KARINE CARLI FRANK

**Gradações histológicas de malignidade: proposição de novo método
para análise em carcinoma epidermoide oral**

São Paulo

2019

KARINE CARLI FRANK

**Gradações histológicas de malignidade: proposição de novo método
para análise em carcinoma epidermoide oral.**

Versão Original

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-graduação em Ciências odontológicas para a obtenção do título de Mestre em Ciências .

Área de concentração: Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes Especiais

Orientador: Prof. Dr. Décio dos Santos
Pinto Junior

São Paulo

2019

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

Frank, Karine Carli.

Gradações histológicas de malignidade: proposição de novo método para análise em carcinoma epidermoide oral / Karine Carli Frank ; orientador Décio dos Santos Pinto Junior. -- São Paulo, 2019.

63 p. : tab., fig. ; 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 original

1. Carcinoma de células escamosas. 2. Gradação de malignidade. I. Pinto Junior, Décio dos Santos. II. Título.

Frank KC. Gradações histológicas de malignidade: proposição de novo método para análise em carcinoma epidermoide oral. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências.

Aprovado em: / /2019

Banca Examinadora

Prof(a).Dr(a)._____

Instituição:_____Julgamento:_____

Prof(a).Dr(a)._____

Instituição:_____Julgamento:_____

Prof(a).Dr(a)._____

Instituição:_____Julgamento:_____

Dedico este trabalho a todos os pesquisadores da área da saúde, que, com muito esforço e dedicação, fazem ciência e propagam descobertas pelo mundo a fim de ajudar o próximo.

Dedico também este trabalho à Lilian Carli, Priscila Carli e Maria Suely Felix Carli, mulheres fortes que me acompanharam durante toda minha vida e me incentivaram sempre a buscar o saber e transformar todo meu aprendizado em ajuda ao próximo.

AGRADECIMENTOS

*Deixo aqui registrado meu imenso agradecimento ao meu Orientador, **Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Júnior**, pela integridade, auxílio, palavras de conforto, conversas que sempre instigavam a mente dos seus orientados e pelo bom humor que sempre transpassou e contagiou a todos no Departamento. Sua bondade, inteligência e carisma me marcaram e serão lembradas sempre por mim. Agradeço pela paciência durante esses anos de orientação e estímulo para fazer tudo isso acontecer. Obrigada pelo carinho e pelos conselhos durante esta jornada, mestre!*

*Não poderia deixar de agradecer aos meus professores da UNIMES, que me mostraram o mundo da odontologia e do ensino e me fizeram escolher o ensino como parte essencial da minha profissão e me incentivaram a fazer o mestrado. Aos professores **Rodrigo Ribeiro** e **Caio Vinícius Gonçalves Roman-Tores** que acompanharam meus primeiros passos da carreira científica e me deram todo suporte e apoio necessários para que tudo isso acontecesse e aos professores **Victor Teixeira** e **Narciso Assunção**, por me mostrarem uma das áreas mais incríveis da odontologia, a qual me apaixonei e pretendo honrar em tudo que eu fizer.*

*Agradeço também a todos os funcionários do departamento, sempre com muito carinho e dedicação aos alunos, me ajudando nas burocracias e me salvando em vários momentos que precisei. Obrigada **Vinicius**, **Carlito** da secretaria . Agradeço também ao **Juvani** e **Elisa**, técnicos do laboratório do departamento, por me ajudarem com a pesquisa e estarem sempre prontos a responder dúvidas e auxiliarem nos processos do laboratório sempre com bom humor.*

*Agradecimento especial a todos os professores do Departamento, os quais passam seu conhecimento com muito prazer a todos os alunos. Apreendi muito com cada um de vocês e é uma honra ter vivenciado tudo isso ao lado de profissionais incríveis com ótima didática e amor pela odontologia. **Professora Karen Ortega**, **Prof. Décio Pinto Júnior**, **Prof. Fábio Daumas**, **Prof. Marília**, **Prof. Marina** e **Prof. Paulo Brás**.*

Agradeço a todos os meus colegas do departamento que, sempre que precisei me ajudaram prontamente. Obrigada pelo carinho, amizade, pelos cafés na copa, pelo

*cuidado do ensino quando precisei de respostas e pelo companheirismo. Em especial, aos meus colegas de sala, **Sthefany, Rodrigo, Rayza, Letícia e Juliana**. Obrigada por aturarem meus surtos de ansiedade e por sempre levantarem meu astral com palavras de conforto e muita risada sempre. Oh, baby baby, it's a wild world!*

*Agradeço também a todos os meus familiares. Ao **Sérgio Simplicio, Vitor Carli, Sergio de Melo, Natália Carli, Lilian Carli e Vovó Suely Carli**, que sempre estiveram por perto, mesmo agora que moro longe e sou consumida pela saudade todos os dias. Obrigada por sempre me apoiarem em tudo, por tentarem contato sempre que possível, pelas palavras de conforto, pelos abraços gostosos, pelo apoio financeiro (que eu sei que nunca foi fácil, mas vocês se dobraram em mil para me ajudar em tudo) e pelo incentivo que sempre recebi de vocês. Amo vocês imensamente.*

*Agradecimento especial à minha mãe **Priscila Carli**, que desde sempre preza pela minha educação e fez de tudo para me proporcionar uma carreira promissora e me incentivou a fazer o que eu amo e quero para minha vida. Mãe, obrigada por ser incrivelmente forte e ser um exemplo de mulher para mim. Mesmo com horas e horas que nos distanciam, em meio a fuso horário e idas e vindas, você sempre esteve presente. Te amo.*

*Agradeço também aos meus colegas de vida, os quais sempre me incentivaram, me acalentavam, escutavam meus desabafos, sempre tinham palavras de conforto e me acompanharam durante todo esse tempo. Minhas colegas de casa e de condomínio, **Lívia Santana, Brenda Lima e Gabriela Martins**, que me salvaram de muitos perrengues durante a pós-graduação e fizeram dessa minha mudança para São Paulo muito mais leve. Meus amigos **Bruno Credidio, Willena Celestino, Natalia Carli, Gabriele Passos, Thaís Pansani, Mariana Mancini, Ari Odolgan e Guilherme Costa**, que sempre com muito amor e risada, fizeram parte dessa minha nova fase e me mostraram como sou capaz de fazer qualquer coisa. O amor que sinto por vocês é imenso.*

*Por último, mas com certeza não menos importante, agradeço ao ser maravilhoso que essa cidade me trouxe e que participou intensamente da minha jornada. **José Vitor da Silva**, obrigada por me incentivar todos os dias, por estar sempre presente em cada decisão minha, pelas conversas sobre o futuro, sobre meus*

deveres, por me ajudar a clarear minhas ideias, me dar conselhos, pelo ombro amigo, por me reconfortar, por me ouvir, por passar seu tempo livre comigo, por me amar, me entender e sempre acreditar em mim, muitas vezes até mais do que eu. Você me faz querer melhorar cada dia mais. E me fez crescer e amadurecer em mil aspectos. Te amo demais da conta.

RESUMO

Frank KC. Gradações histológicas de malignidade: proposição de um novo método para análise em carcinoma epidermoide oral [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2019. Versão Original

O carcinoma epidermoide oral representa 90% das neoplasias malignas na cavidade oral. Por ser uma doença com grande incidência e de alto risco, é de suma importância entender como ela se manifesta, tanto clinicamente quanto histologicamente para obtenção de informações para elaborar o melhor tratamento e um prognóstico favorável para os pacientes. O sistema internacional mais utilizado para a classificação de tumores é o sistema de estadiamento clínico TNM. Porém, este sistema não garante uma análise morfológica e estrutural do carcinoma. Sendo assim, muitos pesquisadores têm dado atenção a este fato, elaborando gradações histológicas de malignidade a fim de auxiliar no tratamento e com o intuito de aumentar a qualidade de vida e prognóstico de pacientes com esta neoplasia. O objetivo do presente estudo foi avaliar o grau histológico de malignidade de 50 casos de carcinoma epidermoide oral localizados em língua, borda de língua e assoalho bucal por meio de sistemas de gradação histológica de malignidade por meio das gradações da Organização mundial da Saúde (OMS), de Brandwein-Gensler e Boxberg e relacionar seus resultados aos estudos mais recentes e morfológicos para enfim elaborar uma nova gradação com as características mais encontradas e discutidas. As 50 lâminas foram coradas com HE e analisadas sob microscópio óptico de luz. Resultados: OMS, 15 bem diferenciado, 26 moderadamente diferenciado e 9 pouco diferenciado, seguido de Boxberg com 18, 27 e 5, respectivamente e Brandwein-Gensler, classificando 22 em baixo risco, 11 em risco intermediário e 17 em alto risco. Em relação aos achados do estudo, concluímos que os diferentes achados na literatura que estão em discrepância a todo o momento podem ser diminuídos caso a combinação de parâmetros morfológicos comece a ser estabelecida em uma nova gradação que inclua aspectos diversos dos carcinomas orais.

