

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA**  
**FACULDADE DE ODONTOLOGIA**  
**PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**Daniella Guedes de Figueiredo Lopes**

**Microarquitetura cortical e expressão gênica de RANK, RANKL, OPG e SOST  
na mandíbula: influência na sobrevida global de pacientes com carcinoma  
epidermóide oral submetidos à mandibulectomia**

Juiz de Fora  
2022

**Daniella Guedes de Figueiredo Lopes**

**Microarquitetura cortical e expressão gênica de RANK, RANKL, OPG e SOST  
na mandíbula: influência na sobrevida global de pacientes com carcinoma  
epidermóide oral submetidos à mandibulectomia**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Clínica Odontológica, da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Clínica Odontológica. Área de concentração em Clínica Odontológica.

Orientador: Prof. Dr. Gustavo Davi Rabelo

Coorientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>: Neuza Maria Souza Picorelli Assis

Juiz de Fora

2022

Lopes, Daniella Guedes de Figueiredo.

Microarquitetura cortical mandibular e expressão gênica de RANK, RANKL, OPG e SOST : influência na sobrevida global de pacientes com carcinoma epidermóide oral submetidos a mandibulectomia / Daniella Guedes de Figueiredo Lopes. -- 2022. 92 f.

Orientador: Gustavo Davi Rabelo

Coorientadora: Neuza Maria Souza Picorelli Assis

Dissertação (mestrado acadêmico) - Universidade Federal de Juiz de Fora, Faculdade de Odontologia. Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica, 2022.

1. Osso. 2. Carcinoma. 3. Sobrevida. I. Rabelo, Gustavo Davi, orient. II. Assis, Neuza Maria Souza Picorelli , coorient. III. Título.

**Daniella Guedes de Figueiredo Lopes**

**Microarquitetura cortical e expressão gênica de RANK, RANKL, OPG e SOST na mandíbula: influência na sobrevivência global de pacientes com carcinoma epidermóide oral submetidos à mandibulectomia**

**Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal de Juiz de Fora como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Clínica Odontológica. Área de concentração: Clínica Odontológica**

**Aprovada em 17/08/2022.**

**BANCA EXAMINADORA**

**Prof. Dr. Gustavo Davi Rabelo** - Orientador  
Universidade Federal de Santa Catarina

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Neuza Maria Souza Picorelli Assis** - Coorientadora  
Universidade Federal de Juiz de Fora

**Prof. Dr. Matheus Furtado de Carvalho**  
Universidade Federal de Juiz de Fora

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Cláudia Malheiros Coutinho Camillo**  
Centro Internacional de Pesquisa (CIPE)/AC Camargo

**Juiz de Fora, 29/07/2022.**



Documento assinado eletronicamente por Gustavo Davi Rabelo, Usuário Externo, em 17/08/2022, às 15:47, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Neuza Maria Souza Picorelli Assis, Professor(a), em 17/08/2022, às 15:49, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Matheus Furtado de Carvalho, Professor(a), em 17/08/2022, às 15:50, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



Documento assinado eletronicamente por Cláudia Malheiros Coutinho Camillo, Usuário Externo, em 17/08/2022, às 15:52, conforme horário oficial de Brasília, com fundamento no § 3º do art. 4º do [Decreto nº 10.543, de 13 de novembro de 2020](#).



A autenticidade deste documento pode ser conferida no Portal do SEI-Ufjf ([www2.ufjf.br/SEI](http://www2.ufjf.br/SEI)) através do ícone Conferência de Documentos, informando o código verificador 0887422 e o código CRC 55251AA9.

Dedico esse trabalho a todos pacientes que necessitam da descoberta de alternativas de tratamento ou cura, para desfrutar de uma melhor qualidade de vida.

Dedico também ao SUS, à ciência, a pesquisa e a todos aqueles que mesmo no caos do mundo, não medem esforços para ajudar ao próximo.

## **AGRADECIMENTOS**

Agradeço primeiramente a Deus, por sempre guiar meus passos e fornecer tudo que eu preciso para meu desenvolvimento moral e espiritual.

À minha amada irmã Vitória portadora de uma imensa sabedoria e maturidade, que sempre me apoia e orienta em minhas decisões. Aos meus pais, principalmente minha mãe Ana Paula, minha melhor amiga, que não mede esforços para me apoiar e ajudar em minhas escolhas.

