

UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
DOUTORADO EM ODONTOLOGIA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO: PATOLOGIA BUCAL

**EXPRESSÃO DE MARCADORES DE TRANSIÇÃO EPITÉLIO-  
MESENQUIMAL EM CASOS DE CARCINOMA ESPINOCELULAR DE  
CABEÇA E PESCOÇO DE UMA POPULAÇÃO DO  
HOSPITAL SOLCA – EQUADOR.**

**MARIA CRISTINA ROCKENBACH BINZ ORDÓÑEZ**

**Porto Alegre**

**2019**

MARIA CRISTINA ROCKENBACH BINZ ORDÓÑEZ

**EXPRESSÃO DE MARCADORES DE TRANSIÇÃO EPITÉLIO-  
MESENQUIMAL EM CASOS DE CARCINOMA ESPINOCELULAR DE  
CABEÇA E PESCOÇO DE UMA POPULAÇÃO DO  
HOSPITAL SOLCA – EQUADOR.**

Tese de Doutorado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como pré-requisito para obtenção do título de Doutora em Odontologia, área de concentração Patologia Bucal.

**Orientador:** Prof. Dr. Pantelis Varvaki Rados

**Linha de pesquisa:** Câncer Bucal

Porto Alegre

2019

CIP - Catalogação na Publicação

ROCKENBACH BINZ ORDÓÑEZ, MARIA CRISTINA  
EXPRESSÃO DE MARCADORES DE TRANSIÇÃO  
EPITÉLIO-MESENQUIMAL EM CASOS DE CARCINOMA  
ESPINOCELULAR DE CABEÇA E PESCOÇO DE UMA POPULAÇÃO DO  
HOSPITAL SOLCA - EQUADOR. / MARIA CRISTINA  
ROCKENBACH BINZ ORDÓÑEZ. -- 2019.  
58 f.  
Orientador: Pantelis Varvaki Rados.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Programa de  
Pós-Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS,  
2019.

1. Carcinoma espinocelular. 2. Epidemiologia. 3.  
Vimentina. 4. N-Caderina. 5. E-Caderina. I. Varvaki  
Rados, Pantelis, orient. II. Título.

“No final, o importante é a família que abriga teu coração.”

**(Maria Cristina Rockenbach Binz Ordóñez)**

## DEDICATÓRIA

Ao meu esposo **Jack**, pela ajuda e apoio incondicional, por acreditar sempre na minha capacidade e entender minha paixão pelo ensino. Te amo

À **Sebastian** e **Enrique**, meus filhotes, que literalmente cresceram com a tese e comigo. São meus bens mais preciosos.

Aos meus irmãos, **Ana Júlia**, **Mario Arthur**, **Juan Domingo** e **Milene**, por cuidarem dos meus filhos, muitas vezes por ano, durante este doutorado; sabemos que apesar de longe, nosso laço é mais forte que tudo.

Aos meus pais, **Mario** e **Margaret**, agradeço a educação e oportunidade que me deram de crescer por meio dos seus exemplos... são fonte de inspiração eterna. Amo vocês.

À vocês, dedico este trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Agradeço a todos aqueles que de alguma maneira contribuíram para a realização deste trabalho.

À minha amiga de coração ...nunca guardando nada para si, ajudando sempre que necessitei, **Rúbia da Rocha Vieira**. O mundo precisa de mais pessoas como você, meu muito obrigada pelo apoio e carinho.

Às minhas amigas que o doutorado me trouxeram, obrigada pelo apoio e gentileza sempre... **Caroline Klabunde e Taiane Berguermaier**.

Às minhas **amigas de Quito, Paulina, Gabriela e Ana**, obrigada pela amizade construída ao longo destes anos e incentivo constante, vocês fazem o Equador ser meu lar.

Professores **Pantelis Varvaki Rados e Manoel Sant'Ana Filho** meu muito obrigada pela oportunidade de aprender, crescer e conviver com vocês... homens de bem e docentes fenomenais.

**Aos professores e administrativos da Faculdade de Odontologia da UFRGS**, pelos ensinamentos transmitidos;

**Aos colegas da pós-graduação**, pelas amizades e companheirismo durante o doutorado;

**A Alessandra, a Chris e ao Pedro**, por todo apoio e gentileza que sempre tiveram comigo.

**Aos colegas e amigos do Hospital Solca de Quito**, especialmente ao doutor **Felipe Rosero, Ramiro Hidalgo, Zelma Paz, Lucho e Fanny** pela abertura e carinho em me receber dentro desta instituição tão importante para o Equador, meu muito obrigado.

**Aos colegas e amigos da Universidad de los Hemisferios**, pelo constante suporte e estímulo para finalizar o doutorado, especialmente a **Marcia Cedeño**, que me fechava no escritório e me obrigava a trabalhar na tese.

À **banca**, pelo tempo dedicado à revisão e engrandecimento do trabalho apresentado.

Ao **Equador**, país que me recebeu com tanto carinho e gentileza.

**Obrigada!**

## **LISTA DE ABREVIATURAS**

**CECP:** Carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço

**CT:** Centro do tumor

**EA:** Epitélio não neoplásico adjacente ao tumor

**E-CAD:** E-caderina

**EMT:** Transição epitélio-mesenquimal

**FOUFRGS:** Faculdade de odontologia da UFRGS

**HSQ:** Hospital SOLCA de Quito

**MET:** Transição mesênquima-epitelial

**N-CAD:** N-caderina

**NPBO:** Núcleo de pesquisa básica em odontologia

**SOLCA:** Sociedad de Lucha contra el Cáncer

**UFRGS:** Universidade Federal do Rio Grande do Sul

**VIM:** Vimentina

**ZI:** Zona de invasão

## **RESUMO**

O carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (CECP) apresenta altos índices de mortalidade e baixa taxa de sobrevida quando em estágios avançados. Esta característica está associada além das recorrências locais, às metástases loco regionais à distância e devido à falta de diagnóstico precoce. A identificação das características clínico-epidemiológicas de uma população específica facilitam o entendimento da patologia em si, favorecem o diagnóstico, prognóstico e tratamento.

No Equador não existem estudos específicos destas características, tampouco do perfil de expressão das proteínas envolvidas no processo de transição epitélio mesenquimal (EMT), fator relacionado com processos de invasão e metástases e responsável pela baixa taxa de sobrevida.

Para o desenvolvimento deste trabalho foram analisados 309 prontuários de pacientes com diagnóstico de tumor maligno de cabeça e pescoço no período de janeiro de 2004 à junho de 2017 do Hospital SOLCA de Quito- Equador (HSQ).

Foram coletados dados epidemiológicos, parâmetros clínicos, características histopatológicas e prognóstico destes pacientes. Desta população foram selecionados 148 prontuários de pacientes com o diagnóstico de CECP que cumpriram com os critérios de inclusão e exclusão.

Destes 48,6% eram homens e 51,4% mulheres, 30,4% tinham menos de 50 anos e 69,6% tinham mais de 50 anos de idade. A análise dos dados, mostrou que o desfecho (favorável para pacientes vivos e sem recidiva e desfavorável para os pacientes com recidiva, metástases ou óbitos) tem associação significativa com: o tempo de evolução, localização das lesões, tipo de tratamento, presença de metástases à distância, metástases regionais, tamanho do tumor e com o estado civil dos pacientes.

Utilizamos 22 amostras tumorais de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (CECP) desta população, e, correlacionamos as características clínicas e histopatológicas, os dados epidemiológicos e prognóstico com a expressão de marcadores vinculados ao processo EMT.

Foi observada relação estatisticamente significativa em relação à metástase à distância, onde a ausência desta, estava associada a um melhor

prognóstico, e sua presença a um pior prognóstico e verificamos ainda associação significativa entre a baixa expressão de E-CAD e o processo de EMT, assim como a alta expressão desta proteína com o processo de transição mesênquima-epitelial (MET).

**Palavras-chave:** Carcinoma espinocelular, epidemiologia, Vimentina, N-Caderina, E-Caderina, transição epitélio-mesenquimal, prognóstico

## ***ABSTRACT***

Head and neck squamous cell carcinoma (CECP) has high rates of mortality and low survival rate. This characteristic is linked to local recurrences, distant and nodal metastases and lack of early diagnosis. The identification of the clinical and epidemiological features of a specific population facilitates the understanding of the disease, and facilitates diagnosis, prognosis and treatment.

These studies have not been carried out in Ecuador, nor there are studies about the expression of proteins involved in the epithelial-mesenchymal transition (EMT), related to invasion and metastasis and responsible for the low survival rate.

In order to develop this work, a total of 309 medical records of patients with a diagnosis of malignant tumors of the head and neck from January 2004 to June 2017, from the Hospital SOLCA of Quito - Ecuador (HSQ) were analysed.

Epidemiological data, clinical parameters, histopathological features and prognosis of these patients were collected. From this population, 148 medical records of patients with the diagnosis of CECP who met the inclusion and exclusion criteria were selected for the study.

In these patients, 48.6% were men and 51.4% women, 30.4% has less than 50 years and 69.6% were over 50 years. The data analysis showed that the outcome (favorable for living patients and without recurrence and unfavorable for patients with recurrence, metastasis or deaths) has a significant association with: time of evolution, location of lesions, type of treatment, presence of distant metastases, regional metastases, tumor size and patients' marital status.

We use 22 CECP tumor samples from this population were studied, and the clinical and histopathological characteristics, epidemiological data and prognosis were correlated with the expression of EMT markers.

A statistically significant relationship was observed in relation to the distant metastases, where their absence was associated with a better prognosis, and their presence with a worse prognosis and a significant association was also observed between a low expression of E-CAD and EMT,

as well as the high expression of this protein with mesenchymal-epithelial transition (MET).

**Keywords:** Squamous cell carcinoma, epidemiology, vimentin, N-cadherin, E-cadherin, epithelial-mesenchymal transition, prognosis

## SUMÁRIO

<b>INTRODUÇÃO .....</b>	<b>12</b>
<b>ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVAS .....</b>	<b>13</b>
<b>REFERÊNCIAS .....</b>	<b>17</b>
<b>OBJETIVO GERAL .....</b>	<b>20</b>
<b>OBJETIVOS ESPECÍFICOS .....</b>	<b>20</b>
<b>ARTIGO CIENTÍFICO 1 .....</b>	<b>21</b>
<b>ARTIGO CIENTÍFICO 2 .....</b>	<b>35</b>
<b>CONSIDERAÇÕES FINAIS.....</b>	<b>55</b>

## INTRODUÇÃO

O carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (CECP) é a sexta neoplasia maligna mundial mais frequente, apresentando alto índice de mortalidade, morbidade e baixa taxa de sobrevivência dos pacientes. Na América Latina, a maior incidência deste tipo de tumor foi encontrada na Argentina, sul do Brasil e Uruguai, sendo no sul do Brasil os maiores percentuais registrados.

No entanto, em alguns lugares dos Estados Unidos, já ocorre a diminuição dos casos devido ao diagnóstico precoce e tratamento oportuno.

No Equador segundo o Instituto Nacional de Estatísticas e Censo, desde 1980 até 2016 houve um incremento de mais de 16% nas taxas de óbitos de todos os tipos de câncer. Isso significa que a cada dia morrem mais de 29 pessoas por essa causa. Nos casos de tumores de cabeça e pescoço os dados epidemiológicos existentes sugerem um aumento significativo dos anos 70 à atualidade.

No CECP, o processo de progressão tumoral se desenvolve de forma gradual e se caracteriza pela acumulação de alterações genéticas que influenciam na homeostase celular, na reparação do DNA e nos genes supressores de tumor. Já o processo de invasão local e de metástases está regulado por fatores relacionados com a capacidade das células tumorais malignas de invadir o espaço extracelular e áreas vasculares.

O processo conhecido como transição epitélio-mesênquima (EMT) vinculado ao processo de invasão tumoral no CECP inicia pela diminuição ou supressão das proteínas epiteliais nas células tumorais para receber proteínas mesenquimais e começar a expressar um fenótipo de célula mesenquimal.

Proporcionar uma melhor compreensão dos mecanismos que atuam na progressão do tumor e sua correlação com o prognóstico, facilitará, por meio das expressões dos marcadores específicos, a definição de prognósticos e a determinação de novos tratamentos específicos para os pacientes portadores de CECP e conseqüentemente aumentando as taxas de sobrevivência.

Todas as ideias e considerações abordadas nesta introdução serão desenvolvidas, aprofundadas e referenciadas nos antecedentes e justificativas.

## ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVAS

O carcinoma de cabeça e pescoço (CECP) é um problema de saúde pública global (SHIELD et al., 2016) com uma tendência ao crescimento e compromete uma população cada vez mais jovem. As etiologias são diversas, dependendo da região estudada e podem estar associadas ou não ao tabaco e álcool, infecções por Epstein-Barr e papillomavirus ou exposição a radiação ultravioleta e deficiências dietéticas (HUSSEIN et al., 2017; BALASUNDARAM et al., 2014; WARNAKULASURIYA, 2009).

As variações nas características clínico epidemiológicas do CECP são descritas por diversos estudos (SEOANE-ROMERO et al., 2012; HERNÁNDEZ-GUERRERO et al., 2013; LING et al., 2013). Compreender a variabilidade deste comportamento do CECP em termos geográficos, pode ajudar a aumentar as taxas de sobrevivência da doença que são baixas, principalmente pela ocorrência de recidivas, metástases e pelo diagnóstico tardio. (KUDO et al., 2004; CARVALHO et al., 2012)

No Equador, segundo o estudo da “Sociedad de Lucha contra el Cáncer” (SOLCA) o câncer mais prevalente em homens é o de próstata, seguido por pele, estômago, linfomas e cólon retal. Em mulheres, o de mama segue a tendência mundial como o de maior prevalência, seguido por tireoide, pele, colo de útero e estômago. Este mesmo estudo aponta que o câncer com a maior taxa de mortalidade tanto em homens como em mulheres é o de estômago, seguido de próstata e pulmão em homens e de colo de útero e de mama em mulheres. Como se pode observar não foi levado em consideração o CECP de forma específica (SOLCA, 2013).

Um estudo recentemente publicado no Equador, mostra que as taxas de mortalidade por câncer de cabeça e pescoço, incluindo CECP e outras variantes aumentaram significativamente nos últimos 16 anos em contraste com outros estudos de países desenvolvidos que indicam taxas decrescentes de mortalidade para estas patologias. (NÚÑEZ-GONZÁLES et al., 2018; SIEGEL et al., 2012 ;SIEGEL et al., 2016 )

As metástases e recidivas ocorrem pela disseminação de células tumorais por meio do sistema linfático e sanguíneo (NOGUTI et al., 2012; MANNELLI et al., 2011) e estas são as principais responsáveis pelos óbitos e

baixa taxa de sobrevida no CECP. (KUDO et al., 2004; CARVALHO et al., 2012)

O comportamento maligno das neoplasias se caracteriza pela capacidade das células tumorais realizarem disseminação a distância, burlando o sistema de vigilância imune, induzindo angiogênese e outros mecanismos próprios de uma célula tumoral maligna (HILDEBRAND et al., 2014; SMITH et al., 2013).

Estas alterações permitem que as células epiteliais migrem para o tecido conjuntivo e, neste processo, as células tumorais se separam e se espalham no estroma subjacente. (PECTASIDES et al., 2014).

Nos últimos 10 anos, a compreensão do mecanismo de disseminação das células malignas foi progressivamente desvendado, culminando com a definição de um novo processo conhecido por EMT. ( NIETO et al., 2016)

O processo de EMT é dinâmico, (SMITH et al., 2013) e durante este mecanismo a célula tumoral com características epiteliais se modifica através de uma alteração da polaridade e adesão, tornando-se em uma célula com características mesenquimatosas (SHOOK & KELLER, 2003; ZHANG et al., 2014).

Com a finalidade de determinar a correlação da expressão das proteínas envolvidas na ocorrência do processo EMT, o estudo de marcadores tumorais para E-caderina (E-CAD), N-caderina (N-CAD) e Vimentina (VIM) poderiam prever a tendência ao desenvolvimento de metástases. (CRUZ et al., 2009; LIU et al., 2010; VON ZEIDLER et al., 2014)

Alguns estudos como o de PECTASIDES et al., (2014), mostraram que a sobrevida geral dos pacientes está relacionada com a alta expressão de E-caderina em comparação com aqueles que apresentavam baixa expressão do mesmo marcador. (LIU et al., 2010)

O inverso funciona para a N-CAD e VIM onde as altas expressões destas são associadas a menores taxas de sobrevida e maior ocorrência de metástases (THIERAUF et al.,2017).

### ***Transição epitélio-mesenquimal (EMT)***

O processo celular de EMT é dinâmico e considerado indispensável para o desenvolvimento de metástases no CECP. Durante este mecanismo, a célula tumoral com características epiteliais se modifica, através de uma alteração da polaridade e adesão, transformando-se em uma célula com características mesenquimatosas (SMITH et al., 2013; NIETO et al., 2016), caracterizando o processo de EMT. Estas alterações permitem a invasão do tecido conjuntivo e a separação das células tumorais. (PECTASIDES et al., 2014).

Para identificar o processo de EMT se utilizam diversos marcadores epiteliais e mesenquimais, dentre eles a E-caderina (E-CAD), N-caderina (N-CAD) e Vimentina (VIM) (THIERAUF et al., 2017). Diferentes estudos mostram que a transição de uma célula epitelial a uma mesenquimatosa é caracterizado pela perda de expressão da E-CAD e por uma excessiva expressão de VIM e N-CAD, o que se relaciona com a conversão de tumores incipientes em tumores invasivos (SHOOK & KELLER, 2003; ZHANG et al., 2014).

PECTASIDES et al., (2014) comprovou que a E-CAD estava superexpressa naqueles casos em que os pacientes apresentavam maior sobrevida comparada quando esta se apresentava subexpressa, destacando o rol primordial que tem esta proteína na progressão e metástases do CECP.

Nos estudos que utilizam a E-CAD como um potencial biomarcador de transformação tumoral de leucoplasias, foi determinado que quando esta se apresenta subexpressa, pode ser usada para identificar potenciais riscos de transformação maligna o que poderia determinar uma oportunidade de tratamento cirúrgico profilático em grupos de pacientes de risco (VON ZEIDLER et al., 2014). **Coloco o que ocorre nas leucoplasias com a expressão de ECAD?**

ZHANG et al., (2014) observou que as células tumorais que se encontravam próximas de um vaso sanguíneo exibiam baixa expressão de E-CAD e alta expressão de VIM e quando estas já se encontravam dentro dos vasos exibiam alta expressão de E-CAD e baixa de VIM, ou seja, quando as células epiteliais recém invadem o tecido conjuntivo voltam a apresentar suas características epiteliais ao atingir um vaso sanguíneo.

Assim mesmo, a N-CAD e a VIM apresentam valores aumentados de expressão nas amostras tumorais e valores de expressão diminuídos nas amostras de mucosa normal. (SHOOK & KELLER, 2003; ZHANG et al., 2014; THIERAUF et al.,2017)

Este trabalho mostrou as principais características epidemiológicas, parâmetros clínicos, características histopatológicas e prognóstico relacionadas ao CECP no Hospital SOLCA – Quito e relacionou estas características com as expressões dos marcadores do processo de EMT e o prognóstico destes pacientes.

**REFERÊNCIAS**

Shield KD, Ferlay J, Jemal A, Sankaranarayanan R, Chaturvedi AK, Bray F, Soerjomataram I. The global incidence of lip, oral cavity, and pharyngeal cancers by subsite in 2012," *Cancer Journal for Clinicians* 2016;67:51–64.

Hussein AA, Helder MN, de Visscher JG, Leemans CR, Braakhuis BJ, de Vet HCW, Forouzanfar T. Global incidence of oral and oropharynx cancer in patients younger than 45 years versus older patients: a systematic review," *European Journal of Cancer* 2017;82:115–127.

Balasundaram P, Singh MK, Dinda AM, Thakar A, Yadav R. Study of  $\beta$ -catenin, E-cadherin and vimentin in oral squamous cell carcinoma with and without lymph node metastases. *Diagnostic Pathology* 2014, 9:145.

Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol* 2009;45(4-5):309-16.

Seoane-Romero JM, Vázquez-Mahía I, Seoane J, Varela-Centelles P, Tomás I, López-Cedrún JL. Factors related to late stage diagnosis of oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2012; 17:e35-40.

Hernández-Guerrero JC, Jacinto-Alemán LF, Jiménez-Farfán MD, Macario-Hernández A, Hernández-Flores F, Alcántara-Vázquez A. Prevalence trends of oral squamous cell carcinoma. Mexico City's General Hospital experience. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2013;18(2):306-11.

Ling W, Mijiti A, Moming A. Survival pattern and prognostic factors of patients with squamous cell carcinoma of the tongue: a retrospective analysis of 210 cases. *J Oral Maxillofac Surg*. 2013; 71:775-85.

Kudo Y, Kitajima S, Ogawa I, Hiraoka M, Sargolzaei S, Keikhaee MR, Sato S, Miyauchi M, Takata T. Invasion and Metastasis of Oral Cancer Cells Require

Methylation of E-Cadherin and/or Degradation of Membranous Beta-Catenin. *Clin Cancer Research* 2004;10: 5455-5463.

Carvalho ALH, Hildebrand IC, Haas AN, Lauxen IS, Sant'ana M. Head and neck squamous cell carcinoma: decline in clinical stage at the time of diagnosis in a reference hospital in southern Brazil. *Applied Cancer Research*. 2012;32(4):111-115.

Incidencia del Cáncer en Quito – Periodo 2011 – 2013 – SOLCA. Núcleo de Quito, 2011-2013. Disponible em: [https://issuu.com/solcaquito/docs/rnt\\_2010\\_2013](https://issuu.com/solcaquito/docs/rnt_2010_2013).

Núñez-González S, Delgado-Ron JA, Gault C, Simancas-Racines D, Trends and Spatial Patterns of Oral Cancer Mortality in Ecuador, 2001–2016. *Int J Dent* 2018;2018:6086595.

Siegel R, Naishadham D, Jemal A, Cancer Statistics. *Ca Cancer J Clin* 2012;62:10–29.

Siegel R, Miller K, Jemal A, Cancer Statistics. *Ca Cancer J Clin* 2016;66:7-30

Noguti J, Foot Gomes de Moura C, Protasio Pacheco de Jesus G, Pereira da Silva VH, Ayako Hossaka T, Fujiyama Oshimo CT, et al., Metastasis from Oral Cancer: an Overview *Oral Cancer and Metastasis (Review)* 2012; 9:329-335.

Mannelli G, Gallo O. Cancer stem cells hypothesis and stem cells in head and neck cancers. *Cancer Treat Rev* 2011;38 :515–539.

Hildebrand LC, Carvalho AL, Lauxen IS, Nör JE, Cerski CTS, Sant'ana Filho M. Spatial distribution of cancer stem cells in head and neck squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 2014; 43(7):499-506.

Smith A, Teknos TN, Pan Q. Epithelial to Mesenchymal Transition in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *Oral Oncol* 2013; 49(4):287-292.

Pectasides E, Rampias T, Sasaki C, Perisanidis C, Kouloulis V, Burtness B,

Zaramboukas T, Rimm D, Fountzilas G, Psyrri A. Markers of Epithelial to Mesenchymal Transition in Association with Survival in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC). *PLoS ONE* 2014; 9(4): e94273.

Nieto MA, Huang RY, Jackson RA, Thiery JP. EMT: 2016. *Cell*. 2016;166(1):21-45. doi: 10.1016/j.cell.2016.06.028.

Shook D, Keller R. Mechanisms, mechanics and function of epithelial-mesenchymal transitions in early development. *Mech Dev* 2003;120:1351-1383.

Zhang Z, Dong Z, Lauxen IS, Filho MS, Nör JE. Endothelial Cell-Secreted EGF Induces Epithelial to Mesenchymal Transition and Endows Head and Neck Cancer Cells with Stem-like Phenotype. *Cancer Res* 2014; 74(10): 2869-81.

Cruz MC, Pereira AL, Lopes F, Nokada CF, Silva R, Freitas R, Souza L, Pereira Pinto L. Immunohistochemical Expression of E-cadherin and CD44v6 in Squamous Cell Carcinomas of the Lower Lip and Tongue. *Braz Dent J* 2009; 20(1):64-69.

Liu LK, Jiang XY, Zhou XX, Wang DM, Song XL, Jiang HB. Upregulation of vimentin and aberrant expression of E-cadherin/b-catenin complex in oral squamous cell carcinomas: correlation with the clinicopathological features and patient outcome. *Modern Pathology* 2010; 23:213-224.

Von Zeidler SV, Botelho TS, Mendonça EF, Batista AC. E-cadherin as a potential biomarker of malignant transformation in oral leukoplakia: a retrospective cohort study. *BMC Cancer* 2014;14:972.