Palavras-chave: Carcinoma Epidermoide, Gradação Histológica de Malignid:

ABSTRACT

Frank KC. Malignant histological grading system: proposal for an adjusted grading system for oral squamous cell carcinoma [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2019. Versão Original

Squamous cell carcinoma represents 90% of malignant neoplasms in the oral cavity. Since it is a disease with high incidence and high risk, it is important to understand how it manifests both clinically and histologically for obtaining information to develop the best treatment and prognostic for patients. The international system used for classification is the clinical TNM staging system. However, this system does not guarantee a morphological and structural analysis of carcinoma. Thus, many researchers have given attention to this fact, making histological grading systems in order to assist in the treatment and in order to increase the quality of life and prognosis of patients with this neoplasia. The aim of the present study was to evaluate the histological grade of malignancy of 50 cases of oral squamous cell carcinoma located in tongue and buccal floor through histological grading systems of The World Health Organization (WHO), Brandwein-Gensler and Boxberg and relate their results to recent studies and to draw a new morphological grading system. The 50 slides were stained with HE and analysed under optical microscope. Results: by WHO, 15 were well-differentiated, 26 moderately differentiated and 9 poorly differentiated. Boxberg with 18, 27 and 5 respectively and Brandwein-Gensler, with 22 low risk, 11 intermediated risk and 9 high risk. In relation to the findings of the study, we conclude that the different findings in the literature that are in discrepancy at all times and can be reduced if the combination of morphological parameters start being established in a new gradation that include several aspects of oral carcinomas.

Keywords: Epidermoid Carcinoma. Histological Grading System.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 5.1 - Sexo feminino e masculino	41
Gráfico 5.2 - Sítio das lesões	41
Gráfico 5.3 - Hábitos e vícios dos pacientes	41
Gráfico 5.4 - Distribuição dos casos de carcinoma epidermoide oral dos sistemas Boxberg, Brandwein-Gensler e OMS em bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pouco diferenciado	42
Figura 5.1 - Fotomicrografia exibindo o padrão de invasão de grandes ilhas tumorais (10x, H/E)	43
Figura 5.2 - Fotomicrografia exibindo o padrão de invasão de ilhas de qualquer tamanho (10x, H/E)	43
Figura 5.3 - Fotomicrografia exibindo o padrão de invasão de ninhos tumorais com >15 das células nos ninhos (10x, H/E)	44
Figura 5.4 - Fotomicrografia exibindo o padrão de invasão de ninhos tumorais exibindo ninhos com 5 a 15 células (10x, H/E)	44
Figura 5.5 - Fotomicrografia exibindo invasão de uma única célula (10x, H/E)	45

LISTA DE TABELAS

Tabela 2.1-	Sistema TNM para CEO envolvendo o tumor primário	26
Tabela 2.2-	Sistema TNM para CEO envolvendo linfonodos regionais.....	27
Tabela 2.3-	Sistema TNM para CEO envolvendo metástase à distância.....	27
Tabela 2.4-	Esquema simplificado das gradações histológicas de malignidade encontradas na literatura.....	31
Tabela 4.1-	Sistema de gradação histológica de malignidade de acordo com a OMS	38
Tabela 4.2-	Sistema de gradação histológica de malignidade proposto por Bradwein-Gensler.....	39
Tabela 4.3-	Sistema de gradação histológica de malignidade proposto por Boxberg.....	39
Tabela 6.1-	Sistema de gradação proposto pelo estudo	51

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Mm	Micrômetro
CEO	Carcinoma epidermoide oral
OMS	Organização Mundial da Saúde
SGHM	Sistema de gradação histológica de malignidade
TNM	Tumor, Nodo, Metástase.
USP	Universidade de São Paulo
Min	Minutos
BB	Boxberg
BG	Bradwein-Gensler

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	23
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	25
3	OBJETIVO	33
4	METODOLOGIA	35
4.1	Seleção das amostras	35
4.2	Critério de inclusão	37
4.3	Critério de Exclusão	37
4.4	Análise dos dados clínicos.....	37
4.5	Análise histológica	37
4.6	Análise estatística	40
5	RESULTADOS	41
6	DISCUSSÃO	47
7	CONCLUSÃO	53
	REFERÊNCIAS	55
	APÊNDICE	59
	ANEXO	61

1 INTRODUÇÃO

O câncer oral destaca-se como um dos tipos mais comuns e com a menor taxa de sobrevivência do mundo, sendo a 6ª região mais afetada por neoplasias malignas.^{1,2} Dados fornecidos pelo INCA em 2016 apontam que, no Brasil, houve um surgimento de 11.140 novos casos de câncer da cavidade oral em homens e 4.350 em mulheres, sendo assim, um dos tipos de neoplasias malignas mais comuns na população.^{3,4}

O carcinoma epidermoide oral (CEO) é uma neoplasia de origem epitelial, de caráter maligno e que corresponde a mais de 90% dos carcinomas que ocorrem na cavidade oral. Quanto à localização, o CEO pode acometer qualquer sítio, porém, os mais comuns são borda lateral de língua, assoalho bucal e palato. Álcool, tabaco e alterações moleculares são descritas como associadas à carcinogênese do carcinoma epidermoide.^{5,6}

Além disso, a agressividade da neoplasia pode estar relacionada a diversos fatores. Dentre eles, o grau histológico de malignidade. Os sistemas de gradação histológica têm como objetivo fornecer informações sobre o comportamento das neoplasias mediante características histológicas, podendo assim, auxiliar na escolha de tratamento adequado para cada tipo de paciente.

7

Existem diversos tipos de métodos a respeito de gradação tumoral. O sistema mais utilizado pelos patologistas é o método TNM, porém, suas limitações de olhar clínico podem ignorar algumas características histológicas e morfológicas importantes para o diagnóstico e elaboração de tratamentos.⁸

Através dos sistemas de gradação histológica de malignidade podemos analisar a invasão do tumor, o pleomorfismo celular, invasão de outras estruturas e até seu padrão de invasão. O sistema da Organização Mundial da Saúde têm sido o mais utilizado entre patologistas, porém existem outros diversos sistemas que podem auxiliar o profissional a analisar outras estruturas e características tumorais.⁹

Mediante as informações adquiridas pela revisão de literatura deste estudo, o objetivo do estudo foi avaliar, através dos sistemas descritos pela OMS, Brandwein-Gensler e Boxberg, o grau histológico de malignidade das amostras de carcinoma epidermoide oral com o intuito de analisar morfológicamente cada característica dos carcinomas de borda de língua e assoalho para discutir a arquitetura tumoral e suas limitações e vantagens para, assim, elaborar uma nova gradação que englobe diferentes e importantes características tumorais que sejam de grande importância para a análise no dia-a-dia dos patologistas. ^{8,9,10}

2 REVISÃO DE LITERATURA

O carcinoma epidermoide oral é a neoplasia mais frequente em região de cabeça e pescoço. Representa mais de 90% das neoplasias malignas orais e acomete mais comumente indivíduos do sexo masculino, com mais de 50 anos. A lógica mais provável deste dado se dá em razão ao período de maior exposição a hábitos e vícios de alto risco especificamente neste grupo. Dentre estes fatores, observa-se o tabagismo, consumo de álcool, infecções e até hábitos alimentares.¹

O carcinoma epidermoide oral (CEO) é uma neoplasia de origem epitelial, de caráter maligno e que corresponde a mais de 90% das neoplasias malignas que ocorrem na cavidade oral. Quanto à localização, o CEO pode acometer qualquer sítio, porém, os mais comuns são borda lateral de língua, assoalho bucal e palato. Álcool, tabaco e alterações moleculares são descritas como associadas à carcinogênese. Além disso, a agressividade das neoplasias pode estar relacionada a diversos fatores, dentre eles, o grau histológico de malignidade.^{1,3}

Clinicamente o CEO pode se apresentar de diversas formas. Pode ser semelhante a uma leucoplasia, leucoplasia verrucosa eritroleucoplasia ou uma eritroplasia ou qualquer lesão que eventualmente possa se transformar em uma úlcera necrótica com bordas elevadas e endurecidas. Geralmente são assintomáticas e apresentam sensibilidade dolorosa quando apresentam infecções secundárias. Lesões maiores podem interferir na qualidade de vida do paciente, impossibilitando atividades corriqueiras, como mastigar, deglutir e dificultar a dicção.² A prevenção consiste em evitar o consumo e hábito de fatores de risco citados e o fator determinante para um bom prognóstico depende do diagnóstico precoce da lesão, portanto, a inspeção de sítios da cavidade oral é muito importante para garantir o tratamento adequado e com maior eficácia.¹¹

Quanto ao tratamento, o primeiro passo é a remoção cirúrgica do tumor para prevenir recorrência e estabelecer um bom prognóstico para o paciente.

