivididos em diferentes grupos, que abrange os casos com ausência de expressão (Negativo = 34%) até os que tiveram expressão positiva forte (14% dos pacientes). Sendo que, a maior porcentagem foi no grupo com expressão positiva fraca (36% dos pacientes). No caso da Ciclina D1, p53 e E-caderina houve uma grande porcentagem dos pacientes que expressaram positivamente os BmTs (87,9%, 63% e 53,5% respectivamente).

Tabela 4. Análise descritiva da expressão dos biomarcadores tumorais (BmTs)

Biomarcadores tumorais (BmTs)	Frequência (n/ Valor absoluto) *	Porcentagem válida (%)
p16		
Positivo	21	21%
Negativo	78	78%
Não realizado*	1	1%
Total	100	100
EGFR		
Fraco	36	36%
Moderado	16	16%
Forte	14	14%
Negativo	34	34%
Total	100	100%
Ciclina D1		
Positivo	87	87%
Negativo	12	12%
Não realizado*	1	1%
Total	100	100%
p53		
Positivo	63	63%
Negativo	37	37%
Total	100	100%
E-Caderina		
Positivo	53	53%
Negativo	46	46%
Não realizado*	1	1%
Total	100	100%

***, o valor total de amostras pode variar de acordo com a disponibilidade de material para a realização da técnica de imunohistoquímica**

4.3 ANÁLISE DE CORRELAÇÃO E/OU ASSOCIAÇÃO ENTRE AS VARIÁVEIS ATRAVÉS DO TESTE

QUI-QUADRADO

Na **Tabela 5** é observado os resultados referentes à estimativa da associação entre a idade dos pacientes no momento do diagnóstico (em anos) e os critérios morfológicos associados ao tumor, tais como estadiamento clínico-patológico, tamanho tumoral, pior padrão de infiltração, invasão angiolinfática, invasão perineural, linfonodos (LNDs) comprometidos, infiltrado linfoide, margens cirúrgicas pós-resssecção e a extensão extracapsular (EEC). Todos esses resultados foram relacionados e visto se havia associação à recidiva local/locorregional e metástase à distância. No entanto, não foi encontrada nenhuma associação estatisticamente significativa ($p \leq 0,05$) entre a idade e os critérios morfológicos, como pode ser visto a seguir:

Tabela 5. Análise da associação entre a idade (em anos) dos pacientes ao diagnóstico de câncer oral e os critérios morfológicos tumorais

Idade / Critérios morfológicos	< 60 anos	= > 60 anos
Tamanho tumoral		
< = 4 cm	25	41
> 4 cm	10	11
Total	35	52
Omissos (n/d) *	13	**
p valor (Qui-quadrado)	0,591	
Estadiamento clínico-patológico agrupado (cpT)		
is, I, II	20	36
III, IV (a,b)	16	16
Total	36	52
Omissos (n/d) *	12	**
p valor (Qui-quadrado)	0,278	
Invasão angiolinfática		
Presente	1	4
Ausente	33	51
Total	34	55
Omissos (n/d) *	11	**
p valor (Qui-quadrado)	0,645	
Invasão perineural		
Presente	11	20
Ausente	24	37
Total	35	57
Omissos(n/d) *	8	**
p valor (Qui-quadrado)	0,894	
Infiltrado Linfoide		
Fraco	10	23
Moderado	15	16
Forte	8	16
Total	33	55
Omissos (n/d) *	12	**
p valor (Qui-quadrado)	0,290	

Tabela 5. Continuação

Idade / Critérios morfológicos	< 60 anos	= > 60 anos
Linfonodos (LNDs)		
Comprometidos	18	21
Livres	15	26
Total	33	47
Omissos (n/d) *	20	**
p valor (Qui-quadrado)	0,521	
Número de linfonodos comprometidos		
< 3	12	9
> = 3	6	12
Total	18	21
p valor (Qui-quadrado)	0,244	
Extensão extracapsular (EEC)		
Presente	9	14
Ausente	10	7
Total	19	21
Omissos (n/d) *	1	**
p valor (Qui-quadrado)	0,361	
Margens cirúrgicas		
Comprometidas	3	8
Livres	32	49
Total	35	57
Omissos (n/d) *	8	**
p valor (Qui-quadrado)	0,523	
Pior padrão de infiltração (PPI-1)		
Tipo 1, 2, 3 (favorável)	20	31
Tipo 4 e 5 (desfavorável)	13	24
Total	33	55
Omissos (n/d) *	12	**
p valor (Qui-quadrado)	0,867	
Pior padrão de infiltração (PPI-2)		
Tipo 1 e 2 (favorável)	7	11
Tipo 3, 4 e 5 (desfavorável)	26	44

Total	33	55
Omissos (n/d) *	12	**
p valor (Qui-quadrado)	1,000	

*, ** n/d informação não disponível. Para os testes estatísticos somente foram incluídos os casos com informação clínica completa.

Na **Tabela 6** estão descritos os resultados obtidos a partir da análise de independência entre a idade (em anos) dos pacientes analisados e as variáveis associadas à Radioterapia realizada no tratamento multimodal. As variáveis contempladas abrangem: a dose total entregue (em Gy), do número de sessões executadas (frações) do campo de irradiação (volume), da técnica de RT empregada, da duração do tratamento, do intervalo entre a ressecção cirúrgica e o início da RT e da aplicação da Quimioterapia (QT) em concomitância à RT.

Tabela 6. Análise da associação da idade (em anos) dos pacientes ao diagnóstico de câncer e oral e a Radioterapia adjuvante (RT+)

Idade / RT+	< 60 anos (n)	= > 60 anos (n)
RT no tumor primário		
Fez	32(82,1%)	32(52,5%)
Não fez	7(17,9%)	29(47,5%)
Total	39(100%)	61(100%)
p valor (Qui-quadrado)	0,005	
Dose total (Gy)		
< = 60	13(40,6%)	16(50,0%)
> 60	19(59,4%)	16(50,0%)
Total	32(100%)	32(100%)
p valor (Qui-quadrado)	0,616	
Número de frações (fx.)		
< 25 fx.	0 (0%)	2 (6.3%)
>= 25fx.	32(100%)	30(93,8%)
Total	32(100%)	32(100%)
p valor (Qui-quadrado)	0,492	
Técnica de RT+		
IMRT	18(56,3%)	15(46,9%)
Não IMRT (2D, 3D)	14(43,8%)	17(53,1%)
Total	32(100%)	32(100%)
p valor (Qui-quadrado)	0,617	

Tabela 6. Continuação

Idade / RT+	< 60 anos (n)	= > 60 anos (n)
Volume irradiado		4(12,5%)
Leito tumoral	1(3,1%)	23(71,9%)
Leito tumoral + drenagem homolateral	8(25,0%)	5(15,6%)
Leito tumoral + drenagem bilateral	23(71,9%)	32(100%)
Total	32(100%)	
p valor (Qui-quadrado-Fisher)	0,351	
Intervalo entre a Cirurgia (Cx.) e a RT+		
<= 60 dias	12(40,0%)	6(22,2%)
> 60 dias	18(60,0%)	21(77,8%)
Total	30(100%)	27(100%)
p valor (Chi-quadrado)	0,248	
Tempo de tratamento (RT+)		
< = 6 semanas	19(59,4%)	20(62,5%)
> 6 semanas	13(40,6%)	12(37,5%)
Total	32(100%)	32(100%)
p valor (Qui-quadrado)	1,000	
Quimioterapia adjuvante (QT)		
Sim	20 (62,5%)	18(58,1%)
Não	12(37,5%)	13(41,9%)
Total	32(100%)	31(100%)
p valor (Chi-quadrado)	0,919	
Finalidade da Quimioterapia (QT)		
QT + (adjuvante isolada)	0(0%)	2(11,8%)
QT cc RT (concomitância)	20(100%)	15(88,2%)
Total	20(100%)	17(100%)
p valor (Qui-quadrado)	0,204	

***, ** n/d informação não disponível. Para os testes estatísticos somente foram incluídos os casos com informação clínica completa.**

Ainda na **Tabela 6**, vemos que houve também uma associação estatisticamente significativa entre a idade e o fato de ter-se realizado a Radioterapia adjuvante (RT+) na abordagem multimodal (valor de $p=0,005$), sendo que a maior porcentagem foi registrada no subgrupo com idade menor a 60 anos (82,1%) e que fizeram RT+ comparada com os que não fizeram (47,5%).

Na **Tabela 7** é observada a análise através do teste de independência (Qui-quadrado) entre o sexo e a RT+ realizada, mas não foi vista nenhuma associação estatisticamente significativa entre ambas as variáveis para esta população de estudo.

Tabela 7. Análise da associação entre o sexo (gênero) dos pacientes portadores de CEC de cavidade oral e tratados através da Radioterapia adjuvante (RT+)

Sexo/ Radioterapia adjuvante (RT+)	Masculino n (/%)	Feminino n (%)
RT no tumor primário		
Fez	47(68,1%)	17(54,8%)
Não fez	22(31,9%)	14(45,2%)
Total	69(100%)	31(100%)
p valor (Qui-quadrado)	0,292	
Dose total (Gy)		
< = 60Gy	19 (40,4%)	10(58,8%)
> 60Gy	28(59,6%)	7(41,2%)
Total	47(100%)	17(100%)
p valor (Qui-quadrado)	0,307	
Número de frações (fx.)		
<25fx.	1(2,1%)	1(2,1%)
>=25fx.	46(97,9%)	16(94,1%)
Total	47(100%)	17(100%)
p valor (Qui-quadrado)	0,464	
Técnica de RT+		
IMRT	25(53,2%)	8(47,1%)
Não IMRT	22(46,8%)	9(52,9%)
Total	47(100%)	17(100%)
p valor (Qui-quadrado)	0,880	
Volume irradiado		
Leito tumoral	3(6,4%)	2(11,8%)
Leito tumoral + drenagem homolateral	11(23,4%)	2(11,8%)
Leito tumoral + drenagem bilateral	33(70,2%)	13(76,5%)
Total	47(100%)	17(100%)
p valor (Qui-quadrado)	0,514	

Tabela 7. Continuação

Sexo/ Radioterapia adjuvante (RT+)	Masculino	Feminino
	n (%)	n (%)
Volume irradiado		
Leito tumoral	3(6,4%)	2(11,8%)
Leito tumoral + drenagem homolateral	11(23,4%)	2(11,8%)
Leito tumoral + drenagem bilateral	33(70,2%)	13(76,5%)
Total	47(100%)	17(100%)
p valor (Qui-quadrado)	0,514	
Intervalo entre a Cx. E a RT+		
<= 60 dias	13(31%)	5(33,3%)
> 60 dias	29(69%)	10(66,7%)
Total	42(100%)	15(100%)
p valor (Qui-quadrado)	1,000	
Tempo de tratamento (RT+)		
<= 6 semanas	27(57,4%)	12(70,6%)
> 6 semanas	20(42,6%)	5(29,4%)
Total	47(100%)	17(100%)
p valor (Qui-quadrado)	0,508	
Quimioterapia adjuvante (QT)		
Sim	30(63,8%)	8(50,0%)
Não	17(36,2%)	8(50,0%)
Total	47(100%)	16(100%)
p valor (Qui-quadrado)	0,496	
Finalidade da QT		
QT adjuvante isolada	2(6,7%)	0(0,0%)
QTccRT	28(93,3%)	7(100%)
Total	30(100%)	7(100%)
p valor (Qui-quadrado)	1,000	

Na **Tabela 8** vemos os dados referentes à análise de associação entre o local do tumor primário e os critérios morfológicos tumorais, mas não foram observadas associações estatisticamente significantes.

Tabela 8. Análise de associação entre o local do tumor primário e os critérios morfológicos tumorais

Critérios morfológicos / Local do tumor primário	Cavidade oral (assoalho bucal) (n)	Língua (n)
Tamanho tumoral (cm)		
< = 4 cm	36	30
> 4 cm	9	12
Total	45	42
Omissos (n/d) *	13	**
p valor (Qui-quadrado)	0,495	
Estadiamento clínico-patológico (cpT)		
Is/I/II	27	29
III/IV (a,b)	17	15
Total	44	44
Omissos (n/d) *	12	
p valor (Qui-quadrado)	0,825	
Infiltrado linfoide		
Fraco	18	15
Moderado	14	17
Forte	12	12
Total	44	44
Omissos (n/d) *	12	**
p valor (Qui-quadrado)	0,755	
Linfonodos		
Comprometidos	21	18
Livres	20	21
Total	41	39
Omissos (n/d) *	20	**
p valor (Qui-quadrado)	0,819	
Número de linfonodos (LNDs) acometidos		
< 3	9	12
> = 3	12	6
Total	21	18
p valor (Qui-quadrado)	0,244	

Invasão angiolinfática		
Presente	3	2
Ausente	44	40
Total	47	42
Omissos (n/d) *	11	
p valor (Qui-quadrado)	1,000	

Tabela 8. Continuação

Crítérios morfológicos / Local do tumor primário	Cavidade oral (assoalho bucal) (n)	Língua (n)
Invasão perineural (IP)		
Presente	18	13
Ausente	31	30
Total	49	43
Omissos (n/d) *	8	**
p valor (Qui-quadrado)	0,662	
Margens cirúrgicas		
Comprometidas	8	3
Livres	40	41
Total	48	44
Omissos (n/d) *	8	**
p valor (Qui-quadrado)	0,257	
Extensão extracapsular (EEC)		
Presente	14	9
Ausente	8	9
Total	22	18
p valor (Qui-quadrado)	0,585	
Pior padrão de infiltração (PPI)		
Tipo I, II e III (favorável)	25	26
Tipo IV, V (desfavorável)	19	18
Total	44	44
Omissos (n/d) *	12	**
p valor (Qui-quadrado)	1,000	

Pior padrão de infiltração (PPI)		
Tipo I, II (favorável)	8	10
Tipo III, IV, V (desfavorável)	36	34
Total	44	44
Omissos (n/d) *	12	**
p valor (Qui-quadrado)	0,792	

*, ** n/d informação não disponível. Para os testes estatísticos somente foram incluídos os casos com informação clínica completa.

A **Tabela 9** apresenta a análise de associação e independência realizada através do teste Qui-quadrado e exata de Fisher, entre os dados demográficos dos pacientes e a expressão dos cinco (05) BmTs analisados, além da terapêutica realizada de forma uni e/ou multimodal, sendo que o valor estatisticamente significativo considerado foi de $p \leq 0.05$:

Tabela 9. Análise da associação entre Dados demográficos, da topografia do tumor primário e da terapêutica versus os BmTs analisados dos pacientes atendidos no A.C. Camargo Cancer Center durante 2013-2017

Dados demográficos/Biomarcadores (BmTs)	p16+	p16-	p53+	p53-	Ecad+	Ecad-	CiclinaD1+	CiclinaD1-	EGFR I	EGFR II
Sexo										
Masculino	15	53	50	19	38	30	60	8	47	22
Feminino	6	25	13	18	15	16	27	4	23	8
Total	21	78	63	37	53	46	87	12	70	30
p valor (Chi-quadrado)	0,968	0,968	0,007	0,007	0,634	0,634	1,000	1,000	0,706	0,706
Idade										
< 60 anos	9	30	25	14	22	16	32	6	30	9
> = 60 anos	48	12	38	23	31	30	55	6	40	21
Total	57	42	61	37	53	46	87	12	70	30
p valor (Chi-quadrado)	0,909	0,909	1,000	1,000	0,632	0,632	0,528	0,528	0,325	0,325
Topografia (local)										
Cavidade oral (assoalho bucal)	7	44	30	21	23	27	44	6	35	16
Língua	14	34	33	16	30	19	43	6	35	14
Total	2	78	63	47	53	46	87	12	70	30
p valor (Chi-quadrado)	0,103	0,103	0,499	0,499	0,188	0,188	1,000	1,000	0,930	0,930
Tabagismo / Etilismo										
Tabagismo (+) / Etilismo (+)	7	39	33	14	27	20	42	5	35	12
Tabagismo (+) / Etilismo (-)	5	7	9	3	6	6	9	3	7	5
Tabagismo (-) / Etilismo (+)	3	6	6	3	4	4	7	1	6	3
Tabagismo (-) / Etilismo (-)	5	23	11	17	14	14	25	3	18	10
Total	20	75	59	37	51	44	83	12	66	30
p valor (Chi-quadrado)	0,158	0,158	0,041	0,041	0,889	0,889	0,553	0,553	0,632	0,632
Tratamento do tumor primário										
Cirurgia exclusiva	7	21	19	10	17	12	24	5	19	10
Cirurgia + 1 adjuvância	4	24	17	11	15	13	25	3	21	7
Cirurgia + 2 adjuvâncias	8	31	23	16	19	20	35	4	27	12
Sem cirurgia	1	2	3	0	1	1	2	0	3	0
Total	20	78	62	37	52	46	86	12	70	29
p valor (Chi-quadrado)	0,592	0,592	0,668	0,668	0,865	0,865	0,795	0,795	0,738	0,738

Legenda: p16 +: positivo / p16-: negativo / p53+: positivo / p53-:negativo / E-caderina +: positivo / E-caderina: negativo Ciclina D1+: positivo / Ciclina D1-: negativo / EGFR I (não expressou / fraco) / EGFR II (moderado / forte)

Na **Tabela 9** também se observa a associação significativa entre o sexo e a expressão do BmT p53 ($p = 0,007$), sendo os pacientes do gênero masculino que demonstraram uma maior porcentagem de expressão (50 pacientes = 79,4%) quando comparado às mulheres (13 pacientes = 20,6%). Foi visto também que houve uma associação estatisticamente significativa ($p = 0,041$) entre o positivo de BmT p53 e o tabagismo/etilismo. Nos subgrupos analisados foi verificado que um maior percentual dos pacientes que não fumam e não consomem álcool (60,7%) não apresentaram a expressão da proteína p53 na amostra do tumor quando comparado com os que expressaram a proteína (39,3%).

Na **Tabela 10** foram registrados os resultados referentes à associação entre os critérios morfológicos tumorais e os BmTs analisados, sendo assim, vemos que a expressão do BmT E-caderina esteve correlacionado com a presença de infiltrado linfoide, principalmente com grau de expressão moderada nas amostras analisadas (22 casos = 47.8%), e com resultado estatisticamente significativo ($p= 0,031$). Da mesma forma, se registrou a associação estatisticamente significante entre a expressão da E-caderina e a invasão perineural ($p= 0,027$),

Na **Tabela 11** vemos os resultados das análises de Qui-quadrado para verificar a associação entre a expressão dos BmTs e as variáveis da RT+ realizada nos pacientes tratados. Destaca-se que a RT+ foi aplicada de acordo com o estadiamento clínico-patológico dos pacientes após ressecção cirúrgica, ou seja, foram observados os fatores prognósticos que poderiam ser associados à recorrência, tais como: estágio clínico avançado (III-IV), margens cirúrgicas comprometidas, mais de três linfonodos comprometidos, invasão perineural, extensão extracapsular e o tipo de pior padrão de infiltração.

Tabela 10. Análise da associação entre os critérios morfológicos tumorais vs. os BmTs analisados nos pacientes atendidos no A.C. Camargo Cancer Center no período de 2013-2017

Critérios morfológicos / BmTs	p16 +	p16-	p53+	p53-	Ecad+	Ecad-	CiclinaD1+	CiclinaD1-	EGFR1	EGFR2
pT										
T1	5	23	17	11	19	9	23	5	21	7
T2	6	19	17	9	12	14	22	4	17	9
T3	2	11	8	5	5	8	13	0	10	3
T4	0	1	1	0	0	1	1	0	1	0
T4a	4	12	11	5	7	8	13	2	11	5
T4b	1	1	1	1	0	2	2	0	2	0
Is (in situ)	1	1	2	0	2	0	2	0	1	1
Total	19	68	57	31	45	42	76	11	63	25
p valor (Qui-quadrado)	0.691	0.691	0.972	0.972	0.137	0.137	0.758	0.758	0.907	0.907
Infiltrado linfoide										
Fraco	6	27	23	10	13	20	31	2	24	9
Moderado	7	23	18	13	22	9	24	7	21	10
Forte	3	21	15	9	11	13	22	2	15	9
Total	16	71	56	32	46	42	77	11	60	28
p valor (Qui-quadrado)	0.593	0.593	0.621	0.621	0.031	0.031	0.159	0.159	0.714	0.714
Pior padrão de infiltração										
Tipo 1	0	4	3	1	2	2	4	0	2	2
Tipo2	5	9	9	5	10	4	12	2	10	4
Tipo 3	4	29	18	15	17	16	28	5	25	8
Tipo4	7	21	21	8	14	15	26	3	17	12
Tipo 5	0	8	5	3	3	5	7	1	6	2
Total	16	71	56	32	46	42	77	11	60	28
p valor (Qui-quadrado)	0.158	0.158	0.697	0.697	0.568	0.568	0.978	0.978	0.557	0.557
Linfonodos										
Comprometidos	5	34	23	16	19	20	36	3	24	15
Livres	10	30	26	15	21	20	35	6	31	10
Total	15	64	49	31	40	40	71	9	55	25
p valor (Qui-quadrado)	0.274	0.274	0.859	0.859	1.000	1.000	0.483	0.483	0.264	0.264

Tabela 10. Continuação

Crítérios morfológicos / BmTs pT	p16 +	p16-	p53+	p53-	Ecad+	Ecad-	CiclinaD1+	CiclinaD1-	EGFR1	EGFR2
Margens cirúrgicas										
Comprometida	2	9	5	6	4	7	10	1	7	4
Livres	14	66	54	27	44	37	71	10	59	22
Total	16	75	59	33	48	44	81	11	66	26
p valor (Qui-quadrado)	1.000	1.000	0.193	0.193	0.425	0.425	1.000	1.000	0.498	0.498
Invasão perineural										
Ausente	15	46	37	24	36	25	53	8	47	14
Presente	3	28	21	10	10	21	28	3	20	11
Total	18	74	58	34	46	46	81	11	67	25
p valor (Qui-quadrado)	0.154	0.154	0.662	0.662	0.027	0.027	0.745	0.745	0.303	0.303
Extensão extracapsular										
Presente	3	20	15	8	9	14	22	1	14	9
Ausente	2	15	8	9	11	6	14	3	11	6
Total	5	35	23	17	20	20	36	4	25	15
p valor (Qui-quadrado)	1.000	1.000	0.409	0.409	0.201	0.201	0.294	0.294	1.000	1.000

Legenda: p16 +: positivo / p16-: negativo / p53+: positivo / p53-:negativo / E-caderina +: positivo / E-caderina: negativo / Ciclina D1+: positivo / Ciclina D1-: negativo / EGFR1 (não expressou / fraco) / EGFR2 (moderado / forte)

