LETÍCIA OLIVEIRA TONIN

**Análise imuno-histoquímica do CXCR4 em carcinomas epidermóides de
cavidade oral**

São Paulo
2018

LETÍCIA OLIVEIRA TONIN

**Análise Imuno-histoquímica do CXCR4 em carcinomas epidermóides de
cavidade oral**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós Graduação em Ciências Odontológicas para obter o título de Mestre em Ciências.

Área de Concentração: Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes Especiais

Orientador: Prof. Dr Fabio Daumas Nunes

São Paulo

2018

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Tonin, Letícia Oliveira.

Análise imuno-histoquímica do CXCR4 em carcinoma epidermoide de cavidade oral / Letícia Oliveira Tonin ; orientador Fábio Daumas Nunes. -- São Paulo, 2018.
88p. : fig., tab., ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas. Área de Concentração: Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes Especiais. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.
Versão corrigida

1. Carcinoma epidermoide. 2. CXCR4. 3. Imuno-histoquímica. 4. Carcinoma de células escamosas. I. Nunes, Fábio Daumas. II. Título.

Tonin LO. Análise imuno-histoquímica do CXCR4 em carcinoma epidermoide de cavidade oral. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas.

Aprovado em: 26/04/2018

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). Luciana Correa

Instituição: FOU SP

Julgamento: Aprovado

Prof(a). Dr(a). Fabio Coracin

Instituição: UNINOVE

Julgamento: Aprovado

Prof(a). Dr(a). Maria Fernanda Destro Setubal Rodrigues

Instituição: UNINOVE

Julgamento: Aprovado

Dedico esse trabalho aos meus pais, Sandra e Paulo, pelo apoio incondicional, amor e dedicação. Ao meu irmão, Saulo, pelo exemplo e companheirismo. Ao meu noivo, Camillo, pela paciência, pela ajuda durante todo esse período, e por ser meu maior incentivador.

AGRADECIMENTOS

A Deus, que me deu a força necessária, sabedoria e discernimento para finalizar mais essa etapa.

A minha mãe, Sandra, por sempre me incentivar a continuar estudando e por apoiar minhas decisões e sonhos. Por sempre ser tão dedicada e tornar cada volta pra casa nos finais de semana ou feriados tão prazerosos.

Ao meu pai, Paulo, por ser meu maior exemplo profissional, pelo apoio incondicional e, mesmo sendo dentista clínico, entender a minha vontade de não ficar só no consultório e buscar novos caminhos longe de casa.

Ao meu irmão Saulo, pelo apoio, incentivo e por ser meu maior companheiro desde sempre.

Ao meu noivo e futuro marido, Camillo, por todo amor, compreensão e paciência ao longo desses 12 anos juntos. Obrigada pelo incentivo, por ouvir minhas reclamações e por estar ao meu lado nos dias difíceis, me dando a força necessária para seguir em frente. Sem você eu não teria conseguido!

Ao meu orientador, Prof. Dr. Fabio Daumas Nunes, por me receber tão bem e ter me orientado durante esses dois anos! Obrigada pela dedicação, pelos ensinamentos e por ser um exemplo a ser seguido.

A minha co-orientadora, Prof^a. Dra Luciana Correa, pela orientação, pelos ensinamentos e por sempre ser tão solícita durante todo esse período! Obrigada por tudo!

A todos os professores do departamento (Prof^a. Marília, Prof^a. Suzana, Prof^a. Marina, Prof^a. Karen, Prof. Decio e Prof. Paulo) com quem tive o prazer de aprender e conviver durante esse período.

A Maria Fernanda, amiga que dividiu comigo mais essa etapa. Obrigada por tornar o dia a dia mais leve.

Aos amigos, Thalita, Jefferson e Marcos por sempre tirarem minhas dúvidas, principalmente durante a rotina. Obrigada também pelas caronas e companhia durante os almoços! Bruno, Natalia, Stephanie e Letícia por estarem dispostos a me ajudar e tirar dúvidas sempre que precisei. E a todos os outros amigos e colegas que dividiram comigo a “salinha dos alunos”, obrigada pelos momentos de estudo, descontração e pela conversa “jogada fora”.

Aos funcionários da secretaria, Vinícius e Fátima, e do laboratório Elisa, Juvani e Adriana, pela disponibilidade e auxílio.

As minhas amigas Letícia, Samira, Camila e Camilinha pelas conversas a distância, pela distração nos momentos mais cansativos, por ouvirem meus problemas e pelas palavras de incentivo sempre.

A todos os familiares e amigos pela torcida e incentivo.

Ao GENCAPO pelas amostras, possibilitando a execução desse trabalho.

A CAPES pelo apoio financeiro e por possibilitar a realização dessa pesquisa.

A Universidade de São Paulo (USP) por todas as oportunidades de estudo e crescimento profissional desde a graduação.

“Por vezes sentimos que aquilo que fazemos não é senão uma gota de água no mar.
Mas o mar seria menor se lhe faltasse uma gota”.
(Madre Teresa de Calcutá)

RESUMO

Tonin LO. Análise imuno-histoquímica do CXCR4 em carcinoma epidermoide de cavidade oral [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. Versão Corrigida.

O carcinoma epidermoide oral é uma das neoplasias mais comuns no Brasil e no mundo, porém seu prognóstico ainda é incerto principalmente devido ao diagnóstico tardio e presença de metástases. A análise de fatores relacionados ao prognóstico dessa doença é de suma importância e, o receptor de quimiocina denominado CXCR4, está sendo relacionado a um pior prognóstico devido a maior capacidade de invasão das células que o expressam, em diversas neoplasias. Apesar dessa relação estar demonstrada em vários tipos de cânceres, com relação ao de cavidade oral pouco se sabe até o momento. Assim, objetivo desse trabalho foi analisar a expressão imuno-histoquímica do receptor de quimiocina CXCR4 em carcinomas epidermóides de cavidade oral, e relacioná-la com variáveis clínicas e histológicas. Foram obtidos 94 blocos de carcinomas epidermóides oriundos de instituições parceiras para obtenção de cortes histológicos convencionais, corados com hematoxilina e eosina (HE), e cortes de TMA (tissue microarray). Foi realizado imuno-histoquímica para anticorpo anti-CXCR4 (ab124824, ABCAM, EUA) e análise da marcação em lâminas de TMA utilizando o software Image J (versão 1.49u). A intensidade de marcação imuno-histoquímica foi correlacionada com dados clínicos (TNM, tabagismo, etilismo e sobrevida) e histopatológicos (diferenciação histológica, infiltrado inflamatório e infiltração vascular, linfática e perineural) dos pacientes. Dos casos analisados 74,4% exibiram uma marcação fortemente positiva para o CXCR4, enquanto que o epitélio não tumoral mostrou uma marcação negativa ou fracamente positiva (71,1%; $p=0,011$). Tumores classificados como “bem diferenciados” apresentaram marcação fortemente positiva para a proteína estudada (53,3%; $p=0,049$). Não houve associação entre a marcação imuno-histoquímica do CXCR4 com sobrevida global em 5 anos ($\chi^2= 0.3$, $p=0.565$). Os resultados sugerem que a alta expressão dessa proteína não influencia no prognóstico e na sobrevida desses pacientes.

Palavras Chaves: Carcinoma epidermoide, CXCR4, Imuno-histoquímica, Carcinoma de células escamosas

ABSTRACT

Tonin LO. Immunohistochemical analysis of CXCR4 in squamous cell carcinoma of the oral cavity [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2018. Versão Corrigida.

Oral cancer is one of the most common neoplasia in Brazil and the world. Mainly due to a late diagnosis and presence of metastases its prognosis is still uncertain. Finding biological markers related to the prognosis of this disease is of paramount importance. The chemokine receptor CXCR4 is being related to a worse prognosis in several neoplasms because cells expressing it acquire a greater capacity of invasion. Although this relationship is demonstrated in several types of cancers, in the oral cavity it is uncertain. The aim of this study was to analyze by immunohistochemistry the CXCR4 chemokine receptor expression in oral squamous cell carcinomas, and related to clinical and histological variables. Conventional histological sections stained with hematoxylin and eosin (HE) were acquired from 94 blocks of oral squamous cell carcinoma for histological analysis. TMA (tissue microarray) was assembled from these blocks for anti-CXCR4 immunohistochemistry (ab124824, ABCAM, USA). Staining analysis was performed using Image J software (version 1.49u). The immunohistochemical signal intensity was correlated with clinical (TNM, smoking, alcoholism and survival) and histopathological parameters (histological differentiation, inflammatory infiltration, vascular, lymphatic and perineural infiltration). From the cases studied 74.4% showed a strong positivity for CXCR4, and the non-tumoral epithelium was negative or weakly positive (71.1%; $p = 0.011$). Tumors histologically well differentiated were strongly positive for the protein studied (53.3%; $p = 0.049$). There was no association between CXCR4 signal and global survival in 5 years ($\chi^2 = 0.3$, $p = 0.565$). These results suggest that a high expression of CXCR4 it is not related to prognosis and survival of patients of patients with oral squamous cell carcinoma.

Keywords: Squamous cell carcinoma, CXCR4, Immunohistochemical,

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AMP	Adenosina monofosfato
BSA	Soro fetal bovino
CCR1	C-C chemokine receptor type 1
CCR10	C-C chemokine receptor type 10
CEC	Carcinoma epidermoide de cavidade oral
CXCR1	C-X-C motif chemokine receptor type 1
CXCR4	C-X-C motif chemokine receptor type 4
CXCR6	C-X-C motif chemokine receptor type 6
CX3C	C-X3-C motif ligand 1
CXCL12	C-X-C motif chemokine ligand 12
DAB	Diaminobenzidina
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
FGF	Fator de crescimento fibroblástico
GENCAPO	Genoma do câncer de cabeça e pescoço
HE	Hematoxilina e Eosina
HIV	Vírus da Imunodeficiência humana
HPV	Papiloma vírus humano
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional do Câncer
INF	Interferon
KDa	Kilodalton
MAT	Microambiente Tumoral

NRF-1	Fator nuclear respiratório 1
OMS	Organização Mundial da Saúde
SDF-1	Stromal cell-derived factor 1
TEM	Transição epitélio mesênquima
TGF	Fator de crescimento transformante
TNF	Fator de necrose tumoral
TNM	Tamanho, metástase linfonodal, metástase a distância
TMA	Tissue microarrays
VEGF	Fator de crescimento endotelial vascular
WHIM	Warts, Hypogammaglobulinemia, Immunodeficiency, and Myelokathexis syndrome
YY 1	Yang Yang 1

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	17
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	19
2.1	Características do Carcinoma Epidermoide de Cavidade Oral	19
2.2	Características Histopatológicas e sua relação com o prognóstico.....	21
2.3	Inflamação	23
2.4	Características gerais das quimiocinas e seus receptores	26
2.5	CXCR4: receptor de quimiocina	27
3	PROPOSIÇÃO	31
3.1	Objetivos específicos	31
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	33
4.1	Análise Morfológica.....	33
4.2	Obtenção das lâminas de TMA.....	33
4.3	Reação Imuno-histoquímica	34
4.4	Análise semi-automatizada da marcação imuno-histoquímica	35
4.5	Metodologia Estatística.....	36
5	RESULTADOS	39
5.1	Caracterização da amostra	39
5.2	Análise Morfológica.....	41
5.3	Resultados da Análise Comparativa	42
5.4	Análise da Sobrevida	45
6	DISCUSSÃO	49
7	CONCLUSÕES	59
	REFERÊNCIAS	61
	APÊNDICE	73
	ANEXO	77

1 INTRODUÇÃO

O câncer de cabeça e pescoço constitui um grupo de neoplasia que representa cerca de 15% de todos os tipos de cânceres, sendo que desse grupo, cerca de 30% ocorre em cavidade oral (1). O tipo histológico mais comumente encontrado em cavidade oral é o carcinoma epidermoide, também conhecido como carcinoma espinocelular (CEC). Muitos são os fatores de risco relacionados a sua etiologia, entre eles temos o abuso de álcool e tabaco, combinado com a susceptibilidade genética (2).

A sobrevida estimada para o CEC, em 5 anos é de aproximadamente 50%, sendo considerada insatisfatória apesar das novas modalidades de tratamento (3). O comportamento clínico dessa neoplasia é bastante variado e, nota-se, que parâmetros clínicos e patológicos isolados não são suficientes para deduzir o seu comportamento biológico (4).

O câncer de cavidade oral, assim como outros localizados em diversos sítios anatômicos, possui um microambiente complexo e específico, que fornece as condições necessárias para o desenvolvimento/progressão ou não dessa neoplasia. Nesse microambiente tumoral há uma interação de diversos elementos como células normais e alteradas, vasos sanguíneos, substâncias produzidas localmente, além da atuação de células do sistema imune e de fatores secretores, como por exemplo diversas citocinas e quimiocinas (5).

As quimiocinas (citocinas quimiotáticas) são responsáveis pela migração coordenada de leucócitos e exercem papel fundamental na regulação de várias condições patológicas como doenças auto-imune, doenças crônicas, infecções virais e câncer (6,7). O CXCR4, é um receptor específico para a quimiocina CXCL12 (SDF-1), presente em células epiteliais e fibroblastos e está envolvido na quimiotaxia de linfócitos em áreas de inflamação que podem promover quimiotaxia para células cancerígenas (7,8). Essa ligação (CXCL12-CXCR4) faz parte de um eixo biológico em que, a expressão do CXCR4 está relacionada a sobrevivência de células tumorais, proliferação e migração dessas células (metástase) (6,7,9,10).

A expressão desse receptor está ligada a um pior prognóstico em vários tipos de tumor, como o câncer de mama, ovário, adenocarcinoma pancreático, e em vários

outros sítios (7,11), tendo sido demonstrada a superexpressão desse receptor em mais de 23 tipos de câncer (12,13).

Apesar da expressão do CXCR4 e sua relação com o processo de metástase estar demonstrada em diversos tipos de neoplasias, em cavidade oral pouco se sabe até o momento. Por isso, nosso estudo se propõe a analisar a marcação imuno-histoquímica do CXCR4 em TMAs de carcinoma epidermóide de boca, relacionando com aspectos clínicos e histopatológicos.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Características do Carcinoma Epidermoide de Cavidade Oral

O câncer de cavidade oral faz parte de um grupo heterogêneo de neoplasias localizadas na região de cabeça e pescoço que tem comportamento clínico, características histológicas/patológicas e forma de tratamento bastante distintos (4). Segundo o GLOBOCAN estima-se para o ano de 2020, 553.050 mil novos casos de câncer no Brasil (14). Na região de cabeça e pescoço, a cavidade oral é o sítio mais acometido e o câncer nessa região é considerado como o quinto câncer mais frequente entre os homens brasileiros segundo o Instituto Nacional de Câncer (INCA) e, devido as altas taxas de incidência, ele vem sendo considerado um problema de saúde pública (15). Para o ano de 2018 no estado de São Paulo, foram estimados 11,32 novos casos para cada 100 mil homens e 2,73 novos casos para cada 100 mil mulheres pelo INCA (16).

O CEC acomete principalmente homens de meia idade que fazem o uso do tabaco e apesar da incidência global de carcinoma epidermoide ter diminuído quando se compara a década passada, a incidência do carcinoma em cavidade oral aumentou, principalmente em pacientes jovens (45 anos ou menos), não fumantes, com carcinoma localizado em língua, mostrando uma alteração no perfil epidemiológico (2,17). Esses pacientes mostram um fenótipo mais agressivo da doença, com linfonodos comprometidos no momento do diagnóstico, alta taxa de recorrência após o tratamento e, conseqüentemente, um pior prognóstico. Apesar dessas evidências, os mecanismos moleculares subjacentes ao comportamento clínico da doença nesses pacientes permanecem incertos (2).

Os fatores de risco mais importantes para o desenvolvimento desse tipo de câncer são o abuso de tabaco e álcool, de modo que o uso concomitante dessas duas substâncias estabelece um efeito sinérgico aumentando ainda mais o risco. A condição sócio econômica também é considerado um fator de risco, já que o paciente que tem essa neoplasia pode ter um acesso dificultado a centros de tratamento resultando em um diagnóstico tardio com menores chances de sobrevida livre de doença (4). Particularmente para os casos de lábio e orofaringe, devemos incluir a

radiação solar e a infecção pelo papiloma vírus humano (HPV-16) como fatores de risco importantes respectivamente (18).

Além dos fatores mencionados acima, deve-se incluir e ressaltar as alterações genéticas e epigenéticas nas vias de sinalização associadas ao câncer, resultando na aquisição de fenótipos como, o potencial replicativo ilimitado, autossuficiência em sinais de crescimento, não resposta ou insensibilidade aos sinais anti-crescimento, capacidade de evadir a apoptose, angiogênese aumentada, invasão e metástase (6).

Na cavidade oral, o tipo histológico mais frequente, em cerca de 90% dos casos, é o carcinoma epidermóide, também denominado de carcinoma espinocelular ou de células escamosas (19). Histologicamente é caracterizado por ilhas e cordões de células epiteliais malignas, apresentando variado grau de pleomorfismo celular e nuclear, inflamação e pérolas de queratina. A partir dessas características o tumor pode ser classificado em: bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pouco diferenciado (20). Os locais de maior acometimento são língua e assoalho bucal (17).

A demora no diagnóstico pode acontecer devido ao fato de que em estágios iniciais muitas vezes não se observa sintomas (21), resultando em crescimento e maiores chances de disseminação tumoral o que aumenta a complexidade do tratamento e resulta em um pior prognóstico para esses pacientes (1,22). A taxa de sobrevida em 5 anos para os pacientes com essa neoplasia é em torno de 50% (2), e as metástases quando acontecem são classificadas em regionais, quando acomete os linfonodos da região do pescoço, ou a distância quando afeta órgãos longe do sítio inicia da lesão e, neste caso, o pulmão é o órgão mais afetado (23).

O tratamento do câncer de cavidade oral, consiste em uma abordagem multidisciplinar e, atualmente, o tipo de terapia é decidido baseado em aspectos clínicos e histológicos (TNM, envolvimento de linfonodos, extravasamento extra capsular, e presença de margens positivas após a cirurgia) o que pode não refletir verdadeiramente a heterogeneidade biológica desses tumores (23).

A classificação TNM é a mais utilizada para determinação do tipo de tratamento e é reconhecida mundialmente para descrição da extensão do tumor baseando-se em 3 parâmetros que dá nome a classificação: estágio T que avalia a extensão o tumor primário, estágio N que verifica a presença de linfonodos regionais comprometidos e o estágio M relacionado a presença de metástases a distância (20). Baseado nesses parâmetros os pacientes são divididos em estádios 0, I, II, III ou IV. Os pacientes classificados em estágio I ou II geralmente apresentam bom prognóstico e o

tratamento consiste em cirurgia seguido ou não de radioterapia. Já pacientes em estágio III ou IV, são considerados em estágio avançado da doença, com pior prognóstico e para tratamento considera-se também a realização de quimioterapia. Devido a essas características vemos a importância o diagnóstico precoce dessa lesão, para que se obtenha resultados mais satisfatórios e aumente a taxa de sobrevivência desse grupo de pacientes (4,23).

Apesar do estadiamento TNM ser amplamente utilizado pelos profissionais envolvidos com o diagnóstico e tratamento do câncer de cavidade oral, ele ainda está muito longe de ser o critério ideal para definir prognóstico e tratamento com resultados mais favoráveis para a qualidade de vida do paciente. Por isso existe uma contínua busca por novos critérios histopatológicos e marcadores biológicos confiáveis de comportamento tumoral (4,20,23).

2.2 Características Histopatológicas e sua relação com o prognóstico

A incidência do câncer de cavidade oral e consequentemente o seu prognóstico é muito variável e, além do TNM, há sempre uma busca por fatores que possam ser relacionados a sobrevivência e prognóstico desses pacientes. No entanto, muitas vezes no momento do diagnóstico a metástase local ou a distância já estão presentes e nota-se a falta de marcadores precisos que possam antecipar esse desfecho (24). A avaliação das características histopatológicas do CEC é fundamental para o diagnóstico e, essas características, também servem de parâmetro para prever desfechos clínicos e na escolha da terapia apropriada (25).