O acompanhamento é feito por uma equipe multidisciplinar a fim de reestabelecer a saúde do paciente, avaliando todas as possíveis abordagens para determinado caso. A modalidade do tratamento varia de acordo com o estágio, tamanho, localização, extensão, metástase e a natureza do carcinoma.

² As modalidades incluem a excisão do tumor, radioterapia, quimioterapia, imunoterapia ou a combinação de modalidades. Para casos mais avançados, a combinação de terapias (cirurgia + tratamento adjuvante) é mais indicada. A classificação mais adotada pelos profissionais da saúde para a caracterização de tumores é o método TNM.⁶

Mundialmente conhecido, o sistema de estadiamento clínico de tumores (TNM) é o método mais utilizado para classificar neoplasias e, assim, obter uma resposta clínica para iniciar o tratamento adequado para cada tipo de tumor e paciente. Porém, este método analisa o tamanho do tumor, metástase na região e metástases à distância, considerando o tumor em seu aspecto macro. Em neoplasias em boca, este método pode não ser o mais indicado para avaliação e tratamento do caso, fazendo-se necessário a busca de um método mais fidedigno, como é o caso das gradações histológicas de malignidade, que complementam o sistema TNM garantindo maior especificidade na análise da neoplasia maligna em questão.⁷

Tabela 2.1- Sistema TNM para CEO envolvendo o tumor primário

Tumor Primário	
TX	O tumor primário não pode ser avaliado
T0	Não há evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma in situ
T1	Tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão
T2	Tumor com mais de 4cm em sua maior dimensão
T3	Tumor com mais de 2cm e até 4cm em sua maior dimensão
T4a	Cavidade Oral: Tumor que invade estruturas adjacentes: Osso, músculo, seio maxilar ou pele da face
T4b	Tumor que invade espaço mastigador, laminas pterigoides ou base do crânio ou envolve artéria carótida interna.

Fonte: OMS⁸

Tabela 2.2- Sistema TNM para CEO envolvendo linfonodos regionais

Fonte: OMS⁸

Linfonodos Regionais	
NX	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausencia de metástase em linfonodos regionais
N1	Metástase em um único linfonodo homolateral, com mais de 3cm e até 6cm em sua maior dimensão
N2	Metástase em um único linfonodo homolateral, com mais de 3cm e até 6cm em sua maior dimensão, ou em linfonodos homolaterais múltiplos, nenhum deles com mais de 6cm em sua maior dimensão; ou em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior dimensão
N2a	Metástase em um único linfonodo homolateral, com mais de 3cm e até 6cm em sua maior dimensão
N2b	Metástase em linfonodos homolaterais múltiplos, nenhum deles com mais de 6cm em sua maior dimensão
N2c	Metástase em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com mais de 6cm em sua maior dimensão
N3	Metástase em linfonodo com mais de 6cm em sua maior dimensão

Tabela 2.3- Sistema TNM para CEO envolvendo metástase à distância

Metástase à distância	
MX	A presença de metástase à distância não pode ser avaliada
M0	Ausencia de metástase à distância
M1	Metástase à distância

Fonte: OMS⁸

Os sistemas de gradação histológica de malignidade têm o propósito de fornecer informações sobre o comportamento biológico de cada neoplasia, verificando a diferenciação celular, estrutura, queratinização, modo de invasão, resposta inflamatória, entre outros, com a finalidade de auxiliar na escolha de tratamento adequado para cada tipo de paciente. ^{8,9,10,12,13,14,15,16,17,18,19}

Até o momento do presente estudo, nenhum sistema de classificação histológica foi aceito universalmente para carcinomas orais.

Em 1920 surgiu o primeiro sistema de gradação histológica e, até os dias de hoje, parâmetros histológicos vêm sendo discutidos e aprimorados a

fim de garantir uma gradação que seja universal e propícia para um adequado tratamento e melhoria de prognóstico aos pacientes.¹⁵

Pioneiro na pesquisa de gradação histológica de malignidade em boca, Broders (1920) propôs em seu artigo, gradar os carcinomas com base no grau de diferenciação celular e determinou que a gradação fosse de um a quatro, independente da história clínica, indicando os graus de diferenciação por porcentagem de células neoplásicas diferenciadas.¹⁵

Consequentemente, Wahi et al.¹⁶, baseou sua pesquisa em um sistema que analisava a proliferação e a diferenciação das células tumorais. Tumores classificados em bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pouco diferenciado e Lund et al.¹⁷ elaboraram um sistema comparativo com oito parâmetros analisando resposta celular, diferenciação nuclear, mitoses, modo de invasão, invasão vascular, queratinização, profundidade de invasão e aparência.

Assim como Anneroth et al.¹⁸ que esquematizaram um sistema relativo à população celular do tumor, analisando mitoses, padrão de queratinização, aberrações nucleares, estrutura, modo de invasão, estágio de invasão e resposta inflamatória do tumor, dando maior enfoque em características do hospedeiro e não apenas em aspecto morfológico das células. Porém, as gradações anteriores se limitavam a biópsias incisionais.

Bryne et al.¹² descreveram um sistema de gradação a fim de melhorar o método já descrito por pesquisadores em anos anteriores e generalizar a gradação para biópsias incisionais e excisionais. Foi proposto que o sistema utilizasse apenas a área mais invasiva do tumor, denominada *front de invasão*. O sistema de gradação, inicialmente, consistia em cinco características morfológicas, sendo elas, o grau de queratinização, infiltração linfoplasmocitária, pleomorfismo, número de mitoses e o modo de invasão. Suas pontuações iam de 1 a 4. Segundo a hipótese de Bryne e colaboradores, o front de invasão é a área mais importante para a determinação do prognóstico da neoplasia maligna, considerando que cada parte do mesmo tumor apresenta áreas de diferentes características histológicas. No front, ocorrem fenômenos importantes para determinar o prognóstico do paciente, como migração celular,

angiogênese, secreção de enzimas e adesão celular.¹² Posteriormente, em outro estudo, Bryne et al¹³ avaliaram o prognóstico dos casos nos quais foram utilizados o SGHM e notou-se que o número de mitoses não apresentava modificações no prognóstico dos pacientes em relação ao método. Assim, reformularam o sistema utilizando apenas 4 parâmetros utilizando ainda o front invasivo, com os mesmos scores de 1 a 4.¹³

A OMS⁸ a fim de determinar um método mundial para as gradações histológicas de malignidade, propuseram uma gradação modificada semelhante à de Bryne, classificando os carcinomas entre bem diferenciado, com o tecido epitelial semelhante ao padrão normal, moderadamente diferenciado, exibindo um leve pleomorfismo nuclear e pouco diferenciado, apresentando queratinização, células imaturas e figuras mitóticas.⁸

No mesmo ano, Brandwein-Gensler et al.⁹ elaboraram uma gradação histológica baseada na análise de risco das espécimes apresentarem recidivas, apresentando três parâmetros histológicos: Padrão de invasão do tumor, agregado linfoplasmocitário e invasão perineural. Os escores variam entre 0 a 3, sendo classificados em baixo risco, risco intermediário e alto risco.⁹