Ao meu orientador Dr. Gustavo Davi Rabelo, com toda sua proatividade, me proporcionou a oportunidade de expandir meus conhecimentos sobre pesquisa e se empenhou muito em me auxiliar a desenvolver um trabalho de qualidade, além de ser um excelente ser humano e profissional brilhante, ao qual tenho profunda admiração, carinho e gratidão.

À minha coorientadora professora Dr<sup>a</sup>. Neuza Maria Souza Picorelli Assis, atenciosa, carinhosa, humana e extremamente competente no âmbito profissional.

Às instituições onde o estudo foi realizado: Universidade Federal de Juiz de Fora, AC Camargo Cancer Center, CIPE e University Medical Center Hamburg-Eppendorf, por permitirem o desenvolvimento do projeto.

Ao Prof. Dr. Eduardo Machado Vilela, por toda proatividade em auxiliar em minhas dúvidas e por permitir que os pacientes do projeto de extensão LAPCAB – Liga Acadêmica de Prevenção ao Câncer de Boca, da Faculdade de Odontologia da UFJF participassem do projeto que seria desenvolvido.

Aos membros do projeto de extensão SECO - Serviço Especializado de Cirurgia Oral, juntamente com a professora Dr<sup>a</sup>. Neuza, coordenadora do projeto, que permitiu a realização de coletas para execução do projeto anterior.

À professora Dr<sup>a</sup>. Karina Lopes Devito por sua prontidão em ajudar sempre que necessário.

À Prof. Dr<sup>a</sup>. Maria Inês da Cruz Campos, por tanto empenho e disposição em auxiliar na realização do estudo.

Aos professores Dr. Breno Nogueira Silva e Matheus Furtado De Carvalho, pela dedicação em ajudar.

Aos membros da instituição coparticipante do estudo, o AC Camargo Cancer Center, nos nomes dos professores Dr. Fabio de Abreu Alves e Dr. Luiz Paulo

Kowalski, por permitirem o desenvolvimento do estudo em questão e proporcionarem a colaboração entre as instituições.

A Doutora Erica Patricio da Silva, por permitir a continuação do estudo e pela solicitude e carinho em me ajudar no desenvolvimento do projeto.

A Doutora Claudia Camilo Coutinho, do Centro Internacional de Pesquisa do AC Camargo Cancer Center, por toda atenção, carinho e proatividade em ensinar, que me deu uma oportunidade incrível em desenvolver um projeto de qualidade, sendo essencial para o desenvolvimento do estudo.

A Katia Klug Oliveira que me acolheu com carinho e atenção, sempre foi muito prestativa em me ensinar a aplicação das técnicas e me auxiliar com minhas dúvidas.

Aos membros do laboratório de Osteologia e Biomecânica da University Medical Center Hamburg-Eppendorf, na cidade de Hamburgo, na Alemanha, os pesquisadores Dr. Björn Busse e Dr<sup>a</sup>. Katharina Jähn, por permitirem a realização da microtomografia.

As minhas queridas amigas Márcia, Jussara, Rayla e Lídia, por todo carinho, companheirismo e prontidão em me ajudar, que foram de suma importância para essa conquista.

Aos meus atuais colegas de profissão, Yuri e Matheus que sempre foram muito atenciosos e proativos em ajudar.

Aos meus amigos de longa data, que sempre me apoiaram, incentivaram e acreditaram no meu potencial, em especial, ao Chin chin, meu irmão de coração.

Ao Raphael, pela paciência, companheirismo e por me incentivar a realizar meus sonhos.

Ao Adriano, pela amizade, por passar pelos perrengues comigo, pela parceria e por contribuir no meu desenvolvimento profissional.

À Valéria de Vasconcellos, Letícia Barbosa Gonçalves e Cláudio Leite da Silva Júnior, por toda paciência, foram muito solícitos em ajudar no que fosse necessário para o caminhar do curso e desenvolvimento do projeto.

Aos funcionários da Universidade, por sempre me receberem de forma carinhosa e solícita.

Ao Mazinho, por toda proatividade e empenho para realização da metodologia de inclusão das amostras do projeto que seria realizado.

Ao Juracy, que me permitiu realizar a aquisição das radiografias periapicais em sua clínica, diante da alteração da dissertação, devido a pandemia da COVID 19.

Aos professores não citados que contribuíram de forma fundamental para o aprimoramento da prática docente.

Aos alunos com quem tive a oportunidade de ensinar e aprender.

