



UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA
"JÚLIO DE MESQUITA FILHO"
Campus de São José dos Campos
Instituto de Ciência e Tecnologia

LUCIANA ROCHA STRIEDER

**ANÁLISE DA PROTEÍNA EGFR EM CARCINOMA
ESPINOCELULAR DE LÁBIO**

2015

LUCIANA ROCHA STRIEDER

**ANÁLISE DA PROTEÍNA EGFR EM CARCINOMA ESPINOCELULAR
DE LÁBIO**

Dissertação apresentada ao curso de Odontologia do Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP – Univ Estadual Paulista, Campus de São José dos Campos, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área de Patologia.

Orientador: Profa. Dra. Estela Kaminagakura Tango

São José dos Campos

2015

BANCA EXAMINADORA

Profa. Dra. Estela Kaminagakura Tango (Orientador)

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP - Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

Profa. Tit. Dra. Yasmin Rodarte Carvalho

Instituto de Ciência e Tecnologia
UNESP - Univ Estadual Paulista
Campus de São José dos Campos

Profa. Dra. Cláudia Malheiros Coutinho Camillo

Centro Internacional de Pesquisa e Ensino
A.C. Camargo Cancer Center
São Paulo

São José dos Campos, 11 de dezembro de 2015.

DEDICATÓRIA

*Aos meus pais, **Maria Socorro Rocha Strieder** (in memorian) e **Clécio Luiz Strieder**, por todo o carinho, dedicação e pela educação que me deram sem a qual não seria capaz de suportar a distância.*

*Ao meu marido, **Bruno Guerreiro**, pelo carinho, paciência e principalmente pelo apoio durante toda minha trajetória longe de casa. Sem seu incentivo, eu teria desistido nos primeiros meses.*

*À minha querida vó materna, **Maria de Nazaré Rocha**, por todos os dias de orações para mim, incentivo e apoio.*

*Aos meus irmãos **Felipe e Gustavo Strieder**, por todo o amor e carinho que tem por mim.*

AGRADECIMENTOS

*À UNESP - Univ Estadual Paulista, na pessoa do diretor do Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos, **Prof. Dr. Estevão Tomomitsu Kimpura**.*

*Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal, na pessoa da coordenadora **Profa. Adj. Juliana Campos Junqueira**.*

*À minha orientadora, **Profa. Dra. Estela Kaminagakura Tango**, por todo o ensinamento e paciência.*

*Ao **AC Camargo Cancer Center** pelo desenvolvimento de parte desta pesquisa.*

*Ao co-orientador, **Dr. Luiz Paulo Kowalski**, por seu conhecimento transmitido.*

*À **Prof. Adj. Ana Sueli Rodrigues Cavalcante**, por todo o carinho e acolhimento.*

À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado do Amazonas (FAPEAM) pela concessão da bolsa de mestrado que possibilitou minha dedicação ao curso.

*Ao meu amigo, **Victor Bernardes**, por toda ajuda e companheirismo em todos os momentos que precisei.*

*Às professoras **Dra. Renata Falchete do Prado, Profa. Tit. Yasmin Rodarte Carvalho, Profa. Dra. Ana Lia Anbinder, Profa. Dra. Janete Dias Almeida e Dra. Celina Carta** pela ajuda na execução do trabalho e ensino.*

*À **Kátia Klug e Dra. Cláudia Coutinho-Camillo**, por toda ajuda técnica, ensinamentos e conhecimentos transmitidos.*

*À **Agatha Rodrigues** estatística do Hospital AC Camargo, responsável pela análise deste trabalho.*

SUMÁRIO

RESUMO	07
ABSTRACT	08
1 INTRODUÇÃO	09
2 REVISÃO DE LITERATURA	12
2.1 Carcinoma espinocelular.....	12
2.2 Gradação histopatológica	17
2.3 EGFR.....	20
3 PROPOSIÇÃO	23
4 MATERIAL E MÉTODOS	24
4.1 Análise clinicopatológica.....	24
4.2 Gradação histopatológica.....	25
4.3 Análise imuno-histoquímica.....	29
4.4 Análise estatística.....	30
5 RESULTADOS	31
5.1 Análise clinicopatológica.....	31
5.2 Gradação histopatológica.....	39
5.3 Análise imuno-histoquímica.....	47
5.4 Análise estatística.....	49
5.4.1 Análise da sobrevida global.....	49
5.4.2 Análise da sobrevida doença específica.....	58
5.4.3 Análise da sobrevida livre de recorrência.....	59
6 DISCUSSÃO	70
7 CONCLUSÃO	75
8 REFERÊNCIAS	76
ANEXO	80

Strieder L. Análise da proteína EGFR em carcinoma espinocelular de lábio [dissertação]. São José dos Campos (SP): Instituto de Ciência e Tecnologia, UNESP – UNIV Estadual Paulista; 2015.

RESUMO

O carcinoma espinocelular de lábio (CEC) é uma das neoplasias malignas mais comuns, acometendo principalmente lábio inferior devido à exposição solar. Este trabalho teve como objetivo avaliar 3 métodos de gradação histológica (OMS, BD e MRH), analisar a expressão da proteína EGFR no CEC de lábio, comparar com queilite actínica (QA) e correlaciona-las com o prognóstico. Dados de 53 pacientes com CEC de lábio foram coletados para a avaliação clinicopatológica e histológica. 22 casos de CEC e 19 de QA foram submetidos à reação imuno-histoquímica com a proteína EGFR e analisados por um analisador automatizado para avaliação da expressão proteica. A média de idade foi de 65 anos, 69,8% foram homens, o lábio inferior foi o local de predileção com 94,4% e 66,03% dos pacientes estavam em estádios precoces (T1+T2). 28 (52,83%) e 34 (64,15%) casos respectivamente foram graduados em baixo risco prognóstico ou grau 1 pelas escalas BD e OMS, o modelo MRH graduou a 29 (54,72%) casos como médio risco prognóstico ou grau 2. O modelo de gradação mais simples e fácil de ser aplicado em CEC de lábio foi a Escala BD e o mais eficaz, pois quando em alto grau histológico foi associado à menor sobrevida global ($P=0,045$). A sobrevida global foi de 87,8% em 5 anos. Estadiamento clínico avançado (T3+T4) e envolvimento linfonodal (N1) foram associados à menor sobrevida global e sobrevida livre de recorrência ($P=0,002$; $0,005$; $0,007$ e $0,01$). O tratamento cirúrgico combinado ao radioterápico foi associado à menor sobrevida livre de recorrência ($P=0,03$). Na expressão da proteína EGFR não houve diferença estatisticamente significativa entre QA e CEC de lábio. O CEC de lábio quando em estádios e graus histológicos avançados, é associado a um pior prognóstico, o diagnóstico precoce é essencial para a escolha do melhor tratamento e sobrevida dos pacientes, evitando mutilações e consequentemente, perda na qualidade de vida.

Palavras-chave: Imuno-histoquímica. Análise de sobrevida. Carcinoma de células escamosas.

Strieder L. *EGFR protein analysis in squamous cell carcinoma of the lip [dissertation]. São José dos Campos (SP): Institute of Science and Technology, UNESP – UNIV Estadual Paulista; 2015.*

ABSTRACT

Lip squamous cell carcinoma (SCC) is one of the most common malignancies affecting especially lower lip due to sun exposure. This study aimed to evaluate three methods of histological grading (WHO, BD and MRH), analyze the expression of EGFR protein on the lip of SCC, compared with actinic cheilitis (AC) and correlates them with the prognosis. Data from 53 patients with lip SCC were collected for the clinicopathological and histological evaluation. 22 cases of SCC and 19 AC underwent immunohistochemical reaction with EGFR protein and analyzed by an automated analyzer for evaluation of protein expression. The average age was 65 years, 69,8% were men, lower lip was the site of predilection with 94,4% and 66,03% of patients were in early stages (T1 + T2). 52.83% and 64.15% cases respectively were graduates in low risk prognosis or grade 1 by BD and WHO scales, the MRH model graduated 54.72% cases as medium risk prognosis or grade 2. The simplest grading model and easy to apply in lip SCC was the BD scale and more efficient because when in high histological grade was associated with lower overall survival ($P = 0.045$). Overall survival was 87,8% at 5 years. Advanced clinical stage (T3 + T4) and lymph node involvement (N1) were associated with lower overall survival and recurrence-free survival ($P = 0.002$; 0.005 ; 0.007 and 0.01). Surgical treatment combined with radiotherapy was associated with lower recurrence-free survival ($P = 0.03$). The expression of EGFR protein had no statistically significant difference between AC and lip SCC. The lip SCC when in advanced stages and high histological grades, is associated with a worse prognosis, early diagnosis is essential for choosing the best treatment and survival of patients, avoiding mutilation and consequently, loss in quality of life.

Key words: Immunohistochemistry. Survival analysis. Carcinoma squamous cell.

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma espinocelular (CEC) de lábio é uma das neoplasias malignas mais comuns da cavidade oral. Ocorre mais frequentemente no lábio inferior de homens (Vartanian et al., 2004) e apresenta prognóstico favorável quando comparado aos pacientes com CEC em outros sítios intrabuciais (Batista et al., 2010), provavelmente devido à localização do tumor que facilita o diagnóstico e à pequena taxa de metástase regional (Vartanian et al., 2004). Entretanto, quando há envolvimento linfonodal, pode ser necessário tratamento cirúrgico extenso, mutilador que acarreta perda na qualidade de vida (Ozturk et al., 2015) podendo ocorrer queda significativa da sobrevida global (Vartanian et al., 2004).

O CEC pode ocorrer da progressão da queilite actínica (QA), que é uma desordem potencialmente maligna, num período de 1 a 20 anos, caso não seja diagnosticada e tratada adequadamente (Main et al., 1994; Moore et al., 1999; Santos et al., 2003). A QA acomete comumente homens leucodermas com mais de 45 anos de idade (Cavalcante et al., 2008). O lábio inferior é o local de maior acometimento (Main et al., 1994) devido à protrusão e consequentemente maior exposição à radiação solar UVB (Scheinberg et al., 1992).

A exposição crônica à radiação ultravioleta é um importante fator etiológico associado ao desenvolvimento do CEC de lábio (Peria-Milla Lopez et al., 2003; Ozturk et al., 2015). A radiação UV e a inflamação crônica podem induzir mutações na pele e podem favorecer o desenvolvimento de neoplasias malignas (Nandakumar et al., 2011). Após exposição à radiação UV, a proteína EGFR (Epidermal growth factor receptor) é rapidamente ativada (El-Abaseri et al., 2005), esta

ativação resulta em cascatas celulares sinalizadoras que promovem a progressão do tumor (Correia et al., 2014) resultando na proliferação celular, migração, metástase, evasão da apoptose e angiogênese em diversos tumores sólidos, incluindo os da região da cabeça e pescoço (Yokota, 2014). Alteração na expressão proteica influenciam significativamente as abordagens terapêuticas e o prognóstico dos pacientes (Szábo et al., 2011).

O sistema de estadiamento clínico TNM é utilizado como um fator prognóstico na resposta ao tratamento, porém, existem casos de óbito por CEC apesar dos pacientes terem sido classificados em estadios precoces (Anneroth et al., 1987). Nestes casos, estadiamento clínico combinado às características histológicas, podem servir como medida para prever a progressão do neoplasma e determinar o plano de tratamento (Anneroth et al., 1987). Alguns modelos de gradação histopatológica foram propostos (Anneroth et al., 1987, Bryne et al., 1992, Brandwein-Gensler et al., 2005, Almangush et al., 2015), na tentativa de prever o prognóstico a partir de características histológicas.

O principal papel da análise histopatológica é complementar a avaliação clínica do estadiamento TNM e fornecer aos cirurgiões formas de avaliar a melhor terapia para os pacientes a partir do prognóstico fornecido pela análise do tecido (Almangush et al., 2015). Identificar possíveis fatores que favoreçam a transformação e progressão do CEC de lábio é relevante na população brasileira, pois parte significativa da economia nacional está baseada na agricultura, pecuária e pesca onde os trabalhadores estão constantemente expostos aos raios solares (Batista et al., 2010). Por estar correlacionada à progressão do tumor, a EGFR é alvo de muitos tratamentos quimioterápicos (Correia et al., 2014), avaliar os aspectos moleculares como expressão proteica da EGFR, poderá servir para identificação de pessoas susceptíveis ao desenvolvimento do CEC. Além disso, gerar novas estratégias para

tratamento de lesões de lábio fazem-se necessárias para evitar mutilações, comprometimento estético e perda da qualidade de vida.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Carcinoma espinocelular

Barnes et al., 2005, na classificação da Organização Mundial de Saúde definem o carcinoma espinocelular como uma neoplasia epitelial invasiva com variados estágios de diferenciação escamosa e com tendência à metástases para linfonodos. Homens são mais acometidos que mulheres pelo maior abuso do uso de tabaco e álcool (Barnes et al., 2005). Os tumores podem surgir em qualquer parte da cavidade oral, inclusive em lábio onde aparece quase que exclusivamente em lábio inferior, localizado no vermelhão em forma de crosta endurecida ou ulceração (Barnes et al., 2005). Os tumores malignos que acometem o lábio são um dos mais frequentes na cavidade oral e está relacionada à exposição solar, principalmente em pacientes de raça branca (Amar et al., 2004). Pode espalhar-se superficialmente em tecidos mais profundos como na mandíbula, embora seja incomum (Barnes et al., 2005). Esvaziamento radical de pescoço é a forma de tratamento adotada para metástases regionais em pacientes acometidos com câncer de cabeça e pescoço (Vartanian et al., 2004).

Estudo retrospectivo feito por Santos et al. (1996), entre os anos de 1980 a 1989 analisou os fatores tumorais e individuais que podem influenciar e determinar o prognóstico causado por CEC de lábio inferior em 58 pacientes diagnosticados com a doença no Hospital das Clínicas da faculdade de Medicina da Universidade de São Paulo. Entre as informações coletadas estavam: tabagismo, etilismo, exposição solar, estadio clínico, análise patológica e tipo de tratamento. A análise de

sobrevida demonstrou diferenças estatisticamente significativas nas seguintes variantes: tamanho do tumor (T) e acometimento linfonodal (N), diminuindo as chances de sobrevida global.

Amar et al. (2004) fizeram uma análise retrospectiva dos prontuários de 78 pacientes com CEC de lábio sem tratamento prévio, entre 1990 e 2001. Foi avaliada a relação do tamanho do tumor primário, grau de diferenciação, comprometimento da comissura labial, presença e localização de metástases e acometimento de linfonodos. A comissura labial estava comprometida em 12 pacientes e foi relacionada com um risco 11 vezes maior de metástases linfonodais. As metástases ocorreram em 8 de 50 pacientes com tumores bem diferenciados, 2 de 18 pacientes com tumores moderadamente diferenciados e 1 de 2 pacientes, pobremente diferenciados. Concluíram que as metástases são infrequentes nos tumores menores que 3 cm e quando presentes acometem o nível I. Desta forma, o esvaziamento suprahióideo pode ser efetivo como forma de tratamento no pescoço.

Vartanian et al. (2004) realizaram análise retrospectiva de 617 pacientes tratados com câncer de lábio entre os anos de 1969 a 1999 para avaliar fatores de risco, metástases para linfonodos e suas implicações no tratamento cervical. 107 pacientes foram submetidos a esvaziamento cervical. Pacientes com tumores T3/T4 e com acometimento da comissura foram relacionados significativamente com risco de metástases cervicais. Estes resultados sugeriram que o esvaziamento cervical pode ser a opção adotada para o tratamento de pacientes com tumores T3/T4 e envolvimento da comissura.

Batista et al. (2010) avaliaram clinicamente e histologicamente 37 pacientes com CEC de lábio (vermelhão do lábio) e comparou com 54 pacientes com CEC da cavidade oral, que inclui: mucosa, gengiva, palato duro, língua e soalho. Houve a predominância de estádios T1 e T2 em CEC de lábio e T3 e T4 em CEC da cavidade oral. Uma taxa significativa de 33,3% dos pacientes com CEC da cavidade oral

apresentavam metástases em linfonodos cervicais e 18,75% destes vieram à óbito enquanto nenhum paciente com CEC de lábio veio a óbito devido a doença. Quanto a histopatologia, um maior número de casos de CEC de lábio demonstrou índice de infiltrado inflamatório intenso comparado ao CEC da cavidade oral. Concluíram que CEC de lábio e da cavidade oral, demonstram características clínicas e microscópicas distintas o que reflete diferentemente no prognóstico e no comportamento do tumor.

Estudo feito com 32 pacientes na Itália que foram submetidos a reconstrução cirúrgica para carcinoma de lábio por Moretti et al. (2011), mostrou que o CEC foi o mais comum (28 pacientes) comparado ao carcinoma de células basais (3) e carcinoma sebáceo (1). Dos 28 pacientes com CEC, 27 tiveram predileção para lábio inferior, exclusivamente no vermelhão do lábio. O estudo mostrou que carcinoma de lábio tem bom prognóstico, especialmente para as lesões iniciais, porém os maiores problemas nas cirurgias de lábio estão nas reparações com grandes perdas de tecido, onde a estética e funcionalidade são perdidos, portanto, as opções a serem adotadas para o tratamento devem alterar o mínimo possível nestes quesitos.

Salihu et al. (2014) fez estudo retrospectivo no período de 1993 a 2013 em Kosovo (Europa), em 789 pacientes com CEC de lábio avaliando a sobrevida e o efeito cirúrgico como forma de tratamento. 614 receberam tratamento e dados foram coletados num período de 10 anos. Foram classificados quanto ao gênero, etiologia, estadio da doença, localização, tratamento, metástase e sobrevida. Os pacientes tinham entre 8 e 92 anos de idade, sendo a maioria entre 50 e 70 anos. O gênero masculino foi predominante 5:1 e 57% dos pacientes tinham sido expostos a radiação solar. Para pacientes em estadio clínico precoce (I e II), excisão cirúrgica foi realizada, como forma de tratamento, com margem de 6mm e se a margem estivesse comprometida histologicamente, nova intervenção cirúrgica foi realizada. Para aqueles

em estadio avançado (III e IV), excisão cirúrgica radical e dissecação cervical foram o tratamento de escolha e, quando houve a presença de metástase em pacientes com estadio IV, quimioterapia era adicionada. A sobrevida de 10 anos para os estadios I, II, III e IV foi de 91,7%, 83,7%, 28% e 11,4%, respectivamente. Foi concluído que o sucesso do tratamento cirúrgico estava relacionado com o estágio da doença e diagnóstico precoce. A maioria dos pacientes deste estudo estavam em estágios iniciais, o que indica que a atenção dos familiares e diagnóstico precoce dos profissionais foram cruciais para o prognóstico.

Bhandari et al. (2015) avaliaram estudos feitos com pacientes portadores de CEC de lábio N0 tratados cirurgicamente com ou sem esvaziamento cervical. A estimativa de metástases ocultas em pacientes N0 com dissecação cervical foi de 0,17% e recorrência local naqueles sem esvaziamento cervical foi de 0,08%. Portanto, os resultados obtidos não resultam em provas suficientes que justifiquem o tratamento com esvaziamento cervical para pacientes N0 e que preservação seria o mais viável para estes casos.

Schüller et al. (2015) avaliaram a qualidade de vida de 105 pacientes com CEC de lábio após tratamento cirúrgico e reconstrução da área operada. Metástases para linfonodos cervicais foram baixas (7,6%) e foram relacionadas a tumores de tamanhos grandes. Somente 5 pacientes (4,8%) foram a óbito devido a doença, especialmente após metástase para linfonodo e recorrência tumoral. A sobrevida global avaliada foi de 61,2%, livre de recorrência 84,5% e sobrevida específica da doença 93,9%. Com relação a qualidade de vida, os resultados mostrados foram desfavoráveis referindo-se à sensibilidade, parestesia, franzir os lábios e abrir a boca. Verificaram que o prognóstico para CEC de lábio é favorável, e que dissecação cervical parece ser desnecessária, principalmente em tumores pequenos. A qualidade de vida do paciente acometido depende do tamanho do tumor primário tratado cirurgicamente,

além disso, a escolha do tratamento adequado proporciona um bom prognóstico e preserva a qualidade de vida estética e funcional.