Lindenblatt et al.⁶ avaliaram 53 casos de carcinoma epidermoide através dos sistemas Anerroth, OMS, Bryne e Brandwein-Gensler e correlacionaram seus resultados com dados clínicos. Os autores indicam que o sistema de Brandwein-Gensler demonstrou um aumento na sobrevida dos pacientes e mostrou melhores resultados em relação à sobrevida do tumor e do hospedeiro.⁶

Almangush et al.¹⁴ começaram a modificar e dar atenção a diferentes arquiteturas dos carcinomas epidermóides da cavidade oral. Os pesquisadores utilizaram o *front de invasão*, utilizado apenas duas características a serem observadas: grupos de células individuais ou ninhos de até 5 células tumorais e profundidade da invasão. Os resultados foram favoráveis, exibindo uma grande significância estatística na recorrência do tumor e sobrevida dos pacientes.¹⁴

A fim de dar enfoque a outros parâmetros, Boxberg et al.²⁰ propuseram um sistema de classificação histológica com forte impacto no prognóstico de pacientes com carcinoma epidermoide da cavidade oral baseado especificamente nos padrões arquiteturais dos ninhos de células tumorais e atividade de brotamento dos mesmos. Este sistema conta com dois parâmetros, sendo o primeiro o brotamento do tumor, que é definido como ramificações de ninhos tumorais e classificado entre menos de cinco células tumorais no estroma, de 1 a 15 células tumorais e mais de 15 células tumorais em ninhos em campos diferentes da lâmina. Subsequentemente, o segundo parâmetro analisa os ninhos de células tumorais, definidos como um agrupamento de células tumorais, classificados como grandes ninhos (>15 células tumorais), ninhos intermediários (5-15 células tumorais), pequenos ninhos (2-4 células tumorais) e invasão de uma única célula (sem nenhuma arquitetura de ninho, definida como células invasoras isoladas). O resultado final da gradação é baseado em um score dividindo os casos entre bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pouco diferenciado, variando de 2 a 7 pontos.²⁰

Em um estudo mais recente, Safi et al.²¹ apontaram o problema do estadiamento TNM não examinar características biológicas do CEO, mas que existe um há amplo consenso entre pesquisadores para considerar parâmetros adicionais, tais como a invasão perineural, invasão de vasos linfáticos e invasão de vasos sanguíneos. Portanto, propuseram uma gradação simples e direta com enfoque em invasão de outras estruturas além das mais comuns em todas as outras gradações. Os pontos vão de 0 a 1, sendo o menor indicando invasão não detectável e o maior apontando invasão perineural, vascular ou linfática. Por fim, os resultados dos pontos somados indicam o score (G1 a G4).²¹

Na rotina clínica, a classificação histológica utilizada entre os patologistas segue as diretrizes da Organização Mundial da Saúde e sua classificação de tumores de cabeça e pescoço. Até os dias atuais, a classificação com maior relevância a respeito de prognósticos favoráveis continua sendo o sistema TNM.⁷ Sendo o planejamento de tratamento uma das fases mais importantes e cruciais do processo de terapias e cura dos pacientes, a dependência e necessidade de maiores informações sobre o carcinoma

epidermoide oral se perpetuam até os dias de hoje, desencadeando uma série de estudos com enfoque em gradações histológicas que evidenciem bons resultados e prognósticos confiáveis.

A combinação de parâmetros histopatológicos para identificar pacientes de alto risco pode ser altamente bem-sucedida frente à redução de complicações terapêuticas. A combinação de parâmetros pode aumentar a precisão e confiabilidade de prognóstico em comparação ao uso de cada parâmetro separadamente.²²

Tabela 2.4- Esquema simplificado de gradações histológicas de malignidade encontradas na literatura.

Broders¹⁵	Wahi et al.¹⁶	Lund et al.¹⁷	Annerot et al.¹⁸
1920	1971	1975	1984
Sistema com base no grau de diferenciação de células neoplásicas (grau 1, 2, 3 e 4 indicando porcentagens diferentes de células indiferenciadas).	Baseada na proliferação e diferenciação das células tumorais. Tumores classificados em bem diferenciados ou grau I, moderadamente diferenciados ou grau II e pouco diferenciados ou grau III.	Sistema comparativo com 8 parâmetros (resposta celular, diferenciação nuclear, mitose, modo de invasão, invasão vascular, queratinização, profundidade de invasão e aparência),	Sistema relativo à população celular do tumor (numero de mitoses, padrão de queratinização, aberrações nucleares e estrutura, modo de invasão, estágio de invasão e inflamação).

Bryne et al.¹²	Bryne et al.¹³	OMS⁸
1989	1991	2005
Sistema caracterizado pelas características histológicas do FRONT de invasão (grau de queratinização, pleomorfismo nuclear, numero de mitose, padrão de invasão e infiltrado linfoplasmocitário).	Sistema caracterizado pelas características do FRONT de invasão (grau de queratinização, pleomorfismo nuclear, padrão de invasão e infiltrado linfoplasmocitário).	Parâmetros classificados em bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pouco diferenciado, analisando características como pleomorfismo nuclear, atividade mitótica e queratinização.

Brandwein-Gensler et al.⁹	Almangush et al.¹⁴	Boxberg et al.²⁰	Safi et al.²¹
2005	2015	2018	2019
Examina o impacto do limite de ressecção. Avaliado em pior padrão de invasão, infiltrado linfocitário e invasão perineural.	Baseado em dois parâmetros: ilhas de invasão tumoral e profundidade de invasão tumoral.	Sistema de classificação baseado em duas características: brotamento do tumor e tamanho dos ninhos de células tumorais.	Parâmetros com foco em vasos sanguíneos, vasos linfáticos e invasão perineural.

Fonte: Broders ¹⁵, Wahi et al.¹⁶, Lund et al.¹⁷, Annerot et al.¹⁸, Bryne et al.^{12,13}, OMS⁸, Brandwein-Gensler et al. ⁹, Almangush et al.¹⁴, Boxberg et al.²⁰ e Safi et al.²¹

3 OBJETIVO GERAL

O objetivo do presente estudo de caráter observacional foi desenvolver, por meio de diferentes critérios de gradações histológicas de malignidade já descritas, um método universal e completo a fim de analisar com maior confiabilidade, a determinação do grau histopatológico de carcinoma epidermoide da cavidade oral e compará-lo a sistemas já descritos separadamente.

4 METODOLOGIA

Este estudo foi conduzido com os preceitos determinados pela resolução 196/96 do Conselho Nacional de Saúde do Ministério da Saúde, publicada em 10 de outubro de 1996. O protocolo de pesquisa foi submetido ao comitê de ética em pesquisa da Universidade de São Paulo e, conforme o parecer nº 3.137.488 (Anexo 1) o projeto foi aprovado. O presente estudo foi realizado com o apoio da Coordenação de Aperfeiçoamento de pessoal nível superior-Brasil (CAPES) – Código de Financiamento 001.

4.1 SELEÇÃO DAS AMOSTRAS

O presente estudo de caráter experimental selecionou 153 blocos de parafina com diagnóstico de carcinoma epidermoide oral e, devido à critérios de exclusão, consistiu de uma amostra de 50 casos de carcinoma epidermoide oral (CEO) provenientes dos arquivos do Serviço de Patologia Cirúrgica Oral e MaxiloFacial da Faculdade de Odontologia Universidade de São Paulo (FOUSP), no período de 2017 a 2018, diagnosticados por meio de exame histopatológico. Dos casos selecionados, foram obtidos cortes histológicos consecutivos de 5µm e em seguida foram corados pelo método de hematoxilina e eosina.

As montagens de lâminas dos cortes histológicos foram executadas a partir do seguinte protocolo:

- Xilol 1 por 5 min
- Xilol 2 por 5 min
- Alcool absolute por 5 min

- Alcool 95% por 5 min
- Alcool 90% por 5 min
- Alcool 80% por 5 min
- Lavar em água corrente por 5 min
- Corar com Hematoxilina por 5 min
- Lavar em água corrente por 5 min
- Mergulhar na Eosina por 2 min
- Lavar rapidamente em água corrente
- Alcool 80% por 3 min
- Alcool 90% por 3 min
- Alcool 95% por 3 min
- Alcool absoluto por 5 min
- Xilol 1 por 5 min
- Xilol 2 por 5 min
- Montagem da lâmina

Após montagem de lâminas, os espécimes foram analisados sob microscópio ótico de luz para diferenciação das amostras em relação aos SGHM. As análises foram executadas por dois patologistas previamente calibrados e divergências de opiniões a respeito das características histológicas foram revisadas pelos mesmos a fim da obtenção de resultado.