Tabela 11. Análise da associação entre a Radioterapia adjuvante (RT+) versus os BmTs analisados nos pacientes atendidos no A.C. Camargo Cancer Center no período de 2013-2017

RT+/BmTs	p16+	p16-	p53+	p53-	Ecad+	Ecad-	CiclinaD1+	CiclinaD1-	EGFR1	EGFR2
RT no tumor primário										
Fez	10	54	39	25	30	33	57	6	48	16
Não Fez	11	24	24	12	23	13	30	6	22	14
Total	21	78	63	37	53	46	87	12	70	30
p valor (Qui-quadrado)	0.114	0.114	0.723	0.723	0.176	0.176	0.345	0.345	0.220	0.220
Dose										
<= 60Gy	4	25	20	9	11	18	28	1	24	5
> 60Gy	6	29	19	16	19	15	29	5	24	11
Total	10	54	39	25	30	33	57	6	48	16
p valor (Qui-quadrado)	1.000	1.000	0.347	0.347	0.242	0.242	0.205	0.205	0.310	0.310
Volume irradiado										
Leito tumoral	0	5	4	1	2	3	5	0	5	0
Leito tumoral + drenagem homolateral	3	10	11	2	6	7	11	2	12	1
Leito tumoral + drenagem linfonodal bilateral	7	39	24	22	22	23	41	4	31	15
Total	10	54	39	25	30	32	57	6	48	16
p valor (Qui-quadrado)	0.616	0.616	0.062	0.062	1.000	1.000	0.766	0.766	0.081	0.081
Intervalo de Tempo Cirurgia – RT										
<= 60 dias	2	16	12	6	9	8	13	4	12	6
> 60 dias	6	33	22	17	19	20	37	2	31	8
Total	8	49	34	23	28	28	50	6	43	14
p valor (Qui-quadrado)	1.000	1.000	0.658	0.658	1.000	1.000	0.062	0.062	0.333	0.333

Tabela 11. Continuação

RT+/BmTs	p16+	p16-	p53+	p53-	Ecad+	Ecad-	CiclinaD1+	CiclinaD1-	EGFR1	EGFR2
Técnica de RT										
IMRT	6	27	19	14	14	18	28	4	27	6
Outras técnicas (não IMRT)	4	27	20	11	16	15	29	2	21	10
Total	10	54	39	25	30	33	57	6	48	16
p valor (Qui-quadrado)	0.734	0.734	0.755	0.755	0.710	0.710	0.672	0.672	0.312	0.312
Tempo de tratamento										
<= 6 semanas	7	32	23	16	20	18	36	2	27	12
> 6 semanas	3	22	16	10	10	15	21	4	21	4
Total	10	54	39	25	30	33	57	6	48	16
p valor (Qui-quadrado)	0.728	0.728	0.889	0.889	0.469	0.469	0.204	0.204	0.300	0.300
Quimioterapia (QT)										
Sim	8	30	24	14	19	18	33	4	25	13
Não	2	23	14	11	11	14	23	2	22	3
Total	10	53	38	25	30	32	56	6	47	16
p valor (Qui-quadrado)	0.291	0.291	0.760	0.760	0.757	0.757	1.000	1.000	0.092	0.092
Finalidade da Quimioterapia (QT)										
QT+ adjuvante (isolada)	0	2	2	0	1	1	2	0	2	0
QTccRT	8	27	21	14	17	17	30	4	22	13
Total	8	29	23	14	18	18	32	4	24	13
p valor (Qui-quadrado)	1.000	1.000	0.517	0.517	1.000	1.000	1.000	1.000	0.532	0.532

Legenda: p16 +: positivo / p16-: negativo / p53+: positivo / p53-:negativo / E-caderina +: positivo / E-caderina: negativo / Ciclina D1+: positivo / Ciclina D1-: negativo / EGFR1 (não expressou / fraco) / EGFR2 (moderado / forte)

Da mesma forma, foi encontrado na **Tabela 11** um valor de p marginal ($p: 0,062$) na análise da associação entre o intervalo de tempo da Cx. realizada e o início da RT+ e a detecção da Ciclina-D1. Após análise dos subgrupos observamos que os pacientes que iniciaram a RT+ em um período superior a 60 dias após cirurgia apresentaram maior porcentagem (37 pacientes = 74%) de Ciclina-D1+ do que os que tiveram ausência de expressão (02 pacientes = 33,3%). Finalmente, foram detectados valores marginais de p para a associação entre o volume irradiado e os BmTs p53 e EGFR ($p: 0,062; 0,081$ respectivamente).

A **Tabela 12** apresenta a avaliação da associação entre os critérios morfológicos tumorais analisados e a Radioterapia adjuvante (RT+) realizada na população de estudo. Dentro desses resultados vemos que houve uma associação estatisticamente significativa ($p= 0,057$) entre o estadiamento clínico-patológico e a realização ou não de RT pelos pacientes, sendo que a maior porcentagem dos pacientes que fizeram RT apresentou um estadiamento clínico-patológico inicial (55,4%), dos que tiveram um estadiamento avançado (44,6%). Da mesma forma, foi encontrada uma associação estatisticamente significativa (valor de $p: 0,03$) entre a presença de invasão angiolinfática (IA) e o volume irradiado (VI) na RT+, sendo que a maior porcentagem de pacientes que irradiou o leito tumoral e drenagem de ambos os lados do pescoço NÃO mostraram IA (38 pacientes = 95%) quando comparados aos que a apresentaram (2 pacientes = 5%). Por outro lado, no caso da invasão perineural (IP) e a dose total entregue na RT, houve uma associação estatisticamente significativa ($p: 0,04$), visto que os pacientes que apresentaram IP após cirurgia (17 pacientes) receberam uma dose superior a 60Gy (54,8%) quando comparados aos pacientes que receberam uma dose inferior ou igual a 60Gy (7 pacientes, 25%). Cabe destacar que a técnica de RT e IP também mostraram associação ($p: 0,05$), sendo que os que fizeram outras técnicas não IMRT (3D, 2D) apresentaram maior porcentagem de pacientes (16 pacientes = 55,2%) quando comparado aos que fizeram IMRT (8 pacientes = 26,7%).

Ressaltamos que a disseminação locorregional aos linfonodos (LNDs) esteve associada a pacientes que realizaram a RT+ ($p: 0,001$), sendo que a maioria dos pacientes que realizaram a RT+ tiveram os LNDs comprometidos (63%) quando comparado aos que não fizeram RT (5 pacientes = 19,2%). A dose de RT+ e o volume irradiado também estiveram

associados estaticamente ao fato dos LNDs regionais estarem comprometidos ou não pela doença (p: 0,003 e 0,055 respectivamente).

A extensão extracapsular (EEC) do linfonodo e o fato dos pacientes realizarem quimioterapia adjuvante (QT+) também apresentaram associação estatisticamente significativa (p: 0,020), observamos também que a maioria dos pacientes que apresentaram ECC (16 pacientes = 72,7%) realizaram QT+ quando comparados ao grupo que não realizou (3 pacientes = 25%). No caso do pior padrão de infiltração (PPI) do tumor, a análise estatística mostrou associação significativa (p: 0,014) com o fato dos pacientes terem indicação de RT+, já que a maioria deles que apresentou após AP os tipos 3, 4 e 5 de PPI (48 pacientes = 88,9%) realizou RT+ quando comparado a quem não fez (22 pacientes = 64,7%) e os que apresentaram um PPI do tipo I e II (6 pacientes = 11,1%).

Por fim, o tamanho tumoral inicial e a técnica de RT+ realizada mostraram uma associação estatisticamente significante (p: 0,032), sendo que a maioria dos pacientes que apresentaram o tamanho do tumor menor ou igual a 4 cm realizaram a técnica de IMRT (25 pacientes = 86,2%) comparado aos que realizaram outras técnicas (16 pacientes = 57,1%), e dos pacientes que apresentaram um tamanho tumoral superior a 4 cm e que fizeram IMRT (4 pacientes = 13,8%). No que diz respeito ao VI, cabe destacar que a maioria dos pacientes que irradiaram o leito tumoral e a drenagem bilateral do pescoço (29 pacientes = 72,5%) tiveram um tumor menor ou igual a 4cm, sendo que os que apresentaram maior tamanho (superior a 4cm) foram em menor quantidade (11 pacientes = 27,5%) que irradiaram leito e drenagem bilateral.

A maioria dos pacientes tratados realizaram a QT+ concomitante à RT+ (30 pacientes) a partir dos critérios morfológicos descritos, sendo que somente dois pacientes iniciaram como QT neoadjuvante e posteriormente associada à RT. Por outro lado, destacamos que com mais de um critério morfológico após AP foram indicados de tratamento adjuvante para o controle local, locorregional e evitar presença de metástase a distância da doença. A RT+ na população de estudo foi realizada na maioria dos pacientes após 60 dias da ressecção cirúrgica, e não foram observadas diferenças estatisticamente significativas com o grupo que fez antes de 60 dias.

Tabela 12. Análise da associação entre a Radioterapia adjuvante (RT+) versus os Critérios morfológicos tumorais analisados nos pacientes portadores de CEC de cavidade oral e atendidos no A.C. Camargo Cancer Center no período de 2013-2017

Critérios morfológicos tumorais / RT+	Radioterapia adjuvante (RT+)		Dose (Gy)		Volume irradiado			N° frações		Téc. RT+		QT+		Tempo de RT+	
	Fez	Não fez	<= 60Gy	> 60 Gy	Leito tumoral	Leito tumoral + drenagem homolateral	Leito tumoral + drenagem bilateral	< 25	>= 25	IMRT	Outras	Sim	Não	<= 6 sem.	> 6 sem.
Estadiamento clínico-patológico															
is/I/II	31	25	15	16	2	9	20	1	30	18	13	15	15	19	12
III/IV (a,b)	25	7	11	14	2	4	19	0	25	12	13	16	9	14	11
Total	56	32	26	30	4	13	39	1	55	30	26	31	24	33	23
p valor (Qui-quadrado)	0,057		0,954		0,546			1,000		0,630		0,442		0,899	
Infiltrado linfoide															
Forte	15	9	9	6	1	4	10	1	14	9	6	8	7	16	9
Moderado	19	12	10	9	1	5	13	0	19	9	10	9	10	15	4
Fraco	20	13	7	13	3	2	15	1	19	10	10	12	7	11	9
Total	5	3	26	28	5	11	38	3	52	28	26	29	24	32	22
p valor (Qui-quadrado)	0,989		0,304		0,613			0,734		0,749		0,615		0,064	
Invasão angiolinfática															
Ausente	53	31	24	29	2	13	38	0	53	28	25	30	23	31	22
Presente	4	1	2	2	2	0	2	1	3	1	3	2	1	3	1
Total	57	32	26	31	4	13	40	1	56	29	28	32	24	34	23
p valor (Qui-quadrado)	0,650		0,999		0,026			0,070		0,352		0,999		0,641	

Tabela 12. Continuação

Critérios morfológicos tumorais / RT+	Radioterapia adjuvante (RT+)		Dose (Gy)		Volume irradiado			N° frações		Téc. RT+		QT+		Tempo de RT+	
	Fez	Não fez	< = 60Gy	> 60	Leito tumoral	Leito tumoral + drenagem homolateral	Leito tumoral + drenagem bilateral	< 25	> = 25	IMRT	Outras	Sim	Não	< = 6	> 6
Invasão perineural															
Ausente	35	26	21	14	2	8	25	0	35	22	13	19	16	21	14
Presente	24	7	7	17	3	5	16	0	23	8	16	14	9	14	10
Total	59	33	28	31	5	13	41	1	58	30	29	33	25	35	24
p valor (Qui-quadrado)	0,096		0,039		0,761			0,407		0,050		0,823		0,999	
Linfonodos (LNDs)															
Livres	20	21	15	5	3	7	10	1	19	13	7	8	11	13	7
Comprometido	34	5	10	24	1	6	27	0	34	14	20	22	12	19	15
Total	54	26	25	29	4	13	37	1	53	27	27	30	23	32	22
p valor (Qui-quadrado)	0,001		0,003		0,055			0,370		0,159		0,193		0,710	
Número de LNDs acometidos															
< 3 LNDs	20	1	6	14	0	5	15	0	20	6	14	11	9	11	9
> = 3 LNDs	14	4	4	10	1	1	12	0	14	8	6	11	3	8	6
Total	34	5	10	24	1	6	27	0	34	14	20	22	12	19	15
p valor (Qui-quadrado)	0,162		0,999		0,186			**		0,219		0,275		0,999	

Tabela 12. Continuação

Critérios morfológicos tumorais / RT+	Radioterapia adjuvante (RT+)		Dose (Gy)		Volume irradiado			N° frações		Téc. RT+		QT+		Tempo de RT+	
	Fez	Não fez	< = 60Gy	> 60 Gy	Leito tumoral	Leito tumoral + drenagem homolateral	Leito tumoral + drenagem bilateral	< 25	> = 25	IMRT	Outras	Sim	Não	< = 6	> 6
Margens cirúrgicas															
Livres	49	32	23	26	3	11	35	0	49	27	22	28	21	28	21
Comprometidas	9	2	4	5	2	2	5	1	8	3	6	5	3	7	2
Total	58	34	27	31	5	13	40	1	57	30	28	33	24	35	23
p valor (Qui-quadrado)	0,203		0,999		0,324			0,155		0,290		0,999		0,295	
Extensão extracapsular (EEC)															
Ausente	15	2	7	8	0	4	11	0	15	4	11	6	9	9	6
Presente	19	4	3	16	1	2	16	0	19	10	9	16	3	10	9
Total	34	6	10	24	1	6	27	0	34	14	20	22	12	19	15
p valor (Qui-quadrado)	0,999		0,068		0,370			**		0,239		0,020		0,935	
Pior padrão de infiltração (PPI)															
1/2/3 (favorável)	28	23	17	11	3	4	21	1	27	18	10	15	13	18	10
4/5 (desfavorável)	26	11	9	17	2	7	17	1	25	10	16	14	11	14	12
Total	54	34	26	28	5	11	38	2	52	28	26	29	24	32	22
p valor (Qui-quadrado)	0,215		0,100		0,556			0,999		0,104		0,999		0,615	

Tabela 12. Continuação

Critérios morfológicos tumorais / RT+	Radioterapia adjuvante (RT+)		Dose (Gy)		Volume irradiado			N° frações		Téc. RT+		QT+		Tempo de RT+	
	Fez	Não fez	< = 60Gy	> 60 Gy	Leito tumoral	Leito tumoral + drenagem homolateral	Leito tumoral + drenagem bilateral	< 25	> = 25	IMRT	Outras	Sim	Não	< = 6	> 6
Pior padrão de infiltração (PPI)															
1/2 (favorável)	6	12	3	3	2	1	3	0	6	3	3	3	3	5	1
3/4/5 (desfavorável)	48	22	23	25	3	10	35	2	46	25	23	26	21	27	21
Total	54	34	26	28	5	11	38	2	52	28	26	29	24	32	22
p valor (Qui-quadrado)	0,014		0,999		0,124			0,999		0,999		0,999		0,383	
Tamanho tumoral															
< 4 cm	41	25	20	21	1	11	29	0	41	25	16	22	19	24	17
> = 4 cm	16	5	6	10	3	2	11	1	15	4	12	10	5	10	6
Total	57	30	26	31	4	13	40	1	56	29	28	32	24	34	23
p valor (Qui-quadrado)	0,359		0,637		0,073			0,281		0,032		0,571		0,999	

4.4 ANÁLISE DE SOBREVIDA GLOBAL (SG)

Para a estimativa da SG nos pacientes portadores de CEC de cavidade oral e submetidos à terapia uni ou multimodal incluídos neste estudo foi aplicado o teste de Kaplan- Meier, e os resultados encontrados são mostrados a seguir:

A **Figura 4** trata-se da curva de SG dos pacientes tratados, sendo que se observa uma leve queda da curva a partir dos 12 meses após o final do tratamento, e segundo o teste, a maioria dos pacientes (88%) estaria viva após esse período. Por outro lado, a curva mostra que a partir dos 40 meses (3 anos e 4 meses) poderia existir uma tendência à estabilização da curva.

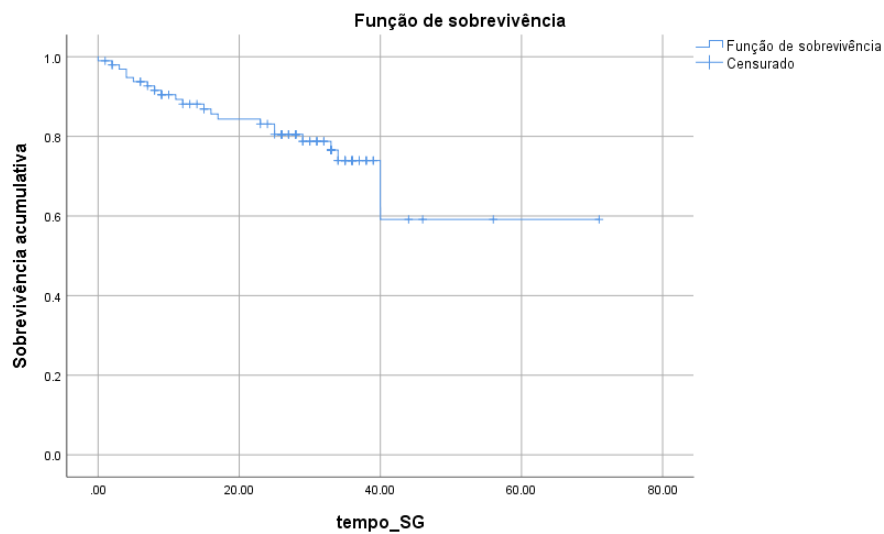


Figura 4. Curva de Sobrevida Global (SG) dos pacientes portadores de CEC de cavidade oral submetidos à terapia uni ou multimodal durante o período de 2013-2017

Na **Figura 5** observa-se a curva de SG em função do estadiamento clínico-patológico dos pacientes analisados, sendo que a mediana foi de 49 meses (R: 31-67 meses) após terapêutica para o estadiamento inicial (is/II/II) e de 40 meses (R: 33-48 meses) para o avançado. A SG atuarial aos 40 meses (ponto de estabilização das 2 curvas) foi de 80% no estadiamento inicial e para o avançado se reduz a 62%. No entanto, o valor de p após teste de Log-Rank foi de 0,06, que mostrou que não há diferenças estatisticamente significantes entre ambas as curvas; porém, sendo o valor de p marginal.

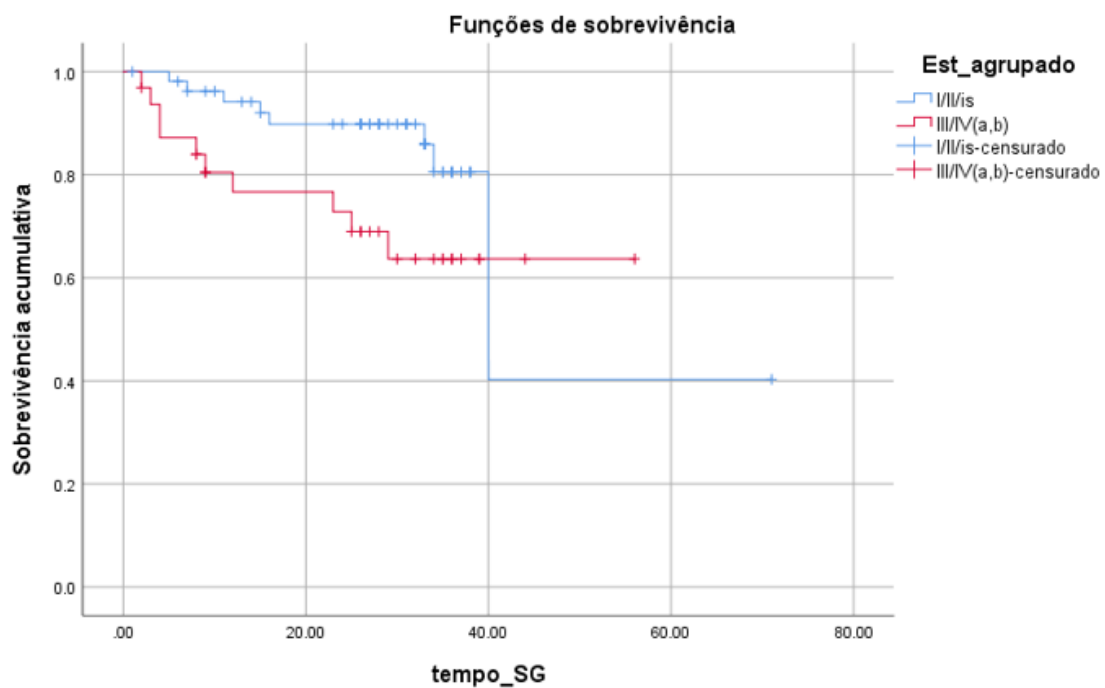


Figura 5. Curva de SG em função do estadiamento clínico-patológico dos pacientes analisados portadores de CEC de cavidade oral

A **Figura 6** apresenta a SG em função da terapêutica realizada, sendo que monoterapia (cirurgia exclusiva) ou multimodal (mais de uma terapia). A média para os pacientes que fizeram cirurgia exclusiva foi de 34 meses (R: 30-38 meses / DP: +-2,16), para o caso dos que fizeram cirurgia + 1 adjuvância foi de 36 meses (R: 30-41 Meses / DP: +-2,67) e para aqueles que fizeram cirurgia + 2 terapias adjuvantes foi de 54 meses (R: 44-63 meses / DP: +-4,66). A SG atuarial após 40 meses nos pacientes que fizeram exclusivamente cirurgia foi de 84%, para a cirurgia e uma adjuvância (RT ou QT) de 76%, e para aqueles que fizeram a cirurgia e duas adjuvâncias (RT + QT) foi de 64%. No entanto, as curvas não mostraram diferenças estatisticamente significantes segundo valor de p: 0,65, após teste de Log-Rank.