Estudo retrospectivo entre os anos de 1991 e 2011 feito em Madrid por Domínguez-Gordillo et al. (2015) analisou 881 pacientes com câncer de lábio levando em consideração idade, gênero, localização do tumor (lábio superior, inferior, comissura ou acometendo estas três áreas) histopatologia (CEC, carcinoma de células basais e outros), extensão (local, regional e disseminada) e presença de múltiplos tumores primários. Separou os anos em 2 períodos, de 1991 a 2001 (477 casos) e de 2002 a 2011 (404 casos) e os compararam. Os fatores idade, histopatologia e localização foram notadas diferenças. A idade aumentou de 66,3 para 69,7 anos. O segundo período mostrou aumento do carcinoma de células basais enquanto a incidência de CEC continuou a mesma. A distribuição de gênero no CEC, se tornou mais semelhante com o aumento do acometimento em mulheres. A prevalência de tumores na mucosa labial e comissura mostrou aumento entre os dois períodos.

Pastuskek et al. (2015) fizeram um estudo com 68 pacientes com CEC de lábio para avaliar e identificar histologicamente e demograficamente aqueles com um risco aumentado para desenvolver metástases locais e regionais. A média de idade foi de 61,09 anos e maior acometimento no gênero masculino, 82,35%. Mais da metade, 54,41%, eram fumantes e 45,59% ex-fumantes. Dos 68 avaliados, 82,35% estavam nos estadios T1N0, 11,76% T2N0, 1,47% T3N2 e 4,41% eram T4N2, T4N0 e T4N1. Histologicamente, 45,59% dos pacientes foram graduados como bem diferenciado, 35,29% moderadamente diferenciado e 1,47% como pobremente diferenciado. O CEC de lábio se apresenta geralmente em estadios iniciais. É normalmente graduado utilizando o estadio TNM, porém, modelos alternativos para avaliação do prognóstico podem ser úteis na identificação de pacientes de risco.

2.2 Gradação histopatológica

O uso da biologia molecular tem aumentado na investigação de carcinoma espinocelular oral e de orofaringe, porém, a avaliação histológica de tecidos removidos cirurgicamente e fixados em formol continua a ser o principal fator para o diagnóstico e estadiamento das peças cirúrgicas na clínica rotineira (Woolgar et al., 2009). Em casos de CEC em estadios iniciais, existem muitos pacientes que vão a óbito devido à doença apesar da gradação histológica e clínica ter sido classificadas como estadio precoce e tratados como o indicado para tais classificações (Anneroth et al., 1987).

Anneroth et al. (1987) fez uma revisão dos métodos de gradação histológica em CEC de cabeça e pescoço apresentando potenciais erros envolvidos e discutindo a correlação das gradações com sobrevida e recorrência. A partir deste resultado, introduz um método que seria o mais apropriado para as gradações em CEC de cabeça e pescoço, o “Novo Sistema de Gradação de Malignidade” o qual se baseia na avaliação morfológica que inclui o grau de queratinização (1-Alto >50% das células; 2- moderado 20-50% das células; 3- mínima queratinização 5-20% das células; 4- sem queratinização 0-5%), polimorfismo nuclear (1- pouco polimorfismo >75% de células maduras; 2- polimorfismo moderadamente abundante 50-75% de células maduras; 3- polimorfismo nuclear abundante 25-50% de células maduras; 4- polimorfismo nuclear extremo 0-25% de células maduras), número de mitoses (1- de 0 a 1 mitose no campo de maior aumento observado; 2 – de 2 a 3 mitoses; 3 – de 4 a 5 mitoses; 4- >5 mitoses no campo observado), padrão de invasão (1- bordas infiltrativas bem delineadas; 2- cordões sólidos ou bandas; 3- pequenos grupos com >15 células; 4-dissociação de pequenos grupos individuais ou com <15 células), invasão/profundidade (1- carcinoma in situ; 2-invasão distinta envolvendo lâmina própria somente; 3- invasão

além da lâmina própria envolvendo músculos, glândulas e periósteo; 4- infiltração envolvendo todo o estroma e infiltrando em tecido ósseo da mandíbula) e infiltrado linfoplasmocitário (1-abundante; 2-moderado; 3-escasso e 4- ausente).

Bryne et al. (1992) graduaram histologicamente biópsias de 61 pacientes diagnosticados com CEC em assoalho de boca. Somente as margens mais invasivas dos tumores foram selecionadas para a gradação que incluíam: grau de queratinização, pleomorfismo nuclear, padrão de invasão tumoral e infiltrado linfoplasmocitário. Ao fim da análise, pontos foram atribuídos e somados para obtenção de um escore onde de 4 a 8 foi considerado de baixo risco, de 9 a 12 risco intermediário e de 13 a 16 alto risco prognóstico. Concluíram que as características celulares de células localizadas no fronte de invasão tumoral podem ser importantes para o planejamento do tratamento de neoplasias malignas orais.

Brandwein-Gensler et al. (2005) avaliaram histologicamente 292 pacientes com CEC oral. A avaliação inclui infiltrado linfoplasmocitário, invasão perineural e padrão de invasão tumoral, o mesmo utilizado por Bryne et al. (1992) que consiste em: 1- bordas infiltrativas bem delimitadas, 2- grandes ilhas ou cordões infiltrantes, 3- pequenos grupos ou cordões de mais de 15 células, 4- células individuais ou ilhas de até 15 célula. Incluíram um quinto padrão: 5- padrão amplo de infiltração tumoral ou seja, quando há a presença de invasão tumoral à uma distância maior que 1mm da interface do tumor em tecidos não fibrosos. O infiltrado linfoplasmocitário foi classificado em 3 padrões: 1- banda contínua e densa, 2- banda moderada e descontínua e 3- pouca inflamação ou ausente. Invasão perineural foi classificada também em 3 padrões: 1- ausente, 2- presente em pequenos nervos e 3- presente em grandes nervos (com diâmetro $\geq 1\text{mm}$). Ao final, pontos são atribuídos de 0, 1 ou 3, somados e classificados em escores onde 0 é de baixo risco prognóstico, 1 a 2 risco intermediário e 3 a 9 alto risco. Concluíram em

seu estudo que, levando em consideração recorrência local e sobrevida global, pacientes com alto risco prognóstico podem se beneficiar da terapia adjuvante radioterapia, este mesmo benefício não foi observado em pacientes de risco intermediário e baixo.

De acordo com a Organização Mundial de Saúde (OMS), o CEC oral é classificado em bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pobremente diferenciado. O CEC bem diferenciado assemelha-se ao epitélio normal, as células tumorais lembram células epiteliais, a queratinização geralmente está presente em grande quantidade com formação variável de “pérolas”. O moderadamente diferenciado é caracterizado pela maior atipia celular contendo pleomorfismo nuclear, atividades mitóticas normais e anormais e com menor quantidade de queratinização. No CEC pouco diferenciado ou pobremente diferenciado, a semelhança com o epitélio normal é pequena e há a predominância de células imaturas, numerosas mitoses, incluindo atípicas podendo se estender para várias camadas do epitélio e mínima queratinização (Barnes et al., 2005).

Almangush et al. (2015) introduziram um modelo histopatológico para análise do prognóstico de pacientes com CEC de língua em estadio inicial. Incluíram 322 casos com avaliação clínica em estadio inicial (T1- T2N0M0) e analisaram profundidade de invasão (baixo <4mm; alto $\geq$ 4mm) e ilhas de invasão ou *buds* (baixo <5; alto $\geq$ 5). O método se baseia no escaneamento de toda a área tumoral em baixa e alta ampliação, medição da superfície do tumor até o fronte de invasão mais profundo, análise das ilhas tumorais e usados para uma escala de gradação. Uma escala de 0 a 2 foi estabelecida onde 0 (baixo risco prognóstico) corresponde a invasão menor que 4mm e ilhas ou *buds* com mais de 5 células. Escala 1 (risco intermediário ou médio) para aqueles com fronte de invasão $\geq$ 4mm ou com ilhas de 5 ou menos células e escala 2 (alto risco prognóstico) para aqueles com presença de *buds* ($\leq$ 5 células) e com fronte invasão $\geq$ 4mm. Após a análise dos casos, a escala

2, de alto risco, foi correlacionada com recorrência regional e óbito por CEC de língua.

2.3 EGFR

El-Albaseri et al. (2005) fizeram um estudo em ratos para determinar os efeitos da ativação da EGFR na promoção de tumores de pele após a exposição aos raios UV. Os resultados mostraram que a indução de raios UV ativavam a EGFR e promoviam a tumorigênese na pele. A ativação da EGFR induzida por raios UV, estimulam vias de sinalização que por sua vez provocam a proliferação de células e supressão da apoptose, resultando em hiperplasia epidérmica e eventual promoção de tumores na pele.

Sok et al. (2006) avaliaram 33 pacientes com CEC de cabeça e pescoço utilizando técnica imuno-histoquímica para expressão do EGFR e EGFRvIII (mutado). EGFRvIII foi encontrado em 42% dos casos e sempre achado juntamente com a forma selvagem EGFR. As células que expressaram o EGFRvIII mostraram alta proliferação *in vitro* e aumento do volume tumoral *in vivo*. O EGFRvIII é expresso em CEC de cabeça e pescoço, fato este que contribui para o crescimento e maior resistência das estratégias de tratamento destinadas ao alvo EGFR.

Szábo et al. (2011) estudaram a mutação do gene *EGFR* e expressão da proteína em 71 pacientes com CEC de cabeça e pescoço, que não foram submetidos ao tratamento anti-EGFR no período de 2001 a 2006. Verificaram que o aumento dos níveis da proteína EGFR e o número de cópias dos genes têm significado no prognóstico dos pacientes. No entanto, encontraram alta incidência da presença do gene mutado *EGFRvIII* e da expressão proteica o que deve ser levado em

consideração para a escolha entre as diferentes opções de tratamento anti-EGFR.

Entretanto, estudo feito por McIntyre et al. (2012) avaliaram a ocorrência de mutações do gene *EGFRvIII* em 50 pacientes com CEC oral onde somente em 1 paciente foi detectada tal mutação. A hiperexpressão da proteína EGFR foi vista em 42% dos casos avaliados. Portanto, sugere-se que a forma mutada *EGFRvIII* é rara e que as terapias específicas do *EGFR* podem não ser adequadas como tratamento de primeira escolha para pacientes com CEC oral.

Carballeira et al. (2014) realizaram estudo da expressão imuno-histoquímica da EGFR em 55 pacientes com CEC de lábio entre os anos de 1991 e 1999, na tentativa de correlacionar com o prognóstico e características clinicopatológicas. Para avaliação fizeram contagem manual e utilizaram analisador de imagem automatizado (ACIS III) para contagem das células. A expressão da EGFR foi ausente ou fraca em 25,5% dos casos, médio em 36,4% (*borderline*) e positiva em 38,2%. Uma relação significativa foi observada entre a expressão positiva da EGFR com a ulceração e o tamanho do tumor, o que revela a relação entre a alta expressão da EGFR em CEC de lábio com um prognóstico de maior risco.

Visto que a terapia anti-EGFR é efetiva em pacientes acometidos com câncer que não tenham genes mutados, Bronte et al. (2015), enfatiza a importância do estudo dos biomarcadores, a fim de melhor selecionar os pacientes que possam realmente se beneficiar com a terapia anti-EGFR e poupando-os de tratamentos desnecessários. Em seu estudo, concluiu que a combinação da terapia anti-EGFR com a quimioterapia para o tratamento de câncer colorretal metastático, aumentou a qualidade de vida e sobrevida dos pacientes.

Andrade et al. (2015) avaliou a expressão proteica através de técnica imuno-histoquímica das proteínas EGFR e EMMPRIN (indutor de metaloproteinase da matriz extracelular) em 45 casos de CEC de

cabeça e pescoço que incluem: soalho de boca, palato, língua, mucosa oral, orofaringe e trígono retromolar. Foram verificadas as características demográficas, tamanho do tumor e estadio TNM. Os casos selecionados foram tratados com os anticorpos anti-EGFR e anti-EMMPRIN e a porcentagem de células positivas foi determinada por escores: 1 (0-50% das células), 2 (51-75%) e 3 (>75%). A intensidade da marcação foi feita seguindo os escores 1 (ausente/fraco) e 2 (forte). Para o EGFR, houve predominância de escores altos em ambas gradações histológicas, baixo e alto grau de malignidade, e em diferentes estadios clínicos, enquanto que no EMMPRIN, houve diferença significativa entre as gradações, foi notada predominância do escore 1 em estadios precoces (T1+T2) e a maioria dos casos avançados (T3+T4) apresentou escore 2. Concluíram que as duas proteínas EGFR e EMMPRIN, são alvos potenciais para terapias de câncer e que o EGFR, de acordo com os resultados obtidos, mostrou grande expressão independente de gradações histológicas o que indica a participação deste marcador em estágios precoces e avançados.

O receptor do fator de crescimento epidérmico (EGFR) é um receptor de tirosina-quinase responsável por regular importantes vias de sinalização celular que contribuem para progressão do tumor, (Wheeler et al., 2010) e está presente em vários tipos de cânceres (Sok et al., 2006). A análise das alterações genéticas e epigenéticas nos tumores humanos tem revelado um potencial alvo molecular para o tratamento de câncer (Sok et al., 2006). Apesar das várias pesquisas envolvendo o carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço, o EGFR parece ser o único quimioterápico molecular de sucesso de terapia biológica com benefício clínico (Hansen, Siu, 2013).

Parâmetros de gradação histológica envolvendo CEC de lábio devem ser analisados juntamente com a expressão proteica da EGFR a fim de que se encontre um modelo simples e preciso para auxiliar na decisão terapêutica destas lesões e avaliar o prognóstico destes pacientes.

3 PROPOSIÇÃO

Realizar a análise clinicopatológica do carcinoma espinocelular de lábio; comparar os métodos de gradação histológica: Escalas BD, Modelo de Risco Histológico e Modelo da Organização Mundial de Saúde para avaliação do prognóstico; analisar a expressão da proteína EGFR selvagem no carcinoma espinocelular de lábio e compará-la com queilite actínica.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi realizado após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos no Instituto de Ciências e Tecnologia, UNESP – UNIV Estadual Paulista (ANEXO A).

4.1 Análise clinicopatológica

Os prontuários médicos de pacientes com o diagnóstico de carcinoma espinocelular primário de lábio tratado no Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital A.C. Camargo Cancer Center de São Paulo, no período de 1990 a 2009 foram retrospectivamente revisados. Os dados coletados incluíram: idade, gênero, história de desordem potencialmente maligna, comorbidades, ocupação, fatores de risco (exposição crônica à radiação UV), histopatologia, estadio TNM (Greene et al., 2010) modalidade de tratamento e seguimento (60 meses, no mínimo). Foram excluídos do estudo, os pacientes com o diagnóstico de CEC intraoral.

As modalidades de tratamento investigadas incluíram: cirurgia, radioterapia e quimioterapia indicada de forma isolada ou combinada. Os casos foram avaliados quanto à recorrência local, metástase regional e à distância.

Neste estudo foram utilizados 53 casos de lâminas de CEC para gradação histopatológica e, destes, 22 casos de CEC e 19 casos de QA foram selecionados para estudo imuno-histoquímico. Os casos de QA foram selecionados a partir do banco de dados do

departamento de Biopatologia bucal da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campos de São José dos Campos e do Departamento de Patologia Oral da Universidade Federal de Pernambuco.

4.2 Gradação histopatológica

Os 53 casos de CEC de lábio selecionados, foram graduados de forma individual utilizando 3 tipos diferentes de gradação histopatológica, o da Organização Mundial de Saúde (OMS), Escala BD e Modelo de Risco Histológico (MRH) por 2 avaliadores previamente calibrados, independentemente. Os casos discrepantes foram conferidos por um 3 avaliador.

A Organização Mundial de Saúde (OMS), classifica o carcinoma espinocelular oral em bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pouco ou pobremente diferenciado. Utilizando microscópio óptico Olympus CX31 (Olympus, New York, EUA) o método foi aplicado nos 53 casos. Os carcinomas bem diferenciados (de baixo risco prognóstico) assemelham-se ao epitélio normal, as células tumorais lembram células epiteliais, a queratinização geralmente está presente em grande quantidade com formação variável de “pérolas”. Os moderadamente diferenciados (médio risco prognóstico) são caracterizados pelas atividades mitóticas normais e anormais e com menor quantidade de queratinização. Nos CECs pouco diferenciados ou pobremente diferenciados (alto risco prognóstico), a semelhança com o epitélio normal é pequena e há a predominância de células imaturas, numerosas mitoses, incluindo atípicas e mínima queratinização (Barnes et al., 2005).

O método de gradação histológica feito por Almangush et al. (2015), “Escore de risco BD”, onde B representa grupos de células

individuais ou ninhos de até 5 células tumorais e D a maior profundidade de invasão, foi aplicado nos 53 casos de CEC de lábio. Grau 1, 2 ou 3 (baixo, médio e alto risco prognóstico) foi estabelecida para cada caso. Utilizando o fotomicroscópio Axiophot 2 (Zeiss, Oberkochen, Germany) e Scanner Panoramic Desk (3DHistech, Budapest, Hungary) a partir da análise de lâminas de H&E, foi medido o tamanho da profundidade de invasão do tumor “D” de cada caso com uma régua fornecida pelo programa Axio Control Program e Axivision rel 4.7 (Zeiss, Oberkochen, Germany) estabelecendo grau 1 (baixo risco prognóstico) na ausência de *buds* e maior profundidade de invasão <4mm, grau 2 (médio risco prognóstico) com presença de *buds* ou maior profundidade de invasão >4mm e grau 3 com presença de *buds* e maior profundidade de invasão >4mm (Quadro 1).

Quadro 1 – Método Escala BD, características observadas e grau atribuído

Grau 1	Grau 2	Grau 3
Ausência de <i>buds</i> e profundidade de invasão >4mm	Presença de <i>buds</i> ou profundidade de invasão >4mm	Presença de <i>buds</i> e profundidade de invasão >4mm

Um outro método chamado “Modelo de Risco Histológico” desenvolvido por Brandwein-Gensler et al. (2005), também foi adotado nos 53 casos de CEC de lábio utilizando microscópio óptico Olympus CX31 (Olympus, New York, EUA) para comparação com a “Escala BD” e modelo da OMS. Neste método, o padrão de invasão, infiltrado inflamatório linfoplasmocitário e invasão perineural são avaliados. Utilizando os métodos de invasão tumoral utilizados por Bryne et al. (1992) que consiste em escores de 1 a 4 onde 1 consiste em bordas infiltrativas bem delineadas, 2 – forma de ilhas ou cordões, 3 – pequenos

grupos ou cordões de células e 4 – células individuais ou pequenos grupos. Acrescentando um quinto padrão 5 – presença de invasão tumoral a uma distância maior que 1mm da interface do tumor em tecido não fibroso. O infiltrado linfoplasmocitário foi classificado em 3 padrões onde 1 consiste em banda densa e contínua de infiltrado, 2 -infiltrado moderado e descontínuo e 3 - infiltrado escasso ou ausente. A invasão perineural também foi classificada em 3 padrões avaliando a ausência de invasão, presença de invasão em pequenos nervos ($\leq 1\text{mm}$) e presença de invasão em grandes nervos ($\geq 1\text{mm}$). Cada parâmetro histopatológico é avaliado e pesos são atribuídos onde 0 é para padrões de invasão de 1 a 3, infiltrado linfoplasmocitário tipo 1 e invasão perineural ausente; peso 1 para padrão de invasão tipo 4, infiltrado linfoplasmocitário tipo 2 e invasão perineural de pequenos nervos; peso 3 para padrão de invasão 5, infiltrado linfoplasmocitário tipo 3 e invasão perineural de grandes nervos. Os escores finais foram somados e classificados em grupos onde 0 é considerado de baixo risco, 1 ou 2 de risco médio e 3 a 9 alto risco prognóstico (Quadro 2 e 3).