Thierauf J, Veit JA, Hess J. Epithelial-to-Mesenchymal Transition in the Pathogenesis and Therapy of Head and Neck Cancer. *Cancers*. 2017; 9(76):1-13.

## OBJETIVOS

### Objetivo geral

Traçar o perfil clínico-histopatológico e desfecho dos pacientes com diagnóstico de CECP atendidos no Hospital SOLCA de Quito no período de 2004 a 2017, e correlacionar com o perfil de expressão das proteínas envolvidas no processo EMT de uma amostra desta população.

### Objetivos específicos

- Correlacionar os dados demográficos, fatores de risco, aspectos clínicos, microscópicos, TNM (tumor - linfonodo e metástases e modalidades terapêuticas para identificar possíveis fatores prognósticos do CECP. Artigo científico1
  
- Avaliar a existência do processo EMT, através das imunomarcações para E-caderina, N-caderina e Vimentina correlacionando os resultados obtidos com os dados clínicos, características histológicas e desfecho dos pacientes analisados. Artigo científico 2

**ARTIGO CIENTÍFICO 1**

Artigo apresentado de acordo com as normas do periódico "Oral Oncology" (Qualis Odontologia A1 – Ano Base 2017, fator de impacto 4.636).

**CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS DE PACIENTES COM  
DIAGNÓSTICO DE CARCINOMA ESPINOCELULAR DE CABEÇA E  
PESCOÇO NO HOSPITAL SOLCA – QUITO – EQUADOR: RELAÇÃO COM  
O PROGNÓSTICO EM 13 ANOS DE ACOMPANHAMENTO.**

**RESUMO**

Este estudo tem por objetivo avaliar as principais características epidemiológicas, parâmetros clínicos e características histopatológicas do CECP nos pacientes atendidos no Hospital SOLCA – Quito - Equador no período de 2004 a 2017 comparando os resultados com os dados de sobrevida em busca de fatores prognósticos do CECP. Os pacientes incluídos neste estudo foram divididos em dois grupos de acordo com o desfecho; favorável para os pacientes vivos e sem recidiva e desfecho desfavorável para os paciente com recidiva, metástase ou óbito.

Dos 148 casos de CECP revisados, o 51,4% é feminino com uma proporção homem:mulher de 1:1,05. Quanto à idade o 69,6% é maior que 50 anos de idade; Os tabagistas e etilistas correspondem a 41,3% e 38,4% respectivamente e os não tabagistas e não etilistas correspondem a 58,7% e 61,6% respectivamente.

O diagnóstico, em 62,1% dos casos, foi realizado entre 0 a 6 meses depois do inicio da sintomatologia clinica conforme referido pelos pacientes, 27,9 % entre 6 meses a 1 ano e 10% após 1 ano.

Os pacientes exibem 51,4% de metástases regionais e 44,5% à distancia e foram tratados em sua maioria por cirurgia associada à quimioterapia e ou radioterapia. Os tumores apresentados são em sua maioria de tamanhos avançados T3 e T4 (57,1%) e os intra bucais representam o 92,5% dos CECP desta população.

O desfecho foi desfavorável em 64,1% e favorável em 35,9%. Observou-se que existe relação de desfecho desfavorável entre o tamanho do tumor T3 e T4 ( $p=0,000$ ), presença de metástase regional ( $p=0,003$ ), metástase à distância ( $p=0,000$ ) e em pacientes submetidos a tratamentos de quimioterapia ou radioterapia isolados ( $p=0,000$ ).

Com este estudo concluímos que no Equador alguns dados epidemiológicos são diferentes do resto da América do Sul, principalmente no que diz respeito a proporção homem:mulher, em relação ao tempo de evolução até o diagnóstico e de que o hábito do tabaco e álcool não mostraram relação com um prognóstico desfavorável e confirmamos de acordo com a literatura mundial que o tamanho do tumor (T3 e T4), presença de metástases e os pacientes submetidos a tratamento somente de quimioterapia e/o radioterapia são fatores que determinam um pior desfecho para estes pacientes.

**Palavras-chave:** câncer bucal; carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço; etiologia; incidência; prognóstico.

## INTRODUÇÃO

O Carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço é a patologia maligna mais comum da cavidade bucal e destes, 95% são do tipo espinocelular (1); apresentam baixas taxas de sobrevivência, principalmente associadas à ocorrência de metástases loco regionais e à distância, recidivas e ao diagnóstico tardio (2,3).

No mundo, os países que apresentam a maior incidência de CECP são Índia, Austrália, França, Brasil e África do Sul (3,4,5); Na América do Sul, mais especificamente no sul do Brasil, Argentina e Uruguai se apresentam as maiores incidências de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (CECP) e a maioria da população afetada é a do sexo masculino (5,6,7,8).

Os dados da IARC levantados no Equador mostram que a prevalência é para o sexo masculino não se confirma atualmente para o câncer de cabeça e pescoço. Em 1998-2002, o câncer de cabeça e pescoço afetou 49 indivíduos da população masculina e 43 da feminina; já nos anos de 2003-2007, esta proporção se modificou significativamente, onde 56 casos afetaram a

população masculina e 81 casos a feminina. (3) Houve assim, um aumento importante da população feminina afetada pelo câncer de cabeça e pescoço, modificando a proporção homem:mulher 1.13:1 no ano de 1998-2002 para homem:mulher de 2003-2007 a 0,69:1 (3,9).

Em alguns países, tem sido observada uma tendência a reduzir a ocorrência de câncer bucal (10, 11, 12). No Equador, esta tendência, não se confirma com as estatísticas apresentadas por a IARC e pelo ultimo estudo apresentado por Núñez-González em 2018 (7).

As características clínicas dos pacientes, sua graduação histológica, os hábitos de risco, tipo de tratamento e idade são fatores envolvidos no prognóstico dos pacientes portadores de CECP e podem ajudar a entender o comportamento desta patologia (10,13,14,15).

Este estudo teve por objetivo avaliar as principais características epidemiológicas, parâmetros clínicos e características histopatológica de uma amostra de pacientes com diagnóstico de CECP atendidos no Hospital SOLCA – Quito - Equador no período de 2004 a 2017 comparando os resultados com os dados de sobrevida em busca de fatores prognósticos para o CECP.

## **METODOLOGIA**

### **- Amostra do Estudo**

Para a realização deste trabalho foram avaliados 309 prontuários eletrônicos de pacientes atendidos no Hospital SOLCA de Quito- Equador (HSQ) no período entre janeiro de 2004 a julho 2017. Foram incluídos no estudo 148 pacientes com CECP de lábio, língua, boca, amígdala, orofaringe, nasofaringe, hipofaringe e faringe que apresentaram ao menos 75 % de dados clínicos completos.

As características demográficas levantadas nos prontuários foram: sexo, idade, origem étnica, tipo sanguíneo, estado civil, grau de instrução. Os fatores de risco revisados foram o tabagismo e o consumo de álcool. As características clínicas observadas nos prontuários foram: estadiamento clínico pela classificação TNM ( T=tamanho, N= metástases regionais e M= metástases à distancia), e a localização da lesão (intra oral ou extra oral). Ademais, se

verificou o grau de diferenciação do tumor, tempo de evolução da patologia, tratamento realizado e desfecho (prognóstico favorável ou desfavorável).

Foi considerado como desfecho favorável aqueles pacientes vivos e sem recidiva e desfecho desfavorável para os paciente com recidiva, metástase loco regional e/ou à distância ou óbito.

#### **- Critérios de Exclusão**

Foram excluídas da amostra todas as neoplasias malignas diferentes de CECP assim como todos os casos de neoplasias malignas que tinham como sitio primário glândulas salivares maiores ou menores. Quando não foi possível identificar o sitio primário, casos sem o diagnóstico histopatológico, registros duplicados ou histórias clinicas com menos de 75% de dados clínicos ou sem dados e registros de outros tipos de câncer também foram excluídos da amostra.

#### **- Análise estatística**

Foi utilizado o teste Qui-quadrado de Pearson e o teste exato de Fisher, para verificar associação entre as características coletadas e o desfecho apresentado pelos pacientes. (nível de significância de  $p < 0,05$ )

## **RESULTADOS**

Um resumo dos dados revisados dos pacientes com CECP estão descritos na Tabela 1. De um total de 148 pacientes com diagnóstico histopatológico de CECP, 72 (48,6%) masculinos e 76 (51,4%) femininos (com uma proporção homem:mulher de 1:1,05). A idade do paciente no momento do diagnóstico correspondeu a 30,4% menores de 50 anos e 69,6% maiores de 50 anos.

A origem étnica é completamente mestiça e a tipificação sanguínea demonstrou uma prevalência do tipo O, seguido pelos tipos A, B e AB. No que se refere a estado civil e grau de instrução os pacientes são na sua maioria casados (55,4%) seguidos por solteiros (20,9%), viúvos (10,7%), divorciados (9,4%) e união estável (3,6%), instrução acadêmica 42,6% completaram ensino fundamental, 26,5% ensino médio, 19,1% ensino superior e 11,8% analfabetos.

**Tabela 1.** Características epidemiológicas dos pacientes com CECP do Hospital SOLCA no período de 2004-2017.

VARIÁVEIS	FREQUÊNCIA	PORCENTUAL	TOTAL	PORCENTAGEM VÁLIDA
<b>SEXO</b>				
FEMININO	76	51,4	148	51,4
MASCULINO	72	48,6		48,6
<b>IDADE</b>				
MENOR O =50 ANOS	45	30,4	148	30,4
MAIOR 50 ANOS	103	69,6		69,6
<b>ORIGEM ÉTNICA</b>				
MESTIÇO	148	100,0	148	100,0
<b>TIPO SANGUINEO</b>				
O	82	55,4	148	70,1
A	23	15,5		19,6
AB	3	2,0		2,6
B	9	6,2		7,7
AUSENTE	31	20,9		
<b>ESTADO CIVIL</b>				
CASADO	77	52,0	148	55,4
SOLTEIRO	29	19,6		20,9
VIÚVO	15	10,1		10,7
UNIAO ESTAVEL	5	3,4		3,6
DIVORCIADO	13	8,8		9,4
AUSENTE	9	6,1		
<b>GRAU INSTRUÇÃO</b>				
ANALFABETO	16	10,8	148	11,8
ENSINO FUNDAMENTAL	58	39,2		42,6
ENSINO MÉDIO	36	24,3		26,5
ENSINO SUPERIOR	26	17,6		19,1
AUSENTE	12	8,1		

No que diz respeito aos hábitos, a tabela 2 exemplifica que 41,3% eram tabagistas e o 58,7% não; 38,4% utilizava álcool e o 61,6% não. A quantificação, tipo, tempo ou intensidade do hábito não foram possíveis de serem estabelecidas por ausência de dados específicos.

**Tabela 2.** Distribuição dos dados referentes a fatores de risco dos pacientes com CECP do Hospital SOLCA no período de 2004-2017.

VARIÁVEIS	FREQUÊNCIA	PORCENTUAL	TOTAL	PORCENTAGEM VÁLIDA
<b>TABACO</b>				
TABAGISTA	57	38,5		41,3
NÃO TABAGISTA	81	54,7	148	58,7
AUSENTE	10	6,8		
<b>ÁLCOOL</b>				
ETILISTA	53	35,8		38,4
NÃO ETILISTA	85	57,4	148	61,6
AUSENTE	10	6,8		

O tamanho dos tumores de CECP desta amostra, foram de T1 e T2 em 42,9% e T3 e T4 em 57,1% dos casos, sendo principalmente intra-bucais (92,5%) e diagnosticados dentro dos primeiros 6 meses de evolução (62,1%), 27,9% entre 6 meses e um ano e 10% com mais de um ano de evolução. O grau de diferenciação dos tumores: 46,2% bem diferenciado, 45,2% moderadamente diferenciado, 6,5% pouco diferenciado e o 2,1% indiferenciado como se demonstra na Tabela 3.

**Tabela 3.** Distribuição dos dados referentes as características clínicas, microscópicas e tempo de evolução dos pacientes com CECp do Hospital SOLCA no período de 2004 a 2017.