Aos pacientes que participaram do estudo e àqueles que fizeram parte de minha formação docente.

A todos aqueles que não foram citados e que passaram por minha vida, contribuindo para meu desenvolvimento profissional e pessoal.

"Que nada nos defina, que nada nos sujeite. Que a liberdade seja a nossa própria substância, já que viver é ser livre." - Simone de Beauvoir

## RESUMO

O carcinoma epidermóide oral (CEO) é a neoplasia maligna que compreende cerca de 90% dos cânceres da cavidade bucal. Sua interação com o microambiente se dá por meio de vários mecanismos moleculares, incluindo o *crosstalk* entre osso e lesão. No osso, genes importantes relacionados ao metabolismo compreendem o sistema RANK/RANKL/OPG e o gene SOST, que codifica para expressão da Esclerostina. Na relação osso e neoplasia, sabe-se que o envolvimento e a invasão óssea estão relacionados com o prognóstico e sobrevida dos indivíduos com câncer de boca. Nesse sentido, o objetivo deste estudo foi avaliar a expressão de genes envolvidos no processo de remodelação óssea da mandíbula de pacientes com CEO, além de avaliar parâmetros microarquiteturais da cortical óssea, e a influência destes achados na sobrevida global dos pacientes, ainda, estimar o papel destas variáveis sobre o risco de óbito. Foram incluídos no estudo 24 pacientes submetidos à mandibulectomia, sendo coletados dois fragmentos ósseos da peça cirúrgica: um para análise da expressão gênica, por meio de PCR quantitativa em tempo real (qPCR) e o outro que foi incluído em metilmetacrilato para realização de microtomografia computadorizada ( $\mu$ CT, Scanco MicroCT40, 55 kVp, 144  $\mu$ A), com voxel isotrópico de 19  $\mu$ m. Na  $\mu$ CT foram avaliados os seguintes parâmetros na cortical: volume ósseo (VO, %), superfície óssea (SO,  $\mu$ m), porosidade (PC, %), número de poros (NP, n), densidade mineral óssea (DMO, g/cm<sup>3</sup> HA) e dimensão fractal (DF, #). Aplicou-se estimador Kaplan-Meier para avaliação da sobrevida, e nas variáveis quantitativas aplicou-se a Regressão de Cox simples. Houve predominância de pacientes do sexo masculino (70,8%) e a média de idade foi de 59,71 anos (mediana de 62 anos). Tumores moderadamente diferenciados foram diagnosticados em 75% dos casos. A invasão óssea foi identificada em 33,3% dos casos. Os genes RANK, RANKL e SOST estavam downregulados em sua maioria (casos com invasão óssea: 25 situações de downregulação e 3 de expressão normal; casos sem invasão foram 38 situações em downregulação e 6 em normalidade), enquanto osteoprotegerina (OPG) apresentou 100% dos casos downregulados. Não houve nenhum caso de superexpressão nos genes analisados. Sobre os parâmetros microarquiteturais, a média da PC foi de 3,28% ( $\pm$ 4,18), a média de NP foi de 39, da DMO foi de 1,07 g/cm<sup>3</sup> HA e a média da DF foi de 1,20. Idade (p 0,01) e tamanho do tumor (p 0,01) apresentaram influência na sobrevida

global. Existe maior risco de óbito para pacientes menores de 56 anos de idade (risco 11,3 vezes maior, p 0,04) e tumores maiores que 6 cm (risco 7,5 vezes maior, p 0,02). Conclui-se que o comportamento de downregulação predominante no osso mandibular sugere uma inércia metabólica óssea parcial próxima à neoplasia em termos de expressão gênica, e estes não influenciam na sobrevida global. A OPG está totalmente subexpressa no osso próximo ao Carcinoma epidermóide. Em relação à sobrevida global dos pacientes com CEO submetidos à mandibulectomia, evidenciou-se que indivíduos abaixo dos 56 anos e com tumores maiores que seis cm apresentaram maior risco de óbito.

Palavras-chave: Carcinoma oral, RANK, RANKL, OPG, Esclerostina, biomarcadores ósseos, sobrevida global.