Quadro 2 – Características histológicas analisadas e peso atribuído no método MRH

Padrão de invasão (peso)	Infiltrado linfoplasmocitário	Invasão perineural
Padrão tipo 1 (zero)	Denso (zero)	Ausente (zero)
Padrão tipo 2 (zero)	Moderado (um)	Presente em nervos $\leq 1\text{mm}$ (um)
Padrão tipo 3 (zero)	Escasso ou ausente (três)	Presente em nervos $\geq 1\text{mm}$ (três)
Padrão tipo 4 (um)		
Padrão tipo 5 (três)		

Quadro 3 – Grau histológico aplicado a partir da soma dos pesos no método MRH

Peso	Grau histológico
0	Grau 1
1 ou 2	Grau 2
3 ou 4	Grau 3

As lâminas de H&E dos 19 casos de QA selecionados, foram revisadas por três pesquisadores independentemente. Os graus de displasia epitelial foram classificados em leve, moderada e severa de acordo com os critérios de Barnes et al. (2005) seguindo a descrição abaixo:

- a) Displasia epitelial leve: atipias e anormalidades estruturais restritas ao terço inferior do epitélio, acompanhadas de poucas atipias celulares.
- b) Displasia epitelial moderada: atipias e anormalidades estruturais restritas ao terço médio do epitélio. Foi levado em consideração o grau de atipia citológica.
- c) Displasia epitelial severa: mais de dois terços do epitélio exibem atipias celulares e estruturais.

Parâmetros arquiteturais e citológicos para diagnóstico de displasias:

- a) Arquiteturais: Estratificação irregular do epitélio, perda da polaridade das células da camada basal, hiperplasia da camada basal, projeções epiteliais em gota, aumento do número de figuras de mitose, mitoses em camadas superficiais, queratinização individual e formação de pérolas córneas.

b) Citológica: Variação anormal do tamanho nuclear, pleomorfismo nuclear, variação anormal do tamanho celular, perda da relação núcleo-citoplasma, aumento do tamanho do núcleo, figuras de mitose atípicas, aumento do número de nucléolos e hiperchromasia.

4.3 Análise imuno-histoquímica

Análise imuno-histoquímica da proteína EGFR na forma selvagem (Abcam, Cambridge, MA, USA) foi feita em 22 casos selecionados de CEC de lábio e 19 casos de QA. Os cortes foram desparafinizados em estufa à 60° C por 18 horas. Para a recuperação antigênica, os cortes foram colocadas em citrato pré aquecido (pH 6.0) e colocados na panela de pressão à 124°C por 4 minutos. Para o bloqueio da peroxidase endógena, foram feitos banhos de H₂O₂ à 6% e depois os cortes foram encubados utilizando o anticorpo primário anti-EGFR (1:500, Abcam, Cambridge, MA, EUA) por 18 horas à 4°C. 2 banhos com Tris (pH 7.4) foram realizados e os cortes encubados utilizando o sistema comercial peroxidase HRP- EnVision™ (DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA), e a detecção da reação foi feita utilizando o substrato cromogênico DAB (diaminobenzidina, DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA). Os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Harris, desidratados e em seguida montados.

Para a imunomarcção os casos foram analisados quantitativamente através de um analisador de imagem automatizado (Acis III Dako's Automated Cellular Imaging System; Dako, Carpinteria, CA, USA) programa Membrane Histo que detecta os níveis de tonalidade, saturação e luminosidade da membrana citoplasmática e converte estes sinais em medidas numéricas de densidade que vai de 60 a 256. Foi estabelecido um nível de expressão baixo ou alto (*high e low expression*)

de acordo com análise feita por Coutinho-Camillo et al. (2011). Cinco áreas tumorais foram selecionadas, considerando a maior profundidade de invasão e áreas com maior intensidade de marcação nos casos de CEC e nos casos de QA, áreas com maior intensidade de marcação nas três camadas do epitélio, basal, suprabasal e granulosa. O analisador de imagem fornece uma média considerada de baixa expressão ou alta expressão.

4.4 Análise estatística

Inicialmente foi realizada uma análise descritiva das variáveis, em que foram apresentadas as distribuições de frequência absoluta (n) e relativa (%) para as variáveis qualitativas, e as principais medidas resumo, como a média, desvio padrão, mediana, valores mínimo e máximo, para as variáveis quantitativas. O estimador de Kaplan-Meier foi considerado para estimar as curvas de sobrevivência e a comparação dos grupos em relação à sobrevida foi realizada pelo teste de LogRank. O nível de significância adotado é de 5%. As análises estatísticas foram realizadas por meio do software SPSS versão 20 (Chicago, IL, USA).

5 RESULTADOS

5.1 Análise clinicopatológica

Os dados epidemiológicos coletados dos prontuários dos 53 pacientes foram analisados através de testes estatísticos. A idade dos pacientes avaliados acometidos por CEC de lábio variou de 30 a 87 anos com média de 65 anos. 41 (77,36 %) pacientes tinham mais de 50 e 12 (22,64 %) com menos de 50 anos de idade (Figura 1).

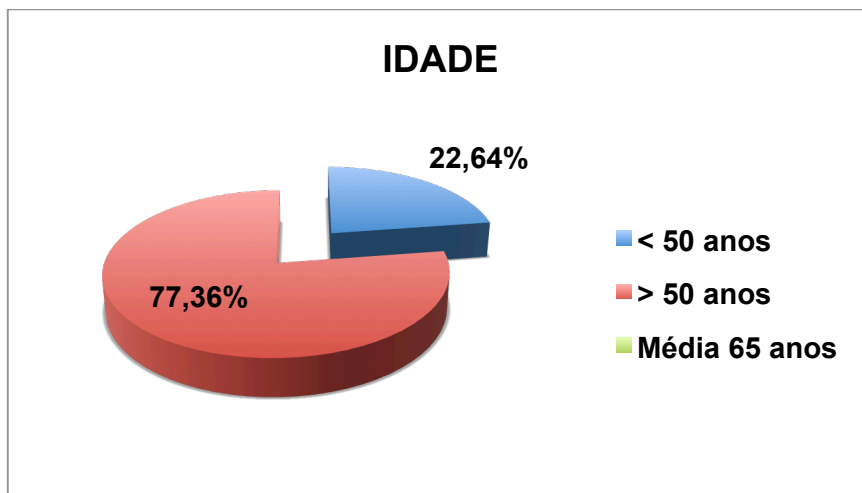


Figura 1 – Gráfico representativo da média de idade dos pacientes e aqueles maiores ou menores que 50 anos.

Teve predileção pelo gênero masculino com 37 (69,81 %) casos e 16 (30,19 %) casos femininos (Figura 2).

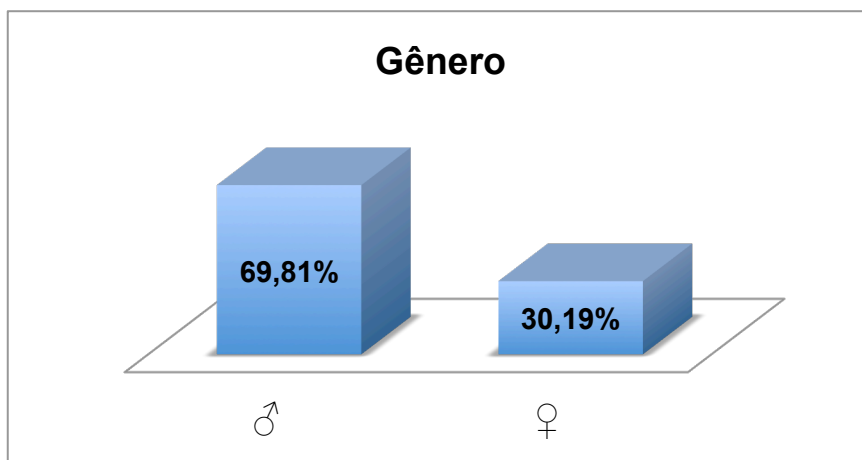


Figura 2 – Gráfico representativo da predileção por gênero no CEC de lábio.

A raça branca foi predominante com 42 (79,25 %) casos, 6 (11,32 %) não brancos e 5 (9,43 %) sem informação (Figura 3).

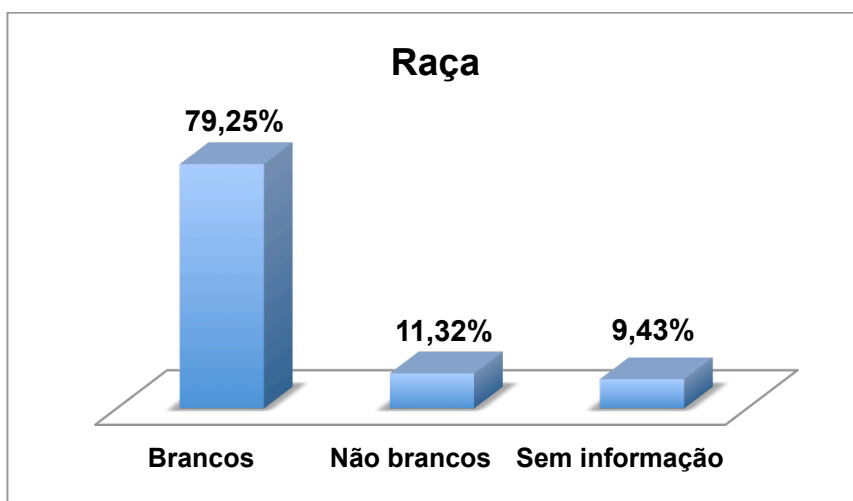


Figura 3 – Gráfico representativo da predileção por raça no CEC de lábio.

A grande maioria dos pacientes deste estudo, 50 (94,34 %) pacientes, tinham lesão localizada em lábio inferior, 2 (3,77 %) pacientes em lábio superior e 1 (1,89 %) superior e inferior (Figura 4).

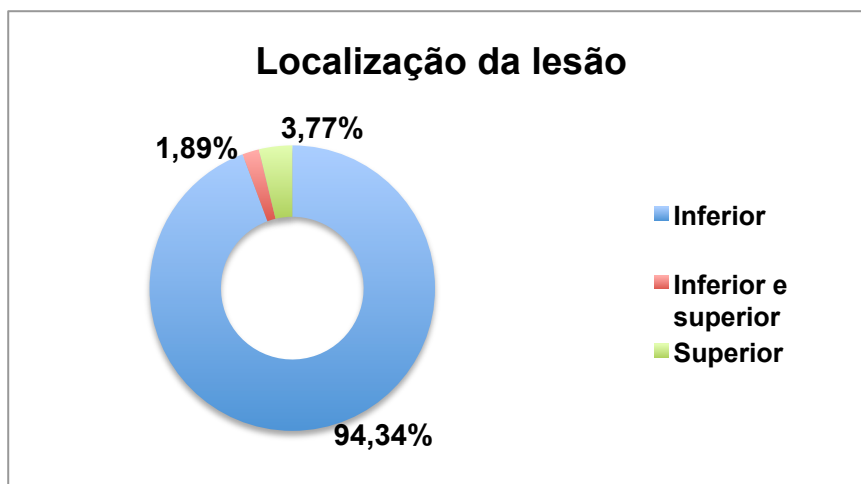


Figura 4 – Gráfico representativo da predileção da localização do CEC de lábio podendo estar em lábio inferior, superior ou em ambas as áreas.

Mais da metade dos pacientes deste estudo, 28 (52,83 %) eram fumantes, 8 (15,09 %) ex-fumantes, 7 (13,21 %) nunca fumaram e 10 (18,87 %) sem informação (Figura 5).

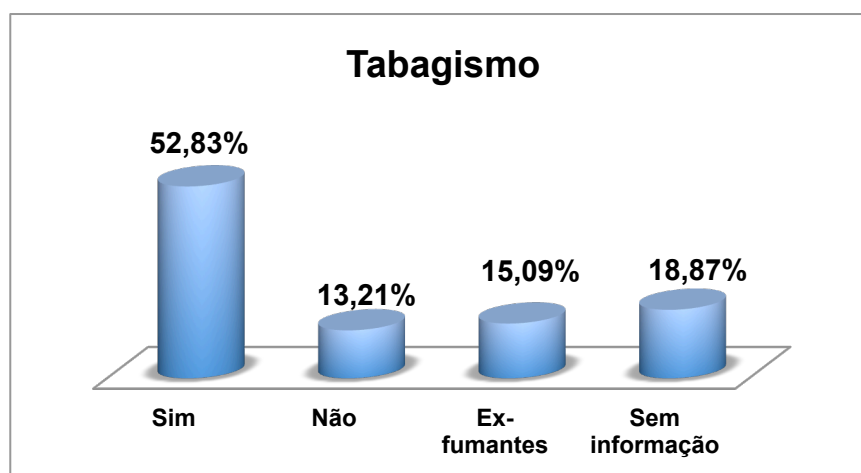


Figura 5 – Gráfico representativo daqueles pacientes fumantes, não fumantes e ex-fumantes.

Com relação à bebida alcoólica, 27 (50,95 %) nunca consumiram bebida alcoólica, 12 (22,64 %) consumiam, 3 (5,66 %) eram

ex-alcoólatras, e 11 (20,75 %) sem informação (Figura 6).

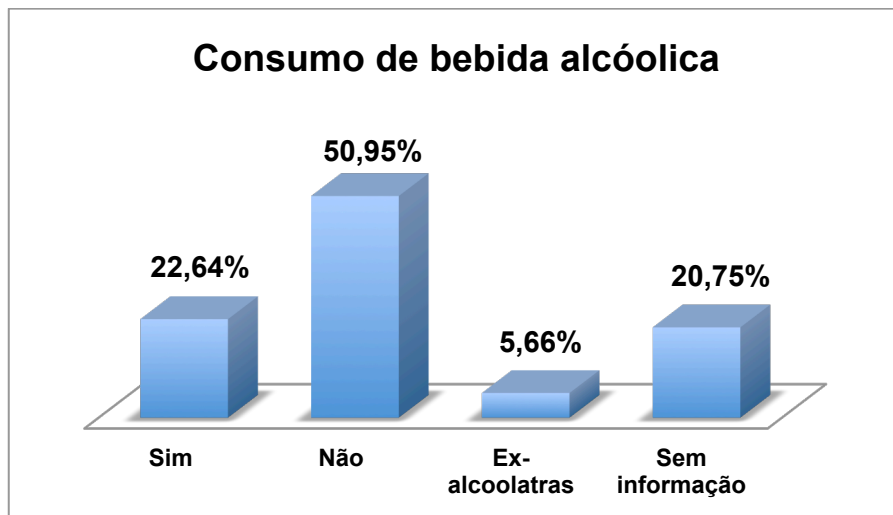


Figura 6 – Gráfico representativo do consumo de bebida alcoólica entre os pacientes.

No estadiamento clínico TNM, a maioria dos pacientes deste estudo foram graduados em estadios precoces com 35 (66,03 %) pacientes, 11 (20,75 %) foram classificados como avançados e 7 (13,22 %) sem informação (Figura 7).

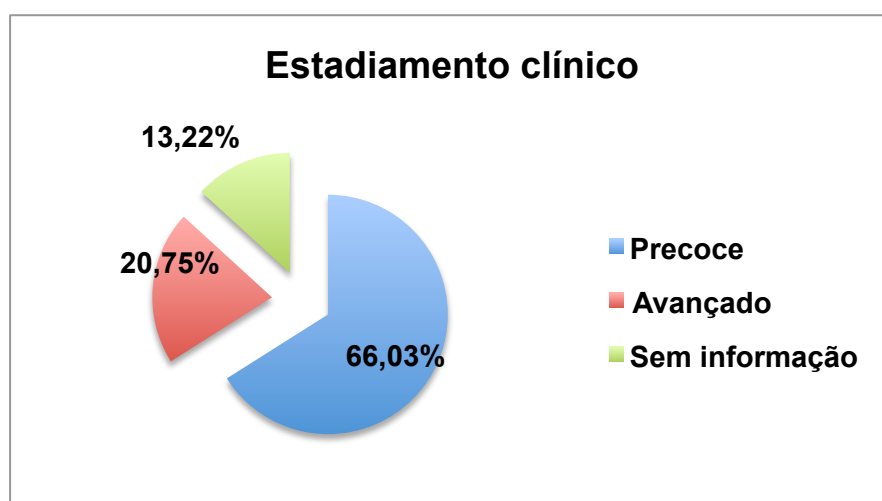


Figura 7 – Gráfico representativo do estadiamento clínico precoce ou avançado.

Dos 53 pacientes, 35 (66,03 %) eram N0, sem envolvimento linfonodal, 8 (15,09 %) eram N1 com envolvimento linfonodal e 10 (18,88 %) sem informação (Figura 8).

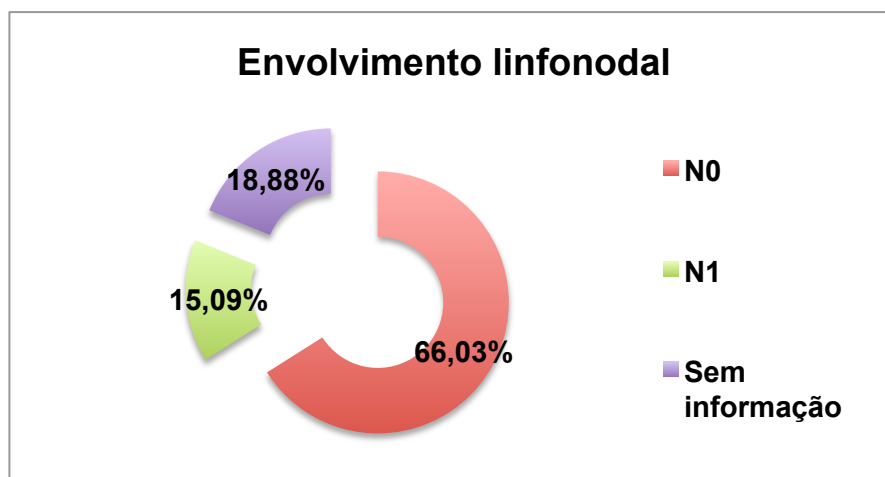


Figura 8 – Gráfico representativo do envolvimento linfonodal.

Os tratamentos primários consistiram em cirurgia e radioterapia. 47 (88,68 %) pacientes fizeram o tratamento primário de cirurgia e 6 (11,32 %) cirurgia combinada à radioterapia (Figura 9).

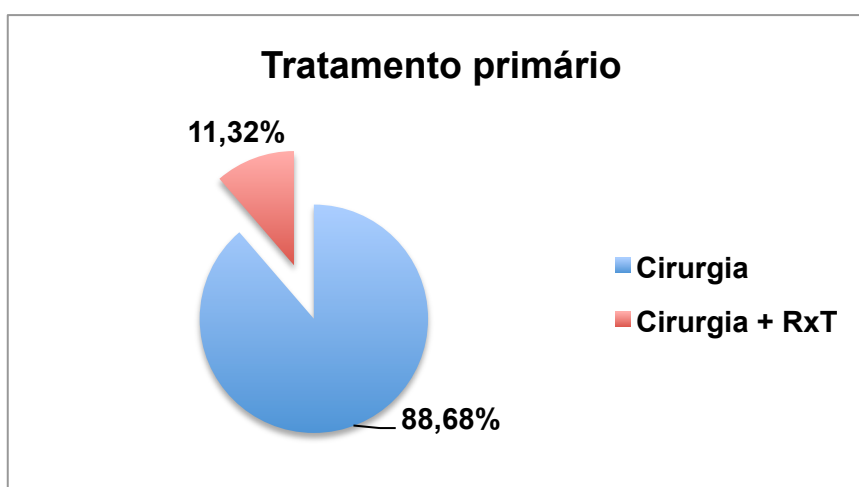


Figura 9 – Gráfico representativo do tratamento primário realizado cirurgia ou radioterapia.