Ao longo dos anos, têm-se tentado descrever características morfológicas e moleculares que possam indicar um prognóstico, explicar o comportamento biológico e contribuir para o tratamento desses tumores (25,26). Vários parâmetros histopatológicos no carcinoma epidermóide tem sido identificado como fatores preditivos de metástase cervical, o que interfere diretamente na modalidade de tratamento a ser escolhida para esse paciente (27).

Um dos primeiros fatores a ser analisado é a presença de margem cirúrgica comprometida. Atualmente as margens são classificadas como envolvidas (menor que 1mm) e livres (maior que 5mm). A análise do congelamento intraoperatório é

usada como guia para uma ressecção adequada, porém a implicação prognóstica ou terapêutica ainda é pouco clara e até mesmo controversa (26,28).

Estudo anterior demonstrou que mesmo com ressecção de margens adequadas, a recidiva local acontece em um grupo imprevisível de pacientes. Dessa forma, a ressecção não deve ser o único fator a ser levado em consideração, assim como correlacionar apenas o grau/diferenciação histológico também não tem um resultado satisfatório (29).

Quanto a diferenciação histológica, encontra-se na literatura relatos tanto de uma relação positiva entre pouca diferenciação celular e um pior prognóstico, quanto a ausência dessa relação (4).

Ao longo dos anos, as graduações histológicas foram evoluindo e se tornando mais refinadas a fim de tentar guiar melhor a conduta dos clínicos. Em 1920, Broders foi o primeiro a propor uma estratificação dos pacientes baseado na diferenciação histológica e das células neoplásicas (30). Porém devido as características complexas e heterogêneas dessas células, outras características começaram a ser levadas em consideração como grau de queratinização, pleomorfismo nuclear, número de mitoses, a forma de invasão do tumor, além da presença de um infiltrado inflamatório (31,32).

Nas partes mais profundas da lesão, a diferenciação histológica estaria diretamente ligada a sobrevivência desses pacientes, uma vez que células neoplásicas nessa região, que chamamos de frente de invasão, parecem ser mais indiferenciadas quando comparadas a outras regiões tumorais constituindo assim mais uma característica (ferramenta) relevante para ser usada como fator prognóstico (24,33).

Segundo Chen et al. (34), a graduação histológica está diretamente relacionada com metástases linfonodais na região de pescoço em tumores localizados na língua, sendo que os classificados como pouco ou moderadamente diferenciados teriam uma maior propensão para metástase linfonodal precoce quando comparado com os classificados como bem diferenciados.

A graduação histológica mais utilizada e mais aceita é a da Organização Mundial da Saúde (OMS) (20). De acordo com essa classificação, expondo de uma maneira simplificada, o tumor é classificado em bem diferenciado quando se assemelha ao epitélio normal, moderadamente diferenciado quando se observa pleomorfismo nuclear, atividade mitótica anormal e uma menor queratinização, e por

último em pouco diferenciado quando há uma predominância de células imaturas, numerosas mitoses (típicas e atípicas) e uma queratinização mínima (20,24).

Além das características citadas acima, Brandwein-Gensler et al. (29), propôs um modelo de risco histológico em que se verifica 3 variáveis: invasão perineural, infiltração linfocítica e o (pior) padrão de invasão, que reflete a relação entre o tecido do hospedeiro e o tecido neoplásico. A presença dessas características estaria relacionada a recorrência local, metástase e sobrevivência, porém os eventos celulares/moleculares envolvidos nesse processo são pouco entendidos e requerem mais estudos.

Em um estudo realizado em 2016 por Alaeddini et al. (35), as variáveis de risco citadas acima foram correlacionadas com a forma de invasão de carcinomas na região de cabeça e pescoço mostrando que as variáveis de risco podem refletir sim as características biológicas dessa neoplasia.

Com o passar dos anos, várias classificações foram desenvolvidas e aprimoradas para tumores sólidos (por exemplo tumores de mama e próstata), e mais recentemente métodos de biologia molecular começaram a ser aplicados para tentar prever um resultado nos pacientes, porém na maioria das vezes esses métodos são caros e requerem uma mão de obra mais especializada. Portanto os cortes histológicos analisados por patologistas experientes continuam a ser um dos métodos mais utilizados para esse fim (36).

2.3 Inflamação e Câncer

O sistema TNM é o mais utilizado para estadiamento de várias neoplasias, porém muitas vezes se percebe evoluções clínicas completamente diferentes em pacientes com o mesmo estadiamento, nos levando a pensar que outros fatores influenciam nesse prognóstico. A associação entre inflamação e progressão tumoral foi proposta há muitas décadas. Em 1863, Rudolf Virchow notou pela primeira vez a presença de leucócitos em tecidos neoplásicos, fazendo essa associação (37).

A inflamação presente no microambiente tumoral (MAT) é um dos inúmeros fatores que foram expostos na literatura nos últimos anos e que poderiam influenciar no comportamento do tumor. Como já foi citado anteriormente, o MAT é definido como um ambiente complexo formado pelo conjunto de células tumorais e não tumorais

presentes no próprio tumor que, de alguma maneira, pode fornecer aporte ou não para o seu desenvolvimento e progressão. Faz parte desse microambiente matriz extracelular, fibroblastos, células do sistema imune e seus produtos, células que compõem os vasos sanguíneos, células inflamatórias, citocinas, fatores de crescimento (38).

A comunicação entre as diferentes células presentes no MAT é conduzida por uma rede complexa de citocinas, quimiocinas, fatores de crescimento, enzimas inflamatórias e remodelação de matriz. Dessa forma as células não tumorais tem a capacidade de promover o tumor em diferentes fases da carcinogênese (39).

O tumor secreta quimiocinas pró inflamatórias, citocinas e também ativa células presentes no estroma da lesão a fazerem o mesmo, culminando em um estado inflamatório imunossupressivo constante no MAT. Essas citocinas/quimiocinas atuam de maneira a recrutar leucócitos, que se tornam um dos grandes componentes da massa tumoral. Esses leucócitos, principalmente macrófagos, liberam fatores angiogênicos, mitógenos, enzimas proteolíticas e fatores quimiotáticos que recrutam mais células inflamatórias que sustentam o crescimento tumoral, a invasão e angiogênese. Consequentemente, a neoformação vascular irá fornecer um maior acesso de células inflamatórias no tumor (40). Essas células inflamatórias, juntamente com outras citocinas e quimiocinas que atuam como mediadores, podem causar alterações genéticas e epigenéticas nas células tumorais podendo influenciar na progressão tumoral (41,42).

Segundo Sun et al. (43) a inflamação crônica pode induzir alterações em células inflamatórias e nos níveis de citocinas presentes no microambiente tecidual, mudanças essas que podem influenciar o desenvolvimento de neoplasias, invasão maligna e metástases, pois modificam a resposta imune do hospedeiro e protegem a neoplasia da vigilância imunológica.

Histologicamente o infiltrado inflamatório pode ser caracterizado pela presença de células mononucleares do processo inflamatório (monócitos, linfócitos, plasmócitos, histiócitos e leucócitos) no tecido conjuntivo entre as ilhas tumorais (infiltrado inflamatório intratumoral) ou permeando as células tumorais invasivas (infiltrado inflamatório peritumoral) (26).

As características do infiltrado inflamatório que compõe o tumor podem interferir no seu comportamento nos levando a questionar se o organismo como um todo e, não só o microambiente tumoral, influenciaria em seu curso (5). Segundo

Affonso e colaboradores, há uma correlação positiva entre maior intensidade do infiltrado inflamatório e maior grau de malignidade do tumor, sugerindo que o grau de inflamação interfere no grau de diferenciação histopatológico do tumor, sem necessariamente influenciar no prognóstico dos pacientes (26). Balkwill e Mantovani (37) sugeriram também que células inflamatórias e citocinas que circundam o tumor contribuem para o seu desenvolvimento e progressão, apesar das respostas imunológicas (antitumorais) do hospedeiro.

O predomínio de células inflamatórias no infiltrado peritumoral do carcinoma oral poderia estimular a angiogênese, aumentando o suporte sanguíneo para as células neoplásicas o que aumentaria o tamanho da lesão área de invasão e resultaria em um pior prognóstico (44).

Com relação a outras neoplasias já foi demonstrado que expressão alterada em citocinas pró ou anti-inflamatórias desempenham um papel fundamental na expressão do carcinoma gástrico, colo-retal, fígado, mama e carcinoma de pele e, com relação ao carcinoma epidermoide de cavidade oral, foi visto que a inflamação crônica pode desencadear uma supressão imunológica que contribui para o desenvolvimento dessa neoplasia (43).

No entanto, ao tentar relacionar a intensidade dessa inflamação com fatores prognósticos no câncer de cavidade oral ainda nos deparamos com muita controvérsia (44). Segundo Manzano et al. (45), a presença do infiltrado inflamatório é comum em várias neoplasias, incluindo o carcinoma epidermoide de cavidade oral, o que sugere uma resposta imune local contra o tumor, porém há controvérsias se a presença e intensidade dessas células estariam ligadas a um melhor prognóstico ou se teria um papel supressor, contribuindo para a disseminação dessas células. De acordo com os resultados de Vieira e colaboradores (44), a porcentagem de infiltração peritumoral foi maior em tumores classificados como pouco diferenciados, o que levaria a pensar em um pior prognóstico para esses pacientes.

Apesar dos avanços, o entendimento do papel da resposta inflamatória no comportamento e prognóstico do CEC ainda é bastante limitado, por isso busca-se estudar mais a fundo outros componentes do MAT, como por exemplo as citocinas e quimiocinas afim de tentar entender o comportamento dos tumores (26,44,45).

2.4 Características gerais das quimiocinas e seus receptores

Quimiocinas são pequenas proteínas quimiotáticas (8-10KDa), secretadas por diversas células que fazem parte de uma grande família de citocinas. Elas foram descritas primeiramente como moléculas reguladores do tráfego de leucócitos, exercendo assim um importante papel no transporte celular tanto em condições fisiológicas, como reações inflamatórias e imunes, quanto em condições patológicas, como a progressão do câncer (7).

São conhecidas ao todo 50 quimiocinas e 20 ligantes, que pertencem a uma superfamília de citocinas, que são capazes de exercer sua função através da interação com receptores específicos (46). Elas são divididas em dois grupos dependendo de suas funções, podendo atuar durante a homeostase ou a inflamação, e em quatro subfamílias, segundo a posição dos dois resíduos de cisteínas terminais. As subfamílias são C, CC, CXC e CX3C, dependendo do posicionamento do resíduo de cisteína no N-terminal da molécula protética, sendo que C representa a cisteína e X o aminoácido presente (7,11).

Essas quimiocinas são localmente produzidas pelos tecidos através da influência de citocinas inflamatórias e fatores de crescimento, e atuam nos leucócitos através da proteína G acoplada na membrana. Elas são produzidas por quase todos os tipos de células, mas em combinações e quantidades distintas. As subfamílias CCR e CXCR são consideradas as maiores, podendo ser denominadas de CCR1 a CCR10 e de CXCR1 a CXCR6 respectivamente (47).

O funcionamento das quimiocinas é realizado através da ligação com receptores específicos acoplados a proteína G da membrana plasmática das células alvo. Essa ligação ativa vias de sinalização que fazem com que os leucócitos possam se aderir a locais específicos nos vasos sanguíneos e depois sejam extravasados em determinados tecidos/órgãos. O conjunto, quimiocina, receptor e moléculas de adesão são capazes de determinar quais serão os leucócitos presentes e qual o seu destino (48).

Assim, quando as quimiocinas se ligam aos respectivos receptores acoplados na proteína G e na membrana plasmática das células alvo, resulta em uma reorganização do citoesqueleto e adesão de células endoteliais, o que leva a migração dessas células. Dessa forma, uma outra função para as quimiocinas é a regulação

tecidual fora da medula hematopoiética, participando da angiogênese, formação de órgãos, desenvolvimento, crescimento e metástase tumoral (49,50).

A ligação da quimiocina com seu respectivo receptor não se limita a atuar apenas sobre os leucócitos, mas também promove degranulação, transcrição de genes, efeitos mitóticos e apoptóticos. Receptores de quimiocinas são encontrados em vários tipos celulares extramedulares, como células endoteliais, células da musculatura lisa, células estromais, epiteliais e neurais, ampliando seu leque de funções quanto ativados. (49).

Com relação as células tumorais, pensa-se, portanto, que essas células poderiam utilizar mecanismos mediados por quimiocinas, como aqueles que regulam o tráfego de leucócitos, durante o processo de metástase. As células tumorais expressam um padrão distinto de receptores de quimiocinas funcionalmente ativos que proporcionariam o crescimento tumoral através da angiogênese, e por último proporcionaria invasão e metástase atuando diretamente na migração das células tumorais (50).

2.5 CXCR4: receptor de quimiocina

Os receptores de quimiocina são proteínas de domínio transmembranar que interagem com citocinas específicas conhecidas como quimiocinas. Muitas dessas quimiocinas estão envolvidas na quimiotaxia celular, e a ativação de seu receptor leva ao rearranjo do citoesqueleto e migração de células para locais que são fontes de quimiocinas (8).

As quimiocinas e seus receptores desempenham um papel importante na transformação e progressão de doenças malignas, incluindo neoplasias que acomete a região de cabeça e pescoço, através de alteração na expressão das citocinas e fatores de crescimento (6).

A quimiocina SDF-1, também conhecida como CXCL12, pertence ao grupo homeostático, que controla a movimentação de células hematopoiéticas e a arquitetura dos tecidos linfoides. Ela é expressa em tecidos embrionários e adultos, e seus níveis mais altos, são encontrados em órgãos como fígado, pâncreas, baço e coração (7).

Dessa forma a secreção constitutiva pelas células estromais da medula óssea é a principal fonte de CXCL12 em adultos. Essas células criam nichos para que as células tronco hematopoiéticas e seus progenitores possam crescer e diferenciar, e a responsabilidade quimiotática entre essas células é restrita ao CXCL12 (51). Assim, a presença de CXCL12 em áreas lesionadas é um evento crucial para uma possível reparação local através do recrutamento de células tronco. Sua presença também facilita o desenvolvimento e a neovascularização tumoral, através do recrutamento de células dendríticas para o local e indução de angiogênese desempenhando importante papel em vários processos fisiopatológicos como sobrevivência e movimentação de células do sistema imunológico, na patogênese tumoral, apoiando o desenvolvimento e disseminação de células tumorais (8,11,52,53).

O CXCR4 é um receptor que se acopla na proteína G, específico para a quimiocina CXCL12 (SDF-1). Seu gene está localizado no cromossomo 2 e ele foi identificado pela primeira vez na membrana celular de leucócitos do sangue periférico. Ele é altamente expresso em uma grande variedade de tipos celulares incluindo linfócitos, células epiteliais, endoteliais e hematopoiéticas, fibroblastos e células neoplásicas. O CXCR4 participa da quimiotaxia de linfócitos em áreas de inflamação que podem promover quimiotaxia para células cancerígenas (7,8).

Além dos papéis bem definidos durante a o processo de hematopoiese e resposta imune, o CXCR4 juntamente com o seu ligante, participam de vários processos fisiológicos como por exemplo formação de células germinativas, angiogênese e processos alguns processos patológicos, como doenças inflamatórias (artrite reumatoide) infecção pelo HIV, e Síndrome de WHIM (ou Warts, Hypogammaglobulinemia, Immunodeficiency, and Myelokathexis syndrome) (7,53).

A expressão basal do CXCR4 tem a transcrição regulada por 2 fatores: o NRF-1 (Fator Nuclear Respiratório- 1) e Yang Yang 1 (YY1) responsável pela regulação negativa. Aumento e melhora da transcrição vem sendo notada na presença de diferentes moléculas de sinalização, como algumas citocinas (IL-2, IL-4, IL-7, IL-10, IL-15, TGF- β), fatores de crescimento (VEFG, bFGF) e mensageiros secundários (cálcio e AMP cíclico). De modo oposto, observa-se diminuição da sua transcrição na presença de outras citocinas como TNF- α , INF- γ e IL-1 (7,54).

A ligação do CXCL12 com o CXCR4 ocorre através de um mecanismo que é dividido em 2 fases: O primeiro contato entre o CXCL12 e seu receptor induz uma mudança conformacional, que força a quimiocina a se ligar em um receptor de bolso

(“pocket receptor”) facilitando essa interação. Em seguida o receptor sofre uma segunda mudança conformacional que ativa a proteína G trimérica intracelular através da dissociação da proteína G do dímero. Foi verificado também que o CXCR4 pode sinalizar uma via independente da proteína G (7,54).

A interação CXCL12-CXCR4 requer a integralidade das duas moléculas, então a presença de algumas proteases pode impedir essa ligação, por exemplo durante respostas inflamatórias, ou por proteases expressas na superfície celular, devido a capacidade de cortar resíduos terminais necessários para a interação com o CXCR4. Esses fatores regulam negativa ou positivamente o receptor e são capazes de influenciar a via de sinalização CXCL12-CXCR4 (54).

A ligação CXCL12-CXCR4 ativa várias vias de sinalização que resulta em várias respostas como aumento de cálcio intracelular, transcrição de genes, quimiotaxia, sobrevivência celular e proliferação (55). Com essas características, essa ligação faz parte de um eixo biológico em que a participação está relacionada a vários tipos de câncer devido a um aumento na sobrevivência de células tumorais, proliferação e migração dessas células (metástase) correlacionando a um pior prognóstico em várias neoplasias incluindo câncer de mama, pulmão, colorretal entre outros (6,7,9–11).

A alta expressão de CXCR4 está sendo relacionada com o estágio da doença, pior prognóstico, TNM avançado e metástase regional e a distância em diferentes tumores (55). Em estudo realizado por Mirisola e colaboradores (56), foi analisado a expressão do CXCL12 E CXCR4 em amostras de câncer de mama e foi demonstrado que a expressão do CXCR4 não está relacionado a sobrevida livre de doença, ao contrario da expressão do CXCL12. Niu et al. (57) mostraram em estudo *in vitro* que a diminuição da expressão do CXCR4 em câncer de laringe inibiu o crescimento celular e concomitantemente diminuiu a invasão e migração celular. No estudo de Zheng et al. (55) sugeriu que o CXCR4 tem um importante papel na progressão do câncer colorretal através da mediação na adesão de células tumorais. A respeito do câncer de pulmão, foi publicado um estudo *in vitro* que a ativação do eixo CXCL12-CXCR4 induz a migração celular, e a inibição do CXCR4 suprime o crescimento tumoral e formação de metástases (58).

Com relação aos cânceres que se localizam na região de cabeça e pescoço, principalmente o de cavidade oral, vemos poucas pesquisas relacionando-os com o CXCR4. No ano de 2016, foi publicado um estudo de coorte realizado com um grupo de pacientes com câncer de cabeça e pescoço, mostrando que a alta expressão do

CXCR4 pode ser considerada um fator prognóstico negativo para esse grupo de neoplasia, devido a possibilidade de disseminação metastática. O grupo cita ainda que o CXCR4 pode ser um possível alvo terapêutico para controle de metástase (59). Apesar desse estudo, e do número crescente de estudos e pesquisas relacionando o CXCR4 com várias neoplasias, com relação ao câncer de cavidade oral pouco se sabe até o momento.

3 PROPOSIÇÃO

A proposição desse trabalho é analisar a marcação imuno-histoquímica do receptor de quimiocina CXCR4 em casos de carcinoma epidermoide de cavidade oral, e relaciona-la com variáveis clínicas e histológicas.

3.1 Objetivos específicos:

1. Analisar, em microscópio de luz, cortes histológicos dos casos que compõe o TMA quanto ao infiltrado inflamatório, infiltração linfocitária grau de diferenciação histológica.
2. Analisar a marcação imuno-histoquímica para CXCR4 em lâminas de TMA em área tumoral, frente de invasão e epitélio não tumoral (margem).
3. Relacionar os achados histológicos e imuno-histoquímicos com os dados clínicos dos pacientes.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Análise Morfológica

Foram avaliados 94 casos de CEC de pacientes oriundos do Hospital Heliópolis e do Hospital das Clínicas localizado na cidade de São Paulo. A localização do tumor, em língua ou assoalho bucal, e a presença dos hábitos de tabagismo e etilismo foram utilizados como critério de inclusão, independente da classificação TNM.