## ABSTRACT

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is a malignant neoplasm that comprises about 90% of malign lesions of the oral cavity. Lesion interaction with microenvironment occurs through several molecular mechanisms, including the crosstalk between bone and tumor. Regarding the bone, metabolism-related genes expression, including RANK/RANKL/OPG and SOST, is probably altered. Bone involvement and invasion are related to the prognosis and survival rates. In this way, the aim of this study was to evaluate the expression of genes involved bone remodeling process in the mandible of patients diagnosed with OSCC, together with the evaluation of microarchitectural parameters in the cortex, and their influence on prognosis. Twenty-four patients who underwent mandibulectomy were included in the study, and two bone fragments were collected from the surgical specimen: one for gene expression analysis by means of quantitative real-time PCR (qPCR), and the other that was included in methyl methacrylate for Microtomography evaluation ( $\mu$ CT, 19  $\mu$ m isotropic voxel, Scanco MicroCT40, 55 kVp, 144  $\mu$ A). The following cortical parameters were evaluated: bone volume (BV, %), bone surface (BS,  $\mu$ m), porosity (Po, %), number of pores (NP, n), bone mineral density (BMD, g/cm<sup>3</sup> HA) and fractal dimension (FD, #). A Kaplan-Meier estimator was used to assess survival, and simple Cox regression was applied to quantitative variables. There was a predominance of male patients (70.8%) and the mean age was 59.71 years (median of 62 years). Moderately differentiated tumors were diagnosed in 75% of cases. The bone invasion was identified in 33.3% of the cases. RANK, RANKL, and SOST genes were mostly downregulated (cases with bone invasion: 25 situations of downregulation and 3 of normal expression; cases without invasion were 38 situations in downregulation and 6 in normality), while OPG presented 100% of downregulation. There were no cases of overexpression. Regarding microarchitectural parameters, the mean Po was 3.28% ( $\pm$ 4.18), NP was 39, BMD was 1.07 g/cm<sup>3</sup> HA, and FD was 1.20. Overall survival analysis revealed that the variables age (p 0.01) and tumor size (p 0.01) were statistically significant. There is a higher risk of death for patients younger than 56 years of age (11.3 times greater risk) and for tumors larger than 6 cm (7.5 times greater risk). In conclusion, there is a predominant gene downregulation in the mandibular bone, suggesting a partial bone metabolic inertia in the proximity of the OSCC lesion. Gene expression was not

influential on overall survival. Osteoprotegerin was downregulated in 100% of the cases. Overall survival rates of OSCC patients submitted to mandibulectomy were negatively influenced for individuals under 56 years of age and for tumors larger than 6 cm.

**Keywords:** squamous cell carcinoma, RANK, RANKL, OPG, sclerostin, bone biomarkers, overall survival.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- Figura 1 - Interação entre metabolismo e os genes envolvidos no processo de remodelamento ósseo. 20
- Figura 2 - Mecanismo de ação da via WNT/ $\beta$  – Catenina no metabolismo ósseo. 21
- Figura 3 - Produto de pelveglossomandibulectomia + ECSHO direito. 25
- Figura 4 - Avaliação macroscópica da peça cirúrgica da ressecção do CEC incluindo mandibulectomia marginal à esquerda, ampliada para musculatura digástrico milo-hióideo e com esvaziamento cervical níveis IA e III. 34
- Figura 5 - Peça cirúrgica onde foi realizada ressecção ampla de neoplasia. 35
- Figura 6 - Peça cirúrgica resultante de produto de pelveglossomandibulectomia de ramo ascendente a direita até ramo horizontal a esquerda concomitante a esvaziamento cervical supraomo-hióideo bilateral. 35
- Figura 7 - Síntese de cDNA. 37
- Figura 8 - Applied Biosystems 7900HT. Interface do software do sistema RT-qPCR – Placa 1. **A:** Poços contendo os genes avaliados. **B:** Em amarelo os genes dos endógenos de GAPDH. **C:** Endógeno GAPDH. 38
- Figura 9 - Applied Biosystems 7900HT. Interface do software do sistema RT-qPCR – Teste de GAPDH. **A:** Poços com os endógenos de GAPDH avaliados. **B:** Em verde, endógenos do pool de células da mucosa. **C:** Curva de amplificação dos endógenos do pool de células da mucosa. 39
- Figura 10 - Applied Biosystems 7900HT. Interface do software do sistema RT-qPCR – Teste 1 de endógenos. **A:** Poços referentes aos endógenos 18s e b2m. **B:** Curva de amplificação indicando contaminação dos assays. 40
- Figura 11 - Applied Biosystems 7900HT. Interface do software do sistema RT-qPCR – Teste 2 de endógenos. **A:** Poços dos genes 18s e b2m. **B:** NTCs para 18s e b2m. **C:** Gráfico sem amplificação, indicando que os genes não estão contaminados. 40