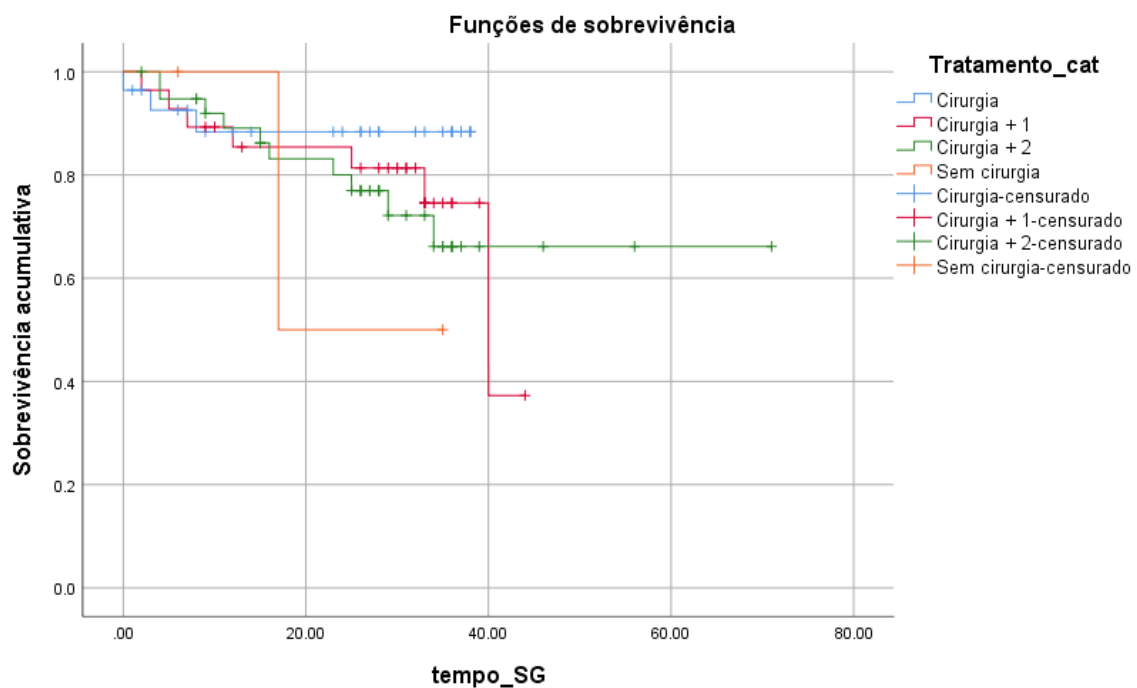


Figura 6. Curvas de SG em função da abordagem uni- ou multimodal dos pacientes portadores de CEC de cavidade oral tratados entre 2013-2017.

A **Figura 7** apresenta a curva de SG em função da expressão do EGFR nas suas duas modalidades: a) EGFR 1 (os que não o expressaram / os que o expressaram de forma fraca) com 11 eventos registrados; b) EGFR 2 (os que o expressaram de forma moderada / forte) com 10 eventos. A SG atuarial aos 40 meses foi de 78% para o grupo EGFR1 e de 62% e para o EGFR2,_(p: 0,02), mostrando que o EGFR1 se correlaciona com a SG com significância estatística (maior taxa de sobrevivência).

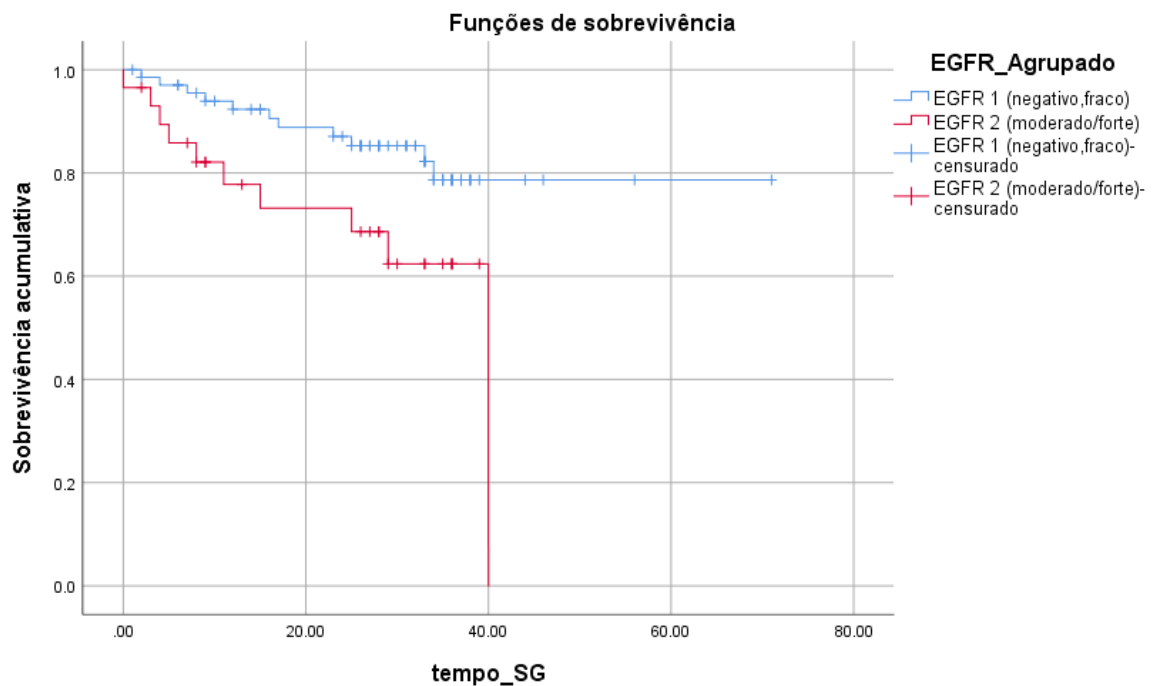


Figura 7. Curva de SG em função da expressão do EGFR nos pacientes portadores de CEC de cavidade oral tratados durante 2013 -2017

Na **Figura 8** apresenta-se a curva de SG em função da expressão da E-caderina, sendo que os que a expressaram tiveram 12 eventos, e os que não 9. Por outro lado, a média para os primeiros foi de 48 meses (R: 35-62 meses / DP: $\pm 6,92$) e dos últimos 46 meses (R: 40-52 meses / DP: $\pm 2,95$). Da mesma forma, a SG atuarial aos 40 meses para o grupo E-caderina+ foi de 76 % e do grupo E-caderina- de 72 %. No entanto, não houve diferença estatisticamente significante entre ambas as curvas ($p = 0,65$).

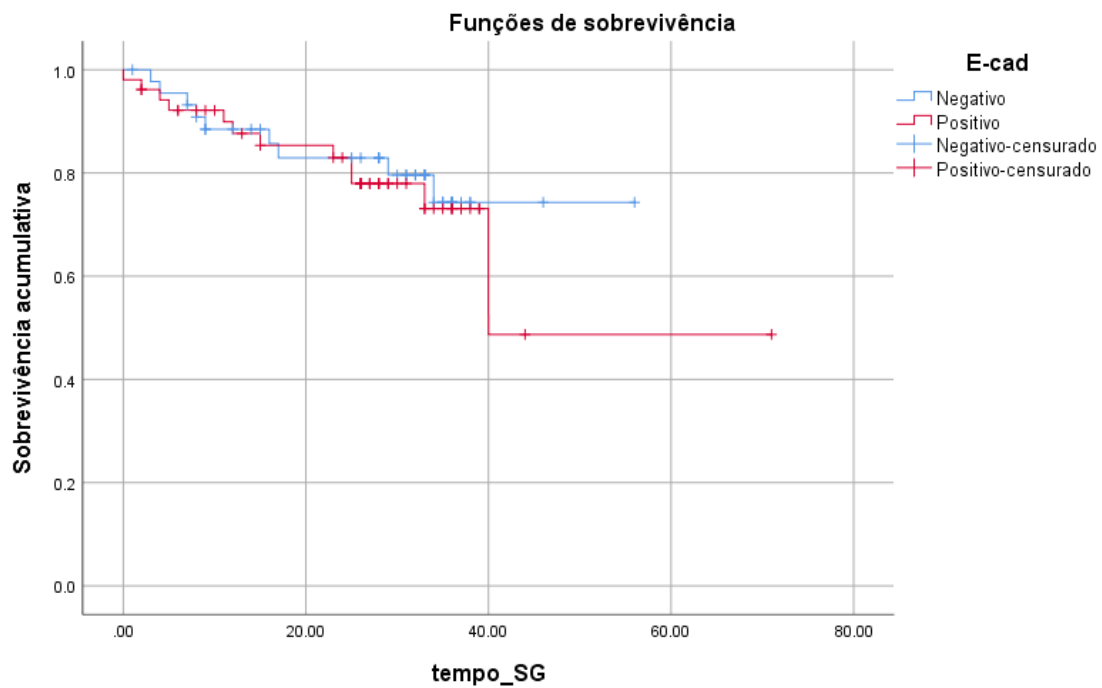


Figura 8. Curva de SG em função da expressão da E-caderina nos pacientes portadores de câncer oral e tratados durante 2013-2017

Na **Figura 9** apresenta a SG em função da expressão do p53, sendo que os que o expressaram tiveram um maior número de eventos (morte) dos que não o expressaram (16 vs. 5 mortes respectivamente). Por outro lado, a média para os p53+ foi de 41 meses (DP: +- 3.43 / R: 34-47 meses) e para os p53- foi de 62 meses (DP: +-3.94 / R: 54-70 meses). A SG atuarial aos 40 meses foi de 82% para os p53- e de 67 % para os p53+. No entanto, não se registrou diferença estatisticamente significante entre as curvas ($p= 0,19$).

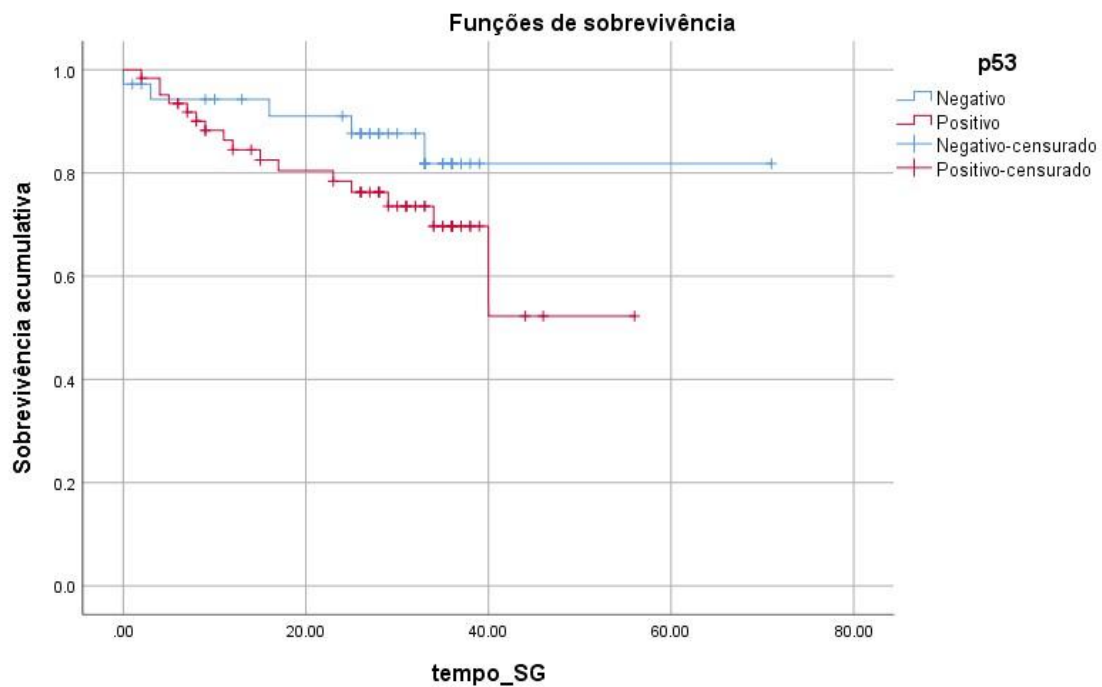


Figura 9. Curva de SG em função da expressão do p53. Observa-se que os p53- apresentam uma maior SG dos que o expressaram (p53+).

Na **Figura 10** mostra-se a curva de SG em função da expressão do p16, sendo que foram registrados 17 eventos para os p16- e 4 eventos para os p16+. Da mesma forma, a média para os p16+ foi de 45 meses (DP: +-4,93/ R: 35-55 meses) e de 51 meses (DP: +-5,53 / R: 40-62 meses) para os p16-. A SG atuarial aos 40 meses foi de 79 % para os p 16+ e de 70% para os p16-. No entanto, não houve diferenças estatisticamente significante entre ambas as curvas ($p= 0,94$).

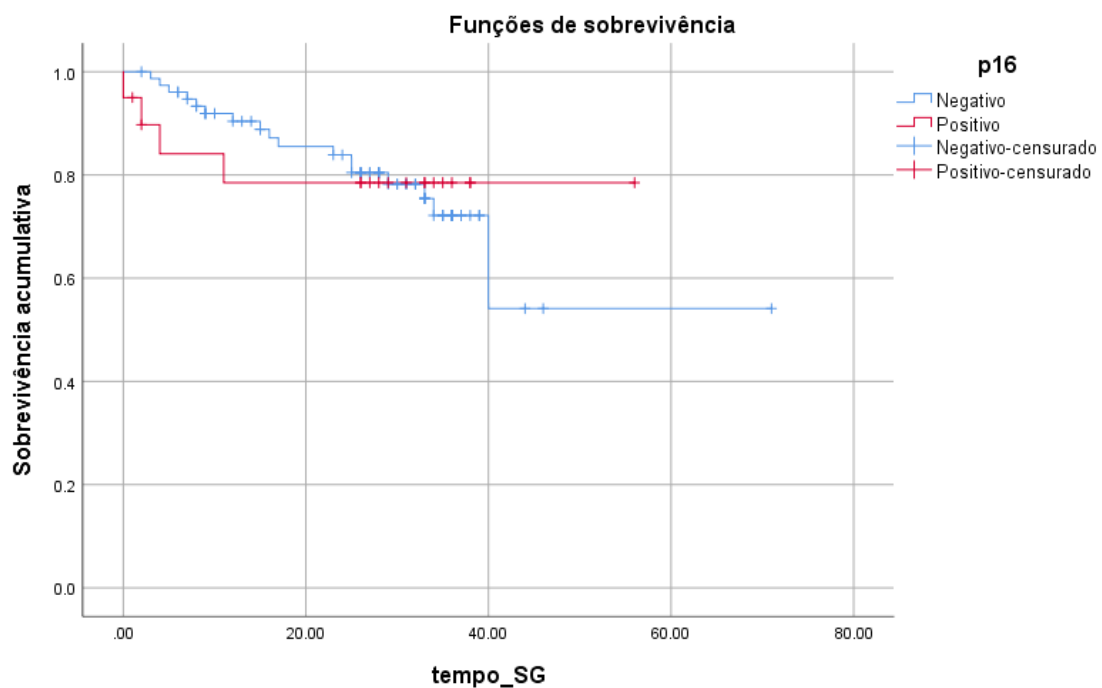


Figura 10. Curva de SG em função da expressão do p16.

A **Figura 11** apresenta a SG em função da expressão da Ciclina-D1, sendo que foram registrados 19 eventos para o grupo Positivo (+) e 2 eventos para o Grupo Negativo (-). A média para os Ciclina-D1+ foi de 51 meses (DP: +- 4.83/ R: 42-61 meses) e para os Ciclina-D1- foi de 34 meses (DP: +- 3,38 / R: 27-40 meses). A SG atuarial aos 40 meses foi de 70% para o grupo Ciclina-D1+ e de 82% para Ciclina-D1. Após teste de Log-Rank, não se registrou diferença estatisticamente significativa entre as curvas ($p= 0,64$).

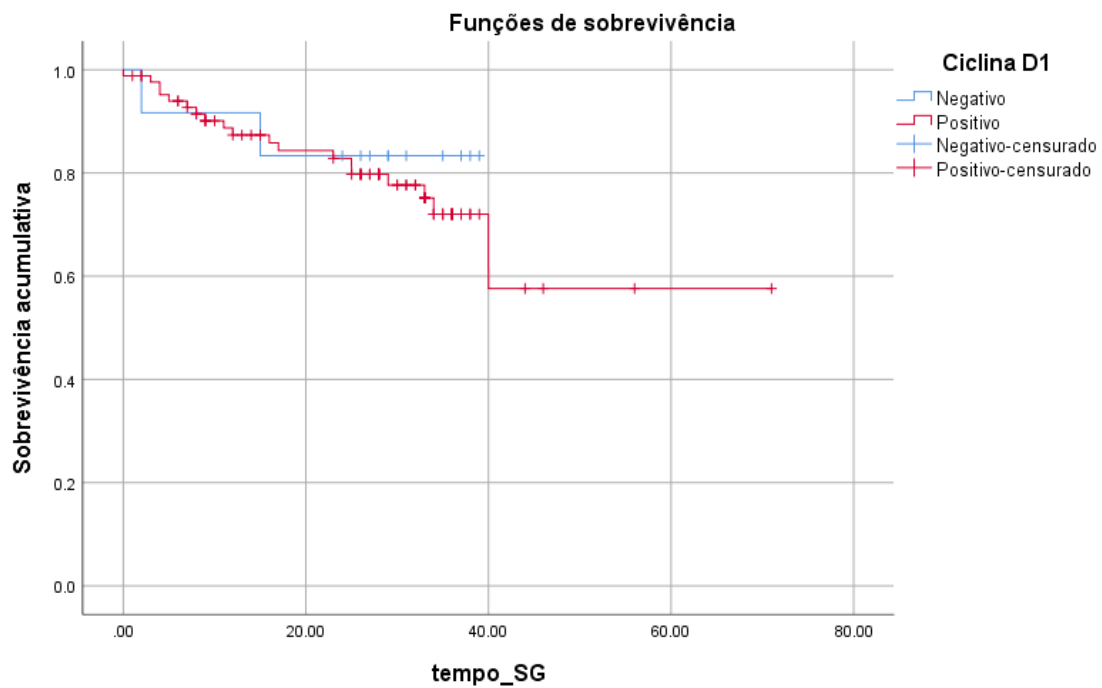


Figura 11. Curva de SG em função da expressão da Ciclina-D1.

Na **Figura 12** apresenta-se a SG em função do pior padrão de infiltração (PPI) categorizado em dois grupos segundo o tipo: a) favorável (Tipo 1, 2 e 3) e b) desfavorável (Tipo 4 e 5), sendo que para o grupo favorável se registraram 7 eventos e para o desfavorável 13. Além disso, a média para o primeiro grupo foi de 41 meses (DP: $\pm 1,87$ / R: 37-44 meses) e para o segundo foi de 36 meses (DP: $\pm 4,20$ / R: 28-45 meses). A SG atuarial aos 40 meses foi de 81% para o grupo favorável sendo que foi reduzida a 57% no grupo desfavorável. As curvas apresentaram diferença estatisticamente significativa ($p= 0,05$). Esta primeira categorização foi realizada já que o tipo III considera-se um fator de risco intermediário, ou seja, poderia estar incluído no grupo favorável e também no grupo desfavorável.

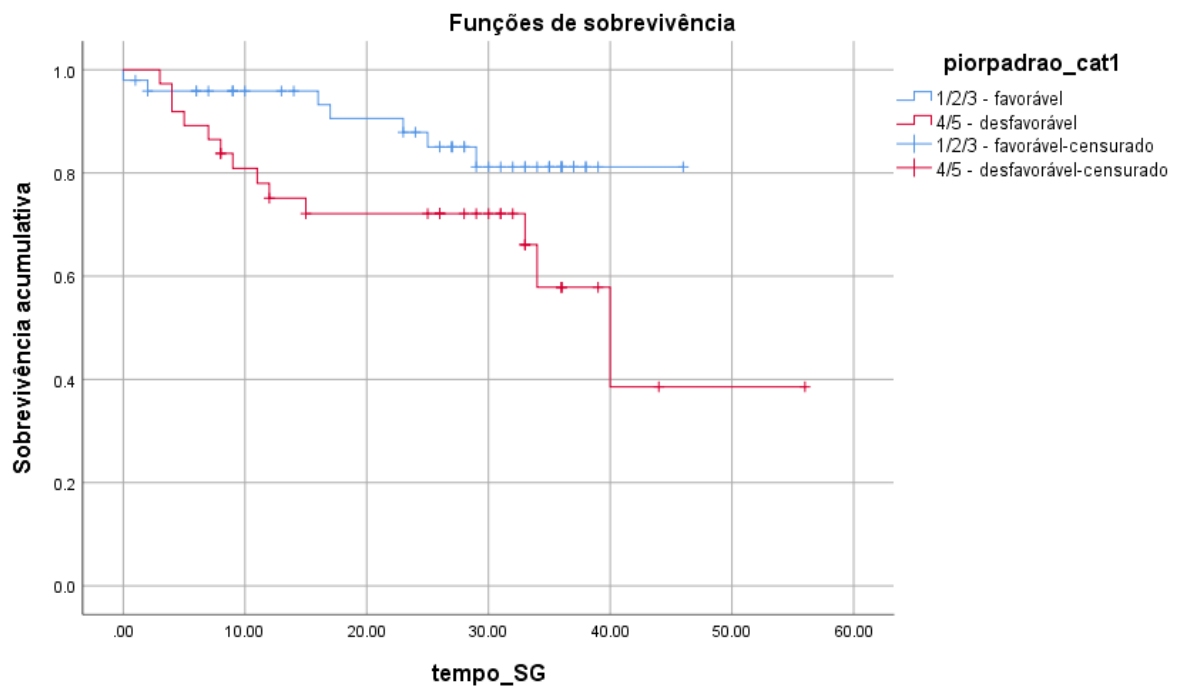


Figura 12. Curva de SG em função do Pior Padrão de Infiltração (PPI) do tumor primário. Observa-se uma maior queda da curva após 40 meses dos pacientes que apresentaram um padrão de infiltração desfavorável (4 e 5).

Dentre os critérios morfológicos tumorais também analisados, a invasão perineural (IP) torna-se um dos principais fatores prognósticos, que quando presente, está associado a um pior prognóstico nestes pacientes. A **Figura 13** apresenta a SG em função da IP, que nos casos presente foram registrados 11 eventos versus os 9 eventos nos casos ausente. A média foi de 36 meses para IP presente (DP: \pm 4,44 / R: 28-45 meses) e 61 meses para a IP ausente (DP: \pm 3,02 / R: 55-67 meses). AG atuarial aos 40 meses foi de 81% para os que não apresentaram IP e de 57% para os que apresentaram IP. Após teste de Log-Rank, detectou-se diferença estatisticamente significativa entre as curvas ($p=0,04$).