Os blocos, referentes aos casos, foram processados para obtenção de cortes de 3µm de espessura e corados com hematoxilina e eosina (HE). Em seguida foram dispostos em lâminas de TMA. Os TMAs e o anticorpo utilizados foram montados e adquiridos para o projeto intitulado “Fatores ambientes clínicos, histopatológicos e moleculares associados ao desenvolvimento e ao prognóstico de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço” do GENCAPO (FAPESP nº 2004/12054-9 e 2010/05168-0) aprovados conforme o parecer em anexo (Anexo A).

Os espécimes da excisão cirúrgica tiveram avaliados o grau de infiltrado inflamatório na região tumoral, presença ou não de infiltração linfática e grau de diferenciação histológico (20,25,26).

A infiltração inflamatória tumoral foi classificada como escassa (+) (células esparsas, pequenas áreas entre as ilhas tumorais ou margeando o tumor) ou moderada (++) (áreas mais largas, espessas ou contínuas entre as ilhas tumorais ou margeando o tumor) (26).

A infiltração linfática foi classificada como presente, quando células tumorais estavam presentes nos vasos linfáticos ou ausente.

O grau de diferenciação histológico foi classificado em pouco ou bem diferenciado de acordo com grau de queratinização e atipias celulares, conforme proposto pela OMS (20).

4.2 Obtenção das lâminas de TMA

Foi realizado corte histológico do tumor, corado em H&E, e áreas representativas das células que compunham a neoplasia, bem como do epitélio não tumoral e da frente de invasão, foram marcadas nas lâminas obtidas dos 94 casos utilizando-se um microscópio Zeiss (Zeiss, Jena, Germany) com objetiva de marcação. Foi feita punção dos blocos doadores com uma agulha de 1 mm e os cilindros transferidos para o bloco receptor com espaçamento de 0,2 mm utilizando-se um equipamento manual (Manual Tissue Arrayer, Beecher Instruments, Silver Springs, MD, USA). Foram então obtidos cortes de 3 μ m do bloco receptor e transferidos com o auxílio de uma fita adesiva para lâminas silanizadas. As lâminas foram mergulhadas em uma camada de parafina para evitar a oxidação e mantida em um freezer -20° C até o uso.

4.3 Reação Imuno-histoquímica

Cortes de 3 μ m de espessura foram obtidos dos blocos de parafina e colocados em lâminas previamente silanizadas. Os cortes foram desparafinizados em três banhos de xilol à temperatura ambiente por 10 minutos cada e reidratados em banhos descendentes de etanol absoluto (95%, 90% e 85%) durante três minutos cada. Em seguida, foram lavados em água destilada durante 5 minutos.

A recuperação antigênica foi realizada com solução de ácido cítrico (10mM, pH 6,0, 95°C, 30 min).

O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado utilizando-se solução de peróxido de hidrogênio 20 volumes associada ao metanol, na proporção de 1:1, em que as lâminas serão mergulhadas em dois banhos, de 15 minutos cada.

Para a reação com o anticorpo anti-CXCR4 (ab124824, ABCAM, EUA) as etapas seguintes (incubação do anticorpo primário, do anticorpo de ligação e complexo terciário, coloração e contra-coloração) foram realizadas automaticamente por meio do sistema de coloração universal Autostainer Dako (Dako, Carpinteria EUA). Após a acomodação das lâminas no equipamento, houve a incubação com o anticorpo primário, diluído em solução de Tris pH 7,4 acrescido de BSA 1% (albumina bovina e azida sódica), na proporção de 1:250. Como anticorpo secundário e complexo de melhoria da marcação, foi utilizado o Envision (Dako, Carpinteria EUA).

Os cortes foram revelados com diaminobenzidina (DAB) e contra-corados com hematoxilina de Mayer.

Posteriormente, foi realizada a desidratação em cadeia ascendente de álcool etílico, diafanização em dois banhos de xilol e montagem automática das lâminas por meio do equipamento Tissue Tek SCA (Sakura Seiki, Nagano Japão).

4.4 Análise semi-automatizada da marcação imuno-histoquímica

Os TMAs de cada reação imuno-histoquímica foram escaneados em escâner modelo ScanScope XP (Aperio- Leica Biosystems) em lente objetiva de 20x. Para cada caso tinha em média 5 spots representando as diversas áreas do tumor (margem não tumoral, tumor e frente de invasão) e, a imagem de cada spot, foi submetida a deconvolução do espectro RGB, para separar a cor azul da hematoxilina e a cor marrom, referente à coloração pelo DAB. Para tanto, foi utilizado um “plugin” (60), no programa Image J (1.49u, National Institute of Health), o qual foi idealizado com base no trabalho de Ruifrok e Johnston (61).

Para se obter a densidade dos tons de marrom, inicialmente foi estabelecido, para a proteína em estudo, o intervalo de tons de marrom que indicassem marcação discreta, moderada ou intensa. Para tanto, foi realizada previamente análise semi quantitativa subjetiva, classificando as marcações como discreta, moderada ou intensa. Em seguida, com base nessa classificação preliminar, foram selecionados os tons discretos, moderados e intensos a partir do histograma de tons presentes em cada spot. O quadro abaixo (Quadro 4.1) mostra o intervalo de tons estabelecido para a proteína analisada.

Quadro 4.1- Intervalo de tons estabelecidos para a proteína analisada

	Tons intensos	Tons moderados	Tons discretos
CXCR4	0 - 130	131 - 185	186 - 230

Após estabelecido o intervalo de seleção para indicar cada intensidade de marcação, o escore final da intensidade foi calculado a partir da fórmula:

$$[(\text{quantidade de pixels} \times \text{escore}) / \text{área de interesse}] \times 100$$

A quantidade de pixels foi aquela obtida a partir da seleção do intervalo de tons de marrom; o escore foi aquele referente à intensidade de marcação (1 para discreto, 2 para moderado e 3 para intenso); e a área de interesse foi a área do spot ocupada pelo tumor. Esse método foi baseado em Varghese et al. (62), no qual foi desenvolvido “plugin” para análise automatizada da coloração imuno-histoquímica. Nesse “plugin”, a maior porcentagem de tons presentes na área de interesse determinava o escore final.

Em função disso, determinamos que, havendo 5% ou mais de tons intensos presentes no spot este seria classificado como de marcação intensa, independentemente da porcentagem dos demais tons. Se os tons intensos não atingiam 5%, observava-se em seguida a porcentagem dos tons moderados, a qual também deveria atingir 5% ou mais para que o spot fosse classificado como de marcação moderada. Por fim, caso os tons moderados fossem <5%, o spot era classificado como de marcação discreta. Se os tons discretos fossem menores que 0.5%, a imagem era então considerada negativa.

Toda a análise descrita anteriormente foi realizada sem conhecimento da classificação das regiões do tumor analisadas, as quais poderiam ser da margem tumoral, do fronte de invasão, de região de tumor bem diferenciado e de tumor pouco diferenciado.

Após a obtenção dos tons de marcação, para fins didáticos e estatísticos, agrupamos as marcações encontradas em fracamente positiva e fortemente positiva e todos os spots pertencentes a um mesmo caso foram agrupados e receberam uma classificação única para cada uma das variáveis analisadas.

4.5 Metodologia Estatística

As informações obtidas foram organizadas em um banco de dados informatizado com auxílio do programa estatístico “R” (63).

Foi feita análise descritiva dos dados referentes a sexo, idade, estadiamento TNM, localização do tumor e hábitos de tabagismo e etilismo. Os dados foram comparados entre si por meio do teste do qui-quadrado (Tabela 5.1).

Em seguida, foi realizada análise comparativa entre a intensidade de marcação imuno-histoquímica para CXCR4 com gradação histológica, frente de invasão, margem, infiltração em vasos sanguíneos, linfáticos e perineural, intensidade de inflamação no tumor, estadiamento T e N e hábitos de tabagismo e etilismo. Para tanto, foram mantidas as gradações, fracamente positivo e fortemente positivo, e os casos negativos foram agrupados juntamente com os fracamente positivos (Tabela 5.2). Essas comparações foram feitas utilizando-se o teste do qui-quadrado.

Utilizou-se o teste de log-rank para comparação da curva de sobrevida global em 5 anos em função da marcação imuno-histoquímica de CXCR4. Utilizou-se a curva de Kaplan-Meier para a apresentação dos resultados. Para comparação múltipla de variáveis prognósticas com a sobrevida global, foi utilizada a análise de regressão proporcional de Cox.

Foi adotado nível de significância de 5% para todos os testes, sendo considerados significativos os valores de $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização da amostra

A amostra dessa pesquisa foi constituída por 94 casos de CEC oriundos do Hospital Heliópolis e do Hospital das Clínicas, ambos localizados na cidade de São Paulo- SP (Brasil). Foram incluídos apenas pacientes que se encaixaram nos critérios estabelecidos de acordo com o perfil epidemiológico dessa neoplasia (Apêndice A).

Conforme mostrado na tabela 5.1, dos 94 casos estudados, 89,4% (n=84) eram pacientes do sexo masculino, 7,4% (n=7) do sexo feminino e 3,2% (n=3) estavam sem essa informação. A idade dos pacientes variou entre 37 e 88 anos, com uma média de 57,3 anos. Com relação aos hábitos, a grande maioria era tabagista (80,9%; n=76) e etilista (71,3%; n=67). A outra parte da amostra era ex-tabagista e ex-etilista.

Quanto ao tamanho do tumor, 62,8% (n=59) eram T3 e T4, e 59,6% (n=56) apresentavam linfonodos positivos no momento do diagnóstico. A maioria dos casos (76,8%; n= 73) não apresentavam metástase a distância. Dos casos analisados, 64,9% (n=61) foram classificados histologicamente como “Bem Diferenciado” e 36,2% (n=34) dos tumores estavam localizados em língua.

Tabela 5.1 - Características gerais dos pacientes, estadiamento tumoral e local de acometimento (n=94)

Gênero	N	%	Valor de p
Masculino	84	89.4	
Feminino	7	7.4	
Sem dado	3	3.2	<0.001
Idade (média e DP)	57.3	9.2	
Tamanho			
1 e 2	33	35.1	0.035
3 e 4	59	62.8	
Sem dado	2	2.1	
Nódulos linfonodais			
Negativos	36	38.3	0.112
Positivos	56	59.6	
Sem dado	2	2.1	
Metástase			
0	73	76.8	
X	4	4.2	<0.001
Sem dado	18	18.9	
Gradação histológica			
Bem diferenciado	61	64.9	
Pouco diferenciado	31	33.0	0.014
Sem dados	2	2.1	
Local			
Língua	34	36.2	
Assoalho	17	18.1	
Língua e assoalho	8	8.5	
Língua e rebordo alveolar	13	13.8	<0.001
Língua e orofaringe	4	4.3	
Outros locais	4	4.3	
Sem dado	14	14.9	
Tabagismo			
Sim, no passado	17	18.1	<0.001
Sim, no presente	76	80.9	
Sem dado	1	1.1	
Etilismo			
Sim, no passado	25	26.6	
Sim, no presente	67	71.3	
Não	2	2.1	<0.001
Sem dado	1	1.1	

Valor de p pelo teste do χ^2 . Significante quando $p < 0.05$.

5.2 Análise Morfológica

Após a gradação histológica de todos dos casos, verificou-se que 48,9% (n=46) dos tumores tinham um infiltrado inflamatório classificado como escasso nas regiões intra e peri tumoral. A maioria (85,1%; n=80) não apresentou infiltração sanguínea e 57,4% (n=54) não mostrou vasos linfáticos infiltrados. Com relação a infiltração perineural, verificou-se que 57,4% 9 (n=54) apresentavam essa invasão (Tabela 5.2).

Por fim, foi visto a marcação imuno-histoquímica para o CXCR4 mostrando que 74,4% (n=70) das amostras evidenciaram uma marcação fortemente positiva para a proteína (Tabela 5.2).

Tabela 5.2 - Características histopatológicas quanto a grau de inflamação, infiltração sanguínea, linfática e perineural e frequência de casos negativos, fracamente e fortemente positivos para CXCR4 (n=94)

	N	%	Valor de p
Inflamação			
Negativa/Escassa	46	48.9	0.529
Moderada	39	41.5	
Sem dados	9	9.6	
Infiltração sanguínea			
Sim	11	11.7	<0.001
Não	80	85.1	
Sem dados	3	3.2	
Infiltração linfática			
Sim	33	35.1	0.082
Não	54	57.4	
Sem dados	7	7.4	
Infiltração perineural			
Sim	54	57.4	0.181
Não	37	39.4	
Sem dados	3	3.2	
Marcação imuno-histoquímica para CXCR4			
Negativo/Fracamente positivo	24	25.5	<0.001
Fortemente positivo	70	74.4	

Valor de p pelo teste do χ^2 . Significante quando $p < 0.05$.

5.3 Resultados da Análise Comparativa

Com o intuito de correlacionar a intensidade de marcação imuno-histoquímica com as variáveis estudadas, foi realizado o teste do qui-quadrado.

A marcação do CXCR4 foi verificada nas regiões de tumor, e também em epitélio classificado como não tumoral (margem). Em 71,1% (n=37) dos casos observou-se uma marcação negativa/fracamente positiva para a proteína, mostrando uma significância estatística ($p=0,011$) (Tabela 5.3).

Na região de frente de invasão tumoral, observou-se uma distribuição bem próxima de casos com marcação fracamente positivos (52,5%) e fortemente positiva (47, 5%), não indicando uma associação estatisticamente significativa ($p=0,715$) (Tabela 5.3).

Com relação a gradação histológica, o valor p foi significativo ($p= 0,049$) para os casos “Bem diferenciados” e que apresentaram uma marcação fortemente positiva para o CXCR4 (53,3%; n=49) (Tabela 5.3).

Quando se comparou o tamanho dos tumores (T1/T2 com T3/T4), observou-se que 49,5% (n=45) eram T3 e T4 e tinham uma marcação fortemente positiva, porém essa associação não mostrou significância ($p=0,255$) (Tabela 5.3).

A variável nódulos linfonodais também não evidenciou uma associação estatística significativa ($p=0,079$). Nela, 48,9% (n=45) dos casos com positividade apresentavam uma marcação fortemente positiva para o CXCR4 (Tabela 5.3).

Com relação as variáveis histopatológicas, houve significância ao relacionar a presença de inflamação com a expressão da proteína ($p= 0,021$). 39,5% (n=34) dos casos com marcação fortemente positiva, apresentavam um grau de inflamação considerada moderada (Tabela 5.3).

Analisando a presença de invasão sanguínea e linfática também não houve uma associação estatística significativa ($p= 0,563$ e $p=0,177$ respectivamente). 64,8% (n=59) não apresentaram infiltração sanguínea e expressavam fortemente a proteína. Com relação a infiltração linfática, 49,4% (n=43) também não apresentavam infiltração e marcavam fortemente a proteína (Tabela 5.3).

Já a variável infiltração perineural, na maioria dos casos em que ela estava presente, havia também uma marcação fortemente positiva para a proteína (42,9%, n=39), entretanto não houve associação estatística entre as variáveis (Tabela 5.3).

As últimas variáveis a serem analisadas foram tabagismo e etilismo. No tabagismo, foi visto que 60,2% (n= 56) dos pacientes que fumavam no presente, apresentaram uma marcação fortemente positiva para a proteína, não evidenciando uma associação estatística ($p= 0,812$) (Tabela 5.3).

Analizando o etilismo, 54,8% (n=51) haviam feito uso do álcool no passado e marcavam fortemente a proteína CXCR4, mostrando uma significância estatística entre as variáveis (p menor que 0,001) (Tabela 5.3).

Tabela 5.3 - Associação entre marcação imuno-histoquímica para CXCR4 e variáveis relacionadas a localização em margem ou frente de invasão, estadiamento histológico e clínico, características histopatológicas e hábitos de tabagismo e etilismo

N (%)	Marcação imuno-histoquímica para CXCR4 - N (%)		Valor de p
	Negativo/Fracamente positivo	Fortemente positivo	
Margem (n=52)	37 (71.1)	15 (28.8)	0.011
Frente de invasão (n=80)	42 (52.5)	38 (47.5)	0.715
Gradação histológica (n=92)			
Bem diferenciado	12 (13.0)	49 (53.3)	0.049
Pouco diferenciado	12 (13.0)	19 (20.7)	
Tamanho (n=91)			
T1 e T2	11 (12.0)	13 (14.3)	0.255
T3 e T4	22 (24.1)	45 (49.5)	
Nódulos linfonodais (n=92)			
Negativos	13 (14.1)	23 (25.0)	0.079
Positivos	11 (11.2)	45 (48.9)	
Inflamação (n=85)			
Negativa/escassa	17 (19.8)	29 (33.7)	0.021
Moderada	6 (7.0)	34 (39.5)	
Infiltração sanguínea (n=91)			
Não	21 (23.0)	59 (64.8)	0.563
Sim	2 (2.2)	9 (9.9)	
Infiltração linfática (n=87)			
Não	11 (12.6)	43 (49.4)	0.177
Sim	11 (12.6)	22 (25.3)	
Infiltração perineural (n=91)			
Não	9 (9.9)	28 (30.8)	0.713
Sim	15 (16.5)	39 (42.9)	
Tabagismo (n=93)			
Sim, no passado	4 (4.3)	13 (14.0)	0.812
Sim, no presente	20 (21.5)	56 (60.2)	
Etilismo (n=93)			
Sim, no passado	7 (7.5)	51 (54.8)	<0.001
Sim, no presente	16 (17.2)	19 (20.4)	

Valor de p pelo teste do χ^2 . Significante quando $p < 0.05$.

5.4 Análise da Sobrevida

Não houve associação entre marcação imuno-histoquímica de CXCR4 e sobrevida global de 5 ($\chi^2 = 0.3$, $p = 0.565$) e 10 anos ($\chi^2 = 0.2$, $p = 0.632$). Utilizou-se o teste de log-rank para comparação das curvas e, a Figura 5.4, ilustra a curva de Kaplan Meier para a sobrevida global de 5 anos segundo a marcação imuno-histoquímica para CXCR4.

Figura 5.1 - Curva Kaplan-Meier para a sobrevida global em 5 anos e teste de log-rank para comparação das curvas em função da marcação imuno-histoquímica de CXCR4

Na análise de regressão proporcional de Cox, utilizando-se as variáveis tabagismo no presente, etilismo no presente, tamanho 3/4, nódulos linfonodais positivos, idade >60 anos, gradação histológica "pouco diferenciado" e marcação imuno-histoquímica "fortemente positiva", somente gradação histológica "pouco

diferenciado" e tamanho 3/4 impactaram na sobrevida global em 5 anos ($p=0,002$ e $p=0,015$ respectivamente) (Tabela 5.4).

Tabela 5.4 - Análise de regressão proporcional de Cox para a sobrevida global

Variável	R ²	IC 95%	Valor de p
nódulos linfonodais positivos	2.59	1.00-6.69	0.048
tamanho 3/4	2.97	1.45-6.06	0.015
pouco diferenciado	2.12	1.15-3.91	0.002

As Figura 5.2 e 5.3 mostram a curva de Kaplan-Meier para a sobrevida global de 5 anos segundo a gradação histológica e o tamanho, respectivamente.

Figura 5.2 - Curva Kaplan-Meier para a sobrevida global em 5 anos e teste de log-rank para comparação das curvas em função da gradação histológica dos tumores.

Figura 5.3 - Curva Kaplan-Meier para a sobrevida global em 5 anos e teste de log-rank para comparação das curvas em função da gradação histológica dos tumores

6 DISCUSSÃO

Apesar de todos os avanços e pesquisas nos últimos anos a respeito do CEC, a imprevisibilidade em seu quadro evolutivo caracterizado por diferentes respostas e evoluções a partir de um mesmo protocolo de tratamento e o alto índice de mortalidade, nos traz questionamentos sobre outros fatores que podem atuar no comportamento clínico dessa neoplasia como, fatores relacionados ao próprio hospedeiro e fatores relacionados ao microambiente tumoral. Sob essa perspectiva, tem-se buscado investigar potenciais marcadores biológicos que são capazes de elucidar seu comportamento clínico na tentativa de predizer o prognóstico e até mesmo atuar como um possível alvo terapêutico (7).