Somente 7 (13,22 %) pacientes realizaram esvaziamento cervical, 43 (81,22 %) pacientes não necessitaram do tratamento e 3 (5,56 %) sem informação (Figura 10).

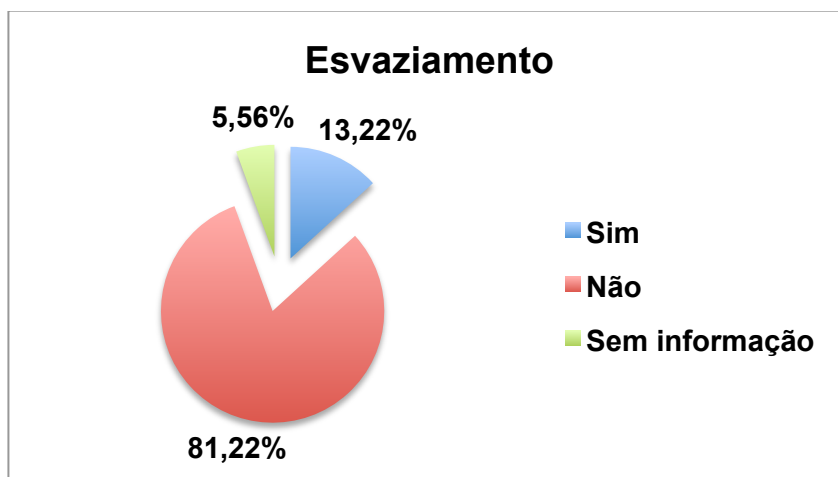


Figura 10 – Gráfico representativo do tratamento com esvaziamento cervical.

Do total, 43 (81,14 %) pacientes não tiveram recorrência/recidiva do tumor, 6 (11,32 %) tiveram recorrência local e 4 (7,54 %) regional (Figura 11).

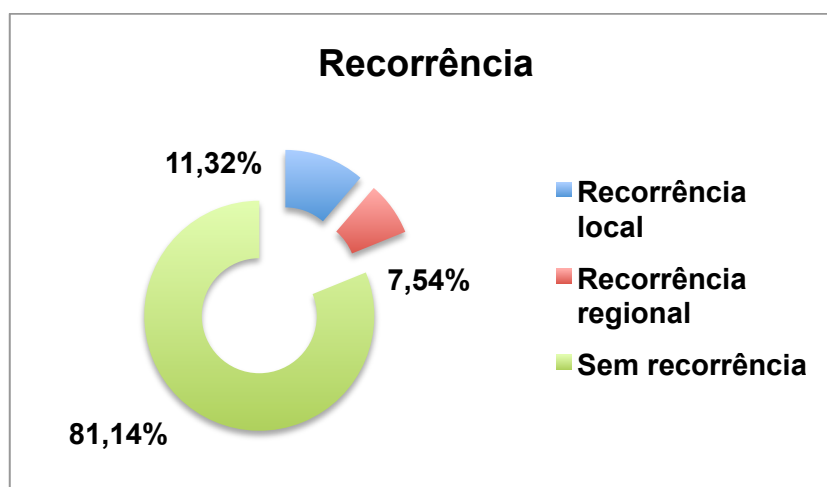


Figura 11 – Gráfico representativo do índice de recorrência local e regional.

O tratamento para recidiva consistiu em cirurgia e radioterapia. Dos 10 pacientes com recorrência local e regional, 8 (80 %) foram tratados com cirurgia, 1 (10 %) com radioterapia e 1 (10 %) não se tratou (Figura 12).

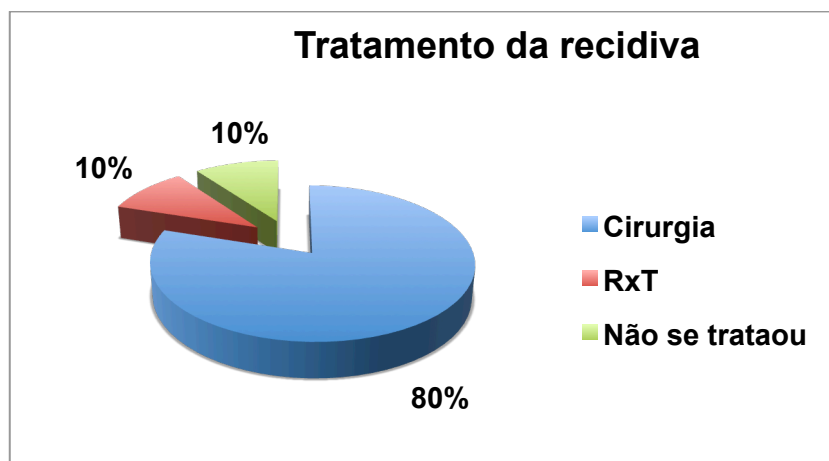


Figura 12 – Gráfico representativo do índice de escolha do tratamento da recidiva.

O índice de mortalidade devido à doença entre os pacientes foi baixo, 2 (3,77 %) vieram a óbito devido a doença, 12 (22,65 %) vieram à óbito por motivos desconhecidos e 38 (71,70 %) pacientes encontram-se vivos e 1 (1,88 %) sem informação (Figura 13).

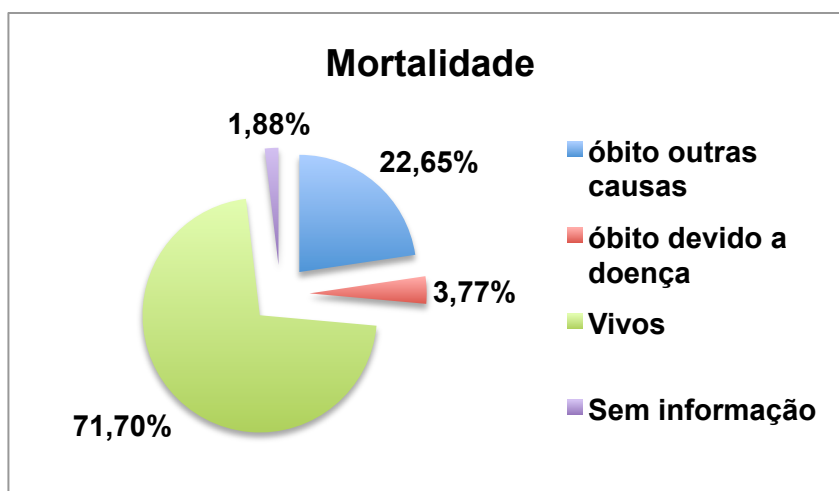


Figura 13 – Gráfico representativo do índice de mortalidade.

A Tabela 1 mostra as características clínicas e epidemiológicas dos 53 pacientes com CEC de lábio.

Tabela 1 – Características clínicas e epidemiológicas dos pacientes com CEC de lábio

Características	Número de pacientes	%
Idade		
<50 anos	12	22,64
>50 anos	41	77,36
Gênero		
Masculino	37	69,81
Feminino	16	30,19
Raça		
Branca	42	79,25
Não branca	6	11,32
Sem informação	5	9,43
Localização		
Lábio inferior	50	94,34
Lábio superior	2	3,77
Lábio superior e inferior	1	1,89
Tabagismo		
Sim	28	52,83
Não	7	13,21
Ex-tabagista	8	15,09
Sem informação	10	18,87
Bebida alcoólica		
Sim	12	22,64
Não	27	50,95
Ex-etilista	3	5,66
Sem informação	11	20,75
Estadiamento clínico		
(T1+T2)	35	60,03
(T3+T4)	11	20,75
Sem informação	7	13,22
N		
N0	35	66,03
N1	8	15,09
Sem informação	10	18,88
Esvaziamento cervical		
Sim	7	13,22
Não	43	81,22
Sem informação	3	5,56

5.2 Gradação histopatológica

Os resultados dos 3 métodos de gradação histológicas estão descritos na Tabela 2 e Figuras 14, 15 e 16, sendo eles: Escala BD Modelo de Risco Histológico (MRH) e o Modelo da Organização Mundial de Saúde (OMS), aplicados nos 53 casos selecionados de CEC de lábio. As gradações consistem em: baixo, médio e alto risco prognóstico.

Tabela 2 – Análises histopatológicas mostrando os 3 modelos de gradação: MRH, BD e OMS dos 53 casos de CEC de lábio

(continua)

Amostra	MRH	BD	OMS
1	médio	baixo	baixo
2	médio	alto	baixo
3	médio	baixo	baixo
4	médio	médio	baixo
5	baixo	baixo	médio
6	médio	alto	alto
7	baixo	baixo	baixo
8	médio	alto	baixo
9	médio	médio	médio
10	alto	alto	baixo
11	médio	médio	baixo
12	alto	médio	médio
13	médio	médio	baixo
14	médio	médio	baixo
15	médio	alto	baixo
16	baixo	baixo	baixo
17	alto	médio	médio
18	médio	baixo	baixo
19	alto	baixo	baixo
20	médio	baixo	baixo
21	médio	baixo	baixo
22	médio	baixo	médio
23	médio	alto	médio
24	alto	baixo	baixo
25	alto	médio	baixo

Tabela 2 – Análises histopatológicas mostrando os 3 modelos de gradação: MRH, BD e OMS dos 53 casos de CEC de lábio

Amostra	<i>(conclusão)</i>		
	MRH	BD	OMS
26	baixo	baixo	alto
27	médio	médio	alto
28	médio	baixo	baixo
29	baixo	baixo	médio
30	alto	médio	baixo
31	médio	baixo	médio
32	baixo	baixo	baixo
33	baixo	baixo	baixo
34	médio	baixo	baixo
35	médio	médio	médio
36	médio	baixo	baixo
37	baixo	baixo	baixo
38	médio	baixo	baixo
39	alto	baixo	alto
40	alto	baixo	baixo
41	médio	alto	baixo
42	médio	médio	médio
43	médio	médio	baixo
44	baixo	médio	baixo
45	alto	baixo	baixo
46	alto	alto	alto
47	alto	baixo	médio
48	médio	médio	médio
49	alto	médio	baixo
50	alto	baixo	baixo
51	médio	baixo	médio
52	médio	médio	médio
53	baixo	baixo	baixo

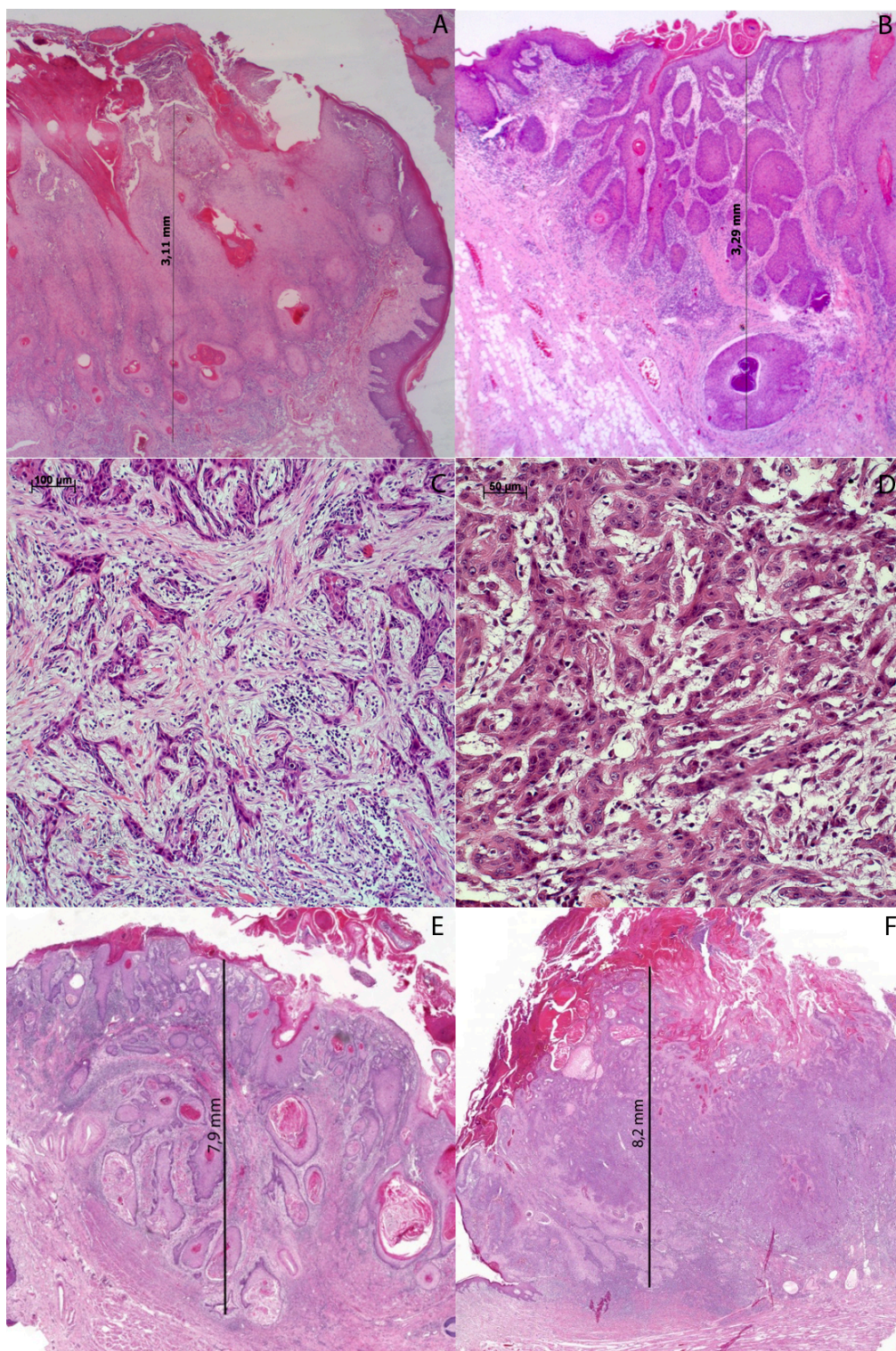


Figura 14 - Método “Escala BD”. Comprimento da área tumoral até a maior profundidade de invasão < 4mm (A e B). *Buds* ou ilhas de invasão tumoral com 5 células ou menos (C e D). Comprimento da área tumoral até a maior profundidade de invasão > 4mm (E e F).

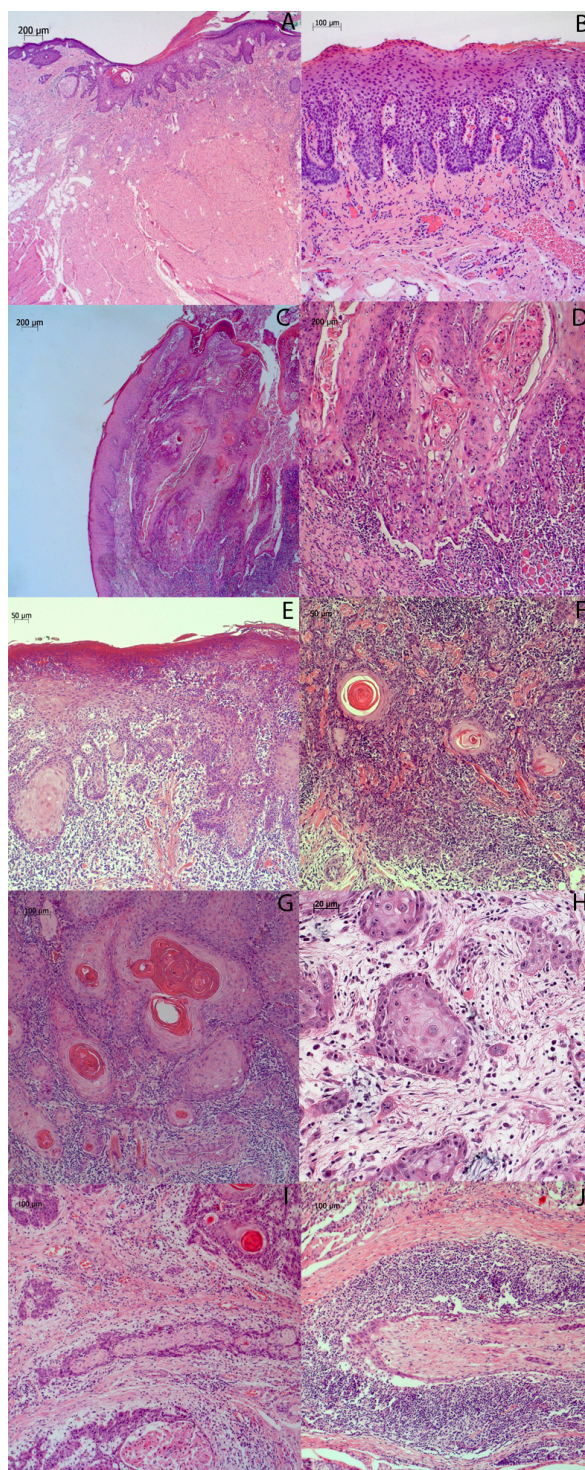


Figura 15 - Método Modelo de Risco Histológico, "MRH." Padrão de invasão 1 com bordas bem delineadas (A e B). Padrão de invasão 2 com ilhas e cordões infiltrantes (C e D). Padrão de invasão 3 com pequenos grupos ou ilhas com mais de 15 células (E e F). Padrão de invasão 4 com grupos ou ilhas de menos de 15 células ou células individuais (G e H). Invasão perineural (I e J). Inflamação com banda densa e contínua (C, D, F, G e J), inflamação moderada e descontínua (E e I) e inflamação escassa ou ausente (A, B e H).

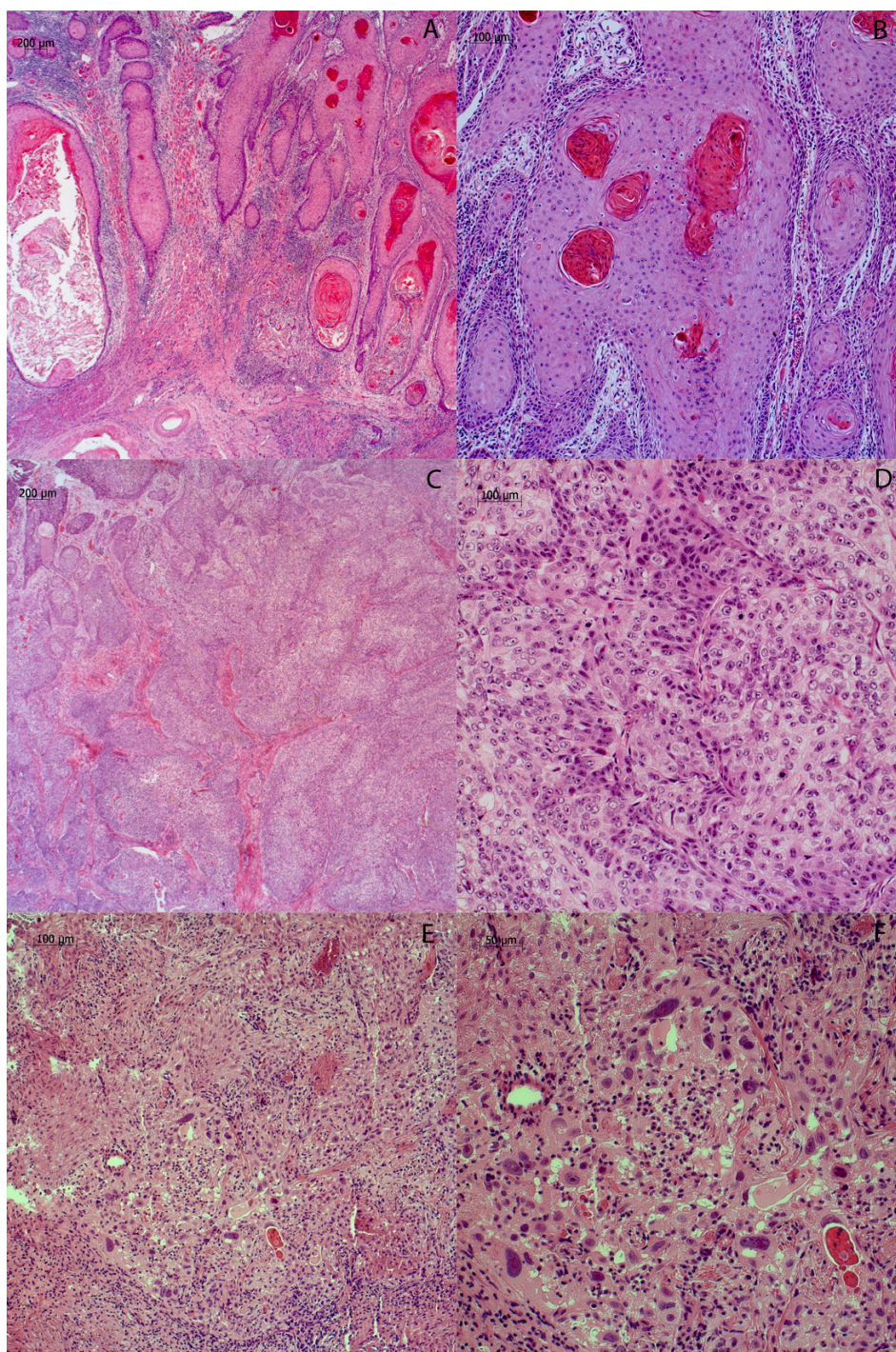


Figura 16 – Método da Organização Mundial de Saúde “OMS”. Grau 1 ou bem diferenciado, as células tumorais se assemelham ao epitélio normal, queratinização abundante e formação de “pérolas” (A e B). Grau 2 ou moderadamente diferenciado, com pouca queratinização, atividade mitótica atípica e as células tumorais ainda assemelham-se às células do epitélio normal (C e D). Grau 3 ou pobremente diferenciado, com pouca ou nenhuma queratinização, células displásicas, que pouco se assemelham ao epitélio normal, núcleos hiper cromáticos e intensa atividade mitótica atípica (E e F).

