

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO AMAZONAS**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**ANA PAULA FERREIRA DE SOUZA**

**EXPRESSÃO DE BIOMARCADORES PROTEICOS DO SISTEMA IMUNE (CD4 e  
CD8) EM CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE BOCA**

**MANAUS-AM**

**2025**

ANA PAULA FERREIRA DE SOUZA

EXPRESSÃO DE BIOMARCADORES PROTEICOS DO SISTEMA IMUNE (CD4 e CD8) EM CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE BOCA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Tatiana Nayara Libório Kimura

Coorientadora: Prof<sup>ª</sup>. Dra. Luciana Botinelly Mendonça Fujimoto

MANAUS-AM

2025

### Ficha Catalográfica

Ficha catalográfica elaborada automaticamente de acordo com os dados fornecidos pelo(a) autor(a).

S729e Souza, Ana Paula Ferreira de  
Expressão de biomarcadores proteicos do sistema imune (CD4 e CD8) em carcinomas epidermóides de boca / Ana Paula Ferreira de Souza . 2025  
91 f.: il. color; 31 cm.

Orientadora: Tatiana Nayara Libório Kimura  
Coorientadora: Luciana Botinelly Mendonça Fujimoto  
Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Federal do Amazonas.

1. Carcinoma de epidermoide. 2. Câncer oral. 3. Microambiente tumoral. 4. Linfócitos infiltrantes de tumor. I. Kimura, Tatiana Nayara Libório. II. Universidade Federal do Amazonas III. Título

ANA PAULA FERREIRA DE SOUZA

EXPRESSÃO DE BIOMARCADORES PROTEICOS DO SISTEMA IMUNE (CD4 e CD8) EM CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE BOCA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Amazonas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Aprovado em 18 de fevereiro de 2025, Manaus-AM

BANCA EXAMINADORA

**Presidente:** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup>. Tatiana Nayara Libório Kimura  
Universidade Federal do Amazonas

---

**Membro:** Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Naíza Menezes Medeiros Abrahim  
Universidade Federal do Amazonas

---

**Membro:** Prof.<sup>a</sup>. Dr.<sup>a</sup>. Lia Mizobe-Ono  
Fundação Centro de Controle de Oncologia do Amazonas

---

Ao meu pai, minha mãe, irmãos,  
cunhada e sobrinha, que sempre me  
incentivaram nesse caminho e na  
realização desse trabalho.

## AGRADECIMENTOS

Gratidão à Deus que, em Seu infinito amor e misericórdia, me escolheu e me capacitou para mais uma etapa acadêmica, me sustentando e conduzindo até aqui.

Gratidão ao meu pai, Paulo Sérgio, que sempre se esforçou, me apoiou e impulsionou nesse caminho da formação acadêmica. Gratidão à minha mãe, Valdeniza, que para mim representa força, persistência e amor, que também nunca mediu esforços para apoiar minha formação, obrigada pai e mãe que mesmo de longe, sempre se fazem presentes, no cuidado e preocupação para comigo, por me orientar e apoiar as minhas decisões.

Aos meus irmãos Hiel, Tayná e Geulane e cunhada Meire pela amizade, parceria e apoio e todo o incentivo durante essa jornada. Como também minha sobrinha Isadora Yarin, que mesmo tão pequena, foi minha alegria e motivação em todos os momentos.

À minha orientadora prof.<sup>a</sup> Dra. Tatiana Libório, por confiar em mim para realizar esse trabalho. Obrigada pela compreensão, paciência, por toda orientação e auxílio para o desenvolvimento desse trabalho.

À minha co-orientadora, prof.<sup>a</sup> Dra. Luciana Fujimoto, por toda orientação que agregou muito para essa pesquisa e sempre se disponibilizou a ajudar, acompanhando essa jornada.

À 11<sup>a</sup> Turma de mestrado do PPGO/UFAM, obrigada por me acompanharem nesse percurso e por serem presentes nas alegrias e nas dificuldades, obrigada por todo apoio de sempre.

À minha amiga, que a “Patologia” me deu, e minha veterana no mestrado, Tássia Mendes, que me acompanhou, apoiou nessa jornada, e também fez parte desse trabalho.

À querida graduanda do PIBIC, Juliana Roza por me auxiliar na realização desse trabalho.

Ao DPML/UFAM, CPDA e FCECON, por permitirem que a pesquisa fosse realizada e aos seus profissionais que me auxiliaram na realização da pesquisa. As queridas, técnica Fabíola e a Maria de Fátima, por toda disponibilidade, auxílio e ensinamentos com a técnica IHQ. Agradeço em especial a Gerência e aos Sócios do CPDA, por terem aberto as portas para mim, disponibilizando o laboratório, o que tornou possível esse trabalho.

À Universidade Federal do Amazonas - UFAM e ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia (PPGO/UFAM) por proporcionar essa valiosa oportunidade de crescimento profissional.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de estudos e à Fundação de Amparo à pesquisa do Estado do Amazonas - FAPEAM pelo apoio ao PPGO-UFAM.

## RESUMO

O carcinoma epidermóide de boca (CEB) é a neoplasia maligna mais comum da cavidade oral. O microambiente tumoral (TME) é composto de componentes provenientes tanto do tumor quanto do hospedeiro. As células imunes do TME, principalmente os linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) CD4+ e CD8+, além de outras, suprimem a proliferação de células malignas e desempenham um papel crucial na progressão do CEB. Esta pesquisa tem como objetivo caracterizar a expressão proteica das células imunes CD4+ e CD8+ bem como a quantidade de TILs no microambiente do CEB e sua relação com parâmetros clinicopatológicos e sobrevida dos pacientes. Este estudo caracterizou-se como observacional, tipo transversal, a partir de avaliações de amostras provenientes sobretudo de biópsias mas também peças cirúrgicas e casos diagnosticados como CEB entre janeiro de 2014 e dezembro de 2018, oriundos de um laboratório de patologia de Manaus/AM. Para tanto, as amostras foram submetidas à análise histopatológica incluindo classificação, grau de queratinização, disposição dos arranjos celulares, TILs e itens do Colégio Americano de Patologistas (estes últimos para as peças cirúrgicas). Todas as amostras foram posteriormente submetidas a imunohistoquímica com anticorpos contra linfócitos CD4 e CD8. Para análise estatística, foi utilizado o teste Qui-Quadrado de Pearson para verificar associações entre as variáveis analisadas, assim como a relação entre os densidade dos TILs e o infiltrado inflamatório. Curvas de Kaplan-Meier foram utilizadas para caracterização da sobrevida, tendo sido usada o teste de ANOVA de Kruskal-Wallis para associação entre variáveis clinicopatológicas em relação a sobrevida. Em todos os testes foi considerado um nível de significância de 5%. Um total de 20 amostras foram incluídas, sendo 75% (15) de CEBs bem diferenciados com 75% (15) dos casos contendo TILs elevados (entre 41% a 90%) em um contexto de intenso infiltrado inflamatório (50% dos casos). Foi observada uma correlação positiva entre TILs e infiltrado inflamatório ( $p=0,027$ ). Todos os casos apresentaram baixa frequência de linfócitos CD4+, ao passo que metade dos casos apresentaram baixa frequência de linfócitos CD8+ e outra metade alta frequência desse marcador, ou seja, 50% dos casos tiveram perfil CD4low/CD8low e 50% CD4low/CD8high, e 53% dos casos bem diferenciados apresentaram altos níveis de CD8. Não houve associação entre as características clinicopatológicas com o tempo de sobrevida. Os resultados do estudo ilustram que as amostras apresentam características clinicopatológicas clássicas de CEB convencional bem diferenciado contendo infiltrado intenso e TILs elevado. Não houve associação dos biomarcadores CD4 e CD8 com os parâmetros clinicopatológicos propostos nem com a sobrevida. No entanto, nota-se alta frequência do linfócito CD8 em células malignas do CEB, sobretudo em casos bem diferenciados, o que sinaliza seu papel citotóxico contra células tumorais com características histológicas mais favoráveis, apesar de também estarem com esse perfil na maioria das amostras com recidiva. Sugere-se a participação mais proeminente do linfócito T CD8 comparado com linfócito T CD4 como elemento inflamatório no contexto de Hallmark do câncer. Mais estudos são necessários para estabelecer a exata relação desses marcadores com parâmetros clinicopatológicos e com a sobrevida dos pacientes acometidos por CEB.

**Palavras-chave:** Carcinoma de epidermoide; câncer oral; microambiente tumoral; linfócitos infiltrantes de tumor.

## ABSTRACT

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the most common malignant neoplasm of the oral cavity. The tumor microenvironment (TME) is made up of components from both the tumor and the host. The immune cells of the TME, mainly CD4+ and CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes (TILs), as well as others, suppress the proliferation of malignant cells and play a crucial role in the progression of CEB. This study aims to characterize the protein expression of CD4+ and CD8+ immune cells as well as the amount of TILs in the CEB microenvironment and their relationship with clinicopathological parameters and patient survival. This is an observational, cross-sectional study, based on evaluations of samples mainly from biopsies, but also surgical specimens and cases diagnosed as CEB between January 2014 and December 2018, from a pathology laboratory in Manaus/AM. To this end, the samples were subjected to histopathological analysis including classification, degree of keratinization, arrangement of cellular arrangements, TILs and items from the College of American Pathologists (the latter for surgical specimens). All the samples were then subjected to immunohistochemistry with antibodies against CD4 and CD8 lymphocytes. For statistical analysis, Pearson's chi-square test was used to verify associations between the variables analyzed, as well as the relationship between TIL density and inflammatory infiltrate. Kaplan-Meier curves were used to characterize survival, and the Kruskal-Wallis ANOVA test was used to associate clinicopathological variables with survival. A significance level of 5% was considered for all tests. A total of 20 samples were included, 75% (15) of which were well-differentiated CEBs with 75% (15) of the cases containing high TILs (between 41% and 90%) in a context of intense inflammatory infiltrate (50% of the cases). A positive correlation was observed between TILs and inflammatory infiltrate ( $p=0.027$ ). All the cases had a low frequency of CD4+ lymphocytes, while half the cases had a low frequency of CD8+ lymphocytes and the other half a high frequency of this marker, i.e. 50% of the cases had a CD4low/CD8low profile and 50% a CD4low/CD8high profile, and 53% of the well-differentiated cases had high levels of CD8. There was no association between clinicopathological characteristics and survival time. The results of the study illustrate that the samples present classic clinicopathological characteristics of conventional well-differentiated CEB containing intense infiltrate and high TILs. There was no association between the CD4 and CD8 biomarkers and the proposed clinicopathological parameters or survival. However, there was a high frequency of CD8 lymphocytes in malignant CEB cells, especially in well-differentiated cases, which indicates their cytotoxic role against tumor cells with more favorable histological characteristics, although they also had this profile in the majority of samples with recurrence. The more prominent participation of the CD8 T lymphocyte compared to the CD4 T lymphocyte as an inflammatory element in the context of Hallmark cancer is suggested. More studies are needed to establish the exact relationship of these markers with clinicopathological parameters and with the survival of patients affected by CEB.

**Keywords:** Squamous cell carcinoma; oral cancer; tumor microenvironment; tumor-infiltrating lymphocytes.

## LISTA DE FIGURAS

**Figura 1:** Fluxograma do processamento laboratorial imunohistoquímico. DAB: diaminobenzidina .....34

**Figura 2:** Análise histopatológica e imuno-histoquímica de um caso de CEB de língua. (A): Corado em HE, caso bem diferenciado, categorizado com grau de queratinização 1 e intenso infiltrado inflamatório (40x). (B): que apresentou uma maior frequência de linfócitos infiltrantes do tumor, variando entre 41 a 90% (TILs high) (200x). (C): O caso apresentou baixa infiltração de células CD4+ (CD4 low) (200x). (D): E intensa infiltração de células CD8+ (CD8 high) que geralmente é vista no estroma tumoral (200x).....49

**Figura 3:** Análise imuno-histoquímica de dois casos de CEB. (A): O caso apresentou baixa infiltração de células CD4+ (CD4 low) (200x). (B): E intensa infiltração de células CD8+ (CD8 high) (200x). (C): Outro caso apresentou baixa infiltração de células CD4+ (CD4 low) (200x). (D): E com baixa infiltração de células CD8+ (CD8 low) (200x)....49

**Figura 4:** curva de sobrevida de Kaplan-Meier dos pacientes diagnosticados com CEB. (A): Curva de sobrevivência, a curva mostra a sobrevida até o evento – morte ocorrer, quanto mais o tempo aumenta, menos probabilidade de sobrevivência. Os participantes que não desenvolveram o evento até o final do estudo ou tiveram perda de acompanhamento são censurados (traços em vermelho). (B): Função de risco, a curva mostra o risco até o evento – morte ocorrer, quanto mais o tempo aumenta, maior probabilidade de morte. ....56

## LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Distribuição de frequências por características sociodemográficas e clínicas dos pacientes diagnosticados com CEB. ....46
- Tabela 2.** Distribuição de frequências por características histopatológicas e imunohistoquímica dos pacientes diagnosticados com CEB. ....48
- Tabela 3.** Relação entre as variáveis TILs e infiltrado inflamatório dos pacientes diagnosticados com CEB. ....50
- Tabela 4.** Distribuição de frequências por características histopatológicas das peças cirúrgicas dos pacientes diagnosticados com CEB. ....50
- Tabela 5.** Relação entre as características clinicopatológicas e os biomarcadores combinados dos pacientes diagnosticados com CEB. ....52
- Tabela 6.** Relação entre as características clinicopatológicas e os biomarcadores combinados com os casos de peça cirúrgica. ....53
- Tabela 7.** Relação entre as medidas de sobrevida e as características clinicopatológicas dos pacientes diagnosticados com CEB. ....55

## LISTA DE ABREVIATURAS

AJCC	American Joint Committee on Cancer
CAP	Colégio Americano de Patologistas
CEB	Carcinoma Epidermóide de Boca
CEC	Carcinoma Escamocelular
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa
CPDA	Centro de Procedimentos Diagnósticos da Amazônia
CTLs	Células T citotóxica
DAB	Diaminobezidina
DAC	Disposição de Arranjos Celulares
DC	Célula Dendrítica
DOI	Profundidade de Invasão
DPML	Departamento de Patologia e Medicina Legal
FCECON	Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas
GLOBOCAN	Observatório Global do Câncer
GQ	Grau de Queratinização
H&E	Hematoxilina e Eosina
HPV	Vírus do Papiloma Humano
IFN $\gamma$	Interferon- $\gamma$
INCA	Instituto Nacional do Câncer
NK	Célula Natural Killer
OMS	Organização Mundial da Saúde
OSCC	Oral squamous cell carcinoma
pMHC	Complexos de Histocompatibilidade Peptídeo-principal
POP	Protocolo Operacional Padrão
PPGO	Programa de Pós-Graduação em Odontologia
SAME	Serviço de Arquivo Médico e Estatísticas
STROBE	Strengthening the Reporting of Observational studies in Epidemiology
TCR	Antígeno de Células T
TILs	Linfócitos Infiltrantes de Tumores

TME	Tumor Microenvironment (microambiente tumoral)
TNF $\alpha$	Necrose tumoral- $\alpha$
TNM	Tumor, Nódulo, Metástase
Treg	Células T Reguladoras
UICC	International Union Against Cancer

## SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO .....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA .....	17
2.1 Câncer de boca: Carcinoma epidermóide de boca .....	17
2.3 Biomarcadores .....	22
2.4 TILs como marcadores prognósticos .....	23
3. OBJETIVOS .....	26
3.1 Objetivo Geral .....	26
3.2 Objetivos Específicos.....	26
4. METODOLOGIA .....	27
4.1 Desenho do estudo .....	27
4.2 Aspectos éticos.....	27
4.3 Local do estudo.....	27
4.4 Amostras.....	27
4.5 Critérios de Inclusão .....	28
4.6 Critérios de exclusão .....	28
4.7 Coleta de dados clínicos .....	28
4.8 Análise histopatológica.....	29
4.8.1 Grau de queratinização (GC) .....	30
4.8.2 Disposição de arranjos celulares (DAC).....	31
4.8.3 Análise dos TILs. ....	31
4.9 Imunohistoquímica .....	32
4.9.1 Técnica Imunohistoquímica .....	32
4.10 Análise dos biomarcadores .....	34
4.11 Análise estatística .....	35
5. ARTIGO.....	36
6. CONCLUSÃO.....	66
REFERÊNCIAS.....	67
ANEXO I – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA.....	72
APÊNDICE A – Ficha de Coleta dos Dados Clínicos.....	82
APÊNDICE B – Análise Histopatológica e Imunohistoquímica do Carcinoma Epidermoide de Boca (CEB).....	84
APÊNDICE C- Protocolo Operacional Padrão da Técnica Imunohistoquímica .....	87

APÊNDICE D - Tabela com dados histopatológicos e imunohistoquímicos dos 20 casos.....	90
---	----

## 1. INTRODUÇÃO

O Carcinoma Epidermóide de Boca (CEB) é uma neoplasia maligna com diferenciação escamosa que se origina do epitélio da mucosa (Muller; Tilakaratne, 2022). A etiologia dessa neoplasia é multifatorial e está frequentemente associada ao tabagismo, etilismo, que são os fatores etiológicos mais determinantes, principalmente quando atuam de forma sinérgica. Outros fatores associados incluem exposição excessiva à luz ultravioleta (para carcinomas labiais), dietas carentes de frutas e vegetais, má higiene bucal e mastigação de noz de areca (especialmente em populações asiáticas), e a infecção pelo Vírus do Papiloma Humano (HPV) também é descrita, em populações mais jovens (El-Naggar *et al.*, 2017; Leite *et al.*, 2018; Plizák *et al.*, 2019).

O perfil epidemiológico dos pacientes com CEB tem mudado ao longo do tempo, com acentuada variação regional, mas ainda há maior prevalência no sexo masculino, o que se deve à maior exposição a fatores de risco entre os homens. O carcinoma epidermoide de boca acomete geralmente indivíduos mais velhos, após a quinta década de vida. A apresentação clínica usual é uma úlcera indolor na borda da língua ou assoalho da boca (Leite *et al.*, 2018; Muller; Tilakaratne, 2022).

No cenário mundial o câncer de cavidade oral representa um importante problema de saúde e constitui a oitava neoplasia maligna mais comum (Louredo *et al.*, 2022; Perdomo *et al.*, 2016). No ano de 2022, dados do Observatório Global do Câncer (GLOBOCAN) da Organização Mundial da Saúde apontaram para o surgimento de 389.485 novos casos de câncer de lábio e cavidade oral em todo o mundo, com 188.230 óbitos (Bray Bsc *et al.*, 2024). No Brasil são observadas as maiores taxas de incidência de câncer de boca e orofaringe, segundo o Instituto Nacional do Câncer (INCA) estima 15.100 novos casos de câncer na cavidade oral para cada ano do triênio de 2023 a 2025, principalmente no sexo masculino, que chegam a ser três vezes maiores do que em outros países da América Central e do Sul. Segundo as estimativas do INCA no ano de 2023 no Amazonas foram cerca de 140 novos casos de câncer diagnosticado em cavidade oral (Ministério da Saúde Instituto Nacional de Câncer, 2023). Onde mais de 90% desses casos são representados pelo carcinoma epidermóide (Bray Bsc *et al.*, 2024; Louredo *et al.*, 2022; Perdomo *et al.*, 2016; Sung *et al.*, 2021).

Atualmente, o tratamento é geralmente baseado na ressecção cirúrgica do tumor primário, que pode ser seguida de radio e quimioterapia. A taxa de sobrevida

global é de menos de 60%, com prognóstico fortemente dependente do sistema de estadiamento TNM. O tamanho do tumor, bem como a presença e extensão das metástases linfonodais são bastante reconhecidos como os preditores mais importantes (Blatt *et al.*, 2017; Mesia *et al.*, 2021). Infelizmente, o estadiamento TNM não prevê consistentemente o prognóstico do paciente e pacientes com características clinicopatológicas idênticas podem ter resultados de sobrevivência muito diferentes. Portanto, há uma necessidade de indicadores prognósticos mais precisos que possam complementar o sistema de estadiamento TNM para orientar as decisões de tratamento em tempo hábil para pacientes com CEB (Wongpattaraworakul *et al.*, 2024).

A imunidade do hospedeiro desempenha um papel complexo, mas importante, na progressão do tumor, mas não está incluída no sistema de estadiamento TNM. Os linfócitos infiltrantes de tumores (TILs) fazem parte da resposta imune que desempenha um papel crítico no reconhecimento e eliminação de tumores (Ni *et al.*, 2020; Wongpattaraworakul *et al.*, 2024). Trabalhos anteriores mostraram que a presença de TILs pode afetar significativamente a sobrevivência do paciente em vários tipos de malignidades. Portanto, o estudo de TILs surgiu como um potencial candidato prognóstico para vários tipos de cânceres (de Ruiter *et al.*, 2017; Fu *et al.*, 2019; Ni *et al.*, 2020; Salgado *et al.*, 2014; Wongpattaraworakul *et al.*, 2024). A maioria dos TILs são células T, entre as células T, há subpopulações que incluem células T citotóxicas, células T auxiliares e células T reguladoras (Treg) (Tiwari; Trivedi; Lin, 2022). As células T citotóxicas, detectadas pelo marcador CD8, são particularmente importantes em sua função contra células cancerígenas. As células T CD8<sup>+</sup> lisam células cancerígenas e secretam citocinas tumorílicas para ajudar a erradicar tumores (Rosenberg; Huang, 2017; Wongpattaraworakul *et al.*, 2024). As células T auxiliares desempenham um papel crucial no suporte da função das células T citotóxicas por meio de vários mecanismos. Essas células secretam citocinas que promovem a diferenciação e proliferação de células T citotóxicas. Além disso, elas podem secretar citocinas tumorílicas em resposta às células dendríticas. O marcador CD4 é usado para identificar células T auxiliares, que são o subtipo mais frequente de células T CD4<sup>+</sup> (Tay; Richardson; Toh, 2020; Wongpattaraworakul *et al.*, 2024).

No câncer oral, o papel de outros componentes do microambiente tumoral (tumor microenvironment – TME), como infiltrado inflamatório, TILs e expressão de CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, ainda precisa ser melhor explorado. Portanto, é essencial caracterizar

o TME no CEB, entender seu perfil imunológico e analisar a influência de fatores clínicos e histopatológicos, bem como sua associação com a progressão da doença (de Souza *et al.*, 2022).

Nesse contexto, considerando a importância da caracterização do TME, este estudo tem como objetivo caracterizar a expressão proteica das células imunes CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> bem como a quantidade de TILs no microambiente do CEB e sua relação com parâmetros clinicopatológicos e sobrevida dos pacientes. Para isso, foi realizado um estudo observacional de casos diagnosticados com CEB, no período de janeiro de 2014 a dezembro de 2018, em um laboratório de patologia da cidade de Manaus.

## 2. REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 Câncer de boca: Carcinoma epidermóide de boca

O Carcinoma epidermoide de boca (CEB), ou ainda conhecido como carcinoma escamocelular, carcinoma espinocelular e carcinoma de células escamosas, é o 16º câncer mais comum em todo o mundo, respondendo por mais de 377.000 por ano, e mais de 177.000 óbitos, segundo dados do GLOBOCAN da OMS, no ano de 2020 (Muller; Tilakaratne, 2022; Sung *et al.*, 2021). O Brasil tem a maior incidência de câncer de boca e orofaringe da América Central e do Sul, e mais de 90% dos casos são representados pelo CEB (Louredo *et al.*, 2022).

O carcinoma epidermoide, espinocelular ou de células escamosas oral é uma neoplasia maligna com diferenciação escamosa, originando-se do epitélio da mucosa (El-Naggar *et al.*, 2017; Neville *et al.*, 2016). A etiologia dessa neoplasia é multifatorial, e está associado a fatores intrínsecos e extrínsecos ao indivíduo. Os fatores intrínsecos incluem idade, raça, sexo e suscetibilidade genética, enquanto os fatores extrínsecos incluem consumo de álcool, uso de tabaco, dieta pobre em frutas e vegetais, má higiene oral e noz de areca em algumas regiões geográficas. Historicamente, os fatores de risco mais significativos para CEB são fumar e beber principalmente quando atuam de forma sinérgica (Leite *et al.*, 2018; Plzák *et al.*, 2019). Embora a verdadeira prevalência permaneça uma questão de debate, a infecção por HPV de alto risco também foi descrita como um fator etiológico, sendo este importante para o carcinoma escamocelular (CEC) de orofaringe, não demonstrou ser um fator etiológico significativo no CEB (Leite *et al.*, 2018; Muller; Tilakaratne, 2022).

Embora o perfil epidemiológico tenha mudado ao longo do tempo, com variações regionais consideráveis, ainda há maior prevalência de câncer bucal entre o sexo masculino representando 70% dos casos (Muller; Tilakaratne, 2022; Sung *et al.*, 2021), o que é consequente à maior exposição a fatores de risco entre os homens (Leite *et al.*, 2018). O CEB geralmente afeta indivíduos mais velhos, após a quinta década de vida, com média de idade relatada de 62 anos. Contudo, nas últimas décadas, tem sido relatada uma incidência crescente entre jovens, da mesma forma, relatos mostram aumento da incidência em mulheres (Daroit *et al.*, 2023; Leite *et al.*, 2018).