No MAT, células cancerígenas provenientes ou não de metástase tendem a expressar receptores de quimiocinas em alguns tipos de carcinoma, como de mama e próstata. As quimiocinas e seus receptores exercem um importante papel no tráfego de leucócitos principalmente em locais de inflamação, infecção, injúria tecidual, celular e crescimento tumoral (5,50,64).

Dentre os diversos marcadores que estão sendo estudados como possíveis preditores do comportamento tumoral, o CXCR4 se destaca. O CXCR4 atua como um receptor de quimiocina específico para o SDF-1 (CXCL-12) atuando na migração e proliferação celular. Estudos recentes sugerem que essa proteína pode regular a função de outros tipos celulares, como a migração de células neoplásicas. Células de vários tumores, de origem epitelial, mesenquimal e hematopoiética, expressam CXCR4 e essa expressão estaria diretamente ligada na migração dessas células para sítios metastáticos, aumentando sua sobrevivência através do estabelecimento de condições satisfatórias promovidas por citocinas/quimiocinas (65). Porém, poucos estudos tentam relacionar a expressão do CXCR4 no tumor primário com variáveis clínicas e histopatológicas. Assim, baseado nesse contexto, nosso estudo se propôs a estudar a imunomarcagem do CXCR4 e sua associação com parâmetros clínicos e histopatológicos em carcinomas epidermóides de boca.

A amostra selecionada para este estudo constitui-se de 94 casos de CEC. Destes casos, 89,4% (n=84) correspondem a pacientes do sexo masculino, com uma idade média de 57,3 anos. Toda a amostra se caracterizava por pacientes tabagistas (80,9%) ou ex-tabagistas (18,1%) e a grande maioria também era etilista (71,3%) ou

ex-estilista (26,6%). Em 36,2% (n=34) dos casos, a localização do tumor era língua e em 18,1% (n=17) em assoalho bucal. Esses dados mostram que o perfil da amostra se assemelha aos dados epidemiológicos que vem sendo apresentado nos últimos anos para o CEC (como sexo e localização) e também apresenta o seu principal fator de risco: o tabagismo que, juntamente com o etilismo, pode exercer um efeito sinérgico (66–68).

A língua e o assoalho bucal são os dois sítios de maior acometimento do CEC, apresentando altos índices de morbidade e mortalidade, por isso optamos por selecionar a maioria dos pacientes com acometimento da doença nesses locais. O CEC nestes dois locais tem sido descrito como mais agressivo, com o maior potencial de metástase regional, muito provavelmente devido a peculiaridades anatômicas. Em nosso estudo, 62,8% (n=59) dos casos apresentavam no momento do diagnóstico, tamanho de tumor T3 ou T4 e 35,1% (n= 33) apresentavam tamanho T1 ou T2. Destes, 59,6% (n=56) apresentavam comprometimento linfonodal. O elevado números de tumores em estágios mais avançado se assemelha a outros estudos descritos na literatura provavelmente por conta do diagnóstico tardio devido a falta de sinais e sintomas, e dificuldade de detecção da lesão por conta de profissionais da área (21,67,69).

Em relação a análise da marcação da proteína selecionada para o estudo, optou-se pela avaliação o grau de marcação utilizando ferramentas do programa Image J (1.49u, National Institute of Health), o qual foi idealizado com base no trabalho de Ruifrok e Johnston (61). Seguindo essa metodologia, observou-se que a grande maioria dos casos, 74,4% (n=70), apresentou uma marcação fortemente positiva para o CXCR4 contra 25,5% (n=24) dos casos com marcação fracamente positiva. Os casos que tiveram marcação negativa (5 casos), foram colocados juntamente com os fracamente positivos para melhor elucidação, evidenciando que praticamente todos os casos que foram incluídos nesse trabalho apresentam uma marcação positiva para essa proteína. Esse resultado corrobora com os achados de Meng e colaboradores (70) em que 62,6% dos casos de CEC mostraram expressão para o CXCR4 e com os achados de Almofti et al. (71) cuja expressão foi de 57,3%, mostrando que, assim como em outros tumores, o CXCR4 é altamente expresso nas células neoplásicas do CEC.

Nos últimos anos, além de verificar a expressão ou não dessa proteína, tem se buscado verificar sua intensidade (grau) de marcação pois, tem-se evidencias que

uma marcação forte do CXCR4 estaria ligado a uma pior sobrevida em tumores gástricos, por exemplo (72). Como vimos o CXCR4 é marcado fortemente nas células neoplásicas, porém tem uma marcação fraca ou negativa em epitélio não tumoral (mucosa normal). Essa marcação fracamente positiva foi vista em 71,1% (n=37) dos casos, de um total de 52 amostras de epitélio não tumoral, dando um resultado estatisticamente significativo ($p=0,011$). Esse resultado pode ser explicado pelo fato de que as células neoplásicas tentam mimetizar o movimento celular normal como uma estratégia para driblar as defesas do organismo e, devido as mutações genéticas e mudanças transcricionais que são muito mais elevadas nessas células, por isso pode ocorrer uma maior expressão do CXCR4 e de outros receptores como CCR7, corroborando com a hipótese de que essa proteína pode ser utilizada sim para distinguir áreas tumorais de áreas livres de tumor (73)(65) (74).

A superexpressão do CXCR4 em vários tipos de tumores quando comparado ao tecido normal, levou pesquisadores a pensar que esse receptor poderia interferir no comportamento clínico, podendo desempenhar um papel crucial no processo de metástase devido a sua capacidade de aumentar a invasividade (72,75). Pensando nisso, optou-se por também analisar a marcação do CXCR4 na região de frente de invasão do tumor. A frente de invasão do tumor é a região mais profunda (mais longe da margem) que tem células neoplásicas. Essa região é descrita como pouco diferenciada e com maior capacidade de invasão devido ao fato de que as células epiteliais que se apresentam mais coesas e polarizadas começam a exibir características de células mesenquimais, como por exemplo não polarização e maior mobilidade, fenômeno conhecido como transição epitélio-mesenquimal (TEM) (76). A nossa hipótese era encontrar um maior número casos com alta marcação do CXCR4 nessa região, porém verificamos que 52,5% (n=47) dos casos tinham uma marcação fracamente positiva para a proteína, contra 47,5% com marcação fortemente positiva. Com essa pequena diferença, não houve significância estatística nessa relação, e a hipótese não foi confirmada.

Na literatura, em estudos com outros tipos de tumor, o CXCR4 é mais expresso em áreas pouco diferenciadas o que, segundo os autores, favorece a migração dessas células para áreas de metástase regionais ou a distancia, favorecendo uma maior capacidade de invasão e influenciando o comportamento clínico da neoplasia (65).

As células que expressam o CXCR4 também podem ser estimuladas a migrar e invadir células do estroma, endoteliais ou da medula óssea de acordo com um

gradiente de concentração positivo para o CXCL-12/SDF-1 (65,70). A expressão do CXCL-12 é elevada em órgãos como fígado, pulmão e medula óssea, fazendo deles sítios mais comuns de metástases (77). Nesse estudo não foi analisado a marcação de CXCL-12/SDF-1. Porém, sítios como os pulmões, estão entre os mais acometidos por metástases de CEC boca.

Após caracterizar a amostra diante da imunomarcação do CXCR4, visando investigar um possível fator prognóstico, realizou-se testes estatísticos para determinar a associação da expressão do CXCR4 com parâmetros clínicos e histopatológicos. Evidências crescentes sugerem que, uma superexpressão do CXCR4 estaria ligada a um maior risco de metástase, tanto regional quanto a distancia, apresentando assim valor prognóstico em vários tipos de tumores (78).

Nesse estudo, 53,3% (n=49) dos casos que tiveram uma forte marcação para o CXCR4 haviam sido classificados como bem diferenciados, mostrando uma relação estatisticamente significativa ao comparar com os casos classificados como pouco diferenciado (p= 0,049). A correlação da gradação histológica com a marcação do CXCR4 já havia sido demonstrada em outros trabalhos (72), porém, diferentemente desse resultado, muitas vezes ele era mais expresso nos casos classificados como pouco ou moderadamente diferenciados, que geralmente estão ligados a um pior prognóstico comparado a tumores bem diferenciados. (4). Com base no que está sendo publicado nos últimos anos, esperávamos encontrar uma marcação fortemente positiva nos casos poucos diferenciados, mas nosso achado foi de encontro a essa hipótese, não sendo possível estabelecer essa relação para os casos no nosso estudo.

A classificação histológica do CEC geralmente é feita com base em um sistema pré-definido e aceito na literatura. Uma das classificações mais utilizadas e que foi empregada nesse trabalho foi a da OMS (20), apesar de ser controverso sua utilização para tentar prever o comportamento clínico da doença. Segundo Xu et al., (79), a gradação do tumor muitas vezes não significa um fator de risco, mas ela pode ser utilizada na determinação do plano terapêutico. Por exemplo, na presença de um tumor pouco diferenciado, seria indicado uma terapia adjuvante. No trabalho realizado por esse grupo, tumores bem diferenciados mostraram-se com menor taxa de recorrência e melhor índice de sobrevida.

Com relação ao tamanho do tumor, observou-se marcação fortemente positiva do CXCR4 em 49,5% (n=45) dos tumores classificados como T3 e T4 contra 14,3%

(n=13) para tumores classificados como T1 e T2. Apesar dessa diferença, não foi observada relação estatisticamente significativa quando da comparação entre esses grupos. Em relação a metástase linfonodal, 48,9% (n=45) dos casos que apresentaram marcação fortemente positiva, tinham linfonodos positivos, contra 25,0% (n=23) casos linfonodos negativos, mas esses dados também não foram estatisticamente significantes. Apesar da maioria dos casos T3 e T4 apresentar comprometimento linfonodal e expressar fortemente a proteína estudada, devido a falta de significância estatística não pudemos correlacionar a marcação dessa proteína com o estágio clínico TNM. Na literatura, essa correlação pode ser demonstrada através de uma meta-análise em que, a expressão do CXCR4 em tumores coloretais, estava relacionada ao TNM, diferenciação tumoral e metástase (78). Em amostras de carcinoma renal de células claras dispostos em lâminas de TMA, assim como foi feito nesse estudo, a marcação do CXCR4 mostrou significância com o tamanho do tumor e, a intensidade de marcação, que também foi dicotomizada, mostrou-se elevada em estágios TNM mais avançados, apesar desse achado não ter sido estatisticamente significativo. Esse mesmo estudo revelou ainda que, a utilização do CXCR4 juntamente com o TNM tem um melhor valor prognóstico comparado com a utilização isolada dos dois critérios. (77).

Com relação ao CEC, um estudo realizado em 2007 com 64 casos, 40 apresentaram positividade para o CXCR4 e, ao analisar a correlação com parâmetros clínicos, obteve significância estatística para a presença de metástase linfonodal, tipo histológico e o estágio TNM, assemelhando-se em partes com os resultados encontrados nesse estudo. Por fim, eles concluíram que o CXCR4 é bastante expresso nesse carcinoma e sua expressão está associada a fatores de progressão da doença, como invasão e metástase linfonodal (80). Outro estudo publicado em 2009 com 74 amostras de CEC, 59,4% dos casos tiveram expressão para o CXCR4 estando essa expressão também correlacionada a presença de linfonodos metastáticos (81). O mesmo achado, teve o estudo realizado anteriormente aos citados acima por (82), que analisou a expressão do CXCR4 em amostras de 90 pacientes e mostrou a mesma significância. Já o estudo de Delibasi e colaboradores (83) foi um pouco além, e observou a marcação do CXCR4 tanto no tumor primário, localizado em língua, quanto no linfonodo metastático do mesmo paciente quanto estava presente. Como resultado, foi observado que carcinoma de língua expressa o CXCR4, enquanto que o tecido não tumoral tem uma expressão fraca ou negativa e,

o linfonodo positivo, tem uma superexpressão da proteína quando se compara ao tecido neoplásico primário. Apesar desses achados, eles concluem que não podem correlacionar a expressão do CXCR4 com a progressão do tumor.

Um outro parâmetro que foi analisado em nosso estudo foi a associação da marcação do CXCR4 com o infiltrado inflamatório presente nas regiões intra e peritumoral. Dos casos que tiveram o infiltrado inflamatório classificado como “moderado”, 39,5% (n=34) apresentaram uma expressão fortemente positiva para a proteína estudada, sendo esse resultado estatisticamente significativo ($p=0,021$). Sabe-se que o recrutamento de leucócitos para locais onde há inflamação envolve a Interleucina-8 e várias outras citocinas quimiotáticas que atraem e ativam as células inflamatórias. Nossa hipótese era a de que o CXCR4, sendo uma citocina inflamatória, poderia estar fortemente marcado sob condições inflamatórias ou poderia recrutar uma maior quantidade de células inflamatórias em regiões tumorais, o que acabou sendo confirmado pela associação entre a marcação fortemente positiva da proteína e a presença de um infiltrado inflamatório “moderado” (84).

O papel e a influência das células inflamatórias em regiões tumorais é bastante controverso na literatura. Sabe-se que o principal mecanismo de defesa anti-tumoral é através da morte de células neoplásicas por linfócitos T citotóxicos ou CD8+, porém essa imunidade celular pode estar deficiente e contribuir para o crescimento tumoral. Então uma maior ou menor atividade inflamatória local, poderia contribuir ou não para o desenvolvimento desse tumor, podendo muitas vezes relacionar essa condição ao prognóstico do paciente. Porém essa condição ainda não foi totalmente estabelecida (26,44).

Buscamos relacionar também outros parâmetros histopatológicos que são utilizados como possíveis preditores do comportamento do tumor e, uma vez presentes, estariam ligados a um maior risco de metástase. Sabe-se que o processo de infiltração de células neoplásicas em vasos sanguíneos e linfáticos contribuem para o desenvolvimento e disseminação dessas células para outros tecidos e órgãos (85). Nossos resultados, apesar de não apresentarem significância estatística, mostraram que 64,8% (n=59) dos casos que exibiam marcação fortemente positiva para o CXCR4 não tinham infiltração sanguínea. Apesar do indício, não podemos correlacionar a expressão dessa proteína com a ausência de infiltração sanguínea, assim como Albert et al. (86), no único trabalho encontrado na literatura que analisou esse parâmetro em CEC localizados em língua, também não conseguiu fazer essa associação, apesar da

expectativa em encontrar uma relação positiva entre os dois parâmetros (86). O mesmo resultado foi encontrado para a infiltração linfática que, apesar de menos estudada, também contribui para desenvolver metástase regional do tumor. Na amostra estudada, 49,4% (n= 43) era fortemente positiva para o CXCR4 e não exibiam infiltração linfática. Assim, não foi possível correlacionar a marcação com essas variáveis histopatológicas.

Mostrando um resultado oposto aos citados acima, o último parâmetro histopatológico analisado foi a infiltração perineural que é uma condição estabelecida na literatura para disseminação tumoral ao longo de feixes nervosos em tumores sólidos, incluindo os carcinomas localizados na região de cabeça e pescoço. Essa condição está relacionada a maior agressividade, maiores chances de recorrência e consequentemente a um pior prognóstico (87). Devido a essas características, uma vez constatada essa condição, muitos clínicos a utilizam para decidir e o estabelecer a modalidade terapêutica a ser adotada, apesar de existir controversas sobre essa postura (88). Nossos dados não mostraram uma associação dessa condição com outras variáveis clínicas, porém foi encontrado que 42,9% (n= 39) dos casos que tinham invasão perineural também apresentava uma expressão fortemente positiva para o CXCR4. Esse tipo de invasão caracteriza o tumor como uma “neoplasia neutrópica” devido ao seu padrão de crescimento e, é encontrada em mais de 30% dos tumores de cavidade oral. Essa condição pode ser encontrada na ausência de invasão sanguínea e linfática, indo ao encontro dos resultados encontrados nesse trabalho (88).

A relação entre a alta expressão do CXCR4 e a invasão perineural já foi encontrada na literatura e, com relação ao CEC, já foi constatada uma forte correlação entre a alta expressão da proteína com a capacidade de invasão perineural (86). A mesma correlação foi demonstrada também em tumores de próstata e tumores pancreáticos, onde também foi considerada preditora de comprometimento neural. No carcinoma adenoide cístico, a administração do antagonista do CXCR4, AMD310, inibiu essa invasão (estudo in vitro e com modelo animal) (89–91).

Apesar do crescente número de estudos envolvendo a proteína CXCR4, ainda nos deparamos com poucos trabalhos que envolvam carcinomas da região de cabeça e pescoço, especialmente com tumores localizados em cavidade oral, como o CEC. E menor ainda é o número de trabalhos que buscam correlacionar sua expressão com características histopatológicas tão específicas como infiltração sanguínea, linfática e

perineural. Isso por um lado, dificulta nossa discussão por não termos dados para comparação. Por outro lado, nos mostra que tomamos uma decisão acertada ao tentar buscar novas respostas.

Além das características clínicas e histopatológicas, também buscamos relacionar a marcação do CXCR4 com os hábitos dos pacientes que constituíram nossa amostra, como o tabagismo e etilismo. Vale ressaltar que toda a nossa amostra era de pacientes tabagistas e etilistas ou ex-tabagistas e ex-etilistas, então nossos resultados devem ser vistos com ressalvas, pois trata-se de uma amostra já caracterizada.

Sabemos que o tabagismo é o principal fator de risco para o CEC e sozinho ele é responsável por milhares de mortes por câncer em todo o mundo. A relação do consumo de tabaco com o CEC já foi bem estabelecida através de vários estudos publicados e sabe-se que as substâncias carcinogênicas presentes (como os hidrocarbonetos poliaromáticos) são capazes de causar mutações no DNA que podem resultar em um crescimento tumoral (92). Nosso trabalho mostrou que 60,2% (n=56) dos pacientes que eram tabagistas apresentavam uma marcação fortemente positiva para a proteína estudada, porém, esse resultado não mostrou significância estatística. Resultado semelhante ao nosso foi visto por Albert et al. (86), em que a maioria dos pacientes tabagistas tinham uma alta expressão da proteína, apesar da falta de significância estatística. Estudo com câncer de pulmão que também tem uma forte associação com o hábito de fumar, mostrou que a expressão do CXCR4 não tem uma associação com a presença do hábito, apesar de mostrar associação com outras variáveis clínicas como presença de metástase e estágio clínico (93).

Com relação ao álcool, sabe-se que ele age de maneira sinérgica com o tabaco aumentando o risco de desenvolvimento do CEC. O álcool seria capaz de aumentar a permeabilidade da mucosa oral causando alterações morfológicas, por exemplo atrofia epitelial, o que poderia aumentar a penetração de substâncias carcinogênicas (92). O presente estudo mostrou que 54,8% (n=51) dos pacientes que fizeram uso de álcool no passado apresentaram uma marcação fortemente positiva para o CXCR4, mostrando-se estatisticamente significativa ($p=0,001$). A associação entre essas duas variáveis já foi demonstrada na literatura por um trabalho realizado com carcinomas localizados em língua em que a correlação estatística foi limítrofe ($p=0,047$). Esse resultado deve ser visto com ressalva devido a caracterização da amostra e por não

sabermos se as alterações causadas pelo uso do álcool permanecem de maneira irreversível e por quanto tempo.

Tem-se buscado também na literatura correlacionar a expressão do CXCR4 a sobrevivência dos pacientes em vários tipos de tumores afim de dar um valor prognóstico a essa expressão. Em uma revisão sistemática com meta-análise publicada em 2015 na qual foram incluídos 85 estudos, foi observado que a expressão aumentada do CXCR4 está ligada a uma pior sobrevida livre de doença e global independente do tipo de câncer. Um menor tempo de sobrevida livre de doença foi encontrado para neoplasias hematológicas, câncer de mama, coloretal, esofágico, renal, ginecológico, pancreático e de fígado (94). Nesse estudo, não houve associação entre a marcação imuno-histoquímica para CXCR4 e a sobrevida global de 5 anos ($\chi^2 = 0.3$, $p=0.565$). Foi também feita análise de regressão de Cox com outras variáveis, e somente a gradação histológica “pouco diferenciado”, e o tamanho 3/4 impactaram na sobrevida global em 5 anos, conforme já está bem estabelecido na literatura (24,36).