A Tabela 3 resume as características histopatológicas analisadas encontradas nos 53 casos de CEC de lábio e Tabela 4 características clínicas e gradação histopatológica dos 19 casos analisados de QA.

Tabela 3 – Características histopatológicas observadas em CEC de lábio

Característica histopatológica	n (%)
Padrão de invasão tipo 1	11 (20,77%)
Padrão de Invasão tipo 2	10 (18,86%)
Padrão de Invasão tipo 3	6 (11,32%)
Padrão de Invasão tipo 4	26 (49,05%)
Padrão de Invasão tipo 5	0 (0,0%)
Invasão perineural (nervos <1mm)	17 (32,08%)
Invasão perineural (nervos ≥1mm)	0 (0,0%)
Invasão perineural ausente	36 (67,92%)
Infiltrado linfoplasmocitário banda densa	21 (39,63%)
Infiltrado linfoplasmocitário descontínuo, moderado	23 (43,39%)
Infiltrado linfoplasmocitário escasso ou ausente	9 (16,98%)
Ilhas ≤ 5 células ou <i>buds</i>	17 (32,08%)
Ilhas >5 células	36 (67,92%)
Tumores < 4mm	36 (67,92%)
Tumores > 4mm	17 (32,08%)

Tabela 4 – Características clínicas e gradação histopatológica dos pacientes com QA

Características	n (%)
Idade	
<50 anos	3 (15,7%)
≥50 anos	16 (84,3%)
Gênero	
Masculino	12 (63,1%)
Feminino	7 (36,9%)
Gradação histopatológica	
Leve	5 (26,3%)
Moderada	8 (42,1%)
Severa	6 (31,6%)

Os 3 modelos de gradação histológica dos pacientes com CEC de lábio foram analisados e correlacionados entre si para identificar o nível de concordância através de teste estatístico. A Tabela 5 resume a análise dos 3 métodos. Escala BD e modelo OMS graduaram a maioria dos casos 28 (52,83 %) e 34 (64,16 %) como baixo risco prognóstico, seguido por médio risco 17 (32,08 %) e 14 (26,41 %), e minoria dos casos como alto risco prognóstico 8 (15,09 %) e 5 (9,43 %). O modelo MRH graduou a maioria dos casos 29 (54,72 %) como médio risco prognóstico, seguido de alto risco 14 (26,41 %) e a minoria 10 (18,87 %) como baixo risco prognóstico (Tabela 5).

Tabela 5 - Distribuição dos 53 casos em frequência absoluta (n) e relativa (%), analisando os 3 métodos

GRADAÇÃO	MRH	BD	OMS
baixo	10 (18,87%)	28 (52,83%)	34 (64,16%)
médio	29 (54,72%)	17 (32,08%)	14 (26,41%)
alto	14 (26,41%)	8 (15,09%)	5 (9,43%)

As Tabelas a seguir mostram os três modelos de gradação histológico aplicados sendo analisados entre si para comparação de concordância. A Tabela 6 compara o modelo MRH com Escala BD, Tabela 7 compara MRH com OMS e Tabela 8 compara Escala BD com OMS. Os métodos Escala BD e OMS, tiveram maior concordância quando comparadas à MRH.

Tabela 6 – MRH (linhas) comparado a Escala BD (colunas), as marcações em negrito apontam a concordância entre as duas gradações ($P=0.119$)

	Alto	Baixo	Médio	Total
Alto	2	7	5	14
Baixo	0	9	1	10
Médio	6	12	11	29
Total	8	28	17	53

Tabela 7 – MRH (linhas) comparado a OMS (colunas), as marcações em negrito apontam a concordância entre as duas gradações ($P=0.292$)

	Alto	Baixo	Médio	Total
Alto	2	9	3	14
Baixo	1	7	2	10
Médio	2	18	9	29
Total	5	34	14	53

Tabela 8 – Escala BD (linhas) comparado a OMS (colunas), as marcações em negrito apontam a concordância entre as duas gradações ($P=0.210$)

	Alto	Baixo	Médio	Total
Alto	2	5	1	8
Baixo	2	20	6	28
Médio	1	9	7	17
Total	5	34	14	53

5.3 Análise imuno-histoquímica

Expressão proteica do EGFR foi realizada em 22 casos de CEC e comparadas com 19 casos de QA (Figura 16). A Tabela 9 mostra o número de casos com baixa e alta expressão na análise imuno-histoquímica e comparação do CEC com QA onde não houve diferença estatisticamente significativa ($P=0,611$).

Tabela 9– Expressão imuno-histoquímica dos casos de CEC comparados com QA ($P=0,611$)

	Mediana	Número de casos com alta expressão	Número de casos com baixa expressão
CEC ($n=22$)	87,79	10	12
QA ($n=19$)	92,63	9	10

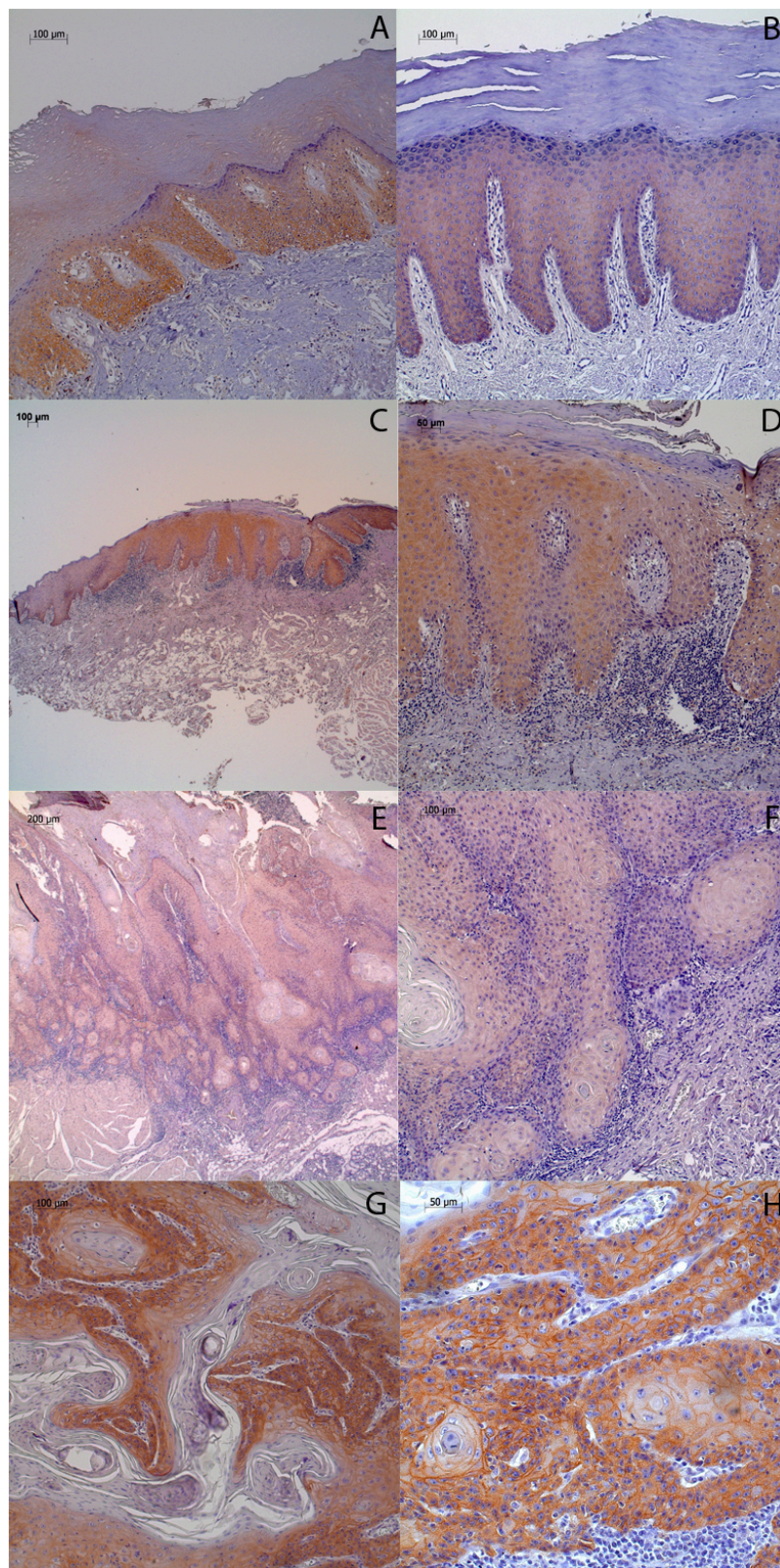


Figura 17 – Imunomarcação membranosa e citoplasmática dos casos de queilite actínica (A,B,C e D), e carcinoma espinocelular de lábio (E,F,G e H).

5.4 Análise estatística

5.4.1 Análise da sobrevida global

As Figuras a seguir ilustram as análises de sobrevida global e comparação com grupos de risco: T e N, tratamento primário, idade, esvaziamento cervical, os 3 métodos de gradação histológico, recorrência e análise imuno-histoquímica. O tempo mínimo de segmento foi de 0,33 meses, máximo de 236,5 e média de 78,6 meses. A sobrevida global em 5 anos foi de 87,8 % e em 10 anos 63,3 % (Figura 18).

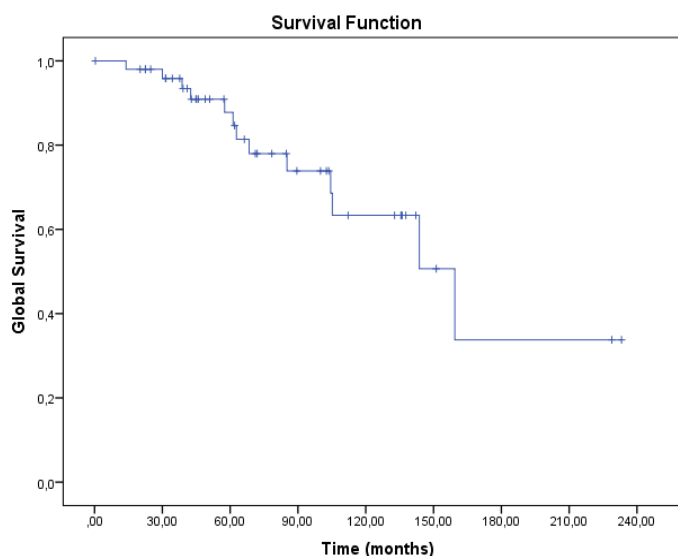


Figura 18 - Gráfico representativo da análise de sobrevida global em até 236 meses.

Na análise do grupo com estadio precoce (T1+T2) a sobrevida global em 5 anos foi de 94,1 % e 67,9 % em 10 anos. No grupo avançado (T3+T4) a sobrevida global em 5 anos caiu para 43,8 % e 21,9 % em 10 anos, diferença estatisticamente significante ($P=0,002$) (Figura 19).

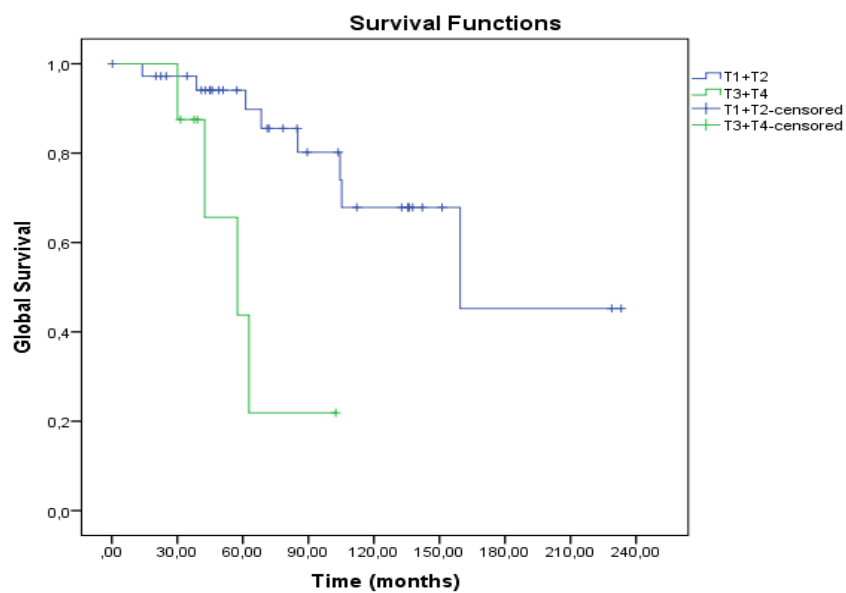


Figura 19 – Gráfico representativo da análise de sobrevida global com os grupos precoce (T1+T2) e avançado (T3+T4).

Na análise do grupo N, a sobrevida global em 5 anos foi 93,6 % e em 10 anos 80,4 % no grupo N0, já no grupo N1 houve queda em 5 anos com 71,4 % e 28,6 % em 10 anos, diferença estatisticamente significativa ($P=0,005$) (Figura 20).

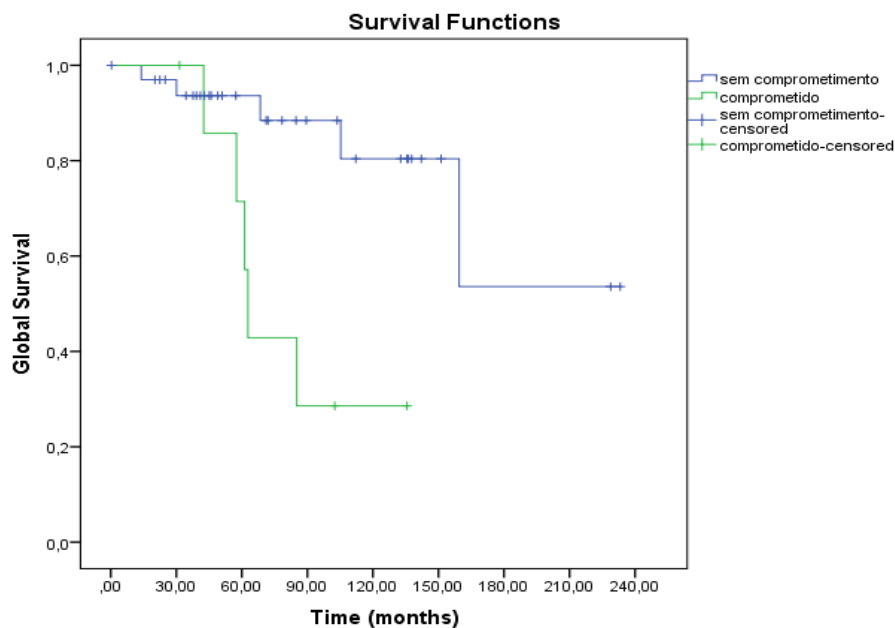


Figura 20 – Gráfico representativo da análise de sobrevida global com o comprometimento linfonodal N0 ou N1.

A análise dos grupos de acordo com o tratamento primário, cirurgia ou cirurgia associada à radioterapia, não houve diferença estatisticamente significativa ($P=0,702$). A sobrevida global em 5 anos foi de 89,7 % para aqueles que realizaram cirurgia como forma de tratamento. Cirurgia associada à radioterapia, a sobrevida global em 5 anos foi de 61,3 % (Figura 21).

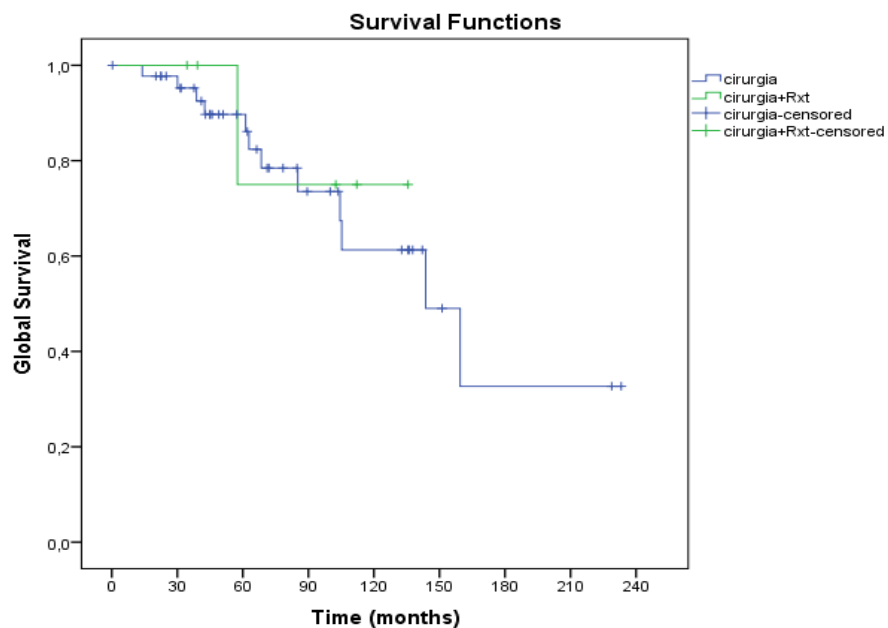


Figura 21 – Gráfico representativo da análise de sobrevida global de acordo com o tratamento primário.

A idade dos pacientes também não houve diferença estatisticamente significativa ($P=0,271$). A sobrevida global em 5 anos para aqueles ≤ 50 anos foi de 91,7 % e pra os > 50 anos, 90,1 % (Figura 22).