Quanto a localização o CEB pode afetar qualquer área da cavidade oral. Os locais mais comuns são a língua principalmente em borda lateral e o assoalho da boca, outros locais também podem ser acometidos como a gengiva, mucosa jugal,

mucosa labial e palato duro (Daroit *et al.*, 2023; Leite *et al.*, 2018; Louredo *et al.*, 2022; Neville *et al.*, 2016). O CEB tem uma apresentação clínica variada, incluindo as formas exofítica (aumento de volume; vegetante, papilífera, verruciforme), endofítica (invasiva, escavada, ulcerada), leucoplásica (mancha branca), eritoplásica (mancha vermelha), eritroleucoplásica (combinação de áreas vermelha e branca). Sendo a apresentação clínica usual uma úlcera indolor na borda da língua ou no assoalho da boca (Daroit *et al.*, 2023; El-Naggar *et al.*, 2017; Leite *et al.*, 2018; Neville *et al.*, 2016). Os pacientes muitas vezes estão cientes de uma alteração de quatro a oito meses antes de procurar ajuda profissional. Os tumores iniciais podem muitas vezes ser sutis e assintomáticos, o que pode representar um desafio diagnóstico nesta fase clínica inicial. A dor pode ser responsável por 30 a 40% das queixas dos pacientes com CEC oral, que geralmente está relacionada a lesões em estágio clínico avançado (Leite *et al.*, 2018; Neville *et al.*, 2016).

Em um estudo sobre o câncer bucal, realizado por Daroit *et al.*, (2023) no estado do Rio Grande do Sul, através de dados retrospectivos de seis décadas de três laboratórios de patologia bucal, sendo uma universidade pública Universidade Federal do Rio Grande do Sul - UFRGS, uma universidade privada Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul - PUCRS, e uma instituição privada de Diagnóstico Oral (Centro de Diagnóstico Oral – CDB). Observaram um total de 53.065 diagnósticos histopatológicos foram revisados ao longo de 66 anos (1953-2019) nos três laboratórios. Destes, 986 eram tumores malignos. A média de idade da amostra foi de 58,31 anos, sendo composta por 71,4% de homens e 27,2% de mulheres, quando analisados apenas os casos de CEB, a média de idade foi de 58,13 em homens e 63,57 em mulheres. Considerando toda a amostra, o sítio anatômico mais acometido foi a língua com 257 (26%) dos casos, seguida do assoalho da boca com 153 (15,5%) e da mandíbula com 143 (14,5%). Quanto aos aspectos clínicos, a maioria das lesões foram úlceras em 484 casos (49%), seguidas de lesões exofíticas em 151 casos (15,3%) e leucoplasia em 102 casos (10,3%). Foram identificados 795 casos de CEB (80,5%).

Histopatologicamente o carcinoma epidermoide origina-se do epitélio displásico e é caracterizado por ninho, ilhas e cordões de células epiteliais malignas, que invadem o tecido conjuntivo subjacente, sem adesão ao epitélio superficial. As células neoplásicas exibem hipercromatismo, pleomorfismo nuclear e celular e aumento do número de figuras de mitoses típicas ou atípicas em diferentes graus de apresentação.

Observa-se ainda a formação e pérolas de queratina (focos arredondados de camadas concêntricas de células queratinizadas) produzidas no interior do epitélio neoplásico (El-Naggar *et al.*, 2017; Neville *et al.*, 2016). As células neoplasias podem além de invadir e destruir o tecido conjuntivo normal, se estender em profundidade para o tecido adiposo, músculo ou osso, podem romper o perineuro que envolve feixes de nervos (invasão perineural) ou conseguem invadir o lúmen das veias ou vasos linfáticos (invasão vascular). Frequentemente observa-se uma grande resposta inflamatória celular ou imune invadindo o epitélio, e a necrose pode estar presente. A neoplasia é capaz induzir uma densa fibrose (desmoplasia ou alteração cirrótica) e a neoformação vascular (angiogênese) (Neville *et al.*, 2016).

A graduação histopatológica é a classificação mais comum e usada rotineiramente para avaliar o grau do tumor no CEB convencional, sendo baseada no grau de semelhança com epitélio pavimentoso normal e a quantidade de produção de queratina, sendo denominados em bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pouco/mal diferenciado ou anaplásico, sendo este o menos frequente (El-Naggar *et al.*, 2017; Matsuo *et al.*, 2022; Neville *et al.*, 2016). Vários subtipos do carcinoma epidermóide são relatados, além do tumor convencional, os quais são o CEC basalóide, CEC de células fusiformes, CEC papilar, CEC adenoescamoso, CEC acantolítico e carcinoma cuniculatum, carcinoma verrucoso, carcinoma linfoepitelial e que podem ser encontrados em cavidade oral (El-Naggar *et al.*, 2017; Matsuo *et al.*, 2022). O valor da classificação histológica do CEB convencional é controverso, onde reconhece-se que a classificação microscópica por si só está pouco correlacionada com o resultado e a resposta ao tratamento. Além disso, o valor prognóstico da identificação de subtipos histológicos de CEB, que apresentam morfologia característica e comportamento específico, não foi claramente estabelecido (Pereira *et al.*, 2007).

O manejo do CEB é baseado na ressecção cirúrgica com ou sem tratamento adjuvante (por exemplo, radioterapia, quimiorradioterapia ou imunoterapia) (Almangush *et al.*, 2020). O tratamento e o prognóstico para pacientes com CEB são baseados principalmente na classificação TNM, um sistema internacional de estadiamento de malignidade que mede 3 parâmetros principais de um câncer: tamanho T ou extensão do tumor primário; N—número de linfonodos envolvidos; M — presença ou ausência de metástases (de Castro Ribeiro Lindenblatt *et al.*, 2012). Por muito tempo, esse sistema foi usado para estimar tanto a resposta clínica a terapia

quanto o resultado de sobrevida, mas alguns pacientes com CEB morrem apesar de terem neoplasias que foram consideradas clinicamente como estágio I ou II e tratadas de acordo (de Castro Ribeiro Lindenblatt *et al.*, 2012).

No atual estadiamento da American Joint Committee on Cancer (AJCC) e International Union Against Cancer - AJCC/UICC TNM (8ª edição, 2017), foram introduzidas duas mudanças importantes para o CEB, a saber, a incorporação da profundidade de invasão do tumor (depth of invasion - DOI) no estágio T e a incorporação da disseminação extracapsular no estágio N (Amin *et al.*, 2017). Estudos examinaram o desempenho da 8ª edição da AJCC em coortes independentes de CEB e a necessidade de mais desenvolvimento é reconhecida, pois esse sistema sozinho nem sempre prediz o resultado clínico, indicando que outros fatores relacionados ao paciente ou às características histopatológicas ou moleculares do tumor devem ser investigados (Almangush *et al.*, 2020; de Castro Ribeiro Lindenblatt *et al.*, 2012).

## **2.2 Microambiente tumoral e sistema imune**

A imunidade do hospedeiro desempenha um papel complexo, mas importante, na progressão do tumor, mas não está incluída no sistema de estadiamento TNM. Infelizmente, o estadiamento TNM não prevê consistentemente o prognóstico do paciente e pacientes com características clinicopatológicas idênticas podem ter resultados de sobrevivência muito diferentes (Wongpattaraworakul *et al.*, 2024). Esses desafios terapêuticos foram excessivamente atribuídos à capacidade das células malignas de sequestrar a maquinaria do hospedeiro para criar um nicho, ou seja, o microambiente tumoral para si mesmas, e modulá-lo progressivamente de respostas antitumorais para pró-tumorais (Tiwari; Trivedi; Lin, 2022).

O TME é um ecossistema dinâmico criado por células malignas composto por componentes contribuídos tanto pelo tumor quanto pelo hospedeiro. Este ecossistema atua como um depósito de fatores, incluindo quimiocinas, fatores de crescimento e citocinas. O nicho dinâmico deste ecossistema é necessário para a transformação do tumor. Ele é composto por componentes acelulares, como matriz extracelular e membrana basal, e componentes celulares, que incluem populações de células imunes e populações de células não imunes (Tiwari; Trivedi; Lin, 2022). As células imunes incluem macrófagos associados a tumores, neutrófilos associados a tumores, células dendríticas, Tregs, células assassinas naturais e linfócitos infiltrantes de

tumores (TILs). As células imunes do TME, principalmente TILs CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, suprimem a proliferação de células malignas e desempenham um papel crucial na progressão do câncer. O TME pode servir como um alvo imunomodulador eficaz para terapias anticâncer (Jeyapriya *et al.*, 2024; Tiwari; Trivedi; Lin, 2022). Trabalhos mostraram que a presença de TILs pode afetar significativamente a sobrevivência do paciente em vários tipos de malignidades. Portanto, o estudo de TILs surgiu como um potencial candidato prognóstico para vários tipos de cânceres (de Ruiter *et al.*, 2017; Fu *et al.*, 2019; Ni *et al.*, 2020; Salgado *et al.*, 2014; Wongpattaraworakul *et al.*, 2024).

Diferentes subconjuntos de linfócitos têm funções diferentes ou até mesmo opostas no microambiente tumoral. Entre as células T, há subpopulações que incluem células T citotóxicas, células T auxiliares e células Treg (de Ruiter *et al.*, 2017; Wongpattaraworakul *et al.*, 2024). As células T formam a principal linha de resposta imune adaptativa antitumoral no TME. Os TILs presentes na TME incluem células auxiliares CD4<sup>+</sup>, células T reguladoras CD4<sup>+</sup> FOXP3<sup>+</sup> imunossupressoras e células T citotóxicas CD8<sup>+</sup> (CTLs) (Tiwari; Trivedi; Lin, 2022).

As células T CD4<sup>+</sup> são células altamente versáteis e polifuncionais que constituem o segundo braço da imunidade adaptativa das células T ao lado de sua linhagem irmã de CTLs CD8<sup>+</sup>. As células T CD4<sup>+</sup> podem se diferenciar em um dos vários subtipos funcionais diversos em resposta a sinais dependentes do contexto, o que por sua vez permite que elas forneçam "ajuda" às células imunes efetoras apropriadas em seu papel principal como coordenadoras centrais da resposta imune. As células T CD4<sup>+</sup> mediam principalmente a imunidade antitumoral fornecendo ajuda para as respostas de anticorpos e CTL CD8<sup>+</sup>, bem como por meio da secreção de citocinas efetoras, como interferon- $\gamma$  (IFN $\gamma$ ) e fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF $\alpha$ ) e, em contextos específicos, por meio da citotoxicidade direta contra células tumorais (Tay; Richardson; Toh, 2020; Wahbi; Al Manadili, 2022).

As células T CD8<sup>+</sup> usam seus receptores de antígeno de células T (TCRs) para reconhecer complexos de histocompatibilidade peptídeo-principal (pMHC) apresentados na superfície da célula apresentadora de antígeno. O correceptor CD8 auxilia o reconhecimento do TCR ligando-se à mesma molécula MHC-I. Os linfócitos T citotóxicos, caracterizados pela expressão de CD8, têm a capacidade de atingir e destruir diretamente células tumorais por meio da ligação a moléculas de MHC de classe I. E também secretar citocinas tumoricidas para ajudar a erradicar tumores (Rosenberg; Huang, 2017; Wongpattaraworakul *et al.*, 2024). A presença de linfócitos

CD8+ no TME tem sido associada a um melhor prognóstico em muitos tipos de câncer, que atualmente também é um alvo importante de novas estratégias de tratamento (de Ruiter *et al.*, 2017).

### 2.3 Biomarcadores

A pesquisa em tecidos cancerígenos revelou que pode haver uma ligação entre as alterações no nível molecular e no nível do tecido que levam a alterações malignas no tecido e desempenham um papel fundamental na progressão da doença. A inferência que pode ser tirada é que um estudo do biológico moléculas envolvidas no mecanismo molecular da carcinogênese poderiam fornecer dados diagnósticos valiosos, ou seja, biomarcadores, sobre o processo da doença cancerígena (Santosh; Jones; Harvey, 2016).

Um biomarcador é definido como uma molécula biológica encontrada no sangue, outros fluidos corporais ou tecidos que é um sinal de um processo normal ou anormal, ou de uma doença como o câncer. Os biomarcadores desempenham um papel importante na distinção entre a presença ou ausência de doença. As alterações teciduais subjacentes no processo da doença podem ser categorizadas como expressões genômicas, proteômicas ou metabolômicas (Santosh; Jones; Harvey, 2016). Os biomarcadores incluem ácidos nucleicos, proteínas, peptídeos, alterações enzimáticas, anticorpos, metabólitos, lipídios e carboidratos. Os biomarcadores podem ser derivados de um ou de uma combinação dos seguintes fluidos corporais: sangue, soro, plasma, secreções corporais (expectoração, saliva) ou excreções (fezes, urina) (Almangush *et al.*, 2017; Santosh; Jones; Harvey, 2016).

Os biomarcadores podem ser usados para avaliação de pacientes em vários ambientes clínicos. Eles podem ser usados para estimar o risco de doença, rastrear cânceres primários ocultos, distinguir achados benignos de malignos, um tipo de malignidade de outro, determinar o prognóstico, atuar como preditores/triagem e monitorar o estado da doença. Como também podem ser usados para detectar recorrência ou determinar a progressão/resposta à terapia (Almangush *et al.*, 2017; Rivera *et al.*, 2017; Santosh; Jones; Harvey, 2016).

Pesquisas recentes no campo da patologia molecular introduziram milhares de biomarcadores tumorais, que estão associados à progressão e/ou prognóstico de diferentes tipos de câncer. Muitos desses biomarcadores foram avaliados quanto ao seu poder prognóstico no CEB. No entanto, o uso de qualquer biomarcador molecular

para CEB na prática diária ainda não foi aprovado, embora vários biomarcadores tenham sido apresentados como prognosticadores promissores que poderiam agregar valor aos clássicos, como estágio, grau do tumor e profundidade de invasão (Almangush *et al.*, 2017).

Em uma revisão sistemática e meta-análise da literatura, realizada por Almangush *et al.* (2017), sobre biomarcadores prognósticos imuno-histoquímicos para CEC de língua. No qual incluíram 174 estudos com 184 biomarcadores foram testados. E cinco biomarcadores incluindo p53, Ki-67, p16, fatores de crescimento endotelial vascular (VEGFs) e ciclina D1 foram avaliados com mais frequência nos trabalhos. Numerosos biomarcadores foram apresentados como prognosticadores úteis, mas a qualidade da condução e dos relatórios dos estudos originais é globalmente insatisfatória, o que não permite conclusões confiáveis. Assim a identificação de biomarcadores prognósticos robustos que possam prever com precisão o comportamento do CEB ajudará na seleção de estratégias de tratamento apropriadas (Almangush *et al.*, 2017; Rivera *et al.*, 2017).

## **2.4 TILs como marcadores prognósticos**

Os TILs foram demonstrados como biomarcadores prognósticos em vários tipos de câncer (de Souza *et al.*, 2022; Fu *et al.*, 2019; Salgado *et al.*, 2014). Entre as várias subpopulações fenotípicas de TILs, as células T são as mais abundantes. Vários estudos investigaram o valor prognóstico de TILs de células T CD4+ e CD8+ em carcinoma epidemóide de cabeça e pescoço (Borsetto *et al.*, 2021). Em tumores sólidos, os linfócitos T são observados como o principal componente do compartimento TIL, dos quais as células T auxiliares CD4+ e as células T citotóxicas CD8+ desempenham papéis essenciais (de Souza *et al.*, 2022; Wahbi; Al Manadili, 2022; Wongpattaraworakul *et al.*, 2024). A pesquisa demonstra que as células T CD4+, células T CD8+, células natural killer (NK), macrófagos de fenótipo M1 e células dendríticas (DCs) têm efeitos antitumorais. Uma interação coordenada e equilibrada desses subconjuntos é necessária para proteger o hospedeiro contra um tumor em desenvolvimento (Borsetto *et al.*, 2021).

A literatura relata vários estudos sobre a imunoexpressão dos TILs e sua relação com os parâmetros clinicopatológicos em CEBs, além do seu valor prognóstico (de Souza *et al.*, 2022; Jeyapriya *et al.*, 2024; Ni *et al.*, 2020; Wahbi; Al Manadili, 2022; Wongpattaraworakul *et al.*, 2024). Porém os estudos de

biomarcadores de CEBs com expressão de marcador TIL são contraditórios, onde alguns mostraram que a alta expressão de marcadores TIL selecionados (por exemplo, CD3, CD4, FOXP3 e CD8) estão associadas a características clinicopatológicas favoráveis do paciente e resultados de sobrevivência; e outros mostrando o resultado oposto ou nenhuma associação com resultados de sobrevivência (Hanakawa *et al.*, 2014; Jeyapriya *et al.*, 2024; Mukherjee *et al.*, 2020; Ni *et al.*, 2020; Wongpattaraworakul *et al.*, 2024).

Uma revisão sistemática e meta-análise realizada por Borsetto *et al.*, (2021), focou no papel prognóstico de populações elevadas de TIL CD4+ e CD8+ carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, relatando 28 estudos. Demonstrou que TILs CD4+ e CD8+ de alta densidade foram associados a melhores taxas de sobrevida geral em HNSCC. Embora as populações de TIL CD4+ e CD8+ se associem a melhor sobrevida geral em HNSCC, houve considerável heterogeneidade nos resultados entre diferentes subsítios anatômicos do tumor. Altos TILs CD4+ e CD8+ foram significativamente associados a melhor OS entre cânceres orofaríngeos e alto CD8+ foi associado a melhor sobrevida geral em cânceres hipofaríngeos. Em contraste, nem altos TILs CD4+ nem CD8+ foram associados a melhor OS para cânceres de cavidade oral, laringe ou hipofaríngeo.

Em um estudo realizado por Stasikowska-Kanicka *et al.*, (2017), em carcinoma epidermóide no assoalho de boca, observou que o número médio de células CD4+ foi significativamente aumentado no grupo de pior prognóstico em comparação aos grupos de melhor prognóstico e controle (mucosa normal). Já as células CD8+ foram significativamente mais numerosas no grupo de melhor prognóstico em comparação aos grupos de pior prognóstico e controle.

No estudo feito por Wahbi e Al Manadili A (2022), em 43 espécimes de ressecção de CEB, avaliando a expressão imune de CD8+ e CD4+ no estroma do CEB e suas relações com características clinicopatológicas e grau histológico de malignidade. Observaram que A infiltração de TILs CD4+ e CD8+ não foi significativamente associada à idade, sexo, tabagismo e estágio do tumor. E que CD4+ foi significativamente associado a tumores pouco diferenciados, já CD8+ não foi significativamente associado ao grau histológico do CEB. Já o estudo realizado por Jeyapriya *et al.*, (2024), em 75 amostras de CEB, observaram uma correlação positiva significativa entre TILs tumorais CD4+ e CD8+ no CEB. Quando ambas expressões

CD4+ e CD8+ foram comparadas com parâmetros clínicos como idade, sexo, tipo, hábito de fumar e local da lesão, não houve diferença estatisticamente significativa no padrão de expressão. No entanto, as expressões foram negativamente correlacionadas com o aumento do estágio do câncer ( $r = -2,37$ ,  $p = 0,041$  e  $r = -0,348$ ,  $p = 0,002$ , respectivamente). Quando comparada com a classificação histopatológica do tumor, a expressão de CD8+ teve uma correlação positiva com o aumento do grau ( $r = 0,288$ ,  $p = 0,012$ ). Outros parâmetros histopatológicos como invasão perineural, invasão linfovascular ou padrão de invasão não mostraram nenhuma correlação para as expressões de CD4+ e CD8+.

### **3. OBJETIVOS**

#### **3.1 Objetivo Geral**

Caracterizar a expressão de biomarcadores proteicos do sistema imune (CD4 e CD8) em CEBs.

#### **3.2 Objetivos Específicos**

- Caracterizar o perfil epidemiológico de pacientes com CEB;
- Graduar o CEB segundo a classificação da OMS, bem como estratificar suas variantes histológicas.;
- Caracterizar os biomarcadores CD4 e CD8 e TILs nos CEBs;
- Associar os achados clínicos, morfológicos e a expressão dos biomarcadores dos pacientes com CEB;
- Comparar os aspectos clínico-patológicos e a sobrevida dos pacientes com CEB;
- Descrever a sobrevida dos pacientes, correlacioná-la com a expressão dos biomarcadores analisados.

## **4. METODOLOGIA**

O trabalho segue essa temática de carcinogênese, na busca de biomarcadores para o CEB, abrangendo assim o presente e, futuros projetos de mestrado e PIBIC's.

### **4.1 Desenho do estudo**

O estudo consiste de uma pesquisa observacional, transversal, retrospectivo e também de sobrevivência. A recomendação *Strengthening the Reporting of Observational studies in Epidemiology* (STROBE), que constitui um conjunto de itens para estudos observacionais, foi utilizada para conduzir esta pesquisa (Cuschieri, 2019).

### **4.2 Aspectos éticos**

Esse trabalho está vinculado a linha de pesquisa de carcinogênese oral, na qual está dentro da linha de biopatologia do Programa de Pós-Graduação de Odontologia (PPGO). E faz parte do projeto amplo "BIOMARCADORES PROTEICOS DE AGRESSIVIDADE EM CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE BOCA", o qual foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP) da Universidade Federal do Amazonas e foi aprovado com o número CAAE 77091324.2.0000.5020 e número do parecer 6.648.099 (ANEXO I).

### **4.3 Local do estudo**

A pesquisa foi realizada no Laboratório de Anatomia Patológica do Departamento de Patologia e Medicina Legal - DPML/UFAM. Alguns casos, os dados foram complementados junto ao Serviço de Arquivo Médico e Estatísticas – SAME da Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas (FCECON). As reações imunohistoquímicas foram realizadas no laboratório particular Centro de Procedimentos Diagnósticos da Amazônia Ltda (CPDA).

### **4.4 Amostras**

A amostragem foi por conveniência constituída de pacientes adultos diagnosticados com CEB, no período entre janeiro de 2014 e dezembro de 2018, que obedeceram aos critérios de elegibilidade. Para isso foram consideradas as informações de prontuários, requisições de exames histopatológicos e amostras histopatológicas (lâminas histológicas), provenientes do laboratório de patologia DPML, dos pacientes diagnosticados com CEB. Neste estudo foram utilizados blocos de parafina e lâminas histopatológicas, localizadas após a identificação dos casos a

partir dos dados de prontuário e requisições de exames histopatológicos, a qual o material encontrado para avaliação constituía-se de produtos de **biópsias representativas** e/ou **peças cirúrgicas** (remoção total da lesão neoplásica). Os blocos de parafina e lâminas foram avaliados quanto a sua qualidade para serem incluídos ou não no estudo, conforme os critérios de elegibilidade.

#### **4.5 Critérios de Inclusão**

- A presença de CEB (incluindo língua, assoalho da boca, gengiva, mucosa jugal, palato duro, trígono retromolar) em pacientes de ambos os sexos, com idade acima de 18 anos, diagnosticados com CEB mediante laudo histológico, podendo ser o CEB convencional ou suas variantes, no período de janeiro de 2014 a dezembro de 2018;
- Prontuário/Requisição de exames histopatológico de pacientes provenientes do laboratório de Patologia DPML/UFAM, com lâminas histopatológicas e/ou blocos de parafina obtidos de peças cirúrgicas e/ou biópsias incisoriais representativas para análise, no período de janeiro de 2014 a dezembro de 2018;
- Pacientes em acompanhamento na FCECON com diagnóstico de CEB primário e/ou sua recidiva (em que a biópsia estiver disponível para comparação), no período de janeiro de 2014 a dezembro de 2018;
- Pacientes que tenham acompanhamento preferencial de 5 anos para análise de sobrevida;

#### **4.6 Critérios de exclusão**

- Prontuário/ Requisição de exame histopatológico sem informações suficientemente documentadas para coleta dos dados clínicoepidemiológicos com informações incompletas do paciente ou do espécime.
- Não localização dos blocos de parafina, ausência de representatividade do tumor no bloco de parafina.

#### **4.7 Coleta de dados clínicos**

Para caracterizar o perfil epidemiológico e clínico de pacientes, as informações foram extraídas de prontuários médicos/requisição de exame histopatológico, a partir

de uma busca ativa de pastas do arquivo do laboratório. Para complementação de alguns dados foi realizado um levantamento junto ao Serviço de Arquivo Médico e Estatísticas (SAME), da Fundação Centro de Controle de Oncologia do Estado do Amazonas – FCECON. Para coleta dos dados foi construído um formulário de coleta (APÊNDICE A), onde foram preenchidos os seguintes dados:

- Condições sociodemográficas: idade, sexo, estado civil, escolaridade, ocupação, naturalidade e cor da pele.
- História médica: Tabagismo, etilismo, sinais e sintomas.
- Características clínicas e anatomopatológicas: data do diagnóstico, grau histopatológico ou variante histológica do CEC, sítio anatômico da lesão, estadiamento patológico, tratamento, recidiva, seguimento e tempo de vida após o diagnóstico.