O estudo realizado por Li et al. (78) concluiu que a alta expressão de CXCR4/SDF-1 é preditivo de uma sobrevida baixa em pacientes com carcinoma coloretal. Esse achado é fundamentado pelo fato de que a ativação da via de sinalização CXCR4/SDF-1 atua na migração e invasão tumoral culminando em metástase, que é comprovadamente relacionada a um pior prognóstico. Acha-se a mesma associação em carcinoma renal de células claras, em que o CXCR4 foi considerado um fator de prognóstico ruim independente, e em tumor de mama e de próstata, em que essa relação já foi validada (95).

Com relação ao CEC, poucos trabalhos estudaram a expressão do CXCR4 nesse grupo de tumores, e menos ainda que tentaram correlacionar essa expressão com sobrevida. Lee et al. (81) em uma amostra de 74 casos de CEC relacionou a alta expressão do CXCR4 como um fator impactante na sobrevida desse grupo de pacientes, diferente dos nossos achados. Porém, como nosso estudo, também mostrou que o tamanho do tumor influencia na sobrevida através da análise multivariada de Cox. Nosso estudo apesar de ter uma amostra maior, teve uma diminuição substancial do “n” devido a perda de acompanhamento dos pacientes, o que pode ter prejudicado análise do impacto da expressão da proteína na sobrevida.

Em um estudo de coorte realizado em 2015 com 233 pacientes com tumores inoperáveis de cabeça e pescoço, que incluía tumores de cavidade oral (em estágios

II, III e IV), orofaringe, hipofaringe e laringe, não foi encontrado relação estatisticamente significativa entre a expressão do CXCR4 e os dados de sobrevida, porém foi visto uma significância entre a alta expressão do CXCR4 com a diminuição do tempo livre de metástase. Assim, eles concluíram que a alta expressão dessa proteína pode ser considerada um fator prognóstico negativo devido a capacidade de promover uma disseminação metastática mais rápida. Vale ressaltar que dos 233 pacientes incluídos nesse estudo, 63 eram portadores de CEC e destes, 24 (38%) apresentaram alta expressão para o CXCR4.

A literatura demonstra que, se o CXCR4 está presente, ele interage com seu ligante CXCL12 e com isso ocorre a ativação de vias importantes, como a AKT/PKB e ERK 1/2 sugerindo um papel decisivo no processo de metástase de CEC, e interferindo na sobrevida dos pacientes (71). O CXCR4 atuando de maneira direta na periferia do tumor, poderia ser utilizado como um potencial alvo terapêutico, como já foi sugerido em trabalhos com outros tumores (96), porém essa hipótese não pode ser confirmada com esse trabalho.

Vale ressaltar que as discrepâncias encontradas nesse trabalho quando comparamos com os estudos publicados até o momento na literatura, pode ser devido a diferentes populações incluídas na amostra ou por se tratarem de tumores em sítios distintos, pois até mesmo dentro do grupo de tumores localizados na região de cabeça e pescoço, há inúmeras particularidades que podem interferir no curso clínico dessas doenças. Devido a essa razão tivemos o cuidado de selecionar uma amostra homogênea, que caracteriza bem o perfil epidemiológico do CEC afim de evitar interpretações errôneas dos resultados.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados dessa pesquisa, podemos concluir que:

- A proteína CXCR4 é fortemente marcada em casos de CEC e fracamente marcada nas áreas de epitélio não tumoral.
- A forte marcação dessa proteína está relacionada a graduação histológica do CEC, sendo mais expressa em tumores classificados como “bem diferenciado”.
- Vê-se uma correlação entre a intensidade de marcação do CXCR4 com a intensidade do infiltrado inflamatório
- A forte marcação da proteína nos casos de CEC localizados em língua sugerem uma importância no desenvolvimento dessa doença, porém os resultados encontrados nessa pesquisa indicam que ela não está associada a fatores prognósticos e não exerce influência na sobrevida desses pacientes.

REFERÊNCIAS¹

1. El-Naaj IA, Leiser Y, Shveis M, Sabo E, Peled M. Incidence of oral cancer occult metastasis and survival of T1-T2N0 oral cancer patients. *J Oral Maxillofac Surg* [Internet]. 2011 Oct;69(10):2674–9. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joms.2011.02.012>
2. Knopf A, Lempart J, Bas M, Slotta-huspenina J, Fritsche MK. Oncogenes and tumor suppressor genes in squamous cell carcinoma of the tongue in young patients. *Oncotarget*. 2015;6(5):3443–51.
3. Taghavi N, Yazdi I. Prognostic factors of survival rate in oral squamous cell carcinoma: Clinical, histologic, genetic and molecular concepts. *Arch Iran Med*. 2015;18(5):314–9.
4. Massano J, Regateiro FS, Januário G, Ferreira A. Oral squamous cell carcinoma: Review of prognostic and predictive factors. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology*. 2006;102(1):67–76.
5. Chammas R. Câncer e o microambiente tumoral Cancer and the tumor microenvironment. *Rev Med (Puebla)*. 2010;89(1):21–31.
6. Koontongkaew S. The tumor microenvironment contribution to development, growth, invasion and metastasis of head and neck squamous cell carcinomas. *J Cancer*. 2013;4(1):66–83.
7. Pozzobon T, Goldoni G, Viola A, Molon B. CXCR4 signaling in health and disease. *Immunol Lett* [Internet]. 2016;177:6–15. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0165247816301092>
8. Albert S, Hourseau M, Halimi C, Serova M, Descatoire V, Barry B, et al. Prognostic value of the chemokine receptor CXCR4 and epithelial-to-mesenchymal transition in patients with squamous cell carcinoma of the mobile tongue. *Oral Oncol*. 2012;48:1263–71.

¹ De acordo com Estilo Vancouver.

9. Zhang W, Wang X, Yue K, Liu S, Liu X. Construction of a CXCL12-KDEL fusion gene to inhibit head and neck squamous cell carcinoma metastasis by intracellular sequestration of CXCR4. *Biomed Res Int* [Internet]. 2015;2015:195828. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25866764>

10. Shi X, Guo L-W, Seedial S, Takayama T, Wang B, Zhang M, et al. Local CXCR4 Upregulation in the Injured Arterial Wall Contributes to Intimal Hyperplasia. *Stem Cells* [Internet]. 2016 Nov;34(11):2744–57. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27340942>

11. Dillenburg-Pilla P, Patel V, Mikelis CM, Zárate-Bladés CR, Doçi CL, Amornphimoltham P, et al. SDF-1/CXCL12 induces directional cell migration and spontaneous metastasis via a CXCR4/Gai/mTORC1 axis. *FASEB J* [Internet]. 2015 Mar;29(3):1056–68. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25466898>

12. Mona CE, Besserer-Offroy É, Cabana J, Leduc R, Lavigne P, Heveker N, et al. Design, Synthesis, and Biological Evaluation of CXCR4 ligands. 2016;10298–311.

13. Zhao H, Guo L, Zhao H, Zhao J, Weng H, Zhao B. CXCR4 over-expression and survival in cancer: A system review and meta-analysis. *Oncotarget* [Internet]. 2014;6(7). Available from: www.impactjournals.com/oncotarget

14. GLOBOCAN [Internet]. [cited 2017 Oct 3]. Available from: http://globocan.iarc.fr/old/burden.asp?selection_pop=24076&Text-p=Brazil&selection_cancer=290&Text-c=All+cancers+excl.+non-melanoma+skin+cancer&pYear=8&type=0&window=1&submit=Execute

15. INCA - Instituto Nacional de Câncer - Estimativa 2016 [Internet]. [cited 2017 Jan 25]. Available from: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/mapa.asp?ID=9>

16. INCA - Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2018 - Neoplasia maligna da cavidade oral [Internet]. [cited 2018 Feb 13]. Available from: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/mapa-cavidade-oral.asp>

17. Rautava J, Luukkaa M, Heikinheimo K, Alin J, Grenman R, Happonen RP. Squamous cell carcinomas arising from different types of oral epithelia differ in their tumor and patient characteristics and survival. *Oral Oncol*. 2007;43(9):911–9.

18. Chaturvedi AK, Engels EA, Anderson WF, Gillison ML. Incidence trends for human papillomavirus-related and -unrelated oral squamous cell carcinomas in the United States. *J Clin Oncol*. 2008;26(4):612–9.
19. Khot KP, Deshmane S, Choudhari S. Human Papilloma Virus in Oral Squamous Cell Carcinoma - The Enigma Unravelling. *Chin J Dent Res*. 2016;19(1):17–23.
20. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization Classification of Tumours Pathology & Genetics Head and Neck Tumours IARC WHO Classification Head and Neck Tumours. *Urology* [Internet]. 2004;65(1):214–5. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S0090429504011148>
21. Bagan J, Sarrion G, Jimenez Y. Oral cancer: Clinical features. *Oral Oncol* [Internet]. 2010;46(6):414–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2010.03.009>
22. Rivera C. Essentials of oral cancer. *Int J Clin Exp Pathol*. 2015;8(9):11884–94.
23. Clatot F, Gou??rant S, Mareschal S, Cornic M, Berghian A, Choussy O, et al. The gene expression profile of inflammatory, hypoxic and metabolic genes predicts the metastatic spread of human head and neck squamous cell carcinoma. *Oral Oncol* [Internet]. 2014;50(3):200–7. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2013.12.009>
24. Costa A de LL, Júnior RF de A, Ramos CCF. Correlation between TNM classification and malignancy histological feature of oral squamous cell carcinoma. *Braz J Otorhinolaryngol* [Internet]. 2005;71(2):181–7. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1808869415313082>
25. De Matos FR, Lima EDNDA, Queiroz LMG, da Silveira EJD, De Araújo Lima EDN, Queiroz LMG, et al. Analysis of inflammatory infiltrate, perineural invasion, and risk score can indicate concurrent metastasis in squamous cell carcinoma of the tongue. *J Oral Maxillofac Surg* [Internet]. 2012 Jul [cited 2013 Jan 2];70(7):1703–10. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.joms.2011.08.023>

26. Affonso VR, Montoro JRDMC, de Freitas LCC, Saggiaro FP, de Souza L, Mamede RCM. Peritumoral infiltrate in the prognosis of epidermoid carcinoma of the oral cavity. *Braz J Otorhinolaryngol* [Internet]. 2015 [cited 2015 Sep 18];81(4):416–21. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/26141206>
27. Fukano H, Matsuura H, Hasegawa Y, Nakamura S. Depth of invasion as a predictive factor for cervical lymph node metastasis in tongue carcinoma. *Head Neck*. 1997 May;19(3):205–10.
28. Ettl T, El-Gindi A, Hautmann M, Gosau M, Weber F, Rohrmeier C, et al. Positive frozen section margins predict local recurrence in R0-resected squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol* [Internet]. 2016 Apr;55:17–23. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2016.02.012>
29. Brandwein-Gensler M, Teixeira MS, Lewis CM, Lee B, Rolnitzky L, Hille JJ, 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* [Internet]. 2005;29(2):167–78. Available from: <http://content.wkhealth.com/linkback/openurl?sid=WKPTLP:landingpage&an=0000478-200502000-00003%5Cnhttp://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15644773>
30. BRODERS AC. SQUAMOUS-CELL EPITHELIOMA OF THE LIP. *J Am Med Assoc* [Internet]. 1920 Mar 6 [cited 2017 Dec 4];74(10):656. Available from: <http://jama.jamanetwork.com/article.aspx?doi=10.1001/jama.1920.02620100016007>
31. Jakobsson PA, Eneroth CM, Killander D, Moberger G, Martensson B. Histologic classification and grading of malignancy in carcinoma of the larynx. *Acta Radiol Ther Phys Biol*. 1973 Feb;12(1):1–8.
32. Anneroth G, Batsakis J, Luna M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. *Scand J Dent Res*. 1987 Jun;95(3):229–49.
33. Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Stene T, Bang G, Dabelsteen E. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas. *J oral Pathol Med Off Publ Int Assoc Oral Pathol Am Acad Oral Pathol*. 1989 Sep;18(8):432–7.

34. Chen YW, Yu EH, Wu TH, Lo WL, Li WY, Kao SY. Histopathological factors affecting nodal metastasis in tongue cancer: analysis of 94 patients in Taiwan. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2008;37(10):912–6.
35. Alaeddini M, Etemad-Moghadam S. Correlation between invasion mode and the histologic risk assessment model in oral squamous cell carcinoma. *Oral Maxillofac Surg* [Internet]. 2016;20(4):353–8. Available from: <http://dx.doi.org/10.1007/s10006-016-0572-3>
36. Wagner VP, Webber LP, Curra M, Klein IP, Meurer L, Carrad VC, et al. Bryne's grading system predicts poor disease-specific survival of oral squamous cell carcinoma: a comparative study among different histologic grading systems. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* [Internet]. 2017;123(6):688–96. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.oooo.2017.02.012>
37. Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: Back to Virchow? *Lancet*. 2001;357(9255):539–45.
38. Kolenda T, Przybyła W, Kapalczyńska M, Teresiak A, Zajączkowska M, Bliźniak R, et al. Tumor microenvironment – Unknown niche with powerful therapeutic potential. *Reports Pract Oncol Radiother*. 2018;23(3):143–53.
39. Balkwill FR, Capasso M, Hagemann T. The tumor microenvironment at a glance. *J Cell Sci* [Internet]. 2012;125(23):5591–6. Available from: <http://jcs.biologists.org/cgi/doi/10.1242/jcs.116392>
40. Yan L, Anderson GM, DeWitte M, Nakada MT. Therapeutic potential of cytokine and chemokine antagonists in cancer therapy. *Eur J Cancer*. 2006;42(6):793–802.
41. Da Silva JM, Soave DF, Moreira Dos Santos TP, Batista AC, Russo RC, Teixeira MM, et al. Significance of chemokine and chemokine receptors in head and neck squamous cell carcinoma: A critical review. *Oral Oncol* [Internet]. 2016;56:8–16. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2016.02.016>
42. Lee M, Rhee I. Cytokine signaling in Tumor Progression. *Immune Netw*. 2017;17(4):214–27.

43. Sun Y, Liu N, Guan X, Wu H, Sun Z, Zeng H. Immunosuppression Induced by Chronic Inflammation and the Progression to Oral Squamous Cell Carcinoma. *Mediators Inflamm* [Internet]. 2016;2016:1–12. Available from: <https://www.hindawi.com/journals/mi/2016/5715719/>
44. Vieira FLD, Vieira BJ, Guimaraes M a M, Aarestrup FM. Cellular profile of the peritumoral inflammatory infiltrate in squamous cells carcinoma of oral mucosa: Correlation with the expression of Ki67 and histologic grading. *BMC Oral Health*. 2008;8:25.
45. Manzano AC, Altemani A, Martins AS. Artigo Original Caracterização imuno-histoquímica do infiltrado linfocitário em biópsia de carcinoma espinocelular da língua e soalho oral e sua implicação prognostica. *Rev Bras Cir Cabeça Pescoço*. 2010;39:270–6.
46. Murdoch C, Monk PN, Finn A. Cxc Chemokine Receptor Expression on Human Endothelial Cells. 1999;11(9):704–12.
47. Uchida D, Kuribayashi N, Kinouchi M, Ohe G, Tamatani T, Nagai H, et al. Expression and function of CXCR4 in human salivary gland cancers. *Clin Exp Metastasis*. 2013;30(2):133–42.
48. Murphy P. Chemokines and Molecular Basis of Cancer. 2001;345(11):833–5.
49. Rosenkilde MM, Schwartz TW. The chemokine system - A major regulator of angiogenesis in health and disease. *Apmis*. 2004;112(7–8):481–95.
50. Müller a, Homey B, Soto H, Ge N, Catron D, Buchanan ME, et al. Involvement of chemokine receptors in breast cancer metastasis. *Nature*. 2001;410(6824):50–6.
51. Burger JA, Kipps TJ. Review article CXCR4 : a key receptor in the crosstalk between tumor cells and their microenvironment. 2017;107(5):1761–8.
52. Kuribayashi N, Uchida D, Kinouchi M, Takamaru N, Tamatani T, Nagai H, et al. The role of metabotropic glutamate receptor 5 on the stromal cell-derived factor-1/CXCR4 system in oral cancer. *PLoS One* [Internet]. 2013;8(11):e80773. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24236200>

53. Nazari A, Khorramdelazad H, Hassanshahi G. Biological / pathological functions of the CXCL12 / CXCR4 / CXCR7 axes in the pathogenesis of bladder cancer. *Int J Clin Oncol*. 2017;
54. Busillo JM BJ. Regulation of CXCR4 Signaling. 2008;1768(4):952–63.
55. Zheng F, Zhang Z, Flamini V, Jiang WG, Cui Y. The Axis of CXCR4/SDF-1 Plays a Role in Colon Cancer Cell Adhesion Through Regulation of the AKT and IGF1R Signalling Pathways. *Anticancer Res* [Internet]. 2017;37(8):4361–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28739729><http://ar.iiarjournals.org/content/37/8/4361.abstract>
56. Mirisola V, Zuccarino A, Bachmeier BE, Sormani MP, Falter J, Nerlich A, et al. CXCL12/SDF1 expression by breast cancers is an independent prognostic marker of disease-free and overall survival. *Eur J Cancer* [Internet]. 2009;45(14):2579–87. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.ejca.2009.06.026>
57. Niu J, Huang Y, Zhang L. CXCR4 silencing inhibits invasion and migration of human laryngeal cancer Hep-2 cells. 2015;8(6):6255–61.
58. Taromi S, Kayser G, Catusse J, von Elverfeldt D, Reichardt W, Braun F, et al. CXCR4 antagonists suppress small cell lung cancer progression. *Oncotarget* [Internet]. 2016 Dec 20;7(51):85185–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27835905>
59. Rave-Fränk M, Tehrany N, Kitz J, Leu M, Hanne ·, Weber E, et al. Prognostic value of CXCL12 and CXCR4 in inoperable head and neck squamous cell carcinoma. *Strahlenther Onkol*. 2016;192:47–54.
60. Landini G. Colour Deconvolution [Internet]. 2015 [cited 2017 Apr 2]. Available from: <http://www.mecourse.com/landinig/software/cdeconv/cdeconv.html>
61. Ruifrok AC, Johnston DA. Quantification of histochemical staining by color deconvolution. *Anal Quant Cytol Histol* [Internet]. 2001 Aug;23(4):291–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11531144>
62. Varghese F, Bukhari AB, Malhotra R, De A. IHC profiler: An open source plugin for the quantitative evaluation and automated scoring of immunohistochemistry images of human tissue samples. *PLoS One*. 2014;9(5).

63. R Development Core Team (2008). R: A language and environment for statistical computing. R Foundation for Statistical Computing, Vienna, Austria. ISBN 3-900051-07-0, [Internet]. [cited 2018 Jan 31]. Available from: <https://www.r-project.org/>
64. Zlotnik A, Yoshie O. Chemokines: A New Classification Review System and Their Role in Immunity. Vol. 12, Immunity. 2000. p. 121–7.
65. Balkwill F. The significance of cancer cell expression of the chemokine receptor CXCR4. *Semin Cancer Biol.* 2004;14(3):171–9.
66. Maleki D, Ghojzadeh M, Mahmoudi S-S, Mahmoudi S-M, Pournaghi-Azar F, Torab A, et al. Epidemiology of Oral Cancer in Iran: a Systematic Review. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2015;16(13):5427–32.
67. Moore SR, Johnson NW, Pierce AM, Wilson DF. The epidemiology of tongue cancer: a review of global incidence. *Oral Dis.* 2000 Mar;6(2):75–84.
68. Ghantous Y, Abu Elnaaj I. [GLOBAL INCIDENCE AND RISK FACTORS OF ORAL CANCER]. *Harefuah.* 2017 Oct;156(10):645–9.
69. Jarungroongruangchai W, Charoenpitakchai M, Silpeeyodom T, Pruksapong C, Burusapat C. Size of cervical lymph node and metastasis in squamous cell carcinoma of the oral tongue and floor of mouth. *J Med Assoc Thai.* 2014 Feb;97 Suppl 2:S101-6.
70. Meng X, Wuyi L, Yuhong X, Xinming C. Expression of CXCR4 in oral squamous cell carcinoma: Correlations with clinicopathology and pivotal role of proliferation. *J Oral Pathol Med.* 2010;39(1):63–8.
71. Almofti A, Uchida D, Begum NM, Tomizuka Y, Iga H, Yoshida H, et al. The clinicopathological significance of the expression of CXCR4 protein in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol.* 2004 Jul;25(1):65–71.
72. Gao Y, Li C, Nie M, Lu Y, Lin S, Yuan P, et al. CXCR4 as a novel predictive biomarker for metastasis and poor prognosis in colorectal cancer. *Tumor Biol.* 2014;35(5):4171–5.