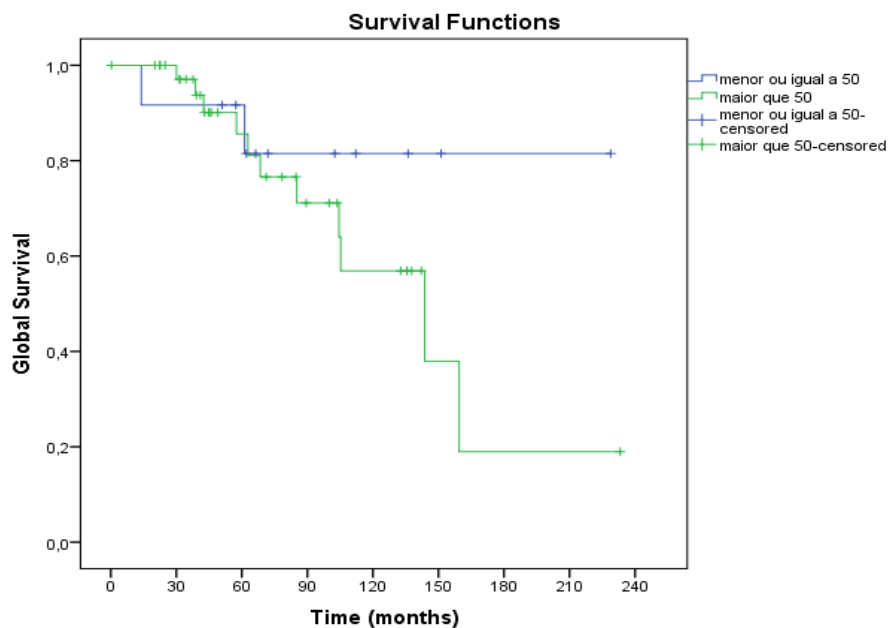


Figura 22 – Gráfico representativo da análise de sobrevida global de acordo com a idade.

A análise do esvaziamento cervical como forma de tratamento para alguns pacientes, não houve diferença estatisticamente significativa ($P=0,186$). A sobrevida global de 5 anos para aqueles que passaram pelo procedimento foi de 80 % e 89,1 % para os que não passaram (Figura 23).

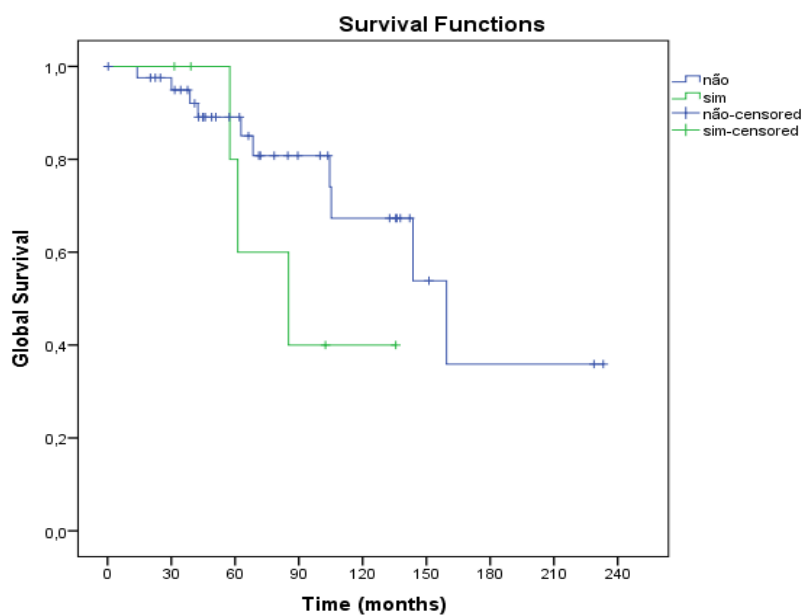


Figura 23 – Gráfico representativo da análise de sobrevida global para pacientes que foram submetidos ao esvaziamento cervical.

A análise do método de gradação Escala BD houve diferença estatisticamente significativa ($P=0,045$) sendo o único entre os 3 analisados. A sobrevida global em 5 anos dos casos graduados em baixo risco prognóstico foi de 95,7 %, médio risco 83 % e alto risco 75 % (Figura 24).

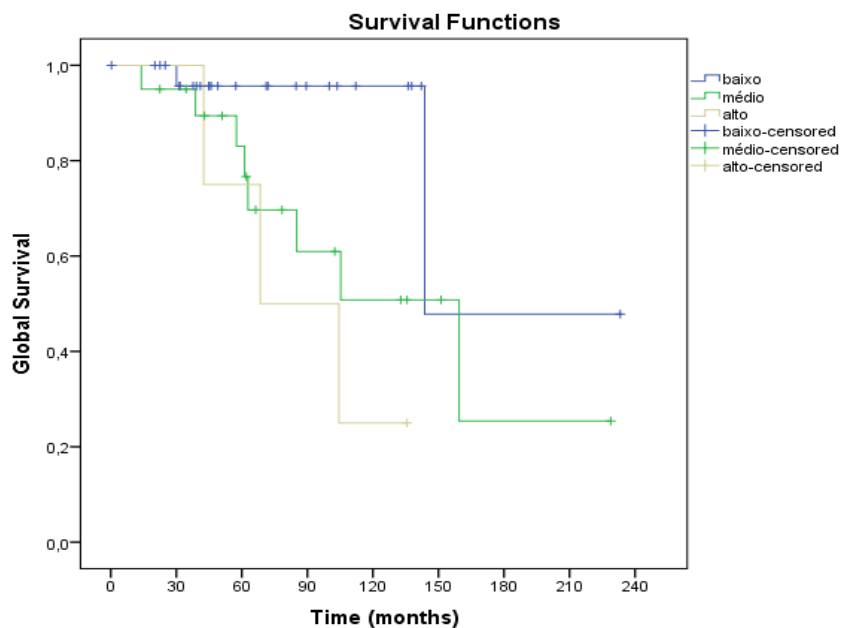


Figura 24 – Gráfico representativo da análise de sobrevida global da Escala BD

No método MRH, não houve diferença estatisticamente significativa ($P=0,222$) quando comparado à sobrevida global que em 5 anos foi de 100 % para os casos graduados como baixo risco prognóstico, 83,8 % para médio e 66,7 % para alto risco (Figura 25).

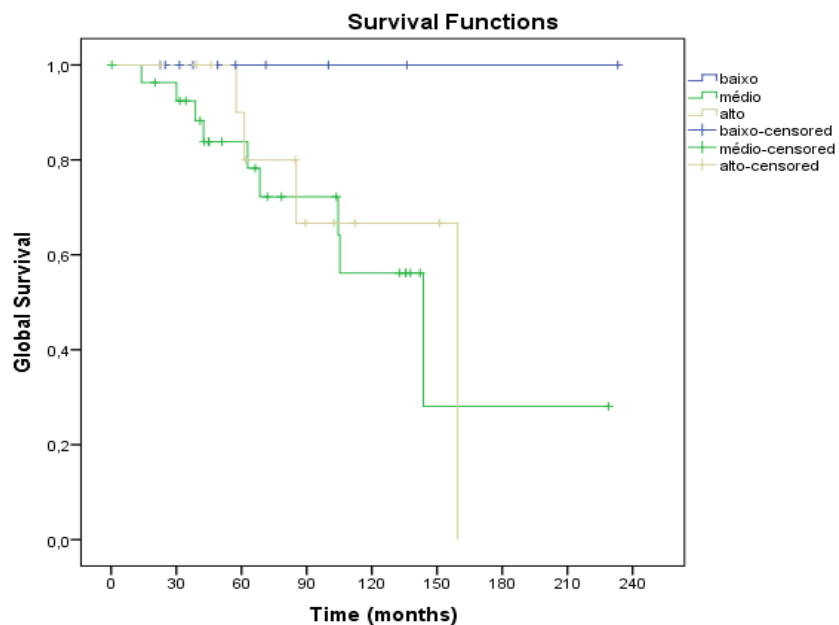


Figura 25 – Gráfico representativo da análise da sobrevida global do método MRH.

O método OMS, assim como MRH, também não houve diferença estatisticamente significante ($P=0,491$). A sobrevida global em 5 anos para os graduados como baixo risco prognóstico foi de 93,1 %, para médio 87,5 % e alto 53 % (Figura 26).

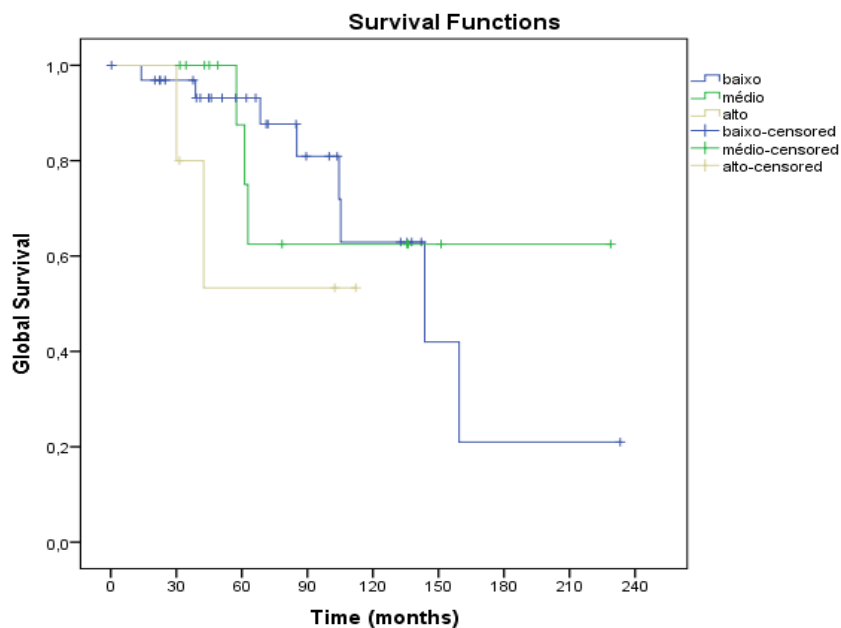


Figura 26 – Gráfico representativo da análise da sobrevida global do método da OMS.

A análise da expressão da proteína EGFR nos 22 casos de CEC não houve diferença estatisticamente significativa entre os casos hiperexpressos e hipoexpressos ($P=0,808$). A sobrevida global em 10 anos dos casos hiperexpressos foi de 83,3 % e 75 % nos hipoexpressos (Figura 27).

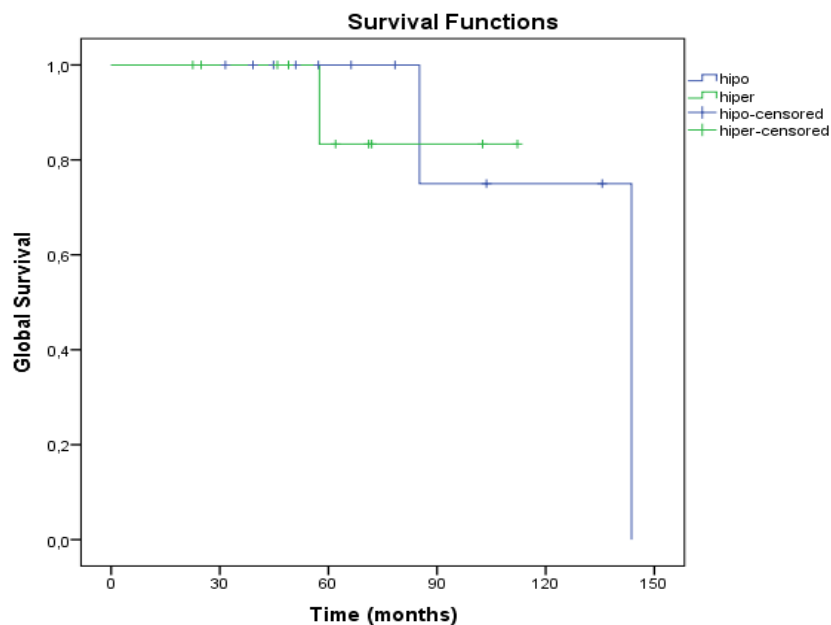


Figura 27 – Gráfico representativo da análise da sobrevida global de acordo com a expressão proteica da EGFR.

5.4.2 Análise da sobrevida doença específica

A sobrevida doença específica foi de 96,4 % em 61,2 meses (Figura 28).

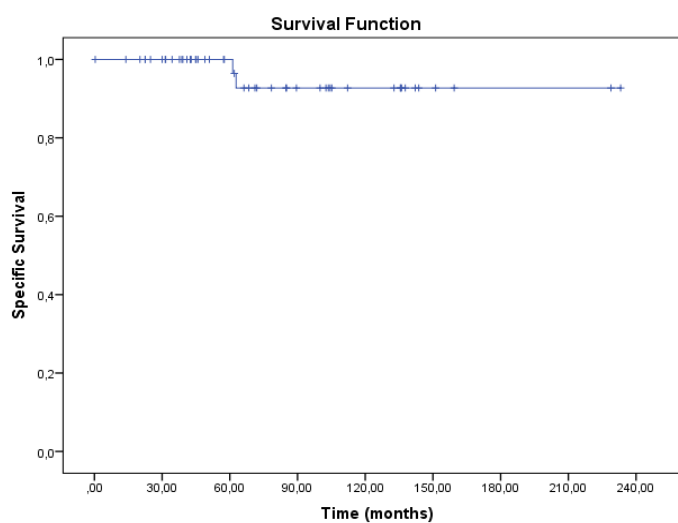


Figura 28 – Gráfico representativo da análise de sobrevida doença específica.

5.4.3 Análise da sobrevida livre de recorrência

A recorrência mínima foi em 2,8 meses e a máxima 56,77 com média de 24,21 meses. A sobrevida livre de recorrência em 5 anos foi de 76,2 % (Figura 29).

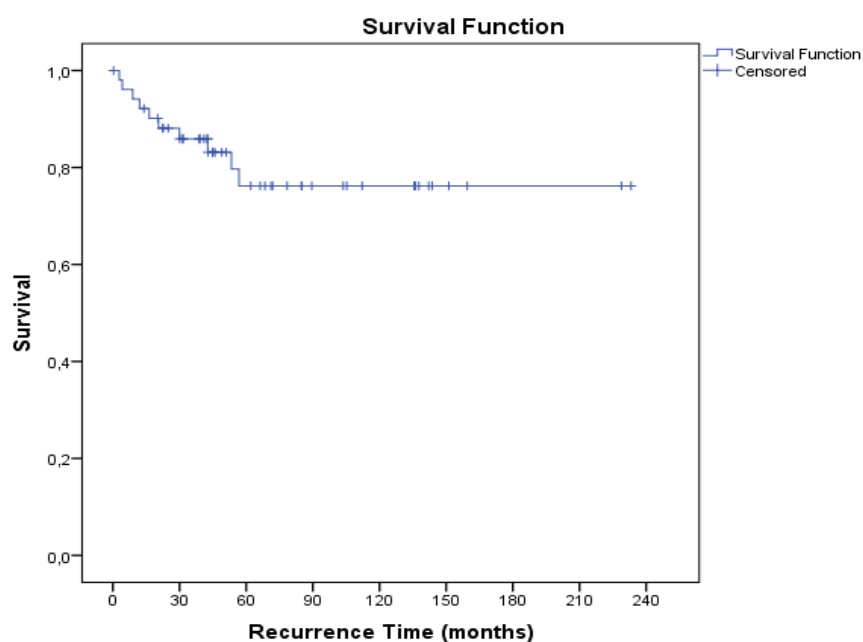


Figura 29 – Gráfico representativo da análise do tempo de recorrência.

As Figuras a seguir ilustram a sobrevida livre de recorrência em comparação às variáveis idade, fumo, estadio TNM, métodos de gradação histopatológica e expressão proteica. A sobrevida livre de recorrência para aqueles com mais de 50 anos foi de 75,7 % em 5 anos e 74,1 % para os pacientes com menos de 50 anos de idade. Não houve diferença estatisticamente significativa ($P=0,648$) (Figura 30).

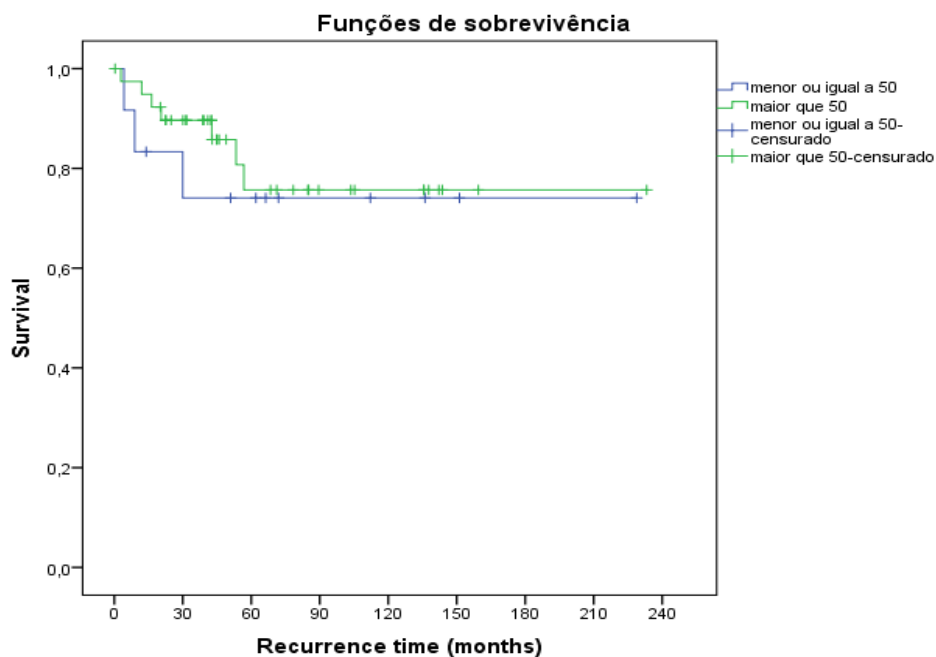


Figura 30 – Gráfico representativo da análise da sobrevida livre de recorrência de acordo com a idade.

Não houve diferença estatisticamente significativa do fumo quando correlacionado com a sobrevida livre de recorrência ($P=0,726$). Para os pacientes que alegaram nunca ter fumado, a sobrevida livre de recorrência em 5 anos foi de 71,4 %, para os fumantes 75,6 % e para ex-fumantes 75 % (Figura 31).

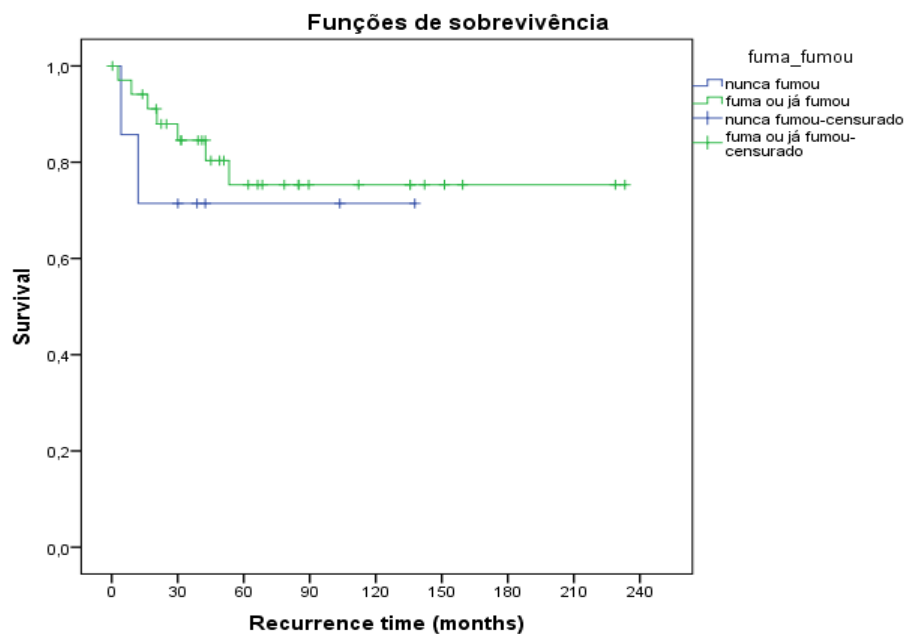


Figura 31 – Gráfico representativo da análise da sobrevida livre de recorrência com o fumo como fator de risco.