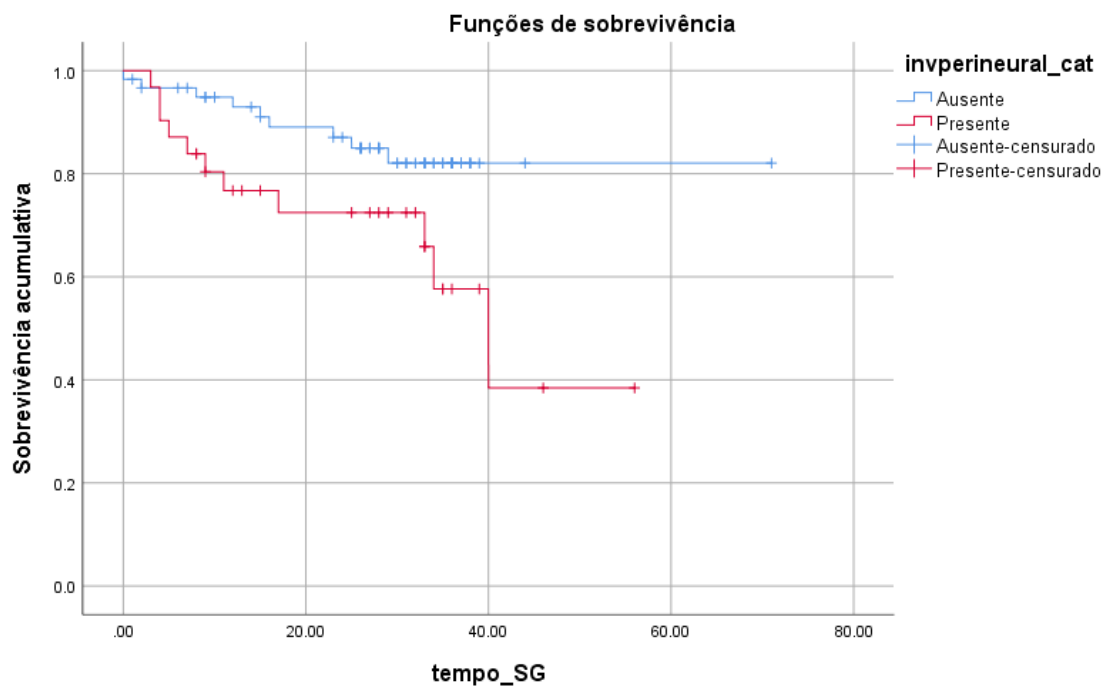


Figura 13. Curva de SG em função da IP detectada no tumor primário. Observa-se uma maior queda da curva nos pacientes que apresentaram IP após análise AP.

A **Figura 14** apresenta-se a SG em função do número de linfonodos (LNDs) comprometidos pelo tumor primário, sendo que para aqueles que tiveram mais de 3 LNDs comprometidos foram registrados 8 eventos e 04 eventos para o grupo que teve menos de 03 LNDs acometidos. Ademais, a média para o grupo com menos de 3 LNDs afetados foi de 38 meses (DP: +- 2,62 / R: 33-43 meses) e de 24 meses para os grupos com mais de 03 LNDs comprometidos (DP: +-3,59 / R: 17-31 meses). A SG atuarial aos 40 meses foi de 79% para os que apresentaram menos de 03 LNDs e reduzida a 41% nos casos com mais de 03 LNDs acometidos. Finalmente, se registrou diferença estatisticamente significativa entre as curvas ($p= 0,04$).

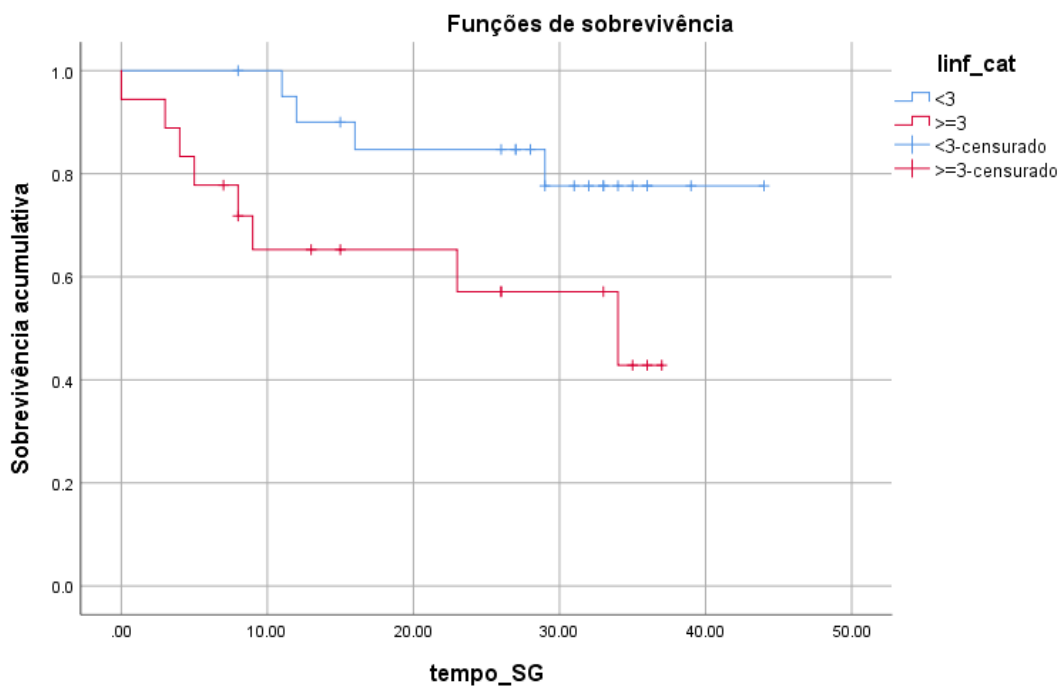


Figura 14. Curva de SG em função do número de linfonodos (LNDs) acometidos pelo tumor primário. Observa-se uma queda maior da curva no grupo que apresentou mais de 03 LNDs acometidos pelo tumor primário.

4.5 ANÁLISE DA SOBREVIDA LIVRE DE DOENÇA (SLD)

Para a estimativa de recorrência do câncer oral foi elaborada a curva de sobrevida livre de doença (SLD) e foi determinada a média do tempo de aparecimento do evento (recorrência). Dos 96 pacientes registrados, 34 apresentaram recorrência após a data do término da terapêutica realizada, sendo a média de 30 meses. Foram também elaboradas as curvas de SLD em função ao sexo, idade, local do tumor primário, dos critérios morfológicos anatomopatológicos analisados inicialmente tais como extensão extracapsular, invasão perineural, pior padrão de infiltração, linfonodos comprometidos, margens cirúrgicas livres ou comprometidas, e com respeito à terapêutica uni ou multimodal e da detecção dos BmTs analisados. Para a análise das diferenças das curvas em cada grupo foi aplicado o teste de Log-Rank com um nível de confiança de 95% e com um valor de p estatisticamente significativo de $p: \leq 0,05$.

Na **Figura 15** observamos a curva de SLD nos pacientes submetidos à terapia uni (cirurgia exclusiva) ou multimodal (Cirurgia + adjuvâncias) pelo CEC de cavidade oral. A partir do gráfico vemos que a curva diminui no decorrer dos meses após tratamento, sendo que a média foi de 30 meses (2 anos e 6 meses) (DP: $\pm 1,8$ / R: 27 – 34 meses), ou seja, o período após tratamento que os pacientes poderiam apresentar recorrência da doença.

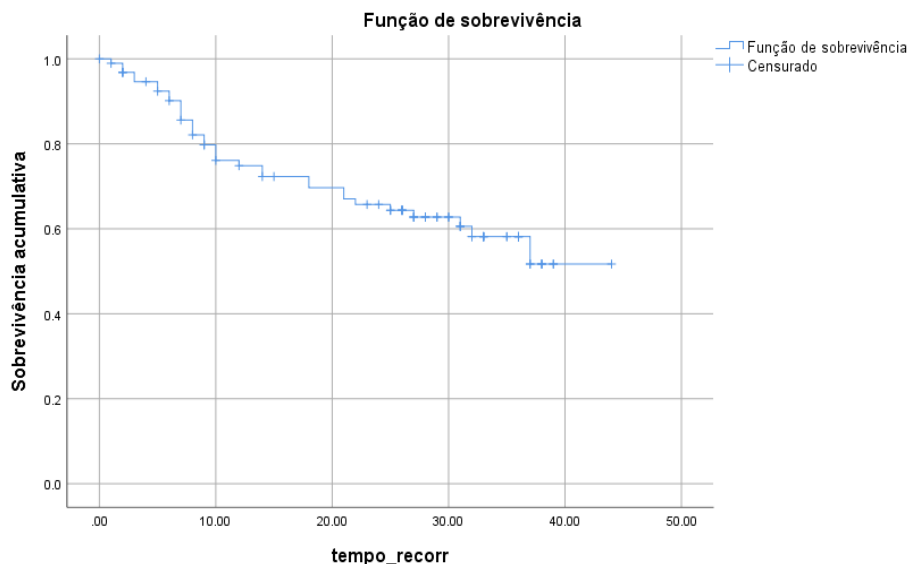


Figura 15. Curva de Sobrevida Livre de Doença (SLD) dos pacientes portadores de CEC de cavidade oral submetidos à terapia uni ou multimodal durante o período de 2013-2017

Na **Figura 16** vemos a curva de SLD em função ao sexo dos pacientes, sendo que para o gênero masculino foram registrados 24 eventos e para o feminino 10 eventos. A média para os homens foi de 30 meses +- 2,18 (R: 26-34 meses) e para as mulheres de 28 meses +- 2,63(R: 22-33 meses). O teste de logRank não detectou diferenças estatisticamente significativas entre ambas as curvas ($p = 0,687$). A SLD atuarial aos 30 meses foi de 60% e 64% para o sexo masculino e feminino respectivamente.

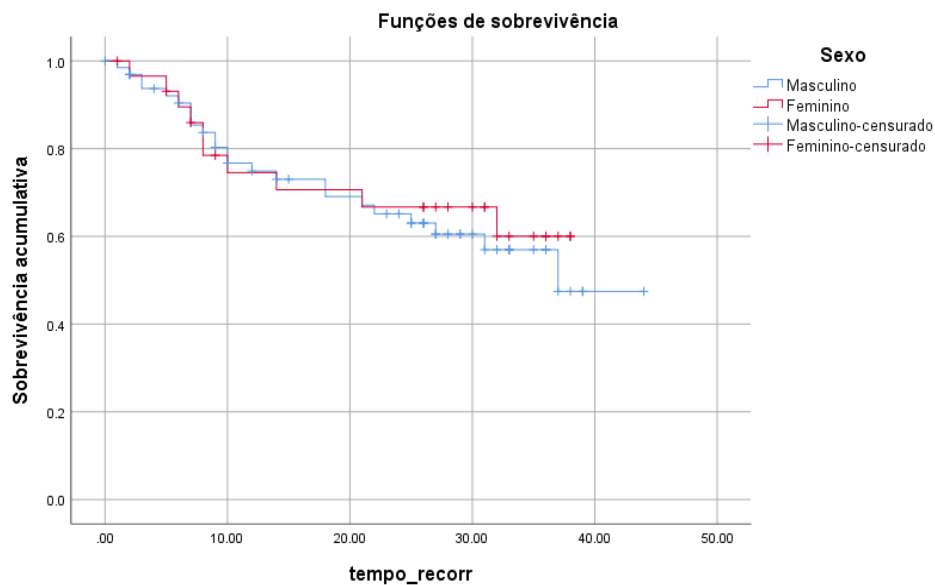


Figura 16. Curva de SLD em função ao sexo dos pacientes incluídos

Na **Figura 17** observamos a curva de SLD em função da idade, cujos grupos foram divididos em pacientes com menos de 60 anos e os que tinham idade igual a 60 anos ou mais no momento do diagnóstico. Destaca-se que na população com menos de 60 anos foram registrados 13 eventos de recorrência da doença e na população com idade igual ou mais de 60 anos foi registrado 19 eventos de recorrência, sendo esta última a que recorreu mais. A SLD atuarial aos 30 meses foi de 64% para o primeiro grupo (<60 anos) e de 62% para o segundo (≥ 60 anos). No entanto, as diferenças entre as curvas não foram estatisticamente significativas após teste de log rank, com um valor de p: 0,80 conforme apresentado no gráfico a seguir:

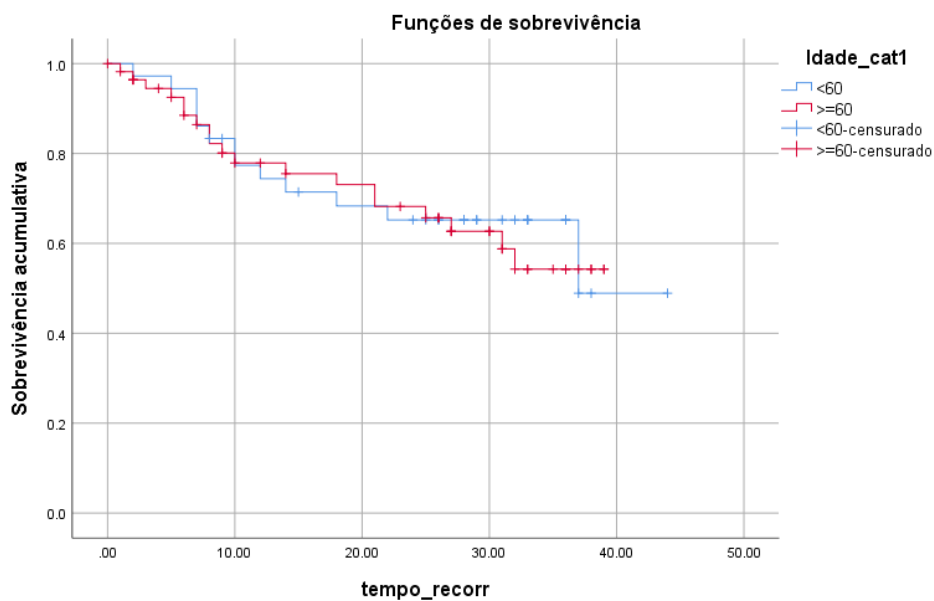


Figura 17. Curva de SLD em função da idade (em anos) da população de estudo

A **Figura 18** mostra a curva de SLD em função do local de aparecimento do tumor primário, sendo que para o assoalho de boca foram registrados 21 eventos e na língua 13 pacientes com recorrência. A média para os primeiros foi de 29 meses $\pm 2,48$ (R: 24-34 meses) e para os segundos de 29 meses $\pm 2,08$ (R: 25-33 meses). A SLD atuarial aos 30 meses foi de 58 % e 70% para o tumor primário no assoalho de boca e língua respectivamente. No entanto, o teste de logRank não detectou diferenças estatisticamente significantes entre as curvas ($p=0,22$). A partir disso, infere-se que em ambas as topografias o tempo de aparecimento da recorrência da doença seria similar.

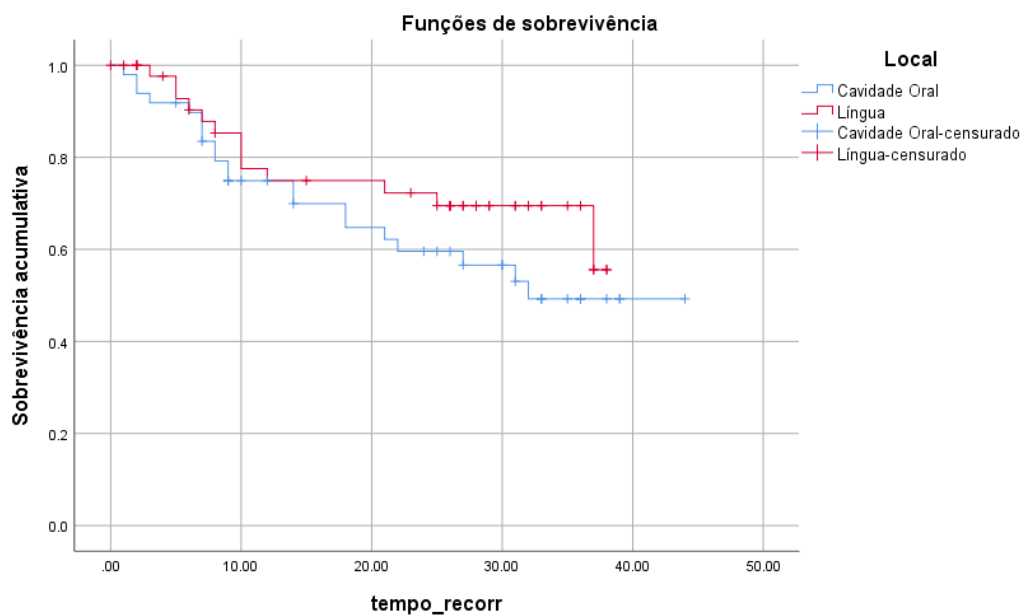


Figura 18. Curva de SLD em função do local do tumor primário

Na **Figura 19** é possível ver a curva de SLD em função do Tabagismo e Etilismo detectado nos pacientes incluídos no estudo. Segundo a análise descritiva realizada, os pacientes que fumam e bebem apresentaram o maior número de recidivas registradas (12 eventos) quando comparado com os outros grupos. Ressaltamos que o grupo que não fumava, mas bebia apresentaram somente um evento. Após o teste de Log-Rank para análise das curvas, o valor de p foi de 0,002 como apresenta-se no gráfico a seguir.

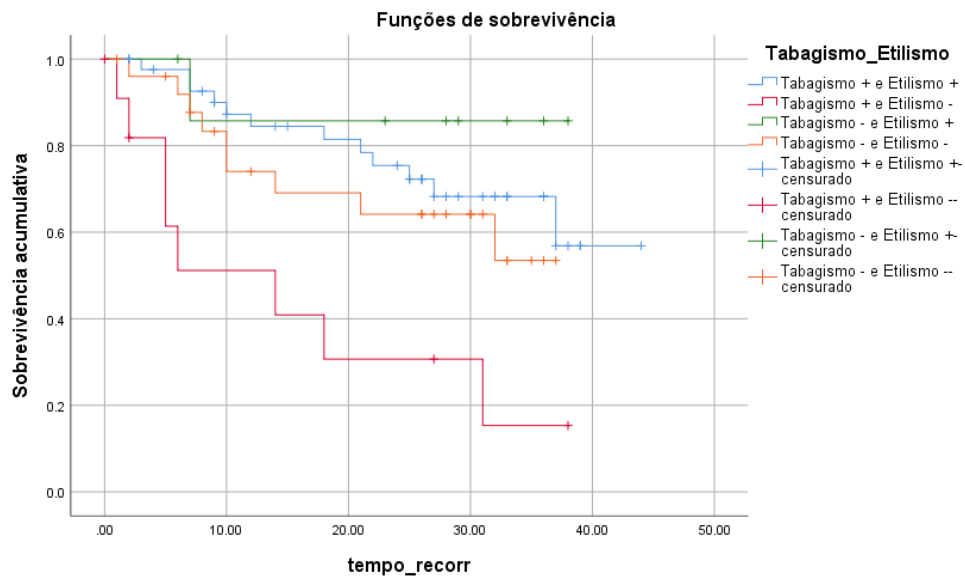


Figura 19. Curva de SLD em função do Tabagismo-Etilismo da população analisada

Na **Figura 20** temos a curva de SLD em função da terapêutica uni ou multimodal realizada. Dos 32 eventos registrados no total, no grupo que realizou cirurgia exclusiva foram detectadas 4 recorrências, para o grupo de cirurgia + 1 tratamento adjuvante foram registrados 06 eventos, o para os que fizeram Cirurgia + 2 tratamentos adjuvantes foram registrados 22 recorrências. A SLD atuarial aos 30 meses para o grupo que fez cirurgia exclusiva foi de 80%, para o grupo que fez cirurgia + 1 adjuvância de 82% e para os que fizeram cirurgia e duas adjuvâncias foi de 40%. Através do Log-Rank foi confirmada a diferença estatisticamente significativa entre as curvas ($p= 0,01$). É possível observar a queda da curva, principalmente no grupo que realizou a ressecção cirúrgica, RT e QT adjuvante (Cirurgia + 2 adjuvâncias), e um maior número de recorrência.

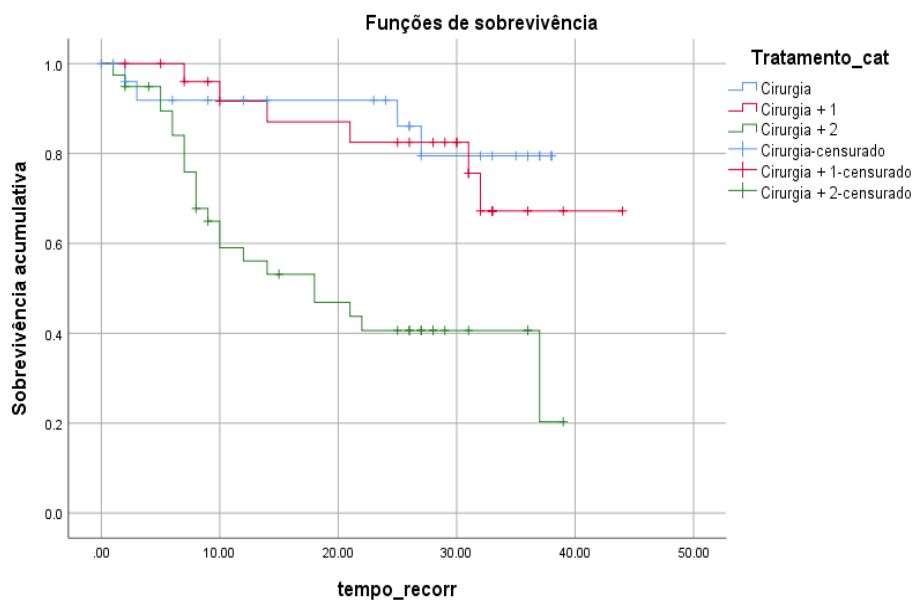


Figura 20. Curva de SLD em função da terapêutica realizada: monoterapia/multimodal

Neste estudo, um total de 67 pacientes realizou a RT+ na abordagem multimodal e uma análise para detecção da correlação entre a SLD e as variáveis usadas no tratamento proposto de RT, tais como dose total, volume irradiado, técnica, período entre a cirurgia e início da RT+, duração do tratamento e a concomitância com a QT+. Na **Figura 21** é possível observar a curva de SLD em função da dose total entregue, sendo que foram considerados dois subgrupos: A) recebeu uma dose total menor ou igual a 60Gy e o subgrupo B) que recebeu uma dose superior a 60Gy. Para o primeiro grupo foram registrados 10 eventos, e para o segundo 15 eventos foram registrados. A SLD atuarial aos 30 meses foi de 67% e 57% para o primeiro e segundo grupo respectivamente. O teste de logRank mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre ambas as curvas ($p=0,51$). Além disso, a SLD de 3 anos (37 meses) não se correlacionou à dose total usada na RT+.