73. Xia X, Liu K, Zhang H, Shang Z. Correlation between CCR7 expression and lymph node metastatic potential of human tongue carcinoma. *Oral Dis* [Internet]. 2015 Jan 1 [cited 2018 Jan 9];21(1):123–31. Available from: <http://doi.wiley.com/10.1111/odi.12228>

74. AL-jokhadar maya, Al-mandily ahmad, zaid khaled, Maalouf EA. CCR7 and CXCR4 Expression in Primary Head and Neck Squamous Cell Carcinomas and Nodal Metastases – a Clinical and Immunohistochemical Study. *DoiOrg* [Internet]. 2017;18(4):1093–104. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28547946>

75. He H, Wang C, Shen Z, Fang Y, Wang X, Chen W, et al. Upregulated expression of C-X-C chemokine receptor 4 is an independent prognostic predictor for patients with gastric cancer. *PLoS One*. 2013;8(8):e71864.

76. Cristina L, Carneiro M, Leite CF, Cardoso SV, Loyola AM, Faria PR De, et al. Expression of epithelial-mesenchymal transition markers at the invasive front of oral squamous cell carcinoma. 2015;23(2):169–78.

77. An H, Xu L, Zhu Y, Lv T, Liu W, Liu Y, et al. High CXC chemokine receptor 4 expression is an adverse prognostic factor in patients with clear-cell renal cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2014;110(9):2261–8.

78. Li YP, Pang J, Gao S, Bai PY, Wang W Da, Kong P, et al. Role of CXCR4 and SDF1 as prognostic factors for survival and the association with clinicopathology in colorectal cancer: A systematic meta-analysis. *Tumor Biol*. 2017;39(6).

79. Xu Q, Wang C, Li B, Li J, Mao M, Qin L, et al. Prognostic value of pathologic grade for patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis*. 2017;(April):1–12.

80. Yin D, Gao Z. [Expression and clinical significance of chemokine receptor 4 in oral squamous cell carcinoma]. *Hua xi kou qiang yi xue za zhi = Huaxi kouqiang yixue zazhi = West China J Stomatol*. 2007 Aug;25(4):392–5.

81. Lee J-I, Jin B-H, Kim M-A, Yoon H-J, Hong S-P, Hong S-D. Prognostic significance of CXCR-4 expression in oral squamous cell carcinoma. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endodontology* [Internet]. 2009;107(5):678–84. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1079210408009487>

82. Ishikawa T, Nakashiro K-I, Hara S, Klosek SK, Li C, Shintani S, et al. CXCR4 expression is associated with lymph-node metastasis of oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol* [Internet]. 2006;28(1):61–6. Available from: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/entrez/query.fcgi?cmd=Retrieve&db=PubMed&dopt=Citation&list_uids=163279805Cn<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16327980>
83. Delilbasi CB, Okura M, Iida S, Kogo M. Investigation of CXCR4 in squamous cell carcinoma of the tongue. *Oral Oncol*. 2004;40(2):154–7.
84. Teixidó J, Martínez-Moreno M, Díaz-Martínez M, Sevilla-Movilla S. The good and bad faces of the CXCR4 chemokine receptor. *Int J Biochem Cell Biol* [Internet]. 2018;95(October 2017):121–31. Available from: <https://doi.org/10.1016/j.biocel.2017.12.018>
85. Bunget A, Fronie A, Afrem E, Corlan Puşcu D, Manolea H, Rodica Dan A, et al. Microscopic aspects of angiogenesis and lymphangiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *Rom J Morphol Embryol*. 2013;54(3):623–7.
86. Albert S, Hourseau M, Halimi C, Serova M, Descatoire V, Barry B, et al. Prognostic value of the chemokine receptor CXCR4 and epithelial-to-mesenchymal transition in patients with squamous cell carcinoma of the mobile tongue. *Oral Oncol* [Internet]. 2012;48(12):1263–71. Available from: <http://linkinghub.elsevier.com/retrieve/pii/S1368837512002084>
87. Baumeister P, Welz C, Jacobi C, Reiter M. Is Perineural Invasion of Head and Neck Squamous Cell Carcinomas Linked to Tobacco Consumption? *Otolaryngol Neck Surg* [Internet]. 2018;19459981775035. Available from: <http://journals.sagepub.com/doi/10.1177/0194599817750354>
88. Chatzistefanou I, Lubek J, Markou K, Ord RA. The role of perineural invasion in treatment decisions for oral cancer patients: A review of the literature. *J Cranio-Maxillofacial Surg* [Internet]. 2017;45(6):821–5. Available from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcms.2017.02.022>
89. Zhang S, Qi L, Li M, Zhang D, Xu S, Wang N, et al. Chemokine CXCL12 and its receptor CXCR4 expression are associated with perineural invasion of prostate cancer. *J Exp Clin Cancer Res*. 2008 Nov;27:62.

90. Jiang Y-M, Li G, Sun B-C, Zhao X-L, Zhou Z-K. Study on the relationship between CXCR4 expression and perineural invasion in pancreatic cancer. *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014;15(12):4893–6.
91. Jeong W-J, Choi IJ, Park M-W, An S-Y, Jeon E-H, Paik JH, et al. CXCR4 antagonist inhibits perineural invasion of adenoid cystic carcinoma. *J Clin Pathol*. 2014;67(11):992–8.
92. Kumar, M; Nanavati, R; Modi TDC. Oral cancer : Etiology and risk factors : A review. 2016;12(2).
93. Zhou X, He L, Hou G, Jiang B, Wang Y, Li Z. Clinicopathological significance of CXCR4 in non-small cell lung cancer. *Drug Des Devel Ther* [Internet]. 2015;9:1349–58. Available from: <http://www.dovepress.com/clinicopathological-significance-of-cxcr4-in-non-small-cell-lung-cancer-peer-reviewed-article-DDDT>
94. Zhao H, Guo L, Zhao H, Zhao J, Weng H, Zhao B, et al. CXCR4 over-expression and survival in cancer: A system review and meta-analysis. *Oncotarget*. 2015;6(7):5022–40.
95. Jung SJ, Kim C Il, Park CH, Chang HS, Kim BH, Choi MS, et al. Correlation between Chemokine Receptor CXCR4 Expression and Prognostic Factors in Patients with Prostate Cancer. *Korean J Urol*. 2011 Sep;52(9):607–11.
96. Epstein RJ. The CXCL12-CXCR4 chemotactic pathway as a target of adjuvant breast cancer therapies. Vol. 4, *Nature reviews. Cancer*. England; 2004. p. 901–9.

APÊNDICE A – Tabela contendo os dados clínicos dos pacientes que participaram dessa pesquisa

Casos	Sexo	Idade	Tamanho	Nódulo	Metastase	Local	Tabagismo	Etilismo	Gradação histológica	Marcação CXCR4	Data da entrevista	Data da cirurgia	Data do acompanhamento	Data do óbito	Causa do óbito
CP1/0005	M	49	4	1	0	lingua	Sim, ainda fuma	So no passado	bem diferenciado	0	17/10/2002	21/10/2002	sd	29/04/2005	Outra causa
CP1/0010	M	49	4	1	0	lingua, rebordo	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	bem diferenciado	1	04/01/2003	07/01/2003	01/07/2014	sd	sd
CP1/0020	M	37	4	2B	0	lingua	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	pucio diferenciado	N	10/02/2003	11/02/2003	sd	07/06/2008	Obito pela Neoplasia
CP1/0021	M	43	3	0	0	lingua, rebordo	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	bem diferenciado	1	17/02/2003	18/02/2003	03/03/2015	sd	sd
CP1/0024	F	48	1	0	0	lingua	Sim, ainda fuma	Nunca	bem diferenciado	1	04/03/2003	05/03/2003	14/06/2011	sd	sd
CP1/0030	M	46	4	2B	0	lingua, rebordo	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	bem diferenciado	1	25/03/2003	25/03/2003	sd	14/03/2004	Obito pela Neoplasia
CP1/0031	M	50	3	0	0	lingua	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	bem diferenciado	0	25/03/2003	26/03/2003	sd	21/07/2003	Outra causa
CP1/0032	M	64	4	2C	0	lingua, rebordo	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	pouco diferenciado	0	27/03/2003	28/03/2003	sd	11/07/2006	Obito pela Neoplasia
CP1/0034	M	52	4	2B	0	lingua	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	bem diferenciado	1	01/04/2003	02/04/2003	sd	09/12/2003	Obito pela Neoplasia
CP1/0035	M	57	4	1	0	lingua, orofaringe	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	bem diferenciado	1	04/04/2003	04/04/2003	sd	03/05/2004	Obito pela Neoplasia
CP1/0039	M	44	4	2B	0	lingua	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	pouco difrenciado	0	06/05/2003	07/05/2003	sd	28/03/2004	Obito pela Neoplasia
CP1/0040	M	48	4	0	0	lingua	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	bem diferenciado	0	06/05/2003	07/05/2003	sd	27/02/2005	Obito pela Neoplasia
CP1/0045	M	53	3	0	0	rebordo	Sim, ainda fuma	So no passado	bem diferenciado	1	25/05/2003	26/05/2003	26/03/2013	sd	sd
CP1/0050	M	42	4	2C	0	lingua, rebordo	Sim, ainda fuma	So no passado	bem diferenciado	1	12/07/2003	13/06/2003	10/11/2011	sd	sd
CP1/0051	M	62	2	0	0	lingua	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	bem diferenciado	1	18/06/2003	18/06/2003	24/07/2014	sd	sd
CP1/0053	M	52	2	0	0	lingua	Somente no passado	So no passado	pouco diferenciado	0	30/06/2003	30/06/2003	sd	12/09/2007	Obito pela Neoplasia
CP1/0055	M	56	4	2B	0	lingua	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	bem diferenciado	1	08/07/2003	09/07/2003	sd	05/01/2005	Obito pela Neoplasia
CP1/0057	M	57	4	2B	0	lingua	Sim, ainda fuma	So no passado	bem diferenciado	1	21/07/2003	21/07/2003	sd	16/09/2003	Outra causa
CP1/0070	F	48	4	1	0	lingua, rebordo	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	pouco diferenciado	1	25/08/2003	26/08/2003	sd	11/04/2005	Obito pela Neoplasia
CP1/0075	M	54	3	0	0	lingua, rebordo	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	bem diferenciado	1	17/09/2003	16/09/2003	sd	29/08/2009	Obito pela Neoplasia
CP1/0079	M	53	4	2B	0	lingua, orofaringe	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	bem diferenciado	1	28/09/2003	29/09/2003	sd	02/07/2005	Obito pela Neoplasia
CP1/0083	M	72	2	0	0	lingua	Somente no passado	So no passado	bem diferenciado	1	09/10/2003	10/10/2003	20/12/2012	sd	sd
CP1/0090	M	73	1	0	0	lingua	Somente no passado	So no passado	bem diferenciado	1	28/10/2003	28/10/2003	sd	16/06/2005	Obito pela Neoplasia
CP1/0206	M	46	4	3	0	lingua, rebordo	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	bem diferenciado	1	27/06/2004	29/06/2004	sd	29/10/2004	Outra causa

Casos	Sexo	Idade	Tamanho	Nódulo	Metastase	Local	Tabagismo	Etilismo	Gradação histológica	Marcação CXCR4	Data da entrevista	Data da cirurgia	Data do acompanhamento	Data do óbito	Causa do óbito
CP1/0212	M	69	4	0	0	lingua	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	bem diferenciado	1	09/08/2004	11/08/2004	sd	17/03/2012	Outra causa
CP1/0213	M	68	4	1	0	lingua, rebordo	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	pouco diferenciado	1	09/08/2004	10/08/2004	06/07/2012	sd	sd
CP1/0230	M	63	4	2C	0	lingua	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	pouco diferenciado	1	04/10/2004	06/10/2004	sd	19/02/2005	Obito pela Neoplasia
CP1/0240	M	75	2	0	0	lingua	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	bem diferenciado	N	14/04/2005	15/04/2005	21/12/2012	sd	sd
CP1/0253	M	53	4	2C	0	lingua, rebordo	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	bem diferenciado	0	19/12/2005	11/04/2005	sd	17/02/2006	Obito pela Neoplasia
CP1/0254	F	49	2	0	0	lingua	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	bem diferenciado	1	18/04/2005	19/04/2005	sd	15/07/2010	Obito pela Neoplasia
CP1/0255	M	50	2	0	0	lingua	Somente no passado	Sim, ainda bebe	bem diferenciado	0	02/05/2005	02/05/2005	11/02/2010	sd	sd
CP1/0261	M	53	4	1	0	lingua	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	bem diferenciado	1	25/06/2005	27/06/2005	sd	24/07/2006	Outra causa
CP1/0300	M	59	4	0	0	lingua, rebordo	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	pouco diferenciado	1	29/01/2006	30/01/2006	sd	02/01/2011	Outra causa
CP1/0305	sd	71	1	0	0	sd	Sim, ainda fuma	So no passado	bem diferenciado	1	18/02/2006	20/02/2006	sd	07/11/2006	Obito pela Neoplasia
CP1/0337	M	72	2	0	0	lingua	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	bem diferenciado	0	24/07/2006	26/07/2006	20/10/2009	sd	sd
CP1/0340	M	51	4	0	0	lingua, labio	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	pouco diferenciado	1	01/08/2006	02/08/2006	sd	14/01/2007	Obito pela Neoplasia
CP1/0346	sd	54	4	2B	0	sd	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	pouco diferenciado	0	23/08/2006	25/08/2006	sd	27/11/2006	Obito pela Neoplasia
CP1/0349	F	65	1	0	0	lingua, rebordo	Sim, ainda fuma	Nunca	bem diferenciado	N	23/02/2007	04/09/2006	27/03/2012	sd	sd
CP1/0362	M	56	4	2C	0	lingua, orofaringe	Somente no passado	Sim, ainda bebe	pouco diferenciado	1	09/02/2007	06/11/2006	sd	17/05/2007	Obito pela Neoplasia
CP1/0363	M	64	2	2C	0	lingua	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	pouco diferenciado	N	01/12/2006	04/12/2006	28/08/2014	sd	sd
CP1/0371	M	58	4	1	0	lingua	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	bem diferenciado	1	08/03/2007	09/03/2007	sd	09/12/2008	Outra causa
CP1/0376	M	56	4	2C	0	sd	Somente no passado	So no passado	bem diferenciado	1	25/04/2007	27/04/2007	30/11/2012	sd	sd
CP1/0378	M	60	4	2B	0	lingua, rebordo	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	bem diferenciado	1	30/04/2007	04/05/2007	sd	15/05/2015	Obito pela Neoplasia
CP1/0387	M	58	4	2C	0	sd	Somente no passado	So no passado	bem diferenciado	1	13/06/2007	15/06/2007	sd	04/07/2009	Obito pela Neoplasia
CP1/0397	M	59	1	3	0	lingua	Somente no passado	So no passado	pouco diferenciado	1	12/09/2007	14/09/2007	sd	26/10/2008	Obito pela Neoplasia
CP1/0436	M	56	4	2C	0	lingua	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	pouco diferenciado	N	07/09/2008	09/09/2008	sd	26/10/2009	Obito pela Neoplasia
CP1/0439	sd	57	2	0	0	laringe	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	pouco diferenciado	0	03/10/2008	03/10/2008	sd	02/11/2010	Outra causa

Casos	Sexo	Idade	Tamanho	Nódulo	Metastase	Local	Tabagismo	Etilismo	Gradação histológica	Marcação CXCR4	Data da entrevista	Data da cirurgia	Data do acompanhamento	Data do óbito	Causa do óbito
CP1/0442	M	55	2	0	0	lingua	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	bem diferenciado	0	09/11/2008	10/11/2008	sd	26/11/2011	Obito pela Neoplasia
CP1/0450	M	45	2	2B	0	lingua	Sim, ainda fuma	So no passado	bem diferenciado	0	09/05/2009	11/05/2009	sd	17/07/2011	Outra causa
CP1/0453	M	41	3	2C	0	lingua	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	pouco diferenciado	1	28/03/2009	30/03/2009	sd	24/05/2010	Obito pela Neoplasia
CP1/0456	M	82	3	0	0	lingua	Somente no passado	So no passado	bem diferenciado	0	04/04/2009	06/04/2009	15/01/2013	sd	sd
CP1/0462	M	66	1	0	0	lingua	Sim, ainda fuma	sd	pouco diferenciado	0	15/11/2008	17/11/2008	23/04/2015	sd	sd
CP3/0008	M	54	1	0	0	assoalho	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	bem diferenciado	1	05/09/2002	06/09/2002	23/09/2014	sd	sd
CP3/0015	M	57	4	2C	0	lingua, assoalho	Somente no passado	So no passado	bem diferenciado	1	03/10/2002	04/10/2002	sd	5/8/2013	Obito pela Neoplasia
CP3/0029	M	50	2	0	0	lingua, assoalho	Somente no passado	So no passado	bem diferenciado	1	12/11/2002	14/11/2002	06/11/2006	sd	sd
CP3/0120	F	46	2	0	0	lingua	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	bem diferenciado	1	17/09/2003	18/09/2003	sd	5/22/2006	Obito pela Neoplasia
CP3/0138	M	75	2	0	0	assoalho	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	pouco diferenciado	1	19/11/2003	27/11/2003	12/11/2013	sd	sd
CP3/0166	M	54	1	0	0	assoalho	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	bem diferenciado	1	sd	sd	sd	sd	sd
CP3/0172	M	55	4	2C	0	assoalho	Sim, ainda fuma	So no passado	bem diferenciado	1	01/04/2004	02/04/2004	01/07/2005	sd	sd
CP3/0175	M	53	4	0	0	assoalho	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	bem diferenciado	1	20/11/2002	21/11/2002	sd	5/5/2005	Obito pela Neoplasia
CP3/0182	M	54	4	1	0	assoalho	Sim, ainda fuma	So no passado	pouco diferenciado	0	02/06/2004	03/06/2004	sd	sd	sd
CP3/0187	M	59	2	0	0	assoalho	Somente no passado	So no passado	sd	1	06/07/2004	07/07/2004	21/01/2014	sd	sd
CP3/0192	M	51	2	0	0	assoalho	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	pouco diferenciado	1	27/07/2004	28/07/2004	sd	3/29/2008	Obito pela Neoplasia
CP3/0234	M	55	4	1	0	assoalho	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	pouco diferenciado	1	21/02/2005	22/02/2005	sd	8/15/2006	Obito pela Neoplasia
CP3/0318	M	69	3	2C	sd	lingua	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	pouco diferenciado	1	17/02/2006	20/02/2006	sd	4/11/2006	Outra causa
CP3/0321	M	69	4	2C	sd	lingua, assoalho	Somente no passado	So no passado	pouco diferenciado	1	02/03/2006	06/03/2006	sd	2/6/2007	Obito pela Neoplasia
CP3/0346	M	56	4A	2B	sd	lingua, assoalho	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	sd	1	04/05/2006	18/05/2006	15/10/2013	sd	sd
CP3/0349	M	59	4A	2B	sd	lingua, assoalho	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	bem diferenciado	1	23/05/2006	01/06/2006	sd	12/1/2006	Obito pela Neoplasia
CP3/0356	M	56	4A	3	sd	lingua, assoalho	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	pouco diferenciado	1	sd	sd	sd	sd	sd
CP3/0364	M	65	4	1	0	sd	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	bem diferenciado	1	sd	sd	sd	sd	sd