- Figura 12 - Applied Biosystems 7900HT. Interface do software do sistema RT- 41  
qPCR – Seleção do endógeno. **A:** Poços com os genes avaliados.  
**B:** Endógenos 18s e b2m. **C:** Curva de amplificação para os  
endógenos. A primeira curva refere-se ao gene b2m.
- Figura 13 - Applied Biosystems 7900HT. Interface do software do sistema RT- 42  
qPCR – Amplificação para  $\beta$ -2-microglobulina. **A:** Poços das  
amostras ósseas. **B:** Endógenos b2m. **C:** Curva de amplificação de  
b2m.
- Gráfico 1 - Sobrevida em meses representada pela linha azul. Eixo X: tempo 46  
de acompanhamento (Follow-up) em meses.
- Gráfico 2 - Curva de sobrevivência associada ao sexo. Linha azul para o sexo 46  
feminino e linha vermelha para o sexo masculino. Eixo X: tempo de  
acompanhamento (Follow-up) em meses.
- Gráfico 3 - Sobrevida associada ao grau de diferenciação. A linha azul 47  
representa tumores com grau de diferenciação moderado, linha  
vermelha para tumores pouco diferenciados e a verde se refere a  
tumores muito diferenciados. Eixo X: tempo de acompanhamento  
(Follow-up) em meses.
- Gráfico 4 - Função de sobrevivência relacionada ao sítio de acometimento 47  
mandibular. Linha azul para o sítio anterior e linha vermelha para o  
sítio posterior. Eixo X: tempo de acompanhamento (Follow-up) em  
meses.
- Gráfico 5 - Sobrevida relacionada ao acometimento tumoral agrupando os 48  
sítios específicos. A linha azul descreve as regiões de assoalho de  
boca e língua e a linha vermelha representa a área retromolar e de  
gengiva. O eixo X representa de acompanhamento (Follow-up) em  
meses.
- Gráfico 6 - Sobrevida relacionada a invasão óssea. A linha vermelha 48  
representa os casos em que houve invasão óssea e a linha azul se  
refere aos casos onde não ocorreu invasão óssea. O tempo de  
acompanhamento (Follow-up) é dado pelo eixo X, em meses.
- Gráfico 7 - Sobrevida relacionada a invasão muscular esquelética. A linha azul 49  
se refere aos casos em que não ocorreu invasão muscular  
esquelética e a linha vermelha representa os casos em que houve

invasão muscular esquelética. O tempo de acompanhamento (Follow-up), em meses, é representado no eixo X.

- Gráfico 8 - Função de sobrevivência para idade. A linha em vermelho se refere 50 a indivíduos com idade maior que 56 anos e a curva azul caracteriza amostras de pacientes com até 56 anos de idade. O eixo X representa, em meses, o acompanhamento (Follow-Up) da condição de sobrevida dos pacientes.
- Gráfico 9 - Função de sobrevivência para tamanho do tumor. A linha azul se 50 refere a tumores de até 6 cm e a linha vermelha representa tumores maiores que 6 cm. O tempo de acompanhamento (Follow-Up) é visto no eixo X, em meses.
- Gráfico 10 - Situação da expressão gênica para RANK, RANKL, OPG e o gene 51 SOST (Esclerostina).
- Gráfico 11 - Função de sobrevivência para RANK. A linha azul representa o 53 gene RANK expresso em situação de downregulação e a linha vermelha representa o gene em situação de expressão normal. O de acompanhamento (Follow-up) é representado em meses pelo eixo X.
- Gráfico 12 - Função de sobrevivência para RANKL. A linha em vermelho 54 representa a expressão de RANKL normal e a linha azul representa o gene expresso em downregulação. O acompanhamento (Follow-up) é dado em meses no eixo X.
- Gráfico 13 - Função de sobrevivência para OPG. A linha azul representa a 55 situação gênica de downregulação em todos os casos. O eixo X se refere ao acompanhamento (Follow-Up), dado em meses.
- Gráfico 14 - Função de sobrevivência para Esclerostina. A linha azul representa 56 a situação do gene SOST em downregulação e a linha vermelha representa o gene SOST em expressão normal. O eixo X caracteriza o tempo de acompanhamento (Follow-Up), em meses.
- Gráfico 15 - Função de sobrevivência para volume ósseo. A linha em vermelho 57 representa os casos em que o volume ósseo foi maior que 96,67% e a linha azul se refere os casos em que o volume ósseo foi de até 96,67%.