VARIÁVEIS	FREQUÊNCIA	PORCENTUAL	TOTAL	PORCENTAGEM VÁLIDA
<b>TAMANHO DO TUMOR</b>				
T1 e T2	60	40,5	148	42,9
T3 e T4	80	54,1		57,1
AUSENTE	8	5,4		
<b>METÁSTASE REGIONAL</b>				
PRESENÇA	71	48,0	148	51,4
AUSÊNCIA	67	45,2		48,6
AUSENTE	10	6,8		
<b>METÁSTASE A DISTANCIA</b>				
PRESENÇA	61	41,2	148	44,5
AUSÊNCIA	76	51,4		55,5
AUSENTE	11	7,4		
<b>LOCALIZAÇÃO DO TUMOR</b>				
INTRA-BUCAL	136	91,9	148	92,5
EXTRA-BUCAL	11	7,4		7,5
AUSENTE	1	0,7		
<b>GRADUAÇÃO DO TUMOR</b>				
BEM DIFERENCIADO	43	29,1	148	46,2
MODERADAMENTE DIFERENCIADO	42	28,3		45,2
POUCO DIFERENCIADO	6	4,1		6,5
INDIFERENCIADO	2	1,3		2,1
AUSENTE	55	37,2		
<b>TEMPO DE EVOLUÇÃO</b>				
0-6 meses	87	58,7	148	62,1
6 meses a 1 ano	39	26,4		27,9
mais de um ano	14	9,5		10,0
AUSENTE	8	5,4		

O tratamento realizado (a que os pacientes foram submetidos) corresponderam principalmente a cirurgia associado a quimioterapia e ou radioterapia, seguido por quimioterapia e/ou radioterapia, somente cirurgia e tratamento paliativo ao menor percentual dos pacientes.

**Tabela 4.** Distribuição dos dados referentes ao tratamento administrado aos pacientes com tumores de CECP do Hospital SOLCA no período de 2004 a 2017.

VARIÁVEIS	FREQUÊNCIA	PORCENTUAL	TOTAL	PORCENTAGEM VÁLIDA
<b>TRATAMENTO</b>				
QUIMIO + RADIO	40	27,0		32,2
CIRURGIA	14	9,5		11,3
QUIMIO + RADIO + CIR	62	41,9	148	50,0
PALIATIVO	8	5,4		6,5
AUSENTE	24	16,2		

O desfecho dos pacientes com CECP apresentado neste estudo (tabela5) correspondeu a 35,9 % favorável e 64,1% desfavorável.

**Tabela 5.** Distribuição dos dados referentes ao prognóstico dos pacientes portadores de tumores de CECP do Hospital SOLCA no período de 2004 a 2017.

VARIÁVEIS	FREQUÊNCIA	PORCENTUAL	TOTAL	PORCENTAGEM VÁLIDA
<b>PROGNÓSTICO</b>				
PROGNÓSTICO FAVORÁVEL	47	31,7		35,9
PROGNÓSTICO DESFAVORÁVEL	84	56,8	148	64,1
AUSENTE	17	11,5		

A tabela 6 demonstra a associação entre prognóstico (n = 131) e o perfil sócio-demográfico, hábitos e fatores de risco dos pacientes e características clínicas e histopatológicas dos tumores. Os resultados mostram associação significativa com tamanho do tumor (p = 0,000) metástase regional (p = 0,003), metástase à distancia (p = 0,000), tratamento (p = 0,000), localização do tumor (p = 0,010), estado civil (p = 0,018) e tempo de evolução (p = 0,004).

**Tabela 6.** Distribuição da associação entre o prognóstico e o perfil sócio-demográfico, hábitos e fatores de risco dos pacientes e características clínicas e histopatológicas dos tumores de CECP do Hospital SOLCA no período de 2004 a 2017.

VARIÁVEIS	Prognóstico		p VALOR*
	Favorável	Desfavorável	
<b>IDADE</b>			
MENOR O =50 ANOS	18 (38,3%)	21 (25,0%)	p = 0,110
MAIOR 50 ANOS	29 (61,7%)	63 (75,0%)	
<b>SEXO</b>			
FEMININO	23 (48,9%)	45 (53,6%)	p = 0,611
MASCULINO	24 (51,1%)	39 (46,4%)	
<b>ORIGEM ÉTNICA</b>			
MESTIÇO	47 (100,0%)	84 (100,0%)	VARIÁVEL CONSTANTE
<b>TABACO</b>			
TABAGISTA	23 (50,0%)	28 (35,9%)	p = 0,123
NÃO TABAGISTA	23 (50,0%)	50 (64,1%)	
<b>ÁLCOOL</b>			
ETILISTA	21(45,7%)	28 (35,9%)	p = 0,283
NÃO ETILISTA	25 (54,3%)	50 (64,1%)	
<b>TAMANHO DO TUMOR</b>			
T1 e T2	<b>31 (67,4%)</b>	25 (30,5%)	p = 0,000*
T3 e T4	15 (32,6%)	<b>57 (69,5%)</b>	
<b>METÁSTASE REGIONAL</b>			
PRESENÇA	14 (31,1%)	<b>49 (60,5%)</b>	p = 0,002*
AUSÊNCIA	<b>31 (68,9%)</b>	32 (39,5%)	
<b>METÁSTASE A DISTANCIA</b>			
PRESENÇA	6 (13,0%)	<b>53 (66,2%)</b>	p = 0,000*
AUSÊNCIA	<b>40 (87,0%)</b>	27 (33,8%)	
<b>TRATAMENTO</b>			
QUIMIO + RADIO	4 (8,7%)	<b>36 (46,2%)</b>	p = 0,000*
CIRURGIA	<b>12 (26,1%)</b>	2 (2,6%)	
QUIMIO + RADIO + CIR	30 (65,2%)	32 (41,0%)	
PALIATIVO	0 (0%)	8 (10,2%)	
<b>TIPO SANGÜINEO</b>			
O	25 (61,0%)	49 (76,6%)	p = 0,280
A	12 (29,3%)	9 (14,1%)	
AB	1 (2,4%)	2 (3,1%)	
B	3 (7,3%)	4 (6,2%)	
<b>LOCALIZAÇÃO DO TUMOR</b>			
INTRA-BUCAL	40 (85,1%)	<b>82 (97,6%)</b>	p = 0,007*
EXTRA-BUCAL	<b>7 (14,9%)</b>	2 (2,4%)	
<b>GRADUAÇÃO DO TUMOR</b>			
BEM DIFERENCIADO	14 (53,8%)	25 (42,4%)	p = 0,573
MODERADAMENTE DIFERENCIADO	11 (42,4%)	27 (45,8%)	
POCO DIFERENCIADO	1 (3,8%)	5 (8,4%)	
INDIFERENCIADO	0 (0%)	2 (3,4%)	
<b>ESTÁDO CIVIL</b>			
CASADO	27 (57,5%)	42 (52,5%)	p = 0,029*
SOLTEIRO	10 (21,3%)	17 (21,2%)	
VIÚVO	1 (2,1%)	<b>14 (17,5%)</b>	
UNIAO ESTAVEL	1 (2,1%)	3 (3,8%)	
DIVORCIADO	<b>8 (17,0%)</b>	4 (5,0%)	
<b>TEMPO DE EVOLUÇÃO</b>			
0-6 meses	24 (52,2%)	56 (69,1%)	p = 0,004*
6 meses a 1 ano	13 (28,2%)	23 (28,4%)	
mais de um ano	<b>9 (19,6%)</b>	2 (2,5%)	
<b>GRAU_INTRUÇÃO</b>			
Analfabeto	5 (10,9%)	10 (12,4%)	p = 0,140
Ensino fundamental	14 (30,4%)	39 (48,8%)	
Ensino médio	14 (30,4%)	19 (23,8%)	
Ensino superior	13 (28,3%)	12 (15,0%)	

Teste do Qui-quadrado de Pearson e Teste exato de Fisher (nível de significância de  $p < 0,05$ ).

## DISCUSSÃO

Este é o primeiro estudo que oferece uma visão mais detalhada do CECP nesta população do Equador.

Em nosso estudo, algumas das características são similares à literatura publicada mundialmente, como por exemplo no que diz respeito a incidência, que é maior em pacientes com mais de 50 anos de idade e as taxas de sobrevida que também são baixas e não apresentam melhoras significativas nos índices. No entanto, algumas das características observadas parecem diferir do resto da informação publicada para a América Latina (14,15,16).

Estas diferenças epidemiológicas poderiam ser explicadas, em parte, pelas diferenças culturais e geográficas que influenciam os diversos fatores de risco associados ao câncer de cabeça e pescoço (8, 17).

Em estudos apresentados no sul do Brasil, Uruguai e Argentina (1, 2,17), há uma maior incidência do CECP em pacientes masculinos (proporção aproximada de 3:1). No Equador esta característica apresenta uma relação 1:1,05 proporção homem:mulher, dado que se pode relacionar com os últimos dados mundiais de incidência de câncer de cabeça e pescoço enviados pelo Equador ( 3, 7, 9).

O estudo não pôde elucidar este aumento de pacientes femininas, no entanto, com base na literatura existente podemos pensar que esta característica pode estar associada à sensibilidade ao tratamento relacionada aos receptores hormonais, presença de lesões causadas por vírus, papilomavírus humano (HPV) (18), herpes simples (HSV-1), citomegalovírus (CMV), vírus do herpes humano (HHV-6) e (HHV-7), vírus da Hepatite C (HCV) e Epstein-Barr vírus (EBV) (19).

Não foi possível estabelecer neste estudo uma relação estatisticamente significativa entre o sexo e o prognóstico, não obstante seria relevante analisar a população deste estudo para determinar a existência de relação entre infecções virais presentes com o prognóstico.

No presente estudo, a maior parte dos pacientes não apresentavam hábitos tabagistas ou ingestão de álcool, não demonstrando relação com o prognóstico. O desenvolvimento de CECP sem os típicos fatores de risco se mantêm em discussão (20), e a literatura indica que a correlação entre taxas de sobrevida e o hábito de fumar não são estatisticamente significantes (21) e que

devemos focar os recursos preventivos relacionados a fatores de estilo de vida, comportamento como a exposição ambiental a abuso de drogas, dieta, infecções virais e imunodeficiência (21, 22).

Existe um consenso de que o melhor indicador de prognóstico é o estadiamento (TNM) (16) ao momento do diagnóstico, assim como a presença de metástases. A nossa população estudada confirma este consenso e mostra que tanto o tamanho do tumor, assim como a presença de metástases tanto regional como à distancia evidenciam sua relação com um pior prognóstico nesta população (23).

O tratamento de cirurgia associado a quimioterapia e ou radioterapia foi o tratamento mais utilizado, pela prevalência de tumores T3 e T4, seguido por quimioterapia e ou radioterapia, em terceiro lugar, somente cirurgia e por último tratamento paliativo; ao realizar a análise estatística foi possível confirmar, que o tratamento com maior taxa de sobrevida é o de cirurgia o que está de acordo com múltiplos estudos publicados (17,20,24,25). Esse resultado é decorrente do estadiamento do tumor e não uma opção terapêutica deliberada .

Frente a esta realidade, as agências de saúde Equatorianas devem implementar políticas de prevenção e diagnóstico precoce do câncer de cabeça e pescoço, estimulando o auto exame. As universidades de odontologia do país também devem estar envolvidas neste processo, uma vez que são as responsáveis por formar os futuros profissionais que deverão desenvolver habilidades para o diagnóstico precoce e orientar o autoexame, esperando assim reduzir as taxas de mortalidade e aumentar a sobrevida desta população (26).

Logo, os dados obtidos neste estudo proporcionam informações inéditas de uma área geográfica específica e estabelecem um perfil inicial do CECP no Equador.

## **REFERÊNCIAS**

1. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol* 2009;45(4-5):309-16.
2. Carvalho ALH, Hildebrand IC, Haas AN, Lauxen IS, Sant'ana M. Head and neck squamous cell carcinoma: decline in clinical stage at the time of diagnosis in a reference hospital in southern Brazil. *Applied Cancer Research*. 2012;32(4):111-115.
3. Forman D, Bray F, Brewster DH, Gombe Mbalawa C, Kohler B, Piñeros M, et al. *Cancer Incidence in Five Continents, Vol. X*. IARC Scientific Publication No. 164. Lyon: International Agency for Research on Cancer 2014.
4. Liu LK, Jiang XY, Zhou XX, Wang DM, Song XL, Jiang HB. Upregulation of vimentin and aberrant expression of E-cadherin/b-catenin complex in oral squamous cell carcinomas: correlation with the clinicopathological features and patient outcome. *Modern Pathology* 2010; 23:213-224.
5. Cohen N, Fedewa S, Chen A. Epidemiology and Demographics of the Head and Neck Cancer Population. *Oral Maxillofacial Surg Clin N Am* 2018; Volume ;30:381-395.
6. Perie S, Meyers M, Mazzaschi O, De Crouy Chanel O, Baujat B, Lacau St Guily J. Epidemiology and anatomy of head and neck cancers. *Bull Cancer* 2014;101:404-10.
7. Núñez-González S, Delgado-Ron JA, Gault C, Simancas-Racines D, Trends and Spatial Patterns of Oral Cancer Mortality in Ecuador, 2001–2016. *Int J Dent* 2018;2018:6086595.
8. Zini A, Czerninski R, Sgan-Cohen HD. Oral cancer over four decades: epidemiology, trends, histology, and survival by anatomical sites. *J Oral Pathol Med*. 2010; 39: 299-305.