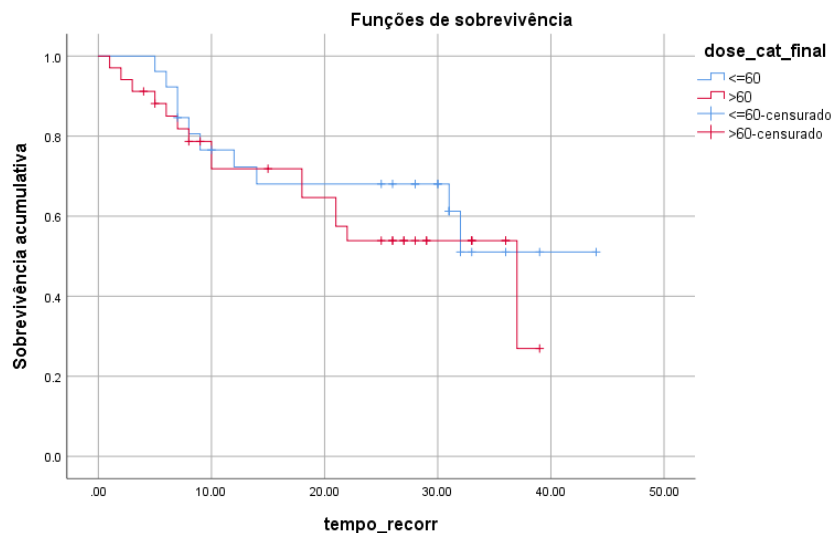


Figura 21. Curva de SLD em função da dose total (Gy) na RT+

A **Figura 22** mostra a curva SLD em função do volume irradiado na RT+. Foram constituídos três subgrupos: a) Irradiação do leito tumoral exclusivamente; b) Irradiação do leito tumoral + a drenagem homolateral; c) Irradiação do leito tumoral e a drenagem bilateral. Para cada subgrupo foram registrados 3, 1 e 21 eventos respectivamente, sendo que o subgrupo que abrangeu um maior campo de irradiação foi o que apresentou mais recorrência da doença. No entanto, o valor de p obtido para cálculo de diferença entre as curvas foi de 0,151 e a SLD para cada grupo após 37, 30 e 29 meses respectivamente não se correlacionou com o volume irradiado na RT+.

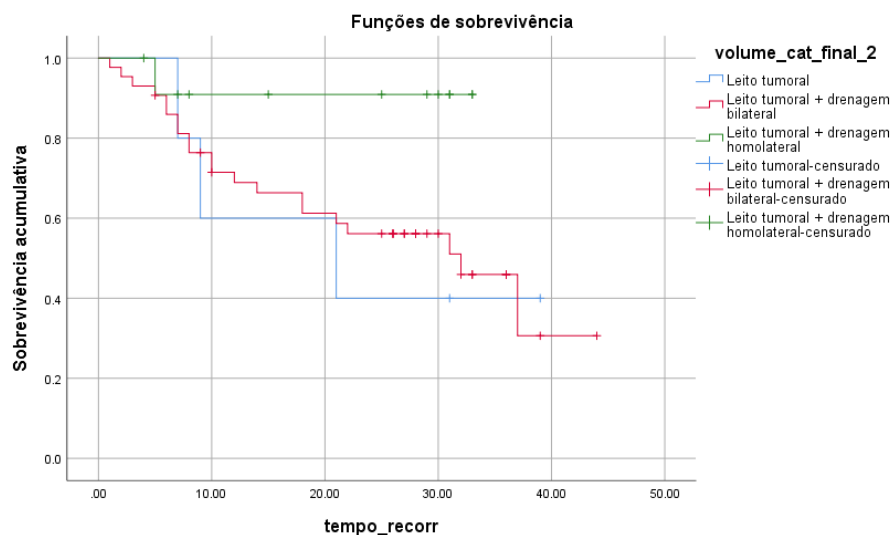


Figura 22. Curva de SLD em função do volume irradiado na RT+

A **Figura 23** apresenta a curva de SLD em função do intervalo de tempo transcorrido da ressecção cirúrgica (Cx.) realizada e o início da RT+. Foram constituídos dois subgrupos baseados no tempo máximo descrito na literatura: a) Pacientes que iniciaram a RT+ em menos de 60 dias ou com 60 dias após a Cx.; e b) pacientes que iniciaram a RT+ em mais de 60 dias após Cx. Foram registrados 7 e 16 eventos (recorrência) respectivamente. A SLD atuarial aos 30 meses foi de 58% e 61% para o primeiro e segundo grupo respectivamente. O valor de p obtido foi de 0,79 sem diferença estatisticamente significativa entre ambas as curvas.

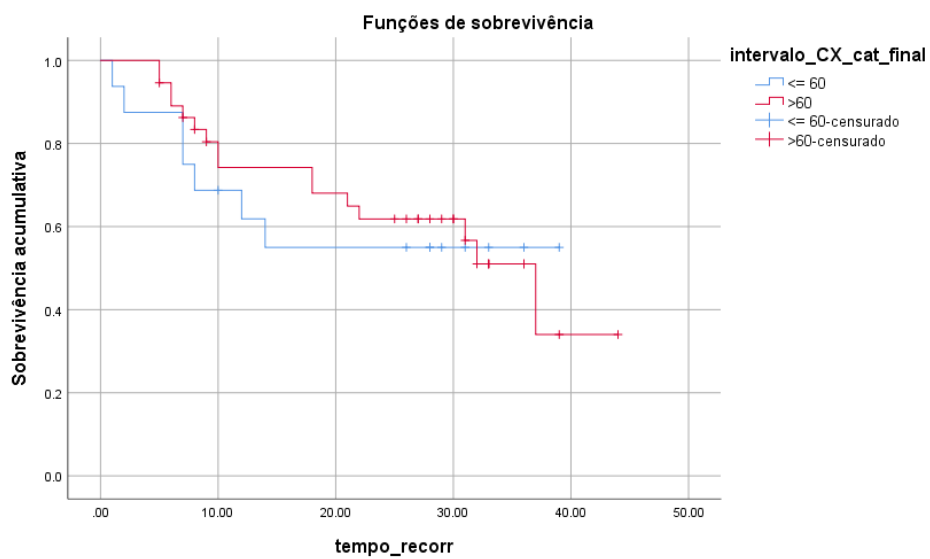


Figura 23. Curva de SLD em função do intervalo de tempo entre a Cx. e a RT+

Na **Figura 24** observa-se a SLD em função da técnica de RT+ empregada na abordagem multimodal nos pacientes incluídos. Foram conformados dois grupos: a) os que trataram com técnica de modulação da intensidade do feixe (*Intensity Modulated Radiation Therapy* – IMRT) e b) os que trataram com outras técnicas não IMRT (3D conformada, 2D). Foram registrados um número de eventos similares (16 e 9 respectivamente) para ambos os grupos. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre as curvas ($p= 0,19$) e nem associação da SLD após 03 anos (36 meses) e a técnica de RT+.

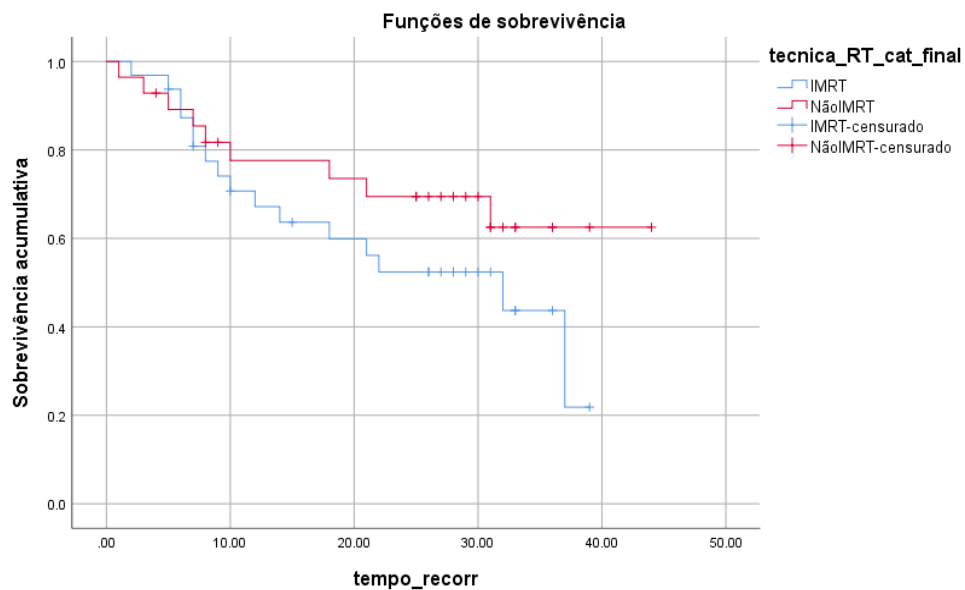


Figura 24. Curva de SLD em função da técnica de RT+ empregada

Na **Figura 25** é apresentada a SLD em função do tempo de RT+ realizada. Foram conformadas duas categorias, sendo que a primeira incluiu os pacientes tratados durante 6 semanas ou em tempo inferior, e o outro grupo por pacientes foram tratados mais de 06 semanas. A SLD atuarial aos 30 meses foi de 62% e 58% para a primeira e segunda categoria respectivamente. Os eventos registrados para ambos os grupos foram próximos em quantidade (15 e 10 respectivamente) e após teste de logRank não foi detectada diferença estatisticamente significativa entre as curvas ($p= 0,97$). Além disso, não houve associação entre a SLD de 03 anos e a duração da RT+.

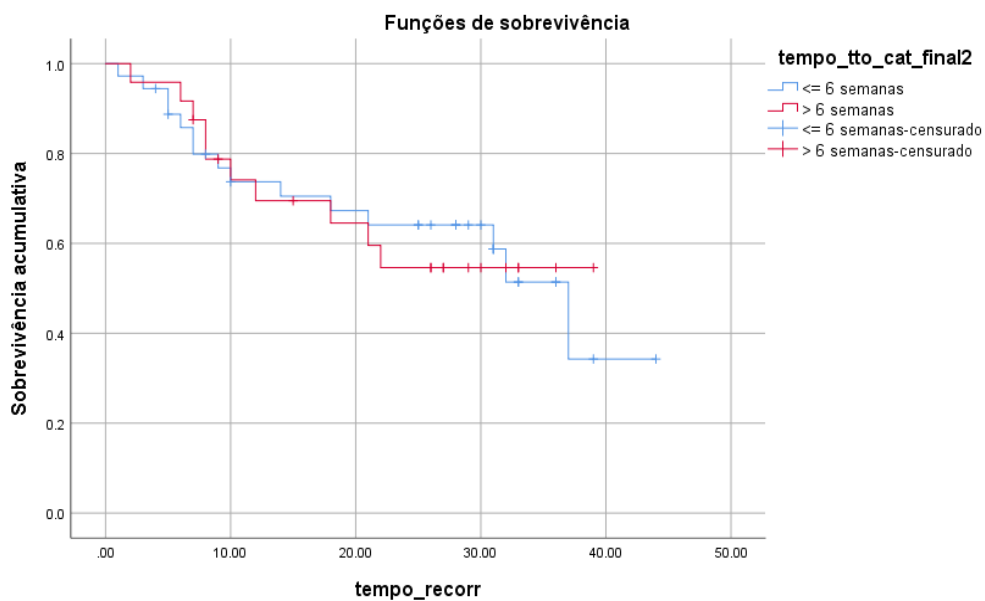


Figura 25. Curva de SLD e o tempo de RT+ realizada

A

Figura 26 mostra a SLD em função dos pacientes que realizaram quimioterapia (QT) após a RT como complementação do tratamento e a abordagem multimodal. A partir do teste de Kaplan Meier é visto que foram registrados 19 eventos de recorrência no subgrupo que fez a QT, sendo que a estimativa de tempo da detecção da recorrência neste grupo foi após 21 meses de finalizada a terapêutica. Por outro lado, no grupo que não fez QT foram detectados 04 eventos de recorrência e a média de tempo foi de 37 meses (após 03 anos). A SLD aos 30 meses para o grupo que não fez QT foi de 79% e para o grupo que fez QT foi de 43%. Após logRank obtivemos um valor de $p= 0,02$, que representa a diferença estatisticamente significativa entre as curvas e para a correlação entre a SLD em 03 anos e o fato de o paciente ter feito QT.

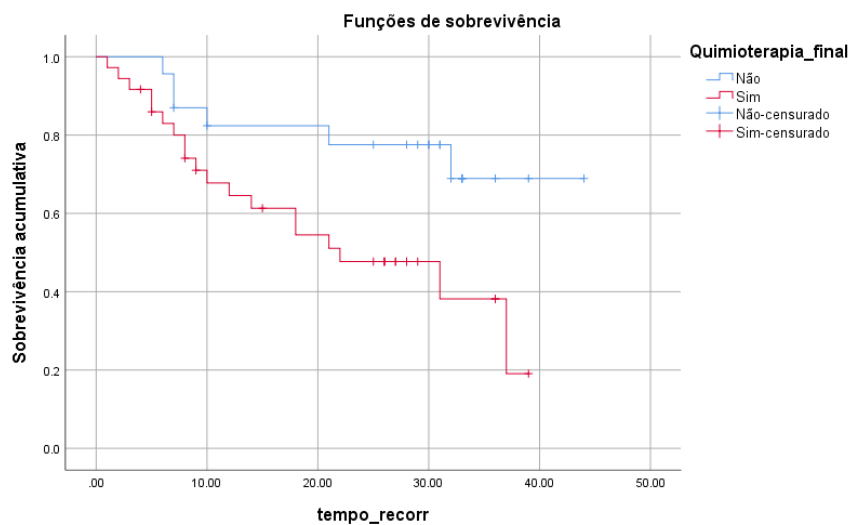


Figura 26. Curva de SLD e QT realizada após e/ou em concomitância à RT

A

Figura 27 apresenta a relação entre a SLD e o tamanho do tumor primário, sendo que foram considerados dois grupos analisados: A) os que apresentaram um tamanho tumoral \leq a 4cm. após análise histopatológica e B) os que apresentaram $>$ 4cm. Após a análise de Kaplan Meier, observamos o registro de 20 eventos de recidiva para o grupo A e 09 recidivas para o grupo B, sendo o valor de $p= 0,06$ (valor marginal), que pode indicar uma diferença estatisticamente significativa entre ambas as curvas. A SLD atuarial aos 30 meses foi de 70% para o Grupo A e se reduziu a 42% para o grupo B segundo o gráfico a seguir:

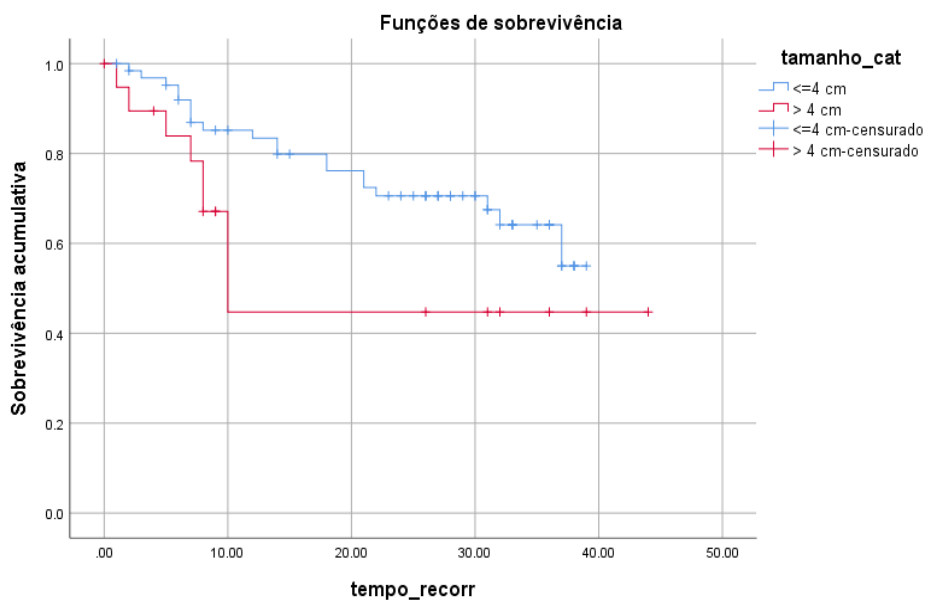


Figura 27. Curva de SLD em função do tamanho do tumor primário após análise anatomopatológica (AP)

A **Figura 28** mostra a curva de SLD em função do número de linfonodos (LNDs) comprometidos pelo tumor primário após análise histopatológica da peça cirúrgica e que foram subdivididos em dois grupos: a) os que apresentaram menos de 03 LNDs acometidos pelo tumor e B) os que apresentaram ≥ 3 LNDs. A SLD atuarial aos 30 meses foi de 65% para os que tiveram menos de 03 LNDs comprometidos e de 18% para os que tiveram mais de 03 LNDs acometidos. Após o Log-Rank, o valor de p foi de 0,001 que indica uma diferença estatisticamente significativa entre ambas as curvas como apresentado no gráfico a seguir:

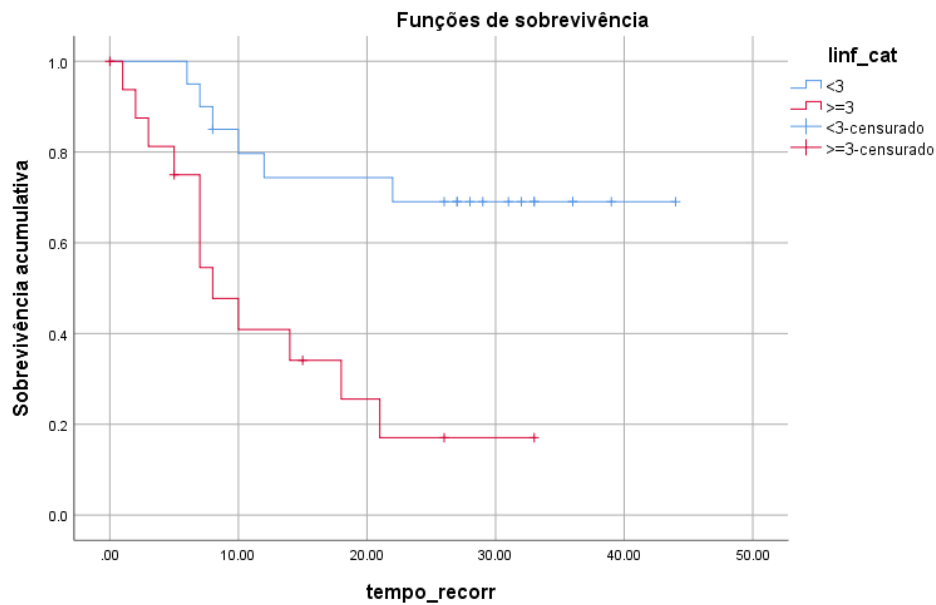


Figura 28. Curva de SLD em função da detecção do número de LNDs acometidos

Na **Figura 29** observamos a curva de SLD em função do estadiamento clínico-patológico dos pacientes, sendo subdivididos em dois grupos: estadiamento clínico-patológico inicial (I, II, *in situ*) e estadiamento clínico-patológico avançado (III e IV/ab). Foram registrados 16 eventos de recorrência para o estadiamento inicial e 12 recorrências para o estadiamento avançado, com valor de $p= 0,22$, sendo assim, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre as curvas. A SLD aos 30 meses para o estadiamento clínico inicial foi de 68% e para o avançado foi de 59%. No entanto, podemos destacar que após 10 meses observa-se uma queda maior da curva do grupo com estadiamento clínico avançado.

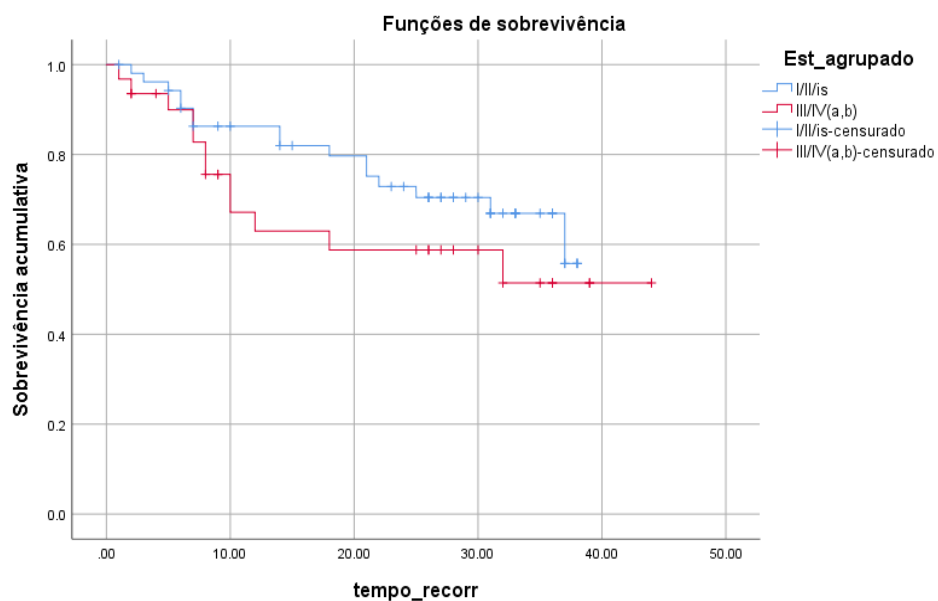


Figura 29. Curva de SLD em função do estadiamento clínico (cT)

A **Figura 30** apresenta a curva de SLD em função do pior padrão de infiltração (PPI) detectado a partir da análise histopatológica tumoral, na qual foram estabelecidos cinco padrões em uma escala de 1 a 5, sendo o número 1 o padrão “mais favorável” e o padrão 5 o “mais desfavorável” como fator prognóstico. Após o teste de logRank foi detectada diferença estatisticamente significativa entre as curvas ($p= 0,013$), o que mostraria que o tempo de aparecimento da recorrência entre os grupos é diferente e observamos que houve um maior registro do evento (recorrência) para aqueles que apresentaram padrão de infiltração 3 e 4 (9 e 13 eventos respectivamente), com uma queda da curva em um menor período quando comparado aos outros grupos.

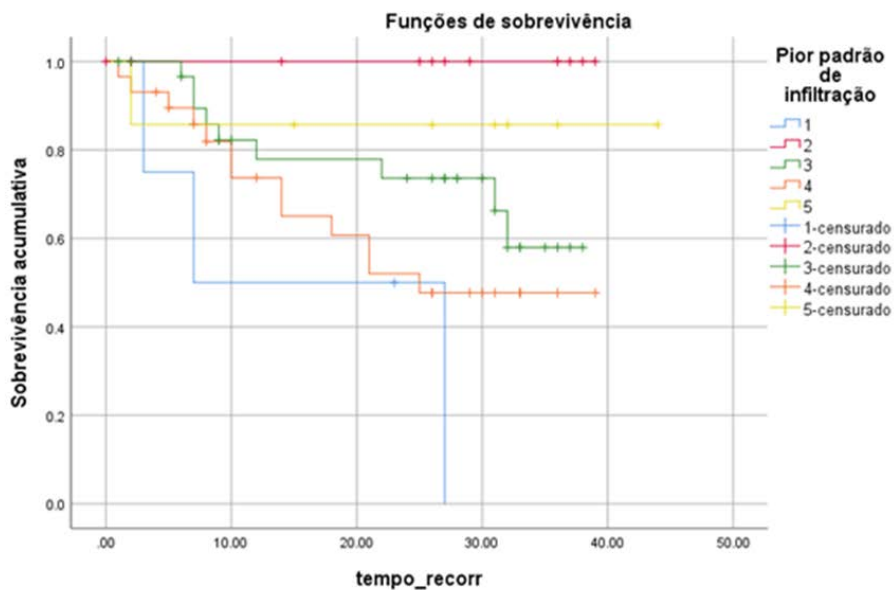


Figura 30. Curvas de SLD em função do pior padrão de infiltração tumoral. Observa-se que os pacientes que apresentaram padrão de infiltração 3 e 4 apresentaram uma queda na curva em um tempo menor quando comparados aos outros grupos.