#### **4.8 Análise histopatológica**

As lâminas histológicas coradas em Hematoxilina e Eosina (H&E), dos casos referentes as biópsias incisionais e peça cirúrgica dos casos de CEB, foram examinadas microscopicamente, suas características histopatológicas, foram inseridas em um formulário (APÊNDICE B). A leitura das lâminas histológicas foi realizada no DPML/UFAM, por 2 patologistas previamente treinados quantos aos parâmetros da avaliação histopatológica de cada elemento. Para iniciar a avaliação das lâminas histológicas, foi mensurado o tamanho da área de tecido presente na lâmina a ser avaliada, com o auxílio de uma régua milimetrada. Primeiramente foi identificado a Classificação histopatológica do CEC, segundo a OMS (2022) em:

- CEC Convencional:
  - Bem diferenciado
  - Moderadamente diferenciado
  - Pouco diferenciado
- Variantes histopatológicas do CEC: Acantolítico;
- Basalóide;
- Adenoescamoso;
- Papilar;
- Linfoepitelial;
- Células fusiformes (sarcomatoide);
- Cuniculatum;

- Verrucoso.

Os seguintes parâmetros foram analisados para todos os casos tanto biópsias, quanto peças cirúrgicas: grau de diferenciação, conforme a classificação da OMS; padrão e perfil inflamatório sendo classificados como infiltrado leve, moderado ou intenso, independentemente de o infiltrado ser estromal ou não; Presença e grau de queratinização (Anneroth et al.; (1987) e Bryne et al.; (1992), Disposição dos arranjos celulares, de acordo com características observadas em Libório et al., (2011), e análise dos TILs, baseada em uma versão modificada dos protocolos descritos no “International TILs Working Group 2014” e no “VENTANA PD-L1 protocol (SP142) Assay for Triple Negative Breast Carcinoma”, com foco no infiltrado inflamatório presente no estroma da lesão como foi realizada por de Souza et al. (2022).

Para os casos provenientes de peça cirúrgica foram avaliados os itens que compõem as recomendações do guia elaborado pelo Colégio Americano de Patologistas, de acordo com a AJCC/UICC 8ª edição, coletadas a partir das informações do laudo histológico e confirmadas com a análise histopatológica, a qual inclui as dimensões máximas do tumor, DOI, invasão linfática e / ou vascular, infiltração perineural, status das margens do tumor, status de linfonodos regionais e o estadiamento patológico. O DOI foi definido como a distância máxima da membrana basal até a margem mais profunda do tumor, esse parâmetro foi medido com a realização uma marcação com pincel de ponta fina, na lâmina histológica, na região correspondente a margem da membrana basal e na margem mais profunda do tumor durante a visualização ao microscópio, e depois foi realizado a mensuração da distância entre as duas marcações com uma régua milimetrada.

#### **4.8.1 Grau de queratinização (GC)**

Os seguintes elementos tumorais foram avaliados e categorizados:

Para avaliação da queratinização, foram considerados os critérios utilizados por Anneroth et al., (1987) e Bryne et al.; (1992):

- Grau 1: Neoplasia altamente queratinizada, onde mais de 50% das células exibem queratinização;
- Grau 2: Moderadamente queratinizado (20%-50% das células);
- Grau 3: Queratinização mínima (5%-20% das células);
- Grau 4: Sem queratinização (0%-5% das células).

A classificação da queratinização foi mensurada independente se a queratina aparecia como células queratinizadas individualmente ou na forma de pérolas de queratina dentro da população de células tumorais. Para essa avaliação foi realizada uma estimativa do percentual da presença de queratina, na área de tumor presente na lâmina avaliada, com a objetiva 4x do microscópio óptico (OPTICAM, O400S).

#### **4.8.2 Disposição de arranjos celulares (DAC)**

Considerando que as células escamosas do CEB podem estar arranjas em diferentes padrões, a análise histopatológica para este item foi avaliada e indicado o padrão predominante utilizando a objetiva de 4x e 10x, do microscópio óptico, de acordo com características observadas em Libório et al., (2011):

- Lençóis: Para esse padrão foram considerados as áreas com grandes grupamentos de células escamosas, com ou sem área de queratinização, sem muitas áreas de estroma permeando a área do tumor.
- Ilhas: Esse padrão compreendeu os casos em que as células se encontravam arranjas em grupo, e permeados de estroma, lembrando ilhas ou ilhotas de células, com ou sem presença de queratinização.
- Cordões: Padrão em que as células escamosas estavam arranjas em grupos, com disposição enfileiradas, com ou sem presença de queratinização, e permeados de estroma.
- Ninhos: Pequenos grupamentos de células escamosas, com ou sem presença de queratinização, e permeados de estroma.
- Células isoladas

#### **4.8.3 Análise dos TILs.**

Para todos os casos tanto de biópsias quanto de peças cirúrgicas foi realizada a análise dos TILs conforme feito por Souza et al., (2022), a qual foi baseada em uma versão modificada dos protocolos descritos no “International TILs Working Group 2014” e no “VENTANA PD-L1 protocol (SP142) Assay for Triple Negative Breast Carcinoma”, com foco no infiltrado inflamatório presente no estroma da lesão. As etapas de avaliação incluíram:

- Foram analisadas células localizadas no compartimento estromal dos tumores ou áreas peritumorais, limítrofes à lesão;

- Quaisquer infiltrados inflamatórios em áreas distantes do estroma ou da margem do tumor foram excluídos da análise;
- Foram considerados TILs quaisquer tipos de leucócitos que estivessem na área acima mencionada, incluindo mononucleares e polimorfonucleares, desde que não fossem considerados restos celulares, nem estivessem em áreas de necrose ou artefatos;
- Os cortes avaliados tinham espessura de 4 µm e foram analisados em aumento de 200x, de forma panorâmica, sem considerar o hot spot, para não mascarar a real quantidade de infiltrado inflamatório em todo o estroma tumoral;
- As análises foram realizadas em consenso por pelo menos dois patologistas. Os casos discrepantes foram revisados e reclassificados;
- A análise quantitativa de TILs varia de 0% a 90%. Os casos foram então subcategorizados como TILs <sup>baixos</sup> – 0% a 40% e TILs <sup>altos</sup> – 41% a 90%.

#### **4.9 Imunohistoquímica**

Amostras de tecido contendo seções de 4 µm de espessura em lâminas silanizadas foram submetidas à reação de imunohistoquímica para determinar individualmente a expressão de células CD4, CD8. O qual foi realizado no Laboratório particular Centro de Procedimentos Diagnósticos da Amazônia LTDA (Laboratório CPDA). Os marcadores foram otimizados previamente, antes de serem realizadas as reações nos casos de CEB. Para cada reação foi elaborada um mapa de lâminas de reação imunohistoquímica, o qual era composto por um controle positivo e os casos de CEB. Os controles positivos de todas as reações de imuno-histoquímica foram constituídos por amostras de tecido de amígdalas, cujas condições metodológicas foram as mesmas dos casos. Ao término de cada reação foi anotado em tabela de Excel (versão 2019) os resultados de qualidade de marcação de cada lâmina.

##### **4.9.1 Técnica Imunohistoquímica**

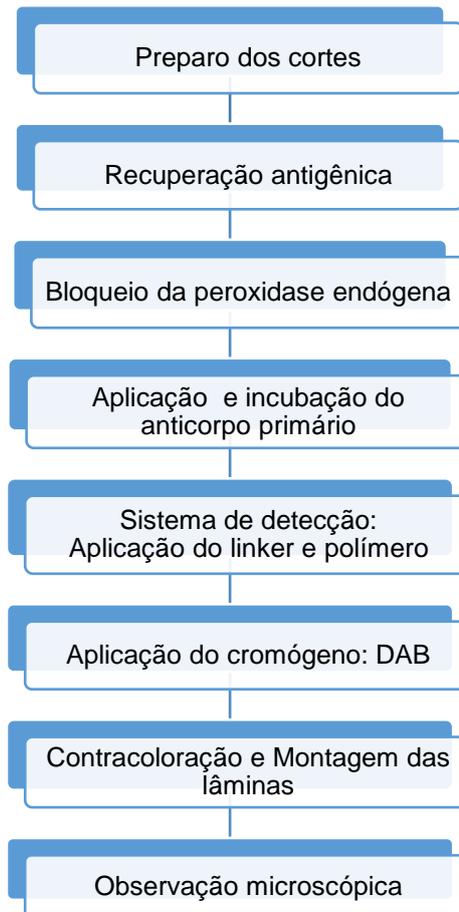
Foram recuperados os blocos de parafina e realizados novos recortes, para a confecção de novas lâminas. As etapas sequenciais na imunohistoquímica, pela técnica da imunoperoxidase indireta, podem ser resumidas da seguinte forma: recuperação de antígeno, adição de anticorpo primário, aplicação de um anticorpo

secundário que se liga ao anticorpo primário e adição de um reagente de detecção para localizar o anticorpo primário (Magaki *et al.*, 2019).

Atualmente, o método mais popular é a recuperação antigênica induzida por calor usando fornos de microondas mais comumente, bem como panelas de pressão, autoclaves e banhos de água. No método indireto, o anticorpo secundário é marcado, permitindo a amplificação do sinal e o uso com muitos anticorpos primários diferentes. Existem vários marcadores que podem ser usados, como enzimas que produzem um produto colorido após incubação com um substrato cromogênico como a diaminobenzidina (DAB). Para a realização da imunohistoquímica, deve-se seguir alguma etapas, como as estabelecidas por Magaki *et al.* (2019):

- Preparação de lâminas histológicas
- Desparafinização e reidratação usando método padrão
- Recuperação de antígeno
- Bloqueio da peroxidase endógena
- Bloqueio com soro ou tampão de bloqueio universal para diminuir a coloração de fundo
- Aplicação de anticorpos
- Aplicação de cromogênio
- Contracoloração, desidratação, clareamento e montagem

Segue fluxograma da fase laboratorial.



**Figura 1:** Fluxograma do processamento laboratorial imunohistoquímico. DAB: diaminobenzidina

O protocolo de imunohistoquímica que foi utilizado está de acordo com o sistema da EnVision FLEX Agilent (DAKO®), adotado pelo Laboratório CPDA, utilizando assim o protocolo operacional padrão (POP) de imunohistoquímica do laboratório CPDA. A equipe da pesquisa passou por treinamento e nivelamento para otimização dos anticorpos em geral e da técnica. Proporcionando assim a engrenagem da técnica e minimizando possíveis falhas operacionais no momento de execução das reações específicas do presente trabalho. No qual, o detalhamento técnico consta no APÊNDICE C.

#### 4.10 Análise dos biomarcadores

A análise dos biomarcadores, foi baseada no estudo “Immunoexpression of PD-L1, CD4+ and CD8+ cell infiltrates and tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in the microenvironment of actinic cheilitis and lower lip squamous cell carcinoma” adotado por de Souza et al., 2022. A avaliação foi realizada em consenso por pelo menos dois patologistas da equipe (ao todo a pesquisa contou com três patologistas). A análise das células CD4+ e CD8+ foi realizada por varredura de toda a lâmina nos casos, apenas

na região do estroma tumoral e peritumoral, utilizando a mesma metodologia descrita para TILs anteriormente no item 4.8.3.

As etapas de avaliação incluíram:

- Foram analisadas células localizadas no compartimento estromal dos tumores ou áreas peritumorais, limítrofes à lesão;
- Quaisquer infiltrados inflamatórios em áreas distantes do estroma ou da margem do tumor foram excluídos da análise;
- Foram considerados TILs quaisquer tipos de leucócitos que estivessem na área acima mencionada, incluindo mononucleares e polimorfonucleares, desde que não fossem considerados restos celulares, nem estivessem em áreas de necrose ou artefatos;
- Os cortes avaliados tinham espessura de 4 µm e foram analisados em aumento de 200x, de forma panorâmica, sem considerar o “*hot spot*”, para não mascarar a real quantidade de infiltrado inflamatório em todo o estroma tumoral;
- As análises foram realizadas em consenso por dois patologistas, conforme mencionado anteriormente. Os casos discrepantes foram revisados e reclassificados;
- A análise quantitativa de CD4 e CD8 varia de 0% a 90%. Os casos foram então subcategorizados como CD4<sup>baixos</sup> – 0% a 40% e CD4<sup>altos</sup> – 41% a 90%, e CD8<sup>baixos</sup> – 0% a 40% e CD8<sup>altos</sup> – 41% a 90%.

#### 4.11 Análise estatística

Foi realizada uma análise descritiva e exploratória das variáveis e os resultados apresentados por meio de tabelas e gráficos. As relações/associações entre variáveis foram verificadas por meio dos testes Qui-Quadrado de Pearson (nas relações entre variáveis nominais/ordinais) e ANOVA de Kruskal-Wallis, entre as variáveis nominais/ordinais com a sobrevida que é uma variável quantitativa. A curva de sobrevida realizada através Curvas de Kaplan-Meier, levou em consideração o tempo de sobrevida de todos os pacientes, sendo os dados censurados os dos pacientes sobreviventes e os com perda de seguimento. Em todas as comparações considerou-se o nível de 5% de significância nas regras de decisões das hipóteses dos testes. As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa IBM SPSS Statistics versão 22.0.

**5. ARTIGO**

O artigo será submetido ao periódico Oral Diseases (Oral Dis)

Online ISSN:1601-0825

Print ISSN:1354-523X

© John Wiley & Sons A/S. Published by John Wiley & Sons Ltd

Qualis A2 / Fator de impacto 4

## **Expressão de biomarcadores proteicos do sistema imune (CD4 e CD8) em carcinomas epidermóides de boca: um estudo transversal com análise de sobrevida**

Ana Paula Ferreira de Souza<sup>a</sup> <https://orcid.org/0000-0003-2217-9999>, Tássia Caroline da Costa Mendes<sup>a</sup> <https://orcid.org/0000-0002-8712-0181>, Juliana Figueiredo Roza<sup>b</sup>, Luciana Botinelly Mendonça Fujimoto<sup>c</sup> <https://orcid.org/0000-0001-8560-4193>, Tatiana Nayara Libório Kimura<sup>a,c</sup> <https://orcid.org/0000-0001-7800-8326>

### **Afiliação Institucional:**

<sup>a</sup> Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil.

<sup>b</sup> Faculdade de Odontologia, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil.

<sup>c</sup> Departamento de Patologia e Medicina Legal, Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Amazonas, Manaus, AM, Brasil.

### **Autor correspondente:**

Tatiana Nayara Libório-Kimura, DDS, PhD

Faculdade de Medicina, Universidade Federal do Amazonas (UFAM)

Departamento de Patologia e Medicina Legal (DPML)

Rua Afonso Pena, 1053, 69020-160, Manaus, Amazonas, Brasil

Email: [tliborio@ufam.edu.br](mailto:tliborio@ufam.edu.br)

**Resumo:** O carcinoma epidermóide de boca (CEB) é a neoplasia maligna mais comum da cavidade oral. O microambiente tumoral (TME) é composto de componentes provenientes tanto do tumor quanto do hospedeiro. As células imunes do TME, principalmente os linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, além de outras, suprimem a proliferação de células malignas e desempenham um papel crucial na progressão do CEB. Esta pesquisa tem como objetivo caracterizar a expressão proteica das células imunes CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> bem como a quantidade de TILs no microambiente do CEB e sua relação com parâmetros clinicopatológicos e sobrevida dos pacientes. Este estudo caracterizou-se como observacional, tipo transversal, a partir de avaliações de amostras provenientes sobretudo de biópsias mas também peças cirúrgicas e casos diagnosticados como CEB entre janeiro de 2014 e dezembro de 2018, oriundos de um laboratório de patologia de Manaus/AM. Para tanto, as amostras foram submetidas à análise histopatológica incluindo classificação, grau de queratinização, disposição dos arranjos celulares, TILs e itens do Colégio Americano de Patologistas (estes últimos para as peças cirúrgicas). Todas as amostras foram posteriormente submetidas a imunohistoquímica com anticorpos contra linfócitos CD4 e CD8. Para análise estatística, foi utilizado o teste Qui-Quadrado de Pearson para verificar associações entre as variáveis analisadas, assim como a relação entre os densidade dos TILs e o infiltrado inflamatório. Curvas de Kaplan-Meier foram utilizadas para caracterização da sobrevida, tendo sido usada o teste de ANOVA de Kruskal-Wallis para associação entre variáveis clinicopatológicas em relação a sobrevida. Em todos os testes foi considerado um nível de significância de 5%. Um total de 20 amostras foram incluídas, sendo 75% (15) de CEBs bem diferenciados com 75% (15) dos casos contendo TILs elevados (entre 41% a 90%) em um contexto de intenso infiltrado inflamatório (50% dos casos). Foi observada uma correlação positiva entre TILs e infiltrado inflamatório ( $p=0,027$ ). Todos os casos apresentaram baixa frequência de linfócitos CD4<sup>+</sup>, ao passo que metade dos casos apresentaram baixa frequência de linfócitos CD8<sup>+</sup> e outra metade alta frequência desse marcador, ou seja, 50% dos casos tiveram perfil CD4<sup>low</sup>/CD8<sup>low</sup> e 50% CD4<sup>low</sup>/CD8<sup>high</sup>, e 53% dos casos bem diferenciados apresentaram altos níveis de CD8. Não houve associação entre as características clinicopatológicas com o tempo de sobrevida. Os resultados do estudo ilustram que as amostras apresentam características clinicopatológicas clássicas de CEB convencional bem diferenciado contendo infiltrado intenso e TILs elevado. Não houve associação dos biomarcadores CD4 e CD8 com os parâmetros clinicopatológicos propostos nem com a sobrevida. No entanto, nota-se alta frequência do linfócito CD8 em células malignas do CEB, sobretudo em casos bem diferenciados, o que sinaliza seu papel citotóxico contra células tumorais com características histológicas mais favoráveis, apesar de também estarem com esse perfil na maioria das amostras com recidiva. Sugere-se a participação mais proeminente do linfócito T CD8 comparado com linfócito T CD4 como elemento inflamatório no contexto de Hallmark do câncer. Mais estudos são necessários para estabelecer a exata relação desses marcadores com parâmetros clinicopatológicos e com a sobrevida dos pacientes acometidos por CEB.

**Palavras-chave:** Carcinoma de epidermoide; câncer oral; microambiente tumoral; linfócitos infiltrantes de tumor.

**Abstract:** Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the most common malignant neoplasm of the oral cavity. The tumor microenvironment (TME) is made up of components from both the tumor and the host. The immune cells of the TME, mainly CD4+ and CD8+ tumor-infiltrating lymphocytes (TILs), as well as others, suppress the proliferation of malignant cells and play a crucial role in the progression of CEB. This study aims to characterize the protein expression of CD4+ and CD8+ immune cells as well as the amount of TILs in the CEB microenvironment and their relationship with clinicopathological parameters and patient survival. This is an observational, cross-sectional study, based on evaluations of samples mainly from biopsies, but also surgical specimens and cases diagnosed as CEB between January 2014 and December 2018, from a pathology laboratory in Manaus/AM. To this end, the samples were subjected to histopathological analysis including classification, degree of keratinization, arrangement of cellular arrangements, TILs and items from the College of American Pathologists (the latter for surgical specimens). All the samples were then subjected to immunohistochemistry with antibodies against CD4 and CD8 lymphocytes. For statistical analysis, Pearson's chi-square test was used to verify associations between the variables analyzed, as well as the relationship between TIL density and inflammatory infiltrate. Kaplan-Meier curves were used to characterize survival, and the Kruskal-Wallis ANOVA test was used to associate clinicopathological variables with survival. A significance level of 5% was considered for all tests. A total of 20 samples were included, 75% (15) of which were well-differentiated CEBs with 75% (15) of the cases containing high TILs (between 41% and 90%) in a context of intense inflammatory infiltrate (50% of the cases). A positive correlation was observed between TILs and inflammatory infiltrate ( $p=0.027$ ). All the cases had a low frequency of CD4+ lymphocytes, while half the cases had a low frequency of CD8+ lymphocytes and the other half a high frequency of this marker, i.e. 50% of the cases had a CD4low/CD8low profile and 50% a CD4low/CD8high profile, and 53% of the well-differentiated cases had high levels of CD8. There was no association between clinicopathological characteristics and survival time. The results of the study illustrate that the samples present classic clinicopathological characteristics of conventional well-differentiated CEB containing intense infiltrate and high TILs. There was no association between the CD4 and CD8 biomarkers and the proposed clinicopathological parameters or survival. However, there was a high frequency of CD8 lymphocytes in malignant CEB cells, especially in well-differentiated cases, which indicates their cytotoxic role against tumor cells with more favorable histological characteristics, although they also had this profile in the majority of samples with recurrence. The more prominent participation of the CD8 T lymphocyte compared to the CD4 T lymphocyte as an inflammatory element in the context of Hallmark cancer is suggested. More studies are needed to establish the exact relationship of these markers with clinicopathological parameters and with the survival of patients affected by CEB.

**Keywords:** Squamous cell carcinoma; oral cancer; tumor microenvironment; tumor-infiltrating lymphocytes.

## INTRODUÇÃO

No cenário mundial o câncer de cavidade oral representa um importante problema de saúde e constitui a oitava neoplasia maligna mais comum (1,2). Onde mais de 90% desses casos são representados pelo carcinoma epidermóide (1–4).

O Carcinoma Epidermóide de Boca (CEB) é uma neoplasia maligna com diferenciação escamosa que se origina do epitélio da mucosa (5). A etiologia dessa neoplasia é multifatorial e está frequentemente associada ao tabagismo, etilismo (6–8). O perfil epidemiológico dos pacientes com CEB tem mudado ao longo do tempo, com variação regional, mas ainda há maior prevalência no sexo masculino, geralmente indivíduos mais velhos, após a quinta década de vida. A apresentação clínica usual é uma úlcera indolor na borda da língua ou assoalho da boca (5,7).

Atualmente, o tratamento é geralmente baseado na ressecção cirúrgica do tumor primário, que pode ser seguida de rádio e quimioterapia. A taxa de sobrevivência global é de menos de 60%, com prognóstico fortemente dependente do sistema de estadiamento TNM. O tamanho do tumor, bem como a presença e extensão das metástases linfonodais são bastante reconhecidos como os preditores mais importantes (9,10). Infelizmente, o estadiamento TNM não prevê consistentemente o prognóstico do paciente, e pacientes com características clinicopatológicas idênticas podem ter resultados de sobrevivência muito diferentes. Portanto, há uma necessidade de indicadores prognósticos mais precisos que possam complementar o sistema de estadiamento TNM para orientar as decisões de tratamento em tempo hábil para pacientes com CEB (11).

A imunidade do hospedeiro desempenha um papel complexo, mas importante, na progressão do tumor. Nesse contexto, a inflamação faz parte de um dos 13 *Hallmarks* do câncer (12). Os linfócitos infiltrantes de tumores (TILs) fazem parte da resposta imune que desempenha um papel crítico no reconhecimento e eliminação de tumores (11,13). Trabalhos anteriores mostraram que a presença de TILs pode afetar significativamente a sobrevivência do paciente em vários tipos de malignidades. Portanto, o estudo de TILs surgiu como um potencial candidato prognóstico para vários tipos de cânceres (11,13–16). A maioria dos TILs são células T, entre as células T, há subpopulações que incluem células T citotóxicas, células T auxiliares e células T reguladoras (Treg) (17). As células T citotóxicas, detectadas pelo marcador CD8, são particularmente importantes em sua função contra células malignas. As células T CD8 + lisam as células malignas e secretam citocinas tumorocidas para ajudar a

erradicar tumores (11,18). As células T auxiliares desempenham um papel crucial no suporte da função das células T citotóxicas por meio de vários mecanismos. Essas células secretam citocinas que promovem a diferenciação e proliferação de células T citotóxicas. Além disso, elas podem secretar citocinas tumorílicas em resposta às células dendríticas. O marcador CD4 é usado para identificar células T auxiliares, que são o subtipo mais frequente de células T CD4<sup>+</sup> (11,19).

No câncer oral, o papel de outros componentes do microambiente tumoral (tumor microenvironment – TME), como infiltrado inflamatório, TILs e expressão de CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, ainda precisa ser melhor explorado. Portanto, é essencial caracterizar o microambiente no CEB, entender seu perfil imunológico e analisar a influência de fatores clínicos e histopatológicos, bem como sua associação com a progressão da doença (20).

Nesse contexto, considerando a importância da caracterização do TME, e escassez na literatura sobre o seu papel, especialmente a correlação entre TILs CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> dos parâmetros clinicopatológicos do CEB. Visto que estudar a expressão dessas células e sua correlação com parâmetros clinicopatológicos no CEB pode fornecer uma melhor compreensão da dinâmica do microambiente tumoral e auxiliar na identificação de alvos imunomoduladores para terapias anticâncer. O presente estudo tem como objetivo caracterizar a expressão proteica das células imunes CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> bem como a quantidade de TILs no microambiente do CEB e sua relação com parâmetros clinicopatológicos e sobrevida dos pacientes.

## **METODOLOGIA**

### **Seleção de amostra de tecido e coleta de dados clinicopatológicos**

Este estudo transversal foi realizado usando amostras arquivadas de tecido. Foram selecionadas 20 amostras de tecido fixados em formalina e embebidos em parafina de CEB de biópsias e ressecções cirúrgicas do laboratório de anatomia patológica do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Universidade Federal do Amazonas (UFAM) entre 2014 e 2018. Mediante o laudo histopatológico liberado por patologistas.

Os critérios de elegibilidade para inclusão no trabalho foram, presença de CEB (incluindo língua, assoalho da boca, gengiva, mucosa jugal, palato duro, triângulo retromolar) em pacientes de ambos os sexos, com idade acima de 18 anos, diagnosticados com CEB mediante laudo histológico, incluindo registros médicos

completos, dados demográficos e clinicopatológicos. Foram excluídos os casos de amostras de tecido inadequadas, e a não localização do bloco de parafina.

As lâminas de tecido foram revisadas em consenso por 2 patologistas, para confirmação do diagnóstico original, e características clinicopatológicas foram coletadas, incluindo idade, sexo, histórico de tabagismo e etilismo, sinais e sintomas, localização do tumor, tratamento, recidiva, seguimento e tempo de vida após o diagnóstico, grau histológico e estadiamento patológico (para as amostras de peças cirúrgicas).

O presente trabalho está vinculado a linha de pesquisa de carcinogênese oral, o qual foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos (CEP) da Universidade Federal do Amazonas e foi aprovado com o número CAAE 77091324.2.0000.5020 e número do parecer 6.648.099.

### **Corte de amostra de tecido e análise histopatológica**

Os materiais selecionados embebidos em parafina foram cortados por seções de micrótomo (Lupetec®) para obter cortes consecutivos de 4 µm de espessura em lâminas silanizadas. Três cortes seriados de tecido de CEB foram realizados: um para coloração de rotina, e dois para reações imuno-histoquímicas. As lâminas foram armazenadas em geladeira a (10°C) até as próximas etapas.

A lâmina para coloração de rotina foi submetida ao método de Hematoxilina e Eosina (H&E) para ser reavaliada por dois patologistas, para identificação das áreas mais representativas da lesão e análises dos parâmetros e elementos histológicos para caracterização morfológica.

Para iniciar a avaliação das lâminas histológicas, foi mensurado o tamanho da área de tecido presente na lâmina a ser avaliada, com o auxílio de uma régua milimetrada. Os seguintes parâmetros foram analisados: grau de diferenciação tumoral, como bem diferenciado, moderadamente diferenciado, pouco diferenciado conforme a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS); padrão e perfil inflamatório sendo classificados como infiltrado leve, moderado ou intenso, independentemente de o infiltrado ser estromal ou não; Presença e grau de queratinização Anneroth *et al.*(21) e Bryne *et al.* (22), em um aumento de 40x, considerando os critérios: Grau 1: Neoplasia altamente queratinizada, onde mais de 50% das células exibem queratinização; Grau 2: Moderadamente queratinizado (20%-50% das células); Grau 3: Queratinização mínima (5%-20% das células); Grau 4: Sem queratinização (0%-5% das células).

Disposição dos arranjos celulares, considerando que as células escamosas do CEB podem estar arranjadas em diferentes padrões, a análise em um aumento de 40x e 100x, de acordo com características observadas em Libório *et al.* (23): lençóis, ilhas, cordões, ninhos e células isoladas.

A análise dos TILs foi baseada em uma versão modificada dos protocolos descritos no “International TILs Working Group 2014” e no “VENTANA PD-L1 protocol (SP142) Assay for Triple Negative Breast Carcinoma”, com foco no infiltrado inflamatório presente no estroma da lesão como realizada por de Souza *et al.*, (20). Resumidamente, as etapas de avaliação incluíram:

- Foram analisadas células localizadas no compartimento estromal dos tumores ou áreas peritumorais, limítrofes à lesão;
- Quaisquer infiltrados inflamatórios em áreas distantes do estroma ou da margem do tumor foram excluídos da análise;
- Foram considerados TILs quaisquer tipos de leucócitos que estivessem na área acima mencionada, incluindo mononucleares e polimorfonucleares, desde que não fossem considerados restos celulares, nem estivessem em áreas de necrose ou artefatos;
- Os cortes avaliados tinham espessura de 4 µm e foram analisados em aumento de 200x, de forma panorâmica, sem considerar o ponto quente, para não mascarar a real quantidade de infiltrado inflamatório em todo o estroma tumoral;
- As análises foram realizadas em consenso por dois patologistas com conhecimento na área, conforme mencionado anteriormente. Os casos discrepantes foram revisados e reclassificados;
- A análise quantitativa de TILs varia de 0% a 90%. Os casos foram então subcategorizados como TILs <sup>baixos</sup> – 0% a 40% e TILs <sup>altos</sup> – 41% a 90%.

Adicionalmente para as amostras oriundas de peças cirúrgicas foram avaliados os itens que compõem as recomendações do guia elaborado pelo Colégio Americano de Patologistas, de acordo com a AJCC/UICC 8ª edição, coletadas a partir das informações do laudo histológico e confirmadas com a análise histopatológica, a qual inclui as dimensões máximas do tumor, profundidade de invasão (DOI), invasão linfática e / ou vascular, infiltração perineural, status das margens do tumor, status de linfonodos regionais e o estadiamento patológico.

### **Reação de imuno-histoquímica para CD4 e CD8**

Amostras de tecido contendo seções de 4 µm de espessura em lâminas silanizadas foram submetidas à reação de imuno-histoquímica para determinar individualmente a expressão das moléculas CD4 e CD8.

Após retiradas da geladeira em temperatura ambiente, as lâminas foram para estufa a 65 °C por 1 hora, logo após passou pela desparafinização em 4 banhos de xilol (5 min cada) e hidratação em 5 banhos de álcool absoluto (5 mergulhos em casa cuba). Após lavagem com água destilada, a recuperação antigênica para determinações de CD4/CD8 foi realizada em panela elétrica (TintoRetriver Pressure Cooker, Bio SB) com tampão Tris/EDTA, pH 9,0 (Target Retrieval Solution, High pH EnVision™ FLEX, Dako®) por 20 min para CD4/CD8. O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado em solução de peróxido de hidrogênio a 3% (Rioquímica ®) por 15 min (para CD4/CD8) à temperatura ambiente. As lâminas contendo os anticorpos primários anti-CD4 (clone 4B12, Ready-to-Use, DAKO®) e anti-CD8 (clone C8/144B, Ready-to-Use, DAKO®) foram incubadas por 1 hora em câmara úmida. O sistema revelador utilizado para imuno-histoquímica de CD4 e CD8 foi o EnVision FLEX+, Mouse, High pH (Link) da DAKO®. E finalmente contracoradas com hematoxilina de Harris por 1min e 30s à temperatura ambiente e desidratadas em banhos 4 banhos de álcool absoluto (4 mergulhos em cada cuba). E posteriormente, as lâminas foram imersas em 5 banhos de xilol (4 mergulhos em cada cuba) e montadas com uma solução de resina não aquosa (Bálsamo do Canadá).

Os controles positivos de todas as reações de imuno-histoquímica foram constituídos por amostras de tecido de amígdalas, cujas condições metodológicas foram as mesmas dos casos. Os controles negativos consistiram em amostras de tecido dos respectivos casos.

### **Análise imuno-histoquímica para CD4 e CD8**

A avaliação foi realizada em consenso por dois patologistas. As lâminas foram observadas pelo microscópio óptico (Nikon, Eclipse E200) e as imagens foram obtidas em ampliação de 200x usando a câmera digital Michrome 6.0 MP – USB 3.0 e software Mosaic 3.0.

A análise das células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> foi realizada por varredura de toda a lâmina, apenas na região do estroma tumoral e peritumoral, utilizando a mesma metodologia descrita para TILs acima.

## **Análise estatística**

Foi realizada uma análise descritiva e exploratória das variáveis e os resultados apresentados por meio de tabelas e gráficos. As relações/associações entre variáveis foram verificadas por meio dos testes Qui-Quadrado de Pearson (nas relações entre variáveis nominais/ordinais) e ANOVA de Kruskal-Wallis, entre as variáveis nominais/ordinais com a sobrevida que é uma variável quantitativa. A curva de sobrevida realizada através Curvas de Kaplan- Meier, levou em consideração o tempo de sobrevida de todos os pacientes, sendo os dados censurados os dos pacientes sobreviventes e os com perda de seguimento. Em todas as comparações considerou-se o nível de 5% de significância nas regras de decisões das hipóteses dos testes. As análises estatísticas foram realizadas por meio do programa IBM SPSS Statistics versão 22.0.

## **RESULTADOS**

### **Seleção da amostra e caracterização da população**

Foi realizada uma busca ativa em pastas disponíveis no arquivo do laboratório. Foram analisados 17.650 laudos, os quais corresponderam a todo material recebido pelo laboratório durante o período da pesquisa (entre 2018 e 2014). Por meio dessa busca, foram obtidos um quantitativo de 32 laudos de biópsias e peças cirúrgicas de CEB, foram excluídos 12 laudos/casos pela não localização do bloco e/ou por falta de representatividade do material. Resultando de 20 amostras incluídos no estudo. Dentro dessas 20 amostras, 13 representavam biópsias incisionais e 7 peças cirúrgicas.

As distribuições de frequências das características sociodemográficas e clínicas dos pacientes, previamente diagnosticados como carcinomas epidermóides de boca são demonstrados na tabela 1. Das 20 amostras incluídas no estudo, a população constituiu-se de 14 (70,0%) pacientes do sexo masculino e 6 (30,0%) do sexo feminino. A idade variou entre 30 e 77 anos, as idades média e mediana dos pacientes foram respectivamente iguais a  $53,95 \pm 13,9$  e 53 anos, sendo a maioria dos pacientes da faixa etária de 50 a 59 anos (8 – 40,0%). Quanto às outras características predominaram a cor da pele feoderma ou parda (16 – 80,0%), procedentes do interior do Amazonas (10 – 50,0%). Quanto ao tabagismo e etilismo, 50% (10) dos pacientes relataram uso do tabaco e álcool, sendo 90% desses tanto

eram tabagistas, quanto etilistas. 35% não era tabagista e 30% não era etilista, 15% e 20% dos casos com ausência de informação para tabagismo e etilismo respectivamente.

**Tabela 1.** Distribuição de frequências por características sociodemográficas e clínicas dos pacientes diagnosticados com CEB.

<b>CARACTERÍSTICA</b>	<b>n (20)</b>	<b>%</b>
<b>Sexo</b>		
Feminino	6	30,0
Masculino	14	70,0
<b>Idade</b>		
Idade média $53,95 \pm 13,9$ anos		
Idade mediana 53 anos		
30 a 39	4	20,0
40 a 49	2	10,0
50 a 59	8	40,0
60 e mais	6	30,0
<b>Cor da pele</b>		
Parda	16	80,0
Branca	4	20,0
<b>Naturalidade</b>		
Capital - Manaus	7	35,0
Interior do Amazonas	10	50,0
Outros Estados	2	10,0
Não informado	1	5,0
<b>Tabagista</b>		
Sim	10	50,0
Não	7	35,0
Não informado	3	15,0
<b>Etilista</b>		
Sim	10	50,0
Não	6	30,0
Não informado	4	20,0
<b>Localização da lesão</b>		
Assoalho bucal	3	15,0
Língua	11	55,0
Maxila	1	5,0
Palato	3	15,0
Trígono retromolar	2	10,0
<b>Tipo de biópsia</b>		
Incisional	13	65,0
Peça cirúrgica	7	35,0
<b>Tratamento</b>		
Cirurgia	7	35,0
Quimioterapia	1	5,0
Radioterapia	2	10,0
Cirurgia + Quimioterapia	1	5,0
Cirurgia + Radioterapia	2	10,0
Cirurgia + Radioterapia + Quimioterapia	2	10,0
Radioterapia + Quimioterapia	3	15,0
Não informado	2	10,0
<b>Recidiva / Recorrência</b>		
Sim	7	35,0

Não	8	40,0
Não informado	5	25,0
<b>Delta-tempo (dias)</b>		
Delta-tempo médio 95.1 ± 87,8		
Delta-tempo mediano 74 dias		
13 a 30	3	15,0
31 a 50	2	10,0
61 a 90	3	15,0
91 e mais	4	20,0
Perda de seguimento	8	40,0
<b>Tempo de seguimento (meses)</b>		
Tempo médio 34.0 ± 40,8		
Tempo mediano 13 meses		
2 a 15	4	20,0
16 a 30	10	50,0
31 e mais	6	30,0
<b>Status do paciente</b>		
Óbito devido ao câncer	8	40,0
Óbito por outra causa	1	5,0
Vivo com a doença	2	10,0
Vivo sem a doença	4	20,0
Perda de seguimento	5	25,0

A sublocalização mais comum da cavidade oral foi a língua (11 – 55%), seguida pelo assoalho da boca e palato (3 – 15% cada) trígono retromolar (2 – 10%) e maxila (1 – 5%). O Principal tratamento de escolha foi a cirurgia, onde 35% (7) dos casos foram submetidos ao tratamento cirúrgico. Dos 20 casos, 8 (40%) não apresentaram recidiva e 7 (35%) apresentaram recidiva, sendo 5 (25%) não informado. Quanto ao tempo de seguimento do paciente (contando em meses desde a data do diagnóstico até o último acompanhamento) variou de 2 meses a 128 meses. A média de tempo que o paciente continuou vivo após o diagnóstico foi de 34.0 ± 40,8 meses e mediana de 13 meses. Quanto ao *status* dos pacientes ao final do estudo, oito (40,0%) faleceram devido ao câncer (Tabela 1).

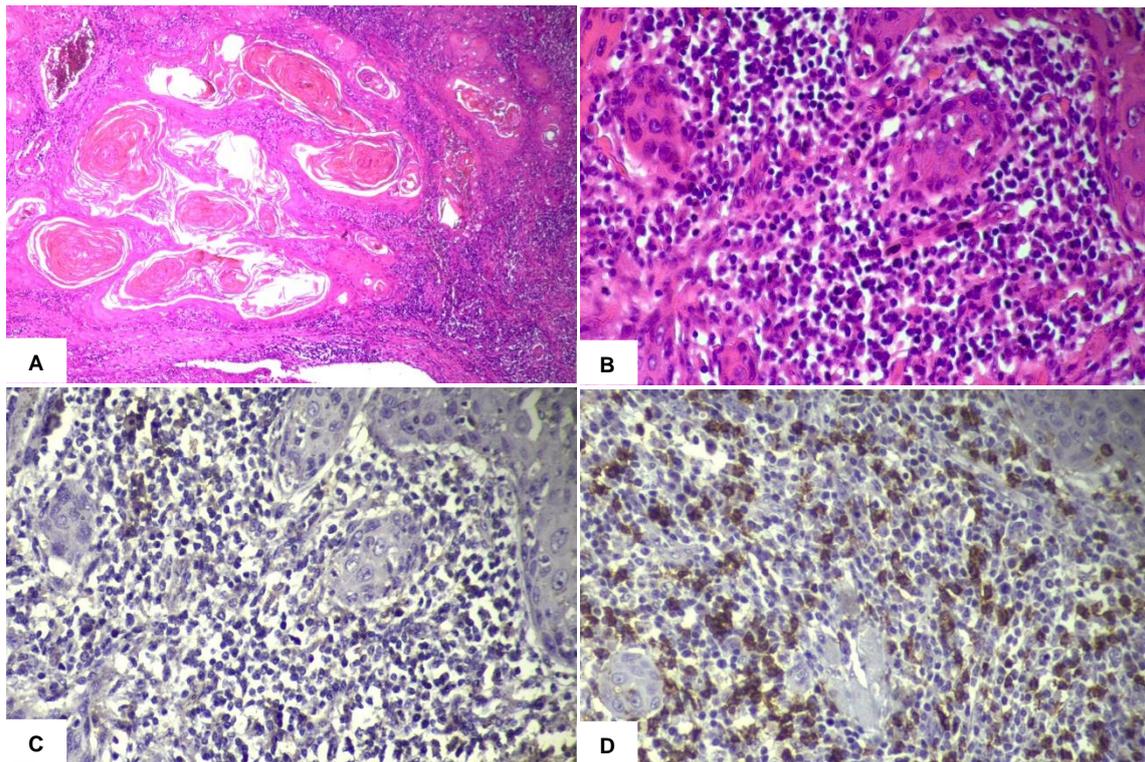
### **Caracterização histopatológica e Imunohistoquímica**

Como mostra a tabela 2, foi verificado que 75% (15) dos casos foram classificados histopatológica como CEB bem diferenciado (Figura 2-A), e 25% (5) foi moderadamente diferenciado, não houve nenhum caso de pouco diferenciado. Foi encontrada presença e grau de queratinização igual a grau 1– altamente queratinizada, para maioria dos casos (Figura 2-A) (10 – 50,0%), a disposição do arranjo celular predominante mais comum foi em ilhas (13 – 65%). Houve maior prevalência de infiltrado inflamatório intenso (Figura 2-A) (10 – 50,0%), e TILs altos

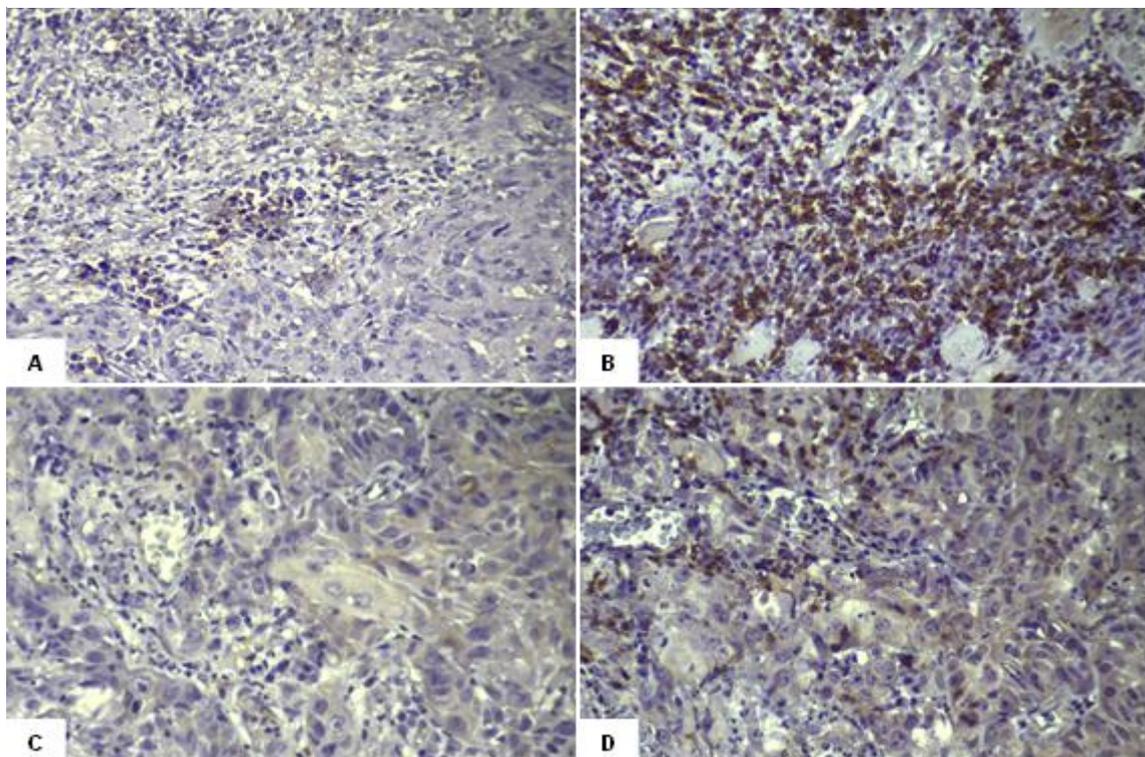
(high) (Figura 2-B) (15 – 75,0%). O qual foi encontrada correlação positiva entre TILs infiltrado inflamatório ( $p=0,027$ ) (Tabela 3). Conforme demonstrado na tabela 2, 100% dos casos apresentaram baixa frequência de células CD4<sup>+</sup> (Figura 2-C, Figura 3-A e C) e 50% apresentaram alta frequência de células CD8<sup>+</sup> (Figura 2-D, Figura 3-B) e 50% baixa frequência CD8<sup>+</sup> (Figura 3-D).

**Tabela 2.** Distribuição de frequências por características histopatológicas e imunohistoquímica dos pacientes diagnosticados com CEB.

<b>CARACTERÍSTICA</b>	<b>n (20)</b>	<b>%</b>
<b>Classificação histopatológica</b>		
Bem diferenciado	15	75,0
Moderadamente diferenciado	5	25,0
<b>Presença e grau de queratinização</b>		
Grau 1: Altamente queratinizada (>50%)	10	50,0
Grau 2: Moderadamente queratinizada (20%-50%)	5	25,0
Grau 3: Queratinização mínima (5%-20%)	5	25,0
<b>Disposição do arranjo celular predominante</b>		
Cordões	3	15,0
Ilhas	13	65,0
Lençóis	4	20,0
<b>TILs</b>		
Low (0 a 40%)	5	25,0
High (41 a 90%)	15	75,0
<b>Infiltrado inflamatório</b>		
Leve	2	10,0
Moderado	8	40,0
Intenso	10	50,0
<b>Frequência de células CD4<sup>+</sup></b>		
Low	20	100,0
High	0	0,0
<b>Frequência de células CD8<sup>+</sup></b>		
Low	10	50,0
High	10	50,0



**Figura 2:** Análise histopatológica e imuno-histoquímica de um caso de CEB de língua. (A): Corado em HE, caso bem diferenciado, categorizado com grau de queratinização 1 e intenso infiltrado inflamatório (40x). (B): que apresentou uma maior frequência de linfócitos infiltrantes do tumor, variando entre 41 a 90% (TILs high) (200x). (C): O caso apresentou baixa infiltração de células CD4+ (CD4 low) (200x). (D): E intensa infiltração de células CD8+ (CD8 high) que geralmente é vista no estroma tumoral (200x).



**Figura 3:** Análise imuno-histoquímica de dois casos de CEB. (A): O caso apresentou baixa infiltração de células CD4+ (CD4 low) (200x). (B): E intensa infiltração de células CD8+ (CD8 high) (200x). (C): Outro caso apresentou baixa infiltração de células CD4+ (CD4 low) (200x). (D): E com baixa infiltração de células CD8+ (CD8 low) (200x).

**Tabela 3.** Relação entre as variáveis TILs e infiltrado inflamatório dos pacientes diagnosticados com CEB.

INFILTRADO INFLAMATÓRIO	TILs				n (20)	p*
	Low		High			
	n (5)	%	n (15)	%		
Leve	2	20,0	0	0,0	2	
Moderado	2	20,0	6	60,0	8	<b>0,027*</b>
Intenso	1	10,0	9	90,0	10	

\*p é significativo em  $p < 0,05$  (5%)Teste Qui-Quadrado de *Pearson*

Adicionalmente para as amostras de peças cirúrgicas foi verificado os itens do CAP de acordo com a AJCC/UICC 8ª edição (Tabela 3), que estavam disponíveis no laudo anatomopatológico e confirmados nas lâminas analisadas. A presença de invasão linfática e / ou vascular foi observada em 57,1% dos casos e não identificada em 42,9% dos casos, enquanto que invasão perineural foi vista em 42,9% dos casos e não identificada em 57,1% dos casos avaliados. A profundidade de invasão, foi observado que em 42,9% o DOI era  $\leq 10$  mm. Em 85,7% dos casos, as margens apresentavam-se livres de comprometimento neoplásico. Linfonodos positivos para o tumor foram encontrados em 28,6% dos casos. 71,4% dos tumores eram bem diferenciados, e outras características como presença e grau de queratinização – grau 1 (4 – 57,1%), disposição do arranjo celular predominante em ilhas (4 – 57,1%), com TILs high (6 – 85,7%) e o infiltrado inflamatório intenso (6 – 85,7%), 100% casos apresentaram baixa frequência de células CD4<sup>+</sup> e 85,7% (6) dos casos apresentaram alta frequência de células CD8<sup>+</sup>. Devido ao tamanho da amostra não foi possível fazer associação das características histopatológicas desses casos de peças cirúrgicas com os marcadores.

**Tabela 4.** Distribuição de frequências por características histopatológicas das peças cirúrgicas dos pacientes diagnosticados com CEB.

CARACTERÍSTICA	n (7)	%
<b>Área de tecido presente na lâmina histológica (mm<sup>2</sup>)</b>		
Área média $257.9 \pm 130,9$ mm <sup>2</sup>		
Área mediano 220 mm <sup>2</sup>		
99 a 220	4	57,1
> 220	3	42,9
<b>Invasão linfática e / ou vascular</b>		
Presente	4	57,1
Não identificada	3	42,9
<b>Invasão Perineural</b>		
Presente	3	42,9

Não identificada	4	57,1
<b>Profundidade de invasão - DOI</b>		
≤5mm	2	28,5
≤10 mm	3	42,9
>10 mm	1	14,3
Não pode ser determinado	1	14,3
<b>Status da margem do tumor</b>		
Margem livre	6	85,7
Margem comprometida	1	14,3
<b>Status de linfonodos regionais</b>		
Comprometido por neoplasia	2	28,6
Livre de comprometimento neoplásico	4	57,1
Não pode ser determinado	1	14,3
<b>Estadiamento patológico</b>		
pT1pN0	1	14,3
pT1pN1	2	28,6
pT2pN0	1	14,3
pT2pNx	1	14,3
pT3pN0	1	14,3
pT4apN0	1	14,3
<b>Classificação histopatológica</b>		
Bem diferenciado	5	71,4
Moderadamente diferenciado	2	28,6
<b>Presença e grau de queratinização</b>		
Grau 1: Altamente queratinizada (>50%)	4	57,1
Grau 2: Moderadamente queratinizada (20%-50%)	1	14,3
Grau 3: Queratinização mínima (5%-20%)	2	28,6
<b>Disposição do arranjo celular predominante</b>		
Cordões	1	14,3
Ilhas	4	57,1
Lençóis	2	28,6
<b>TILs</b>		
Low	1	14,3
High	6	85,7
<b>Infiltrado inflamatório</b>		
Moderado	1	14,3
Intenso	6	85,7
<b>Frequência de células CD4<sup>+</sup></b>		
Low	7	100,0
High	0	0,0
<b>Frequência de células CD8<sup>+</sup></b>		
Low	1	14,3
High	6	85,7

### **Análise de imunexpressão de células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>.**

Todos os casos apresentaram baixa frequência de células CD4<sup>+</sup>, 50% dos casos apresentaram baixa frequência de CD8<sup>+</sup> e 50% apresentaram alta frequência de CD8<sup>+</sup> (Tabela 2).

Os parâmetros imunológicos foram dicotomizados e correlacionados considerando os grupos formados com base na alta ou baixa frequência de células

CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>. A tabela 5 apresenta as frequências cruzadas entre as características clínicas e os biomarcadores combinados. A maioria dos casos com baixa frequência de CD4<sup>+</sup> e alta frequência de CD8<sup>+</sup> estavam localizados em língua, mas não houve associação entre a alta ou baixa frequência dos marcadores e a localização da lesão ( $p=0,137$ ). 7 casos tiveram recidiva, onde 6 tiveram alta frequência de CD8<sup>+</sup>. A tabela 4 apresenta ainda as frequências cruzadas das características histopatológicas quanto a classificação histológica, grau de queratinização infiltrado inflamatório, TILs e os biomarcadores. Onde as análises não apresentaram associação entre as referidas características e os resultados dos biomarcadores ( $p>0,05$ ). Os casos de peça cirúrgica foram também observados quanto a dicotomização dos marcadores CD4 e CD8 e as características clinicopatológicas, embora não tenha sido realizada associação devido ao tamanho da amostra. Onde a maioria dos casos 85,7%(6) apresentaram alta frequência de CD8 (Tabela 6).

**Tabela 5.** Relação entre as características clinicopatológicas e os biomarcadores combinados dos pacientes diagnosticados com CEB.

CARACTERÍSTICA	CD4 <sup>low</sup> CD8 <sup>low</sup>		CD4 <sup>low</sup> CD8 <sup>high</sup>		n (20)	p*
	n (10)	%	n (10)	%		
<b>Faixa etária</b>						
30 a 39	1	10,0	3	30,0	4	0,244
40 a 49	2	20,0	0	0,0	2	
50 a 59	3	30,0	5	50,0	8	
60 e mais	4	40,0	2	20,0	6	
<b>Sexo</b>						
Feminino	2	20,0	4	40,0	6	0,314
Masculino	8	80,0	6	60,0	14	
<b>Tabagismo</b>						
Sim	5	50,0	5	50,0	10	0,788
Não	3	30,0	4	40,0	7	
Não informado	2	20,0	1	10,0	3	
<b>Etilismo</b>						
Sim	5	50,0	5	50,0	10	0,450
Não	2	20,0	4	40,0	6	
Não informado	3	30,0	1	10,0	4	
<b>Localização da lesão</b>						
Assoalho bucal	2	20,0	1	10,0	3	0,137
Língua	3	30,0	8	80,0	11	
Maxila	1	10,0	0	0,0	1	
Palato	3	30,0	0	0,0	3	
Trígono retromolar	1	10,0	1	10,0	2	
<b>Recidiva / Recorrência</b>						
Sim	1	20,0	6	60,0	7	0,282
Não	4	80,0	4	40,0	8	

<b>Classificação histopatológica (OMS)</b>						
Bem diferenciado	7	70,0	8	80,0	15	0,500
Moderadamente diferenciado	3	30,0	2	20,0	5	
<b>Presença e grau de queratinização</b>						
Grau 1	4	40,0	6	60,0	10	0,670
Grau 2	3	30,0	2	20,0	5	
Grau 3	3	30,0	2	20,0	5	
<b>Infiltrado inflamatório</b>						
Leve	1	10,0	1	10,0	2	0,638
Moderado	5	50,0	3	30,0	8	
Intenso	4	40,0	6	60,0	10	
<b>TILs</b>						
0% - 40% Low	3	30,0	2	20,0	5	0,5
41% - 90% High	7	70,0	8	80,0	15	

\*p é significativo em  $p < 0,05$  (5%)  
 Teste Qui-Quadrado de Pearson  
 Teste exato de Fisher para "recidiva"

**Tabela 6.** Relação entre as características clinicopatológicas e os biomarcadores combinados com os casos de peça cirúrgica.

CARACTERÍSTICA	CD4 <sup>low</sup> CD8 <sup>low</sup>		CD4 <sup>low</sup> CD8 <sup>high</sup>		n (7)
	n (1)	%	n (6)	%	
<b>Sexo</b>					
Feminino	1	100,0	4	66,7	5
Masculino	0	0,0	2	33,3	2
<b>Tabagismo</b>					
Sim	1	100,0	4	66,7	5
Não	0	0,0	2	33,3	2
<b>Etilismo</b>					
Sim	1	100,0	4	66,7,0	5
Não	0	0,0	2	33,3	2
<b>Localização da lesão</b>					
Língua	1	100,0	6	100,0	7
<b>Recidiva / Recorrência</b>					
Sim	0	0,0	4	66,7	4
Não	0	0,0	2	33,3	2
Não informado	1	100,0	0	0,0	1
<b>Status do paciente</b>					
Óbito devido ao câncer	1	100,0	2	33,3	3
Vivo com a doença	0	0,0	1	16,7	1
Vivo sem a doença	0	0,0	1	16,7	1
Perda de seguimento	0	0,0	2	33,3	2
<b>Invasão linfática e / ou vascular</b>					
Presente	1	100,0	3	50,0	4
Não identifica	0	0,0	3	50,0	3
<b>Invasão Perineural</b>					
Presente	0	0	3	50,0	3
Não identifica	1	100,0	3	50,0	4
<b>Profundidade de invasão - DOI</b>					

≤5mm	0	0,0	2	33,3	2
≤10 mm	1	100,0	2	33,3	3
>10 mm	0	0,0	1	16,7	1
Não pode ser determinado	0	0,0	1	16,7	1
<b>Status da margem do tumor</b>					
Margem livre	1	100,0	5	83,3	6
Margem comprometida	0	0,0	1	16,7	1
<b>Status de linfonodos regionais</b>					
Comprometido por neoplasia	0	0,0	2	33,3	2
Livre de comprometimento neoplásico	0	0,0	4	66,7	4
Não pode ser determinado	1	100,0	0	0,0	1
<b>Estadiamento patológico</b>					
pT1pN0	0	0,0	1	16,7	1
pT1pN1	0	0,0	2	33,3	2
pT2pN0	0	0,0	1	16,7	1
pT2pNx	1	100,0	0	0,0	1
pT3pN0	0	0,0	1	16,7	1
pT4pN0	0	0,0	1	16,7	1
<b>Classificação histopatológica (OMS)</b>					
Bem diferenciado	1	100,0	4	66,7	5
Moderadamente diferenciado	0	0,0	2	33,3	2
<b>Presença e grau de queratinização</b>					
Grau 1	1	100,0	3	50,0	4
Grau 2	0	0,0	1	16,7	1
Grau 3	0	0,0	2	33,3	2
<b>Disposição do arranjo celular predominante</b>					
Cordões	0	0,0	1	16,7	1
Ilhas	1	100,0	3	50,0	4
Lençóis	0	0,0	2	33,3	2
<b>Infiltrado inflamatório</b>					
Leve	0	0,0	0	0,0	0
Moderado	1	100,0	0	0,0	1
Intenso	0	0,0	6	100,0	6
<b>TILs</b>					
0% - 40% Low	1	100,0	0	0,0	1
41% - 90% High	0	0,0	6	100,0	6

### **Análise de sobrevida com as características clinicopatológicas**

O tempo de sobrevida dos pacientes variou entre 0,2 (< 1 ano) e 10,9 anos, sendo a sobrevivência mediana global de 1,2 anos. A curva de sobrevida de Kaplan-Meier, mostra que quanto mais o tempo aumenta, tem menos probabilidade de sobrevivência dos pacientes (Figura 4). Não houve associação entre sobrevivência e as características clinicopatológicas dos pacientes (Tabela 6).

**Tabela 7.** Relação entre as medidas de sobrevida e as características clinicopatológicas dos pacientes diagnosticados com CEB.

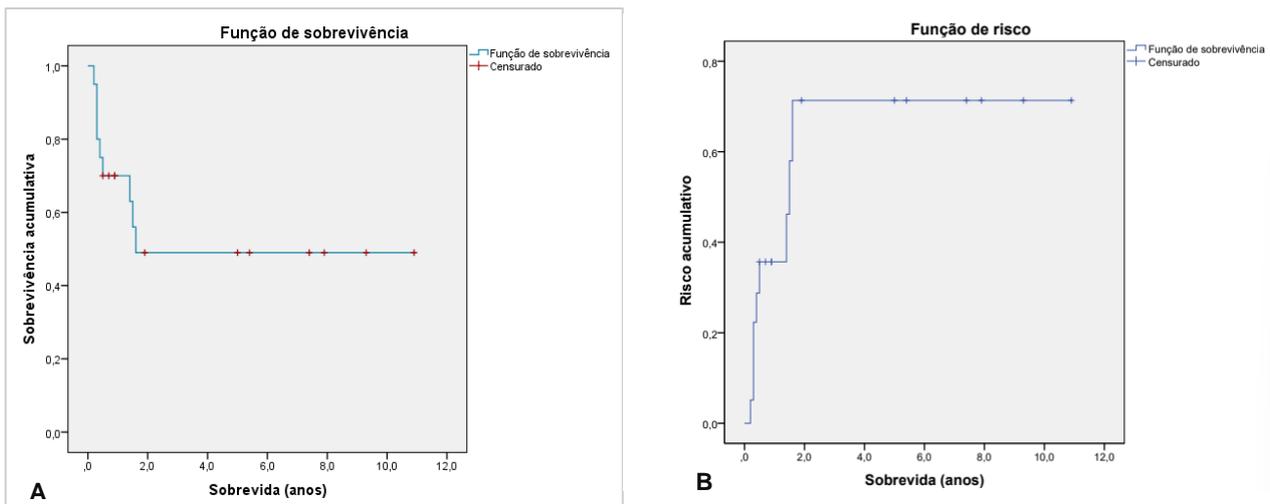
CARACTERÍSTICA	MEDIDAS DESCRITIVAS (sobrevida em anos)						p*
	n	Média	dp	Mínimo	Mediana	Máximo	
<b>Faixa Etária</b>							
30 a 39	4	6,7	4,3	1,4	7,2	10,9	0,131
40 a 49	2	0,5	0,3	0,3	0,5	0,7	
50 a 59	8	1,9	2,5	0,2	1,2	7,9	
60 e mais	6	2,5	3,1	0,3	0,7	7,4	
<b>Sexo</b>							
Feminino	6	4,1	3,9	0,4	3,3	10,9	0,186
Masculino	14	2,3	3,2	0,2	0,8	9,3	
<b>Tabagismo</b>							
Sim	10	2,0	2,6	0,2	0,7	7,9	0,494
Não	7	4,1	4,4	0,4	1,4	10,9	
Não informado	3	3,1	3,8	0,3	1,5	7,4	
<b>Etilismo</b>							
Sim	10	1,5	2,3	0,2	0,6	7,9	0,222
Não	6	4,7	4,6	0,4	3,2	10,9	
Não informado	4	3,7	3,3	0,3	3,5	7,4	
<b>Localização da lesão</b>							
Assoalho bucal	3	0,6	0,3	0,3	0,5	0,9	0,414
Língua	11	3,6	4,0	0,2	1,6	10,9	
Maxila	1	0,3	*	0,3	0,3	0,3	
Palato	3	2,6	2,4	0,9	1,5	5,4	
Trígono retromolar	2	4,1	4,7	0,7	4,1	7,4	
<b>Tipo de biópsia</b>							
Incisional	13	2,5	3,1	0,2	0,9	9,3	0,341
Peça cirúrgica	7	3,5	4,2	0,3	1,6	10,9	
<b>Tratamento</b>							
Cirurgia	7	4,3	3,6	0,3	5,0	9,3	0,141
Quimioterapia	1	0,2	*	0,2	0,2	0,2	
Radioterapia	2	0,3	0,0	0,3	0,3	0,3	
Cirurgia + Quimioterapia	1	1,9	*	1,9	1,9	1,9	
Cirurgia + Radioterapia	2	0,5	0,0	0,5	0,5	0,5	
Cirurgia + Radioterapia + Quimioterapia	2	6,3	6,6	1,6	6,3	10,9	
Radioterapia + Quimioterapia	3	0,9	0,6	0,4	0,9	1,5	
Não informado	2	4,2	4,6	0,9	4,2	7,4	
<b>Classificação histopatológica</b>							
Bem diferenciado	15	2,9	3,5	0,3	0,9	10,9	0,694
Moderadamente diferenciado	5	2,6	3,8	0,2	1,4	9,3	
<b>Presença e grau de queratinização</b>							
Grau 1: Altamente queratinizada (>50%)	10	3,9	3,9	0,3	3,0	10,9	

Grau 2: Moderadamente queratinizada (20%-50%)	5	2,5	3,9	0,3	0,9	9,3	0,608
Grau 3: Queratinização mínima (5%-20%)	5	1,1	0,7	0,2	1,4	1,9	
<b>Disposição do arranjo celular predominante</b>							
Cordões	3	1,0	0,7	0,2	1,4	1,5	
Ilhas	13	3,4	3,8	0,3	0,9	10,9	0,659
Lençóis	4	2,5	3,4	0,3	1,1	7,4	
<b>TILs</b>							
Low (0 a 40%)	5	4,4	4,1	0,2	5,0	9,3	0,827
High (41 a 90%)	15	2,3	3,2	0,3	0,9	10,9	
<b>Infiltrado inflamatório</b>							
Leve	2	8,4	1,3	7,4	8,4	9,3	
Moderado	8	1,7	2,2	0,3	0,6	5,4	0,110
Intenso	10	2,7	3,6	0,2	1,5	10,9	
<b>Frequência de células CD4+</b>							
Low	20	2,9	3,4	0,2	1,2	10,9	NA
High	-	-	-	-	-	-	
<b>Frequência de células CD8+</b>							
Low	10	1,94	3,021	0,2	0,6	9,3	0,069
High	10	3,79	3,75	0,4	1,75	10,9	
<b>Recidiva / Recorrência</b>							
Sim	7	3,5	4,0	0,7	1,6	10,9	0,728
Não	8	3,8	3,6	0,3	3,3	9,3	

NA: Não se Aplica

\*p é significativo em  $p < 0,05$  (5%)

ANOVA de Kruskal-Wallis



**Figura 4:** curva de sobrevida de Kaplan-Meier dos pacientes diagnosticados com CEB. (A): Curva de sobrevivência, a curva mostra a sobrevida até o evento – morte ocorrer, quanto mais o tempo aumenta, menos probabilidade de sobrevivência. Os participantes que não desenvolveram o evento até o final do estudo ou tiveram perda de acompanhamento são censurados (traços em vermelho). (B): Função de risco, a curva mostra o risco até o evento – morte ocorrer, quanto mais o tempo aumenta, maior probabilidade de morte.

## DISCUSSÃO

O presente estudo avaliou a relação entre a frequência de células CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e TILs no CEB, e sua associação com várias características clinicopatológicas e análise de sobrevida, em 20 amostras oriundas sobretudo de biopsias com algumas peças cirúrgicas de casos diagnosticados com CEB. A amostra consecutiva foi de conveniência incluída em um período de 5 anos.

O câncer de cavidade oral representa um grande problema de saúde. No Brasil mais de 90% dos casos são representados pelo CEB (1). O perfil epidemiológico dos pacientes com CEB tem mudado ao longo do tempo, com acentuada variação regional, mas ainda há maior prevalência no sexo masculino, geralmente indivíduos mais velhos, após a quinta década de vida (5,7). Nesse estudo, a maioria dos pacientes era do sexo masculino, com média de idade 53 anos e predominância de pacientes com mais de 55 anos, semelhante ao visto em estudos anteriores, onde tem uma predominância homens com mais 60 anos, mas difere um pouco na idade (1,7). Em relação à localização da lesão, a maioria dos casos foi descrito na língua, seguida do assoalho bucal e palato. Os dados são congruentes com o que descreve a epidemiologia brasileira sobre a localização mais frequente do CEB (1,7).

A associação entre tabaco e o álcool com CEB estão estabelecidos na literatura (5,7,24). Em relação aos tabagistas e etilistas desse estudo, 50% era tabagista e 50% etilista, os resultados foram semelhantes ao estudo de Leite et al., (2018), que a 50% de todos os pacientes que foram questionados se faziam uso de álcool ou tabaco responderam que faziam uso de ambas as substâncias. O que a literatura afirma que os fumantes acometidos com CEB se encontram com estadiamento mais avançado e características patológicas mais agressivas que os pacientes com CEB e sem histórico de tabagismo (25).

Muitos estudos indicaram que a presença de linfócitos infiltrantes de tumor (TILs) é um fator prognóstico favorável para o resultado do tratamento em diferentes tipos de câncer(11,14,15,20). O TME abriga uma variedade de células imunes, sendo composto principalmente de TILs (linfócitos T e B e células NK), macrófagos e células dendríticas (17,26,27). Todos os componentes desempenham papéis críticos na detecção e eliminação de células tumorais, contribuindo assim para interromper a progressão e proliferação do tumor (28). Os linfócitos T CD4<sup>+</sup>, coordenam a imunidade adaptativa das células T, reconhecem antígenos peptídicos de moléculas MHC II de Classe II. As células T CD4<sup>+</sup> podem ter uma função efetora e apoiar a diferenciação

em células T CD8<sup>+</sup> ou se diferenciar em Tregs induzidos que medeiam a imunossupressão (19,29). Já os linfócitos T CD8<sup>+</sup>, reconhecem antígenos peptídicos em moléculas MHC I de Classe I. As células T CD8<sup>+</sup> inibem o crescimento do câncer e, na maioria dos cânceres, as células T CD8<sup>+</sup> estão associadas a um prognóstico favorável e à sobrevivência livre de doença (29).

O presente estudo avaliou a relação entre TILs, frequência de CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> no CEB, bem como sua associação com várias características clinicopatológicas. Neste estudo, a expressão de CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> não foi significativamente associada a parâmetros clínicos como idade, sexo e local do tumor. Os resultados do estudo foram semelhantes ao estudo de Wahbi e Al Manadili (30), onde foi relatado que a expressão de CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> não foi significativamente associada à idade, sexo e tabagismo. Assim como o estudo de Jeyapriya *et al.*(29), onde a expressão de CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> não foi significativamente associada a parâmetros clínicos como idade, sexo, hábito de fumar ou local do tumor. Já, no estudo de Lequerica-Fernández *et al.* (26), no qual houve TILs de CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> mais elevados ao hábito de fumar e consumo de álcool. Isso mostra que a tumorigênese pode ser multifatorial e não limitada a hábitos e locais de tumor (29).

As alterações histopatológicas priorizadas neste estudo foram a presença de infiltrado inflamatório, graduação dos tumores e presença de TILs. Estudos mostram a importância da associação da densidade e distribuição dos TILs e o impacto significativo no prognóstico dos pacientes (31–33). Semelhante a um estudo (20), este estudo encontrou uma correlação positiva entre infiltrado inflamatório e densidade de TILs, o que indica que células inflamatórias recrutadas ainda podem infiltrar as áreas tumorais. No presente estudo 50% (10) da amostra apresentou alta frequência de CD8<sup>+</sup>, no qual a alta expressão do CD8<sup>+</sup> foi observada em 53% dos tumores bem diferenciados, mas não houve significância estatística, quanto ao grau histológico. As células T CD8<sup>+</sup> são geralmente consideradas a principal força contra o câncer (11). Em apoio a isso, Sales de Sá *et al.*(28) encontraram uma associação entre alta expressão de CD3 e CD8 com tumores bem diferenciados. Em um estudo de Wahbi e Al Manadili (30), o CD8<sup>+</sup> não foi associado ao grau de malignidade, o que é conjecturado que devido à complexidade de sua correlação com o microambiente do CEB, como a sinalização por meio de receptores, incluindo CTLA-4 e PD-1 em células CD8<sup>+</sup>, pode inibir sua atividade (30). Contrariamente no estudo de Jeyapriya *et al.*(29) a expressão de CD8<sup>+</sup> correlacionou-se positivamente com o aumento do grau

histopatológico do CEB, no qual é relacionado que apesar das células CD8<sup>+</sup> exercerem um efeito tumoricida, o grau mais elevado de tumores, apesar da infiltração pesada de CD8<sup>+</sup>, pode ser devido à imunoeedição do câncer (29). Deve-se levar em consideração também que a diferença nos resultados possivelmente é devido ao tamanho das amostras, aos diversos sistemas de pontuação usados para calcular a expressão de TIL e às diferentes técnicas de análise de tecidos e caracterização de linfócitos, que podem resultar em discrepâncias nos resultados desses estudos.

Em um estudo realizado por Wolf *et al.*(31) casos com contagens mais altas de infiltrado de CD8 foram associadas à recorrência do tumor ( $p=.05$ ), mas não à sobrevida geral ou específica da doença, o que é inesperado visto essa população de célula é conhecida por ter qualidade supressora no microambiente tumoral. Porém eles também observaram que uma menor infiltração geral de linfócitos (soma de células CD4 e CD8) tendeu a estar associada a maiores taxas de recorrência. Shimizu *et al.*(32) relataram que o CD8<sup>+</sup> é um indicador de recorrência tumoral e prognóstico no CEB. Neste estudo 7 casos tiveram histórico de recidiva, onde 6 apresentaram uma razão de baixa frequência CD4<sup>+</sup> e baixa ou alta de CD8<sup>+</sup>, porém não houve significância estatística.

Estudos anteriores mostram que a alta expressão de células T citotóxicas CD8<sup>+</sup> está correlacionada com melhor sobrevivência em paciente com CEB (11,28,32,33). Onde a alta densidade de células T CD8<sup>+</sup> estromais na periferia do tumor e a alta densidade de células T CD8<sup>+</sup> parenquimatosas na borda invasora podem ser fatores prognósticos independentes para sobrevida livre de recorrência e sobrevida global (32).

Este estudo traz 7 amostras provenientes de peças cirúrgicas, onde a presença de invasão linfovascular foi observada em 57,1% dos casos, invasão perineural em 42,9% e 28,6% com comprometimento linfonodal regional. Porém, devido ao tamanho amostral, não foi viável fazer a associações dessas características histopatológicas e ou o estadiamento pTNM com os marcadores. Assim, não sendo possível saber o valor prognóstico dessas variáveis.

Para células T CD4<sup>+</sup>, estudos anteriores encontraram uma associação entre baixa expressão de CD4 e estágio T mais alto e presença de invasão linfovascular (11,34). No entanto, estudos como os de Spector *et al.*(35) e Gaafar *et al.*(36) relataram que contagens mais altas de células CD4<sup>+</sup> estavam associadas ao CEC oral em estágio avançado. Além disso, os estudos de Gaafar *et al.*(36) e de Whabi *et al.*

2022 descobriram que o infiltrado denso de células CD4<sup>+</sup> estava associado a tumores pouco diferenciados, o que para eles apoia a visão de que a infiltração de células T auxiliares CD4<sup>+</sup> pode ser um indicador de resposta protumoral. Neste estudo, em todos os casos houve baixa expressão de CD4, e na razão de CD4<sup>low</sup>/CD8<sup>low</sup> ou CD8<sup>high</sup> não houve nenhuma associação entre as variáveis clinicopatológicas.

Em relação ao valor prognóstico da expressão de CD4 em CEB, Sales de Sá *et al.*(28) descobriram que o aumento da expressão de CD4<sup>+</sup> tendia a ter um prognóstico pior no CEC oral, mas esse resultado não foi significativo e o estudo incluiu apenas 48 participantes. Assim como Gaafar *et al.*(36) descobriram que células CD4<sup>+</sup> densas estavam associadas a pior sobrevida global, embora seja importante notar que o tempo médio de acompanhamento para o estudo foi relativamente curto (48 meses), e o tamanho da amostra foi relativamente pequeno ( $n = 22$ ). No entanto, o estudo de Wongpattaraworakul *et al.*(11) mostrou associações significativas entre alta expressão de CD4 e resultados de sobrevivência favoráveis, e que a baixa expressão de CD4 (e não CD3 ou CD8) poderia identificar pacientes com CEB em estágio inicial com resultados de sobrevida desfavoráveis. Não se tem certeza sobre esses resultados inconsistentes na literatura de expressão de CD4 em CEB, no entanto, as células CD4<sup>+</sup> são capazes de se diferenciar em diferentes subconjuntos, onde todos tem papéis diferentes. Especula-se que as diferenças nos subtipos tumorais de células CD4<sup>+</sup> podem explicar a variabilidade observada entre esses estudos, e sugere-se que analisar o valor prognóstico de subconjuntos específicos de células T CD4<sup>+</sup> pode ser valioso (11). No presente trabalho observou-se que dos 8 casos que foram a óbito devido a doença, 5 tiveram baixa frequência de CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup>, porém não foi possível estabelecer associação. A sobrevivência mediana global foi de 1,2 anos, porém quando os resultados de sobrevida foram analisados de acordo com as características clinicopatológicas dos pacientes, não houve significância estatística.

Este trabalho contém algumas limitações e que devem ser discutidas. Uma delas é seu desenho retrospectivo, que introduz vieses inerentes. A fonte do paciente foi uma única instituição, o que pode resultar em viés de seleção, como também limitar a generalização dos resultados. Além disso, as dificuldades estatísticas incluem a coorte de pacientes relativamente pequena limitando o poder estatístico. Um tamanho de amostra maior pode mostrar uma associação significativa entre infiltração de CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> e os parâmetros clinicopatológicos. Apesar das limitações, este trabalho

representa um marco para a caracterização da população da presente amostra, mostra o perfil de inflamação presente e densidade e frequência TILs nestes tumores, ainda que com marcadores específicos CD4 e CD8, percebe-se uma diferença entre os marcadores, visto que houve um comportamento diferente, onde todos os casos teve baixa frequência de células CD4<sup>+</sup>, já a frequência de células CD8<sup>+</sup> foi alta em 50% dos casos em geral e em 53% dos casos bem diferenciados. Tal constatação precisa ser melhor investigada, em termos biológicos de cada um, visto que as células T CD4<sup>+</sup> e CD8<sup>+</sup> desempenham papéis distintos, mas complementares, no sistema imunológico e nos hallmarks do câncer.

## CONCLUSÃO

- O perfil epidemiológico e histopatológico dos pacientes com CEC primário de boca neste estudo é semelhante ao perfil clássico encontrado na literatura, com pacientes do sexo masculino, acima dos 50 anos, com lesões em língua e amostras de CEB convencional bem queratinizado.
- O perfil de TILs elevado em um contexto de infiltrado inflamatório intenso, sinaliza que as células inflamatórias recrutadas mantêm a capacidade de infiltrar as áreas tumorais, reforçando a importância biológica da inflamação como *Hallmark* do câncer.
- A alta expressão dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> em 50% dos casos em geral e em 53% dos casos bem diferenciados, sinaliza seu papel citotóxico, em casos com características mais favoráveis do ponto de vista histológico.
- A baixa frequência de linfócitos CD4<sup>+</sup> em todos os CEBs sinaliza que a resposta imunológica orquestrada provavelmente não é o caminho prioritário frente ao CEB clássico.
- A análise dos linfócitos T CD4 e CD8 não deve ser feita de maneira isolada no contexto da biologia tumoral do CEB. Estudos adicionais com subconjuntos de células T, além de outras células inflamatórias são necessários para melhor entendimento do papel da resposta imune na biologia tumoral.

## REFERÊNCIAS

1. Louredo BVR, Vargas PA, Pérez-De-oliveira ME, Lopes MA, Kowalski LP, Curado MP. Epidemiology and survival outcomes of lip, oral cavity, and oropharyngeal squamous cell carcinoma in a southeast Brazilian population. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* [Internet]. 2022 May 1 [cited 2023 May 25];27(3):e274–84. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35368013/>
2. Perdomo S, Martin Roa G, Brennan P, Forman D, Sierra MS. Head and neck cancer burden and preventive measures in Central and South America. *Cancer Epidemiol* [Internet]. 2016 Sep 1 [cited 2023 May 25];44 Suppl 1:S43–52. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27678322/>
3. Sung H, Ferlay J, Siegel RL, Laversanne M, Soerjomataram I, Jemal A, et al. Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2021 May [cited 2023 May 25];71(3):209–49. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33538338/>
4. Bray Bsc F, Laversanne | Mathieu, Hyuna |, Phd S, Ferlay J, Siegel Mph RL, et al. Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. *CA Cancer J Clin* [Internet]. 2024 May 1 [cited 2025 Jan 6];74(3):229–63. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/caac.21834>
5. Muller S, Tilakaratne WM. Update from the 5th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumors: Tumours of the Oral Cavity and Mobile Tongue. *Head Neck Pathol* [Internet]. 2022 Mar 1 [cited 2023 Aug 14];16(1):54. Available from: [/pmc/articles/PMC9018914/](https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35368013/)
6. El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ. WHO Classification of Head and Neck Tumours. 4th editio. IARC: Lyon, editor. 2017.
7. Leite AA, Leonel ACL da S, de Castro JFL, Carvalho EJ de A, Vargas PA, Kowalski LP, et al. Oral squamous cell carcinoma: a clinicopathological study on 194 cases in northeastern Brazil. A cross-sectional retrospective study. *Sao Paulo Med J* [Internet]. 2018 Mar 1 [cited 2023 May 25];136(2):165–9. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29590233/>
8. Plzák J, Bouček J, Bandúrová V, Kolář M, Hradilová M, Szabo P, et al. The Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Microenvironment as a Potential Target for Cancer Therapy. *Cancers (Basel)* [Internet]. 2019 Apr 1 [cited 2023 May 25];11(4). Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30925774/>
9. Blatt S, Krüger M, Ziebart T, Sagheb K, Schiegnitz E, Goetze E, et al. Biomarkers in diagnosis and therapy of oral squamous cell carcinoma: A review of the literature. *J Craniomaxillofac Surg* [Internet]. 2017 May 1 [cited 2023 Jul 31];45(5):722–30. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28318929/>
10. Mesia R, Iglesias L, Lambea J, Martínez-Trufero J, Soria A, Taberna M, et al. SEOM clinical guidelines for the treatment of head and neck cancer (2020). *Clin Transl Oncol* [Internet]. 2021 May 1 [cited 2025 Feb 21];23(5):913–21. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33635468/>

11. Wongpattaraworakul W, Choi A, Buchakjian MR, Lanzel EA, KD AR, Simons AL. Prognostic Role of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Oral Squamous Cell Carcinoma. *BMC Cancer* [Internet]. 2024 Dec 1 [cited 2025 Jan 3];24(1):766. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11201865/>
12. Hanahan D. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. *Cancer Discov* [Internet]. 2022 Jan 1 [cited 2025 Feb 3];12(1):31–46. Available from: [/cancerdiscovery/article/12/1/31/675608/Hallmarks-of-Cancer-New-DimensionsHallmarks-of](https://cancerdiscovery/article/12/1/31/675608/Hallmarks-of-Cancer-New-DimensionsHallmarks-of)
13. Ni YH, Zhang X xin, Lu Z yi, Huang XF, Wang ZY, Yang Y, et al. Tumor-Infiltrating CD1a+ DCs and CD8+/FoxP3+ Ratios Served as Predictors for Clinical Outcomes in Tongue Squamous Cell Carcinoma Patients. *Pathol Oncol Res* [Internet]. 2020 Jul 1 [cited 2025 Jan 3];26(3):1687–95. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31606786/>
14. Salgado R, Denkert C, Demaria S, Sirtaine N, Klauschen F, Pruneri G, et al. The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. *Ann Oncol* [Internet]. 2014 Feb 1 [cited 2025 Jan 3];26(2):259. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6267863/>
15. Fu Q, Chen N, Ge C, Li R, Li Z, Zeng B, et al. Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in melanoma: a systematic review and meta-analysis. *Oncoimmunology* [Internet]. 2019 Jul 3 [cited 2025 Jan 15];8(7):1593806. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6527267/>
16. de Ruyter EJ, Ooft ML, Devriese LA, Willems SM. The prognostic role of tumor infiltrating T-lymphocytes in squamous cell carcinoma of the head and neck: A systematic review and meta-analysis. *Oncoimmunology* [Internet]. 2017 Nov 2 [cited 2025 Jan 2];6(11):e1356148. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5674970/>
17. Tiwari A, Trivedi R, Lin SY. Tumor microenvironment: barrier or opportunity towards effective cancer therapy. *J Biomed Sci* [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2024 Dec 26];29(1):83. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9575280/>
18. Rosenberg J, Huang J. CD8+ T Cells and NK Cells: Parallel and Complementary Soldiers of Immunotherapy. *Curr Opin Chem Eng* [Internet]. 2017 Mar 1 [cited 2025 Jan 2];19:9. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5880541/>
19. Tay RE, Richardson EK, Toh HC. Revisiting the role of CD4+ T cells in cancer immunotherapy—new insights into old paradigms. *Cancer Gene Ther* [Internet]. 2020 Feb 1 [cited 2025 Jan 2];28(1):5. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7886651/>
20. de Souza VG, Santos DJS, Silva AG, Ribeiro RIM de A, Loyola AM, Cardoso SV, et al. Immunoexpression of PD-L1, CD4+ and CD8+ cell infiltrates and tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in the microenvironment of actinic cheilitis and lower lip squamous cell carcinoma. *J Appl Oral Sci* [Internet]. 2022 [cited 2025 Jan 3];30:e20210344. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8860405/>

21. ANNEROTH G, BATSAKIS J, LUNA M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. *Eur J Oral Sci* [Internet]. 1987 Jun 1 [cited 2025 Jan 22];95(3):229–49. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1600-0722.1987.tb01836.x>
22. Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Kjærheim Å. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. *J Pathol* [Internet]. 1992 Apr 1 [cited 2025 Jan 22];166(4):375–81. Available from: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/path.1711660409>
23. LiboRio TN, Acquafreda T, Matizonkas-Antonio LF, Silva-Valenzuela MG, Ferraz AR, Nunes FD. In situ hybridization detection of homeobox genes reveals distinct expression patterns in oral squamous cell carcinomas. *Histopathology* [Internet]. 2011 Jan [cited 2025 Jan 22];58(2):225–33. Available from: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21323949/>
24. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Chi AC. *Patologia Oral e Maxilofacial 4ed* [Internet]. Elsevier; 2016. Available from: [www.mercadolivre.com.br](http://www.mercadolivre.com.br)
25. Al Feghali K, Ghanem A, Burmeister C, Chang S, Ghanem T, Keller C, et al. Impact of Smoking on Pathological Features in Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma. *J Cancer Res Ther* [Internet]. 2019 Apr 1 [cited 2025 Jan 15];15(3):582. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7470189/>
26. Lequerica-Fernández P, Suárez-Canto J, Rodriguez-Santamarta T, Rodrigo JP, Suárez-Sánchez FJ, Blanco-Lorenzo V, et al. Prognostic relevance of cd4+, cd8+ and foxp3+ tils in oral squamous cell carcinoma and correlations with pd-l1 and cancer stem cell markers. *Biomedicines* [Internet]. 2021 Jun 1 [cited 2025 Jan 17];9(6):653. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8227658/>
27. Bisheshar SK, van der Kamp MF, de Vries J, Slagter-Menkema L, Schuurung EMD, Lunter GA, et al. Addition of tumor microenvironment immune cell composition to improve the performance of a predictive model for oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2024 Jun 1;153:106830.
28. Sales de Sá R, Miranda Galvis M, Mariz BALA, Leite AA, Schultz L, Almeida OP, et al. Increased Tumor Immune Microenvironment CD3+ and CD20+ Lymphocytes Predict a Better Prognosis in Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma. *Front Cell Dev Biol* [Internet]. 2021 Feb 18 [cited 2025 Jan 17];8:622161. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7951138/>
29. Jeyapriya SM, Mohan AM, Kumar MS, Nirmal RM. Expression of CD4+ and CD8+ Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Oral Squamous Cell Carcinoma and Their Relationship With Clinicopathological Parameters: A Cross-Sectional Study. *Cureus* [Internet]. 2024 Apr 22 [cited 2024 Dec 21];16(4):e58748. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11110919/>
30. Wahbi HS, Al Manadili A. Immunoexpression of Tumor Infiltrating Lymphocytes(TILS) CD4 + and CD8 + in Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) in Correlations with Clinicopathological Characteristics and Prognosis.

- Asian Pac J Cancer Prev [Internet]. 2022 [cited 2025 Jan 3];23(12):4177. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9971484/>
31. Wolf GT, Chepeha DB, Bellile E, Nguyen A, Thomas D, McHugh J, et al. Tumor Infiltrating Lymphocytes (TIL) and Prognosis in Oral Cavity Squamous Carcinoma: A Preliminary Study. *Oral Oncol* [Internet]. 2014 Jan 1 [cited 2025 Jan 21];51(1):90. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4268429/>
  32. Shimizu S, Hiratsuka H, Koike K, Tsuchihashi K, Sonoda T, Ogi K, et al. Tumor-infiltrating CD8+ T-cell density is an independent prognostic marker for oral squamous cell carcinoma. *Cancer Med* [Internet]. 2019 Jan 1 [cited 2025 Jan 21];8(1):80. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6346233/>
  33. Mukherjee G, Bag S, Chakraborty P, Dey D, Roy S, Jain P, et al. Density of CD3+ and CD8+ cells in gingivo-buccal oral squamous cell carcinoma is associated with lymph node metastases and survival. *PLoS One* [Internet]. 2020 Nov 1 [cited 2025 Jan 3];15(11):e0242058. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7676650/>
  34. Chen WY, Wu CT, Wang CW, Lan KH, Liang HK, Huang BS, et al. Prognostic significance of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with operable tongue cancer. *Radiat Oncol* [Internet]. 2018 Aug 28 [cited 2025 Jan 17];13(1):157. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6114480/>
  35. Spector ME, Bellile E, Amlani L, Zarins K, Smith J, Brenner JC, et al. Prognostic Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. *JAMA Otolaryngol Head Neck Surg* [Internet]. 2019 Nov 1 [cited 2025 Jan 17];145(11):1012. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6735419/>
  36. Gaafar NM, Osman TAH, Elsheikh M, Ahmed IA, Dongre H, Fromreide S, et al. Epithelial PD-L1 expression at tumor front predicts overall survival in a cohort of oral squamous cell carcinomas from Sudan. *Clin Exp Dent Res* [Internet]. 2022 Dec 1 [cited 2025 Jan 17];8(6):1467. Available from: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9760153/>

## 6. CONCLUSÃO

- O perfil epidemiológico e histopatológico dos pacientes com CEC primário de boca neste estudo é semelhante ao perfil clássico encontrado na literatura, com pacientes do sexo masculino, acima dos 50 anos, com lesões em língua e amostras de CEB convencional bem queratinizado.
- O perfil de TILs elevado em um contexto de infiltrado inflamatório intenso, sinaliza que as células inflamatórias recrutadas mantêm a capacidade de infiltrar as áreas tumorais, reforçando a importância biológica da inflamação como *Hallmark* do câncer.
- A alta expressão dos linfócitos T CD8<sup>+</sup> em 50% dos casos em geral e em 53% dos casos bem diferenciados, sinaliza seu papel citotóxico, em casos com características mais favoráveis do ponto de vista histológico.
- A baixa frequência de linfócitos CD4<sup>+</sup> em todos os CEBs sinaliza que a resposta imunológica orquestrada provavelmente não é o caminho prioritário frente ao CEB clássico.
- A análise dos linfócitos T CD4 e CD8 não deve ser feita de maneira isolada no contexto da biologia tumoral do CEB. Estudos adicionais com subconjuntos de células T, além de outras células inflamatórias são necessários para melhor entendimento do papel da resposta imune na biologia tumoral.

## REFERÊNCIAS

- AL FEGHALI, Karine *et al.* Impact of Smoking on Pathological Features in Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma. **Journal of cancer research and therapeutics**, [s. l.], v. 15, n. 3, p. 582, 2019. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7470189/>. Acesso em: 15 jan. 2025.
- ALMANGUSH, Alhadi *et al.* Prognostic biomarkers for oral tongue squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. **British Journal of Cancer**, [s. l.], v. 117, n. 6, p. 856, 2017. Disponível em: [/pmc/articles/PMC5589992/](https://pmc/articles/PMC5589992/). Acesso em: 22 jan. 2024.
- ALMANGUSH, Alhadi *et al.* Staging and grading of oral squamous cell carcinoma: An update. **Oral Oncology**, [s. l.], v. 107, p. 104799, 2020.
- AMIN, Mahul B. *et al.* The Eighth Edition AJCC Cancer Staging Manual: Continuing to build a bridge from a population-based to a more “personalized” approach to cancer staging. **CA: a cancer journal for clinicians**, [s. l.], v. 67, n. 2, p. 93–99, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28094848/>. Acesso em: 19 jan. 2024.
- ANNERTH, GÖRAN; BATSAKIS, JOHN; LUNA, MARIO. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. **European Journal of Oral Sciences**, [s. l.], v. 95, n. 3, p. 229–249, 1987. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1600-0722.1987.tb01836.x>. Acesso em: 22 jan. 2025.
- BISHESHAR, Sangeeta K. *et al.* Addition of tumor microenvironment immune cell composition to improve the performance of a predictive model for oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, [s. l.], v. 153, p. 106830, 2024.
- BLATT, Sebastian *et al.* Biomarkers in diagnosis and therapy of oral squamous cell carcinoma: A review of the literature. **Journal of cranio-maxillo-facial surgery: official publication of the European Association for Cranio-Maxillo-Facial Surgery**, [s. l.], v. 45, n. 5, p. 722–730, 2017. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/28318929/>. Acesso em: 31 jul. 2023.
- BORSETTO, Daniele *et al.* Prognostic Significance of CD4+ and CD8+ Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: A Meta-Analysis. **Cancers**, [s. l.], v. 13, n. 4, p. 781, 2021. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7918220/>. Acesso em: 21 dez. 2024.
- BRAY BSC, Freddie *et al.* Global cancer statistics 2022: GLOBOCAN estimates of incidence and mortality worldwide for 36 cancers in 185 countries. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, [s. l.], v. 74, n. 3, p. 229–263, 2024. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.3322/caac.21834>. Acesso em: 6 jan. 2025.
- BRYNE, Magne *et al.* Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. **The Journal of Pathology**, [s. l.], v. 166, n. 4, p. 375–381, 1992. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1002/path.1711660409>. Acesso em: 22 jan. 2025.
- CHEN, Wan Yu *et al.* Prognostic significance of tumor-infiltrating lymphocytes in patients with operable tongue cancer. **Radiation Oncology (London, England)**, [s. l.], v. 13, n. 1, p. 157, 2018. Disponível em:

<https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6114480/>. Acesso em: 17 jan. 2025.

CUSCHIERI, Sarah. The STROBE guidelines. **Saudi Journal of Anaesthesia**, [s. l.], v. 13, n. Suppl 1, p. S31, 2019. Disponível em: </pmc/articles/PMC6398292/>. Acesso em: 30 jan. 2024.

DAROIT, Natália Batista *et al.* Oral cancer over six decades: a multivariable analysis of a clinicopathologic retrospective study. **Brazilian Dental Journal**, [s. l.], v. 34, n. 5, p. 115, 2023. Disponível em: </pmc/articles/PMC10759960/>. Acesso em: 11 jan. 2024.

DE CASTRO RIBEIRO LINDENBLATT, Rhayany *et al.* Oral squamous cell carcinoma grading systems – analysis of the best survival predictor. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, [s. l.], v. 41, n. 1, p. 34–39, 2012. Disponível em: <https://onlinelibrary.wiley.com/doi/full/10.1111/j.1600-0714.2011.01068.x>. Acesso em: 12 jan. 2024.

DE RUITER, Emma J. *et al.* The prognostic role of tumor infiltrating T-lymphocytes in squamous cell carcinoma of the head and neck: A systematic review and meta-analysis. **Oncoimmunology**, [s. l.], v. 6, n. 11, p. e1356148, 2017. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5674970/>. Acesso em: 2 jan. 2025.

DE SOUZA, Vinícius Gonçalves *et al.* Immunoexpression of PD-L1, CD4+ and CD8+ cell infiltrates and tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in the microenvironment of actinic cheilitis and lower lip squamous cell carcinoma. **Journal of Applied Oral Science**, [s. l.], v. 30, p. e20210344, 2022. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8860405/>. Acesso em: 3 jan. 2025.

EI-NAGGAR, A K *et al.* **WHO Classification of Head and Neck Tumours**. 4th edition. [S. l.: s. n.], 2017.

FU, Qiaofen *et al.* Prognostic value of tumor-infiltrating lymphocytes in melanoma: a systematic review and meta-analysis. **Oncoimmunology**, [s. l.], v. 8, n. 7, p. 1593806, 2019. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6527267/>. Acesso em: 15 jan. 2025.

GAAFAR, Nuha M. *et al.* Epithelial PD-L1 expression at tumor front predicts overall survival in a cohort of oral squamous cell carcinomas from Sudan. **Clinical and Experimental Dental Research**, [s. l.], v. 8, n. 6, p. 1467, 2022. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9760153/>. Acesso em: 17 jan. 2025.

HANAHAN, Douglas. Hallmarks of Cancer: New Dimensions. **Cancer Discovery**, [s. l.], v. 12, n. 1, p. 31–46, 2022. Disponível em: </cancerdiscovery/article/12/1/31/675608/Hallmarks-of-Cancer-New-DimensionsHallmarks-of>. Acesso em: 3 fev. 2025.

HANAKAWA, Hiroyuki *et al.* Regulatory T-cell infiltration in tongue squamous cell carcinoma. **Acta oto-laryngologica**, [s. l.], v. 134, n. 8, p. 859–864, 2014. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/24921153/>. Acesso em: 3 jan. 2025.

JEYAPRIYA, S Marytresia *et al.* Expression of CD4+ and CD8+ Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Oral Squamous Cell Carcinoma and Their Relationship With Clinicopathological Parameters: A Cross-Sectional Study. **Cureus**, [s. l.], v. 16, n. 4, p. e58748, 2024. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11110919/>. Acesso em: 21 dez. 2024.

LEITE, Amanda Almeida *et al.* Oral squamous cell carcinoma: a clinicopathological study on 194 cases in northeastern Brazil. A cross-sectional retrospective study. **Sao Paulo medical journal = Revista paulista de medicina**, [s. l.], v. 136, n. 2, p. 165–169, 2018. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/29590233/>. Acesso em: 25 maio 2023.

LEQUERICA-FERNÁNDEZ, Paloma *et al.* Prognostic relevance of cd4+, cd8+ and foxp3+ tils in oral squamous cell carcinoma and correlations with pd-l1 and cancer stem cell markers. **Biomedicines**, [s. l.], v. 9, n. 6, p. 653, 2021. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC8227658/>. Acesso em: 17 jan. 2025.

LIBORIO, Tatiana N. *et al.* In situ hybridization detection of homeobox genes reveals distinct expression patterns in oral squamous cell carcinomas. **Histopathology**, [s. l.], v. 58, n. 2, p. 225–233, 2011. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/21323949/>. Acesso em: 22 jan. 2025.

LOUREDO, Brendo Vinícius Rodrigues *et al.* Epidemiology and survival outcomes of lip, oral cavity, and oropharyngeal squamous cell carcinoma in a southeast Brazilian population. **Medicina oral, patología oral y cirugía bucal**, [s. l.], v. 27, n. 3, p. e274–e284, 2022. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/35368013/>. Acesso em: 25 maio 2023.

MAGAKI, Shino *et al.* An Introduction to the Performance of Immunohistochemistry. **Methods in molecular biology (Clifton, N.J.)**, [s. l.], v. 1897, p. 289, 2019. Disponível em: [/pmc/articles/PMC6749998/](https://pmc/articles/PMC6749998/). Acesso em: 31 jul. 2023.

MATSUO, Katsuhisa *et al.* Squamous cell carcinoma of the tongue: subtypes and morphological features affecting prognosis. **American journal of physiology. Cell physiology**, [s. l.], v. 323, n. 6, p. C1611–C1623, 2022. Disponível em: <https://journals.physiology.org/doi/10.1152/ajpcell.00098.2022>. Acesso em: 12 jan. 2024.

MESIA, R. *et al.* SEOM clinical guidelines for the treatment of head and neck cancer (2020). **Clinical & translational oncology : official publication of the Federation of Spanish Oncology Societies and of the National Cancer Institute of Mexico**, [s. l.], v. 23, n. 5, p. 913–921, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33635468/>. Acesso em: 21 fev. 2025.

MINISTÉRIO DA SAÚDE INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA MINISTÉRIO DA SAÚDE INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. [s. l.], 2023.

MUKHERJEE, Geetashree *et al.* Density of CD3+ and CD8+ cells in gingivo-buccal oral squamous cell carcinoma is associated with lymph node metastases and survival. **PLoS ONE**, [s. l.], v. 15, n. 11, p. e0242058, 2020. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7676650/>. Acesso em: 3 jan. 2025.

MULLER, Susan; TILAKARATNE, Wanninayake M. Update from the 5th Edition of the World Health Organization Classification of Head and Neck Tumors: Tumours of the Oral Cavity and Mobile Tongue. **Head and Neck Pathology**, [s. l.], v. 16, n. 1, p. 54, 2022. Disponível em: [/pmc/articles/PMC9018914/](https://pmc/articles/PMC9018914/). Acesso em: 14 ago. 2023.

NEVILLE, Brad W *et al.* **Patologia Oral e Maxilofacial 4ed.** [S. l.]: Elsevier, 2016. Disponível em: [www.mercadolivre.com.br](http://www.mercadolivre.com.br).

NI, Yan Hong *et al.* Tumor-Infiltrating CD1a+ DCs and CD8+/FoxP3+ Ratios Served as Predictors for Clinical Outcomes in Tongue Squamous Cell Carcinoma Patients. **Pathology oncology research: POR**, [s. l.], v. 26, n. 3, p. 1687–1695, 2020. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/31606786/>. Acesso em: 3 jan. 2025.

PERDOMO, Sandra *et al.* Head and neck cancer burden and preventive measures in Central and South America. **Cancer epidemiology**, [s. l.], v. 44 Suppl 1, p. S43–S52, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27678322/>. Acesso em: 25 maio 2023.

PEREIRA, Michele Conceição *et al.* Histologic subtypes of oral squamous cell carcinoma: prognostic relevance. **Journal (Canadian Dental Association)**, [s. l.], v. 73, n. 4, p. 339–344, 2007. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/17484800/>. Acesso em: 4 jan. 2022.

PLZÁK, Jan *et al.* The Head and Neck Squamous Cell Carcinoma Microenvironment as a Potential Target for Cancer Therapy. **Cancers**, [s. l.], v. 11, n. 4, 2019. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/30925774/>. Acesso em: 25 maio 2023.

RIVERA, César *et al.* Prognostic biomarkers in oral squamous cell carcinoma: A systematic review. **Oral Oncology**, [s. l.], v. 72, p. 38–47, 2017.

ROSENBERG, Jillian; HUANG, Jun. CD8+ T Cells and NK Cells: Parallel and Complementary Soldiers of Immunotherapy. **Current opinion in chemical engineering**, [s. l.], v. 19, p. 9, 2017. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5880541/>. Acesso em: 2 jan. 2025.

SALES DE SÁ, Raísa *et al.* Increased Tumor Immune Microenvironment CD3+ and CD20+ Lymphocytes Predict a Better Prognosis in Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma. **Frontiers in Cell and Developmental Biology**, [s. l.], v. 8, p. 622161, 2021. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7951138/>. Acesso em: 17 jan. 2025.

SALGADO, R. *et al.* The evaluation of tumor-infiltrating lymphocytes (TILs) in breast cancer: recommendations by an International TILs Working Group 2014. **Annals of Oncology**, [s. l.], v. 26, n. 2, p. 259, 2014. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6267863/>. Acesso em: 3 jan. 2025.

SANTOSH, Arvind; JONES, Thaon; HARVEY, John. A review on oral cancer biomarkers: Understanding the past and learning from the present. **Journal of cancer research and therapeutics**, [s. l.], v. 12, n. 2, p. 486–492, 2016. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/27461598/>. Acesso em: 14 ago. 2023.

SHIMIZU, Shota *et al.* Tumor-infiltrating CD8+ T-cell density is an independent prognostic marker for oral squamous cell carcinoma. **Cancer Medicine**, [s. l.], v. 8, n. 1, p. 80, 2019. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6346233/>. Acesso em: 21 jan. 2025.

SPECTOR, Matthew E. *et al.* Prognostic Value of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma. **JAMA Otolaryngology-- Head & Neck Surgery**, [s. l.], v. 145, n. 11, p. 1012, 2019. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC6735419/>. Acesso em: 17 jan. 2025.

STASIKOWSKA-KANICKA, Olga; WĄGROWSKA-DANILEWICZ, Małgorzata; DANILEWICZ, Marian. Immunohistochemical Analysis of Foxp3+, CD4+, CD8+ Cell

Infiltrates and PD-L1 in Oral Squamous Cell Carcinoma. **Pathology Oncology Research**, [s. l.], v. 24, n. 3, p. 497, 2017. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC5972165/>. Acesso em: 21 dez. 2024.

SUNG, Hyuna *et al.* Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries. **CA: a cancer journal for clinicians**, [s. l.], v. 71, n. 3, p. 209–249, 2021. Disponível em: <https://pubmed.ncbi.nlm.nih.gov/33538338/>. Acesso em: 25 maio 2023.

TAY, Rong En; RICHARDSON, Emma K.; TOH, Han Chong. Revisiting the role of CD4+ T cells in cancer immunotherapy—new insights into old paradigms. **Cancer Gene Therapy**, [s. l.], v. 28, n. 1, p. 5, 2020. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC7886651/>. Acesso em: 2 jan. 2025.

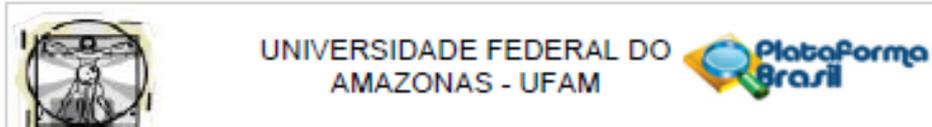
TIWARI, Aadhya; TRIVEDI, Rakesh; LIN, Shiaw Yih. Tumor microenvironment: barrier or opportunity towards effective cancer therapy. **Journal of Biomedical Science**, [s. l.], v. 29, n. 1, p. 83, 2022. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9575280/>. Acesso em: 26 dez. 2024.

WAHBI, Hanan Salman; AL MANADILI, Ahmed. Immunoexpression of Tumor Infiltrating Lymphocytes(TILS) CD4 + and CD8 + in Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC) in Correlations with Clinicopathological Characteristics and Prognosis. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention : APJCP**, [s. l.], v. 23, n. 12, p. 4177, 2022. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC9971484/>. Acesso em: 3 jan. 2025.

WOLF, Gregory T. *et al.* Tumor Infiltrating Lymphocytes (TIL) and Prognosis in Oral Cavity Squamous Carcinoma: A Preliminary Study. **Oral oncology**, [s. l.], v. 51, n. 1, p. 90, 2014. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC4268429/>. Acesso em: 21 jan. 2025.

WONGPATTARAWORAKUL, Wattawan *et al.* Prognostic Role of Tumor-Infiltrating Lymphocytes in Oral Squamous Cell Carcinoma. **BMC Cancer**, [s. l.], v. 24, n. 1, p. 766, 2024. Disponível em: <https://pmc.ncbi.nlm.nih.gov/articles/PMC11201865/>. Acesso em: 3 jan. 2025.

## ANEXO I – PARECER DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** BIOMARCADORES PROTEICOS DE AGRESSIVIDADE EM CARCINOMAS EPIDERMÓIDES DE BOCA

**Pesquisador:** Tatiana Nayara Libório Kimura

**Área Temática:**

**Versão:** 1

**CAAE:** 77091324.2.0000.5020

**Instituição Proponente:** Universidade Federal do Amazonas - UFAM

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 6.648.099

#### Apresentação do Projeto:

Informações retiradas do documento PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_2271139.pdf  
19/01/2024 16:11:16:

O Carcinoma Epidemóide de Boca (CEB) é uma neoplasia maligna com diferenciação escamosa que se origina do epitélio da mucosa (MULLER; TILAKARATNE, 2022). A etiologia dessa neoplasia é multifatorial e está frequentemente associada ao tabagismo, etilismo, que são os fatores etiológicos mais determinantes, principalmente quando atuam de forma sinérgica. Outros fatores associados incluem exposição excessiva a luz ultravioleta (para carcinomas labiais), dietas carentes de frutas e vegetais, má higiene bucal e mastigação de noz de areca (especialmente em populações asiáticas), e a infecção pelo Vírus do Papiloma Humano (HPV) também é descrita, em populações mais jovens (EI-NAGGAR et al., 2017; LEITE et al., 2018; PLZÁK et al., 2019). O perfil epidemiológico dos pacientes com CEB tem mudado ao longo do tempo, com acentuada variação regional, mas ainda há maior prevalência no sexo masculino, o que se deve à maior exposição a fatores de risco entre os homens. O carcinoma epidermoide de boca acomete geralmente indivíduos mais velhos, após a quinta década de vida. A apresentação clínica usual é uma úlcera indolor na borda da língua ou assoalho da boca (LEITE et al., 2018; MULLER; TILAKARATNE, 2022). No cenário mundial o câncer de cavidade oral representa um importante problema de saúde e constitui a oitava neoplasia maligna mais comum (LOUREDO et al., 2022; PERDOMO et al., 2016).

Endereço: Rua Teresina, 4950

Bairro: Adrianópolis

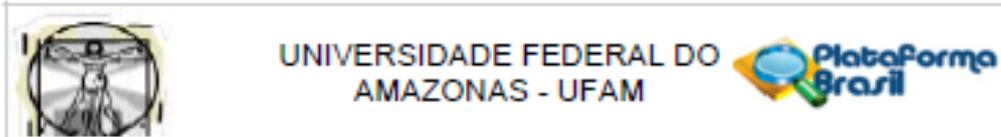
CEP: 69.057-070

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (02)3305-1181

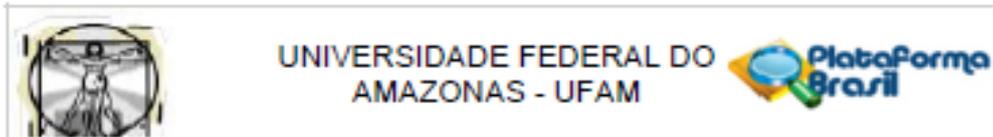
E-mail: cep.ufam@gmail.com



Continuação do Penseir: 6.648.099

No ano de 2020, dados do Observatório Global do Câncer (GLOBOCAN) da Organização Mundial da Saúde apontaram para o surgimento de 377.713 novos casos de câncer de lábio e cavidade oral em todo o mundo, com 177.757 óbitos (SUNG et al., 2021). No Brasil são observadas as maiores taxas de incidência de câncer de boca e orofaringe, principalmente no sexo masculino, que chegam a ser três vezes maiores do que em outros países da América Central e do Sul. Segundo as estimativas do Instituto Nacional do Câncer (INCA) para o ano de 2023 no Amazonas são esperado cerca de 140 novos casos de câncer diagnosticado em cavidade oral. Onde mais de 90% desses casos são representados pelo carcinoma epidermóide (LOUREDO et al., 2022; PERDOMO et al., 2016; SUNG et al., 2021). Atualmente, o tratamento é geralmente baseado na ressecção cirúrgica do tumor primário, que pode ser seguida de rádio e quimioterapia. A taxa de sobrevivência global é de menos de 60%, com prognóstico fortemente dependente do sistema de estadiamento TNM. O tamanho do tumor, bem como a presença e extensão das metástases linfonodais são bastante reconhecidos como os preditores mais importantes. No entanto, os mecanismos subjacentes que levam a um fenótipo agressivo ainda não são totalmente compreendidos (BLATT et al., 2017). O estudo das moléculas biológicas envolvidas no mecanismo molecular da carcinogênese fornecem dados diagnósticos valiosos, ou seja, biomarcadores, no processo do câncer. O biomarcador é uma molécula biológica encontrada no sangue, outros fluidos corporais ou tecidos que é um sinal de um processo normal ou anormal, ou de uma condição de doença como o câncer (SANTOSH; JONES; HARVEY, 2016). Os biomarcadores podem ser carboidratos, DNA, mRNAs, proteínas ou pequenas moléculas como metabólitos e outras moléculas celulares. Estes podem ser usados clinicamente para rastrear, diagnosticar e monitorar a atividade da doença e avaliar a resposta terapêutica. Os biomarcadores de câncer podem ser classificados com base no estado da doença, incluindo biomarcadores preditivos, diagnósticos e prognósticos (RIVERA et al., 2017). Os biomarcadores preditivos levam à detecção de anormalidades que causam o desenvolvimento do CEB, enquanto os biomarcadores prognósticos ajudam a prever a resposta à terapia e o prognóstico do paciente (PILLAI et al., 2021). Podem ainda, serem categorizados em relação ao significado clínico quanto aos processos biológicos dos biomarcadores na regulação do ciclo celular, proliferação celular, microambiente tumoral, reação imunológica, instabilidade genômica, como também genes de desenvolvimento embrionário (BLATT et al., 2017). Atualmente, vários biomarcadores tumorais têm sido sugeridos para prever o prognóstico de pacientes com carcinoma epidermóide de boca (LENOUVEL et al., 2020; STEUER et al., 2018). Uma vez que possíveis biomarcadores são necessários para prever o prognóstico, para ajudar a individualizar as abordagens terapêuticas e para superar possíveis mecanismos de resistência (BLATT et al., 2017).

Endereço: Rua Teresina, 4950	CEP: 69.057-070
Bairro: Adrianópolis	
UF: AM Município: MANAUS	
Telefone: (92)3305-1181	E-mail: cep.ufam@gmail.com



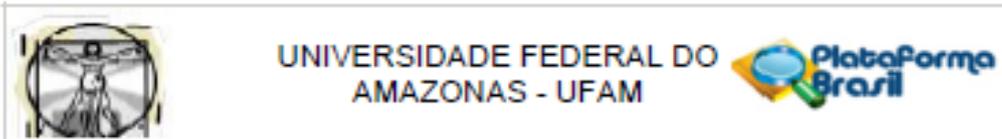
Continuação do Parecer: 6.648.099

No entanto, o estabelecimento de biomarcadores do CEB para uso no diagnóstico e prognóstico permanece parcialmente identificados. De maneira geral, esses biomarcadores também podem ser de alguma maneira enquadrados em um dos dez Hallmarks classicamente estudados no câncer (SASAHIRA; KIRITA, 2018). Nesse contexto, o objetivo desse estudo é caracterizar a expressão biomarcadores de agressividade em carcinomas epidermóide primários de boca. Para isso, será realizado um estudo observacional de casos diagnosticados com CEB, no período de janeiro de 2014 a dezembro de 2023, de três laboratórios de patologia da cidade de Manaus.

**Hipótese:** Existe um perfil de expressão de biomarcadores proteicos que influencia na agressividade do carcinoma epidermóide de boca (CEB).

**Metodologia Proposta:** O projeto está vinculado a linha de pesquisa de carcinogênese oral, na qual está dentro da linha de biopatologia do Programa de Pós-Graduação de Odontologia (PPGO). O trabalho segue essa temática de carcinogênese, na busca de biomarcadores para o CEB, abrangendo assim o presente e, futuros projetos de mestrado e PIBIC's. O mesmo está planejado para ser executado no laboratório de patologia e imunohistoquímica do Departamento de patologia em medicina legal (DPML), que está em processo de implementação, para fins de pesquisa, porém conta atualmente com a colaboração do laboratório particular Centro de Procedimentos Diagnósticos da Amazônia (CPDA) onde as reações também poderão ser realizadas. **Desenho do estudo** O estudo a ser realizado trata-se de uma pesquisa observacional, retrospectiva e também de sobrevivência. A recomendação Strengthening the Reporting of Observational studies in Epidemiology (STROBE), que constitui um conjunto de itens para estudos observacionais, será utilizada para conduzir esta pesquisa (CUSCHIERI, 2019). **Questão de Pesquisa** Qual o perfil de expressão de biomarcadores em carcinoma epidermóide de boca? Para a elaboração da questão foi utilizada a estratégia para estudos observacionais (Cafón & Buhrago-Gómez, 2018): **Aspectos éticos** O projeto completo foi inicialmente submetido à direção do hospital FCECON para obtenção da Carta de Anuência Institucional, assim como à chefe do DPML/UFAM e Laboratório particular CPDA, para finalmente ser submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa CEP/UFAM. O mesmo foi autorizado nos três locais (Anexos I, II e III). Para os casos da FCECON com diagnóstico de CEB recentes, em que o paciente encontra-se em acompanhamento na unidade de saúde, a partir da identificação junto ao Serviço de Arquivo Médico e Estatísticas (SAME), esses ou seus responsáveis serão abordados pelo pesquisador, mediante explicações acerca da natureza, dos objetivos, dos benefícios e possíveis riscos do estudo, a fim de obter autorização para as coletas dos dados e

Endereço: Rua Teresina, 4950  
 Bairro: Adrianópolis CEP: 69.057-070  
 UF: AM Município: MANAUS  
 Telefone: (92)3305-1181 E-mail: cep.ufam@gmail.com



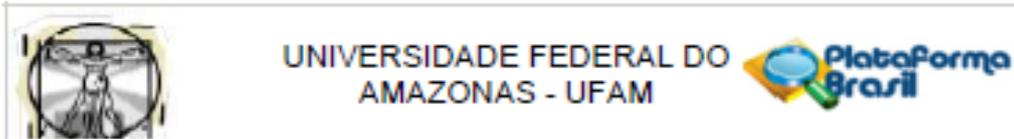
Continuação do Protocolo: 0.648.099

caracterização das demais informações através do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE (APÊNDICE A). Deve-se destacar que nenhum novo procedimento será realizado no paciente, sendo necessária exclusivamente a anuência do participante para utilização de seus dados e material histológico, como lâminas e blocos de parafina, já confeccionados no passado, em materiais que tiverem sido obtidos por procedimentos cirúrgicos visando o diagnóstico. Para os casos mais antigos da FCECON, nos quais os pacientes já não estejam em acompanhamento regular, quer seja por óbito, por abandono, ou por alta, e os casos diagnosticados pelos laboratórios de patologia do DPML/UFAM e CPDA será solicitada a Dispensa do TCLE (TDCLE) (APÊNDICE B), onde serão apresentadas justificativas plausíveis (dentre elas a dificuldade de acesso ao participante), sendo, para esses casos, utilizado o Termo de compromisso e utilização dos Dados – TCUD (APÊNDICE C), para salvaguardar os direitos quanto à confidencialidade das informações de dados pessoais e de revisão de lâminas dos participantes da pesquisa. Local do estudo A pesquisa será realizada em 3 laboratórios de anatomia patológica da cidade de Manaus/AM, sendo eles: Laboratório de Anatomia Patológica do DPML/UFAM, Laboratório de Anatomia Patológica da Fundação Centro de Controle de Oncologia do Amazonas (FCECON) e no Centro de Procedimentos Diagnósticos da Amazônia (CPDA). Amostra de estudo e casuística O planejamento amostral foi realizado com base nos Relatórios de Gestão da FCECON dos últimos 5 anos, que registrou em média 24 pacientes no setor de Cabeça e Pescoço portadores de neoplasias malignas do lábio, cavidade oral e faringe. Tanto no DPML quanto CPDA estão previstas uma média de 10 a 12 casos por ano representativos de material, totalizando em conjunto em média 480 casos nos 10 anos planejados.

**Critério de Inclusão:**

- A presença de carcinoma epidermóide de boca (incluindo língua, assoalho da boca, gengiva, mucosa jugal, palato duro, trigono retromoiar) em pacientes de ambos os sexos, com idade acima de 18 anos, diagnosticados com CEB mediante laudo histológico, podendo ser o CEB convencional ou suas variantes, no período de janeiro de 2014 a dezembro de 2023;
- Prontuário/Requisição de exames histopatológico de pacientes provenientes dos nos laboratórios de Patologia da FCECON, DPML/UFAM e CPDA, com lâminas histopatológicas e/ou blocos de parafina obtidos de peças cirúrgicas e/ou biópsias incisivas representativas para análise;
- Pacientes em acompanhamento na FCECON com diagnóstico de CEB primário de boca e/ou recidiva (em que a biópsia estiver disponível para comparação), no período de janeiro de 2014 a

Endereço: Rua Teresina, 4950  
 Bairro: Adrianópolis CEP: 69.057-070  
 UF: AM Município: MANAUS  
 Telefone: (92)3305-1181 E-mail: cep.ufam@gmail.com



Continuação do Parecer: 0.640.099

dezembro de 2023;

- Pacientes que tenham acompanhamento preferencial de 5 anos para análise de sobrevivência;

**Critério de Exclusão:**

- Prontuário/ Requisição de exame histopatológico sem informações suficientemente documentadas para coleta dos dados clínicoepidemiológicos com informações incompletas do paciente ou do espécime.
- Não localização dos blocos de parafina, ausência de representatividade do tumor no bloco de parafina.

Tamanho da Amostra: 240

O Cronograma de Execução está completo e indica que a coleta dos dados está prevista para acontecer no período de 19/02/2024 a 31/12/2027. Orçamento Financeiro prevê um custo de R\$ 1345,86, referente à compra de material de custeio, e foi indicado financiamento próprio.

**Objetivo da Pesquisa:**

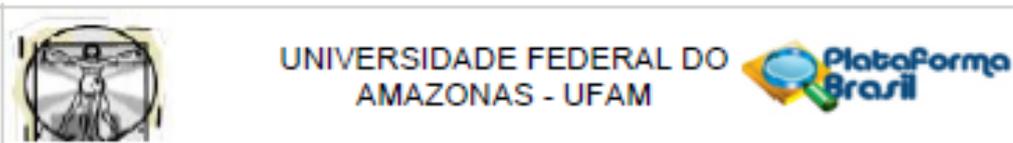
Segundo o pesquisador principal no documento PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_2271139.pdf 19/01/2024 16:11:16, os objetivos do estudo são:

**Objetivo Primário:** Caracterizar a expressão de biomarcadores proteicos de agressividade em carcinomas epidermóide de boca.

**Objetivo Secundário:**

- Caracterizar o perfil epidemiológico de pacientes com carcinoma epidermóide de boca (CEB) casos primários e de recidiva;
- Verificar o perfil do CEB de acordo com as variáveis: classificação da OMS e suas variantes histológicas, invasão linfocelular e perineural, pior padrão de invasão, status das margens do tumor e o estadiamento patológico;
- Caracterizar biomarcadores de evasão tumoral/sistema imune, reguladores do ciclo celular, índice de proliferação celular, de instabilidade de microssatélite e biomarcadores de desenvolvimento de embrião (HOMEBOX) em CEB;
- Associar os achados clínicos e morfológicos dos pacientes com CEB primário de boca com a

Endereço: Rua Teresina, 4050	CEP: 69.057-070
Bairro: Adrianópolis	
UF: AM Município: MANAUS	
Telefone: (92)3305-1181	E-mail: cep.ufam@gmail.com



Continuação do Parecer: 6.648.099

expressão dos biomarcadores de agressividade.

- Comparar os aspectos clínico-patológicos e a sobrevida dos pacientes com CEB;
- Descrever a sobrevida dos paciente (em 5 anos), correlacioná-la com a expressão dos biomarcadores analisados.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Segundo o pesquisador principal no documento PB\_INFORMAÇÕES\_BÁSICAS\_DO\_PROJETO\_2271139.pdf 19/01/2024 16:11:16:

Riscos: Na presente pesquisa ocorrerá uma caracterização da expressão de biomarcadores proteicos de agressividade em carcinomas epidermóide de boca, dos espécimes de peças cirúrgicas ou biópsias com laudos de CEB primário de boca. Por tratar-se de uma pesquisa documental e retrospectiva, não será necessário o submeter a qualquer tipo de procedimento ou interferir no seu cotidiano, não havendo também mudança no seu diagnóstico inicial. Porém, segundo a Resolução Nº 466, de 12 de dezembro de 2012, toda pesquisa envolve riscos. No caso da presente pesquisa, os riscos são: a quebra de sigilo das suas informações pessoais, no entanto, nós, da equipe de pesquisa, asseguramos a total confidencialidade e sigilo das informações que nos forem repassadas, pois utilizaremos codificação de registros em computadores e/ou planilhas de acesso exclusivo dos pesquisadores, protegidos por senha. Outro possível risco é a quebra de lâminas histopatológicas durante a análise ao microscópio, visto que as mesmas são de vidro, mas garantimos que haverá extremo zelo e cuidado com a manipulação das mesmas. Com relação aos blocos de parafina que contenham amostras da lesão, também garantimos zelo e cuidado para manipulação e o não esgotamento das amostras, quando da confecção de novas lâminas. Também garantimos que o remanescente do(s) bloco(s) e a(s) lâmina(s) serão devolvidos para o armazenamento no arquivo do laboratório de origem. Dessa maneira garantimos que tomaremos todos os cuidados e medidas cabíveis para garantir o sigilo dos dados do paciente, seguindo também o que orienta a Carta Circular nº. 039/2011/CONEP/CNS/GB/MS (que trata especificamente sobre uso de prontuários, apesar de se tratar de laudos) e também a Resolução CFM Nº 2.217/2018 publicada no D.O.U. de 01 de novembro de 2018, Seção I, p. 179, modificada pela Resolução CFM nº 2.222/2018 e pela Resolução CFM nº 2.226/2019) (Código de Ética Médica). Devido à impossibilidade de obtenção do TCLE de todos os participantes do estudo, os pesquisadores assinarão o Termo de Compromisso de Utilização de Dados (TCUD) e os dados serão expressos em termos de médias e proporções para o conjunto dos indivíduos, resguardando-se a confidencialidade dos dados utilizados.

Endereço: Rua Teresina, 4950

Bairro: Adrianópolis

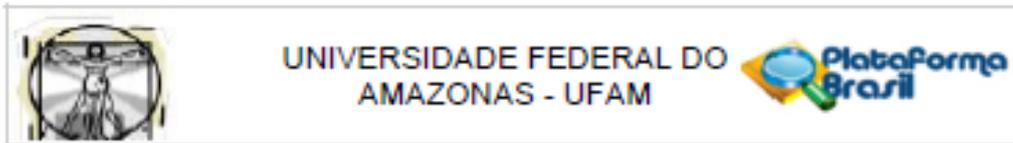
CEP: 69.057-070

UF: AM

Município: MANAUS

Telefone: (92)3305-1181

E-mail: cep.ufam@gmail.com



Continuação do Parecer: 0.540.099

**Benefícios:** Os benefícios da pesquisa são, de maneira geral, indiretos aos participantes da pesquisa e respeitam suas dimensões física, psíquica, moral, intelectual, social, cultural e espiritual. Nesse contexto, futuramente os dados ajudarão a individualizar as abordagens terapêuticas e para superar possíveis mecanismos de resistência, visando o melhor conhecimento da doença e suas características, reforçando ainda a aplicabilidade e importância clínica dos biomarcadores preditores validados para sobrevida, recorrência tumoral, metástase linfonodal e resistência a [https://plataformabrasil.saude.gov.br/common/images/icon\\_pdf.gif?terapia](https://plataformabrasil.saude.gov.br/common/images/icon_pdf.gif?terapia). Do ponto de vista científico, a pesquisa ajudará ainda trazer conhecimentos sobre possíveis biomarcadores que são muito necessários para prever o prognóstico. Além disso, o estudo tem o benefício de obtenção de informações relevantes e esclarecedoras do perfil clinicopatológico da doença, como também a forma que o CEB se distribui nos pacientes no contexto de suas características sociodemográficas.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

Trata-se de um projeto de pesquisa, que foi submetido para apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Amazonas no dia 19 de Janeiro de 2024, e tem como pesquisadora responsável a Profa. Dra. Tatiana Nayara Libório Kimura, professora permanente do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da UFAM, conforme seu CVLattes (06/06/2023). Também participam da equipe de pesquisa: Luciana Botinely Mendonça Fujimoto, Tassia Caroniline da Costa Mendes, Ana Paula Ferreira de Souza e Malko Ramos Mals.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:**

**FOLHA DE ROSTO:** ADEQUADA. Apresentado no documento folhaDeRosto\_assinado.pdf 18/01/2024 01:18:21

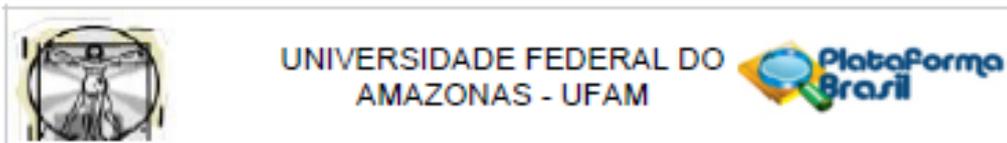
**INSTRUMENTO DE COLETA DE DADOS:** ADEQUADO. Apresentado como anexo do documento Projeto\_Detalhado.pdf 18/01/2024 01:08:23

**TCLE:** ADEQUADO. Apresentado no arquivo APENDICE\_A\_TCLE.pdf 18/01/2024 01:09:01

**TCUD:** ADEQUADO. Apresentado no arquivo APENDICE\_C\_TCUD.pdf 05/01/2024 12:17:01

**TERMO DE ANUÊNCIA:** ADEQUADO. Apresentado nos documentos Carta\_de\_Anuencia\_DPML.pdf

Endereço: Rua Teresina, 4950	CEP: 69.057-070
Bairro: Adrianópolis	
UF: AM	Município: MANAUS
Telefone: (92)3305-1181	E-mail: cep.ufam@gmail.com



Continuação do Parecer: 0.640.099

05/01/2024 12:13:39, Carta\_de\_Anuencia\_do\_Servico\_de\_Patologia\_Fcecon.pdf 05/01/2024 13:17:37, Carta\_de\_Anuencia\_CPDA.pdf 05/01/2024 12:13:48, Carta\_de\_Anuencia\_SAME\_FCECON.pdf 05/01/2024 13:18:21 e Carta\_de\_Anuencia\_E\_Parecer\_FCECON.pdf 05/01/2024 12:12:48.

TERMO DE COMPROMISSO DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL: ADEQUADO. Apresentado no documento Declaracao\_de\_Manuseio\_de\_Material\_Biologico.pdf 18/01/2024 01:11:02, Carta\_de\_Anuencia\_do\_Pesquisador\_Colaborador.pdf 05/01/2024 12:41:16 e TERMO\_DE\_COMPROMISSO\_DO\_PESQUISADOR\_RESPONSAVEL.pdf 05/01/2024 12:15:47

**Recomendações:**

Este CEP analisa os aspectos éticos da pesquisa com base nas Resoluções 466/2012-CNS, 510/2016-CNS e outras complementares. A aprovação do protocolo neste Comitê NÃO SOBREPÕE eventuais restrições ao Início da pesquisa estabelecidas pelas autoridades competentes, devido à pandemia de COVID-19. O pesquisador (a) deve analisar a pertinência do Início, segundo regras de sua Instituição ou Instituições/autoridades sanitárias locais, municipais, estaduais ou federais.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

O comitê de ética da UFAM analisou o presente projeto e entendeu que o mesmo está dentro das normas do comitê e das normas vigentes do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde estando o mesmo APROVADO, lembrando ao pesquisador principal da obrigatoriedade de cumprir o cronograma e o envio do relatório final na data prevista. Caso a pesquisa não seja concluída no prazo estipulado, o pesquisador deve enviar o relatório parcial.

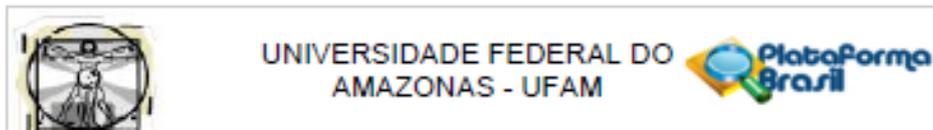
O(A) pesquisador(a) deve enviar por Notificação os relatórios parciais e final. (Item XI.d. da Res 466/2012-CNS), por meio da Plataforma Brasil e manter seu cronograma atualizado, solicitando por Emenda eventuais alterações antes da finalização do prazo inicialmente previsto.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Este CEP analisa os aspectos éticos da pesquisa com base nas Resoluções 466/2012-CNS, 510/2016-CNS e outras complementares. A aprovação do protocolo neste Comitê NÃO SOBREPÕE eventuais restrições ao Início da pesquisa estabelecidas pelas autoridades competentes, devido à pandemia de COVID-19. O pesquisador (a) deve analisar a pertinência do Início, segundo regras de sua Instituição ou Instituições/autoridades sanitárias locais, municipais, estaduais ou federais.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

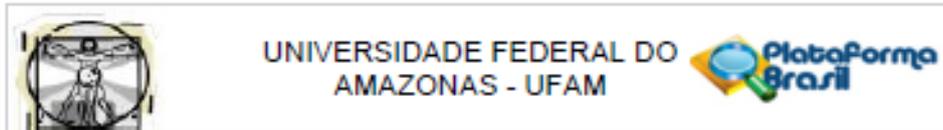
Endereço: Rua Teresina, 4950	CEP: 69.057-070
Bairro: Adrienópolis	
UF: AM Município: MANAUS	
Telefone: (92)3305-1181	E-mail: cep.ufam@gmail.com



Continuação do Parecer: 0.040.099

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_PROJETO_2271139.pdf	19/01/2024 16:11:16		Aceito
Folha de Rosto	folhaDeRosto_assinado.pdf	18/01/2024 01:18:21	ANA PAULA FERREIRA DE SOUZA	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Declaração_de_Manuseio_de_Material_Biologico.pdf	18/01/2024 01:11:02	ANA PAULA FERREIRA DE SOUZA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	APENDICE_A_TCLE.pdf	18/01/2024 01:09:01	ANA PAULA FERREIRA DE SOUZA	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_Detalhado.pdf	18/01/2024 01:08:23	ANA PAULA FERREIRA DE SOUZA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_de_Anuencia_SAME_FCECON.pdf	05/01/2024 13:18:21	ANA PAULA FERREIRA DE SOUZA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_de_Anuencia_do_Servico_de_Patologia_Fcecon.pdf	05/01/2024 13:17:37	ANA PAULA FERREIRA DE SOUZA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Carta_de_Anuencia_do_Pesquisador_Colaborador.pdf	05/01/2024 12:41:16	ANA PAULA FERREIRA DE SOUZA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	APENDICE_C_TCUD.pdf	05/01/2024 12:17:01	ANA PAULA FERREIRA DE SOUZA	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	APENDICE_B_TDCLE.pdf	05/01/2024 12:16:48	ANA PAULA FERREIRA DE SOUZA	Aceito
Declaração de Pesquisadores	TERMO_DE_COMPROMISSO_DO_PESQUISADOR_RESPONSAVEL.pdf	05/01/2024 12:15:47	ANA PAULA FERREIRA DE SOUZA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_de_Anuencia_CPDA.pdf	05/01/2024 12:13:48	ANA PAULA FERREIRA DE SOUZA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_de_Anuencia_DPML.pdf	05/01/2024 12:13:39	ANA PAULA FERREIRA DE SOUZA	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Carta_de_Anuencia_E_Parecer_FCECON.pdf	05/01/2024 12:12:48	ANA PAULA FERREIRA DE SOUZA	Aceito

Endereço: Rua Teresina, 4950  
 Bairro: Adrienópolis CEP: 69.057-070  
 UF: AM Município: MANAUS  
 Telefone: (02)3305-1181 E-mail: cep.ufam@gmail.com



Continuação do Parecer: 6.643.099

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

MANAUS, 12 de Fevereiro de 2024

---

Assinado por:  
Eliana Maria Pereira da Fonseca  
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Teresina, 4950

Bairro: Adrianópolis

UF: AM

Telefone: (92)3305-1181

Município: MANAUS

CEP: 69.057-070

E-mail: cep.ufam@gmail.com



### APÊNDICE A – Ficha de Coleta dos Dados Clínicos

1. Número do Prontuário: \_\_\_\_\_ Data de Inclusão no projeto:  
\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_/\_\_\_\_\_  
2. Nome do paciente: \_\_\_\_\_ Serviço de origem:  
\_\_\_\_\_

#### CONDIÇÕES SOCIOECONOMICAS/DEMOGRÁFICAS

3. Idade do paciente: \_\_\_\_\_  
4. Sexo do paciente: \_\_\_\_ Masculino \_\_\_\_ Feminino \_\_\_\_ Ignorado  
5. Estado civil:  
( ) Casado (a) ( ) Divorciado (a) ( ) Viúvo (a) ( ) União estável ( ) Solteiro (a) ( ) Não informado  
5. Naturalidade: \_\_\_\_\_ Município onde reside: \_\_\_\_\_  
6. Cor da pele  
( ) Leucoderma (branca)  
( ) Xantoderma (amarela)  
( ) Melanoderma ( negra)  
( ) Feoderma (parda)  
( ) Não identificou

#### HISTÓRIA MÉDICA

7. Tabagismo: ( ) Sim ( ) Não ( ) Não Informado  
8. Etilista:  
( ) Sim ( ) Não ( ) Não informado

#### 9. Sinais e Sintomas

- ( ) úlcera  
( ) dor  
( ) dificuldade para mastigar  
( ) dificuldade para movimentar a língua  
( ) placas esbranquiçadas (gengiva, língua, palato e mucosa jugal)  
( ) Outro. Qual?

#### 10. Tempo do aparecimento dos sintomas até o diagnóstico (dias)

- ( ) <14 dias  
( ) >14 dias  
( ) entre 30 e 60 dias  
( ) > 60 dias  
( ) Não informado

#### CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS E ANATOMOPATOLÓGICAS

#### 11. Onde foi realizada a biópsia

- ( ) FCECON  
( ) Faculdade de Odontologia  
( ) Centro de Especialidades Odontológicas (CEO)  
( ) Outro. Qual?





## APÊNDICE B – Análise Histopatológica e Imunohistoquímica do Carcinoma Epidermoide de Boca (CEB)

### 1. identificação

Número do registro: \_\_\_\_\_ Data de Inclusão no projeto: \_\_\_\_/\_\_\_\_/\_\_\_\_

Número do Prontuário: \_\_\_\_\_

Nome do Paciente: \_\_\_\_\_

Serviço de origem: \_\_\_\_\_

### 2. Características do Espécime

( ) Biopsia incisional ( ) Biópsia excisional ( ) Peça cirúrgica: \_\_\_\_\_

Localização da Lesão: \_\_\_\_\_

#### Estadiamento (CAP 2021) – Peças cirúrgicas

Procedimento: \_\_\_\_\_

Tamanho do tumor (Máximas dimensões em cm<sup>2</sup>): \_\_\_\_\_

Profundidade de Invasão (em mm<sup>2</sup>) \_\_\_\_\_

Invasão Linfovascular:

( ) Não identificada ( ) Presente ( ) Não pode ser determinada

Invasão Perineural

( ) Não identificada ( ) Presente ( ) Não pode ser determinada

Pior Padrão de Invasão (WPOI)

( ) WPOI 5

( ) WPOI 1-4

Status das margens do tumor:

---

---

---

---

Linfonodos regionais (Número de linfonodos com tumor, lateralidade e tamanho do maior linfonodo):

---

---

---

Estadiamento patológico: \_\_\_\_\_



### AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA

Área do tecido avaliado: \_\_\_\_\_

#### 3. Classificação histopatológica do CEB (OMS)

##### Convencional

Grau histológico: ( ) Bem diferenciado ( ) Moderadamente diferenciado ( ) Pouco diferenciado

##### Variante histológica:

- ( ) verrucoso
- ( ) basaloide
- ( ) fusiforme
- ( ) papilífero
- ( ) acantolítico
- ( ) adenoescamoso
- ( ) Linfoepitelial
- ( ) Cuniculatum

#### ELEMENTOS TUMORAIS

#### 4. Presença e grau de queratinização (Anneroth et al., (1987) e Bryne et al., (1992))

- ( ) Grau 1: Altamente queratinizada (>50%)
- ( ) Grau 2: Moderadamente queratinizada (20%-50%)
- ( ) Grau 3: Queratinização mínima (5%-20%)
- ( ) Grau 4: Sem queratinização (0%-5%)

Estimativa percentual: \_\_\_\_\_

#### 6. Disposição do arranjo celular predominante (Libório et al., (2011))

- ( ) Lençóis
- ( ) Ilhas
- ( ) Cordões
- ( ) Ninhos
- ( ) Células isoladas

#### 7. Padrão e perfil Inflamatório (estromal ou não)

- ( ) Leve
- ( ) Moderado
- ( ) Intenso

#### 8. Análise dos linfócitos infiltrantes do estroma tumoral (TILs) (de Souza et al., 2022).

- ( ) TILs High: 0% a 40%
- ( ) TILs Low: 41% a 90%

Percentual bruto (interno): \_\_\_\_\_





## **APÊNDICE C- Protocolo Operacional Padrão da Técnica Imunohistoquímica**

### **Pré-analítico:**

- Temperatura da parafina em torno de 50 – 53°C
- O corte foi realizado no micrótomo (Lupetec®), sendo um corte homogêneo entre 3 e 4 micras.

1. Pescado os cortes com a lâmina de carga (lâmina silanizada)
2. Foi separada as lâminas de trabalho (caso e controle) em um papel na bancada por recuperação Antigênica (Alto) (Mouse). Quando as lâminas estavam na geladeira, foi retirado e esperado ficar em temperatura ambiente antes da estufa.
3. A lâmina foi colocada na estufa (FANEM®) (na temperatura entre 60 - 65 °C, controle de temperatura dupla, com termômetro do próprio aparelho e um externo, para controle paralelo) por 1 hora.
4. Logo após sair da estufa, imergido o berço na cuba com o primeiro xilol da bateria de desparafinização:
5. Assim o berço com as lâminas passou em 4 cubas de xilol por 5 minutos em cada cuba. Fez-se a secagem em um papel toalha. Posteriormente o berço passou por 5 banhos em álcool absoluto com 5 mergulhos em cada cuba.
6. Após o último Álcool, passou o berço para uma cuba com água destilada (pode aguardar um pouco na água destilada se precisar esperar mais tempo, deixar em buffer).

(Depois de desparafinizar, e lavar em água, pode deixar as lâminas de um dia pro outro mesmo fora de solução).

### **Recuperação antigênica:**

Foi realizada através da Panela Elétrica (TintoRetriver Pressure Cooker, Bio SB).

7. Colocado as lâminas na cuba com tampão Tris/EDTA pH 9,0 (Target Retrieval Solution, pH alto, dil. 1:50:00, DAKO®).
8. Ajustado as cubas na panela com 600 mL de água destilada.
9. Colocar o pino em Pressure. Ligar a panela na tomada, apertar o “menu” até Potência Alta e selecionar o tempo até 20 MINUTOS.



## PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA

10. Quando acabar o tempo, girar o pino até pressure release. Abrir e retirar as cubas. Levar tampa para pia. Levar as cubas para perto da pia. Pode deixar na própria solução se precisar fazer algo.
11. Esperado esfriar por 10 min. Pode deixar na própria solução se precisar fazer algo.
12. Retirada as lâminas das cubas com o reagente da recuperação antigênica e lavado 2 vezes na cuba com água destilada com alguns mergulhos (trocada a água entre primeira e segunda lavagem).

**Bloqueio da Peroxidase endógena:**

13. Foi desprezada a água destilada sobre as lâminas e, na mesma cuba, foi deixado o berço com as lâminas em Peróxido de Hidrogênio a 3% (vol.10, Rioquímica®) (por 10 minutos, quando usado a primeira e 15 minutos quando usado o mesmo peróxido pela segunda vez. Guardar o peróxido no frasco “peróxido usado” e somar o número de lâminas (pode reutilizar até 150 lâminas ou 4 dias).
14. Lavado 2 vezes com água destilada
15. Lavado 2 vezes com tampão de lavagem, Wash buffer (EnVision™ FLEX Wash Buffer, 20x, dil. 1:20:00, DAKO®)

**Anticorpo Primário:**

16. Tirado as lâminas da cuba, tirado o excesso de buffer com lenço rapidamente do fundo da lâmina e dos lados.
17. Os cortes foram contornados com a caneta DAKO Pen (DAKO®) (caneta hidrofóbica)
18. Com o ar desligado, foi aplicado 100 uL do anticorpo CD4 (clone 4B12, Pronto para uso, DAKO®) e CD8 (clone C8/144B, Pronto para uso, DAKO®) (ou o suficiente para cobrir o corte). Homogeneizar na mão. Incubado a 1 hora. (Bandeja com papel umedecido no fundo e com tampa).
19. Colocada as lâminas no berço e lavada 2 vezes em cuba com Wash Buffer.

**Linker:**

20. Foi separado o linker Mouse (EnVison™ FLEX+ Mouse (LINKER)), Pronto para uso, DAKO®).



21. Secado o excesso de buffer, encaixada a lâmina na bandeja e adicionado 100 uL do Linker. Esperado 20 minutos
22. Lavado 2 vezes com buffer.

**Polímero:**

23. Secar o excesso, encaixar na bandeja a lâmina e adicionar 100 uL do polímero marcado (EnVison™ FLEX/HRP, DAKO®). Esperado 25 minutos
24. Preparado o diaminobenzidina tetrahydroclorato (DAB) + Solução tamponada contendo peróxido de hidrogênio (1 mL substrato + 1 gota DAB), (EnVision™ FLEX DAB+ Chromogen, EnVision™ FLEX Substrate Buffer DAKO®), 5 min antes de terminar o tempo do polímero.

**Revelação: Aplicação do cromógeno (DAB)**

25. Lavado 2 vezes com buffer.
26. Secado com papel. Foi posicionado as lâminas em uma esponja com papel toalha. Aplicado o DAB com micropipeta o suficiente para cobrir o corte (necessário apagar as luzes, pois o mesmo é sensível a luz). Esperar 5 minutos. Os cortes que foram ficando castanho, foram retirados e colocados no berço fora da cuba. Posteriormente neutralizado o resíduo em hipoclorito 10% e fazer o descarte de resíduos apropriado.
27. Após os 5 minutos, foi completado o berço e posicionado na cuba com Wash buffer. Lavado 2 vezes.

**Contracoloração e finalização:**

28. Foi o berço com as lâminas na Cuba com Hematoxilina de Harris. Esperando 1 minuto e 30 segundos.
29. Lavou com alguns mergulhos em uma cuba contendo água destilada (
30. Secado o excesso com papel.
31. Bateria de Finalização: as lâminas passaram por 4 banhos de álcool absoluto, secado o excesso em papel toalha e passaram por 5 banhos de xilol. (com 4 mergulhos cada cuba de álcool absoluto e xilol).
32. Secado o excesso com papel e montar com Entellan e Lamínula.

### APÊNDICE D - Tabela com dados histopatológicos e imunohistoquímicos dos 20 casos

Caso	Tipo de biópsia	Classificação histológica	TILs Low 0% a 40% / High 41% a 90% (200x)	TILs % bruto	Perfil Infiltrado Inflamatório	CD4 Low 0% a 40% / High 41% a 90% (200x)			CD8 Low 0% a 40% / High 41% a 90% (200x)			Marcadores Combinados
						Low	High	% bruto	Low	High	% bruto	
1	Peça Cirúrgica	Bem diferenciado	High	60	Intenso	X		0		X	70	CD4 Low CD8 High
2	Peça Cirúrgica	Bem diferenciado	High	75	Intenso	X		0		X	75	CD4 Low CD8 High
3	Incisional	Bem diferenciado	High	50	Moderado	X		0	X		30	CD4 Low CD8 Low
4	Incisional	Bem diferenciado	High	55	Moderado	X		0		X	50	CD4 Low CD8 High
5	Incisional	Moderadamente diferenciado	Low	30	Leve	X		10	X		30	CD4 Low CD8 Low
6	Incisional	Moderadamente diferenciado	High	50	Moderado	X		0	X		40	CD4 Low CD8 Low
7	Peça Cirúrgica	Bem diferenciado	High	80	Intenso	X		20		X	60	CD4 Low CD8 High
8	Incisional	Bem diferenciado	High	60	Intenso	X		0	X		30	CD4 Low CD8 Low
9	Peça Cirúrgica	Moderadamente diferenciado	High	80	Intenso	X		0		X	50	CD4 Low CD8 High
10	Peça Cirúrgica	Bem diferenciado	High	60	Intenso	X		0		X	55	CD4 Low CD8 High
11	Incisional	Bem diferenciado	Low	30	Leve	X		0		X	45	CD4 Low CD8 High
12	Peça Cirúrgica	Bem diferenciado	Low	40	Moderado	X		0	X		40	CD4 Low CD8 Low
13	Incisional	Bem diferenciado	High	70	Moderado	X		0	X		15	CD4 Low CD8 Low
14	Incisional	Bem diferenciado	High	55	Intenso	X		2	X		30	CD4 Low CD8 Low

<b>15</b>	Incisional	Bem diferenciado	High	80	Moderado	X	0	X	30	CD4 Low CD8 Low
<b>16</b>	Peça Cirúrgica	Moderadamente diferenciado	High	80	Intenso	X	1	X	80	CD4 Low CD8 High
<b>17</b>	Incisional	Moderadamente diferenciado	Low	40	Intenso	X	5	X	10	CD4 Low CD8 Low
<b>18</b>	Incisional	Bem Diferenciado	High	70	Intenso	X	0	X	40	CD4 Low CD8 Low
<b>19</b>	Incisional	Bem Diferenciado	High	70	Moderado	X	0	X	70	CD4 Low CD8 High
<b>20</b>	Incisional	Bem Diferenciado	Low	40	Moderado	X	0	X	65	CD4 Low CD8 High