As lesões selecionadas para o estudo foram de carcinoma epidermoide oral de assoalho bucal e borda lateral e ventre de língua, independente de sexo, etnia, idade ou características das lesões dos pacientes.

4.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram selecionados blocos de parafina com material suficiente para análise e ausência de fixação imprópria de biópsias confirmadas histopatologicamente de carcinoma epidermoide oral.

4.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO

Foram excluídos do estudo os casos nos quais os dados das fichas estavam incompletos (idade, tabagista, etilista e localização da lesão) e peças com quantidade insuficiente de material para a análise morfológica e para o estudo imuno-histoquímico. Serão também excluídos os cortes que contém uma extensa área de necrose.

4.4. ANÁLISE DOS DADOS CLÍNICOS

Os dados clínicos e epidemiológicos serão obtidos pelo prontuário eletrônico do Programa Laudo & Imagem do Departamento de Patologia da FOUSP e incluídos variáveis como: idade, gênero, etnia e história de consumo de álcool e/ou tabaco. Os dados epidemiológicos coletados dos prontuários dos 50 pacientes serão analisados através de testes estatísticos. As variações de gênero, etnia, hábitos e vícios e localização da lesão serão demonstrados através de gráficos.

4.5 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

A amostra selecionada foi fixada em formol a 10% e emblocada em parafina para obtenção dos cortes de 5µm de espessura para análise do corte tecidual em lâminas de vidro. Em sequência, foi submetida a coloração de hematoxilina e eosina e, posteriormente, foram examinadas por dois examinadores previamente calibrados para a análise histopatológica de acordo com os três sistemas de gradação (OMS, Brandwein-Gensler e Boxberg). Para o sistema OMS, as análises das lâminas foram efetuadas em toda a extensão do corte e classificados entre bem, moderadamente e pouco diferenciados.

Com base no modelo de Brandwein- Gensler, o padrão de invasão, infiltrado linfoplasmocitário e invasão perineural foram observadas em toda a extensão do corte. Os escores foram somados para a obtenção do resultado entre risco alto, médio e baixo. O sistema de Boxberg foi analisado em 400x no Microscópio xxx e as lâminas foram analisadas em cinco campos diferentes. Os escores foram somados para a obtenção de resultados que consistem em bem, moderadamente e pouco diferenciado.

Tabela 4.1- Sistema de gradação histológica de malignidade segundo a OMS⁸

Parâmetros	Bem diferenciado	Moderadamente diferenciado	Pouco diferenciado
Características	Numerosas pérolas córneas, arquitetura tecidual semelhante ao padrão normal do epitélio pavimentoso, queratinização, menos de duas mitoses por campo focado, escassez de células gigantes e pleomorfismo reduzido.	Pérolas córneas escassas ou ausentes, pouca queratinização, duas a quatro mitoses por campo, considerável grau de pleomorfismo e atividade mitótica.	Pérolas córneas raras, células imaturas, numerosas mitoses típicas e atípicas, ausência de queratinização, mais de quatro mitoses por campo, presença de células gigantes e pleomorfismo nuclear

Fonte: OMS⁸

Tabela 4.2. Sistema de gradação histológica de malignidade segundo o critério de Brandwein-Gensler et al.⁹

Características	0	1-2	3
Padrão de invasão	Bordas infiltrativas, bandas infiltrativas ou grandes ilhas separadas.	Pequenas ilhas (< 15 células)	Ilhas tumorais de qualquer tamanho, com 1mm de tecido normal entre estas e a interfacetumor/hospedeiro
Infiltrado linfoplasmocitário	Bandas contínuas	Placas descontínuas	Pouco ou nenhum
Invasão perineural	Ausente	Pequenos nervos (<1mm)	Nervos com >1mm de diâmetro

Gradação tumoral : Bem diferenciado (G1), Moderadamente diferenciado (G2), Pouco diferenciado (G3)

Fonte: Brandwein-Gensler et al.⁹

Tabela 4.3. Sistema de gradação histológica de malignidade segundo o critério de Boxberg et al. (2018)

Características	Classificação
Atividade das ilhas tumorais	Ausente (1) <15 (2) >15 (3)
Menores ninhos de células na região central do tumor	>15 células (1) 5-15 células (2) 2-4 células (3) Invasão de uma única célula (4)
<u>Gradação tumoral</u>	
Bem diferenciado (G1)	2-3
Moderadamente diferenciado (G2)	4-6
Pouco diferenciado (G3)	7

Fonte: Boxberg et al.²⁰

4.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos com as análises morfológicas foram digitados em planilha eletrônica Excel (Microsoft Office 2010) para análise através de porcentagem para avaliar os scores obtidos nas gradações histológicas escolhidas pelo estudo. As variáveis de idade, sexo, etnia e hábitos e vícios também foram analisadas e tabuladas pelo Programa Excel e exibidas em forma de gráficos. Por se tratar de um estudo observacional, não houve a necessidade de fórmulas estatística.

5 RESULTADOS

A amostra do estudo foi constituída de 50 casos de carcinoma epidermoide de língua, ventre e borda de língua. Todos os dados tabulados no programa para realização dos percentuais e tabelas escolhidos para o estudo. A análise descritiva dos dados clínicos de pacientes com carcinoma epidermoide de borda de língua e assoalho bucal, foi observado na amostra uma predileção por pacientes do sexo masculino (82%), seguido por 18% de pacientes do sexo feminino, com a média de idade de 59,9 anos. Entre os sítios escolhidos para o estudo, encontramos respectivamente em língua (46%), assoalho (28%) e borda de língua (26%). Entre os hábitos e vícios dos pacientes, encontramos 52% de tabagistas, 37% etilistas e 11% de pacientes ex-fumantes.

Gráfico 5.1 - Sexo feminino e masculino

Gráfico 5.2 - Sítio das lesões

Gráfico 5.3 - Hábitos e vícios dos pacientes

Fonte: O autor

Em relação à análise histológica, de acordo com a gradação da OMS, 15 casos foram diagnosticados como carcinomas de baixo grau de malignidade, 26 casos demonstraram ser moderadamente diferenciado e 9 pouco diferenciado.

De acordo com a gradação de Brandwein-Gensler, 22 casos foram diagnosticados como baixo risco, 11 de risco intermediário e 17 foram diagnosticados como alto risco. De acordo com a gradação de Boxberg, 18 casos foram detectados como bem diferenciado, 27 foram moderadamente diferenciados e 5 pouco diferenciados.

Gráfico 5.4- Distribuição dos casos de carcinoma epidermoide oral dos sistemas Boxberg, Brandwein-Gensler e OMS em bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pouco diferenciado

Fonte: O autor

Além das estruturas citadas nas gradações histológicas de malignidade, encontramos outras características dignas de nota, como acantólise, invasão perivascular, invasão glandular e invasão muscular.

Figura 5.1 - Fotomicrografia mostrando o padrão de invasão de bordas grandes lihas (10x, H/E)

Fonte: O autor

Figura 5.2 - Fotomicrografia mostrando o padrão de invasão de ilhas de qualquer tamanho (10x, H/E)

Fonte: O autor

Figura 5.3 - Fotomicrografia exibindo o padrão de invasão de ninhos tumorais com >15 das células nos ninhos (10x, H/E)

Fonte. O autor

Figura 5.4 - Fotomicrografia exibindo o padrão de invasão de ninhos tumorais com 5 a 15 células nos ninhos (10x, H/E)

Fonte: Autor

Figura 5.5 . Fotomicrografia exibindo invasão de uma única célula (10x, H/E)

Fonte: O autor

6 DISCUSSÃO

O carcinoma epidermoide da cavidade oral é um dos maiores problemas de saúde pública em todo mundo, constituindo 90% dos casos de neoplasias malignas na cavidade oral.^{1,2} De acordo com Nagpal e Das, 2003, a taxa de mortalidade excede, tendo uma das maiores taxas no mundo.²³ O perfil do CEO, de acordo com Shield et al. (2012) é de homens com média de idade entre 40-60 anos e fumantes. Em nosso estudo, os resultados mostram maior predileção pelo sexo masculino (82%) com a média de idade de 59,9 anos.²⁴ Na maioria dos estudos indicando incidência e perfil do carcinoma epidermoide,^{25,26} os pacientes tabagistas e etilistas ocupavam grande espaço na estatística que apontava indivíduos com CEO, assim como retrata o resultado de nosso estudo. De 50 casos, 52% dos pacientes eram tabagistas e 37% etilistas.