A **Figura 31** apresenta a SLD em função do PPI em uma primeira categorização, sendo que o tipo 1,2 e 3 foram considerados como o grupo “favorável” e o tipo 4 e 5 no grupo “desfavorável”. A SLD atuarial aos 30 meses para o primeiro grupo foi de 76% e para o segundo grupo de 58%. Por outro lado, observa-se que aos 20 meses há uma maior queda da curva para o grupo desfavorável com uma redução da SLD a 62% versus 80% no grupo favorável. No entanto, após teste de Log-Rank o p obtido foi de 0,222 que mostra a não diferença estatisticamente entre as curvas.

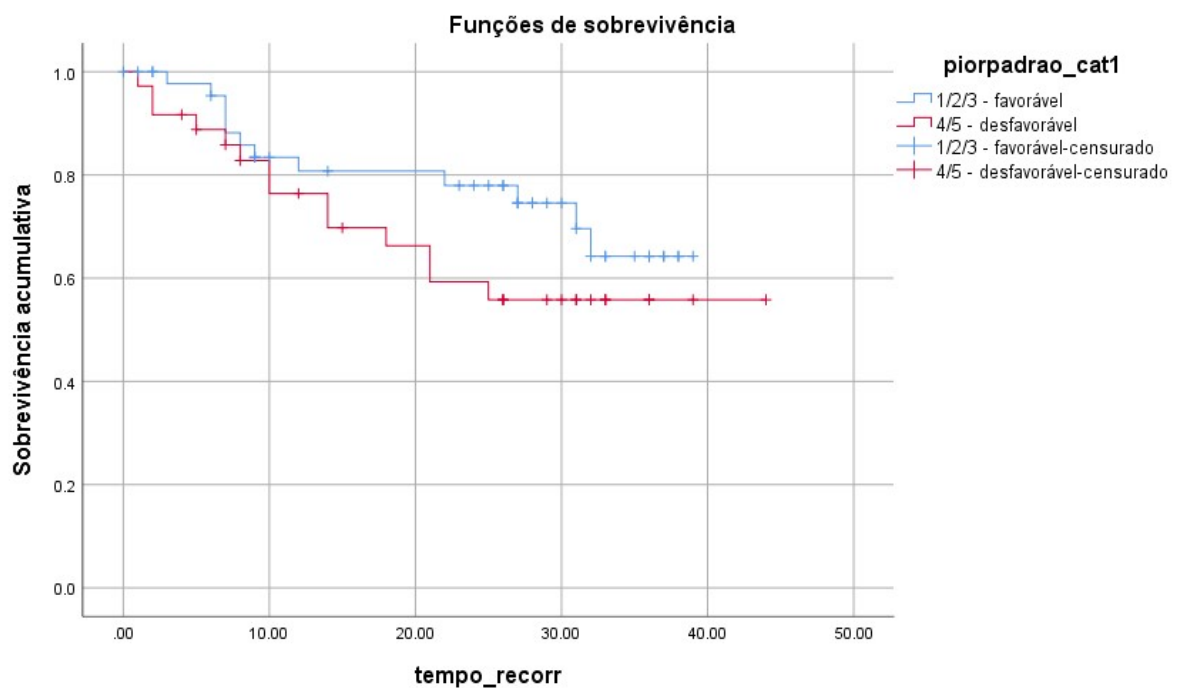


Figura 31. Curva de SLD em função do PPI (primeira categoria)

A **Figura 32** apresenta a curva de SLD em função do pior padrão de infiltração (PPI) recategorizado na qual foram estabelecidos dois subgrupos definidos como o grupo “mais favorável” que inclui o tipo 1 e 2 e grupo “mais desfavorável” que inclui o tipo 3, 4 e 5 como fator prognóstico. A SLD aos 30 meses para o primeiro grupo foi de 77% e para o segundo grupo de 62%. Após o teste de logRank resultou o valor de $p= 0,262$, que representa que não houve diferença estatisticamente significativa entre as curvas.

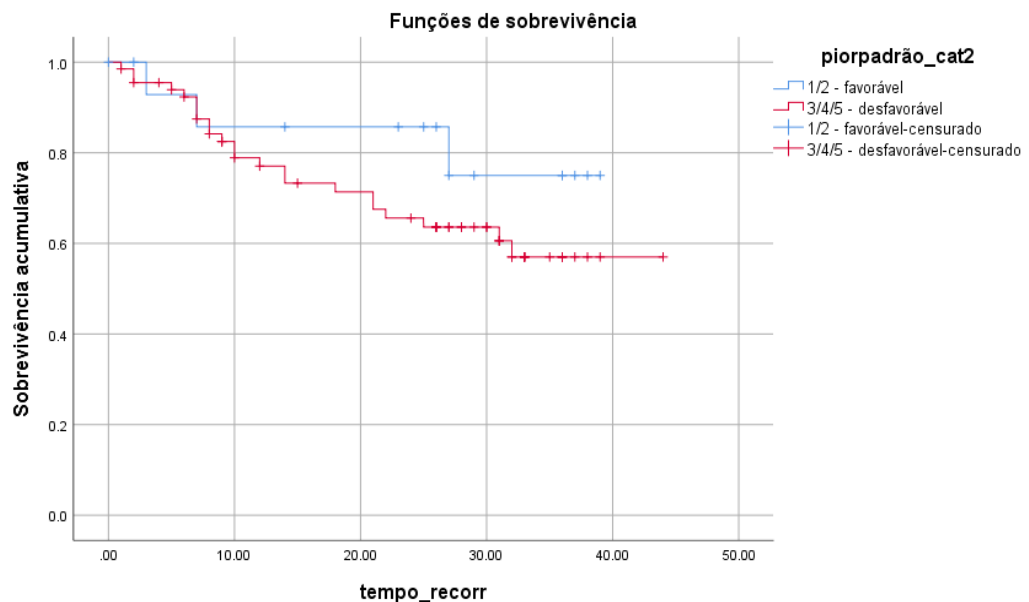


Figura 32. Curva de SLD e PPI recategorizado (segunda categoria)

Na **Figura 33** observamos a curva de SLD em função da Extensão extracapsular (EEC) detectada a partir da análise histopatológica do tumor. Foram registrados 18 eventos (recorrência), nos quais foram distribuídos entre os subgrupos: presente (13 eventos registrados) e ausente (5 eventos registrados). Após o teste de Log-Rank e com um valor de $p=0,057$, considerando o valor marginal, próximo ao estatisticamente significativo. A projeção da SLD atuarial aos 30 meses foi de 38% para EEC presente e de 65% para EEC ausente ($p=0,057$).

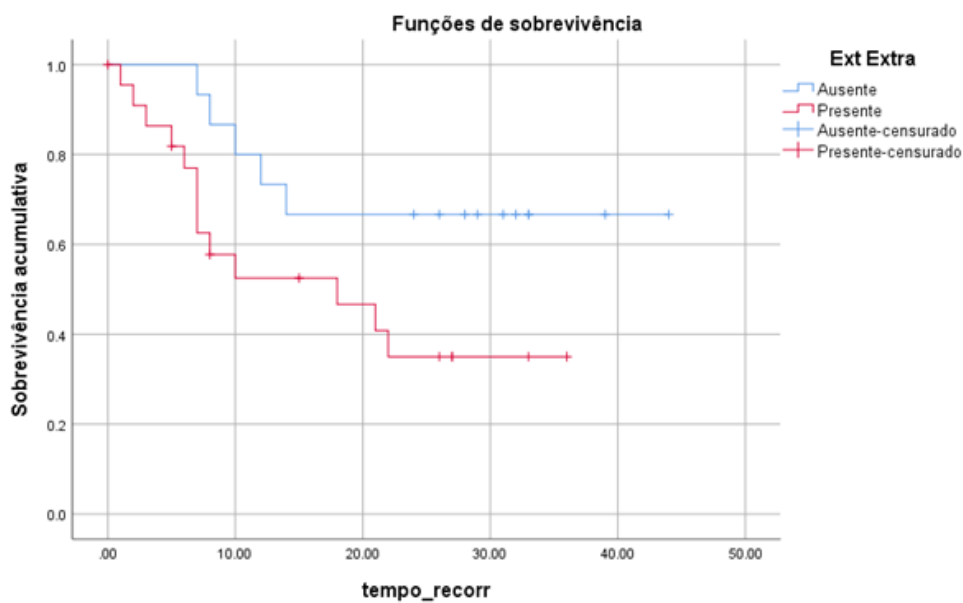


Figura 33. Curva de SLD em função da EEC tumoral detectada na AP. Observa-se diferença entre ambas as curvas com uma queda dela nos pacientes que apresentaram EEC.

Na **Figura 34** é observada a curva de SLD em função da invasão perineural (IPN) analisada constituída por dois subgrupos: Presente e Ausente. Para o subgrupo que apresentou IPN foram registrados 14 eventos (recorrência), enquanto o grupo que não apresentou IPN registrou 16 eventos. No entanto, o teste de Log Rank mostrou uma diferença estatisticamente significativa entre ambas as curvas ($p=0,04$), sendo que o subgrupo com IPN tiveram uma queda na SLD em um tempo menor quando comparado ao grupo sem IPN. A SLD atuarial após 30 meses para os que apresentaram IP seria de 41% e para os que não a apresentaram de 77% conforme mostra o gráfico a seguir:

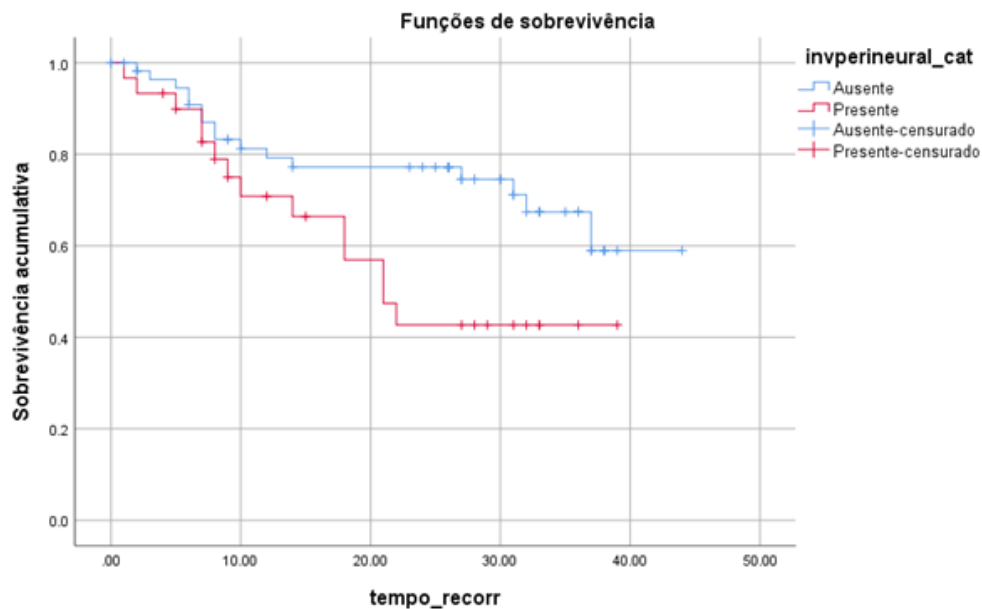


Figura 34. Curva de SLD em função da Invasão Perineural (IPN) detectada

A

Figura 35 apresenta a curva de SLD em função da análise das margens cirúrgicas após ressecção, sendo assim, neste grupo foram registrados 32 eventos de recorrência. Para o subgrupo que apresentou margens cirúrgicas livres, foram detectados 26 pacientes com recorrência da doença, e para o grupo de margens comprometidas foram observados 06 pacientes que apresentaram recorrência. Para isso, foi realizado o teste de logRank, o qual não mostrou uma diferença estatisticamente significativa entre ambos os grupos ($p= 0,25$). A SLD atuarial após 30 meses para o grupo que teve as margens cirúrgicas livres foi de 62% e para o grupo com margens comprometidas foi de 43%. No entanto, no grupo com margens cirúrgicas comprometidas pôde ser observada uma tendência à queda maior da curva do que o grupo com margens livres, mesmo com uma média de tempo de aparecimento da recorrência similar entre ambos os grupos.

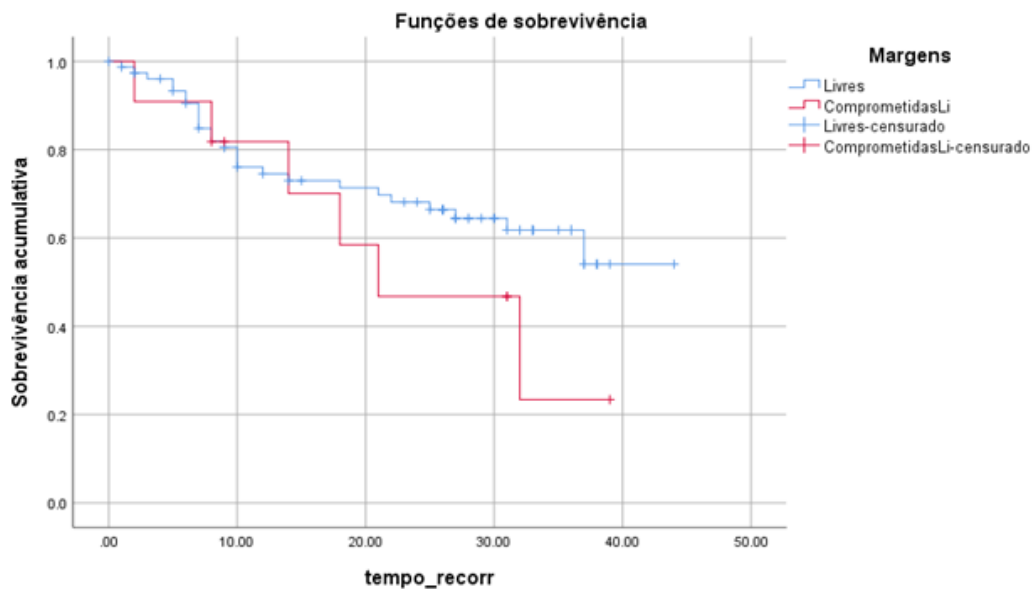


Figura 35. Curva de SLD em função das margens cirúrgicas obtidas após ressecção tumoral

Na **Figura 36** mostra-se a curva de SLD em função do acometimento ou não das cadeias de LNDs retiradas após ressecção cirúrgica. Foram registrados 29 eventos (recorrência) em somatória dos subgrupos: a) LNDs livres e b) LNDs comprometidos. A SLD atuarial aos 30 meses foi de 77% para o grupo A e de 44% para o grupo B. O teste de Log-Rank apresentou uma diferença estatisticamente significativa entre as curvas com um valor de $p= 0,047$, sendo que se observa uma queda da curva no subgrupo com os LNDs comprometidos quando comparado ao grupo com LNDs livres.

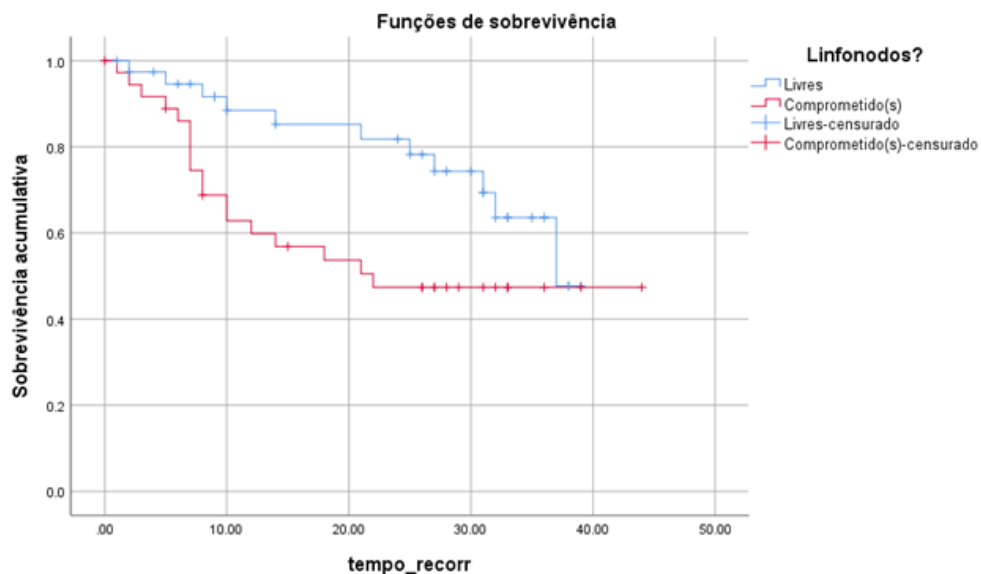


Figura 36. Curva de SLD em função dos LNDs analisados após análise AP. O logRank mostrou uma diferença estatisticamente significativa entre as curvas, observando-se uma queda maior no subgrupo que apresentou LNDs comprometidos.

A **Figura 37** apresenta a curva de SLD em função da detecção do biomarcador EGFR agrupado em dois grupos. O grupo denominado EGFR1 são os pacientes que expressaram o biomarcador de forma fraca e/ou os que não o expressaram. Por outro lado, o grupo EGFR2 é aquele que o expressaram de forma moderada ou forte. No caso do primeiro grupo foram registrados 19 eventos de recorrência e no segundo grupo 13 recorrências registradas, o que completou um total de 30 eventos para este BmT. Para o cálculo da diferença entre ambas as curvas, foi aplicado o teste de Log-Rank, cujo valor foi de $p= 0,04$, sendo considerado estatisticamente significativo, o que representaria que o grupo EGFR2 apresenta um menor tempo de aparecimento da recorrência nesses pacientes, com uma rápida queda da curva após tratamento quando comparado ao grupo EGFR1. A SLD atuarial após 30 meses para o EGFR1 foi de 70% e para o EGFR2 de 45%.

No entanto, foi possível ver acentuação da diferença entre as curvas após 30 meses, sendo que a taxa de SLD diminuiu nos pacientes que apresentaram EGFR2 (queda da curva com um tempo de aparecimento rápido da falha clínica para este grupo de pacientes) que pode ser associada como pior fator prognóstico e com alta probabilidade de recidiva.

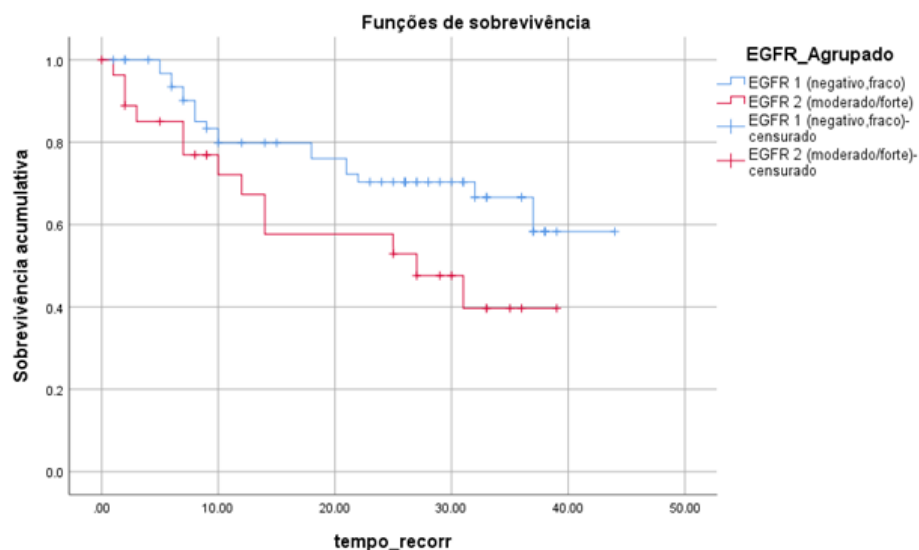


Figura 37. Curva de SLD em função da detecção do EGFR subdividido em dois grupos EGFR 1 e 2. Observa-se uma queda da curva em um menor tempo no subgrupo EGFR 2.

A **Figura 38** mostra a curva de SLD em função da detecção da E-caderina, na qual foram registrados 14 eventos (recorrência) nos pacientes que expressaram o biomarcador. Após aplicação do teste de Log-Rank para avaliação da diferença entre a curva dos pacientes que expressaram ou não o biomarcador, o valor obtido de $p=0,22$, não sendo considerado estatisticamente significativo, o que indicaria que o tempo de aparecimento da recorrência seria igual para ambos os subgrupos (positivo e negativo).

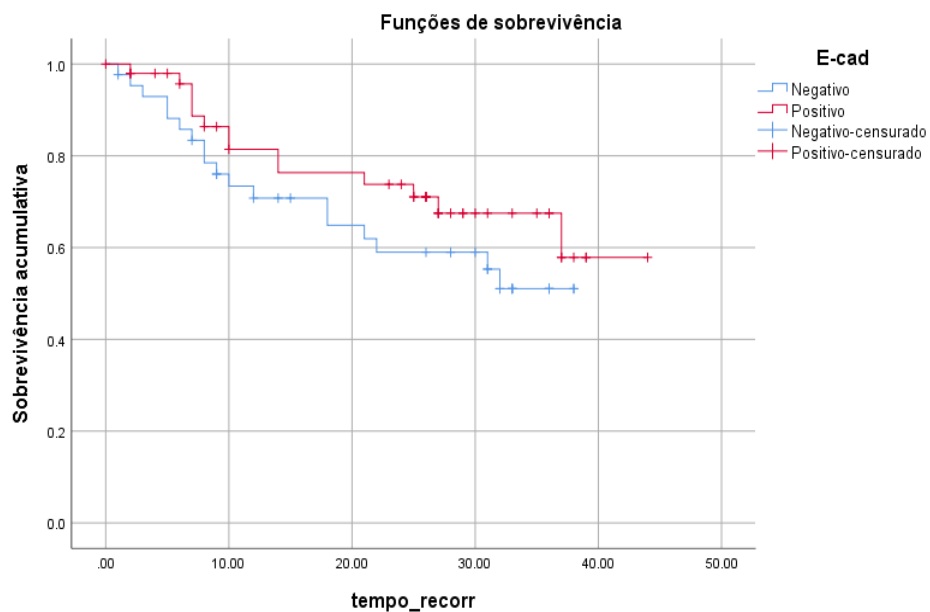


Figura 38. Curva de SLD em função da detecção da E-caderina. A partir da análise de ambas as curvas e teste de logRank não se observou diferença estatisticamente significativa entre elas.