Casos	Sexo	Idade	Tamanho	Nódulo	Metastase	Local	Tabagismo	Etilismo	Gradação histológica	Marcação CXCR4	Data da entrevista	Data da cirurgia	Data do acompanhamento	Data do óbito	Causa do óbito
CP3/0401	M	54	4	2B	0	sd	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	pouco diferenciado	1	sd	sd	sd	sd	sd
CP3/0412	F	53	4A	1	sd	assoalho	Sim, ainda fuma	So no passado	bem diferenciado	1	29/11/2006	30/11/2006	24/10/2007	sd	sd
CP3/0443	M	51	2	0	sd	assoalho	Sim, ainda fuma	So no passado	bem diferenciado	0	12/04/2007	04/10/2011	sd	sd	sd
CP3/0448	M	53	4	2B	0	sd	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	pouco diferenciado	1	sd	sd	sd	sd	sd
CP3/0455	M	59	4A	1	sd	assoalho	Somente no passado	Sim, ainda bebe	bem diferenciado	1	29/05/2007	31/05/2007	sd	sd	Obito pela Neoplasia
CP3/0508	M	88	4	0	0	sd	somente no passado	sim, ainda bebe	bem diferenciado	1	sd	sd	sd	sd	sd
CP3/0513	M	49	4	3	0	sd	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	bem diferenciado	1	sd	sd	sd	sd	sd
CP3/0548	M	47	2	2B	sd	lingua, assoalho, orofaringe	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	bem diferenciado	1	26/03/2008	29/05/2008	09/04/2013	sd	sd
CP3/0550	M	74	sd	sd	sd	sd	somente no passado	Sim, ainda bebe	bem diferenciado	1	sd	sd	sd	sd	sd
CP3/0634	M	59	3	2C	sd	assoalho	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	bem diferenciado	1	05/02/2009	09/02/2009	22/01/2013	sd	sd
CP3/0652	M	63	1	1	sd	assoalho	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	bem diferenciado	1	18/03/2009	19/03/2009	09/04/2013	sd	sd
CP3/0662	M	61	sd	sd	sd	sd	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	bem diferenciado	1	sd	sd	sd	sd	sd
CP3/0663	M	60	2	1	0	sd	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	bem diferenciado	1	sd	sd	sd	sd	sd
CP3/0676	M	52	4A	2B	0	assoalho	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	pouco diferenciado	1	sd	sd	sd	sd	sd
CP3/0686	F	68	1	2B	sd	lingua	Sim, ainda fuma	So no passado	bem diferenciado	1	03/06/2009	04/06/2009	22/06/2010	sd	sd
CP3/0708	M	55	2	0	sd	assoalho	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	bem diferenciado	1	28/07/2009	10/08/2009	15/10/2012	sd	sd
CP3/0709	M	64	2	2B	sd	lingua	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	bem diferenciado	1	26/07/2009	28/07/2009	sd	sd	sd
CP3/0718	M	59	2	0	X	lingua	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	pouco diferenciado	1	21/08/2009	20/08/2009	sd	4/5/2011	sd
CP3/0732	M	65	4A	0	X	lingua, assoalho	Somente no passado	Sim, ainda bebe	pouco diferenciado	0	25/09/2009	28/09/2009	sd	8/31/2011	sd
CP3/0737	M	52	4A	2B	sd	lingua, assoalho	Sim, ainda fuma	So no passado	bem diferenciado	1	07/10/2009	13/10/2009	25/05/2010	sd	sd
CP3/0738	M	71	4A	2C	X	assoalho	Somente no passado	So no passado	bem diferenciado	1	07/10/2009	08/10/2009	sd	2/17/2010	sd
CP3/0773	M	51	4A	2B	0	sd	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	pouco diferenciado	1	sd	sd	sd	sd	sd
CP3/0780	M	56	2	2B	X	lingua, orofaringe	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	bem diferenciado	1	26/03/2010	22/03/2010	sd	sd	sd
CP3/400	M	61	4	2B	0	sd	Sim, ainda fuma	Sim, ainda bebe	pouco diferenciado	0	sd	sd	sd	sd	sd

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética

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

PARECER Nº. 128/2012

Registro CONEP 16491 (Este nº deve ser citado nas correspondências referentes a este projeto)

Folha de Rosto: 405501

Processo nº 25000.084206/2011-76

Projeto de Pesquisa: *"Fatores ambientais, clínicos, histopatológicos e moleculares associados ao desenvolvimento e ao prognóstico de carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço"* (GENCAPO Fase II).

Pesquisador Responsável: Dra. Eloiza Helena Tajara da Silva

Instituição: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto/SP (1º CENTRO)

CEP de origem: Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP/SP)

Área Temática Especial: Genética Humana, Biossegurança, Pesquisa com Cooperação Estrangeira

Patrocinador: Fundação de Amparo a Pesquisa do Estado de São Paulo.

Sumário geral do protocolo

Sob a denominação de câncer de cabeça e pescoço incluem-se as neoplasias que surgem na cavidade oral, faringe e laringe, sendo a maioria do tipo histológico espinocelular. Mundialmente, constitui o sexto tipo de câncer mais comum, compreendendo cerca de 6% dentre todos os tipos de câncer. Acima de 500.000 casos novos e cerca de 300.000 óbitos por tumores de cabeça e pescoço são estimados por ano. No Brasil, mais de 14 mil casos novos são estimados para 2010, considerando apenas os tumores de cavidade oral, e as taxas de incidência previstas correspondem a 22,1 e 3,3/100.000 para homens e mulheres, respectivamente.

Os principais fatores de risco para o carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (CECP) são o tabagismo e o consumo de bebidas alcoólicas. Existem evidências de um aumento de risco para os fumantes da ordem de três a quatro vezes para o câncer da cavidade oral e faringe e de dez vezes para o câncer de laringe. O risco conferido pelo álcool também é significativo - o consumo de 50 gramas por dia traduz-se em aumento de aproximadamente três vezes quanto ao risco de câncer de cavidade oral e faringe e de cerca de duas vezes para o risco de câncer de laringe. Juntos, tabaco e álcool são responsáveis por aproximadamente 51% dos tumores de cabeça e pescoço nos Estados Unidos da América, 84% na Europa e 83% na América Latina. O impacto do efeito combinado de tabaco (cigarros/dia) e álcool (bebidas/semana) é maior que a soma dos seus efeitos individuais e excede um efeito multiplicador sobre o risco de câncer de cabeça e pescoço.

Outros fatores de risco para esses tumores incluem a ingestão de mate quente (chimarrão), baixa ingestão de frutas e vegetais e infecção por HPV. Várias circunstâncias profissionais e exposição a carcinógenos nos locais de trabalho, tais como manufatura de isopropanol e exposição a névoas contendo ácido sulfúrico e gás mostarda, são fatores de risco suspeitos para o câncer de laringe. Outros possíveis fatores de risco incluem tabagismo involuntário, histórico sexual, uso de maconha, má higiene bucal, história familiar de câncer de cabeça e pescoço, baixo status socioeconômico e baixo índice de massa corporal.

O CECP é uma das neoplasias mais frequentes no Brasil. Seu prognóstico é ainda limitado e a taxa de sobrevida em cinco anos é baixa. São poucos os estudos de cunho etiológico no Brasil com tamanhos de amostra suficientemente grandes para avaliar simultaneamente múltiplos fatores de risco para o CECP e que permitam estratificações agregando casos e controles para análises específicas. Ou seja, estudos em grande escala, de seguimento de pacientes com CECP, que permitam avaliar simultaneamente o papel do HPV, fatores ambientais, clínicos, histopatológicos, moleculares e a terapêutica utilizada na sobrevida de pacientes e no desenvolvimento do tumor primário não estão disponíveis no Brasil.

Segundo os proponentes, a organização de uma coorte de pacientes com seguimento apropriado após o diagnóstico (com entrevistas periódicas e coleta de sangue) permitirá uma abordagem única para avaliação do papel dos fatores relacionados aos hábitos de vida sobre o prognóstico da doença e a ocorrência de segundo câncer primário, ajudando a identificar marcadores precoces de recrudescimento e outros eventos morbidos.

A variação geográfica na associação entre HPV e risco de CECP, bem como o papel do HPV na sobrevida de pacientes, devem ser investigados. A organização proposta no projeto em tela no âmbito do Estado de São Paulo e sua ampliação para outras regiões do país, no contexto do projeto InterCHANGE, permitirá tais avaliações.

A estimativa da probabilidade de sucesso de tratamento, complicações e morbidade é essencial para tomadas de decisão clínica e para o aconselhamento de pacientes com CECP. Entretanto, existem poucas opções para cálculo dessa estimativa e o método mais frequentemente utilizado tem como base a experiência, objetiva e subjetiva, do médico. Uma alternativa constitui a probabilidade média de desfechos, mas que não considera as características individuais e não permite avaliação personalizada. Tratamentos mais agressivos são propostos para casos de alto risco, embora os limites entre os níveis de risco não sejam nítidos atualmente. Existe, portanto, a necessidade de definir mais claramente tais limites.

Objetivos: O presente projeto tem como objetivo geral identificar fatores ligados ao estilo de vida, infecção por HPV, bem como perfis de expressão gênica (tanto miRNAs quanto mRNAs) por sequenciamento em larga escala, fatores clínicos, histopatológicos e moleculares associados ao comportamento biológico de CECP e, após integração dos dados obtidos, desenvolver uma ferramenta preditiva para a determinação do risco individual de eventos morbidos em portadores desses tumores, incluindo metástases linfonodais e hematogênicas, sobrevida geral e livre de doença e ocorrência de segundos tumores primários.

Com base no objetivo geral, foram estabelecidos os seguintes objetivos específicos: Realizar o recrutamento de uma grande série de pacientes com CECP e seus controles, que permita estratificações detalhadas das questões de estudo e garanta resultados precisos e robustos; Avaliar os fatores etiológicos e prognósticos do CECP por meio de informações obtidas por questionário sucinto sobre estilo de vida, tratamento e evolução da doença, aplicado no momento do diagnóstico e em retornos anuais dos pacientes; Avaliar histologicamente amostras de CECP com relação à margem de invasão, infiltração linfática, vascular e neural, relacionando com marcadores biológicos de apoptose, proliferação, hipóxia, potencial metastático, entre outros; Identificar e caracterizar padrões de metilação do DNA associados a eventos morbidos e/ou progressão tumoral de CECP, em genes que exibiram, em estudos prévios do grupo, alterações epigenéticas ou expressão reduzida e ilhas CpG nas sequências regulatórias; Analisar o transcrito de cabeça e pescoço empregando tecnologia de sequenciamento em larga escala para identificar eventos transcricionais associados ao fenótipo de CECP com potencial de predição do risco de eventos morbidos, transcritos de função desconhecida ou resultantes de fusões e deleções gênicas, isoformas alternativas e polimorfismos ou mutações nos transcritos sequenciados; Sequenciar pequenos RNAs,

Cont. Parecer CONEP nº. 128/2012

em particular microRNAs, de amostras de CECP e suas respectivas margens cirúrgicas para identificação de marcadores candidatos com potencial de utilização na análise de plasma, para acompanhamento clínico e/ou avaliação de prognóstico; Analisar o metaboloma e o perfil proteico de carcinomas de cabeça e pescoço, especificamente a fração glicosilada da membrana celular, e identificar eventos relacionados com características clínicas e histopatológicas e com potencial de predição do risco de eventos morbidos; Investigar o papel de marcadores candidatos na tumorigênese, utilizando estudos funcionais *in vitro*, e o seu potencial de utilização em abordagens pouco invasivas, validando transcritos e proteínas diferencialmente expressas no plasma e em tecidos de pacientes; Realizar revisão sistemática da literatura sobre biomarcadores de CECP relacionados a eventos morbidos e extrair um resumo quantitativo de dados publicados, potencialmente úteis para predição de risco individual; e Desenvolver e validar ferramenta de predição do risco individual de eventos morbidos em pacientes com CECP, considerando dados de exposição a agentes ambientais e vírus, e características clínicas, histopatológicas e moleculares desses tumores.

Métodos: Cada centro clínico recrutará uma série de casos de CECP, incluindo tumores da cavidade oral, orofaringe e laringe. Um grupo comparável de controles será recrutado ao mesmo tempo, pareados por frequência com os casos por sexo, faixa etária (5 anos), etnia e área de residência. Os controles hospitalares serão escolhidos de uma lista restrita de doenças e controles visitantes ao hospital também serão aceitáveis. A entrevista de casos e controles será feita por entrevistador treinado por meio de questionário estruturado para obtenção de informações atuais e passadas sobre tabagismo, consumo de bebidas alcoólicas, hábitos alimentares e outros fatores de estilo de vida.

Local de realização

Trata-se de um estudo nacional, multicêntrico, com cooperação estrangeira.

As amostras e dados dos pacientes e controles serão coletados nos seguintes cinco centros clínicos: Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da USP, Hospital Heliópolis, Instituto Arnaldo Vieira de Carvalho, Hospital do Câncer de Barretos e Faculdade de Medicina do ABC. O Grupo de Pesquisas Epidemiológicas em Câncer (GPEC) da Faculdade de Saúde Pública da USP será o centro receptor dos questionários e informações sobre material biológico. O material biológico será processado e armazenado em diferentes centros; os procedimentos de armazenamento para manutenção da qualidade do material biológico serão gerenciados pelo Departamento de Biologia Molecular da FAMERP/SP. Pelo menos metade das amostras de cada indivíduo deverá ser transportada para o biorepositório central (local a ser decidido), após a aprovação dos comitês de ética em cada local (centro). As análises do material biológico serão realizadas nos laboratórios dos pesquisadores principais e associados (listados acima), excetuando a análise de anticorpos para proteínas do HPV, para a qual será contratado o Centro de Pesquisa em Câncer da Alemanha, em Heidelberg, sob supervisão do Dr. Michael Pawlita. A Agência Internacional para Pesquisa do Câncer da Organização Mundial da Saúde (IARC/WHO), nas pessoas de Maria Paula Curado e Paul Brennan, dará apoio logístico futuro ao projeto na sua integração à rede de centros de pesquisa no Brasil e à rede internacional de pesquisa sobre CECP e participarão das análises dos dados epidemiológicos (Anexo "Declaração CONEP").

Apresentação do protocolo

O protocolo foi encaminhado por ofício, acompanhado de duas mídias digitais idênticas, contendo os seguintes documentos: Sumário; Projeto Comitê de Ética SIRP, Pasta de Anexos com: Aprovação do "Estudo Genético e Ambiental Internacional de Câncer de Cabeça e Pescoço - INTERCHANGE - BRASIL (Projeto nr. 09-33) pelo Comitê de Revisão Institucional da IARC, Folha de rosto, Declaração de Aprovação do estudo

pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FAMERP/SP, Cronograma de Execução, Orçamento Financeiro, Lista de Centros Participantes, Parecer consubstanciado de pendências, Resposta às pendências solicitadas pelo CEP, Parecer consubstanciado de aprovação, Endereço do Currículo Lattes/CNPq, Questionário Inicial sobre Hábitos e Estilo de Vida, Formulário de Informações Clínicas (somente para os casos), Formulário para Seguimento (somente para os casos), Folha de Registro para Casos e Controles, Números de Identificação e Etiquetas com Código de Barras, protocolo de Preparação das Amostras de Sangue e Tecidos, Termo de Consentimento Informado para Casos e Controles, Declaração CONEP.

Juntamente ao Recurso ao Parecer CONEP Nº. 611/2011, os seguintes documentos foram apresentados: 1. Solicitação de recurso; 2. Resposta do Pesquisador; 3. Parecer Consubstanciado CEP – Famerp; 4. Folha de Rosto modificada; 5. Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, versão de novembro/2011; 6. Projeto (anexo separado do recurso ao parecer CONEP 611/2011).

Considerações sobre a análise do recurso ao Parecer CONEP Nº. 611/2011, relativo ao projeto de pesquisa em questão:

1. Em declaração de 12 de maio de 2011 (Anexo "Declaração CONEP", página 2), a pesquisadora responsável informa que "O projeto compreende a primeira iniciativa concreta de obtenção de financiamento com o objetivo de organizar no futuro uma rede brasileira sobre câncer de cabeça e pescoço, que se integrará à rede mundial denominada InterCHANGE". Adicionalmente, "O nome InterCHANGE reflete a colaboração que ocorrerá entre vários grupos de diferentes países, envolvidos na pesquisa de aspectos relevantes dos tumores de cabeça e pescoço" (trechos em destaque já grifados no original). Mais à frente, "A etapa citada nesses dois parágrafos, que corresponde ao Estudo Genético e Ambiental Internacional de Câncer de Cabeça e Pescoço (INTERCHANGE - BRASIL), não tem previsão de início e só será desenvolvida após aprovação pela CONEP, em solicitação posterior específica para esse Estudo Internacional". Portanto, fica esclarecido que a análise constante do presente documento não inclui a possível futura integração dos centros brasileiros à rede InterCHANGE.

Resposta: "Reafirmamos que a presente solicitação de parecer para o projeto FAPESP 10/51168-0 não inclui no momento a possível futura integração dos centros brasileiros à rede InterCHANGE. A realização do presente projeto é contributiva para a implementação da rede InterCHANGE, considerando que ele, com os resultados positivos e possíveis dificuldades, servirá de modelo para o delineamento de projetos dos outros grupos que integrarão a rede".

Análise: Os esclarecimentos apresentados estão em acordo com os destaques apontados no Parecer. **Pendência atendida.**

2. A pesquisa em tela não atende à classificação de estudos em Biossegurança do Sistema CEP/CONEP (vide Carta 0213/CONEP/CNS, de 21 de outubro de 2010). Portanto, solicita-se a correspondente retificação da Folha de Rosto.

Resposta: "A Folha de Rosto foi retificada".

Análise: A retificação solicitada na Folha de Rosto foi realizada. **Pendência atendida.**

3. Em decorrência do exposto na página 22/57 do projeto (item 6.5 Tamanho da amostra) ("Considerando-se a média mensal de casos recrutados durante o desenvolvimento do Projeto GENCAPO (Fase I), estima-se que no período de condução deste estudo nos cinco centros clínicos será possível identificar cerca de 1.200 casos novos de tumores de cabeça e pescoço e 1.200 controles de base hospitalar. Deve-se considerar que a esta casuística serão agregados os pacientes incluídos no projeto GENCAPO (Fase I) com disponibilidade de

sangue periférico [...]), verifica-se que o número total de sujeitos previsto na Folha de Rosto (n = 1.000) encontra-se em desacordo. Solicita-se a apresentação dos esclarecimentos cabíveis e/ou retificação. Cabe destacar que esta adequação já havia sido solicitada pelo CEP.

Resposta: "O número correto é 1.200 casos novos de tumores de cabeça e pescoço e 1.200 controles. Este é o número previsto de casos e controles. A Folha de Rosto foi retificada".

Análise: Uma vez que o número total de participantes foi estabelecido em 2.400 (1.200 casos novos de CECP e 1.200 controles), excluiu-se a participação dos "[...] pacientes incluídos no projeto GENCAPO (Fase I) com disponibilidade de sangue periférico", que somam 1422 casos e 541 controles. No entanto, tal afirmação contrapõe-se à resposta apresentada em atendimento à Consideração "5.b" (vide abaixo), na qual se verifica a manutenção da intenção de uso de amostras armazenadas anteriormente. Adicionalmente, a nova Folha de Rosto apresenta a quantia "1.200" no campo "No. de Sujeitos Total", o que denuncia equívoco quanto a este informe específico. Portanto, a alteração realizada na Folha de Rosto não contempla a efetiva casuística prevista pelos pesquisadores. **Pendência não atendida.**

Recurso: "A Folha de Rosto foi retificada: o número total de participantes é 2.400 (1.200 casos de CECP e 1.200 controles, cujos dados e amostras serão coletados prospectivamente). Serão excluídos os pacientes do projeto GENCAPO (Fase I), que somam 1422 casos e 541 controles."

Análise: **Recurso parcialmente atendido.** Em atendimento, a Folha de Rosto retificada foi apresentada. No entanto, os Termos de Compromisso do pesquisador responsável e do responsável pela Instituição proponente, apesar de assinados, não se encontram datados. Ressalta-se que todos os campos da Folha de Rosto devem ser preenchidos, sobretudo os referentes a assinaturas e datas, pois trata-se de um documento que dá consistência jurídica ao projeto. Os compromissos assumidos pelos respectivos responsáveis legais devem estar datados, uma vez que, em momento futuro, estes poderão ser substituídos. Desta forma, procura-se garantir respaldo às partes envolvidas, caso seja necessário. Solicita-se adequação.

4. Em relação aos Termos de Consentimento Informado para Casos e Controles cabem as seguintes considerações:

- a. Os documentos devem ser renomeados como "Termo de Consentimento Livre e Esclarecido", pois esta é a nomenclatura utilizada por determinação das Resoluções pertinentes do Conselho Nacional de Saúde. Solicita-se adequação.