9. M.P. Curado, B. Edwards, H.R. Shin, H. Storm, J. Ferlay, M. Heanue and P. Boyle Cancer Incidence in Five Continents, Volume IX / edited by M.P. Curado... [et al.] (IARC Scientific Publications ; 160 2009.
10. Franceschi S, Bidoli E, Herrero R, Munoz N. Comparison of cancers of the oral cavity and pharynx worldwide: etiological clues. *Oral Oncol*, 2000;volume; 36 (1):106-115.
11. Siegel R, Miller K, Jemal A, Cancer Statistics. *Ca Cancer J Clin* 2016;66:7-30
12. Siegel R, Miller K, Jemal A, Cancer Statistics. *Ca Cancer J Clin* 2019;0:1-28
13. De Silva RK, Siriwardena BSMS, Samaranayaka A, Abeyasinghe WAMUL, Tilakaratne WM. A model to predict nodal metastasis in patients with oral squamous cell carcinoma. *PLoS ONE* 2018;13(8):
14. Seoane-Romero JM, Vázquez-Mahía I, Seoane J, Varela-Centelles P, Tomás I, López-Cedrún JL. Factors related to late stage diagnosis of oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2012; 17:e35-40.
15. Ganly I, Patel S, Shah J. Early stage squamous cell cancer of the oral tongue--clinicopathologic features affecting outcome. *Cancer*. 2012; 118:101-11.
16. Kreppel M, Drebber U, Rothamel D, Eich HT, Kübler A, Scheer M, Zöller JE. Prognostic impact of different TNM-based stage groupings for oral squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2010; 33:1467-75.
17. Olivera ML, Wagner V, Sant'Ana M, et al. 10-year analysis of oral squamous cell carcinoma profile in Public Health Centers in Uruguay. *Braz Oral Res [online]*. 2015;Volume ;29(1):1-8
18. Kobayashi, K., Hisamatsu, K., Suzui, N. et al. A Review of HPV-Related Head and Neck Cancer. *J Clin Med*. 2018;7(9).

19. Chen, YH., Chang, KP., Chu, SC. et al. Value of early evaluation of treatment response using 18F-FDG PET/CT parameters and the Epstein-Barr virus DNA load for prediction of outcome in patients with primary nasopharyngeal carcinoma Eur J Nucl Med Mol Imaging. 2018; <https://doi.org/10.1007/s00259-018-4172-3>.
20. Warnakulasuriya S. Living with oral cancer: epidemiology with particular reference to prevalence and life-style changes that influence survival. Oral Oncol. 2010; 46:407-10.
21. Irimie AI, Braicu C, Cojocneanu R, et al . Differential Effect of Smoking on Gene Expression in Head and Neck Cancer Patients. Int. J. Environ. Res. Public Health 2018; 15: 1558.
22. Galbiatti AL, Padovani-Junior JA, Maniglia JV, Rodrigues CD, Pavarino EC, Goloni-Bertollo EM. Head and neck cancer: causes, prevention and treatment. Braz J Otorhinolaryngol 2013;79(2):239-24
23. Süslü N, Hoşal AS, Aslan T, Sözeri B, Dolgun A. Carcinoma of the Oral Tongue: A Case Series Analysis of Prognostic Factors and Surgical Outcomes. J Oral Maxillofac Surg 2013 Mar 21.
24. INCA - Instituto Nacional do Câncer 2018 citado 10 set. 2018 . Disponível em: [http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/boca/d  
efinicao](http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/tiposdecancer/site/home/boca/definicao)
25. Kaminagakura E, Vartanian JG, da Silva SD, dos Santos CR, Kowalski LP. Case-control study on prognostic factors in oral squamous cell carcinoma in young patients. Head Neck 2010; 32: 1460-66.
26. Mashberg A. Diagnosis of early oral and oropharyngeal squamous carcinoma: obstacles and their amelioration. Oral Oncol 2000; 36:253-5.

**ARTIGO CIENTÍFICO 2**

Artigo apresentado de acordo com as normas do periódico "Cancer Research" (Qualis Odontologia A1 – Ano Base 2017, fator de impacto 9.130).

**EXPRESSÃO DE MARCADORES DO PROCESSO EMT EM CARCINOMA ESPINOCELULAR DE CABEÇA E PESCOÇO E SUA RELAÇÃO COM O PROGNÓSTICO****RESUMO**

Este estudo tem por objetivo avaliar a expressão de marcadores do processo de transição epitélio-mesenquimal (EMT) e demonstrar que a subexpressão da E-caderina (E-CAD) e sobreexpressão da Vimentina (VIM) e N-Caderina (N-CAD) em 22 amostras tumorais de carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (CECP), implicaram em um pior prognóstico destes pacientes. As amostras parafinadas de CECP foram submetidas a imunomarcção e os resultados comparados com as características clínicas, histopatológicas e evolução dos pacientes. Foram avaliadas três zonas: centro do tumor (CT), zona de invasão (ZI) e epitélio adjacente (EA), e para a interpretação atribuiu-se o escore 1 (0-50%) e escore 2 (51-100%).

Foi observada relação estatisticamente significativa ( $p=0,004$ ) em relação à metástase a distância, onde a ausência desta estava associada a um melhor prognóstico e sua presença a um pior prognóstico.

Nas análises de imunoistoquímica no que se refere a expressão de E-CAD e N-CAD em ZI, CT e EA, existiu associação de subexpressão de E-CAD no ZI e esta associou-se a tumores de tamanho entre T1 e T2 ( $p=0,032$ ), ademais ocorreu subexpressão de E-CAD no CT e esta associou-se a indivíduos com faixa etária de até 50 anos ( $p=0,012$ ), bem como a indivíduos solteiros ( $p=0,046$ ).

Verificamos, no que se refere a EMT, fase de transição e MET na ZI e CT, associação significativa entre a baixa expressão de E-CAD e o processo de EMT assim como a alta expressão desta proteína com o processo de MET

( $p=0,012$ ), e associação significativa na alta expressão de N-CAD associada ao processo de EMT e na baixa expressão desta ao processo de MET ( $p=0,002$ ).

Os resultados da análise do EA mostram que existiu superexpressão de E-CAD ao epitélio normal e expressão ao epitélio alterado ( $p=0,000$ ).

Não foram encontrados resultados significativos entre as demais variáveis estudadas, concluindo que estes marcadores não tem valor prognóstico para o diagnóstico nesta amostra estudada, e casos com alta expressão de E-CAD tem melhor desfecho, independente da área do tumor estudada.

Palavras-chave: Carcinoma espinocelular, E-CAD, N-CAD, VIM, transição epitélio-mesenquimal e prognóstico.

## **INTRODUÇÃO**

A transição epitélio-mesenquimal (EMT) participa no processo de invasão, progresso e no desenvolvimento de metástases do carcinoma espinocelular de cabeça e pescoço (CECP) (1, 2). Neste mecanismo a célula tumoral com características epiteliais, altera sua polaridade e adesão e se modifica em uma célula com características mesenquimatosas; as células com este fenótipo acabam invadindo o tecido conjuntivo e neste processo as células se separam e se disseminam no estroma adjacente (3, 4).

Um grande numero de artigos científicos (5,6,7,8) confirma que, o evento do processo EMT está relacionado diretamente com um pior prognóstico, o que inclui, metástases (6), tumores mais indiferenciados, (7) aumento de recorrências e diminuição das taxas de sobrevida em diversos tipos de câncer, entre eles o CECP (3).

Existem diversos marcadores que se utilizam para identificar o processo de EMT, entre eles E-caderina (E-CAD), N-caderina (N-CAD) e Vimentina (VIM). A E-caderina, se utiliza como marcador que evidencia a perda das características epiteliais e a N-caderina e Vimentina para demonstrar a aquisição das características mesenquimatosas (1, 2, 4, 6).

Diversos estudos demonstraram que quando a E-CAD está superexpressa os pacientes apresentaram maior sobrevida comparados a quando esta estava subexpressa; Esta característica demonstra que a E-CAD é uma das principais reguladoras do processo EMT e consequentemente a maior responsável (quando subexpressa) pela progressão e metástases do CECP (1, 4, 7).

Diferentes estudos mostraram que a transição de uma célula epitelial a uma mesenquimatosa é caracterizada pela perda de expressão da E-CAD e por uma excessiva expressão de VIM e N-CAD, o que se relaciona com a conversão de tumores incipientes, em tumores invasivos ( 1, 2, 4, 5).

No que respeita a VIM e a N-CAD, Zhang et al., observou que as células tumorais que se encontravam próximas de um vaso sanguíneo exibiam alta expressão de VIM e baixa de E-CAD e quando esta já se encontrava dentro dos vasos exibiam baixa expressão de VIM e alta de E-CAD, ou seja, quando as células epiteliais recém invadem o tecido conjuntivo voltam a apresentar suas características epiteliais ao atingir um vaso sanguíneo (8).

Corroborando esta observação, tanto a N-CAD como a VIM apresentam valores aumentados de expressão nas amostras tumorais e valores de expressão diminuídos nas amostras de mucosa normal (1, 2, 4, 5, 8).

Os eventos de EMT e MET são dinâmicos o que possibilita diversos ciclos de invasão e metástases (6). No processo EMT/transição/MET pode existir um estado transacional ou híbrido, onde as células não adquirem necessariamente características mesenquimais; também pode ocorrer perda parcial das características epiteliais e apresentar características mesenquimais o que pode gerar diferentes comportamentos durante a migração e invasão tumoral (9).

Este estudo procurou avaliar a existência do processo EMT, utilizando as imunomarcações para E-CAD, N-CAD e VIM no centro do tumor, zona de invasão e epitélio adjacente em 22 amostras parafinadas de CECP; correlacionando os resultados obtidos com os dados clínicos, desfechos dos pacientes e as características histológicas dos tumores analisados.

## **METODOLOGIA**

### **- Descrição da amostra**

Foram utilizadas 22 amostras tumorais de pacientes CECP primários, sem tratamento prévio, atendidos e tratados no Hospital Solca – Equador no período de janeiro de 2004 até junho de 2017.

### **- Parâmetros clínicos dos pacientes**

Foram coletados nos prontuários eletrônicos as características clínicas de: sexo, idade, etnia, estado civil, grau de instrução, tipo sanguíneo, fatores de risco (tabaco e álcool), tempo de evolução, modalidades de tratamento e prognóstico.

### **- Características clínicas e histopatológicas dos tumores**

Os dados referentes a tamanho do tumor, localização do tumor, presença de metástases regionais e/ou à distância, foram obtidos nos registros dos prontuários. A graduação histológica foi realizada por dois patologistas previamente calibrados seguindo com os critérios de BRYNE et al., (1992) (10) e as amostras apresentavam centro (CT), zona de invasão (ZI) e epitélio adjacente (EA)

Os pacientes incluídos neste estudo se dividiram em dois grupos conforme o desfecho (favorável para pacientes vivos e sem recidiva do tumor) e desfavorável (óbito pelo tumor, recidiva ou metástase).

### **- Imunoistoquímica**

Foram realizados cortes histológicos de 03 micrometros de cada bloco de parafina previamente selecionados do repositório de patologia do Hospital SOLCA - Quito e foram submetidos a técnica de imunoistoquímica de acordo ao quadro 1. Todas as imunomarcações foram acompanhadas de controles positivos e como controle negativo se realizou a supressão do anticorpo primário.