Na **Figura 39** observamos as curvas de SLD em função da detecção do BmT Ciclina-D1, onde foram registrados 32 eventos de recorrência da doença em ambos os subgrupos (positivo e negativo). Para o subgrupo que expressou positivamente o biomarcador houve 32 eventos registrados e para o subgrupo que não expressou o biomarcador somente 2 eventos foram registrados. Após a aplicação do teste logRank, obteve-se um valor de $p=0,14$, que não é considerado estatisticamente significativo, o que indicaria que o tempo de aparecimento da recorrência seria o mesmo para ambos os subgrupos.

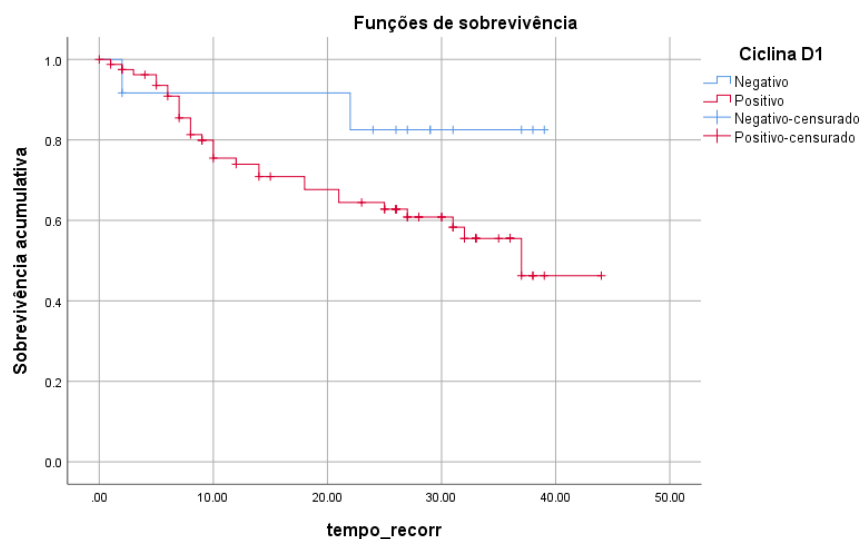


Figura 39. Curva de SLD em função da detecção da Ciclina D1. Observa-se que o tempo de aparecimento da recorrência para ambas as curvas não é estatisticamente significante; porém, o subgrupo que expressou o BmT apresentou uma queda da curva em um tempo menor.

A **Figura 40** apresenta a curva de SLD em função da detecção do BmT p53, na qual foram registrados 32 eventos de recorrência para ambos os subgrupos (positivo e negativo). No subgrupo que expressou o biomarcador foram registrados 20 eventos e no subgrupo negativo 12 eventos foram registrados. A partir do teste de logRank com valor de $p=0,55$, foi observado que não houve diferença estatisticamente significativa entre ambas as curvas, o que indicaria que o tempo de aparecimento da recorrência seria igual para ambos os subgrupos.

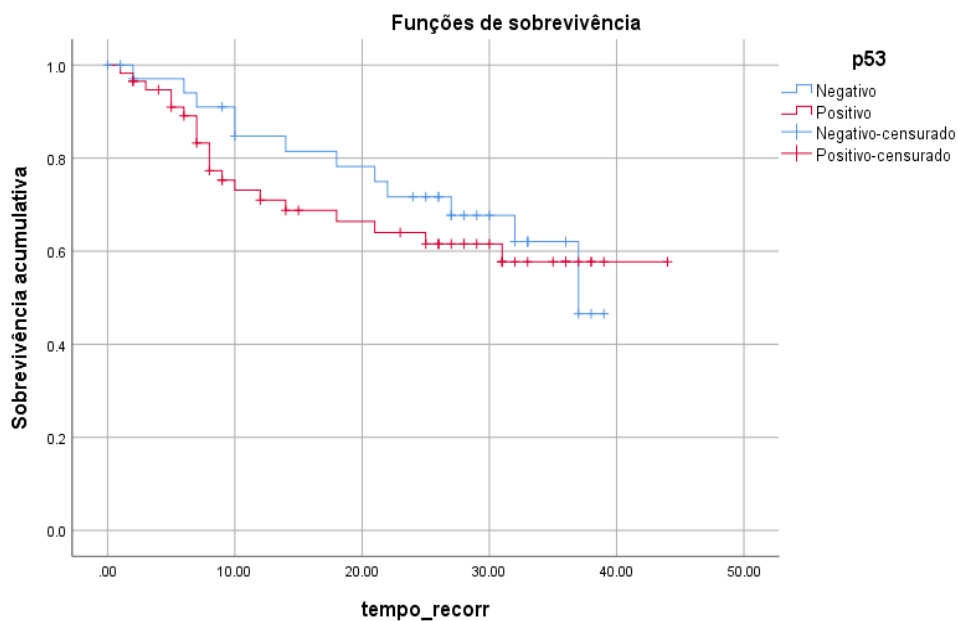


Figura 40. Curva de SLD em função da detecção do p53. Observa-se que ambas as curvas apresentam um tempo de aparecimento similar (queda) para cada subgrupo que apresentou o evento (falha clínica). Após teste de logRank confirmou-se que não há diferença estatisticamente significante entre ambos os grupos.

Na **Figura 41** observamos a curva de SLD em função da detecção do BmT p16. Foram detectados 33 eventos (recorrência), sendo que o grupo que não expressou o biomarcador apresentou um maior número de eventos (30) quando comparado com o grupo que expressou a proteína (3). No entanto, através do teste de Log-Rank para detecção de diferença entre as curvas, o valor de $p= 0,24$ mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa entre ambas as curvas, o que indicaria que o tempo de aparecimento da recorrência seria similar para ambos os subgrupos (positivo e negativo).

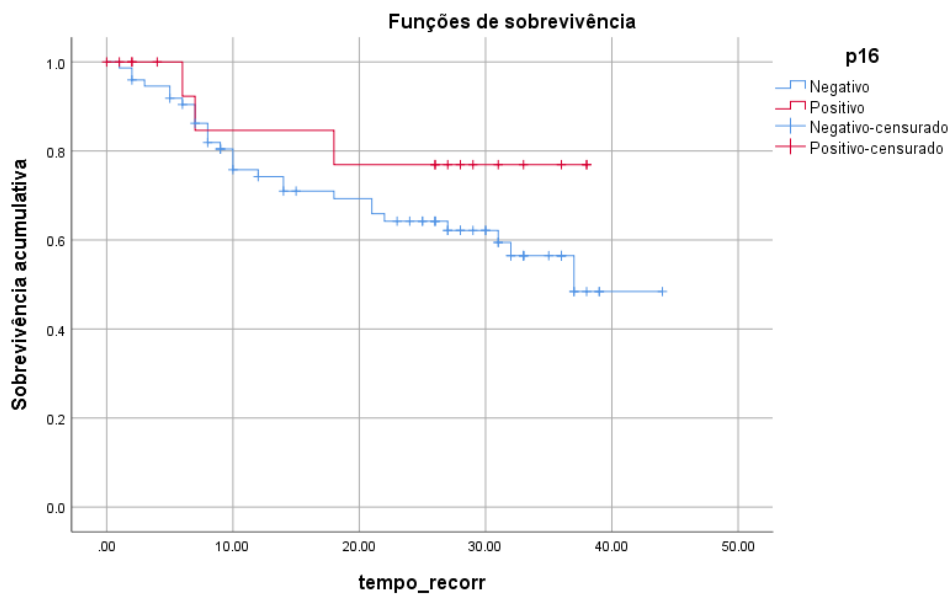


Figura 41. Curva de SLD em função da detecção do p16. Observa-se uma maior queda da curva de sobrevivência nos pacientes que NÃO expressaram o biomarcador; no entanto, o logRank mostrou que não houve diferença estatisticamente significativa para ambos os grupos.

Em uma análise agrupada dos BmTs em dupla, com finalidade de obtermos alguma informação de relevância clínica, e com referência à curva de SLD e/ou ao tempo de aparecimento da recorrência através do Kaplan Meier. Para o caso da combinação do EGFR e a E-caderina obteve um valor de $p: 0,05$ que apontaria uma diferença estatisticamente significativa entre os subgrupos que expressaram e/ou não expressaram ambos os BmTs.

Na **Figura 42** nota-se que há uma queda das curvas de forma geral após 20 meses de realizado o tratamento. Por outro lado, pode ser observado que no grupo que expressou o EGFR de forma moderada a forte (EGFR2) e não expressou a E-caderina teve uma maior queda da curva em um período menor (menos de 10 meses) o que indicaria que a falha clínica nesses pacientes poderia ser apresentada precocemente.

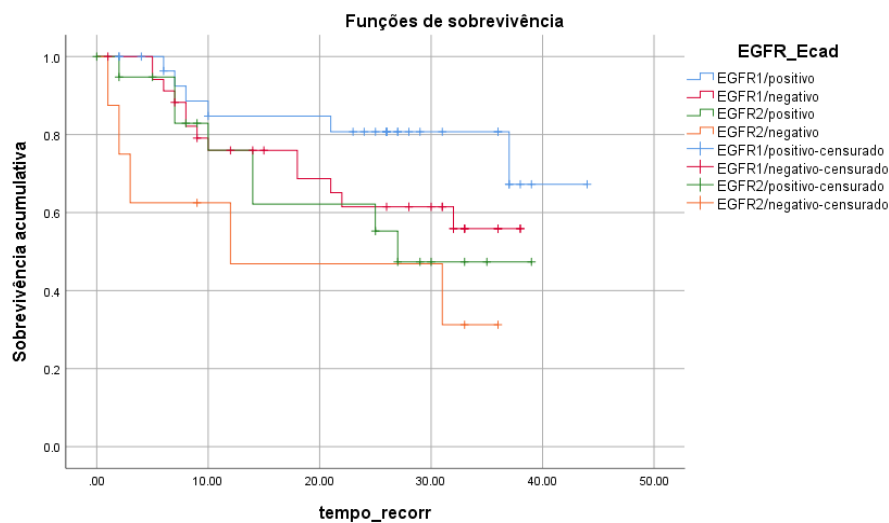


Figura 42. Curva de SLD em função do agrupamento dos BmTs EGFR e E-caderina.

4.6 ANÁLISE MULTIVARIADA DE REGRESSÃO DE COX

Para o cálculo da razão de risco (RR) (*hazard ratio/ HR*) foi estabelecido o modelo de regressão de Cox com a finalidade de quantificarmos o risco de aparecimento da recorrência a partir da expressão dos BmTs e dos critérios morfológicos obtidos na análise histopatológica. Foram construídos três modelos nos quais foram incluídos os BmTs com o valor estatisticamente significativos no teste de logRank e da presença da extensão extracapsular através da análise multivariada de Cox.

No modelo apresentado na **Tabela 13** estão incluídos a EEC, o EGFR agrupado e a E-caderina. As duas colunas apresentam o valor de p obtido e a RR em amarelo e vermelho respectivamente. Para o caso do grupo que apresentou extensão extracapsular o valor de p obtido foi de 0,05 e a RR foi de 3,68, o que representaria que os pacientes que apresentaram extensão extracapsular mostraram 3 vezes mais o risco de apresentarem a recorrência após tratamento. Para o caso do EGFR agrupado, o valor de p obtido foi de 0,016 e a RR 4,971, indicou que os pacientes que expressaram o EGFR II apresentariam quase 5 vezes mais o risco de aparecimento da recorrência do que os pacientes que expressaram de forma fraca ou os que não o apresentaram (EGFR I). Finalmente, para o subgrupo do BmT e-caderina, chegou ao valor de p: 0,056, sendo que o RR é inferior a 1, pelo qual pode considerar que a expressão da E-caderina seria um “fator protetor”, apresentando um risco reduzido de aparecimento da recorrência, com um valor de p: 0,294.

Tabela 13. Regressão de Cox - análise multivariada (MODELO 1)

Critérios morfológicos / BmTs	B	SE	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	95.0% CI para Exp (B)	
							Inferior	Superior
Ext Extra	1,302	0,663	3,852	1	0,050	3,675	1,002	13,484
EGFR_Agrupado	1,604	0,665	5,811	1	0,016	4,971	1,349	18,308
E-cad	-1,223	0,640	3,654	1	0,056	0,294	0,084	1,032

Na **Tabela 14** pode ser visto um outro modelo a partir da análise multivariada. Observa-se que no caso do subgrupo que apresentou EEC como variável incluída no modelo com RR 2,72 ($p= 0,08$) poderia ser relacionado a um risco em duplo de aparecimento da recorrência nos pacientes que a apresentaram. Por outro lado, mantém o EGFR como fator preditor de risco de recorrência com RR de 3,97 ($p= 0,02$). Por outro lado, pôde ser incluso o BmT p53 RR de 1,259 ($p= 0,65$), o que mesmo não se obtendo um valor de p estatisticamente significativo, os pacientes que expressaram o BmT teriam um aumento no risco de aparecimento da falha clínica. Por fim, para o caso da E-caderina, o RR manteve-se inferior a 1 (0,422) que representaria um risco reduzido de aparecimento de recorrência e seria considerado como “fator protetor”.

Tabela 14. Regressão de Cox - análise multivariada (MODELO 2)

Critérios morfológicos / BmTs	B	SE	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	95.0% CI para Exp (B)	
							Inferior	Superior
Extensão Extracapsular (EEC)	1.027	0.585	3.082	1	0.079	2.792	0.887	8.782
EGFR_Agrupado	1.379	0.579	5.681	1	0.017	3.973	1.278	12.351
p53	0.230	0.513	0.201	1	0.654	1.259	0.461	3.439
E-Caderina	-0.863	0.563	2.346	1	0.126	0.422	0.140	1.273

Na **Tabela 15** foram incluídas outras variáveis no modelo, tais como tamanho tumoral, invasão perineural (IP) e pior padrão de infiltração (PPI). Para a variável tamanho tumoral com RR 3,672 ($p=0,078$), sendo o valor de p marginal. No caso da IP com RR 0,161 ($p=0,03$), resultou em uma RR inferior a 1, pelo qual não seria considerado um fator que aumentaria o risco de recorrência segundo o modelo. No caso do PPI com RR 10,76 ($p=0,07$), o valor de p também foi marginal e devido a uma RR alta (o risco de aparecimento da recorrência aumentado em até 10 vezes), futuros estudos de maiores coortes deverão ser realizados para esclarecimento deste fato.

Por fim, as outras três variáveis já incluídas nos modelos descritos anteriormente confirmam os resultados dos termos sobre a EEC (RR: 11,48/ $p:0,01$) e do EGFR (RR: 10,75 / $p=0,001$) como dois fatores preditivos de risco de aparecimento da recorrência após o final do tratamento em até 11 vezes. A expressão positiva da E-caderina seria considerada um risco reduzido (“fator protetor”).

Tabela 15. Regressão de Cox - análise multivariada (MODELO 3)

Critérios morfológicos / BmTs	B	SE	Wald	gl	Sig.	Exp(B)	95.0% CI para Exp (B)	
							Inferior	Superior
Tamanho tumoral	1.301	0.739	3.101	1	0.078	3.672	0.863	15.622
Invasão perineural	-1.827	0.852	4.602	1	0.032	0.161	0.030	0.854
Pior padrão de infiltração (2)	2.375	1.311	3.283	1	0.070	10.756	0.823	140.483
Extensão extracapsular (EEC)	2.441	0.949	6.619	1	0.010	11.479	1.788	73.682
EGFR Agrupado	2.375	0.736	10.400	1	0.001	10.748	2.538	45.510

E- Caderina	-1.921	0.730	6.921	1	0.009	0.147	0.035	0.613
-------------	--------	-------	-------	---	-------	-------	-------	-------

5. DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a associação e a predição do aparecimento da recorrência a partir da detecção dos BmTs p16, p53, E-caderina, Ciclina-D1 e EGFR nos pacientes diagnosticados com câncer oral e que foram submetidos à abordagem multimodal. Foram correlacionadas as características demográficas, clínicas e tumorais dos pacientes, além do cálculo da taxa de SG e da SLD em função dos BmTs, e através da análise multivariada e cálculo da razão de risco (RR) foram propostos três modelos que indicariam os fatores de risco independentes com potencial caráter preditivo de recorrência na população avaliada.

O câncer de cabeça e pescoço (CCP) é o sexto tumor maligno mais frequente na população mundial e que leva a óbito mais de 350.000 pessoas por ano, mesmo com os avanços significativos que vão desde a prevenção até a terapêutica com a imunoterapia e terapias alvo (CHENG et al. 2021). Mais de 90% dos cânceres diagnosticados na região de CP correspondem ao carcinoma de células escamosas (CEC), cuja taxa de sobrevida ainda permanece sendo de 25% entre os pacientes que desenvolvem um segundo tumor após 05 anos do diagnóstico inicial (PELTANOVA et al. 2019). Cabe destacar que o microambiente tumoral abrange diversos fenômenos bioquímicos reguladores do processo de carcinogênese e tumorigênese (BHAT et al. 2021) que incluem: evasão da apoptose das células tumorais, indução de angiogênese, desregulação da energia gerada no metabolismo celular, resistência de parte das células tumorais à detecção do sistema imune e consequente destruição e ativação da invasão tumoral e metástase à distância, os quais têm sido estabelecidos e associados à progressão do CCP; porém, novas descobertas ao nível intracelular e molecular tem favorecido a instauração de estratégias que visem atingir estes fenômenos e consigam um melhor controle local (CL), locorregional (CLR), metástases recorrentes (MR) e consequentemente aumentos nas taxas de SG, SLD e sobrevida livre de progressão (SLP). Inúmeras proteínas têm sido vinculadas ao desenvolvimento do tumor, sendo que a participação e a presença delas têm sido associadas a piores prognósticos e à resistência às terapêuticas baseadas em drogas-alvo, o que torna o panorama ainda mais incerto para o aumento de SG em 05 anos em mais de 50% da população tratada de forma

multimodal (cirurgia com terapias adjuvantes) (SIRIWARDENA et al. 2020), (PELTANOVA et al. 2019).

Neste estudo foram analisados 100 pacientes diagnosticados e tratados através de duas abordagens, que são amplamente descritas na literatura baseada exclusivamente na ressecção cirúrgica (monoterapia) e está somada a uma ou mais adjuvâncias (abordagem multimodal), sendo que a SG após quase 04 anos manteve-se em mais de 60% da população com uma tendência a estabilização da curvas após este período de tempo; porém, notou-se que pelo reduzido número de pacientes analisados no estudo “n” não é possível conseguir afirmar de forma definitiva que isto se aplica para toda a população tratada na instituição. No entanto, estudos prévios descritos na literatura mostram uma SG de até 05 anos após diagnóstico em 50% da população analisada (ADAMSKI et al. 2021), (MAGNES et al. 2021), (SIRIWARDENA et al. 2020), (POLVERINI et al. 2018).

No nosso estudo foi detectada uma maior prevalência de pacientes acometidos do sexo masculino (69%) e com idade ao diagnóstico de mais de 60 anos (61%); porém, ambas as características não apresentaram correlação com a recorrência tumoral e os outros parâmetros histopatológicos associados, assim como na SG e SLD para ambos os casos. No entanto, destaca-se que o número reduzido da nossa amostra (n=100 pacientes) pode ser um fator limitante para obtenção de um maior poder estatístico com uma possível significância e detecção de potenciais fatores independentes para predição de risco de recorrência da doença, pôde ser notado que os homens maiores de 60 anos tiveram mais eventos de recorrência do que as mulheres e resultados similares foram descritos na literatura(SIRIWARDENA et al. 2020).

Na nossa análise com respeito aos critérios morfológicos tumorais, a invasão perineural teve o valor de p de 0,032 e o RR 0,161, resultando em uma razão de risco inferior 1, não o colocando como um fator que aumentaria o risco de recorrência segundo o modelo que propusemos, no entanto, segundo a literatura atual a invasão perineural é um dos critérios mais associados às altas taxas de recorrência local e locorregional, o que diverge com o nosso resultado (MAGNES et al. 2021), (SIRIWARDENA et al. 2020), (PELTANOVA et al. 2019).

O critério morfológico tumoral referente ao pior padrão de infiltração, $p=0,070$ e RR 10,76 o que indicaria que aqueles que apresentaram um padrão de infiltração desfavorável (3, 4 e 5) apresentaram 10 vezes mais o risco de apresentar recorrência com comparado com os que tinham padrão de infiltração “favorável” (1 e 2), o que converge com o descrito atualmente na literatura (SIRIWARDENA et al. 2020); porém, para uma real confirmação deste dado seriam necessários mais casos em nosso estudo.

Neste estudo foram analisados 05 BmTs associados a tumorigênese, progressão tumoral, prognóstico e reaparecimento do câncer oral descritos amplamente na literatura nas diferentes fases do processo de carcinogênese. Na população de estudo os BmTs foram detectados em tal porcentagem: p53 (63%), Ciclina D1 (87,9%), EGFR (66%), E-caderina (53,5%) e p16 (21,2%), sendo este último o mais prevalente em pacientes portadores de CEC de orofaringe e em menor proporção no CEC de cavidade oral, sendo confirmado a partir dos nossos resultados. No entanto, a Ciclina D1 cuja alta expressão tem sido associada à progressão locorregional da doença (metástase linfonodal) não foi correlacionada de modo estatisticamente significativo ($p=0,159$ / $p=0,483$) à presença de um maior número de linfonodos comprometidos e infiltrado linfoide (de forma moderada) respectivamente nesta população de estudo, o que pode ser justificado pelo número reduzido de pacientes analisados e que ainda não está claramente descrito na literatura (MONTALTO e DE AMICIS 2020), (LOH et al. 2019), (NOORLAG et al. 2017).

Por outro lado, a expressão da E-caderina esteve associada de modo estatisticamente significativo ao infiltrado linfonodal, o que confirma a correlação entre a ocorrência de metástase do tumor primário aos linfonodos locorregionais e a detecção em altas porcentagens deste BmT também descrito na literatura (LOH et al. 2019), (YAZDANI et al. 2018), (SHERGILL et al. 2018). Da mesma forma, outro estudo avaliou a expressão de ambos os BmTs e sua correlação com maior estadiamento clínico-patológico, no qual encontraram que a perda da expressão da E-caderina e uma alta expressão da Cilina-D1 estavam associadas a maior incidência de metástase linfonodal e um TNM elevado, o que ressalta a importância da análise da combinação de ambos os biomarcadores como fatores prognósticos (LOH et al. 2019), (SHERGILL et al. 2018).