Até os dias atuais, o sistema TNM tem mostrado ser mais eficaz no diagnóstico e na elaboração de terapias para o tratamento desta doença. Porém, o sistema de estadiamento clínico não avalia as características biológicas do tumor.²⁷ Os diversos estudos elaborados para criar uma gradação que auxiliasse o patologista a elaborar tratamentos são executados desde 1920 e, até os dias de hoje, nenhuma delas faz parte de uma regra “padrão ouro” na análise histológica do câncer de boca. Alguns autores acreditam que essa se dá pelo fato de terem muitas características discutíveis e de diferentes objetivos na lesão.²⁸

Em estudos recentes, alguns pesquisadores estão em busca de biomarcadores que possam auxiliar na análise de comportamento do CEO ^{28,29} porém, até então, nenhum dos estudos garantiu com confiabilidade a execução de tal manobra para uso dos patologistas, além de ser mais um procedimento a ser executado para análise que não são usados no dia-a-dia de laboratórios e precisariam de mais tempo e etapas de execução. Portanto, é importante salientar e aprimorar modos de análise através da coloração de hematoxilina e eosina, que são mais adaptáveis e mais utilizados na rotina laboratorial de análise de lâminas.²⁸

Em nosso estudo, os graus histológicos de malignidade foram analisados em três gradações histológicas de malignidade, tendo como escolha a gradação proposta pela OMS⁸, que analisa a morfologia do tumor por características predominantemente tumorais (pleomorfismo nuclear, queratinização, mitoses e células gigantes), o de Bradwein-Gensler, analisando as características tumorais e também a resposta do hospedeiro (Agregado linfoplasmocitário, invasão perineural e padrão de invasão) e a gradação de Boxberg, que foge dos dois temas abordados nos dois tipos de gradação citados anteriormente (Brotamento das ilhas tumorais e tamanho de ninhos tumorais), focando especificamente na invasão e alastramento das células tumorais.^{9,20}

Dos SGHM escolhidos, o sistema proposto pela OMS apresentou maior porcentagem de casos moderadamente diferenciados, Lindenblatt et al.⁶ avaliando seus casos também com a gradação da OMS, aponta que em seus resultados houve uma associação estatisticamente significativa da sobrevida dos pacientes e o grau de malignidade.⁶ Alguns autores não observam esta significância estatística, não conseguindo correlacionar a sobrevida e metástase linfonodal com o grau histológico de malignidade do sistema proposto.^{30,31}

A falta de congruência de resultados nos estudos que utilizam apenas a gradação da OMS pode ser pelo fato dos parâmetros clínicos e associações serem vagos a respeito da característica do tumor, levando em consideração muitos aspectos que fogem do principal problema que indica maior risco ao paciente e trata de uma maneira mais geral as análises das lâminas. A própria organização recomenda a avaliação mais minuciosa dos patologistas, analisando características que não se encontram na gradação, tais como: infiltrado inflamatório, invasões em outras estruturas e padrão de invasão.³²

O sistema de Bradwein-Gensler apresenta apenas três escores que analisam o padrão de invasão, o infiltrado linfoplasmocitário e a invasão perineural. Este sistema foi o primeiro a mencionar a invasão perineural como fator agravante no processo de tratamento e prognóstico dos pacientes com CEO. Em nosso estudo, não encontramos sinais de invasão perineural nas

lâminas analisadas. De acordo com Brandwein-Gensler et al.⁹ a invasão perineural apresenta alerta à invasão em tecidos adjacentes, sendo muito importante esta análise para o obter um prognóstico favorável ao paciente. Entretanto, a análise em biópsias incisionais podem ser limitantes, pois não abrangem grande parte do tumor e não proporcionam a análise de tal estrutura.⁹

Diversos estudos fizeram análises de diferentes tipos de gradações e suas correlações. Lidenblatt et al.⁶ analisaram os sistemas de Anerroth, OMS, Brandwein-Gensler e Bryne e observaram os dados de sobrevida de pacientes. Os autores concluíram que o sistema de Brandwein-Gensler demonstrava uma maior fidedignidade em relação à sobrevida e prognóstico favorável.⁶ Marasecsu et al.³² avaliaram 54 casos de CEO com a junção de dois sistemas: Brandwein-Gensler e OMS. Seus resultados mostram que 33,33% dos casos foram classificados como bem diferenciado 44,44% dos casos foram de carcinomas moderadamente diferenciados e 22,22% foram de acordo com a gradação da OMS.³³ Com a gradação de Brandwein-Gensler, os resultados foram de 14,8% baixo risco, 50% de alto risco e 35,2% de alto risco. Neste estudo, revelam que apenas dois casos tiveram a presença de invasão perineural, Em nosso estudo, os resultados demonstraram ausência de invasão perineural.

A invasão perineural, mesmo sendo uma importante característica digna de nota para avaliação de casos de CEO, não é vista recorrentemente em casos de biópsia incisional, podendo este ser uma limitação para estudos que visam avaliar este tipo de invasão.³³

Kolokythas et al.³³ avaliaram 49 casos de CEO em língua através da gradação de Brandwein-gensler e sua aplicabilidade em pacientes tratados cirurgicamente para analisar o risco de recorrência do tumor. Em seus resultados, os pesquisadores relatam que 14 CEO pertenciam ao estágio 1 do sistema TNM, 10 ao estágio 2, 7 do estágio 3 e 18 do estágio 4, não encontrando correlação entre baixo risco e moderado/alto risco em estágios maiores (3-4) e menores (1-2).³⁴ Os resultados do sistema de risco de Brandwein-Gensler têm sido bastante conflitante, portanto não se há uma

definição de aprovação ou reprovação do método utilizado por si só em casos de CEO. ^{35,36,37}

Rodrigues et al.³⁵ também mostraram em seus resultados que o modelo de avaliação de Brandwein-Gensler aplicado sozinho não mostrou qualquer correlação entre parâmetros demográficos e clínicos do tumor. ³⁵

Em nosso estudo, houve uma grande porcentagem de casos de CEO moderadamente diferenciados, seguido de bem diferenciado e também não encontramos correlação entre parâmetros de gênero ou raça, estando em congruência com parte dos resultados de outros estudos encontrados na literatura. ^{36,37}

O sistema proposto por Boxberg et al.²⁰ vêm de outra linha de raciocínio, iniciada por Almangush et al.¹⁴ que indaga que a estrutura que deve ser analisada com maior atenção são às ilhas tumorais e como elas se apresentam nesta neoplasia. Almangush et al.²⁸, entretanto, têm a limitação de utilizar apenas biópsias excisionais e/ou bem delimitadas para a mensuração da profundidade do tumor. ¹⁴

Boxberg et al.²⁰ utilizaram uma gradação que era utilizada em carcinoma de pulmão que exibia um alto impacto no prognóstico dos pacientes. O resultado de seu estudo com 157 casos de CEO demonstrou uma significância estatística em sobrevida do paciente. ²⁰

Consequentemente, outros autores avaliaram a atividade das ilhas tumorais. ^{14, 38,39} Em nosso estudo, através da análise, notamos que a maioria dos casos pobremente diferenciados nos sistemas OMS eram bem pareados com o de Boxberg, mesmo sem nenhuma das características deles estarem na gradação um do outro. Para os patologistas do nosso estudo, a gradação de Boxberg, por analisar mais precisamente a atividade do CEO e seu padrão mais agressivo de invasão, pode ser uma das características mais importantes para análise histopatológica, além da segurança e da rapidez do método. Strieder et al.³⁷ também analisaram 53 casos de carcinoma epidermoide oral e correlacionaram com estágio T1 e T4 do tumor com um follow-up de 159.4

meses e relataram que a profundidade do tumor demonstrou um prognóstico favorável para tal.³⁷

Em grande parte dos estudos encontrados, os autores que utilizaram OMS e Brandwein-Gensler demonstram uma inconsistência e desconformidade com os resultados relatados.^{6,35,36,37} Alguns preveem uma melhora no prognóstico, outros não acham significância estatística em seus dados. A maioria dos casos das gradações de atividade de ilha tumoral ou profundidade de invasão demonstram maiores correlações.^{20,38, 39}

Com o intuito de melhorias nos sistemas de gradação e mediante todas as informações encontradas na literatura discutidas neste trabalho e análise de outras características que foram observadas nas lâminas de nosso estudo, decidimos propor um esquema de gradação que englobasse grande parte de características de gradações já elaboradas que possam promover uma análise mais minuciosa e concreta dos CEO.