**Quadro 1:** Marca comercial, diluição, tipo de recuperação antigênica e tempo de incubação e controle positivo para cada anticorpo avaliado

<i>Anticorpo</i>	<i>Marca/Clone</i>	<i>Diluição</i>	<i>Recuperação antigênica</i>	<i>Tempo incubação</i>	<i>Controle positivo</i>
<b>E-caderina*</b>	Cell Signaling® Clone 24E10 (coelho)	1:200	Panela de pressão (115°C – 3'30")	Overnight (4°C)	Tecido epitelial
<b>N-caderina*</b>	Abcam® Clone AB18203 (coelho)	1:300	Panela de pressão (115°C – 3'30")	Overnight (4°C)	Tecido nervoso
<b>Vimentina*</b>	Dako® Clone V9 (rato)	1:100	Panela de pressão (110°C – 3')	Overnight (4°C)	Schwannoma

\*Sistema de detecção: Envision dual link; (Dako®, Carpinteria, USA); Revelações: Diaminobenzidina (Dako®, Carpinteria, USA); Contra-coloração: Hematoxilina de Mayer

### - Quantificação da imunistoquímica e reprodutibilidade

A expressão da imunistoquímica para cada marcador nas diferentes zonas de interesse foi quantificada por três avaliadores previamente calibrados, utilizando um aumento final de 400X. Consideramos imunomarcagem positiva E-CAD (membrana), N-CAD (citoplasma e núcleo) e VIM (membrana). As células que apresentaram a coloração marrom se atribuiu o escore 1 (0-50% de células imunopositivas) e escore 2 (51-100% de células imunopositivas).

Durante a execução das técnicas imunistoquímica, ocorreu a degradação do EA de uma das amostras. Se decidiu manter esta lâmina sem análise desta área específica.

### - Análise do processo de EMT em amostras tumorais e classificação do EA

Quando existiu baixa expressão de E-CAD, e alta expressão de N-CAD e/ou VIM as amostras foram determinadas como em EMT, ao existir alta expressão de E-CAD, e baixa expressão de N-CAD e/ou VIM se caracteriza MET ou quando os tumores não condiziam nos critérios EMT ou MET se determinou fase híbrida. Se considerou normal o EA quando existiu alta expressão de E-CAD, e baixa expressão de N-CAD e VIM, e alterado quando não condizente com este padrão.

### - Reprodutibilidade

A reprodutibilidade foi confirmada durante o estudo. De cada 05 lâminas avaliadas de cada proteína, 01 foi sorteada para reavaliação após um período de 7 dias. Aceitamos valor de Kappa maior que 0,7. Durante a avaliação, os examinadores estiveram cegos para qual paciente pertence o material.

### - Análise estatística

Foi utilizado o teste Qui-quadrado de Pearson e o teste exato de Fisher, para demonstrar a associação das expressões imunohistoquímicas com as variáveis analisadas através do software SPSS versão 21 (IBM Corporation, EUA).

**Figura 1.**

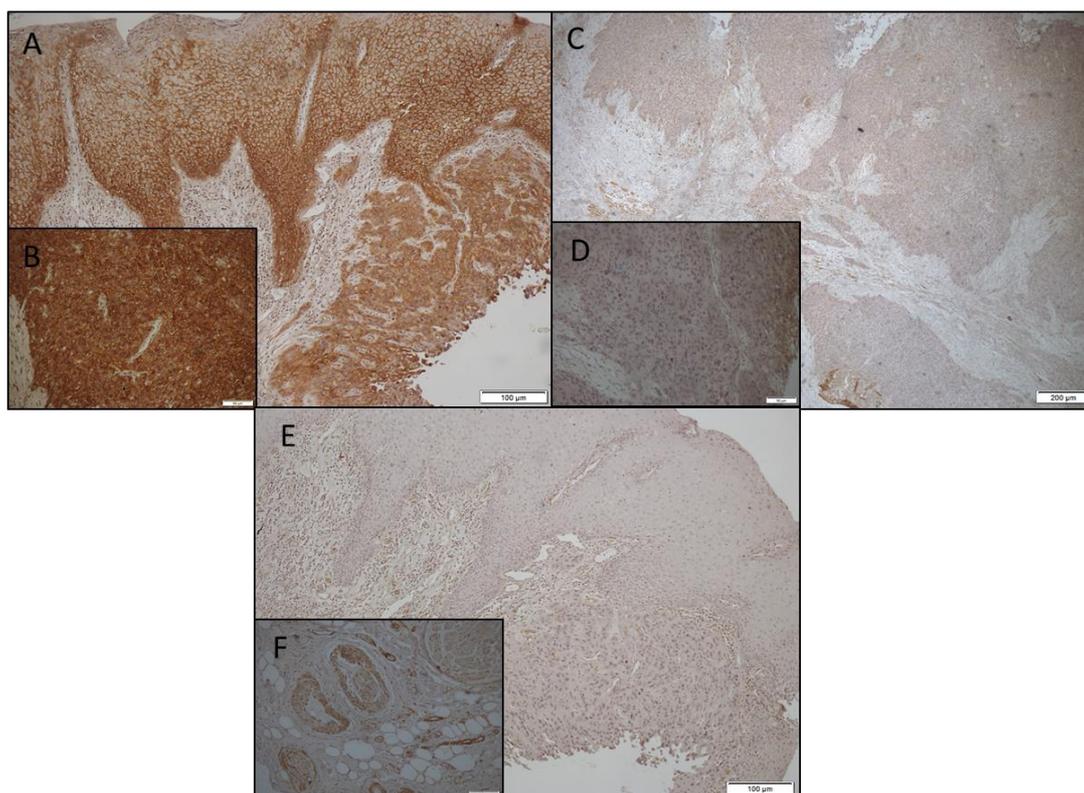


Figura 1 - Fotomicrografia com a marcação imunohistoquímica dos diferentes escores considerados nesse estudo. A) Marcação de E-caderina mostrando o epitélio adjacente (EA) e a zona de invasão (ZI) com escore 1 (100 x). B) Marcação de E-caderina escore 1 na porção do centro do tumor (CT) (200 x). C) Marcação de N-caderina mostrando epitélio adjacente (EA) e a zona de invasão (ZI) com escore 2. (40x). D) Marcação de N-caderina escore 2 na porção do centro do tumor (CT) (200x). E) Marcação de Vimentina sendo subexpressa de forma constante, mostrando o epitélio adjacente (EA) e a zona de invasão (ZI) (100x). F) Controle interno de Vimentina mostrando marcação em tecido muscular e parede de vasos sanguíneos (200x).

## RESULTADOS

Observou-se que os indivíduos dos dois grupos possuíam faixa etária de mais de 50 anos (72,7%), pertenciam predominantemente ao sexo feminino (59,1%), eram não tabagistas (59,1%), não etilistas (54,5%), tipo sanguíneo O (85%), estado civil casado (68,2%). Em relação ao grau de instrução a maioria dos indivíduos com prognóstico favorável possuíam ensino superior completo (45,5%) e a maioria dos indivíduos com prognóstico desfavorável possuíam ensino fundamental completo (54,5%) – Tabela 1.

**Tabela 1.** Associação entre prognóstico (n=22) e o perfil sócio-demográfico, e fatores de risco para os grupos com prognóstico favorável e desfavorável para o CECP.

VARIÁVEIS	FAVORÁVEL	DESFAVORÁVEL	p VALOR*
<b>IDADE</b>			
Menor 50 anos	3 (27,3)	3 (27,3)	>0,999
Maior 50 anos	8 (72,7)	8 (72,7)	
<b>SEXO</b>			
Feminino	6 (54,5)	7 (63,6)	0,664
Masculino	5 (45,5)	4 (36,4)	
<b>TABACO</b>			
Tabagista	5 (45,5)	4 (36,4)	0,664
Não tabagista	6 (54,5)	7 (63,6)	
<b>ÁLCOOL</b>			
Etilista	5 (45,5)	5 (45,5)	>0,999
Não etilista	6 (54,5)	6 (54,5)	
<b>TIPO SANGUINEO</b>			
O	9 (90)	8 (80)	0,485
A	0 (0)	1 (10)	
B	1 (10)	1 (10)	
<b>ESTADO CIVIL</b>			
Casado	8 (72,7)	7 (63,6)	0,693
Solteiro	2 (18,2)	2 (18,2)	
Viúvo	0 (0)	1 (9,1)	
Divorciado	1 (9,1)	1 (9,1)	
<b>GRAU DE INSTRUÇÃO</b>			
Analfabeto	1 (9,1)	1 (9,1)	0,305
Ensino fundamental	2 (18,2)	6 (54,5)	
Ensino médio	3 (27,2)	2 (18,2)	
Ensino superior	5 (45,5)	2 (18,2)	

*Teste do Qui-quadrado de Pearson e Teste exato de Fisher (nível de significância de  $p < 0,05$ ).*

Quanto às características clínicas e histopatológicas dos tumores e sua relação com o prognóstico, observou-se que a maioria dos indivíduos do grupo de prognóstico favorável, possuíam tumores de tamanhos menores (72,7%), com ausência de metástase regional (72,7%), cujo tratamento de eleição foi cirurgia associada à quimioterapia e ou radioterapia (72,2%), tumor de localização intraoral (81,8%), graduação moderadamente diferenciado (60%) e tempo de evolução de até 06 meses (81,8%).

No grupo de prognóstico desfavorável, houve prevalência de tumores de tamanhos maiores (63,6%), com presença de metástase regional (63,6%), onde o tratamento de eleição foi a cirurgia associada à quimioterapia e radioterapia (63,6%), tumor de localização intraoral (81,8%), graduação

moderadamente diferenciado (54,5%) e tempo de evolução de até 06 meses (54,5%).

Foi observada relação estatisticamente significativa ( $p=0,004$ ) em relação à metástase a distância, onde a ausência desta estava associada a um melhor prognóstico e sua presença a um pior prognóstico (Tabela 2).

**Tabela 2.** Associação entre o prognóstico (n=22) e as características clínicas e histopatológicas da amostra de pacientes com CECp.

VARIÁVEIS	FAVORÁVEL	DESFAVORÁVEL	p VALOR*
<b>TAMANHO DO TUMOR</b>			
T1 e T2	8 (72,7)	4 (36,4)	0,083
T3 e T4	3 (27,3)	7 (63,6)	
<b>METÁSTASE REGIONAL</b>			
Presença	3 (27,3)	7 (63,6)	0,083
Ausência	8 (72,7)	4 (36,4)	
<b>METÁSTASE À DISTÂNCIA</b>			
Presença	0 (0)	<b>7 (63,6)</b>	<b>0,004*</b>
Ausência	<b>11 (100)</b>	4 (36,4)	
<b>TRATAMENTO</b>			
Químio + radio	1 (9,1)	3 (27,3)	0,675
Cirurgia	2 (18,2)	1 (9,1)	
Químio + radio + cirurgia	8 (72,7)	7 (63,6)	
<b>LOCALIZAÇÃO DO TUMOR</b>			
Intra-bucal	9 (81,8)	9 (81,8)	>0,999
Extra-bucal	2 (18,2)	2 (18,2)	
<b>GRADUAÇÃO DO TUMOR</b>			
Bem diferenciado	3 (30)	5 (45,5)	0,397
Moderadamente diferenciado	6 (60)	6 (54,5)	
In situ	1 (10)	0 (0)	
<b>TEMPO DE EVOLUÇÃO</b>			
0-6 meses	9 (81,8)	6 (54,5)	0,086
6 meses a 1 ano	1 (9,1)	5 (45,5)	
Mais de um ano	1 (9,1)	0 (0)	

*Teste do Qui-quadrado de Pearson e Teste exato de Fisher (nível de significância de  $p < 0,05$ ).*

## **Análises imunoistoquímicas**

### **- Expressão de E-CAD e N-CAD em ZI, CT e EA**

A subexpressão de E-CAD no ZI associou-se a tumores de tamanho entre T1 e T2 ( $p=0,032$ ).

A subexpressão de E-CAD no CT associou-se a indivíduos com faixa etária de até 50 anos ( $p=0,012$ ), bem como a indivíduos solteiros ( $p=0,046$ ).

Não foi constatada relação estatisticamente significativa entre as demais variáveis estudadas e a imunoexpressão de E-CAD e N-CAD em ZI, CT e EA (Tabela 3 a 5).

### **- Expressão de VIM em ZI, CT e EA**

Encontrou-se 100% de subexpressão de VIM nas três zonas estudadas de ambos grupos, favorável e desfavorável. Por se tratar de uma variável constante não foi possível realizar a análise estatística.

### **EMT, fase de transição e MET na ZI e CT**

Na ZI cinco amostras se encontravam em EMT, treze na fase híbrida e quatro no processo de MET. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa entre estas variáveis (EMT/Transição/MET) e o desfecho. No entanto, foi possível verificar associação significativa entre a baixa expressão de E-CAD e o processo de EMT assim como a alta expressão desta proteína com o processo de MET ( $p=0,012$ ) (Tabela 6).

Verificou-se também associação significativa entre a alta expressão de N-CAD e o processo de EMT assim como a subexpressão desta com o processo de MET ( $p=0,006$ ) (Tabela 6).