A sobrevida livre de recorrência em 5 anos para o estadio precoce (T1+T2) foi de 85,3 % e avançado (T3+T4) 37,5 % (Figura 32). Houve diferença estatisticamente significativa ($P=0,007$).

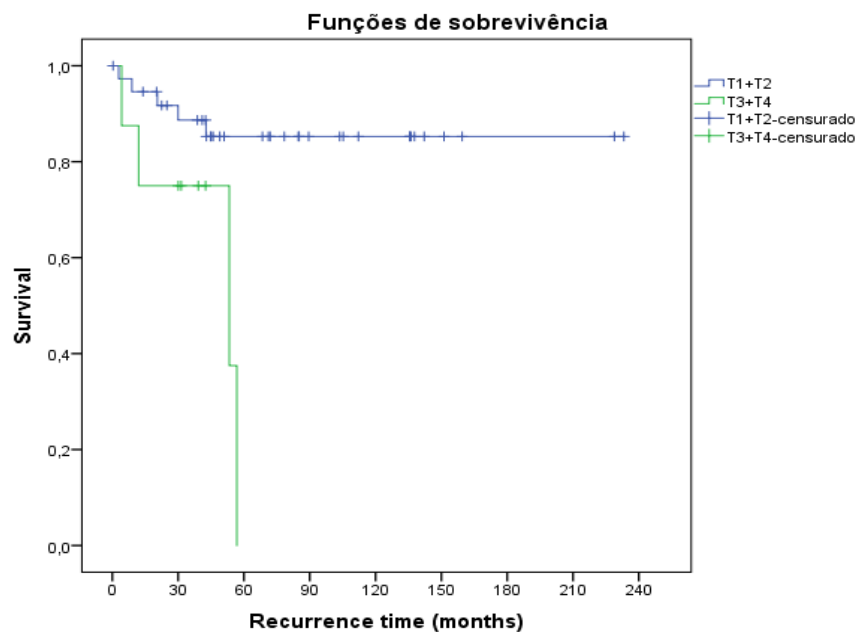


Figura 32 – Gráfico representativo da análise da sobrevida livre de recorrência com o estadio precoce (T1+T2) e avançado (T3+T4).

Para aqueles sem comprometimento linfonodal, a sobrevida livre de recorrência em 5 anos foi de 87,6 %, e para os pacientes com comprometimento linfonodal, 37,5 % (Figura 33). Diferença estatisticamente significativa ($P=0,01$).

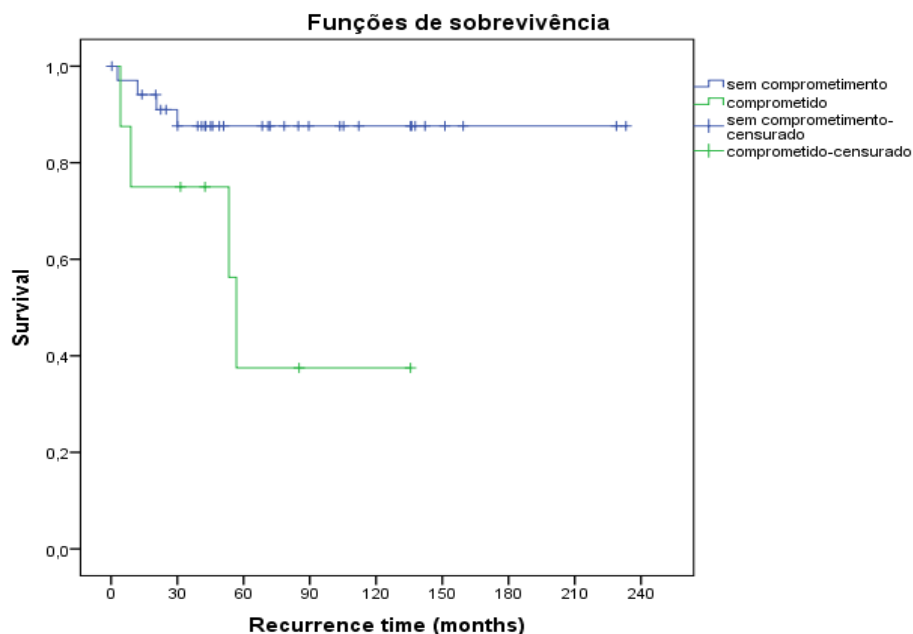


Figura 33 – Gráfico representativo da análise da sobrevida livre de recorrência com o comprometimento linfonodal.

Os pacientes que realizaram cirurgia como forma de tratamento tiveram sobrevida livre de recorrência de 81,2 % em 5 anos, aqueles que realizaram cirurgia e radioterapia 44,4 % (Figura 34). Diferença estatisticamente significativa ($P=0,03$).

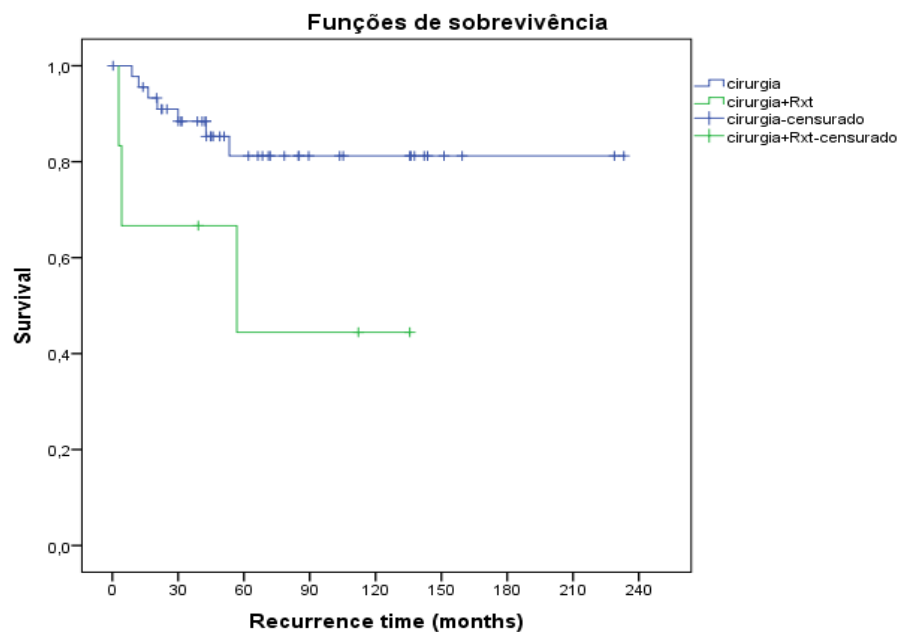


Figura 34 - Gráfico representativo da análise da sobrevida livre de recorrência com o tratamento primário cirurgia individual ou combinada com radioterapia.

Não houve diferença estatisticamente significativa para aqueles que realizaram esvaziamento cervical ($P=0,095$). Para os pacientes que não realizaram o procedimento, a sobrevida livre de recorrência em 5 anos foi de 80,2 %, e para os que realizaram 47,6 % (Figura 35).

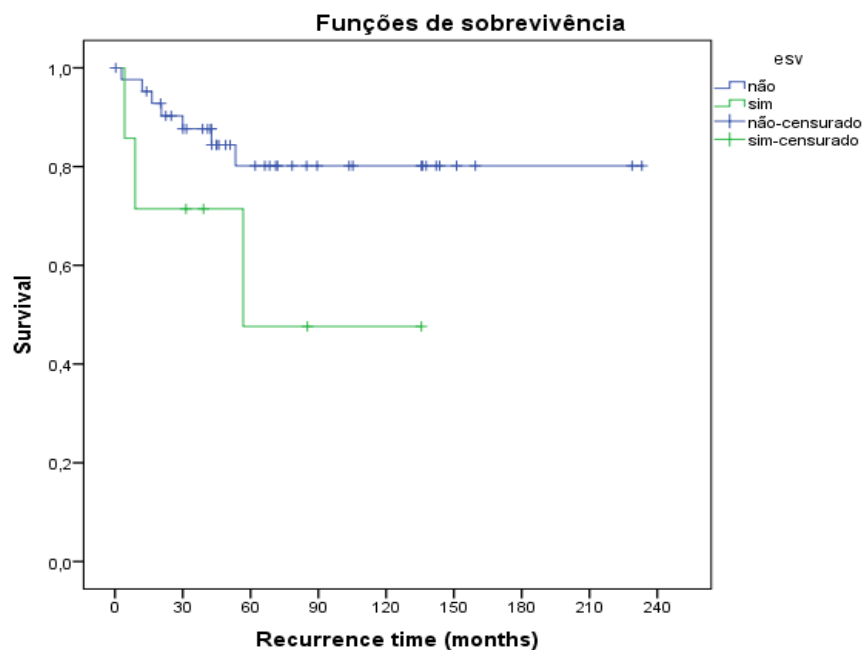


Figura 35 - Gráfico representativo da análise da sobrevida livre de recorrência com o esvaziamento cervical.

Nos modelos de gradação histológica Escala BD, MRH e OMS, não houve diferença estatisticamente significativa quando correlacionados à sobrevida livre de recorrência. Para a Escala BD, a sobrevida livre de recorrência em 5 anos para os casos graduados como baixo risco prognóstico foi de 88,4 %, médio risco 65,2 % e alto risco 66,7 % ($P=0,336$) (Figura 36).

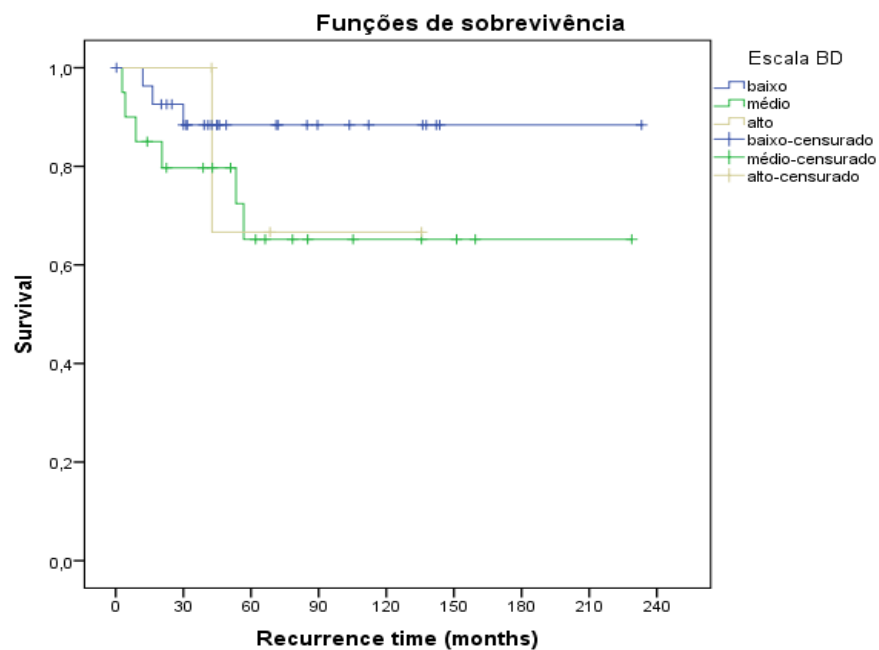


Figura 36 - Gráfico representativo da análise da sobrevida livre de recorrência com o modelo de gradação Escala BD.

Para o modelo MRH, a sobrevida livre de recorrência em 5 anos para os casos graduados como baixo risco prognóstico foi de 66,7 %, médio risco 80,7 % e alto risco 74 % ($P=0,487$) (Figura 37).

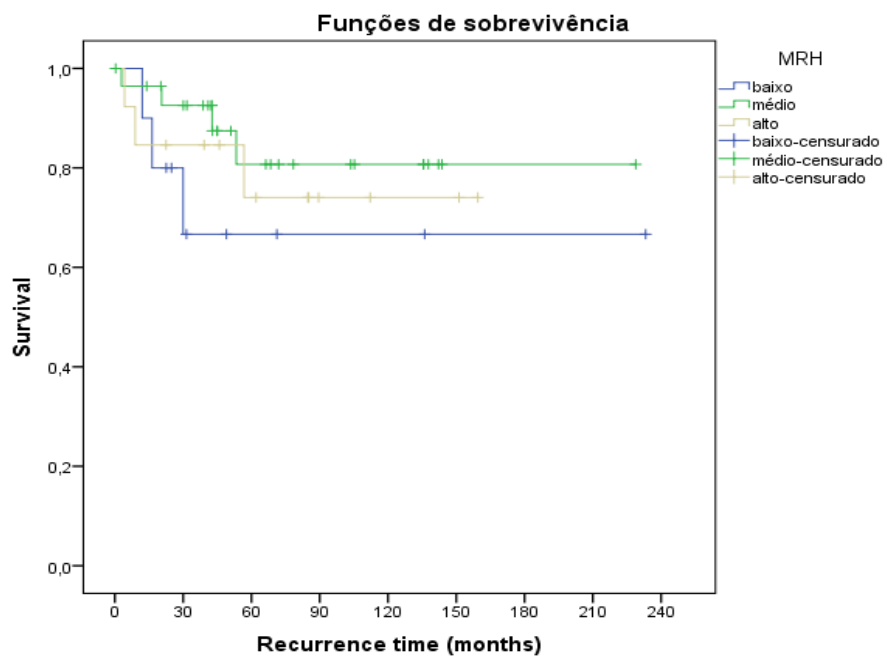


Figura 37 - Gráfico representativo da análise da sobrevida livre de recorrência com o modelo de gradação MRH.

Para o modelo OMS, a sobrevida livre de recorrência em 5 anos para os casos graduados como baixo risco prognóstico foi de 82,2 %, médio risco 61,2 % e alto risco 80 % ($P=0,613$) (Figura 38).

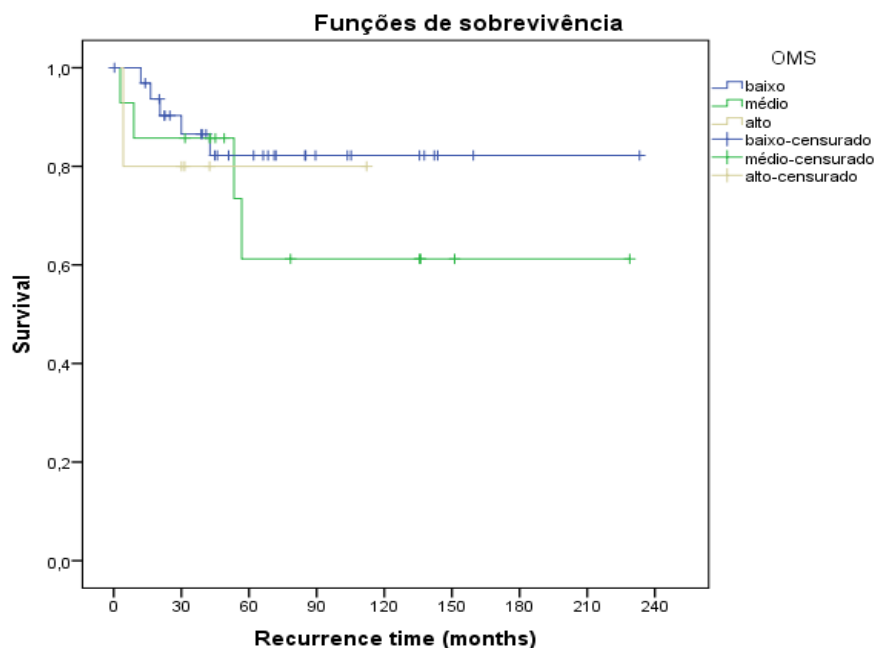


Figura 38 - Gráfico representativo da análise da sobrevida livre de recorrência com o modelo de gradação OMS

A análise da expressão da proteína EGFR, não houve diferença estatisticamente significativa quando correlacionada à sobrevida livre de recorrência ($P=0,397$). Os casos hipoexpressos apresentaram sobrevida livre de recorrência em 5 anos de 91,7 %, e os casos hiperexpressos 72 % (Figura 39).

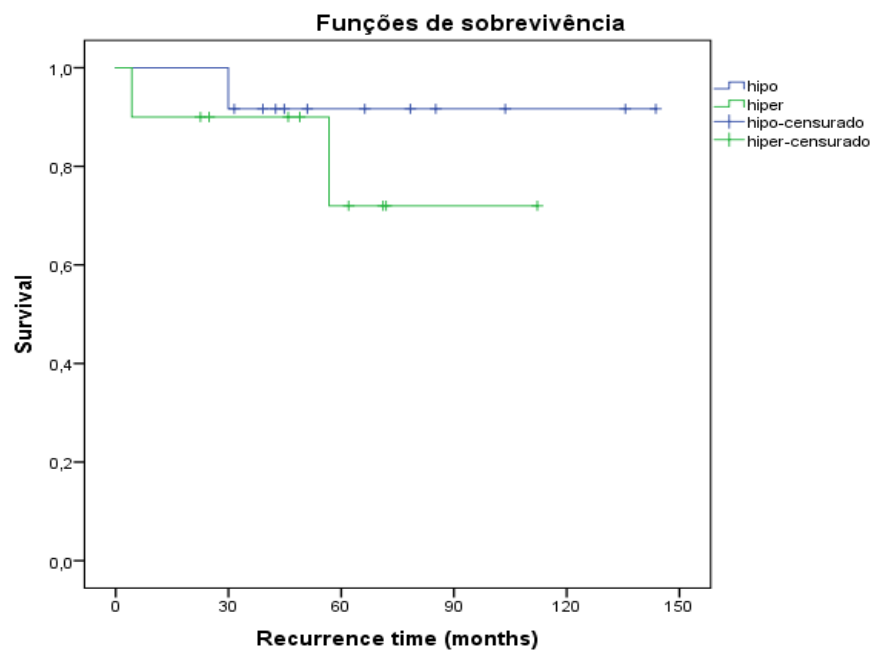


Figura 39 – Gráfico representativo da análise da sobrevida livre de recorrência com a expressão da proteína EGFR.

6 DISCUSSÃO

Os tumores malignos que acometem o lábio são um dos mais frequentes na cavidade oral (Amar et al., 2004) e o CEC de lábio corresponde à 95% das neoplasias malignas que afetam essa região, preferencialmente o vermelhão do lábio inferior (Santos et al., 1996; Vartanian et al., 2004; Batista et al., 2010; Moretti et al., 2011; Domínguez-Gordilo et al., 2015). Dos 53 casos analisados, a localização predominante estava em vermelhão de lábio inferior, provavelmente por conta da protrusão e conseqüentemente maior exposição à radiação solar (Scheinberg, 1992).

Os resultados epidemiológicos encontrados neste estudo, são semelhantes aos achados na literatura. A média de idade dos pacientes foi de 65 anos semelhante a estudos prévios (Batista et al., 2010; Pastuskek et al., 2015; Domínguez-Gordilo et al., 2015). A idade variou de 30 a 87 anos semelhante a outro estudo (Santos et al., 1996). O gênero masculino é predominante em CEC de lábio (Santos et al., 1996; Vartanian et al., 2004; Batista et al., 2010; Salihu et al., 2014; Pastuskek et al., 2015; Domínguez-Gordillo et al., 2015) assim como a raça branca (Santos et al., 1996; Batista et al., 2010) como mostrado neste estudo.

Neste estudo mais da metade dos pacientes, eram fumantes no momento do diagnóstico, concordando com outros autores (Santos et al., 1996; Batista et al., 2010; Pastuskek et al., 2015). Pacientes acometidos por CEC de lábio, tem altos índices de ingestão de bebida alcoólica (Santos et al., 1996; Batista et al., 2010) porém, contrastando com os resultados deste estudo, a maioria alegou nunca ter ingerido bebida alcóolica. O uso de tabaco e ingestão de bebida alcóolica podem estar correlacionados à etiologia do CEC de lábio (Carballeira et

al., 2014) embora a exposição aos raios UV seja o fator primordial (Uribe, Gonzales, 2011). Este tecido compartilha características tanto da mucosa oral quanto da pele (Domínguez-Gordillo et al., 2015).