Tabela 6.1- Sistema de gradação proposto pelo presente estudo.

Características	Análise
Padrão de invasão tumoral	1- Bordas infiltrativas 2- Grandes ilhas tumorais (>15) 3- Pequenas ilhas tumorais (<15) 4- Invasão de uma única célula tumoral
Queratinização	1- Perlas córneas em grande parte da extensão do corte 2- Pérolas córneas escassas e presença de regiões queratinizadas 3- Pouca queratinização 4- Ausência ou escassez de queratinização.

Infiltrado inflamatório	1- Abundante 2- Presente em áreas focais 3- Baixa presença de inflamação
Invasão perivascular	1- Ausente 2- Células tumorais invadindo a área central do vaso 3- Células tumorais circundando o vaso
Invasão Muscular, Glandular ou Ossea	1- Ausente 2- Presente
Invasão Perineural	1- Ausente 2- Presente
Pleomorfismo nuclear	1- Baixo 2- Médio 3- Alto

Fonte: O autor

Em relação ao score, dividimos os resultados entre baixo risco (de 1-2 pontos), risco intermediário (2-4 pontos) e alto risco (4-6 pontos). As escolhas dos parâmetros utilizados foram de acordo com a diversidade de características que podem influenciar no aumento da agressividade do tumor. O enfoque do nosso trabalho foi fazer com que a gradação conseguisse alcançar as diferenças morfológicas e também a reação do hospedeiro.

O intuito principal da elaboração da gradação, de acordo com as informações coletadas pelo estudo, foi garantir que a nossa gradação pudesse abranger um maior espectro de características principais e que representem a infiltração do tumor, bem como seu perfil de maior agressividade ou não, para que o patologista tenha um diagnóstico rápido e preciso e que dê enfoque maior no padrão invasivo das células neoplásicas.

7 CONCLUSÃO

Concluimos que nossos achados foram congruentes com artigos encontrados na literatura, mas também diverge de outros achados. A utilização de um só método de gradação não garante o prognóstico favorável ou equipara à sobrevida do paciente. Vimos também que muitos dos casos caracterizados como “moderadamente diferenciado” ou “bem diferenciado” poderiam indicar “alto risco” em outras gradações por apenas uma característica que os diferencia, porém que exercem diferentes tipos de ação no carcinoma epidermoide. Mediante nossa concepção de fatos inseridos neste trabalho, conseguimos modular uma gradação que utilizasse scores dando maior ênfase em invasão de estruturas adjacentes e invasão de pequenos grupos de células tumorais, apontando a gravidade de tais comportamentos e evidenciando a diferença de padrões de invasão de cada sistema histológico aqui apresentado.

REFERENCIAS

1. Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma overview. *Oral Oncol.* 2009; 45(4-5):301-8.2
2. van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncol.* 2009 Apr-May;45(4-5):317-23. doi:10.1016/j.oraloncology.2008.05.016. Epub 2008 Jul 31. Review.
3. Feller L, Lemmer J. Oral squamous cell carcinoma: Epidemiology, clinical presentation and treatment. *J. Cancer Ther.* 2012;3:263–8.
4. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro RJ: INCA, 2016.
5. Simpson DR, Mell LK, Cohen EE. Targeting the PI3K/AKT/mTOR pathway in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Oral Oncol.* 2015 Apr;51(4):291-8. doi: 10.1016/j.oraloncology.2014.11.012. Epub 2014 Dec 17. Review.
6. Lindenblatt Rde C, Martinez GL, Silva LE, Faria PS, Camisasca DR, Lourenço Sde Q. Oral squamous cell carcinoma grading systems--analysis of the best survival predictor. *J Oral Pathol Med.* 2012 Jan;41(1):34-9. doi: 10.1111/j.1600-0714.2011.01068.x. Epub 2011 Sep 8.
7. Sobin, LH, Witterkind CH. *TNM Classification of Malignant Tumours* - 6th ed. John Wiley & Sons, INC, 2002.
8. Cardesa A, Gale N, Nadal A, Zidar N. Squamous cell carcinoma. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D, eds. *World Health Organization classification of tumors: pathology and genetics of head and neck tumors*. Lyon: IARC Press; 2005, p.118.
9. 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.* 2005 Feb;29(2):167-78.

10. Boxberg M, Jesinghaus M, Dorfner C, Mogler C, Drecoll E, Warth A, et al. Tumour budding activity and cell nest size determine patient outcome in oral squamous cell carcinoma: proposal for an adjusted grading system. *Histopathology*. 2017 Jun;70(7):1125-37.
11. Petersen PE. Oral cancer prevention and control--the approach of the World Health Organization. *Oral Oncol*. 2009 Apr-May;45(4-5):454-60. doi: 10.1016/j.oraloncology.2008.05.023. Epub 2008 Sep 18. Review.
12. Bryne M. Prognostic value of various cellular and molecular features in oral squamous cell carcinomas: a review. *J Oral Pathol Med*. 1991;20:414-20.
13. 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*. 1989;18:432-37.
14. Almangush A, Coletta RD, Bello IO, Bitu C, Keski-Säntti H, Mäkinen LK, Kauppila JH, Pukkila M, Hagström J, Laranne J, Tømmola S, Soini Y, Kosma VM, Koivunen P, Kowalski LP, Nieminen P, Grénman R, Leivo I, Salo T. A simple novel prognostic model for early stage oral tongue cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2015 Feb;44(2):143-50. doi: 10.1016/j.ijom.2014.10.004. Epub 2014 Nov 11.
15. Broders AC. Squamous cell cancer of the lip: a study of five hundred and thirty-seven cases. *JAMA*. 1920; 74: 656–64.
16. Wahi, P.M. Tipos histológicos de tumores orales y orofaríngeos. Giebra: Organizacion Mundial de la Salud; 1971.
17. Lund C, Sosgaard H, Elbro S, O, Jørgensen K, Andersen AP. Epidermoid carcinoma of the tongue: histologic grading in the clinical evaluation. *Acta Radiol. Ther, Phys. Biol*. 1975; 14(6): 513-21.
18. 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.
19. Brandwein-Gensler M, Smith RV, Wang B, Penner C, Theilken A, Broughel D, Schiff B, Owen RP, Smith J, Sarta C, Hebert T, Nason R, Ramer M, DeLacure M, Hirsch D, Myssiorek D, Heller K, Prystowsky M, Schlecht NF, Negassa A. Validation of the histologic risk model in a new cohort of patients with head and neck squamous cell carcinoma. *Am J Surg Pathol*. 2010 May;34(5):676-88.
20. Boxberg M, Bollwein C, Jöhrens K, Kuhn PH, Haller B, Steiger K et al. Novel prognostic histopathological grading system in oral squamous cell carcinoma based on tumour budding and cell nest size shows high interobserver and intraobserver concordance. *J Clin Pathol*. 2019 Apr;72(4):285-94.