No CT, cinco amostras se encontravam em EMT, onze estavam na fase híbrida e seis no processo de MET. Houve associação significativa em relação a subexpressão de E-CAD com o processo de EMT e superexpressão desta com MET ( $p=0,002$ ). O contrário ocorreu com a proteína N-CAD onde observou-se alta expressão desta proteína associada ao processo de EMT e a baixa expressão desta ao processo de MET ( $p=0,002$ ). Não foi encontrada associação significativa entre o desfecho e os processos estudados (Tabela 6).

### **Análise do EA**

No EA a superexpressão de E-CAD associou-se ao epitélio normal e sua expressão ao epitélio alterado ( $p=0,000$ ).

Não houve resultados significativos entre o desfecho, N-CAD e as demais variáveis estudadas em relação ao EA (Tabela 7).

**Tabela 3.** Associação entre a imunexpressão de E-CAD e N-CAD na zona de invasão do CECP em relação às variáveis estudadas

VARIÁVEIS		E-CADERINA		N-CADERINA	
		Escore 1 n (%)	Escore 2 n (%)	Escore 1 n (%)	Escore 2 n (%)
<b>Evolução</b>	1- Favorável	6 (54,5)	5 (45,5)	6 (60,0)	5 (41,7)
	2-Desfavorável	5 (45,5)	6 (54,5)	4 (40,0)	7 (58,3)
		$p=0,670$		$p=0,390$	
<b>Idade</b>	< 50 anos	5 (45,5)	1 (9,1)	3 (30,0)	3 (25,0)
	> 50 anos	6 (54,5)	10 (90,9)	7 (70,0)	9 (75,0)
		$p=0,149$		$p=1,000$	
<b>Tamanho</b>	T1 e T2	<b>9 (81,8)</b>	3 (27,3)	7 (70,0)	5 (41,7)
	T3 e T4	2 (18,2)	<b>8 (72,7)</b>	3 (30,0)	7 (58,3)
		$p=0,032^*$		$p=0,231$	
<b>Metástase regional</b>	Ausência	3 (27,3)	7 (63,6)	3 (30,0)	7 (58,3)
	Presença	8 (72,7)	4 (36,4)	7 (70,0)	5 (41,7)
		$p=0,198$		$p=0,231$	
<b>Metástase à distancia</b>	Ausência	3 (27,3)	4 (36,4)	3 (30,0)	4 (33,3)
	Presença	8 (72,7)	7 (63,6)	7 (70,0)	8 (66,7)
		$p>0,999$		$p>0,999$	
<b>Tratamento</b>	quimio + radio	1 (9,1)	3 (27,3)	3 (30,0)	1 (8,3)
	cirurgia	2 (18,2)	1 (9,1)	1 (10,0)	2 (16,7)
	quimio+radio+cir	8 (72,7)	7 (63,6)	6 (60,0)	9 (75,0)
		$p=0,675$		$p=0,442$	
<b>Localização do tumor</b>	Intra-bucal	9 (81,8)	9 (81,8)	10 (100,0)	8 (66,7)
	Extra-bucal	2 (18,2)	2 (18,2)	0 (0,0)	4 (33,3)
		$p>0,999$		$P=0,096$	
<b>Gradação</b>	Bem Diferenciado	5 (45,5)	3 (30,0)	3 (33,3)	5 (41,7)
	Moderadamente	6 (54,5)	6 (60,0)	6 (55,6)	7 (58,3)
	In situ	0 (0,0)	1 (10,0)	1 (11,1)	0 (0,00)
		$p=0,657$		$p=0,632$	
<b>Estado civil</b>	Casado	5 (45,5)	10 (90,9)	8 (80,0)	7 (58,4)
	Solteiro	3 (27,2)	1 (9,1)	1 (10,0)	3 (25,0)
	Viúvo	1 (9,1)	0 (0,00)	0 (0,0)	1 (8,3)
	Divorciado	2 (18,2)	0 (0,00)	1 (10,0)	1 (8,3)
		$p=0,124$		$p=0,785$	
<b>Tempo evolução</b>	0 a 6 meses	8 (72,7)	7 (63,6)	7 (70,0)	8 (66,7)
	6 meses a 1 ano	3 (27,3)	3 (27,3)	3 (30,0)	3 (25,0)
	Mais de 1 ano	0 (0,0)	1 (9,1)	0 (0,0)	1 (8,3)
		$p>0,999$		$p>0,999$	

Teste do Qui-quadrado de Pearson e Teste exato de Fisher (nível de significância de  $p<0,05$ ). \*Resultados estatisticamente significativos destacados em negrito.

**Tabela 4.** Associação entre a imunexpressão de E-CAD e N-CAD no centro do tumor do CECP em relação às variáveis estudadas.

VARIÁVEIS		E-CADERINA		N-CADERINA	
		Escore 1 n (%)	Escore 2 n (%)	Escore 1 n (%)	Escore 2 n (%)
<b>Evolução</b>	1-Favorável	5 (45,5)	6 (54,5)	8 (66,7)	3 (30,0)
	2-Desfavorável	6 (54,5)	5 (45,5)	4 (33,3)	7 (70,0)
		$p=0,670$		$p=0,083$	
<b>Idade</b>	< 50 anos	<b>6 (54,5)</b>	0 (0,00)	4 (33,3)	2 (20,0)
	> 50 anos	5 (45,5)	<b>11 (100)</b>	8 (66,7)	8 (80,0)
		$p=0,012^*$		$p=0,646$	
<b>Tamanho</b>	T1 e T2	7 (63,6)	5 (45,5)	9 (75,0)	3 (30,0)
	T3 e T4	4 (36,4)	6 (54,5)	3 (25,0)	7 (70,0)
		$p=0,670$		$p=0,084$	
<b>Metástase regional</b>	Ausência	4 (36,4)	6 (54,5)	3 (25,0)	7 (70,0)
	Presença	7 (63,6)	5 (45,5)	9 (75,0)	3 (30,0)
		$p=0,670$		$p=0,084$	
<b>Metástase à distância</b>	Ausência	3 (27,3)	4 (36,4)	3 (25,0)	4 (40,0)
	Presença	8 (72,7)	7 (63,6)	9 (75,0)	6 (60,0)
		$p>0,999$		$p=0,652$	
<b>Tratamento</b>	quimio + radio	2 (18,2)	2 (18,2)	2 (16,7)	2 (20,0)
	cirurgia	2 (18,2)	1 (9,1)	2 (16,7)	1 (10,0)
	quimio+radio+cir	7 (63,6)	8 (72,7)	8 (66,6)	7 (70,0)
		$p>0,999$		$p>0,999$	
<b>Localização do tumor</b>	Intra-bucal	10 (90,9)	8 (72,7)	11 (91,7)	7 (70,0)
	Extra-bucal	1 (9,1)	3 (27,3)	1 (8,3)	3 (30,0)
		$p=0,586$		$p=0,293$	
<b>Gradação</b>	Bem Diferenciado	5 (45,5)	3 (30,0)	5 (45,5)	3 (30,0)
	Moderadamente	6 (54,5)	6 (60,0)	5 (45,5)	7 (70,0)
	In situ	0 (0,0)	1 (10,0)	1 (9,0)	0 (0,00)
		$p=0,657$		$p=0,505$	
<b>Estado civil</b>	Casado	5 (45,4)	<b>10 (90,9)</b>	9 (75,0)	6 (60,0)
	Solteiro	<b>4 (36,4)</b>	0 (0,00)	2 (16,7)	2 (20,0)
	Viúvo	1 (9,1)	0 (0,00)	0 (0,0)	1 (10,0)
	Divorciado	1 (9,1)	1 (9,1)	1 (8,3)	1 (10,0)
		$p=0,046^*$		$p=0,879$	
<b>Tempo evolução</b>	0 a 6 meses	6 (54,5)	9 (81,8)	9 (75,0)	6 (60,0)
	6 meses a 1 ano	4 (36,4)	2 (18,2)	3 (25,0)	3 (30,0)
	Mais de 1 ano	1 (9,1)	0 (0,00)	0 (0,0)	1 (10,0)
		$p=0,360$		$p=0,801$	

Teste do Qui-quadrado de Pearson e Teste exato de Fisher (nível de significância de  $p<0,05$ ). \*Resultados estatisticamente significativos destacados em negrito.

**Tabela 5.** Associação entre a imunexpressão de E-CAD e N-CAD no epitélio adjacente em relação às variáveis estudadas.

VARIÁVEIS		E-CADERINA		N-CADERINA	
		Escore 1 n (%)	Escore 2 n (%)	Escore 1 n (%)	Escore 2 n (%)
<b>Evolução</b>	<i>Favorável</i>	4 (40,0)	7 (63,6)	9 (47,4)	2 (100,0)
	<i>Desfavorável</i>	6 (60,0)	4 (36,4)	10 (52,6)	0 (0,00)
		<i>p=0,277</i>		<i>p=0,096</i>	
<b>Idade</b>	< 50 anos	4 (40,0)	1 (9,1)	5 (26,3)	0 (0,00)
	> 50 anos	6 (60,0)	10 (90,9)	14 (73,7)	2 (100,0)
		<i>p=0,149</i>		<i>p&gt;0,999</i>	
<b>Tamanho</b>	T1 e T2	6 (60,0)	6 (54,5)	11 (57,9)	1 (50,0)
	T3 e T4	4 (40,0)	5 (45,5)	8 (42,1)	1 (50,0)
		<i>p&gt;0,999</i>		<i>p&gt;0,999</i>	
<b>Metástase regional</b>	<i>Ausência</i>	5 (50,0)	5 (45,5)	9 (47,4)	1 (50,0)
	<i>Presença</i>	5 (50,0)	6 (54,5)	10 (52,6)	1 (50,0)
		<i>p&gt;0,999</i>		<i>p&gt;0,999</i>	
<b>Metástase à distância</b>	<i>Ausência</i>	5 (50,0)	2 (18,2)	7 (36,8)	0 (0,00)
	<i>Presença</i>	5 (50,0)	9 (81,8)	12 (63,2)	2 (100,0)
		<i>p=0,183</i>		<i>p=0,533</i>	
<b>Tratamento</b>	<i>Quimio + radio</i>	3 (30,0)	1 (9,1)	4 (21,1)	0 (0,00)
	<i>Cirurgia</i>	2 (20,0)	1 (9,1)	3 (15,8)	0 (0,00)
	<i>Quimio+radio+cir</i>	5 (50,0)	9 (81,8)	12 (63,1)	2 (100,0)
		<i>p=0,345</i>		<i>p&gt;0,999</i>	
<b>Localização do tumor</b>	<i>Intra-bucal</i>	9 (90,0)	8 (72,7)	16 (84,2)	1 (50,0)
	<i>Extra-bucal</i>	1 (10,0)	3 (27,3)	3 (15,8)	1 (50,0)
		<i>p=0,586</i>		<i>p=0,352</i>	
<b>Gradação</b>	<i>Bem Diferenciado</i>	3 (33,3)	4 (36,4)	7 (38,8)	0 (0,00)
	<i>Moderadamente</i>	6 (66,7)	6 (54,5)	10 (55,6)	2 (100,0)
	<i>In situ</i>	0 (0,0)	1 (9,1)	1 (5,6)	0 (0,00)
		<i>p&gt;0,999</i>		<i>p=0,549</i>	
<b>Estado civil</b>	<i>Casado</i>	6 (60,0)	8 (72,7)	12 (63,1)	2 (100,0)
	<i>Solteiro</i>	3 (30,0)	1 (9,1)	4 (21,1)	0 (0,00)
	<i>Viúvo</i>	1 (10,0)	0 (0,00)	1 (5,3)	0 (0,00)
	<i>Divorciado</i>	0 (0,00)	2 (18,2)	2 (10,5)	0 (0,00)
		<i>p=0,279</i>		<i>p&gt;0,999</i>	
<b>Tempo evolução</b>	<i>0 a 6 meses</i>	7 (70,0)	7 (63,6)	13 (68,4)	1 (50,0)
	<i>6 meses a 1 ano</i>	3 (30,0)	3 (27,3)	6 (31,6)	0 (0,00)
	<i>Mais de 1 ano</i>	0	1 (9,1)	0	1 (50,0)
		<i>p&gt;0,999</i>		<i>p=0,098</i>	

Teste do Qui-quadrado de Pearson e Teste exato de Fisher (nível de significância de  $p<0,05$ ). \*Resultados estatisticamente significativos destacados em negrito.