O CEC de lábio apresenta um prognóstico mais favorável quando comparado ao CEC de outros sítios intrabuciais (Batista et al., 2010) porém há muitos pacientes que morrem apesar de terem sido classificados clinicamente em estadios precoces e tratados de acordo com a necessidade (Anneroth et al., 1987). Estes pacientes tendem a ser diagnosticados em estadios precoces (T1 ou T2) (Santos et al., 1996; Vartanian et al., 2004; Pastuskek et al., 2015), assim como mostrado neste estudo, provavelmente devido à localização do tumor que facilita o diagnóstico (Vartanian et al., 2004) e desta forma, metástases são incomuns (Vartanian et al., 2004; Batista et al., 2010; Amar et al., 2004). Apesar de serem reportados casos de metástases para linfonodos N2 ou N3 (Vartanian et al., 2004) e metástases à distância (Santos et al., 1996; Carballeira et al., 2014), neste estudo não foram observados tais casos, que podem ser justificados por grande parte da amostra ter sido diagnosticada precocemente.

As características celulares das células localizadas no fronte de invasão tumoral podem ser importantes para as escolhas de tratamentos adotadas em neoplasmas orais (Bryne et al., 1992). Almangush et al. (2015), consideram células individuais ou pequenos grupos de até 5 células, graduando de forma mais elevada de acordo com esta característica e indicando um pior prognóstico. Os 3 métodos de gradação histopatológica foram realizados separadamente neste estudo, comparados entre si e apresentaram discordância entre os casos como reportado por Frare (2015). Os modelos que mais concordaram entre si foram a OMS e Escala BD que graduaram a maioria dos pacientes em baixo risco prognóstico. O CEC de lábio, mostra-se em gradações histopatológicas baixas (Santos et al., 1996; Batista et al., 2010; Pastuskek et al., 2015), porém, neste estudo, o modelo MRH teve a

maioria graduada como médio risco prognóstico. Provavelmente porque parte dos tecidos biopsiados analisados possuíam infiltrado linfoplasmocitário escasso ou ausente, o que elevou a gradação para maior risco prognóstico no modelo MRH. Nos modelos Escala BD e OMS, 15,09% e 9,43% respectivamente, foram graduados em grau 3 de alto risco prognóstico, assim como outro estudo (Pastuskek et al., 2015).

Os modelos de gradação OMS e MRH requerem mais tempo de análise, visto que as características a serem observadas são inúmeras. O modelo mais simples, prático e eficiente para ser aplicado para o CEC de lábio foi a Escala BD concordando com estudo prévio que utilizou amostras de CEC de língua (Almangush et al., 2015). As características a serem observadas são duas: tumores $<$ ou $\geq$ a 4mm e células individuais ou ninhos de até 5 células, as chamadas *buds*. Foram encontrados 17 (32,08%) casos com *buds* e 17 (32,08%) casos eram maiores que 4mm. Comparando esta análise com estudo feito em CEC de língua, resultado semelhante foi encontrado em relação à presença de *buds*, porém, a maioria dos casos era $\geq$ 4mm (Almangush et al., 2015) diferente dos casos de CEC de lábio.

Apesar do modelo MRH ter sido classificado em muitos casos como médio e alto risco prognóstico, nenhum caso deste estudo foi classificado como padrão de invasão tipo 5 e nem invasão de grandes nervos (>1 mm) porém, Brandwein-Gensler et al., (2005) reportaram tais eventos em CEC intra-bucal. Estes fatos podem ser explicados pela maior agressividade do CEC intraoral em comparação ao CEC de lábio (Batista et al., 2010). A Escala BD foi a única a ser correlacionada com a sobrevida global quando graduada em alto risco prognóstico, no entanto, nenhum dos três métodos aplicados foi correlacionado com a sobrevida livre de recorrência, o que indica que estes métodos não puderam prever a recorrência do CEC de lábio.

Independente da gradação histopatológica, altos índices de expressão da proteína EGFR são reportados (Andrade et al., 2015).

Em nossas análises, marcação membranosa e citoplasmática foram notadas nas duas lesões analisadas, CEC e QA, pois a proteína EGFR atua em diversas fases do ciclo celular em importantes vias de sinalização (Wheeler et al., 2010). Este tipo de marcação também é reportado em outro estudo (Carballeira et al., 2014). Não houve diferença estatisticamente significativa na expressão da EGFR entre CEC e QA, sugerindo que esta proteína não foi silenciada/supressa durante a progressão da QA para CEC de lábio. A hiperexpressão da EGFR foi observada em 10 de 22 casos de CEC de lábio analisados, outros estudos encontraram resultados semelhantes (Sok et al., 2006; McIntire et al., 2012; Carballeira et al., 2014; Andrade et al., 2015). Apesar do índice da hiperexpressão da EGFR em nosso estudo, não foi correlacionado à sobrevida global ou livre de recorrência, o diagnóstico precoce e tratamento adequado foram mais importantes.

A análise da sobrevida global foi de 87,8% em 5 anos e 63,3% em 10 anos, concordando com outros estudos (Caballeira et al., 2014; Schüller et al., 2015 e Pastuskek et al., 2015). A recorrência livre de doença em 5 anos foi de 76,2% assim como já relatado (Schüller et al., 2015). Tumores avançados (T3+T4) ou com metástase para linfonodo, foram associados ao pior prognóstico concordando com estudo de Santos et al. (1996). Na ausência de metástases cervicais, o câncer de lábio tem um prognóstico favorável e altas chances de cura (Gooris et al., 2002).

Neste estudo os 2 pacientes que foram a óbito devido a doença tiveram recorrência regional. Além disso, aqueles com margens comprometidas, realizaram cirurgia combinada à radioterapia como forma de tratamento e observou-se relação à menor sobrevida livre de recorrência.

A análise de sobrevida doença específica não foi possível realizar devido ao baixo índices de óbito pela doença, concordando com estudos prévios (Batista et al., 2010; Schüller et al., 2015), um índice

baixo de pacientes veio a óbito devido à doença, (somente 2) quando comparado a outro estudo (Santos et al., 1996).

O diagnóstico precoce do CEC de lábio é essencial para um melhor prognóstico. As características clínicas associadas à gradação histopatológica poderão auxiliar no plano de tratamento, evitando mutilações e conseqüentemente, perda na qualidade de vida do paciente.

7 CONCLUSÃO

A análise dos resultados obtidos permitiu concluir que:

- a) o único modelo de gradação histológico avaliado correlacionado à sobrevida global foi a Escala BD. Um modelo prático, simples e eficaz como o método histológico Escala BD pode ser aplicado para a avaliação do risco prognóstico em CEC de lábio;
- b) o estadio clínico avançado e envolvimento linfonodal foi correlacionado com menor sobrevida global e sobrevida livre de recorrência;
- c) o tratamento cirúrgico e radioterápico combinados, foram correlacionados à menor sobrevida livre de recorrência;
- d) a expressão proteica da EGFR em CEC de lábio, não foi correlacionada com sobrevida global e livre de recorrência. Não houve diferença da expressão da proteína entre CEC de lábio e QA.

8 REFERÊNCIAS*

Almangush A, Coletta R, Bello I, Bitu C, Keski-Sänti H, Mäkinen L, et al. A simple novel prognostic model for early stage oral tongue cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2015Feb;44(2):143-50.

Amar A, Franzi S, Curioni O, Rapoport A, Cervantes O. Neck dissection in the treatment of squamous cell carcinoma of the lip. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2004Nov-Dec;70(6):772-5.

Andrade A, Ferreira SJ, Ferreira SM, Ribeiro C, Freitas R, Galvão H. Immunoexpression of EGFR and EMMPRIN in a series of cases of head and neck squamous cell carcinoma. *Pathol Res Pract*. 2015Oct;211(10):776-81.

Anneroth G, Batsakis J, Luna M. Review of the literature and recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. *Scand J Dent Res*. 1987Jun;95(3):229-49.

Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization Classification of tumors. In: N. Gale, B.Z. Pilch, D. Sidransky, W.H. Westra, J. Califano, editors. *Epithelial Precursor Lesions. Pathology and Genetics. Head and Neck*. Lyon; IARC press 2005. P.141-2.

Batista AC, Costa NL, Oton-Leite AF, Mendonça EF, Alencar Rde C, Silva TA. Distinctive clinical and microscopic features of squamous cell carcinoma of oral cavity and lip. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010Mar;109(3):e74-9.

Bhandari K, Wang DC, Li SC, Jiang BH, Guo YX, Koirala U, et al. Primary cN0 squamous cell carcinoma and elective neck dissection: systematic review and meta-analysis. *Head Neck*. 2015Sep;37(9):1392-400.

Brandwein-Gensler M, Teixeira M, Lewis C, Lee B, Rolnitzky L, Hille J, et al. Oral squamous cell carcinoma: histologic risk assessment, but not margin status, is strongly predictive of local disease-free and overall survival. *Am J Surg Pathol*. 2005Feb;29(2):167-78.

*Baseado em:

International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 25 ago.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html

Bronte G, Silvestris N, Castiglia M, Galvano A, Passiglia F, Sortino G, et al. New findings on primary and acquired resistance to anti-EGFR therapy in metastatic colorectal cancer: do all roads lead to RAS? *Oncotarget*. 2015Sep22;6(28):24780-96.

Bryne M, Koppang H, Lilleng R, Kjaerheim A. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinoma has high prognostic value. *J Pathol*. 1992Apr;166(4):375-81.

Carballeira A, Ginarte M, Diniz-Freitas M, Fernández-Campos I, Gude F, Fraga M, et al. Immunohistochemical evaluation of EGFR expression in lip squamous cell carcinoma. Correlation with clinicopathological characteristics. *Histol Histopathol*. 2014May;29(5):641-8.

Cavalcante AS, Anbinder AL, Carvalho YR. Actinic cheilitis: clinical and histological features. *J Oral Maxillofac Surg*. 2008Mar;66:498-503.

Correia M, Thiagarajan V, Coutinho I, Gajula G, Petersen S, Neves-Petersen M. Modulating the structure of EGFR with UV light: new possibilities in cancer therapy. *PloS One*. 2014Nov11;9(11)e111617.

Coutinho-Camillo CM, Lourenço SV, Nishimoto IN, Kowalski LP, Soares FA. Caspase expression in oral squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2011Aug;33(8):1191-8.

Domínguez-Gordillo A, Esparza-Gómez G, García-Jimenez B, Cerero-lapiedra R, Casado-Gómez I, Romero-Lastra P, et al. The pattern of lip câncer occurrene over the 1990-2011 period in public hospital in Madrid, Spain. *J Oral Pathol Med*. 2015.

El-Abaseri T, Fuhrman J, Trempus C, Shendrik I, Tennant R, Hansesn L. Chemoprevention of UV light-induced skin tumorigenesis by inhibition of the epidermal growth fator receptor. *Cancer Res*. 2005May1;65(9):3958-65.

Frare J. Análise das características clinicopatológicas de carcinomas espinocelulares orais em pacientes jovens [tese]. UNICAMP 2015.

Gooris P, Vermey A, de Visscher J, Burlage F, Roodenburg J. Supraomoyoid neck dissection in the management of cervical lymph node metastases of squamous cell carcinoma of the lower lip. *Head Neck*. 2002Jul24(7):678-83.

Greene F, Page D, Fleming I, Fritz A, Balch C. *AJCC Cancer staging handbook;from the AJCC cancer staging manual*. New York;Springer Verlag;2010. 484p.

Hansen A, Siu L. Epidermal growth factor receptor targeting in head and neck cancer: have we been just skimming the surface? *J Clin Oncol*. 2013Apr10;31(11):1381-3.

Main J, Pavone M. Actinic cheilitis and carcinoma of the lip. *J Can Dent Assoc*. 1994Feb;60:113-6.

McIntyre J, Bose P, Klimowicz A, Brockton N, Petrillo S, Mathews W, et al. Specific and sensitive hydrolysis probe-based real time PCR detection of epidermal growth factor receptor variant III in oral squamous cell carcinoma. *PloS One*. 2012;7(2):e31723.

Moore S, Johnson N, Pierce A, Wilson D. The epidemiology of lip cancer: a review of global incidence and aetiology. *Bucal Dis*. 1999Jul;5:185-95.

Moretti A, Vitullo F, Augurio A, Pacella A, Croce A. Surgical management of lip cancer. *Acta Otorhinolaryngol Ital*. 2011Feb;31(1):5-10.

Nandakumar V, Vaid M, Tollefsbol T, Katiyar S. Aberrant DNA hypermethylation patterns lead to transcriptional silencing of tumor suppressor genes in UVB-exposed skin and UVB-induced skin tumors of mice. *Carcinogenesis*. 2011Apr;32(4):597-604.

Ozturk K, Gode S, Erdogan U, Akyildiz S, Apaydin F. Squamous cell carcinoma of the lip: survival analysis with long-term follow-up. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2015Nov;272(11):3545-50.

Pastuszek A, Hanson M, Grigg R. Squamous cell carcinoma of the lip: depth of invasion. Local recurrence and regional metastases. Experience of rural multidisciplinary head and neck unit. *J Laryngol Otol*. 2015.

Perea-Milla Lopez E, Miñarro-Del Moral R, Martínez-García C, Zanetti R, Rosso R, Serrano S, et al. Lifestyle environmental and phenotypic factors associated with lip cancer: a case-control study in southern Spain. *Br J Cancer*. 2003Jun2;88(11):1702-7.

Salihu S, Güven O, Glareva E, Prekazi M, Salihu L. A clinical study on survival rate of patients with squamous cell carcinoma of the lower lip in Kosovo. *J Craniomaxillofac Surg*. 2014Dec;42(8):1773-7.

Santos JN, de Souza SO, Nunes FD, Sotto MN, de Araújo VC. Altered cytokeratin expression in actinic cheilitis. *J Cutan Pathol*. 2003Apr;30(4):237-41.

Santos LR, Cernea CR, Kowalski LP, Carneiro PC, Soto MN, Nishio S, et al. Squamous-cell carcinoma of the lower lip: a retrospective study of 58 patients. *São Paulo Med J*. 1996Mar-Apr;114(2):1117-26.

Scheinberg RS. Carbon dioxide laser treatment of actinic cheilitis. *West J Med.* 1992Feb;156(2):192-3.

Schüller M, Gosau M, Müller S, Gerken M, Rohrmeier C, Legal S, et al. Long-term outcome and subjective quality of life after surgical treatment of lower lip cancer. *Clin Oral Invest.* 2015Jun;19(5):1093-9.

Sok J, Coppelli F, Thomas S, Lango M, Xi S, Hunt J, et al. Mutant epidermal growth factor receptor (EGFRvIII) contribute to head and neck cancer growth and resistance to EGFR targeting. *Clin Cancer Res.* 2006Sep1;12(17):5064-73.

Szabó B, Nelhubel G, Kárpáti A, Kenessey I, Jóri B, Skékely C, et al. Clinical significance of genetic alterations and expression. Of epidermal growth factor receptor (EGFR) in head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Oncol.* 2011Jun;47(6):487-96.

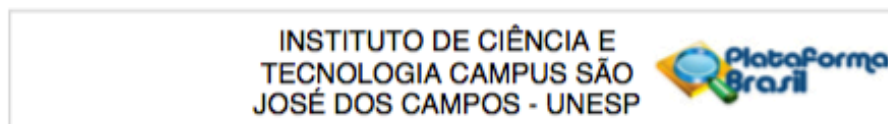
Uribe P, Gonzales. Epidermal growth factor receptor (EGFR) and squamous cell carcinoma of the skin: molecular bases for EGRF-targeted therapy. *Pathol Res Pract.* 2011Jun15;207(6):337-42.

Vartanian JG, Carvalho AL, Araújo Filho MJ, Hattori Junior M, Magrin J, Kowalski LP. Predictive factors and distribution of lymph node metastasis in lip cancer patients and their implications on the treatment of the neck. *Oral Oncol.* 2004Feb40(2):223-7.

Wheeler SE, Suzuki S, Thomas SM, Sen M, Leeman-Neill RJ, Chiosea SI, et al. Epidermal growth factor receptor variant III mediates head and neck cancer cell invasion via STAT3 activation. *Oncogene.* 2010Sep16;29(37):5135-45.

Yokota T. Is biomarker research advancing the era of personalized medicine for head and neck cancer? *Int J Clin Oncol.* 2014Apr;19(2):211-19.

ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: Investigação da variação genética do EGFR em queilite actínica e carcinoma espinocelular de lábio inferior

Pesquisador: Luciana Rocha Strieder

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 41299615.0.0000.0077

Instituição Proponente: Instituto de Ciência e Tecnologia de São José dos Campos - UNESP

Patrocinador Principal: FUNDAÇÃO DE AMPARO A PESQUISA DO ESTADO DE SÃO PAULO

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 958.150

Data da Relatoria: 18/02/2015

Apresentação do Projeto:

Os objetivos deste estudo serão investigar a significância clínica da variação genética do EGFR em carcinoma espinocelular primário de lábio inferior, através da técnica de irrosequenciamento; comparar com os casos de queilite actínica e correlacionar os resultados obtidos com a epidemiologia e o prognóstico dos pacientes com queilite actínica. Os dados demográficos e clinicopatológicos serão coletados dos prontuários dos pacientes com diagnóstico confirmado. O DNA de 40 amostras (20 de QA e 20 de CEC) de tecidos parafinados será extraído e as amostras íntegras serão submetidas à amplificação por PCR, utilizando-se os iniciadores específicos para o EGFR (éxons 18, 19, 20 e 21). A reação de síntese por sequenciamento da fita complementar será realizada automaticamente; o sinal emitido durante a reação será detectado por uma câmera e convertido em picos para formar um pirograma. Posteriormente, para a validação dos resultados obtidos serão realizadas reações imunohistoquímicas. Os dados serão submetidos a testes estatístico de Qui-quadrado ou exato de Fisher. Para os casos de carcinoma, o método de Kaplan Meier será aplicado para verificar as taxas de sobrevida atuarial e o teste de log-rank será utilizado para se comparar as curvas de sobrevida. Para todos os testes estatísticos o nível de significância de 5% será adotado.

Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777

Bairro: Jardim São Dimas

CEP: 12.245-000

UF: SP

Município: SÃO JOSÉ DOS CAMPOS

Telefone: (12)3947-9078

Fax: (12)3947-9010

E-mail: cep@focjc.unesp.br

INSTITUTO DE CIÊNCIA E
TECNOLOGIA CAMPUS SÃO
JOSÉ DOS CAMPOS - UNESP



Continuação do Parecer: 958.150

Objetivo da Pesquisa:

Investigar as possíveis alterações genéticas do EGFR em carcinoma espinocelular primário de lábio inferior e da queilite actínica.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Não oferece riscos

Benefícios: Conduzir ao aprimoramento das estratégias de tratamento para as lesões de lábio, através identificação dos possíveis casos responsivos ao emprego da nova geração de quimioterápicos evitando mutilações e comprometimento estético dos pacientes.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A relevância da pesquisa se dá exatamente pelos benefícios a que ela se propõe, conforme relatados no item anterior.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os termos obrigatórios foram apresentados. O TCLE está dispensado neste tipo de pesquisa.

Recomendações:

Alterar as datas no cronograma de execução apresentado no documento "Informações Básicas". O cronograma apresentado no projeto final já encontra-se atualizado.

O pesquisador deverá atender as normas da CONEP, com relação a apresentação de relatórios semestrais. O CEP não analisará novas submissões, caso haja pendência no envio de relatórios.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

O Colegiado aprova o parecer da relatora.

Endereço: Av. Engº Francisco José Longo 777

Bairro: Jardim São Dimas

CEP: 12.245-000

UF: SP

Município: SAO JOSE DOS CAMPOS

Telefone: (12)3947-9078

Fax: (12)3947-9010

E-mail: ceph@fosjc.unesp.br