Resposta: "O documento foi renomeado (ver DOCUMENTO 1)".

Análise: A adequação solicitada foi realizada. **Pendência atendida.**

- b. Na página 1/2 (item INTRODUÇÃO) dos Termos se lê: "Você está sendo convidado a participar de um estudo para investigar fatores ambientais e seus efeitos sobre a saúde das pessoas" (não grifado no original). Apesar da palavra "tumor" ser citada em outros pontos do documento, não há menção à condição específica em estudo, qual seja, câncer de cabeça e pescoço. Solicita-se adequação (Resolução CNS 196/96, item IV.1.a).

Resposta: "A condição específica foi acrescentada na linha 2 do item INTRODUÇÃO dos TCLEs".

Análise: A adequação solicitada foi realizada. **Pendência atendida.**

- c. Não consta informe quanto ao envio de amostra para análise no exterior. Uma vez que o sujeito da pesquisa, ou representante legal,

pode considerar esta informação relevante no seu processo decisório, solicita-se adequação (Resolução CNS 196/96, item IV.1.a).

Resposta: "Esta informação foi acrescentada ao TCLE. Ver: linhas 3-5 do item ANÁLISE DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS do TCLE para casos

linhas 2-5 do item ANÁLISE DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS do TCLE para os controles".

Análise: A adequação solicitada foi realizada. **Pendência atendida.**

- d. Na página 1/2 (item ANÁLISE DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS) dos Termos se lê: "Suas amostras serão armazenadas por até 30 anos, para serem utilizadas em investigações genéticas e bioquímicas no presente estudo" (não grifado no original). No entanto, considerando o cronograma da pesquisa, com duração prevista de cinco anos, e o disposto no item 3 da Resolução CNS 347/05 ("O armazenamento poderá ser autorizado pelo período de 5 anos, quando houver aprovação do projeto pelo CEP e, quando for o caso, pela CONEP, podendo haver renovação mediante solicitação da instituição depositária, acompanhada de justificativa e relatório das atividades de pesquisa desenvolvidas com o material"). Solicita-se adequação.

Resposta: "Os TCLEs foram retificados. Ver: linhas 5-7 do item ANÁLISE DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS dos TCLEs".

Análise: O trecho destacado no TCLE original foi substituído por "Suas amostras serão armazenadas por 5 anos, pra serem utilizadas em investigações genéticas e bioquímicas do presente estudo e, caso haja necessidade de prolongar esse tempo, você será chamado para confirmar ou não essa alteração". Ou seja, a adequação solicitada foi realizada. Cabe ressaltar que a extensão de prazo de armazenamento em Biorrepositório não necessita de autorização do sujeito e, sim, do CEP que autorizou a pesquisa (Resolução CNS 441/11, item 12.I). Finalmente, se houver intenção de constituição de um Biobanco, deve-se apresentar o respectivo Protocolo de Desenvolvimento, à luz das disposições contidas na Resolução CNS 441/11 (contém as diretrizes para análise ética de projetos de pesquisas que envolvam armazenamento de material biológico humano ou uso de material armazenado em pesquisas anteriores) para análise pelo Sistema CEP/CONEP. **Pendência atendida.**

- e. Na página 1/2 (item ANÁLISE DE AMOSTRAS BIOLÓGICAS) dos Termos se lê: "Ao concordar em participar da parte de coleta de amostras biológicas deste estudo, você concede agora a autorização para usos futuros dessas amostras que se relacionam com o objetivo do presente estudo" (não grifado no original). No entanto, considerando as diretrizes contidas nos itens III.12 da Resolução CNS 340/04 ("Dados genéticos humanos coletados em pesquisa com determinada finalidade só poderão ser utilizados para outros fins se for obtido o consentimento prévio do indivíduo doador ou seu representante legal [...]") e 6.2.d da Resolução CNS 347/05 ("Os protocolos de pesquisa que pretendam utilizar material armazenado devem incluir: [...] d) TCLE específico para nova pesquisa [...]"), solicita-se adequação. Substituir a autorização imediata para usos futuros prevista no Termo proposto pela autorização para armazenamento com vistas à possível utilização futura, quando nesta situação, salvo por futura dispensa autorizada do CEP, o sujeito será consultado quanto a sua vontade de participar de nova pesquisa.

Resposta: "Qualquer estudo futuro será submetido ao CEP antes de iniciado. Por esse motivo, no item ANÁLISE DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS de ambos os TCLE, a frase a seguir foi retirada: "Qualquer uso futuro das amostras ou estudo de acompanhamento deverá ser aprovado por você ou seu representante e por um comitê de ética".

Análise: A adequação solicitada não foi realizada. A frase "Ao concordar em participar da parte de coleta de amostras biológicas deste estudo, você concede agora a autorização para usos futuros dessas amostras que se relacionam com o objetivo do presente estudo" foi mantida na nova versão dos TCLEs propostos para o estudo. No entanto, uma vez que o referido banco de materiais biológicos humanos não se encontra formatado como um Biobanco e, sim, como um Biorrespositório, a autorização *a priori* de pesquisas futuras não se aplica. Ainda, "O consentimento livre e esclarecido referente à coleta, depósito, armazenamento, utilização e descarte de material biológico humano em Biorrespositório é formalizado por meio de TCLE específico para cada pesquisa, conforme preconizado nas resoluções do Conselho Nacional de Saúde (CNS)" (Resolução CNS 441/2011, item 6).

Pendência não atendida.

Recurso: "No item ANÁLISE DAS AMOSTRAS BIOLÓGICAS de ambos os TCLE, a frase a seguir foi retirada: "Ao concordar em participar da parte de coleta de amostras biológicas deste estudo, o(a) Sr.(a) concede agora a autorização para usos futuros dessas amostras que se relacionam com o objetivo do presente estudo".

No item NOTIFICAÇÃO, CUSTO E COMPENSAÇÃO de ambos os TCLE, a frase "As amostras biológicas obtidas serão utilizadas apenas para fins de investigação. Qualquer material que não seja imediatamente utilizado continuará a ser armazenado para ser utilizado no futuro para ajudar os cientistas a aprender mais sobre as relações entre meio ambiente, alterações genéticas e saúde" foi modificada para: "As amostras biológicas obtidas serão utilizadas apenas para fins de investigação e para ajudar os cientistas a aprender mais sobre as relações entre meio ambiente, alterações genéticas e saúde".

Análise: Em atendimento, foram apresentadas novas versões ("Novembro 2011") dos TCLEs do estudo. As alterações efetuadas contemplam os esclarecimentos e garantias necessárias apontadas nos pareceres anteriores. **Recurso atendido.**

- f. Na página 1/2 (item NOTIFICAÇÃO, CUSTO E COMPENSAÇÃO) dos Termos se lê: "Os resultados da pesquisa não são adequados para uso em testes clínicos, como parte de seu atendimento médico. Portanto, os resultados desses estudos não estarão disponíveis para você" (não grifado no original). No entanto, conforme dispõe o item V.1.d da Resolução CNS 340/2004, deve ser ofertado e garantido ao sujeito a opção de tomar ou não conhecimento sobre as informações geradas a partir do seu material biológico cedido para a pesquisa. Solicita-se adequação. Cabe destacar que esta adequação já havia sido solicitada pelo CEP.

Resposta: "O TCLE foi retificado com a informação: ..."mas esses resultados estarão disponíveis para o(a) Sr.(a)". Ver: linhas 5 do item NOTIFICAÇÃO, CUSTO E COMPENSAÇÃO do TCLE para casos

linhas 4-5 do item NOTIFICAÇÃO, CUSTO E COMPENSAÇÃO do TCLE para os controles".

Análise: A adequação solicitada foi realizada. **Pendência atendida.**

- g. Na página 2/2 (item BENEFÍCIOS POTENCIAIS) dos Termos se lê: "Não haverá benefícios diretos para você que não a satisfação de participar desta pesquisa para o possível benefício das gerações futuras. Sua participação é muito importante para o sucesso desta pesquisa científica" (não grifado no original). No entanto, a frase destacada pode induzir o sujeito a participar da pesquisa, uma vez que coloca sobre o indivíduo a pressão pelo alcance do sucesso do estudo. Solicita-se, portanto, que o trecho destacado seja retirado dos Termos.

Resposta: "A frase destacada foi retirada dos TCLEs".

Análise: A adequação solicitada foi realizada. **Pendência atendida.**

- h. Conforme preconizado nos itens IV.1.i e V.6 da Resolução CNS 196/96, além do direito à assistência integral, os sujeitos da pesquisa têm direito à indenização, em caso de danos previstos ou não. Portanto, solicita-se adequar os Termos com a inclusão, de modo claro e afirmativo, da garantia à indenização, em caso de danos decorrentes da participação na pesquisa.

Resposta: "Os TCLEs foram retificados. Ver:

linhas 4-6 do item DESCONFORTO E RISCOS POTENCIAIS dos TCLEs".

Análise: Em atendimento, a seguinte frase "Se estes danos ocorrerem, você será imediatamente tratado pelos profissionais do hospital" foi substituída por "Se estes danos ou outros danos ocorrerem resultantes de sua participação no estudo, você será imediatamente tratado pelos profissionais do hospital e terá assistência integral" (item DESCONFORTO E RISCOS POTENCIAIS). Percebe-se, portanto, que a garantia à indenização não foi incluída, apesar de claramente indicada no Parecer. Cabe, então, destacar o disposto no item V.7 da Resolução CNS 196/96: "Jamais poderá ser exigido do sujeito da pesquisa, sob qualquer argumento, renúncia ao direito à indenização por dano. O formulário do consentimento livre e esclarecido não deve conter nenhuma ressalva que afaste essa responsabilidade ou que implique ao sujeito da pesquisa abrir mão de seus direitos legais, incluindo o direito de procurar obter indenização por danos eventuais". Portanto, considera-se que a pendência "4.h" não foi resolvida. **Pendência não atendida.**

Recurso: "Os TCLEs foram retificados. Ver: linhas 4-6 do item DESCONFORTO E RISCOS POTENCIAIS dos TCLEs: "Se estes danos ou outros danos ocorrerem resultantes de sua participação no estudo, você será imediatamente tratado pelos profissionais do hospital, terá assistência integral, bem como manterá seus direitos legais, incluindo o direito de procurar obter indenização por danos eventuais".".

Análise: A inclusão da garantia à indenização em caso de danos relativos à pesquisa foi realizada nas novas versões dos TCLE do estudo. **Recurso atendido.**

- i. Não foram apresentadas as formas de contato com o CEP responsável pelo acompanhamento do estudo, que poderá ser questionado em caso de denúncia ou dúvidas relativas à eticidade da pesquisa. Solicita-se que sejam acrescentados aos Termos o telefone e o endereço do CEP, assim como uma breve descrição do seu papel. Cabe destacar que esta adequação já havia sido solicitada pelo CEP.

Resposta: "Foram acrescentados os endereços e os telefones do responsável pelo acompanhamento do estudo e do CEP da Instituição".

Análise: A adequação solicitada foi realizada. **Pendência atendida.**

5. Em diferentes pontos do projeto é declarada a intenção de uso de amostras armazenadas no contexto de pesquisa anterior (p. ex., "[...] a esta casuística serão agregados os pacientes incluídos no projeto GENCAPO (Fase I) com disponibilidade de sangue periférico (1422 casos e 541 controles), tomando a amostra disponível para análise mais robusta" / página 22/57; e "O presente projeto também utilizará amostras já coletadas pelo temático FAPESP (04/12054-9) / página 42/57)" (grifos nossos). Portanto, solicita-se a apresentação de:

- a. Cópia do TCLE utilizado quando da pesquisa em que o material biológico foi colhido e armazenado, em atendimento ao disposto no item 6.2.c da Resolução CNS 347/05.

Resposta: "O TCLE do projeto GENCAPO (Fase I), projeto FAPESP 04/12054-9 é apresentado como DOCUMENTO 2".

Análise: A solicitação indicada foi atendida. **Pendência atendida.**

- b. Modelo de TCLE, específico para a pesquisa em tela, destinado aos sujeitos cujas amostras já se encontram armazenadas ou a justificativa para dispensa de obtenção do consentimento individual, em atendimento ao disposto no item 6.2.d da Resolução CNS 347/05. A declaração à página 42/57, item 8. PROCEDIMENTOS ÉTICOS, "Como novos objetivos e tipos de processamento de amostras foram acrescentados, cada centro local tentará obter dos pacientes novo TCLE específico" não é considerada suficiente.

Resposta: "No momento de inclusão das amostras armazenadas e, portanto, após aprovação dos protocolos da pesquisa em tela pela CONEP, faremos uma emenda com solicitação de isenção de TCLE para o CEP da instituição, com apresentação dos locais do projeto modificados e justificativas para dispensa de obtenção do consentimento individual".

Análise: O conteúdo da emenda mencionada deveria ter sido apresentado à análise ética como parte integrante do projeto em tramitação. Portanto, considera-se que a pendência "5.b" não foi solucionada adequadamente. **Pendência não atendida.**

Recurso: "Resposta ao Parecer CONEP 611/2011: Considerando que serão excluídos os pacientes do projeto GENCAPO Fase I (1422 casos e 541 controles), não apresentaremos emenda para análise.

Salientamos que as frases abaixo foram retiradas do projeto:

Página 5, última frase do item 1: "Deve-se destacar que muitas das análises propostas a serem conduzidas no escopo do presente projeto (GENCAPO Fase II) devem integrar as informações já disponíveis no GENCAPO (Fase I).

Página 22, item 6.5: "Deve-se considerar que a esta casuística serão agregados os pacientes incluídos no projeto GENCAPO (Fase I) com disponibilidade de sangue periférico (1422 casos e 541 controles), tornando a amostra disponível para análise mais robusta. Essas amostras serão utilizadas após a obtenção do consentimento do indivíduo doador ou de seu representante legal para uso futuro ou após obtenção do CEP/CONEP para dispensa do TECL nos casos com justificativa de impossibilidade de contato (doador falecido, tentativas de contato sem sucesso ou outros). Considere-se também que há intenção

de juntar esses casos e controles aos de outros estudos no Brasil e internacionais para ampliar o poder do estudo."

Página 39, item 6.21.1: "Os dados gerados pela presente proposta serão integrados aos dados do GENCAPO Fase I, buscando garantir maior poder estatístico."

Página 42, item 8: "O presente projeto também utilizará amostras já coletadas pelo temático FAPESP (04/12054-9), das quais arquivou o termo de consentimento para sua utilização em pesquisa de biomarcadores de CECs. Como novos objetivos e tipos de processamento de amostras foram acrescentados, cada centro local tentará obter dos pacientes novo TCLE específico. Nos casos de impossibilidade de contato, a aprovação para realização do estudo dessas amostras será solicitada aos comitês de ética de cada instituição."

Análise: Conforme exposto, os proponentes do estudo em tela decidiram pela não utilização das amostras coletadas no contexto do projeto GENCAPO Fase I, dispensando-se, portanto, a apresentação do modelo de TCLE específico e da emenda mencionados nos pareceres anteriores. **Recurso atendido.**

6. Conforme informado à página 27/57 (item 6.12 HPV), ao menos 100 µL de plasma serão necessários para a análise de anticorpos para proteínas do HPV, a ser realizada no DKFZ (Centro de Pesquisas em Câncer de Heidelberg, Alemanha), sob a supervisão do Dr. Michael Pawlita. Portanto, em atendimento ao disposto no item VII.5 da Resolução CNS 292/99, solicita-se a apresentação de declaração do colaborador alemão quanto ao uso do material biológico e dos dados e informações coletados exclusivamente para os fins previstos no protocolo.

Resposta: "O documento é apresentado no DOCUMENTO 3".

Análise: A solicitação indicada na Consideração "6" foi atendida. **Pendência atendida.**

7. Segundo o Cronograma apresentado (Anexo 12), a coleta de amostras e dados de pacientes teria início no primeiro mês de 2011. Solicita-se esclarecer se a pesquisa já teria iniciado e, em caso negativo, a apresentação de cronograma atualizado.

Resposta: "A pesquisa ainda não foi iniciada. O novo cronograma é apresentado no DOCUMENTO 4".

Análise: Foi apresentado novo cronograma referente às atividades relativas ao ano em curso, com previsão de inclusão de sujeitos de pesquisa a partir de setembro. O cronograma referente ao período 2012 a 2015 não foi reapresentado, do que se depreende que não tenha sido alterado. Consta compromisso com início somente após a aprovação do projeto pela CONEP.

Pendência atendida.

Diante do exposto, a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 196/96, manifesta-se pela aprovação do projeto de pesquisa proposto, devendo o CEP verificar o cumprimento da questão 03 acima, antes do início do estudo.

Situação: **Protocolo aprovado com recomendação.**

OBS: No Brasil, além da Faculdade de Medicina de São José do Rio Preto (FAMERP/SP) informa-se a participação dos seguintes centros: Fundação PIO XII, Hospital de Câncer de Barretos/SP (André Lopes Carvalho/Comitê de Ética em Pesquisa -

Cont. Parecer CONEP nº. 128/2012

CEP da Fundação Pio XII); Centro Internacional de Pesquisa e Ensino do Hospital AC Camargo/SP (Emmanuel Dias-Neto/Comitê de Ética em Pesquisa - CEP do Hospital AC Camargo); Faculdade de Odontologia da USP/SP (Fábio Daumas Nunes/Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da USP); Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, USP, SP (José Eduardo Levi/Comissão de Ética em Pesquisa do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo); Instituto Ludwig de Pesquisa sobre o Câncer/SP (Luisa Lina Villa/Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Alemão Oswaldo Cruz); Hospital Heliópolis/SP (Marcos Brasilino de Carvalho/Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Heliópolis); Faculdade de Medicina da USP/SP (Pedro Michaluart Jr/Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da USP); Faculdade de Saúde Pública da USP/SP (Victor Wunsch Filho/Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Saúde Pública da USP); Faculdade de Ciências Farmacêuticas da USP em Ribeirão Preto/SP (Andréia Machado Leopoldino/Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital das Clínicas e da Faculdade de Medicina de Ribeirão Preto); Instituto do Câncer Arnaldo Vieira de Carvalho/SP (José Francisco de Góis Filho/Comitê de Ética em Pesquisa do Instituto do Câncer Arnaldo Vieira de Carvalho); UNESP/Faculdade de Engenharia, Ilha Solteira/SP (Flávia C. Rodrigues-Lisoni/Comitê de Ética em Pesquisa da UNESP/Faculdade de Engenharia, Ilha Solteira); Centro de Pesquisa Experimental, Instituto Israelita de Ensino e Pesquisa Albert Einstein/SP (Patrícia Severino/Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital Israelita Albert Einstein); Faculdade de Medicina do ABC/SP (Jossi Ledo Kanda/Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Fundação do ABC); Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo/SP (Karina B. Ribeiro/Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos - Irmandade da Santa Casa de Misericórdia de São Paulo); e Instituto de Biociências da USP/SP (Tiago V. Pereira/Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos do Instituto de Biociências da USP).

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

NOTA: Caso na execução do protocolo, em um determinado Centro, haja parceria de instituições no recrutamento e/ou atendimento de sujeitos de pesquisa, solicita-se ao CEP correspondente que observe cuidadosamente os seguintes aspectos, conforme exigências éticas explicitadas nos itens III.3.i, V.5, VI.2.h, VI.2.i, VI.3.d e VI.3.g da Resolução CNS 196/96 e item IV.1.m da Resolução CNS nº 251/97, com vistas à garantia da assistência ao sujeito da pesquisa, sem prejuízo ao Sistema Único de Saúde:

- 1) formas de recrutamento e referência de sujeitos de pesquisa; se serão pacientes do SUS e ou particulares; em que instituição estão registrados, ou seja, qual instituição assume as responsabilidades inerentes à "Instituição de Pesquisa";
- 2) descrição da infra-estrutura disponível para a realização da pesquisa;
- 3) vínculos do pesquisador;
- 4) anuência assinada pela diretoria técnica de instituições parceiras, para assistência dos sujeitos de pesquisa, quando for o caso, com apresentação de convênios ou outras relações envolvendo pessoas jurídicas;

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

Brasília, 02 de março de 2012.

Gyselle Saddi Tannous
Coordenadora da CONEP/CNS/MS