21. Safi AF, Grochau K, Drebber U, Schick V, Thiele O, Backhaus T et al. A novel histopathological scoring system for patients with oral squamous cell carcinoma. *Clin Oral Investig*. 2019 Jan 23. doi:10.1007/s00784-019-02804-4.
22. Kim EA, Kim YH, Kang HW, Yoon HY, Kim WT, Kim YJ et al. Lower Levels of Human MOB3B Are Associated with Prostate Cancer Susceptibility and Aggressive Clinicopathological Characteristics. *J Korean Med Sci*. 2015 Jul;30(7):937-42. doi: 10.3346/jkms.2015.30.7.937. Epub 2015 Jun 10.
23. Nagpal JK, Das BR. Oral cancer: reviewing the present understanding of its molecular mechanism and exploring the future directions for its effective management. *Oral Oncol*. 2003 Apr;39(3):213-21. Review.
24. 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. *CA Cancer J Clin*. 2017 Jan;67(1):51-64. doi:10.3322/caac.21384. Epub 2016 Oct 19.
25. Zavras AI, Douglass CW, Joshipura K, Wu T, Laskaris G, Petridou E, Dokianakis G, Segas J, Lefantzis D, Nomikos P, Wang YF, Diehl SR. Smoking and alcohol in the etiology of oral cancer: gender-specific risk profiles in the south of Greece. *Oral Oncol*. 2001 Jan;37(1):28-35.
26. Muwonge R, Ramadas K, Sankila R, Thara S, Thomas G, Vinoda J, Sankaranarayanan R. Role of tobacco smoking, chewing and alcohol drinking in the risk of oral cancer in Trivandrum, India: a nested case-control design using incident cancer cases. *Oral Oncol*. 2008 May;44(5):446-54. Epub 2007 Oct 22.
27. Costa Ade L, Pereira JC, Nunes AA, Arruda Mde L. [Correlation between TNM classification, histological grading and anatomical location in oral squamous cell carcinoma]. *Pesqui Odontol Bras*. 2002 Jul Sep;16(3):216-20. Portuguese.
28. Almangush A, Pirinen M, Heikkinen I, Mäkitie AA, Salo T, Leivo I. Tumour budding in oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis. *Br J Cancer*. 2018 Feb 20;118(4):577-86.
29. Sølund TM, Brusevold IJ. Prognostic molecular markers in cancer - quo vadis? *Histopathology*. 2013 Sep;63(3):297-308.
30. Silveira EJ, Godoy GP, Lins RD, Arruda Mde L, Ramos CC, Freitas Rde A, Queiroz LM. Correlation of clinical, histological, and cytokeratin profiles of squamous cell carcinoma of the oral tongue with prognosis. *Int J Surg Pathol*. 2007 Oct;15(4):376-83.

31. Kurokawa H, Zhang M, Matsumoto S, Yamashita Y, Tomoyose T, Tanaka T, Fukuyama H, Takahashi T. The high prognostic value of the histologic grade at the deep invasive front of tongue squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2005 Jul;34(6):329-33.
32. Ion Ciucă Mărășescu FI, Marasescu PC, Matei M, Florescu AM, Margaritescu C, Petrescu SMS, Dumitrescu CI. Epidemiological and Histopathological Aspects of Tongue Squamous Cell Carcinomas- Retrospective Study. *Curr Health Sci J*. 2018 Jul-Sep;44(3):211-24. doi: 10.12865/CHSJ.44.03.03. Epub 2018 Jul 15.
33. Kolokythas A, Park S, Schlieve T, Pytynia K, Cox D. Squamous cell carcinoma of the oral tongue: histopathological parameters associated with outcome. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2015 Sep;44(9):1069-74.
34. Li Y, Bai S, Carroll W, Dayan D, Dort JC, Heller K, et al. Validation of the risk model: high-risk classification and tumor pattern of invasion predict outcome for patients with low-stage oral cavity squamous cell carcinoma. *Head Neck Pathol*. 2013 Sep;7(3):211-23.
35. Rodrigues PC, Miguel MC, Bagordakis E, Fonseca FP, de Aquino SN, Santos-Silva AR, et al. Clinicopathological prognostic factors of oral tongue squamous cell carcinoma: a retrospective study of 202 cases. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2014 Jul;43(7):795-801.
36. Weijers M, Snow GB, Bezemer PD, van der Waal I. Malignancy grading is no better than conventional histopathological grading in small squamous cell carcinoma of tongue and floor of mouth: retrospective study in 128 patients. *J Oral Pathol Med*. 2009 Apr;38(4):343-7.
37. Strieder L, Coutinho-Camillo CM, Costa V, da Cruz Perez DE, Kowalski LP, Kaminagakura E. Comparative analysis of three histologic grading methods for squamous cell carcinoma of the lip. *Oral Dis*. 2017 Jan;23(1):120-5.
38. Jensen DH, Reibel J, Mackenzie IC, Dabelsteen E. Single cell migration in oral squamous cell carcinoma - possible evidence of epithelial-mesenchymal transition in vivo. *J Oral Pathol Med*. 2015 Oct;44(9):674-9.
39. Zhang P, Zhang L, Liu H, Zhao L, Li Y, Shen JX, et al. Clinicopathologic Characteristics and Prognosis of Tongue Squamous Cell Carcinoma in Patients with and without a History of Radiation for Nasopharyngeal Carcinoma: A Matched Case-Control Study. *Cancer Res Treat*. 2017 Jul;49(3):695-705

APÊNDICE A - Ficha do programa Microsoft Excel para tabulação de dados histológicos dos 50 casos de carcinoma epidermoide oral

ANEXO A- Aprovação do projeto na Plataforma Brasil e parecer do Comitê de Ética em Pesquisa.

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DA EMENDA**

Título da Pesquisa: ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DE VIMENTINA, E-CADERINA, N-CADERINA, SNAIL E TWIST E SUA CORRELAÇÃO COM SISTEMAS DE GRADAÇÃO HISTOLÓGICA DE MALIGNIDADE EM CARCINOMAS EPIDERMÓIDES ORAIS.

Pesquisador: Décio dos Santos Pinto Junior

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 03300718.0.0000.0075

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.137.488

Apresentação do Projeto:

O Carcinoma epidermoide oral é uma neoplasia de origem epitelial que representa um desafio devido a seu comportamento agressivo e capacidade metastática. Sua carcinogênese envolve um processo multifásico que consiste em diversas alterações genéticas que levam a desregulação da expressão de proteínas responsáveis pelas funções celulares. Em busca de biomarcadores que possam ser usados como fatores prognósticos,

juntamente com gradações histológicas de malignidade, este estudo tem por objetivo analisar pela técnica de imuno-histoquímica das proteínas Vimentina, E-caderina, N-caderina, Snail e Twist, 50 casos de carcinomas epidermóides orais provenientes dos arquivos dos serviços de Patologia Cirúrgica do departamento de Patologia Oral e Maxilofacial da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP), no período de 2008 a 2018.

Objetivo da Pesquisa:

Analisar a expressão das proteínas Vimentina, E-caderina, N-caderina, Snail e Twist em carcinomas epidermóides correlacionando com os sistemas de gradação histológica de malignidade proposto por Bryne (1998) e pela OMS (2005) e posteriormente comparar os dados encontrados buscando identificar a relação dos graus de expressão das proteínas analisadas com a progressão neoplásica.

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SÃO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br

Continuação do Parecer: 3.137.488

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

O presente estudo não apresenta riscos já que serão utilizadas lâminas de arquivo e não será possível a identificação dos pacientes.

Obter maior compreensão deste carcinoma de forma que consiga direcionar novas pesquisas para a busca de um ou mais proteínas que auxiliem no prognóstico para os pacientes e possibilitar a criação de um novo sistema de gradação histológica de malignidade que contemple todas as características desse carcinoma.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de uma emenda cuja a única alteração ocorrida neste projeto foi a inclusão de um membro na equipe de pesquisa a aluna Karine Carli Frank

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatório estão de acordo com as exigências da Resolução 466/12.

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final, utilizando-se da opção "Enviar Notificação" (descrita no Manual "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte - canto superior direito do site www.saude.gov.br/plataformabrasil).

Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "emenda" a este CEP, de forma objetiva e com justificativas para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_1293268_E1.pdf	04/02/2019 13:29:04		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.docx	22/11/2018 14:04:52	RAYZA RECHETNICOU	Aceito

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
 Bairro: Cidade Universitária CEP: 05.508-900
 UF: SP Município: SAO PAULO
 Telefone: (11)3091-7950 Fax: (11)3091-7814 E-mail: cepo@usp.br

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 3.137.488

Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	autorizacao.pdf	22/11/2018 13:16:32	RAYZA RECHETNICOU	Aceito
Folha de Rosto	Folha_de_Rosto.pdf	03/10/2018 14:16:36	RAYZA RECHETNICOU	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 08 de Fevereiro de 2019

Assinado por:
Maria Gabriela Haye Blazevic
(Coordenador(a))

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária CEP: 05.508-900
UF: SP Município: SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 Fax: (11)3091-7814 E-mail: cepfo@usp.br