**Tabela 6.** Associação do processo de EMT, fase híbrida e MET na zona de invasão e centro do tumor do CECP em relação às diferentes variáveis de estudo

Zona de Invasão		EMT n=5 (%)	HIBRIDA n=13 (%)	MET n=4 (%)	p VALOR
GRUPO/EVOLUÇÃO	1- Favorável	3 (60)	5 (38,5)	3 (75)	0,510
	2- Desfavorável	2 (40)	8 (61,5)	1 (25)	
EXPRESSÃO E-CAD	Escore 1	<b>5 (100)</b>	6 (46,2)	0 (0,0)	<b>0,012*</b>
	Escore 2	0 (0,0)	7 (53,8)	<b>4 (100)</b>	
EXPRESSÃO N-CAD	Escore 1	0 (0,0)	6 (46,2)	<b>4 (100)</b>	<b>0,006*</b>
	Escore 2	<b>5 (100)</b>	7 (53,8)	0 (0,0)	
Centro do Tumor		EMT n=5 (%)	TRANSIÇÃO n=11 (%)	MET n=6 (%)	p VALOR
GRUPO/EVOLUÇÃO	1- Favorável	1 (20)	6 (54,5)	4 (66,7)	0,399
	2- Desfavorável	4 (80)	5 (45,5)	2 (33,3)	
EXPRESSÃO E-CAD	Escore 1	<b>5 (100)</b>	6 (54,5)	0 (0,00)	<b>0,002*</b>
	Escore 2	0 (0,0)	5 (45,5)	<b>6 (100)</b>	
EXPRESSÃO N-CAD	Escore 1	0 (0,0)	6 (54,5)	<b>6 (100)</b>	<b>0,002*</b>
	Escore 2	<b>5 (100)</b>	5 (45,5)	0 (0,00)	

Teste do Qui-quadrado de Pearson e Teste exato de Fisher (nível de significância de  $p < 0,05$ ). \*Resultados estatisticamente significativos destacados em negrito.

**Tabela 7.** Avaliação do epitélio adjacente em relação as diferentes variáveis de estudo

Epitélio Adjacente		NORMAL n=9 (%)	ALTERADO n=12 (%)	p VALOR
GRUPO/EVOLUÇÃO	1- Favorável	5 (55,6)	6 (50,0)	>0,999
	2- Desfavorável	4 (44,4)	6 (50,0)	
E-CADERINA	Escore 1	0 (0,0)	<b>10 (83,3)</b>	<b>0,000*</b>
	Escore 2	<b>9 (100)</b>	2 (16,7)	
N-CADERINA	Escore 1	9 (100)	10 (83,3)	0,486
	Escore 2	0 (0,0)	2 (16,7)	

Teste do Qui-quadrado de Pearson e Teste exato de Fisher (nível de significância de  $p < 0,05$ ). \*Resultados estatisticamente significativos destacados em negrito.

## DISCUSSÃO

O estudo realizado avaliou a expressão do processo de EMT em amostras de CECP de uma população equatoriana. Este é o primeiro trabalho numa população com características específicas, onde se avaliou o processo EMT em diferentes zonas do CECP e EA.

Em nosso estudo, em relação à expressão de E-CAD e N-CAD em ZI, CT e EA, existiu subexpressão de E-CAD no ZI e esta associou-se a tumores de tamanho entre T1 e T2; o que se confirma na literatura, onde menos marcação de E-CAD corresponde a um prognóstico desfavorável para estes indivíduos (1, 4).

Um dado interessante é a diminuição da expressão de E-CAD no CT em pacientes jovens (até 50 anos) que não encontra respaldo na literatura, fato que leva a especular uma possível atividade mais intensa das células tumorais neste processo de transição EMT/MET em pacientes jovens (7, 8, 9).

A expressão da VIM em ZI, CT e EA teve 100% de subexpressão de VIM nas três zonas estudadas dos dois grupos e se pode sugerir que este marcador não possui relevância na definição do desfecho do tumor para esta amostra estudada.

No EA não neoplásico observou-se superexpressão de E-CAD, sugerindo que no tecido epitelial normal há presença suficiente da proteína E-CAD nas regiões de adesão celular, situação inversa foi encontrada no tumor, no qual houve somente expressão no epitélio alterado (10, 11).

Com base em nossos achados, encontramos pouca validade de emprego de E-CAD para sinalizar campo de cancerização.

Não foi possível determinar significância entre as variáveis (EMT/Transição/MET) e o desfecho, no entanto, verificamos associação significativa entre a baixa expressão de E-CAD e o processo de EMT assim como a alta expressão desta proteína com o processo de MET como demonstrado por diversos autores (1, 2, 4, 5, 12, 13). Este resultado pode ocorrer porque a análise executada é estática e o processo EMT dinâmico o que pode não demonstrar o real processo em ação.

Também se verificou na ZI associação significativa entre a alta expressão de N-CAD e o processo de EMT assim como a subexpressão desta com o processo de MET corroborando o encontrado na literatura sugerindo que o processo MET/EMT possui papel significativo na invasão tumoral (4, 14, 15).

No CT, existiu associação significativa em relação a subexpressão de E-CAD com o processo de EMT e superexpressão desta com MET. O contrário ocorreu com a proteína N-CAD onde observou-se alta expressão desta proteína associada ao processo de EMT e a baixa expressão desta ao processo de MET e novamente não foi encontrada associação significativa entre o desfecho e os processos estudados, demonstrando a característica dinâmica do processo (9,16).

As características clínicas e demográficas dos pacientes diferiram da maioria das publicações consultadas(17), principalmente no que se refere à

porcentagem da população feminina (18) e, no que respeita à exposição aos hábitos considerados de risco para o desenvolvimento do CECP (19, 20). No entanto parece ser uma característica desta população em particular.

De acordo com os resultados encontrados se pode observar que a expressão da E-CAD e da N-CAD são ferramentas estabelecidas para determinar a ocorrência dos processos EMT e MET (4, 9, 16).

## REFERÊNCIAS

1. Krisanaprakornkit S, Iamaroon A. Epithelial-mesenchymal transition in oral squamous cell carcinoma. *ISRN Oncol* 2012;681469.
2. Cruz MC, Pereira AL, Lopes F, Nokada CF, Silva R, Freitas R, Souza L, Pereira Pinto L. Immunohistochemical Expression of E-cadherin and CD44v6 in Squamous Cell Carcinomas of the Lower Lip and Tongue. *Braz Dent J* 2009; 20(1):64-69.
3. Seoane-Romero JM, Vázquez-Mahía I, Seoane J, Varela-Centelles P, Tomás I, López-Cedrún JL. Factors related to late stage diagnosis of oral squamous cell carcinoma. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2012; 17:e35-40. 21.
4. Pectasides E, Rampias T, Sasaki C, Perisanidis C, Kouloulis V, Burtneess B, Zaramboukas T, Rimm D, Fountzilas G, Psyrri A. Markers of Epithelial to Mesenchymal Transition in Association with Survival in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma (HNSCC). *PLoS ONE* 2014; 9(4): e94273.
5. Leemans CR, Braakhuis BJ, Brakenhoff RH. The molecular biology of head and neck cancer. *Nat Rev Cancer* 2011;11:9–22.
6. Książkiewicz M, Markiewicz A, Zaczek AJ. Epithelial-mesenchymal transition: a hallmark in metastasis formation linking circulating tumor cells and cancer stem cells. *Pathobiology* 2012;79:195-208.
7. Von Zeidler SV, Botelho TS, Mendonça EF, Batista AC. E-cadherin as a potential biomarker of malignant transformation in oral leukoplakia: a retrospective cohort study. *BMC Cancer* 2014;14:972.
8. Zhang Z, Dong Z, Lauxen IS, Filho MS, Nör JE. Endothelial Cell-Secreted EGF Induces Epithelial to Mesenchymal Transition and Endows Head and Neck Cancer Cells with Stem-like Phenotype. *Cancer Res* 2014;74:2869-81.

9. Grigore AD, Jolly MK, Jia D, Farach-Carson MC, Levine H. Tumor Budding: The Name is EMT. Partial EMT. *J Clin Med* 2016;5:E51.
10. Bryne M, Koppang H, Lilleng R, Kjaerheim A. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. *J Pathol* 1992;166:375–81.)
11. Kalluri R, Weinberg RA. The basics of epithelial-mesenchymal transition. *J Clin Invest* 2009; 119:1420-28.
12. Thierauf J, Veit JA, Hess J. Epithelial-to-Mesenchymal Transition in the Pathogenesis and Therapy of Head and Neck Cancer. *Cancers (Basel)* 2017.
13. Yeung KT, Yang J. Epithelial-mesenchymal transition in tumor metastasis. *Mol Oncol* 2017;11:28-39.
14. Marcucci F, Stassi G, de Maria R. Epithelial-mesenchymal transition: A new target in anticancer drug discovery. *Nat Rev Drug Discov* 2016;15:311–25.
15. Thiery JP, Acloque H, Huang RY, Nieto MA. Epithelialmesenchymal transitions in development and disease. *Cell* 2009;139:871–90.
16. Nieto MA, Huang RY, Jackson RA, Thiery JP. EMT: 2016. *Cell* 2016;166:21-45.
17. Olivera ML, Wagner V, Sant'Ana M, et al. 10-year analysis of oral squamous cell carcinoma profile in Public Health Centers in Uruguay. *Braz Oral Res [online]*. 2015;Volume ;29(1):1-8
18. Durazzo MD, de Araujo CE, Brandão Neto JS, Potenza AS, Costa P, Takeda F, et al. Clinical and epidemiological features of oral cancer in a medical school teaching hospital from 1994 to 2002: increasing incidence in women, 50 predominance of advanced local disease, and low incidence of neck metastases. *Clinics* 2005; 60:293-8.

19. Warnakulasuriya S. Living with oral cancer: epidemiology with particular reference to prevalence and life-style changes that influence survival. *Oral Oncol.* 2010; 46:407-10.

20. Irimie AI, Braicu C, Cojocneanu R, et al . Differential Effect of Smoking on Gene Expression in Head and Neck Cancer Patients. *Int. J. Environ. Res. Public Health* 2018; 15: 1558.

## CONSIDERAÇÕES FINAIS

O carcinoma espinocelular é a neoplasia maligna que mais acomete a região de cabeça com destaque para a cavidade bucal e está dentro das 10 neoplasias malignas mais comuns que afetam a população mundial; ocorre mais em homens, com mais de 40 anos a nível mundial e infelizmente ainda apresenta altas taxas de mortalidade. A determinação do prognóstico do CECP está relacionado a diversos fatores, entre eles, o diagnóstico precoce, a terapêutica empregada e está vinculado diretamente com a ocorrência de metástases, especialmente loco regionais, recidivas e invasão do processo tumoral;

Este estudo foi o primeiro a demonstrar as características dos pacientes com CECP no Equador. Os resultados mostram um perfil diferente do CECP em relação a outros países da América Latina, onde os pacientes mais afetados são as mulheres e portanto é necessária a implementação de políticas de saúde para essa população bem como estudos com maior profundidade em temas relacionados à relação do CECP com HPV ou hormônios femininos .

Ainda é preciso conhecer com maior profundidade a carcinogênese do CECP e os fatores envolvidos na sua progressão tumoral como a invasão, metástases e recidivas; Estes fatores são primordiais para determinar um perfil de prognóstico para os pacientes com diagnóstico de CECP.

No artigo 1, se pode ressaltar a prevalência da população feminina e a inexistência de correlação entre os fatores de risco e o prognostico. Estes distintivos caracterizam esta população como única e devem ser levadas em consideração para implementar ações preventivas eficazes e medidas investigativas específicas visando incrementar as taxas de sobrevida.

No artigo 2, foi ressaltado que a baixa expressão de E-CAD estava relacionada com o processo EMT e sua alta expressão com o processo de MET e o inverso para N-CAD tanto em EA com ZI e CT. Esta relação é bem descrita e evidenciada em muitos trabalhos e se pode concluir que estes marcadores podem determinar a ocorrência do processo EMT e MET. No que se refere a VIM acreditamos que a variabilidade de proteínas envolvidas no mecanismo EMT e MET bem como a plasticidade do processo não nos

permitiram, nessa amostra da população e nesse estudo comprovar o seu valor prognóstico.

O conhecimento acerca das diferentes características celulares relacionadas à dinâmica do processo EMT pode contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas efetivas que tenham como alvo as células envolvidas no processo de EMT.

A realização de novos estudos se faz necessária tanto nessa população quanto em outras regiões do país para ampliar a compreensão adquirida até o momento.