- Gráfico 16 - Função de sobrevivência para superfície óssea. A linha vermelha 57 se refere a amostras que apresentaram superfície óssea de área maior que 0.0042 mm e a azul representa amostras com até 0,0042 mm de superfície óssea. O eixo X representa o acompanhamento (Follow-Up), em meses.
- Gráfico 17 - Função de sobrevivência para o grau de anisotropia. A linha azul 58 representa os casos em que o grau de anisotropia foi de até 0,83 e a linha vermelha se refere àqueles em que foi maior que 0,83. O acompanhamento (Follow-Up) foi realizado em meses, representado pelo eixo X. O eixo X representa o acompanhamento (Follow-Up), em meses.
- Gráfico 18 - Função de sobrevivência para porosidade cortical. A linha azul 59 representa os casos em que a porosidade cortical foi de até 2,26 e a linha vermelha se refere aos casos que ultrapassaram tal valor. O eixo X caracteriza o acompanhamento (Follow-Up), em meses.
- Gráfico 19 - Função de sobrevivência para número de canais. A linha azul 59 representa os casos com até 32 canais e a linha vermelha se refere aos casos em que as amostras apresentaram mais de 32 canais. O eixo X representa o acompanhamento (Follow-Up), em meses.
- Gráfico 20 - Função de sobrevivência para densidade mineral óssea. A linha em 60 azul representa os casos em que a densidade mineral óssea foi de até 1,09 g/cm<sup>3</sup> HA e as em vermelho se refere aos casos em que esse valor foi ultrapassado. O eixo X representa o acompanhamento (Follow-Up), em meses.
- Gráfico 21 - Função de sobrevivência para dimensão fractal. A linha azul 61 representa os casos em que a dimensão fractal foi de até 1,09 e a linha vermelha representa os casos em que tal parâmetro foi superior a esse valor. O eixo X caracteriza o acompanhamento (Follow-Up), em meses.

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1	- Sequência de nucleotídeos dos genes estudados.	38
Tabela 2	- Valores de p com significância estatística e valores que apresentam uma tendência em possuir significância estatística e risco relativo na comparação das curvas, relacionadas a sobrevida global.	49
Tabela 3	- Invasão óssea para os genes RANK, RANKL, OPG e SOST (Esclerostina)	51
Tabela 4	- Situação da expressão de RANK.	52
Tabela 5	- Situação da expressão de RANKL.	52
Tabela 6	- Situação da expressão OPG.	52
Tabela 7	- Situação da expressão do SOST.	53
Tabela 8	- Situação da expressão gênica para OPG.	54
Tabela 9	- Situação da expressão gênica para SOST (Esclerostina).	55
Tabela 10	- Parâmetros microarquiteturais ósseos.	56
Tabela 11	- Comparação da microarquitetura cortical entre os casos com invasão óssea e sem invasão óssea.	57

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

A	Grau de Anisotropia
AJCC	American Joint Committee on Cancer
B2M	$\beta$ -2-microglobulina
CD	Células Dendríticas
cDNA	DNA complementar
CE	Carcinoma Epidermóide
CEC	Carcinoma espinocelular, sinônimo de Carcinoma Epidermóide
CEO	Carcinoma epidermóide oral
DF	Dimensão Fractal
DMO	Densidade Mineral Óssea
DNA	Ácido Desoxirribonucleico
EC	Esvaziamento cervical
EGFR	Receptor do fator de crescimento epidérmico
GAPDH	gliceraldeído 3- fosfato desidrogenase
H&E	Hematoxilina e Eosina
HA	Hidroxiapatita
HPV	Papilomavírus humano
INCA	Instituto nacional de câncer
NC	Números de Canais
NF- $\kappa$ B	Fator nuclear kappa B
OMS	Organização Mundial da Saúde