No que diz respeito à expressão dos BmTs e as características demográficas da população deste estudo, foi observada uma correlação ($p:0,041$) entre o sexo e a expressão

do p53, sendo que haveria uma maior predominância nos pacientes do sexo masculino na expressão deste BmT, correlacionado com os achados na literatura atual (RAGOS et al. 2018), (SOLOMON et al. 2016) Ainda nas correlações foi visto que, os pacientes que fumam e bebem simultaneamente apresentaram uma maior expressão do p53, sendo registrada uma associação entre o tabagismo/etilismo e a expressão positiva de p53 para esta população do estudo, o que confirmaria o que já foi descrito na literatura, considerando que ambos os fatores são independentes para predizer o risco de aparecimento, progressão e recorrência do CEC de cavidade oral, e que a mutação do p53 tem sido detectada em altas porcentagens nestes pacientes (PELTANOVA et al. 2019), (PLATH et al. 2018), (KUPFERMAN e MYERS 2006). No entanto, o impacto da expressão do p53 na SG e SLD dos pacientes tabagistas e etilistas ainda é controverso no que diz respeito a este fator ser independente na predição de risco de recorrência local e/ou locorregional e à distância, apesar que, nosso estudo mostrou uma diferença estatisticamente significativa ($p: 0,002$) entre as curvas no caso da SLD em três anos (36 meses), havendo uma queda maior na curva dos pacientes que fumam, mas que não são elitistas (**Figura 19**). Uma recente revisão da literatura mostrou que, pacientes que continuaram fumando durante o período da RT, pode ter associação com as baixas taxas de respostas e curvas de sobrevida (SG e SLD) diminuídas quando comparadas aos dos pacientes que pararam de fumar antes do tratamento ou não fumantes (MAGNES et al. 2021). Por outro lado, neste mesmo estudo, quando avaliado a coexistência dos diferentes fatores contribuintes ao desenvolvimento e progressão do CEC em cavidade oral foi visto que os pacientes HPV positivos e fumantes apresentam altas taxas de recorrência e metástases à distância, além de um pior prognóstico, quando comparado à pacientes HPV positivos não tabagistas (MAGNES et al. 2021), (SIRIWARDENA et al. 2020).

A marcação positiva de p16 apresentou uma baixa expressão nas amostras analisadas (21,2%) quando comparada aos outros BmTs, sendo que este BmT tem sido associado com maior frequência ao desenvolvimento de CEC na região de orofaringe e com baixa prevalência em outras topografias, tais como assoalho de boca, língua, mucosa bucal e/ou jugal e outras áreas da cavidade oral. Uma maior expressão do p16 tem sido observada em pacientes infectados pelo papiloma vírus humano (*Human papilloma virus* -HPV) e dentro do mecanismo fisiopatológico seria o bloqueio e desregulação por parte das oncoproteínas E6 e E7 provenientes deste vírus sobre os supressores tumorais p53 e a proteína do

retinoblastoma (Rb). Cabe destacar que, os BmTs Ciclina D1 e p53 são pouco expressos ou detectados em pacientes HPV relacionados ou associados ao CEC de outras topografias na região de cabeça e pescoço (PLATH et al. 2018). Mas, um recente estudo de coorte retrospectivo com um tempo de acompanhamento a partir de 36 meses até 119 meses avaliou pacientes portadores de CEC de orofaringe associados ou não à expressão do p16, sendo que, os pacientes que apresentaram uma alta taxa de expressão positiva do p16 tiveram como principal desfecho clínico, uma melhora na taxa de SG e SLDE e a identificação de baixa expressão dos outros biomarcadores (p53, Ciclina D1, pRb). Outro estudo destacou que pacientes HPV positivos e que desenvolveram câncer na região da cavidade oral associado à infecção apresentaram pior na taxa de sobrevida livre de doença (SLD) (MAGNES et al. 2021), (PLATH et al. 2018).

A partir dos resultados obtidos observou-se que a expressão do EGFR de forma moderada a forte está relacionada com uma diminuição nas taxas de SLD (PATEL e SABA 2021), e com o aparecimento precoce de recorrência da doença. Conforme descrito na literatura, o fator de crescimento epidérmico (EGFR) está associado com pior prognóstico, uma redução na SG e na SLD através do estímulo de maior diferenciação e proliferação das células tumorais através da ativação de processos bioquímicos com capacidade de estimular diferentes vias de sinalização, que interferem no ciclo celular e na tumorigênese; porém, permanece incerto a associação de mutações à este oncogene que ajam como biomarcadores de predição de risco de falha clínica e que os mecanismos inibidores do EGFR causem um impacto maior no tratamento de CCP no que diz respeito ao ganho na SG, SLD (PATEL e SABA 2021). Uma das terapêuticas baseadas na Cisplatina concomitante à RT adjuvante tem mostrado maiores taxas de controle local e locoregional e um aumento prolongado na taxa de sobrevida livre de doença específica (SLDE) no câncer de cavidade oral, sendo que este quimioterápico é usado dentro dos principais esquemas terapêuticos e que se baseia na sua alta capacidade antitumoral como potencializadora da RT e aumento da capacidade citorrredutora. No entanto, estudos recentes mostraram resistência ao tratamento com cisplatina em pacientes com CEC de cavidade oral associados a múltiplos fatores, tais como o microambiente tumoral, superexpressão do EGFR, inibição do mecanismo de apoptose nas células tumorais, entre outros mecanismos ao nível molecular (CHENG et al. 2021), (CHOI et al. 2021). Tendo em vista o que já foi descrito, novas

estratégias terapêuticas baseadas na combinação de terapias direcionadas à inibição do EGFR superexpresso na doença localmente avançada para CCP são potenciais tratamentos, como o Cetuximab sendo um dos agentes mais usados atualmente (VAHABI et al. 2021), (CHOI et al. 2021), (CHENG et al. 2021). Um estudo multicêntrico fase III mostrou que o regime baseado em Cetuximab mais platina com fluoracil melhorou a taxa de resposta ao tratamento, a SLP e a SG dos pacientes com doença recorrente local e à disseminação à distância quando comparado a esquemas de platina-fluoracil isoladas (CHENG et al. 2021).

Neste estudo foi observado que a expressão do EGFR foi encontrada em 66% da população e que através da análise multivariada de Cox (Razão de risco (RR): 4, 971; p: 0,016) torna-se um fator de risco independente de recorrência, sendo que o risco aumenta até 4 vezes nos pacientes que o expressaram versus os que não o tiveram. Com isto, é confirmado mais uma vez os achados na literatura ea necessidade da instauração de detecção deste BmT em pacientes com doença localmente avançada, doença recorrente e com disseminação à distância, e desta forma, a conduta terapêutica baseada nos esquemas atuais com terapias alvo, imunoterapia (antiPDL-1) e Cetuximab com esquemas convencionais (platina-fluoracil) consiga ser instaurada primariamente através desta análise molecular.

Mesmo que as drogas inibidoras dos receptores de EGFR tais como cisplatina e Cetuximab (nos casos de resistência), o cenário atual mostra que novas estratégias têm sido implementadas através do uso da imunoterapia associada a esquemas convencionais de quimioterapia baseada na alta ou baixa expressão da proteína programadora de morte celular (PD-1) e o ligante da proteína programadora de morte celular (PD-L1) sendo que este último se constitui como o biomarcador preditivo mais importante para uso da imunoterapia. Altas taxas de expressão do PD-L1 estão associadas a um pior prognóstico em pacientes abordados de forma multimodal (cirurgia, radioterapia, quimiorradioterapia), pelo qual drogas anti-PD-L1 têm sido desenvolvidas, sendo o principal e já usado em primeira linha para casos avançados, com múltiplas recorrências e metastáticos como o caso de Pembrolizumabe. O uso somente do Pembrolizumabe ou em combinação com outras drogas como a platina e o fluoracil são esquemas que já são usados nos grandes centros de referência mundialmente para casos refratários ao tratamento convencional e com alto risco de metástase à distância (ADAMSKI et al. 2021), (MAGNES et al. 2021).

Por outro lado, a expressão da E-caderina ainda permanece incerta neste grupo de pacientes, já que a análise conjunta com os outros biomarcadores mostrou estar relacionada a um risco diminuído quando comparada aos demais biomarcadores, o que poderia levá-la a ser considerada como um fator “protetor” diferente ao descrito na literatura atualmente. Nosso estudo sugere a necessidade de uma análise mais aprofundada e com um maior número de pacientes para um melhor esclarecimento do papel deste biomarcador na recorrência. No que diz respeito aos diferentes critérios tumorais analisados no nosso estudo, em especial o pior padrão de infiltração como fator prognóstico de recorrência e associado à uma SLD reduzida em trinta meses, o mesmo não foi confirmado na nossa análise, embora já se encontre descrito encontra descrito na literatura (SIRIWARDENA et al. 2020), e que está relacionado a um maior risco de recorrência local, locorregional e metástase à distância quando apresentado em associação ou não a outros fatores tais como extensão extracapsular, invasão perineural, margens cirúrgicas e maior número de linfonodos comprometidos .

6. CONCLUSÕES

A partir dos resultados obtidos neste estudo conclui-se a seguir:

- O risco de falha clínica (recorrência) pode ser avaliado a partir da detecção de biomarcadores tumorais (EGFR e E-caderina) nos pacientes portadores de câncer oral atendidos no A.C. Camargo Cancer Center no período de 2013-2017. A detecção dos BmTs através de IHQ permitiu a identificação deles nas regiões tumorais tais como central, periférica e de frente através de diferentes graus de expressão.
- A expressão do p53 esteve associada ao gênero masculino e em pacientes tabagistas e etilistas, ao passo que a E-caderina se correlacionou a um maior infiltrado linfóide e à presença de invasão perineural nas amostras analisadas.
- A SLD geral neste estudo foi de 60% em 30 meses, sendo que maiores taxas foram associadas à cirurgia exclusiva (80%) do que em pacientes que fizeram cirurgia em conjunto com as terapias adjuvantes (40%) em 30 meses ($p=0,01$).
- Não houve correlação entre a SLD atuarial em 30 meses e o gênero, idade e local de aparecimento do tumor primário. As taxas de SLD atuarial foram reduzidas em pacientes com estadiamento clínico-patológico avançado, com presença de extensão extracapsular, com maior número de linfonodos acometidos, com presença de invasão perineural, com pior padrão de infiltração tipo III, IV e V, além dos que apresentaram margens cirúrgicas comprometidas quando comparadas a pacientes que não apresentavam essas características.
- A SLD atuarial após 30 meses foi reduzida para os pacientes com EGFR superexpresso (moderado a forte). Por outro lado, a perda da expressão da E-caderina se associou com uma menor taxa de SLD.
- De forma geral a expressão do EGFR confirmou-o como um fator de risco independente de predição de risco de falha clínica, e no caso da E-caderina a perda expressão torna-a um fator preditivo de falha clínica dentre os BmTs analisados.

7. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1.- Adamski ŁJ, Starzyńska A, Adamska P, et al. High PD-L1 Expression on Tumor Cells Indicates Worse Overall Survival in Advanced Oral Squamous Cell Carcinomas of the Tongue and the Floor of the Mouth but Not in Other Oral Compartments. **Biomedicines** 2021; 9:1132.
- 2.- Alao JP. The regulation of cyclin D1 degradation: roles in cancer development and the potential for therapeutic invention. **Mol Cancer** 2007; 6:1–16.
- 3.- Almangush A, Heikkinen I, Mäkitie AA, et al. Prognostic biomarkers for oral tongue squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. **Br J Cancer** 2017; 117:856–866.
- 4.- Basheeth N, Patil N. Biomarkers in head and neck cancer an update. **Indian Journal of Otolaryngology and Head & Neck Surgery** 2019; 71:1002–1011.
- 5.- Bhat AA, Yousuf P, Wani NA, et al. Tumor microenvironment: an evil nexus promoting aggressive head and neck squamous cell carcinoma and avenue for targeted therapy. **Signal Transduct Target Ther** 2021; 6:1–15.
- 6.- Carrà G, Crivellaro S, Taulli R, Guerrasio A, Saglio G, Morotti A. Mechanisms of p53 functional de-regulation: role of the I κ B- α /p53 complex. **International Journal of Molecular Sciences** 2016; 17:1997.
- 7.- Cheng Y, Li S, Gao L, Zhi K, Ren W. The Molecular Basis and Therapeutic Aspects of Cisplatin Resistance in Oral Squamous Cell Carcinoma. **Frontiers in Oncology** 2021; 11:

- 8.- Chiang K, Shieh J, Shen C, et al. Epidermal growth factor-induced COX-2 regulates metastasis of head and neck squamous cell carcinoma through upregulation of angiopoietin-like 4. **Cancer Sci** 2020; 111:2004–2015.
- 9.- Choi HS, Kim Y-K, Yun P-Y. Cisplatin Plus Cetuximab Inhibits Cisplatin-Resistant Human Oral Squamous Cell Carcinoma Cell Migration and Proliferation but Does Not Enhance Apoptosis. **International Journal of Molecular Sciences** 2021; 22:8167.
- 10.- Chuerduangphui J, Pientong C, Patarapadungkit N, et al. Amplification of EGFR and cyclin D1 genes associated with human papillomavirus infection in oral squamous cell carcinoma. **Medical Oncology** 2017; 34:1–11.
- 11.- Chung CH, Zhang Q, Hammond EM, et al. Integrating EGFR assay with clinical parameters improves risk classification for relapse and survival in head and neck squamous cell carcinoma. **Int J Radiat Oncol Biol Phys** 2011; 81:331.
- 12.- Chung CH, Gillison ML. Human papillomavirus in head and neck cancer: its role in pathogenesis and clinical implications. **Clinical cancer research** 2009; 15:6758–6762.
- 13.- Da Silva JAG. Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil. **Rio de** 2020;
- 14.- De Kort WWB, Spelier S, Devriese LA, Van Es RJJ, Willems SM. Predictive value of EGFR-PI3K-AKT-mTOR-pathway inhibitor biomarkers for head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review. **Mol Diagn Ther** 2021; 25:123–136.
- 15.- Harris TJR, McCormick F. The molecular pathology of cancer. **Nature reviews Clinical oncology** 2010; 7:251–265.

16.- Johnson DE, Burtneß B, Leemans CR, Lui VWY, Bauman JE, Grandis JR. Head and neck squamous cell carcinoma. **Nature reviews Disease primers** 2020a; 6:1–22.

17.- Johnson DE, Burtneß B, Leemans CR, Lui VWY, Bauman JE, Grandis JR. Head and neck squamous cell carcinoma. **Nature reviews Disease primers** 2020b; 6:1–22.

18.- Kreppel M, Nazarli P, Grandoch A, et al. Clinical and histopathological staging in oral squamous cell carcinoma—Comparison of the prognostic significance. **Oral Oncol** 2016; 60:68–73.

19.- Krisanaprakornkit S, Iamaroon A. Epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma. **International Scholarly Research Notices** 2012; 2012:

20.- Kupferman ME, Myers JN. Molecular biology of oral cavity squamous cell carcinoma. **Otolaryngologic Clinics of North America** 2006; 39:229–247.

21.- Lee YS, Johnson DE, Grandis JR. An update: emerging drugs to treat squamous cell carcinomas of the head and neck. **Expert Opin Emerg Drugs** 2018; 23:283–299.

22.- Leemans CR, Snijders PJF, Brakenhoff RH. **The molecular landscape of head and neck cancer** *Nature Reviews Cancer* Nature Publishing Group, 2018; .

23.- Liao C-T, Lee L-Y, Hsueh C, et al. Tumor depth of invasion (tumor > 4 cm/depth > 10 mm and depth > 20 mm) and through cortex/skin invasion are both valid criteria for classifying tumors as pT4a in AJCC 2018 oral cavity cancer staging system. **Annals of Surgical Oncology** 2019; 26:3663–3672.

- 24.- Loh C-Y, Chai JY, Tang TF, et al. The E-cadherin and N-cadherin switch in epithelial-to-mesenchymal transition: signaling, therapeutic implications, and challenges. **Cells** 2019; 8:1118.
- 25.- Magnes T, Wagner S, Kiem D, et al. Prognostic and predictive factors in advanced head and neck squamous cell carcinoma. **International Journal of Molecular Sciences** 2021; 22:4981.
- 26.- Montalto FI, De Amicis F. Cyclin D1 in cancer: a molecular connection for cell cycle control, adhesion and invasion in tumor and stroma. **Cells** 2020; 9:2648.
- 27.- Nazar M, Naz I, Mahmood MK, Hashmi SN. Immunohistochemical expression of Cyclin D1 and Ki-67 in primary and metastatic oral squamous cell carcinoma. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention: APJCP** 2020; 21:37.
- 28.- Noorlag R, Boeve K, Witjes MJH, et al. Amplification and protein overexpression of cyclin D1: predictor of occult nodal metastasis in early oral cancer. **Head Neck** 2017; 39:326–333.
- 29.- Owosho AA, Brady P, Wolden SL, et al. Long-term effect of chemotherapy–intensity-modulated radiation therapy (chemo-IMRT) on dentofacial development in head and neck rhabdomyosarcoma patients. **Pediatr Hematol Oncol** 2016; 33:383–392.
- 30.- Patel B, Saba NF. Current Aspects and Future Considerations of EGFR Inhibition in Locally Advanced and Recurrent Metastatic Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. **Cancers (Basel)** 2021; 13:3545.

- 31.- Peltanova B, Raudenska M, Masarik M. Effect of tumor microenvironment on pathogenesis of the head and neck squamous cell carcinoma: a systematic review. **Mol Cancer** 2019; 18:1–24.
- 32.- Plath M, Broglie MA, Förbs D, Stoeckli SJ, Jochum W. Prognostic significance of cell cycle-associated proteins p16, pRB, cyclin D1 and p53 in resected oropharyngeal carcinoma. **Journal of Otolaryngology-Head & Neck Surgery** 2018; 47:1–9.
- 33.- Polverini PJ, D’Silva NJ, Lei YL. Precision therapy of head and neck squamous cell carcinoma. **J Dent Res** 2018; 97:614–621.
- 34.- Ragos V, Mastronikolis NS, Tsiambas E, et al. p53 mutations in oral cavity carcinoma. **J BUON** 2018; 23:1569–1572.
- 35.- Ramos-García P, González-Moles MÁ, Gonzalez-Ruiz L, Ruiz-Avila I, Ayen A, Gil-Montoya JA. Prognostic and clinicopathological significance of cyclin D1 expression in oral squamous cell carcinoma: A systematic review and meta-analysis. **Oral Oncol** 2018; 83:96–106.
- 36.- Ramos-García P, Bravo M, González-Ruiz L, González-Moles M. Significance of cytoplasmic cyclin D1 expression in oral oncogenesis. **Oral Diseases** 2018; 24:98–102.
- 37.- Ramos-García P, González-Moles MÁ, González-Ruiz L, et al. Clinicopathological significance of tumor cyclin D1 expression in oral cancer. **Archives of Oral Biology** 2019; 99:177–182.

- 38.- Shergill K, Sen A, Pillai HJ. Role of E-cadherin and cyclin D1 as predictive markers of aggression and clonal expansion in head and neck squamous cell carcinoma. **J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg** 2018; 44:182–190.
- 39.- Sinevici N, O'sullivan J. Oral cancer: Deregulated molecular events and their use as biomarkers. **Oral Oncol** 2016; 61:12–18.
- 40.- Siriwardena B, Karunathilaka H, Kumarasiri PVR, Tilakaratne WM. Impact of Histological and Molecular Parameters on Prognosis of Oral Squamous Cell Carcinoma: Analysis of 290 Cases. **Biomed Res Int** 2020; 2020:
- 41.- Solomon MC, Vidyasagar MS, Fernandes D, et al. The prognostic implication of the expression of EGFR, p53, cyclin D1, Bcl-2 and p16 in primary locally advanced oral squamous cell carcinoma cases: a tissue microarray study. **Medical Oncology** 2016; 33:1–7.
- 42.- Stone A, Harrington K, Frakes M, et al. EGFR and c-Met inhibitors are effective in reducing tumorigenicity in cancer. 2014;
- 43.- Szentkúti G, Dános K, Brauswetter D, et al. Correlations between prognosis and regional biomarker profiles in head and neck squamous cell carcinomas. **Pathology & Oncology Research** 2015; 21:643–650.
- 44.- Toratani S, Ogawa I, Sasahara H, et al. Pathological factors involved in local failure in squamous cell carcinoma of the oral cavity: retrospective study and proposal of a new clinical classification. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery** 2019; 48:143–151.

45.- Vahabi M, Blandino G, Di Agostino S. MicroRNAs in head and neck squamous cell carcinoma: a possible challenge as biomarkers, determinants for the choice of therapy and targets for personalized molecular therapies. **Translational Cancer Research** 2021; 10:3090.

46.- Yazdani J, Ghavimi MA, Jabbari Hagh E, Ahmadpour F. The role of E-cadherin as a prognostic biomarker in head and neck squamous carcinoma: A systematic review and meta-analysis. **Mol Diagn Ther** 2018; 22:523–535.

47.- Yogosawa S, Yoshida K. Tumor suppressive role for kinases phosphorylating p53 in DNA damage-induced apoptosis. **Cancer Sci** 2018; 109:3376–3382.

48.- Zhao Y, Yu D, Li H, et al. Cyclin D1 overexpression is associated with poor clinicopathological outcome and survival in oral squamous cell carcinoma in Asian populations: insights from a meta-analysis. **PLoS One** 2014; 9:e93210.

49.- Zhao Z, Ge J, Sun Y, et al. Is E-cadherin immunoexpression a prognostic factor for head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC)? A systematic review and meta-analysis. **Oral Oncol** 2012; 48:761–767.

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

**COMITÊ DE ÉTICA
EM PESQUISA - CEP**

APROVAÇÃO


Os membros do Comitê de Ética em Pesquisa da Fundação Antônio Prudente – A.C. Camargo Cancer Center, em sua última reunião de **10/12/2019**, **aprovaram** a realização do projeto n°. **2814/19** intitulado: **“PREDIÇÃO DE RISCO DE FALHA BASEADA NA CLASSIFICAÇÃO MOLECULAR EM CÂNCER DE CAVIDADE BUCAL.”**

Pesquisador Responsável: Antonio Cassio Assis Pellizzon
Aluno: Wilber Edison Bernaola-Paredes (Doutorado)

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

São Paulo, 16 de dezembro de 2019.

Atenciosamente,



Dra. Sandra Caires Serrano
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa