

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DE MINAS GERAIS
Programa de Pós-graduação em Odontologia

Lilian de Barros

**AVALIAÇÃO DA INTENSIDADE DE *BUDDING* TUMORAL E DA DENSIDADE DE
MASTÓCITOS EM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE BOCA**

Belo Horizonte
2019

Lilian de Barros

**AVALIAÇÃO DA INTENSIDADE DE *BUDDING* TUMORAL E DA DENSIDADE DE
MASTÓCITOS EM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE BOCA**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, como requisito parcial para a obtenção do título de Mestre em Odontologia, Área de Concentração em Clínicas Odontológicas, Área Temática: Estomatologia.

Linha de Pesquisa: Biologia Oral

Orientador: Prof. Dr. Martinho Campolina
Rebello Horta

Belo Horizonte

2019

FICHA CATALOGRÁFICA

Elaborada pela Biblioteca da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais

B277a Barros, Lilian de
Avaliação da intensidade de *budding* tumoral e da densidade de mastócitos em carcinoma de células escamosas de boca / Lilian de Barros. Belo Horizonte, 2019.

63 f. : il.

Orientador: Martinho Campolina Rebello Horta
Dissertação (Mestrado) – Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais.
Programa de Pós-Graduação em Odontologia

1. Carcinoma de células escamosas. 2. Mastócitos. 3. Boca - Tumores. 4. Neoplasias Bucais. I. Horta, Martinho Campolina Rebello. II. Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais. Programa de Pós-Graduação em Odontologia. III. Título.

CDU: 616.31-006.6

Ficha catalográfica elaborada por Renata Diniz Guimarães de Oliveira - CRB 6/2646

Lilian de Barros

AVALIAÇÃO DA INTENSIDADE DE *BUDDING* TUMORAL E DA DENSIDADE DE MASTÓCITOS EM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE BOCA

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia. Área de Concentração: Clínicas Odontológicas – Área Temática: Estomatologia.

COMPOSIÇÃO DA BANCA EXAMINADORA:

- 1- Prof. Dr. Helvécio Marangon Júnior – UNIPAM
- 2- Profa. Dra. Giovanna Ribeiro Souto – PUC Minas
- 3- Prof. Dr. Martinho Campolina Rebello Horta – PUC Minas

DATA DA APRESENTAÇÃO E DEFESA: 12 de fevereiro de 2019

A dissertação, nesta identificada, foi aprovada pela Banca Examinadora

Prof. Dr. Martinho Campolina Rebello Horta
Orientador

Prof. Dr. Rodrigo Villamarim Soares
**Coordenador do Programa de Pós-graduação
em Odontologia**

*Esse trabalho é dedicado à minha amada filha Isabel,
Sol que ilumina minha vida,
razão do meu viver.*

AGRADECIMENTOS

Antes de tudo, quero agradecer a Deus, por ter abençoado todos os dias da minha vida, por iluminar meu caminho e me dar uma fé inabalável de que, no final, tudo dá certo.

Aos meus pais, Camilo e Edna, que muitas vezes se doaram e renunciaram aos seus sonhos, para que eu pudesse realizar os meus e por me darem a única herança que ninguém pode me tirar: a educação. Obrigada por me ensinarem agir com respeito, simplicidade, dignidade, honestidade e amor ao próximo.

À minha amada filha Isabel, por ser o Sol que ilumina minha vida, a razão do meu viver. Faço tudo por você, para você meu amor, para te dar um futuro cheio de alegrias, do jeito que você merece.

Ao meu marido, Vinícius, por ser meu companheiro nessa dura jornada que é a vida.

Aos meus sogros, Maria Augusta e Hermes por sempre estarem ao meu lado, me ajudando em tudo que podem.

Agradeço ao professor Martinho Campolina Rebelo Horta, pela oportunidade de tê-lo como meu orientador do mestrado. Tenho muito orgulho de citá-lo como um dos responsáveis pela minha formação profissional. Agradeço pela confiança, pela dedicação extrema, pela amizade, pelos bons conselhos e pela paciência. O senhor é um exemplo de simplicidade, compreensão e competência. Todos que trabalham com o senhor admiram sua dedicação e amor ao trabalho e à pesquisa científica. Enfim, sua dedicação vai muito além do que o dever o impõe. Aprendi com o senhor que a docência é uma grande responsabilidade e que requer dedicação e muito estudo. O senhor se tornou meu espelho de pessoa, mestre e profissional. Que eu possa sempre contar com o privilégio de ter sua amizade.

Ao meu querido amigo Helvécio Marangon Júnior, por ser o grande responsável por ter me apresentado a PUC Minas, instituição essa que hoje tanto respeito e amo, e por ser meu exemplo de dedicação e excelência em tudo o que faz.

À todos os professores da clínica de Estomatologia da PUC Minas (Carlão, Hermínia, Rosana, Helenice, Paulo Eduardo, Giovanna e Soraia) pelos enormes

ensinamentos nesse excelentes 2 anos de convivência e pela confiança em meu trabalho.

Às queridas Andréia e Reni, pela dedicação extrema em me ajudar a concluir essa pesquisa.

À Silvânia e Angélica, verdadeiros anjos na minha vida, por sempre estarem dispostas a me ajudar nas horas que mais precisei. Muito obrigada por serem tão carinhosas e dedicadas. À vocês, meu eterno respeito e amizade.

À alunas de iniciação científica, Mayara Rodrigues e Jéssica Campos, pela enorme ajuda e pelo compromisso em fazer tudo com responsabilidade e maestria.

À todas as funcionárias da clínica de Estomatologia da PUC Minas, em especial à Fran, Sirleide e Ana, pela amizade, respeito e paciência.

À todos os pacientes por mim atendidos, pela confiança e por me permitirem aprimorar meus conhecimentos.

Ao meu querido amigo Joaquim Barbosa Neto, companheiro nessa árdua jornada, meu “braço direito” na realização desse trabalho. Obrigada pelos momentos de muito estudo, mas também de boas risadas, de cantorias felizes e, até mesmo, de desabafos. Obrigada por sempre me incentivar e por não ter me deixado desistir nos momentos mais difíceis. Te dedico minha eterna amizade.

À Luana Farnese e Vítor Figueiredo, pelos fortes laços de amizade que construímos durante o mestrado.

À todos os outros colegas pela ótima convivência.

À Instituição PUC Minas, com todo respeito e amor, o meu muito obrigada.

RESUMO

O carcinoma de células escamosas é a neoplasia maligna mais comum da boca e apresenta altos índices de morbidade e mortalidade. A presença de células neoplásicas isoladas ou formando pequenos ninhos (*buds*) no fronte de invasão dos tumores, fenômeno denominado *budding* tumoral, tem sido associada ao comportamento mais agressivo de vários tipos de neoplasias malignas. Alta intensidade de *budding* tumoral vem sendo relacionada ao aumento da recorrência do tumor primário, de metástases regionais e à distância e à diminuição da sobrevida em carcinoma de células escamosas de boca (CCEB). O papel dos mastócitos no comportamento biológico de neoplasias malignas também tem sido amplamente investigado. Diante do exposto, o objetivo desse estudo foi avaliar a existência de associação entre a intensidade de *budding* tumoral e a densidade de mastócitos em CCEB. Investigou-se a existência de diferença na densidade de mastócitos entre tumores com alta intensidade de *budding* tumoral e tumores com baixa intensidade ou ausência de *budding* tumoral. Avaliou-se também, em tumores com alta intensidade de *budding* tumoral, a existência de diferença na densidade de mastócitos entre a área do *budding* e a área fora do *budding*. Oitenta amostras de CCEB foram submetidas a reações imunoistoquímicas para identificação de multi-citoqueratina (utilizada na avaliação de *budding* tumoral) e triptase de mastócitos (marcador utilizado na avaliação da densidade de mastócitos). O teste t de Student foi utilizado para comparar a densidade de mastócitos entre tumores com alta intensidade de *budding* tumoral e tumores com baixa intensidade ou ausência de *budding* tumoral. Para avaliar a existência de diferença na densidade de mastócitos entre a área do *budding* e a área fora do *budding*, foi realizado o teste t pareado. Quando a variável foi transformada em dicotômica, o teste exato de Fisher foi utilizado para avaliar a existência de associação entre intensidade de *budding* tumoral e densidade de mastócitos. Houve associação negativa entre a intensidade de *budding* tumoral e a densidade de mastócitos em CCEB ($p < 0,05$). A densidade de mastócitos em CCEB foi maior em tumores com baixa intensidade ou ausência de *budding* tumoral quando comparados a tumores com alta intensidade de *budding* tumoral ($p < 0,05$). Em tumores com alta intensidade de *budding* tumoral, não houve diferença na densidade de mastócitos entre a área do *budding* e a área fora do *budding* ($p > 0,05$). Os resultados observados sugerem que os mastócitos podem apresentar um papel protetor em relação à progressão tumoral do CCEB.

Palavras-chave: Carcinoma de células escamosas de boca. *Budding* tumoral. Mastócitos.

ABSTRACT

Squamous cell carcinoma is the most common malignant tumor of the oral cavity and presents high rates of morbidity and mortality. The presence isolated or small nests of neoplastic cells (buds) on the tumor invasive front, a phenomenon called tumor budding, has been associated with a more aggressive behavior of several types of malignant tumors. High-intensity tumor budding has been related to higher recurrence of the primary tumor, increased regional and distant metastases, and decreased survival in oral squamous cell carcinoma (OSCC). The role of mast cells in the biological behavior of malignant neoplasms has also been extensively investigated. Therefore, the aim of this study was to evaluate association between the intensity of tumor budding and the mast cell density in OSCC. Differences in mast cell density between tumors with high-intensity tumor budding and tumors with low-intensity or no tumor budding were evaluated. In tumors with high-intensity tumor budding, the study also assessed differences in mast cell density between the budding area and the area outside the budding. Eighty OSCC samples were submitted to immunohistochemical reactions to identify multi-cytokeratin (used in the evaluation of tumor budding) and mast cell tryptase (a marker used to evaluate mast cell density). Student's t-test was used to compare mast cell density between tumors with high-intensity tumor budding and tumors with low-intensity or no tumor budding. To evaluate differences in mast cell density between the budding area and the area outside the budding, the paired t-test was performed. When the variable was transformed into dichotomous, Fisher's exact test was used to evaluate association between tumor budding intensity and mast cell density. There was a negative association between tumor budding intensity and mast cell density in OSCC ($p < 0.05$). The mast cell density in OSCC was higher in tumors with low-intensity or no tumor budding when compared to tumors with high-intensity tumor budding ($p < 0.05$). In tumors with high-intensity tumor budding, there was no difference in mast cell density between the budding area and the area outside the budding ($p > 0.05$). These results suggest that mast cells may play a protective role in tumor progression of OSCC.

Keywords: Oral squamous cell carcinoma. Tumor budding. Mast cells.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	17
1.1 Carcinoma de células escamosas de boca.....	17
1.2 Densidade de mastócitos e sua importância no processo de invasão local e metástase das neoplasias	21
1.3 Budding tumoral e sua importância no processo de invasão local e metástase das neoplasias	27
2 OBJETIVOS.....	31
2.1 Objetivo geral	31
2.2 Objetivos específicos.....	31
3 ARTIGO CIENTÍFICO	33
4 CONSIDERAÇÕES FINAIS	55
REFERÊNCIAS.....	57
ANEXO A – Parecer Consubstanciado do CEP PUC Minas.....	61

1 INTRODUÇÃO

1.1 Carcinoma de células escamosas de boca

O carcinoma de células escamosas é a neoplasia maligna mais comum da boca, representando aproximadamente 95% das lesões malignas desta região. O carcinoma de células escamosas de boca (CCEB) se desenvolve a partir do epitélio de revestimento da mucosa oral e apresenta altos índices de morbidade e mortalidade (EL-NAGGAR *et al.*, 2017; WARNAKULASURIYA, 2009).

O câncer bucal é um grave problema global e sua incidência está aumentando em todo o mundo. A estimativa anual de novos casos de câncer na cavidade oral é em torno de 275.000 novos casos em países em desenvolvimento (WARNAKULASURIYA, 2009). Segundo dados do Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva (INCA), em 2016, a estimativa, no Brasil, foi de 15.490 novos casos de câncer de boca, sendo 11.140 em homens e 4.350 em mulheres. O número de mortes estimado foi de 5.401, sendo 4.223 homens e 1.178 mulheres (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2016). Já no biênio de 2018-2019, a estimativa para novos casos de câncer de boca é de 11.200 casos em homens e 3.500 em mulheres. O risco estimado é de 10,86 novos casos a cada 100.000 homens e de 3,28 novos casos para cada 100.000 mulheres (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2018).

Com base no documento *World Cancer Report 2014* da International Agency for Research on Cancer (IARC), da Organização Mundial da Saúde (OMS), o câncer é um problema de saúde pública, especialmente entre os países em desenvolvimento, onde se espera que o impacto do câncer na população, nas próximas décadas, corresponda a 80% dos mais de 20 milhões de casos novos estimados para 2025 (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2016).

Em vários países, o câncer de boca é mais comum em homens do que em mulheres. Essa maior incidência em homens está relacionada à maior exposição dos mesmos aos fatores de risco relacionados ao desenvolvimento do câncer, relacionados tanto aos hábitos de vida quanto à maior exposição ao Sol (fator esse relacionado à maior incidência de câncer de vermelhão de lábio) (WARNAKULASURIYA, 2009). No Brasil, a boca representa a sexta localização de

maior incidência de câncer em homens e a décima segunda em mulheres (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2018).

Os indivíduos do sexo masculino são os mais acometidos pelo CCEB, principalmente entre a quinta e sexta décadas de vida. Nas últimas décadas, tem sido observado um aumento no número de pacientes do sexo feminino e adultos jovens. Essa diferença cada vez menor entre os sexos se dá devido ao fato de que certos hábitos até então relacionados ao sexo masculinos e provavelmente relacionados à etiologia da doença, tenham sido adotados pelas mulheres, o que pode justificar, em parte, o aumento da prevalência no sexo feminino. Além disso, há associação entre a infecção por HPV (16 e 18) e o câncer de boca. Parte do aumento da incidência em mulheres pode estar relacionada às mudanças no comportamento sexual nos últimos tempos (OGBUREKE; BINGHAM, 2012).

As taxas de incidência e mortalidade para CCEB variam de um país para outro, como também dentro do mesmo país. Essas variações dependem, principalmente, das diferenças de hábitos, das características socioeconômicas, da expectativa de vida, de fatores ambientais, da raça, de educação preventiva e da qualidade da assistência médica nas diversas regiões (BRENER *et al.*, 2007).

No Brasil, no biênio de 2018-2019, o câncer de boca é o quarto mais frequente em homens no Sudeste (13,77/100 mil). Na região Centro-Oeste (9,72/100 mil) e na região Nordeste (6,72/100 mil), ocupa a quinta posição. Nas regiões Sul (15,40/100 mil) e Norte (3,59/100 mil), ocupa a sexta posição. É o 11º mais frequente em mulheres na região Nordeste (3,12/100 mil) e o 12º nas regiões Centro-Oeste (2,96/100 mil) e Norte (1,78/100 mil). Ocupa a 13ª posição na região Sudeste (3,64/100 mil) e a 15ª posição na região Sul (3,59/100 mil) (INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2018).

O CCEB é uma doença multifatorial (BRENER *et al.*, 2007, KHALILI, 2008; OGBUREKE; BINGHAM, 2012). A exposição a um dos três grandes grupos de estímulos carcinogênicos: químicos, físicos e virais, é potencialmente indutora de câncer na mucosa bucal. O CCEB é causado predominantemente por agentes químicos carcinogênicos. Nesse contexto, cabe também destacar que fatores genéticos, dietéticos, sexuais e hormonais são potenciais moduladores dos processos neoplásicos em geral (OGBUREKE; BINGHAM, 2012). Os fatores de risco bem estabelecidos para o CCEB são tabagismo, etilismo, infecção pelo

Papiloma Vírus Humano (HPV) e exposição à radiação solar (BRENER *et al.*, 2007; KHALILI, 2008).

O tabagismo e o etilismo destacam-se como os principais fatores de risco para os cânceres de lábio e cavidade oral. O número de casos em fumantes chega a ser de duas a três vezes maior que entre os não fumantes (BRENER *et al.*, 2007). Segundo Ogbureke e Bingham (2012), estudos epidemiológicos indicam que o risco de se desenvolver câncer bucal é cinco vezes maior para fumantes do que para os não fumantes. Pacientes que fumam 80 cigarros ou mais por dia podem aumentar em 17 vezes esse risco. Aproximadamente 80% dos pacientes com câncer de boca são fumantes e, além disso, pacientes tratados de câncer de boca e que continuam a fumar apresentam risco de duas a seis vezes maior de desenvolverem uma segunda neoplasia maligna, principalmente dos tratos respiratório e digestivo, quando comparados aos pacientes que pararam de fumar. O uso de tabaco sem fumaça é também um potencial fator etiológico do desenvolvimento do CCEB, porém, com uma incidência bem menor quando comparado àquela relacionada ao ato de fumar tabaco. Merece também destaque o forte sinergismo entre tabagismo e etilismo, o que potencializa o risco de desenvolver a doença (OGBUREKE; BINGHAM, 2012).

A relação entre o álcool (principalmente bebidas destiladas) e o CCEB é conhecida há muito tempo. O maior desafio até hoje é separar os efeitos do consumo intenso de álcool dos do tabagismo e de outros fatores de risco como, por exemplo, os nutricionais. A maioria das pessoas que consomem grandes quantidades de bebida alcoólica também é tabagista também em grandes quantidades (OGBUREKE; BINGHAM, 2012). Segundo Brener *et al.* (2007), o álcool isoladamente não pode ser associado à fase inicial da carcinogênese oral, mas acredita-se que ele possa promovê-la ao potencializar os efeitos do tabaco.

Em relação ao Vírus do Papiloma Humano (HPV), há comprovada associação entre HPV 16, HPV 18 e CCEB (MARTÍNEZ; BALDIRIS; DÍAZ, 2014). O HPV 16 é o subtipo mais comum associado ao CCEB e às lesões cancerizáveis orais (OGBUREKE; BINGHAM, 2012).

A exposição crônica aos raios solares é um importante fator de risco para o carcinoma de células escamosas de lábio, que pode se desenvolver a partir do surgimento de uma lesão cancerizável denominada de queilite actínica (BRENER *et*

al., 2007; INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA, 2016).

O CCEB origina-se de queratinócitos do epitélio de revestimento da mucosa oral e sua anatomia patológica microscópica caracteriza-se pela presença de invasão da lâmina própria e dos tecidos adjacentes por lençóis, ninhos, cordões ou pequenos grupos de células epiteliais de revestimento neoplásicas, muitas vezes exibindo pleomorfismo nuclear e celular, hipocromatismo nuclear, multinucleação, diskeratose e mitoses típicas e atípicas (EL-NAGGAR *et al.*, 2017).

O curso clínico do CCEB é, muitas vezes, agressivo, com ocorrência loco – regional de metástase para linfonodos cervicais. O CCEB geralmente está associado a mau prognóstico, apresentando altas taxas de recorrência do tumor primário e de metástases regionais (DISSANAYAKE, 2017; JERJES *et al.*, 2010). A presença de metástase regional está relacionada a um pior prognóstico do tumor (ALMANGUSH *et al.*, 2014; XIE *et al.*, 2015).

O prognóstico do CCEB é determinado pelo estadiamento clínico do tumor através do sistema TNM. Este sistema utiliza três parâmetros, onde T correlaciona-se ao tamanho do tumor, N à presença ou ausência de metástase para linfonodos regionais e M, se há ou não presença de metástase à distância. Quanto maior o estadiamento do tumor, pior é seu prognóstico. Por este sistema de estadiamento, há quatro estágios de progressão do tumor: estágios I, II, III e IV. Entretanto, essa classificação TNM apresenta limitações, pois um CCEB classificado como T1 (tumor em estágio inicial) pode apresentar metástase para linfonodos e um comportamento agressivo com resultado fatal (ALMANGUSH *et al.*, 2014). Segundo Dissanayake (2017), o estadiamento clínico de acordo com o sistema TNM é amplamente utilizado para o planejamento do tratamento de pacientes diagnosticados com CCEB. Pressupõe-se, por essa classificação, que tumores menores e sem disseminação local ou regional apresentam melhor prognóstico em relação à tumores maiores e com metástase. Porém, observou-se que a taxa de crescimento e o padrão de disseminação do CCEB pode refletir pouca ou nenhuma relação com o comportamento biológico agressivo do tumor. Portanto, o estadiamento TNM por si só é insuficiente para se prever o prognóstico do paciente diagnosticado com CCEB.

Apesar dos enormes avanços nas modalidades de diagnóstico e tratamento do CCEB, as taxas de mortalidade permanecem inalteradas, apresentando baixas

taxas de sobrevida em cinco anos (ANGADI *et al.*, 2015; JERJES *et al.*, 2010; OGBUREKE; BINGHAM, 2012).

Há, portanto, a necessidade do desenvolvimento de novos parâmetros que possam prever as características do tumor antes de tomadas de decisões em relação ao tratamento cirúrgico do CCEB, por exemplo, determinando, de forma confiável, a necessidade de se adotar protocolos terapêuticos mais agressivos, incluindo a dissecação dos linfonodos regionais (XIE *et al.*, 2015). Esse fato enfatiza a necessidade de se determinar fatores prognósticos confiáveis que permitam uma melhor divisão dos pacientes em categorias com base na agressividade do tumor e, a partir disso, poder desenvolver um protocolo terapêutico individualizado para cada caso diagnosticado (ALMANGUSH *et al.*, 2014).

1.2 Densidade de mastócitos e sua importância no processo de invasão local e metástase das neoplasias

Os mastócitos são células do tecido conjuntivo que foram descritas, pela primeira vez, por Paul Ehrlich, em 1878, em sua tese de doutorado, que utilizou o termo “mastzellen” (termo alemão que se refere à “uma célula bem alimentada”) para descrevê-los. São originários de células tronco totipotentes da medula óssea (células progenitoras hematopoiéticas CD34+) que migram para os tecidos, onde se diferenciam e amadurecem; ou seja, apresentam diferenciação terminal nos tecidos (KAMAL *et al.*, 2015). Exercem papel importante na defesa do organismo e residem em todos os tecidos vascularizados. Mastócitos maduros não são encontrados na circulação sanguínea, ou seja, circulam na sua forma imatura no próprio tecido. Apresentam uma tendência em se acumularem em torno dos vasos sanguíneos em focos inflamatórios e neoplásicos (GUDISEVA *et al.*, 2017).

Quando vistos através de microscopia óptica, os mastócitos humanos apresentam formato arredondado ou oval, variando seu diâmetro de 8 a 20 µm. Possuem um núcleo arredondado ou ovoide e apresentam numerosos grânulos secretores metacromáticos no citoplasma (GAJE *et al.*, 2016).

Os mastócitos são células complexas e multifuncionais que desempenham importante papel tanto na imunidade inata quanto na adquirida. Por meio da degranulação de seus grânulos citoplasmáticos, estas células exercem influência local e sistêmica através da liberação de uma variedade de mediadores, estimulando

a neovascularização por meio de mediadores angiogênicos como fator de crescimento de fibroblastos (FGF), fator de crescimento transformador (TGF) e fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) (GUDISEVA *et al.*, 2017). Após a ativação por diversos estímulos, essas células secretam uma grande variedade de produtos biologicamente ativos como heparina, histamina, prostaglandinas, citocinas, quimiocinas e fatores de crescimento (GUDISEVA *et al.*, 2017; MARICHAL; TSAI; GALI, 2013). É uma rica fonte de proteases, especialmente de triptase e de quimase. Apesar de todos os mastócitos se derivarem de um precursor comum, eles mostram heterogeneidade em termos de fenótipo e função: mastócitos do tecido conjuntivo e mastócitos de mucosa. Esses dois tipos celulares se diferem por suas localizações, mediadores produzidos e resposta a diferentes estímulos. Desse modo, alguns mastócitos apresentam apenas a triptase em seus grânulos, já outros apresentam tanto triptase quanto quimase (GAJE *et al.*, 2016; MARICHAL; TSAI; GALI, 2013). Uma vez secretados, os mediadores mastocitários podem iniciar respostas teciduais e imunológicas, atrair células inflamatórias e mediar o remodelamento e reparo tecidual (MACIEL; MOURA; HERMINE, 2015). Os mastócitos estão localizados na interface ambiente-hospedeiro, ou seja, na periferia imediata de vasos sanguíneos, linfáticos e de fibras nervosas, como também na periferia imediata de células do sistema imunológico. Essa localização estratégica confere a essas células o papel de sentinelas, como também a capacidade de responderem, de forma rápida, a qualquer alteração no microambiente circundante através de interações com outras células das respostas imunológica e fisiológica. Dessa forma, os mastócitos são considerados células efetoras potentes do sistema imunológico (GAJE *et al.*, 2016).

Todo tecido conjuntivo contém mastócitos, inclusive o da cavidade oral. Na mucosa oral, essas células se distribuem, preferencialmente, adjacentes a microvasos da lâmina própria e ao redor do endotélio microvascular da mucosa oral (GAJE *et al.*, 2016). Suas variadas funções biológicas incluem a fagocitose, o processamento de antígenos, a produção de citocinas e a liberação de uma gama de mediadores pré-formados (histamina, proteoglicanos e proteases) bem como a produção de mediadores fisiológicos formados a partir da resposta ao estímulo, como leucotrienos e prostaglandinas. Devido à sua distribuição e localização estratégicas e sua multiplicidade de funções biológicas, os mastócitos apresentam

papel importante nos processos fisiológicos, imunológicos e patológicos (ZAID; MALLICK, 2014).

Os mastócitos são uma fonte primordial de fatores angiogênicos e sua localização na proximidade de capilares sanguíneos e vasos linfáticos, como também nas bordas de tumores invasivos, facilita a angiogênese através da liberação de mediadores pré-formados ou ativando a liberação proteolítica do composto angiogênico ligado à matriz extracelular. Um fator essencial relacionado à progressão dos tumores é a angiogênese, que consiste na formação de novos vasos sanguíneos a partir de estruturas vasculares pré-existentes. Para que ocorra a angiogênese, é necessário que haja um desequilíbrio entre moduladores angiogênicos positivos e negativos, produzidos por células tumorais e do hospedeiro, dentro do microambiente vascular. A angiogênese também requer a atividade de várias moléculas como fatores angiogênicos (que promovem proliferação e diferenciação de células endoteliais vasculares), proteínas da matriz extracelular, receptores de adesão e enzimas proteolíticas. Esses vasos sanguíneos neoformados fornecem oxigênio adequado às células tumorais e fazem a drenagem eficiente de seus metabólitos (KABIRAJ *et al.*, 2018).

O aumento da densidade de mastócitos nas margens do tumor e a liberação subsequente de fatores angiogênicos mostram uma interação tumor-hospedeiro que favorece a progressão tumoral e, em vários tipos de neoplasias, os mastócitos se acumulam no fronte invasivo do tumor, facilitando a angiogênese (ANURADHA *et al.*, 2014, DANTAS *et al.*, 2017, GUDISEVA *et al.*, 2017, KABIRAJ *et al.*, 2018; LAISHRAM *et al.*, 2017, MACIEL; MOURA; HERMINE, 2015; NAKANDALA; SURAWEEERA; JAYASOORIYA, 2018; SHARMA *et al.*, 2010). Durante a progressão do tumor, os mastócitos atuam, também, no recrutamento de eosinófilos e neutrófilos, bem como na ativação das respostas imunes dos linfócitos T e B e de células supressoras derivadas da linhagem mieloide, que se acumulam no microambiente do tumor e se correlacionam com um mau prognóstico (MACIEL; MOURA; HERMINE, 2015).

A triptase é a proteína mais abundante que fica armazenada nos grânulos dos mastócitos. Promove o processo inflamatório e a remodelação tecidual. Atua também como um fator mitogênico para as células endoteliais e ativa as metaloproteinases e o ativador do plasminogênio, que promovem a degradação da matriz extracelular (SHARMA *et al.*, 2010). Além disso, é considerado um importante

fator angiogênico (GAJE *et al.*, 2016). Outra protease produzida pelos mastócitos é a quimase, que estimula, de forma direta e indireta, a progelatinase B (pró-MMP9, metaloproteinase-9), ajudando na progressão da doença. As citocinas, principalmente a IL-8 (Interleucina-8) produzida por mastócitos, induzem a metaloproteinase de matriz MMP2, facilitando a migração de células endoteliais e, portanto, auxiliando a angiogênese (GUDISEVA *et al.*, 2017).

A angiogênese está relacionada à progressão e metástase de várias neoplasias malignas como câncer de pulmão, de esôfago, de mama e da cavidade oral. Os mastócitos são uma importante fonte de fatores angiogênicos e pró-angiogênicos (CHEMMA; RAMESH; BALAMURALI, 2012). Essas células podem liberar fatores angiogênicos, como o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), no estroma tumoral, estimulando a angiogênese precoce. Várias proteínas, além do VEGF, foram identificadas como ativadores angiogênicos: fator básico de crescimento de fibroblastos, angiogenina, fator de crescimento transformador- α , fator de crescimento endotelial derivado de plaquetas, fator estimulante de colônias de granulócitos, fator de crescimento placentário, interleucina 8 (IL-8), fator de crescimento de hepatócitos e fator de crescimento epidérmico (NAKANDALA; SURaweera; JAYASOORIYA, 2018).

Mastócitos podem também promover a liberação de histamina, que induz a proliferação das células neoplásicas. Além disso, essas células liberam metaloproteinases de matriz e proteases, como a quimase e a triptase, que são capazes de degradar a matriz extracelular e promoverem a disseminação das células neoplásicas e, conseqüentemente, a metástase (GAJE *et al.*, 2016). Os mastócitos também secretam o fator de necrose tumoral- α , que está implicado no aumento da expressão das metaloproteinases MMP2 e MMP9, que degradam a matriz extracelular e, portanto, ajudam no processo de invasão tumoral (GUDISEVA *et al.*, 2017).

Parizi *et al.* (2010) relataram que os mastócitos são a maior fonte de VEGF, sendo esse o fator angiogênico mais potente, que induz a liberação de outros fatores angiogênicos através da parede do endotélio da matriz. A reorganização do estroma pelas proteases produzidas pelos mastócitos com o objetivo de facilitar a migração de células endoteliais é também um fator importante na angiogênese. Além disso, a heparina produzida pelos mastócitos contribui para a invasão de vasos sanguíneos e, conseqüentemente, para o processo de metástase.

A carcinogênese é um processo complexo que apresenta diversas etapas. Vários fatores, como a liberação de peptídeos derivados de tumores, bem como a regulação da ativação de células T ou das proteínas quimiotáticas derivadas de mastócitos, liberadas durante o desenvolvimento tumoral, induzem a migração quimiotática de mastócitos (ZAID; MALLICK, 2014). Essas células também podem migrar, por quimiotaxia, para áreas de hipóxia devido à liberação de fatores angiogênicos pelas células neoplásicas, que estimulam a infiltração de mais mastócitos no tumor (LAISHRAM *et al.*, 2017). O aumento da densidade de mastócitos está associado a um mau prognóstico em várias neoplasias malignas, o que mostra seu papel na progressão tumoral. O acúmulo dessas células na periferia dos tumores e a liberação de fatores inflamatórios podem contribuir para a interação tumor-hospedeiro, o que favorece a progressão tumoral (GAJE *et al.*, 2016).

Entretanto, o papel dos mastócitos na progressão tumoral é controverso na literatura. A densidade significativamente maior de mastócitos no CCEB sugere que a contagem de mastócitos pode ser utilizada como indicador da progressão da doença, ou seja, a densidade de mastócitos seria útil para se observar o comportamento agressivo das células neoplásicas (CHEMMA; RAMESH; BALAMURALI, 2012). Há estudos demonstrando que a alta densidade de mastócitos no CCEB está relacionada à carcinogênese e à progressão tumoral (agravando o prognóstico), principalmente pelo fato dos mastócitos liberarem diversos fatores angiogênicos (AGARWAL; BHARGAVA, 2015; ANURADHA *et al.*, 2014; GADDIKERI; BHORGONDE, 2016; GUDISEVA *et al.*, 2017; KABIRAJ *et al.*, 2018; LAISHRAM *et al.*, 2017; NAKANDALA; SURaweera; JAYASOORIYA, 2018; SAXENA *et al.*, 2018; SHARMA *et al.*, 2010). Porém, outra vertente de estudos mostra que a alta densidade de mastócitos está relacionada a um melhor prognóstico nos casos de CCEB (ATTRAMADAL *et al.*, 2016; BROCKMEYER *et al.*, 2017; DANTAS *et al.*, 2017).

Gaddikeri e Bhorgonde (2016) observaram aumento significativo no número de mastócitos no CCEB, quando comparado ao número dessas células nos controles de mucosa oral normal, sugerindo que os mastócitos apresentam papel importante na angiogênese e na carcinogênese. Nakandala, Suraweera e Jayasooriya (2018) relataram correlação estatisticamente significativa entre a densidade de mastócitos e a densidade microvascular com a metástase para linfonodos em CCEB, sendo que a densidade de mastócitos foi maior em tumores

com metástase linfonodal. Agarwal e Bhargava (2015) também observaram um aumento progressivo na contagem de mastócitos de lesões potencialmente malignas para lesões malignas de mucosa oral. A contagem de mastócitos também aumentou de carcinomas bem diferenciados para carcinomas moderadamente diferenciados e destes para carcinomas mal diferenciados. Saxena *et al.* (2018) relataram que a densidade de mastócitos é uma poderosa ferramenta para se observar a invasão do estroma em CCEB, além de um indicador do prognóstico do paciente. Esses autores observaram que a densidade de mastócitos progressivamente aumenta de mucosa normal para leucoplasia e de leucoplasia para CCEB.

Attramadal *et al.* (2016) avaliaram a densidade de mastócitos no fronte de invasão e sua relação com prognóstico de pacientes com CCEB em estágio inicial (T1N0M0 e T2N0M0). Maior densidade de mastócitos foi significativamente associada a maior sobrevida dos pacientes e a menor recorrência do tumor primário. Os autores sugeriram que baixa densidade celular de mastócitos é condizente com um mau prognóstico no CCEB, predizendo menor sobrevida. Já a maior densidade dessas células indicaria a participação das mesmas na regulação do comportamento biológico do tumor, levando a um melhor prognóstico. Brockmeyer *et al.* (2017) avaliaram a densidade de mastócitos e sua relação com o prognóstico em CCEB. Esses autores concluíram que a alta densidade de mastócitos atua como um marcador independente de prognóstico, indicando uma taxa de sobrevida global mais favorável. Segundo esses autores, os mastócitos teriam um efeito citotóxico sobre as células neoplásicas, induzido pela liberação de TNF, promovendo a sua apoptose. Adicionalmente, por meio da liberação de diferentes interleucinas e quimiocinas como CCL5, CXCL8, CXCL10 e IL-6, os mastócitos poderiam recrutar e ativar várias células do sistema imune com capacidade de inibir o crescimento do tumor. Dantas *et al.* (2017) observaram, em CCEB, que a densidade de mastócitos é significativamente maior em tumores bem diferenciados, quando comparados a tumores moderadamente ou mal diferenciados. Esses autores sugerem que a menor densidade de mastócitos em tumores moderadamente ou mal diferenciados poderia ser atribuída a um ambiente celular desfavorável, indicando que esta redução poderia ser causada pela competição entre o sistema imune celular e o microambiente tumoral.

A melhor compreensão dos mecanismos de ativação dos mastócitos, da capacidade de imunomodulação e de seu potencial pró-angiogênico pode contribuir

para o desenvolvimento de novas estratégias terapêuticas para o tratamento do câncer. Em modelos de estudo, tanto *in vitro* e *in vivo*, a inibição da degranulação de mastócitos parece diminuir o crescimento do tumor, a sua vascularização e sua capacidade de metastatizar. Imunoterapia por meio da inibição da liberação da triptase de mastócitos tem potencial para ser utilizada como tratamento clínico (AMENDOLA *et al.*, 2016).

1.3 Budding tumoral e sua importância no processo de invasão local e metástase das neoplasias

Budding tumoral é definido como a presença de células neoplásicas isoladas ou agrupadas em pequenos ninhos (compostos por até quatro células) presentes próximo ao fronte de invasão do tumor, mas não exclusivamente restritas a esta localização (WANG *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2011). Segundo Almangush *et al.* (2014), o *budding* tumoral representa um crescimento infiltrativo difuso de células neoplásicas isoladas ou formando pequenos ninhos espalhados no estroma em distâncias variáveis do fronte de invasão do tumor. É um fenômeno morfológico no qual grupos isolados de células neoplásicas se separam do epitélio neoplásico e migram para o estroma (WANG *et al.*, 2011).

O *budding* tumoral foi descrito pela primeira vez em carcinoma colorretal, sugerindo sua correlação com maior agressividade biológica do tumor. Posteriormente, foi considerado um “fator prognóstico adicional” pela UICC (União Internacional contra o Câncer) para o carcinoma colorretal (GRIZZI *et al.*, 2012; WANG *et al.*, 2009).

O *budding* tumoral expressa duas propriedades de malignidade, que são a perda de coesão entre as células e o movimento ativo de invasão (WANG *et al.*, 2011). As células na área de *budding* perdem a expressão de caderina-E e expressam vimentina, sugerindo a ocorrência de transição epitélio-mesênquima (EMT) (BASTID, 2012).

Budding tumoral tem sido relacionado ao prognóstico de vários tipos de neoplasias malignas epiteliais e sua avaliação pode ser utilizada como um parâmetro universal indicativo de agressividade (ALMANGUSH *et al.*, 2014; ALMANGUSH *et al.*, 2018). Os *buds* (ou ninhos) geralmente estão nas bordas invasivas das neoplasias malignas e a alta intensidade de *budding* tumoral está

associada ao tamanho do tumor, ao seu estadiamento, ao seu grau de diferenciação, à presença de metástase para linfonodos e à sobrevida em geral (HONG *et al.*, 2018).

A intensidade de *budding* tumoral pode ser assim classificada: I) baixa intensidade ou ausência de *budding* tumoral: presença de menos de 5 *buds* (ninhos contendo até 4 células tumorais) em um único campo de 200X; II) alta intensidade de *budding* tumoral: presença de 5 ou mais *buds* (ninhos contendo até 4 células tumorais) em um único campo de 200X (MARANGON JUNIOR *et al.*, 2014; WANG *et al.*, 2009; WANG *et al.*, 2011).

O *budding* tumoral tem a capacidade de definir a agressividade biológica do tumor e servir como índice para se determinar o potencial metastático do CCEB. Também é considerado um fator prognóstico para a recorrência local, presença de metástase à distância, invasão linfática e vascular e tempo de sobrevida (ALMANGUSH *et al.*, 2014, ANGADI *et al.*, 2015).

De acordo com Almangush *et al.* (2014), o *budding* tumoral é um preditor independente para metástase em linfonodos no CCEB, ou seja, um fator de prognóstico independente das demais variáveis clinicopatológicas, incluindo o tradicional estadiamento clínico do tumor. Sua intensidade é capaz de predizer a ocorrência de metástase linfonodal, metástase à distância, recorrência locorregional e piores sobrevidas tanto global quanto a livre de doença (HONG *et al.*, 2018). No CCEB, a avaliação do *budding tumoral* em amostras provenientes de biópsias é um fator capaz de predizer a ocorrência de metástase para linfonodos e essa avaliação é independente tanto do padrão de invasão quanto da profundidade de invasão do tumor. Portanto, a intensidade de *budding* tumoral é um poderoso e independente fator capaz de predizer a ocorrência de metástase locorregional e o prognóstico do paciente (KIRITA *et al.*, 2018).

Alta intensidade de *budding* tumoral está associada a um mau prognóstico do carcinoma de células escamosas de língua em fase inicial, juntamente com a maior profundidade de invasão do tumor e um pior padrão de invasão (ALMANGUSH *et al.*, 2014). A ocorrência de *budding* tumoral é um evento frequente e parece ser um fator prognóstico independente em CCEB de língua (WANG *et al.*, 2011).

Xie *et al.* (2015) analisaram a correlação do *budding* tumoral com as características clínico-patológicas de carcinoma de células escamosas de língua em estágios iniciais do tumor. Observou-se, nesse estudo, que a frequência do *budding*

tumoral nesses carcinomas foi de 85,6% e que a alta intensidade do *budding* tumoral está fortemente relacionada com metástase para linfonodos, pior padrão de invasão, maior ocorrência de recidivas locais e maior profundidade de invasão.

Uma característica que torna a presença de *budding* tumoral muito atraente para a avaliação do comportamento biológico do tumor é que essa avaliação pode ser realizada facilmente como parte do exame histopatológico de rotina e seus resultados são bastante reproduzíveis (WANG *et al.*, 2011).

O estágio clínico e a classificação patológica dos tumores têm falhado em prever a sobrevida em pacientes diagnosticados com CCEB. Por isso, há a necessidade de se desenvolver um sistema de classificação que possa ter um valor preditivo fiel na avaliação do prognóstico de pacientes com esse tipo de neoplasia (DISSANAYAKE, 2017). Pacientes com estágios de desenvolvimento do CCEB semelhantes podem apresentar diversidade nos cursos clínicos e nas respostas terapêuticas mesmo quando submetidos ao mesmo regime de tratamento. Atualmente, nenhum dos fatores prognósticos estabelecidos, unicamente ou em combinação, é capaz de prever esse comportamento biológico do tumor de forma individualizada. Os fatores prognósticos devem fornecer uma melhor compreensão do curso da doença, como também, uma melhor previsão da resposta do paciente à terapia padrão e, um dos achados mais promissores a esse respeito é o conhecimento das características funcionais e estruturais do fronte de invasão, que corresponde à parte mais agressiva do tumor. Essas características morfológicas e funcionais do fronte de invasão do tumor estão relacionadas à agressividade do CCEB e a incorporação desses conceitos em um sistema para se determinar o prognóstico poderá refletir melhor a diversidade dos comportamentos biológicos do câncer bucal e prever, com precisão, os resultados clínicos e as respostas à determinados tipos de terapêutica adjuvante (BÀNKFALVI; PIFFKÓ, 2000). De acordo com Bryne (1998), as características moleculares e morfológicas do fronte de invasão do tumor refletem seu prognóstico melhor do que outras partes da neoplasia (ou seja, o fronte de invasão é a área mais importante para se determinar o prognóstico do CCEB). Por décadas, patologistas observaram que, no fronte de invasão, a morfologia do tumor é diferente, quando comparada com as partes central ou superficial. No fronte de invasão, as células neoplásicas apresentam maior potencial de agressividade, uma vez que são essas células que provavelmente irão provocar a metástase (BRYNE *et al.*, 1992; BRYNE, 1998; KONG *et al.*, 2015). É

nesse contexto que o *Budding* tumoral surge como um marcador morfológico de prognóstico. Sua intensidade é um forte fator prognóstico independente para a predição da metástase para linfonodos e sobrevida em CCEB. Portanto, o *budding* tumoral é um parâmetro importante para se avaliar o comportamento biológico do tumor. Sua relevância em predizer o prognóstico e a facilidade de sua reprodução enfatiza a importância de sua avaliação e incorporação na prática diária da patologia cirúrgica no manejo do CCEB (ALMANGUSH *et al.*, 2014).

O CCEB, em estágios iniciais, já apresenta alto risco de metástase regional e a presença de metástase local para linfonodos cervicais é o mais importante fator capaz de predizer a sobrevida do paciente. Mas, apesar dos grandes avanços no que diz respeito à avaliação clínica da presença ou ausência de metástase regional, esse fato nem sempre pode ser determinado. Por isso, mesmo com a alta probabilidade de ocorrer metástase regional nos casos de CCEB, recomendar ou não o esvaziamento da cadeia de linfonodos cervicais torna-se um desafio. Um estudo recente mostrou que as taxas de sobrevida global e de sobrevida livre de doença aumentaram com o esvaziamento cervical eletivo em relação ao esvaziamento cervical terapêutico. Porém, em pacientes sem metástase regional, o esvaziamento cervical eletivo o traria comorbidades desnecessárias. Isso faz com que novas estratégias para a determinação do prognóstico do CCEB sejam desenvolvidas para a tomada de decisões importantes para o manejo terapêutico do paciente. Tendo em vista as evidências de sua associação ao prognóstico de pacientes com CCEB em fase inicial, a intensidade de *budding tumoral* pode ser utilizada não apenas como mais um biomarcador, mas como uma importante ferramenta terapêutica para determinação da necessidade de esvaziamento cervical profilático nesses pacientes (SHIMIZU *et al.*, 2019).

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a intensidade de *budding* tumoral e a densidade de mastócitos em carcinoma de células escamosas de boca (CCEB).

2.2 Objetivos específicos

- a) avaliar, em CCEB, a existência de associação entre a intensidade de *budding* tumoral e a densidade de mastócitos;
- b) avaliar, em CCEB, a existência de diferença na densidade de mastócitos entre tumores com alta intensidade de *budding* tumoral e tumores com baixa intensidade ou ausência de *budding* tumoral;
- c) avaliar, em tumores com alta intensidade de *budding* tumoral, a existência de diferença na densidade de mastócitos entre a área do *budding* tumoral e a área fora do *budding* tumoral.

3 ARTIGO CIENTÍFICO

O artigo intitulado “**Avaliação da intensidade de *budding* tumoral e da intensidade de mastócitos em carcinoma de células escamosas de boca**” será submetido ao periódico “Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal” (Qualis B1 Odontologia).

Normas para submissão de artigos podem ser visualizadas no endereço eletrônico: <http://www.medicinaoral.com/04b.pdf>.

**Avaliação da intensidade de *budding* tumoral e da densidade de mastócitos
em carcinoma de células escamosas de boca**

Título curto: Mastócitos e budding tumoral em carcinoma de boca

**Lilian de Barros¹, Joaquim-Barbosa-Matias Neto¹, Helvécio Marangon Junior¹,
Mayara Rodrigues¹, Jéssica-Campos Vieira¹, Giovanna-Ribeiro Souto¹, Paulo-
Eduardo-Alencar de Souza¹, Martinho-Campolina-Rebello Horta¹**

¹ Programa de Pós-graduação em Odontologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Belo Horizonte, Minas Gerais, Brasil.

Autor correspondente:

Martinho Campolina Rebello Horta

Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, Departamento de Odontologia

Av. Dom José Gaspar 500 - Prédio 45 - Sala 110

Belo Horizonte, MG - Brasil

CEP: 30535-901

Phone: (+55) 31 3319-4341

E-mail: martinhhorta@pucminas.br

Resumo

Objetivos: Avaliar a existência de associação entre a intensidade de *budding* tumoral e a densidade de mastócitos em carcinoma de células escamosas de boca (CCEB). Investigar a existência de diferença na densidade de mastócitos entre tumores com alta intensidade de *budding* e tumores com baixa intensidade ou ausência de *budding*. Avaliar, em tumores com alta intensidade de *budding*, a existência de diferença na densidade de mastócitos entre a área do *budding* e a área fora do *budding*.

Desenho do estudo: Oitenta amostras de CCEB foram submetidas a reações imunoistoquímicas para identificação de multi-citoqueratina (utilizada na avaliação de *budding*) e triptase de mastócitos (marcador utilizado na avaliação da densidade de mastócitos). O teste t de Student foi utilizado para comparar a densidade de mastócitos entre tumores com alta intensidade de *budding* e tumores com baixa intensidade ou ausência de *budding*. Para avaliar a existência de diferença na densidade de mastócitos entre a área do *budding* e a área fora do *budding*, foi realizado o teste t pareado. Quando a variável foi transformada em dicotômica, o teste exato de Fisher foi utilizado para avaliar a existência de associação entre intensidade de *budding* e densidade de mastócitos.

Resultados: Houve associação negativa entre a intensidade de *budding* e a densidade de mastócitos em CCEB ($p < 0,05$). A densidade de mastócitos em CCEB foi maior em tumores com baixa intensidade ou ausência de *budding* quando comparados a tumores com alta intensidade de *budding* ($p < 0,05$). Em tumores com alta intensidade de *budding*, não houve diferença na densidade de mastócitos entre a área do *budding* e a área fora do *budding* ($p > 0,05$).

Conclusões: Associação negativa entre a intensidade de *budding* tumoral e a densidade de mastócitos em CCEB sugere que essas células podem apresentar um papel protetor em relação à progressão tumoral nesta neoplasia.

Palavras-chave: Carcinoma de células escamosas de boca. *Budding* tumoral. Mastócitos.

Introdução

O carcinoma de células escamosas de boca (CCEB) é a neoplasia maligna mais comum da boca e apresenta altos índices de morbidade e mortalidade (1,2). A taxa global de sobrevida para os casos de CCEB não mudou de forma significativa nos últimos 30 anos (2).

A presença de células neoplásicas isoladas ou formando pequenos ninhos (*buds*) no fronte de invasão dos tumores, fenômeno denominado *budding* tumoral, tem sido associada ao comportamento mais agressivo de vários tipos de neoplasias malignas (3,4). Alta intensidade de *budding* tumoral vem sendo relacionada a maior índice de proliferação celular (5) e a pior prognóstico em CCEB (4,6-9).

O papel dos mastócitos no comportamento biológico de neoplasias malignas tem sido amplamente investigado. Essas células carregam, em seus grânulos citoplasmáticos, uma série de moléculas de adesão, vários receptores da resposta imunológica e moléculas de superfície que lhes fornecem a capacidade de reagir à múltiplos estímulos específicos e inespecíficos (10). A literatura mostra divergência no que se refere ao papel dos mastócitos na progressão tumoral, tendo em vista que a o aumento da densidade de mastócitos no estroma do CCEB tem sido relacionado à progressão tumoral e pior prognóstico (11-16), bem como o melhor prognóstico (17-19).

Diante do exposto, o objetivo desse estudo foi avaliar a existência de associação entre a intensidade de *budding* tumoral e a densidade de mastócitos em CCEB. Investigou-se a existência de diferença na densidade de mastócitos entre tumores com alta intensidade de *budding* tumoral e tumores com baixa intensidade ou ausência de *budding* tumoral. Avaliou-se também, em tumores com alta

intensidade de *budding* tumoral, a existência de diferença na densidade de mastócitos entre a área do *budding* e a área fora do *budding*.

Material e Métodos

Seleção da amostra

Este estudo foi aprovado pelo comitê de ética da PUC Minas (CAAE 01595518.4.0000.5137).

Foram selecionadas 80 amostras de CCEB provenientes do Laboratório de Patologia Bucal do Departamento de Odontologia da PUC Minas, previamente obtidas por meio de biópsia incisional para fins de diagnóstico e armazenadas em blocos de parafina. Tais amostras incluíram casos de diferentes localizações em boca. Os 80 casos utilizados foram selecionados a partir da avaliação inicial de 160 casos de CCEB, sendo incluídos apenas os casos com quantidade de parênquima e estroma suficientes para as análises propostas.

Reações imunoistoquímicas

A técnica imunoistoquímica foi empregada para identificação de: 1) multicitokeratina AE1/AE3 (utilizada na avaliação de tumoral para a identificação de células epiteliais neoplásicas); 2) triptase de mastócitos (*Mast Cell Tryptase* - marcador de mastócitos).

Cortes com 3 µm de espessura das amostras foram obtidos a partir dos blocos de parafina. As etapas de desparafinização, reidratação e reativação antigênica foram realizadas utilizando a solução Trilogy (Cell Marque, Rocklin, USA), de acordo com as instruções do fabricante (2 banhos de 30 minutos a 98°C). O bloqueio da peroxidase endógena e de proteínas endógenas foi realizado com a

utilização das soluções Hydrogen Peroxide Block (Spring, Bioscience, California, USA) e Protein Block (Spring, Bioscience, California, USA), de acordo com as orientações do fabricante. Posteriormente os cortes foram lavados em tampão TRIS por cinco minutos. Em seguida, os cortes foram incubados, em câmara úmida por 60 minutos, com um dos seguintes anticorpos primários: 1) anti-multi-citoqueratina (coquetel de clones AE1 e AE3, diluído a 1:50; Leica Biosystems, Newcastle, UK); 2) anti- Mast Cell Tryptase (clone AA1; diluído a 1:600; Diagnostic BioSystems, Pleasanton, CA). Posteriormente, foram realizados 3 banhos de tampão TRIS de 5 minutos cada. O sistema de amplificação livre de biotina Reveal (Spring, Bioscience, California, USA) foi então utilizado de acordo com as instruções do fabricante. A revelação foi realizada por meio do kit de revelação com solução de diaminobenzidina (Spring, Bioscience, California, USA). A contracoloração foi realizada com hematoxilina de Mayer por 1 minuto. Posteriormente, os cortes foram desidratados em soluções com concentrações crescentes de etanol, a partir de uma passagem em etanol 70% durante 2 minutos, uma passagem em etanol 90% durante 5 minutos e três passagens em etanol absoluto, durante cinco minutos cada. Os cortes foram, então, diafanizados por meio de três banhos de xilol, em temperatura ambiente, de cinco minutos cada. Para a montagem das lâminas foi utilizado Permount (Fisher Scientific, Fair Lawn, USA). Amostras contendo mucosa oral normal foram utilizadas como controle positivo para multicitoqueratina e amostras de líquen plano em mucosa oral foram utilizadas como controle positivo para triptase de mastócitos. O controle negativo foi realizado por meio da supressão do anticorpo primário.

Avaliação da intensidade de budding tumoral

Para a avaliação da intensidade de budding tumoral, foi seguido o critério proposto por Wang et al. (4). Essa avaliação se deu por meio de microscopia óptica em amostras imunomarcadas para multi-citoqueratina (AE1/AE3), como sugerido por Leão et al. (20).

Inicialmente, as amostras foram avaliadas em menor aumento para que a área com maior intensidade de *budding* tumoral fosse selecionada. Posteriormente, realizou-se a contagem dos *buds* (células neoplásicas isoladas ou agrupadas em pequenos ninhos com menos de cinco células, localizadas no fronte de invasão tumoral).

Na área com maior número de *tumor buds*, esta contagem foi realizada em um único campo, em um aumento de 200X.

As amostras foram classificadas, então, em: I) alta intensidade de *budding* tumoral: 5 ou mais *tumor buds* presentes em um campo de 200X; II) baixa intensidade de *budding* tumoral ou ausência de *budding* tumoral: menos de 5 *tumor buds* ou ausência de *tumor buds* em um campo de 200X.

A avaliação da intensidade de *budding* tumoral foi realizada por três examinadores independentes, os quais utilizaram o mesmo microscópio de luz, com lente ocular 10X e número de campo 22 (diâmetro do campo de visão na lente ocular). As avaliações que geraram discordância entre os três examinadores foram classificadas de acordo com os resultados da maioria dos examinadores. A concordância interexaminadores foi avaliada pelo Kappa de Fleiss, enquanto a concordância intraexaminador foi calculada pelo Kappa de Cohen. Nesta última análise, cada examinador realizou, de forma independente, estimativas em 40 amostras em dois momentos: T1 (avaliação inicial) e T2 (30 dias depois). A tabela de

cálculo de amostras publicada por Sim e Wright (21) foi utilizada para calcular a quantidade de 40 amostras para reanálise, assumindo o valor da hipótese nula de Kappa de zero, o Kappa mínimo para detectar 0,40 e o poder de 80%. O intervalo de 30 dias entre T1 e T2 foi considerado adequado para diminuir o viés da análise anterior dos espécimes em T1. As análises de concordância foram realizadas pelos programas estatístico StatsToDo no site www.statstodo.com (StatsToDo Trading Pty Ltd, Brisbane, QLD, Austrália). Em comparação com a força de concordância associada à estatística Kappa proposta por Landis e Koch (22), a concordância interexaminadores foi quase perfeita (Kappa = 0,84, IC 95%: 0,72-0,97). A concordância interexaminador foi também quase perfeita para todos os três examinadores: Examinador 1 (Kappa = 0,94, IC 95%: 0,85-1,04), Examinador 2 (Kappa = 0,94 IC 95%: 0,84-1,04) e examinador 3 (Kappa = 0,95, IC 95%: 0,85-1,04).

Avaliação da densidade de mastócitos

A avaliação da densidade de mastócitos foi realizada utilizando-se microscópio óptico, em um aumento de 200X, nas amostras nas quais foram feitas as reações imunoistoquímicas para triptase de mastócitos (*Mast Cell Tryptase* - marcador de mastócitos).

Foram consideradas como mastócitos apenas as células com marcação citoplasmática para triptase de mastócitos e contendo núcleo de formato ovoide.

Para as amostras classificadas como apresentando “alta intensidade de *budding* tumoral”, foram analisados dois campos de 200X para análise: 1) um campo de 200X com maior densidade de mastócitos na área de *budding* tumoral; 2) um campo de 200X com maior densidade de mastócitos fora da área do *budding*

tumoral. Para comparação com as amostras classificadas como apresentando “baixa intensidade ou ausência de *budding* tumoral”, utilizou-se o campo com maior densidade de mastócitos, entre os dois campos supracitados.

Para as amostras classificadas como apresentando “baixa intensidade ou ausência de *budding* tumoral”, foi analisado um campo de 200X, sendo escolhido o que apresentou maior densidade de mastócitos.

A avaliação da densidade de mastócitos foi realizada por meio do software *Cell F Soft Imaging System* (Olympus, Münster, Germany), utilizando-se o mesmo monitor de 22 polegadas e a mesma condição de luminosidade do ambiente.

Após a contagem, gerou-se a variável cardinal “densidade de mastócitos” (número de mastócitos por campo de 200X). Essa variável cardinal foi também transformada em uma variável nominal dicotômica (baixa densidade de mastócitos *versus* alta densidade de mastócitos) utilizando-se como ponto de corte a mediana dos valores observados.

Análise estatística

O teste D’Agostino & Pearson demonstrou que os dados apresentavam distribuição normal. O teste t de Student foi utilizado para comparar a densidade de mastócitos entre tumores com alta intensidade de *budding* tumoral e tumores com baixa intensidade ou ausência de *budding* tumoral. Para avaliar a existência de diferença na densidade de mastócitos entre a área do *budding* e a área fora do *budding*, foi realizado o teste t pareado. Quando a variável foi transformada em dicotômica, o teste exato de Fisher foi utilizado para avaliar a existência de associação entre intensidade de *budding* tumoral e densidade de mastócitos.

O nível de significância foi estabelecido em 5%. As análises foram realizadas por meio do software *GraphPad Prism* (San Diego, Califórnia, USA).

Resultados

Foram avaliadas 80 amostras de CCEB de diferentes sítios anatômicos. Sessenta e seis pacientes eram do sexo masculino e 14 do sexo feminino. A média de idade dos pacientes foi de 57,57 anos. Do total da amostra, 40 (50%) apresentavam alta intensidade de *budding* tumoral (Figura 1A) e 40 (50%) apresentavam baixa intensidade ou ausência de *budding* tumoral.

A imunomarcção para triptase de mastócitos foi observada no citoplasma (Figuras 1B, C, D, E e F).

Houve associação negativa entre a intensidade de *budding* tumoral e a densidade de mastócitos em CCEB (Tabela 1; $p < 0,05$). A densidade de mastócitos em CCEB foi maior em tumores com baixa intensidade ou ausência de *budding* tumoral ($36,53 \pm 16,06$) quando comparados a tumores com alta intensidade de *budding* tumoral ($23,98 \pm 11,27$). (Figuras 1B, C, D, E e F; Gráfico 1; $p < 0,05$).

Em tumores com alta intensidade de *budding* tumoral, não houve diferença na densidade de mastócitos entre a área do *budding* tumoral ($21,15 \pm 11,33$) e a área fora do *budding* tumoral ($18,08 \pm 10,31$) (Figuras 1C, D, E e F; Gráfico 2; $p > 0,05$).

Discussão

Apesar dos enormes avanços nas modalidades de diagnóstico e tratamento do CCEB, as taxas de mortalidade permanecem inalteradas e essa neoplasia ainda apresenta baixas taxas de sobrevida em cinco anos (9). Pacientes com estágios de desenvolvimento semelhante podem apresentar diversidade nos cursos clínicos e

nas respostas terapêuticas, mesmo quando submetidos ao mesmo regime de tratamento. Tendo em vista que o estágio clínico dos tumores tem falhado em prever a sobrevida em pacientes com CCEB, torna-se necessário o desenvolvimento de novos biomarcadores, que possam ter um valor preditivo fiel na avaliação do prognóstico de pacientes com esta neoplasia (23,24).

Budding tumoral tem sido relacionado ao prognóstico de vários tipos de neoplasias malignas epiteliais. A presença de alta intensidade de *budding* tumoral em CCEB é capaz de prever a ocorrência de metástases regionais, recorrência do tumor primário e pior sobrevida (4,6-9).

Um fator essencial relacionado à progressão dos tumores é a angiogênese, que consiste na formação de novos vasos sanguíneos a partir de estruturas vasculares pré-existentes. Os mastócitos são uma fonte primordial de fatores angiogênicos e sua localização na proximidade de capilares sanguíneos e vasos linfáticos, como também nas bordas de tumores invasivos, facilita a angiogênese por meio da liberação de mediadores pré-formados ou ativando a liberação proteolítica do composto angiogênico ligado à matriz extracelular (15). Gaje et al. (25) relataram que a progressão de displasia epitelial para CCEB está associada a um aumento da neovascularização na lâmina própria subepitelial e que os mastócitos representam uma rica fonte de fatores angiogênicos e de diferentes enzimas proteolíticas que favorecem a formação de novos vasos sanguíneos. Agarwal e Bhargava (26) e Saxena et al. (27) também observaram um aumento progressivo na contagem de mastócitos de lesões potencialmente malignas para lesões malignas orais. A densidade significativamente maior de mastócitos no CCEB sugere que a contagem de mastócitos pode ser utilizada como indicador da progressão da doença, ou seja, a densidade de mastócitos seria útil para se observar o comportamento agressivo

das células neoplásicas (28). Entretanto, o papel dos mastócitos na progressão tumoral é controverso na literatura. Há estudos demonstrando que a alta densidade de mastócitos no CCEB está relacionada à progressão tumoral e pior prognóstico (11-16). Porém, uma outra vertente de estudos mostra que a alta densidade de mastócitos está relacionada a melhor prognóstico em CCEB (17-19). Diante do exposto, torna-se relevante avaliar a existência de associação entre a intensidade de *budding* tumoral e a densidade de mastócitos em CCEB.

Os resultados do presente estudo mostraram associação entre a intensidade de *budding* tumoral e a densidade de mastócitos em CCEB (Tabela 1; $p < 0.05$). A densidade de mastócitos foi maior em tumores com baixa intensidade ou ausência de *budding* tumoral, quando comparados a tumores com alta intensidade de *budding* tumoral (Gráfico 1; $p < 0.05$). A maior densidade de mastócitos em tumores com baixa intensidade ou ausência de *budding* sugere que essas células podem apresentar um papel protetor em relação à progressão tumoral, proporcionando melhor prognóstico ao paciente. Nesta mesma direção, Dantas et al. (19) observaram que a densidade de mastócitos em CCEB é significativamente maior em tumores bem diferenciados. Esses autores sugerem que a menor densidade de mastócitos em tumores moderadamente ou mal diferenciados poderia ser atribuída a um ambiente celular desfavorável, indicando que esta redução poderia ser causada pela competição entre o sistema imune celular e o microambiente tumoral. Attramadal et al. (17), avaliando pacientes com CCEB em estágio inicial, observaram que maior densidade de mastócitos foi significativamente associada a maior sobrevida e a menor recorrência do tumor primário. Brockmeyer et al. (18) também observaram que a alta densidade de mastócitos atua como um marcador independente de prognóstico, indicando uma taxa de sobrevida global mais favorável em CCEB. Segundo esses

autores, os mastócitos teriam um efeito citotóxico sobre as células neoplásicas, induzido pela liberação de TNF, promovendo apoptose. Adicionalmente, por meio da liberação de diferentes interleucinas e quimiocinas como CCL5, CXCL8, CXCL10 e IL-6, os mastócitos poderiam recrutar e ativar várias células do sistema imune com capacidade de inibir o crescimento do tumor. Entretanto, cabe novamente destacar que a literatura também apresenta estudos com resultados antagônicos aos supracitados, ou seja, a alta densidade de mastócitos seria condizente com progressão tumoral e pior prognóstico em CCEB (11-16).

Apesar da associação negativa anteriormente descrita entre intensidade de budding tumoral e densidade de mastócitos, em tumores com alta intensidade de budding tumoral não houve diferença na densidade de mastócitos entre a área do *budding* e a área fora do *budding* (Gráfico 2; $p>0.05$). Esses resultados demonstram que a densidade de mastócitos é menor e homoganeamente distribuída nas amostras com alta intensidade de *budding*, independentemente da área avaliada. Tal fato poderia, em tese, estar relacionado à associação entre baixa densidade de mastócitos e pior prognóstico (17-19).

Uma limitação do presente estudo é a avaliação isolada de mastócitos, tendo em vista que outras células presentes no estroma tumoral podem também influenciar o comportamento biológico do CCEB (29). Outra limitação é o fato de que as amostras utilizadas no estudo foram provenientes de biópsias incisionais. Entretanto, cabe destacar que Almangush et al. (6) demonstraram que os escores de *budding* tumoral de biópsias incisionais pré-operatórias de CCEB estão estatisticamente associadas aos scores de amostras de ressecção tumoral pós-operatória.

Os resultados do presente estudo nos permitem concluir que há associação negativa entre a intensidade de *budding* tumoral e a densidade de mastócitos em

CCEB, sugerindo que essas células podem apresentar um papel protetor em relação à progressão tumoral. A densidade de mastócitos em CCEB foi maior em tumores com baixa intensidade ou ausência de *budding* tumoral quando comparados a tumores com alta intensidade de *budding* tumoral. Entretanto, em tumores com alta intensidade de budding tumoral, não houve diferença na densidade de mastócitos entre a área do *budding* e a área fora do *budding*.

Referências

1. El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slootweg PJ. WHO Classification of Head and Neck Tumours. 4th ed. IARC Press, Lyon, France; 2017.
2. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. Oral Oncol. 2009;45(4-5):309-16.
3. Wang LM, Kevans D, Mulcahy H, O'Sullivan J, Fennelly D, Hyland J, et al. Tumor budding is a strong and reproducible prognostic marker in T3N0 colorectal cancer. Am J Surg Pathol. 2009 Jan;33(1):134-41.
4. Wang C, Huang H, Huang Z, Wang A, Chen X, Huang L, et al. Tumor budding correlates with poor prognosis and epithelial-mesenchymal transition in tongue squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med. 2011;40(7):545-51.
5. Marangon Junior H, Leão PLR, Melo VVM, Caixeta ÂB, Souza PEA, de Aguiar MCF, et al. Cell proliferation is associated with intensity of tumor budding in oral squamous cell carcinoma. J Oral Pathol Med. 2018;47(2):128-35.
6. Almangush A, Pirinen M, Heikkinen I, Mäkitie AA, Salo T, Leivo I. Tumour budding in oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis. Br J Cancer. 2018;118(4):577-86.

7. Almangush A, Leivo I, Siponen M, Sundquist E, Mroueh R, Mäkitie AA, et al. Evaluation of the budding and depth of invasion (BD) model in oral tongue cancer biopsies. *Virchows Arch.* 2018;472(2):231-6.
8. Hong KO, Oh KY, Shin WJ, Yoon HJ, Lee JI, Hong SD. Tumor budding is associated with poor prognosis of oral squamous cell carcinoma and histologically represents an epithelial- mesenchymal transition process. *Hum Pathol.* 2018;80:123-9.
9. Angadi PV, Patil PV, Hallikeri K, Mallapur MD, Hallikerimath S, Kale AD. Tumor budding is an independent prognostic factor for prediction of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Int J Surg Pathol.* 2015 Apr;23(2):102-10.
10. Maciel TT, Moura IC, Hermine O. The role of mast cells in cancers. *F1000 Prime Rep.* 2015;7(9):1-6.
11. Sharma B, Sriram G, Saraswathi TR, Sivapathasundharam B. Immunohistochemical evaluation of mast cells and angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. *Indian J Dent Res.* 2010 Apr-Jun;21(2):260-5.
12. Anuradha A, Naik BKK, Srinivas GV, Devi RS, Puneet HK. Incidence of mast cells in oral squamous cell carcinoma: A short study. *J Oncol,* 2014 Jan;2014:614291.
13. Gudiseva S, Santosh ABR, Chitturi R, Anumula V, Poosarla C, Baddam VRR. The role of mast cells in oral squamous cell carcinoma. *Contemp Oncol (Pozn.* 2017 Mar;21(1):21-9.
14. Laishram D, Rao K, Devi HSU, Priya NS, Smitha T, Sheethal HS. Mast cells and angiogenesis in malignant and premalignant oral lesions: An

immunohistochemical study. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2017 May-Aug;21(2):229-238.

15. Kabiraj A, Jaiswal R, Singh A, Gupta J, Singh A, Samadi FM. Immunohistochemical evaluation of tumor angiogenesis and the role of mast cell in oral squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Ther.* 2018 Apr-Jun;14(3):495-502.
16. Nakandala K, Suraweera A, Jayasooriya P. Correlation of elevated mast cell and micro-vessel densities with lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Stomatological Dis Sci.* 2018/ Apr;2(4):1-10.
17. Attramadal CG, Kumar S, Gao J, Boysen ME, Halstensen TS, Bryne M. Low mast cell density predicts poor prognosis in oral squamous cell carcinoma and reduces survival in head and neck squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.* 2016 Oct;36(10):5499-506.
18. Brockmeyer P, Kling A, Schulz X, Perske C, Schliephake H, Hemmerlein B. High mast cell density indicates a longer overall survival in oral squamous cell carcinoma. *Scient Rep.* 2017 Nov;7(1):14677.
19. Dantas RCM, de Souza RO, Valverde LF, Vidal MTA, Sales CBS, Sousa LP, et al. Evaluation of Mast Cell Density in the Tumor Microenvironment in Oral Epithelial Dysplasia and Oral Squamous Cell Carcinoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2017 Nov/Dec;25(10):e83-e88.
20. Leão PLR, Marangon Junior H, Melo VVM, Caixeta ÂB, Souza PEA, de Aguiar MCF, et al. Reproducibility, repeatability, and level of difficulty of two methods for tumor budding evaluation in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2017;46(10):949-55.

21. Sim J, Wright CC. The kappa statistic in reliability studies: use, interpretation, and sample size requirements. *Phys Ther.* 2005;85(3):257-68.
22. Landis JR, Koch GG. The measurement of observer agreement for categorical data. *Biometrics.* 1977;33(1):159-74.
23. Bãnkfalvi A, Piffikó J. Prognostic and predictive factors in oral cancer: the role of the invasive tumour front. *J Oral Pathol Med.* 2000;29(7):291-8.
24. Jerjes W, Upile T, Petrie A, Riskalla A, Hamdoon Z, Vourvachis M, et al. Clinicopathological parameters, recurrence, locoregional and distant metastasis in 115 T1-T2 oral squamous cell carcinoma patients. *Head Neck Oncol.* 2010;2:9. doi: 10.1186/1758-3284-2-9.
25. Gaje PN, Amalia Ceausu R, Jitariu A, Stratul SI, Rusu LC, Popovici RA, et al. Mast cells: key players in the shadow in oral inflammation and in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *BioMed Res Int.* 2016;2016:9235080.
26. Agarwal I, Bhargava S. Role of mast cell in oral lesions. *J Med Sci Clin Res.* 2015 Sep;3(9):7575-80.
27. Saxena S, Singh A, Singh P, Sundaragiri KS, Sankhla B, Bhargava A. Evaluating the role of immunological cells (Tissue Eosinophils and Mast Cells) in progression of oral squamous cell carcinoma. *Mymensingh Med J.* 2018 Apr;27(2):382-8.
28. Chemma VS, Ramesh V, Balamurali PD. The relevance of mast cells in oral squamous cell carcinoma. *J Clin Diagn Res.* 2012 Dec;6(10):1803-7.
29. Giatromanolaki A, Sivridis E, Koukourakis MI. The pathology of tumor stromatogenesis. *Cancer Biol Ther.* 2007;6(5):639-45.

Agradecimentos

Fundo de Incentivo à Pesquisa da PUC Minas (FIP PUC Minas), Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de Minas Gerais (FAPEMIG), Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) e Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES).

Figura 1. **A)** Alta densidade de *budding* tumoral em carcinoma de células escamosas de boca (imunomarcção para multi-citoqueratina, 200x); **B)** Mastócitos no estroma de CCEB com baixa intensidade ou ausência de *budding* tumoral (imunomarcção para triptase de mastócitos, 200x); **C e D)** Mastócitos no estroma da área do *budding* em CCEB com alta intensidade de *budding* tumoral (imunomarcção para triptase de mastócitos, C: 200x, D: 400X); **E e F)** Mastócitos no estroma da área fora do *budding* em CCEB com alta intensidade de *budding* tumoral (imunomarcção para triptase de mastócitos, E: 200x, F: 400x).

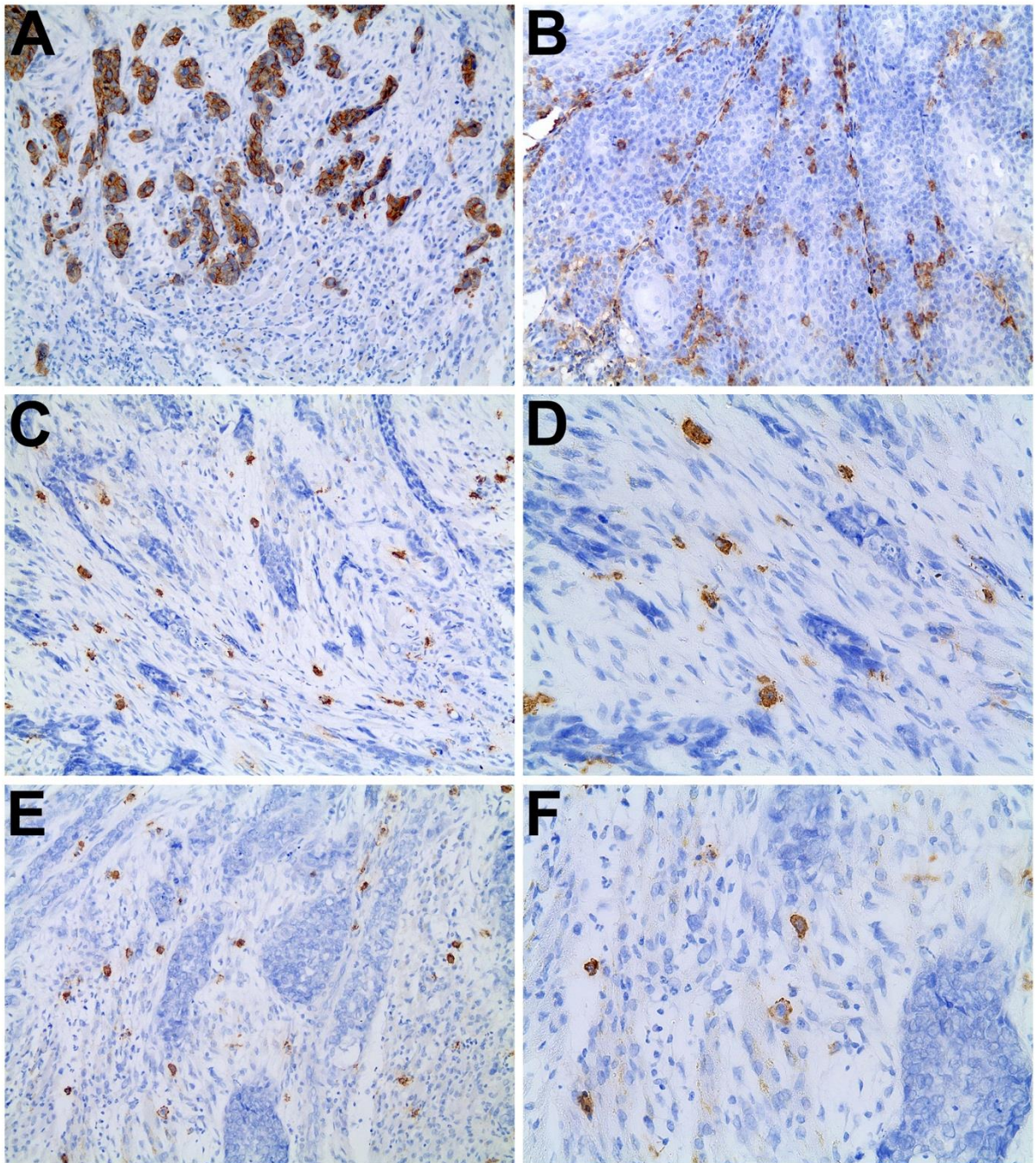


Tabela 1. Associação entre densidade de mastócitos e intensidade de *budding* tumoral

	Baixa intensidade ou ausência de <i>budding</i>	Alta intensidade de <i>budding</i>	Valor de p*	Odds ratio (IC95%)
Baixa densidade de mastócitos	14	26	<0,05	0,28 (0,11 – 0,72)
Alta densidade de mastócitos	26	14		

* Valor de p obtido pelo teste exato de Fisher

Baixa densidade de mastócitos: densidade de mastócitos $\leq 27,5$.

Alta densidade de mastócitos: densidade de mastócitos $> 27,5$.

Gráfico 1. Densidade de mastócitos em tumores com baixa intensidade ou ausência de *budding* tumoral e tumores com alta intensidade de *budding* tumoral

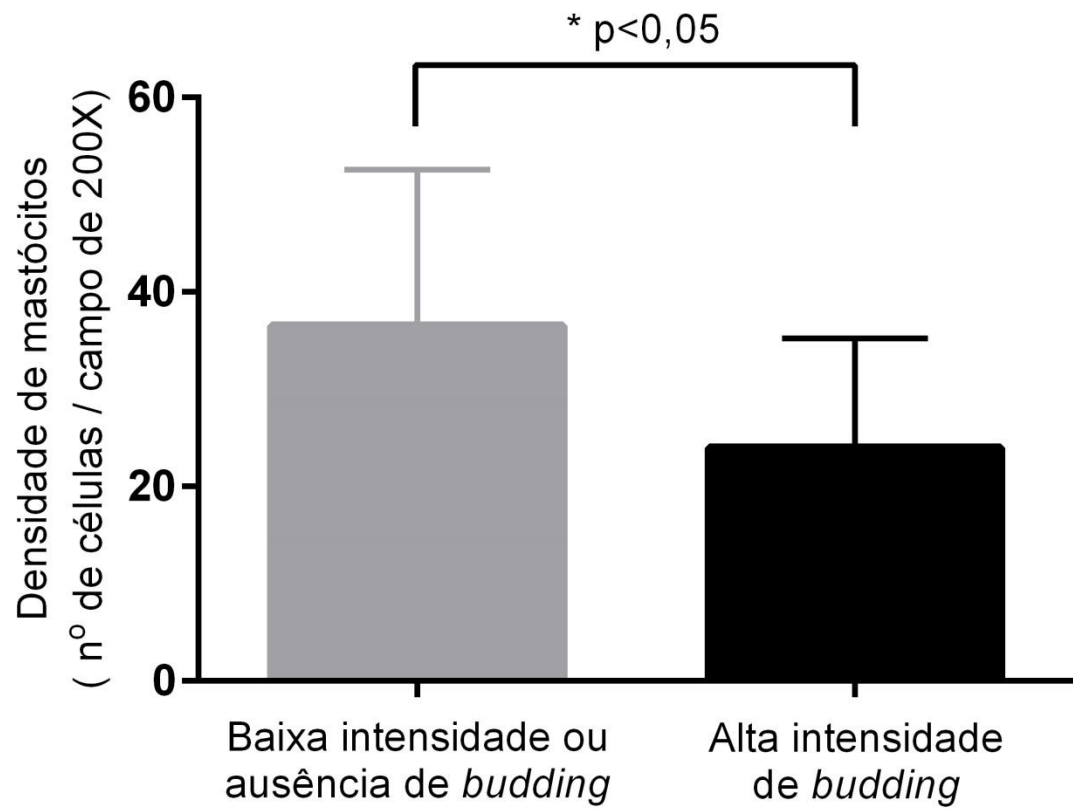
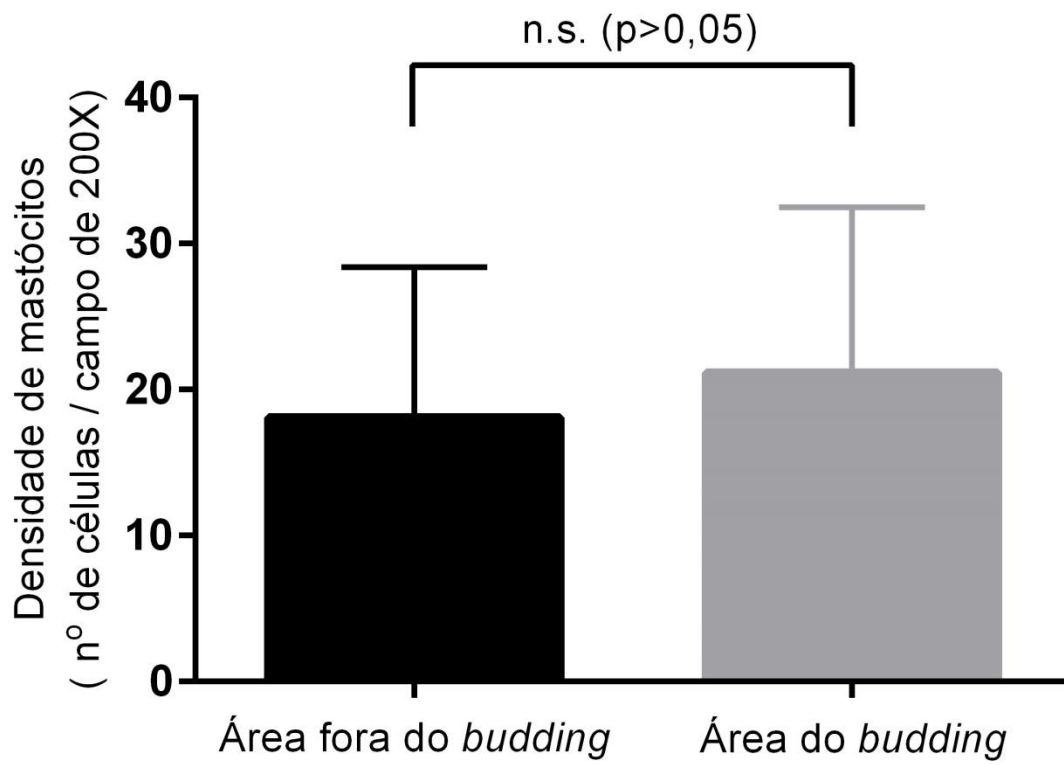


Gráfico 2. Densidade de mastócitos na área fora do *budding* e na área do *budding* de tumores com alta intensidade de *budding* tumoral



4 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Os resultados do presente estudo nos permitem concluir que:

- a) houve associação negativa entre a intensidade de *budding* tumoral e a densidade de mastócitos em CCEB;
- b) a densidade de mastócitos em CCEB foi maior em tumores com baixa intensidade ou ausência de *budding* tumoral quando comparados a tumores com alta intensidade de *budding* tumoral;
- c) em CCEB, em tumores com alta intensidade de *budding* tumoral, não houve diferença na densidade de mastócitos entre a área do *budding* tumoral e a área fora do *budding* tumoral.

REFERÊNCIAS

- AGARWAL, I.; BHARGAVA, S. Role of mast cell in oral lesions. **Journal of Medical Science and Clinical Research**, v.3, n.9, p. 7575-7580, Set. 2015.
- ALMANGUSH, A. *et al.* Depth of invasion, tumor budding, and worst pattern of invasion: prognostic indicators in early-stage oral tongue cancer. **Head & Neck**, v.36, n.6, p. 811-818, June 2014.
- ALMANGUSH, A. *et al.* Tumour budding in oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis. **British Journal of Cancer**, v.118, n.4, p. 577-586, Feb. 2018.
- AMENDOLA, M. *et al.* Mast cell- targeted strategies in cancer therapy. **Transfusion Medicine and Hemotherapy**, v.43, n.2, p. 109-113, Mar. 2016.
- ANGADI, P.V. *et al.* Tumor budding is an independent prognostic factor for prediction of lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. **International Journal of Surgical Pathology**, v.23, n.2, p. 102-110, Apr. 2015.
- ANURADHA, A. *et al.* Incidence of mast cells in oral squamous cell carcinoma: a short study. **Journal of Oncology**, v.2014, p. 614291, Jan. 2014.
- ATTRAMADAL, C.G. *et al.* Low mast cell density predicts poor prognosis in oral squamous cell carcinoma and reduces survival in head and neck squamous cell carcinoma. **Anticancer Research**, v. 36, n.10, p. 5499-5506, Oct. 2016.
- BÀNKFALVI, A.; PIFFIKÓ, J. Prognostic and predictive factors in oral cancer: the role of the invasive tumour front. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, Oxford, v.29, n.7, p. 291-298, Aug. 2000.
- BASTID, J. EMT in carcinoma progression and dissemination: facts, unanswered questions, and clinical considerations. **Cancer Metastasis Reviews**, v.31, n.1-2, p. 277-283, June 2012.
- BRENER, S. *et al.* Carcinoma de células escamosas bucal: uma revisão de literatura entre o perfil do paciente, estadiamento clínico e tratamento proposto. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v.53, n.1, p. 63-69, 2007.
- BROCKMEYER, P. *et al.* High mast cell density indicates a longer overall survival in oral squamous cell carcinoma. **Scientific Reports**, v.7.n.1, p. 14677, Nov. 2017.
- BRYNE, M. *et al.* Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. **The Journal of Pathology**, v.166, n.4, p. 375-381, Apr. 1992.
- BRYNE, M. Is the invasive front of an oral carcinoma the most important area for prognostication? **Oral Diseases**, v.4, n.2, p. 70-77, June 1998.

CHEMMA, V.S.; RAMESH, V.; BALAMURALI, P.D. The relevance of mast cells in oral squamous cell carcinoma. **Journal of Clinical and Diagnostic Research**, v.6, n.10, p. 1803-1807, Dec. 2012.

DANTAS, R.C.M. *et al.* Evaluation of mast cell density in the tumor microenvironment in oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, v.25, n.10, p. e83-e88, Nov./Dec. 2017.

DISSANAYAKE, U. Malignancy grading of invasive fronts of oral squamous cell carcinomas: Correlation with overall survival. **Translational Research in Oral Oncology**, v.2, p. 1-8, July 2017.

EL-NAGGAR, A.K. *et al.* WHO Classification of Head and Neck Tumours. 4th ed. Lyon, France: IARC Press, 2017.

GADDIKERI, K.; BHORGONDE, D.D. Assessment of role of mast cells in oral squamous cell carcinoma. **Asian Pacific Journal of Health Science**, v.3, n.4S, p. 63-66, 2016.

GAJE, P.N. *et al.* Mast cells: key players in the shadow in oral inflammation and in squamous cell carcinoma of the oral cavity. **BioMed Research International**, v.2016; p. 9235080, Oct. 2016.

GRIZZI, F. *et al.* Tumor budding as a potential histopathological biomarker in colorectal cancer: Hyde or hope? **World Journal of Gastroenterology**, v.18, n.45, p. 6532-6536, Dec. 2012.

GUDISEVA, S. *et al.* The role of mast cells in oral squamous cell carcinoma. **Contemporary Oncology (Pozn)**, v.21, n.1, p. 21-29, Mar. 2017.

HONG, K.O. *et al.* Tumor budding is associated with poor prognosis of oral squamous cell carcinoma and histologically represents an epithelial- mesenchymal transition process. **Human Pathology**, v.80, p. 123-129, Oct. 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA.
Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2016.
Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/estimativa-2016-v11.pdf>.
Acesso em: 20 jun. 2017.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA.
Estimativa 2018: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA, 2018.
Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/estimativa-2018-v12.pdf>.
Acesso em: 20 jan. 2019.

JERJES, W. *et al.* Clinicopathological parameters, recurrence, locoregional and distant metastasis in 115 T1-T2 oral squamous cell carcinoma patients. **Head & Neck Oncology**, v.2, p. 9, Apr. 2010.

KABIRAJ, A. *et al.* Immunohistochemical evaluation of tumor angiogenesis and the role of mast cell in oral squamous cell carcinoma. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v.14, n.3, p. 495-502, Apr./Jun. 2018.

KAMAL, R. *et al.* Mast cells and oral pathologies: a review mast cells and oral pathologies: A Review. **Journal of Natural Science, Biology and Medicine**, v.6, n.1, p. 35-39, Jan./June 2015.

KHALILI, J. Oral cancer: risk factors, prevention and diagnostic. **Experimental Oncology**, v.30, n.4, p. 259-264, Dec. 2008.

KIRITA, T. *et al.* Tumor budding as a useful prognostic indicator in early oral squamous cell carcinoma. **Journal of Cancer Research and Therapeutics**, v.10, n.6, p. 162-167, 2018.

KONG, Y.H. *et al.* Co-expression of TWIST1 and ZEB2 in oral squamous cell carcinoma is associated with poor survival. **PLoS One**, v.10, n.7, p. 1-18, July 2015.

LAISHRAM, D. *et al.* Mast cells and angiogenesis in malignant and premalignant oral lesions: An immunohistochemical study. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, v.21, n.2, p. 229-238, May-Aug. 2017.

MACIEL, T.T.; MOURA, I.C.; HERMINE, O. The role of mast cells in cancers. **F1000Prime Reports**, v.7, n.9, p. 1-6, Jan. 2015.

MARANGON JUNIOR, H. *et al.* Laminin-5 γ 2 chain expression is associated with intensity of tumor *budding* and density of stromal myofibroblasts in oral squamous cell carcinoma. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v.43, n.3, p. 199-204, Mar. 2014.

MARICHAL, T.; TSAI, M.; GALI, S.J. Mast cells: potential positive and negative roles in tumor biology. **Cancer Immunology Research**, v.1, n.5, p. 269-279, Nov. 2013.

MARTÍNEZ, A.M.; BALDIRIS, R.A.; DÍAZ, A.C. Infección por papiloma virus humano y carcinoma escamocelular bucal: diversas técnicas moleculares para detectar su presencia. **Avances en Odontoestomatología**, v.30, n.2, p. 69-78, Mar./Abr. 2014.

NAKANDALA, K.; SURaweera, A.; JAYASOORIYA, P.R. Correlation of elevated mast cell and micro-vessel densities with lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. **Stomatological Disease and Science**, v.2, n.4, p. 1-10, Apr. 2018.

OGBUREKE, K.U.E.; BINGHAM, C. Overview of oral cancer. In: OGBUREKE, K.U.E (Ed.). **Oral cancer**. Croatia: InTech, 2012. Cap. 1, p. 1-20. Available from: <https://www.intechopen.com/books/oral-cancer/overview-of-oral-cancer>. Access in: 12 jul. 2017.

PARIZI, A.C.G. *et al.* Comparação entre a concentração de mastócitos em carcinomas espinocelulares da pele e da cavidade oral. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v.85, n.6, p. 811-818, 2010.

SAXENA, S. *et al.* Evaluating the role of immunological cells (Tissue Eosinophils and Mast Cells) in progression of oral squamous cell carcinoma. **Mymensingh Medical Journal**, v.27, n.2, p. 382-388, Apr. 2018.

SHARMA, B. *et al.* Immunohistochemical evaluation of mast cells and angiogenesis in oral squamous cell carcinoma. **Indian Journal of Dental Research**, v.21, n.2, p. 260-265, July 2010.

SHIMIZU, S. *et al.* Tumor budding is an independent prognostic marker in early stage oral squamous cell carcinoma: With special reference to the mode of invasion and worst pattern of invasion. **PloS One**, v.13, n.4, p. e0195451, Apr. 2019.

WANG, C. *et al.* Tumor budding correlates with poor prognosis and epithelial-mesenchymal transition in tongue squamous cell carcinoma. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, Oxford, v.40, n.7, p. 545-551, Aug. 2011.

WANG, L.M. *et al.* Tumor budding is a strong and reproducible prognostic marker in T3N0 colorectal cancer. **The American Journal of Surgical Pathology**, v.33, n.1, p. 134-141, Jan. 2009.

WARNAKULASURIYA, S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. **Oral Oncology**, v.45, n.4-5, p. 309-316, Apr./May 2009.

XIE, N. *et al.* Tumor budding correlates with occult cervical lymph node metastasis and poor prognosis in clinical early-stage tongue squamous cell carcinoma. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v.44, n.4, p. 266-272, Apr. 2015.

ZAID, M.A.; MALLICK, A.K. A study on assessment of mast cells in oral squamous cell carcinoma. **Annals of Medical and Health Sciences Research**, v.4, n.3, p. 457-460, May/June 2014.

ANEXO A – Parecer Consubstanciado do CEP PUC Minas

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DE MINAS GERAIS -
PUCMG



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: AVALIAÇÃO DA INTENSIDADE DE BUDDING TUMORAL, DA DENSIDADE DE MASTÓCITOS E DA DENSIDADE DE EOSINÓFILOS EM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE BOCA

Pesquisador: Martinho Campolina Rebello Horta

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 01459518.9.0000.5137

Instituição Proponente: Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais - PUCMG

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.002.186

Apresentação do Projeto:

O carcinoma de células escamosas de boca (CCEB) é a neoplasia epitelial maligna mais comum da cavidade oral, estando associado a altos índices de morbidade e mortalidade. Budding tumoral é um marcador morfológico de prognóstico definido como a presença de células neoplásicas isoladas. Serão selecionadas 150 amostras de CCEB provenientes do Serviço de Patologia Bucal do Departamento de Odontologia da PUC Minas, armazenadas em blocos de parafina.

Objetivo da Pesquisa:

- Avaliar a existência de associação entre a intensidade de budding tumoral, a densidade de mastócitos e a densidade de eosinófilos em CCEB. Adicionalmente, em tumores com alta intensidade de budding tumoral, será investigada a presença de diferenças na densidade de mastócitos e na densidade de eosinófilos entre a área do budding e a área fora do budding.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Riscos: Não há riscos. O projeto de pesquisa utilizará material de arquivo do Laboratório de Patologia Bucal do Departamento de Odontologia da PUC Minas (fichas de biópsia e blocos de parafina).

Benefícios: Um impacto muito relevante do conhecimento gerado a partir de estudos desse tema, com benefícios diretos aos pacientes, é a possibilidade da utilização da avaliação do budding

Endereço: Av. Dom José Gaspar, 500 - Prédio 03, sala 228

Bairro: Coração Eucarístico

CEP: 30.535-901

UF: MG

Município: BELO HORIZONTE

Telefone: (31)3319-4517

Fax: (31)3319-4517

E-mail: cep.proppg@pucminas.br

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DE MINAS GERAIS -
PUCMG**



Continuação do Parecer: 3.002.186

tumoral como um procedimento de rotina para a determinação do prognóstico dessa doença.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto não apresenta impedimentos de natureza ética. Foi solicitada dispensa do TCLE por se tratar de material proveniente de arquivo do Laboratório de Patologia Bucal do Departamento de Odontologia da PUC Minas (fichas de biópsia e blocos de parafina).

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos de apresentação obrigatória foram anexados e estão de acordo com as normas vigentes.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Sem pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1240370.pdf	17/10/2018 15:50:40		Aceito
Outros	TermoCompromisso1.pdf	17/10/2018 15:49:34	Martinho Campolina Rebello Horta	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto.pdf	17/10/2018 15:47:30	Martinho Campolina Rebello Horta	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	JustificativaTCLE.pdf	17/10/2018 15:44:08	Martinho Campolina Rebello Horta	Aceito
Folha de Rosto	FolhaRosto.pdf	17/10/2018 15:43:18	Martinho Campolina Rebello Horta	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Avaliação da CONEP:

Não

Endereço: Av. Dom José Gaspar, 500 - Prédio 03, sala 228
Bairro: Coração Eucarístico **CEP:** 30.535-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3319-4517 **Fax:** (31)3319-4517 **E-mail:** cep.proppg@pucminas.br

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE
CATÓLICA DE MINAS GERAIS -
PUCMG



Continuação do Parecer: 3.002.186

BELO HORIZONTE, 06 de Novembro de 2018

Assinado por:
CRISTIANA LEITE CARVALHO
(Coordenador(a))

Endereço: Av. Dom José Gaspar, 500 - Prédio 03, sala 228
Bairro: Coração Eucarístico **CEP:** 30.535-901
UF: MG **Município:** BELO HORIZONTE
Telefone: (31)3319-4517 **Fax:** (31)3319-4517 **E-mail:** cep.propg@pucminas.br