OPG	Osteoprotegerina
PC	Porosidade cortical
PCR	Reação em cadeia da polimerase
PET-CT	Positron Emission Tomography - Computed Tomography (Tomografia por emissão de Pósitrons)
PTHrP	Proteína relacionada ao paratormônio
QR	Quimiorradiação
RANK	Receptor ativador do fator nuclear kappa B
RANKL	Ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B
RNA	Ácido Ribonucleico
RT-qPCR	PCR quantitativa em tempo real
SC	Sobrevida condicional
SG	Sobrevida global
SO	Superfície Óssea
TBP	TATA-binding protein
TCR	Receptor de Células T
TNF	Fator De Necrose Tumoral
TNF $\alpha$	Fator de necrose tumoral alfa
TNM	Estadiamento tumoral (T: Tamanho; N:Linfonodos Comprometidos; M:Metástase)
TRAF	TNF receptor-associated fator
UICC	Union for International Cancer Control
VO	Volume Ósseo

Wnt           Wingless – Via De Sinalização

TRAIL        Ligante do fator de necrose tumoral

## LISTA DE SÍMBOLOS

~	Aproximadamente
%	Porcentagem
ng	Nanograma
μL	Microlitro
®	Marca registrada
nm	Nanômetro
μm	Micrómetro
°C	Escala CELSIUS
°	Graus

## SUMÁRIO

<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	19
<b>2 REVISÃO DE LITERATURA</b> .....	22
2.1 CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL E A INVASÃO MANDIBULAR.....	22
2.2 INVASÃO MANDIBULAR E SOBREVIVÊNCIA.....	26
2.3 SISTEMA RANK, RANKL, OPG, ESCLEROSTINA E INVASÃO ÓSSEA.....	28
<b>3 OBJETIVO</b> .....	31
3.1 OBJETIVO GERAL.....	31
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS.....	31
<b>4 MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	32
4.1 CASUÍSTICA.....	32
<b>4.1.1 Critérios de inclusão</b> .....	33
<b>4.1.2 Critérios de exclusão</b> .....	33
4.2 AMOSTRAS.....	33
<b>4.2.1 Etapa Clínica</b> .....	33
<b>4.2.2 Etapas Laboratoriais</b> .....	36
4.2.2.1 <i>Extração do RNA Total</i> .....	36
4.2.2.2 <i>Síntese de cDNA</i> .....	36
4.2.2.3 <i>Amplificação por PCR Quantitativa em Tempo Real (qPCR)</i> .....	37
4.2.2.4 <i>Critérios para a categorização dos genes avaliados</i> .....	42
<b>4.2.3 Microtomografia</b> .....	<b>42</b>
4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA .....	44
<b>5 RESULTADOS</b> .....	45
5.1 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS E SOBREVIVÊNCIA.....	45
5.2 EXPRESSÃO GÊNICA E SOBREVIVÊNCIA.....	51
5.3 MICROTOMOGRÁFIA E ANÁLISE DA SOBREVIVÊNCIA.....	56
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	61
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	66
<b>REFERÊNCIAS</b> .....	67
<b>ANEXOS A – PARECER CONSUBSTANCIADO DA UNIVERSIDADE FEDERAL DE JUIZ DE FORA</b> .....	78
<b>ANEXOS B – PARECER CONSUBSTANCIADO DO AC CAMARGO CANCER CENTER</b> .....	83

## 1 INTRODUÇÃO

O carcinoma epidermóide oral (CEO), também chamado carcinoma espinocelular (CEC), define um grupo de tumores malignos sólidos originados da mucosa do trato aerodigestivo superior, faringe, laringe, boca e cavidade nasal. Apresenta comportamento invasivo, por vezes com evolução metastática e mau prognóstico, sendo o sexto câncer mais comum no mundo, com 600.000 novos casos notificados a cada ano (PORCHERI; MEISEL; MITSIADIS, 2019) e representando mais de 95% dos cânceres da cavidade oral e orofaringe (PATASZ et al., 2017).

No microambiente tumoral, o CEO pode afetar diretamente o osso e a invasão óssea apresenta implicações importantes no estadiamento do tumor, na escolha do tratamento, no desfecho e na qualidade de vida do paciente (VAASSEN; SPEEL; KESSLER, 2017). Conforme cresce, o tumor invade os tecidos circundantes e pode penetrar no osso, caracterizando a invasão. Sabidamente, a presença de invasão óssea piora o prognóstico e avança o estágio do tumor (VAASSEN; SPEEL; KESSLER, 2017). O mecanismo celular pelo qual o CEO invade o osso subjacente permanece incerto, dificultando o desenvolvimento de estratégias de melhoria no tratamento. A compreensão desses mecanismos é essencial para minimizar a disseminação da lesão e auxiliar no planejamento cirúrgico com maior precisão do prognóstico (SINGH et al., 2019).

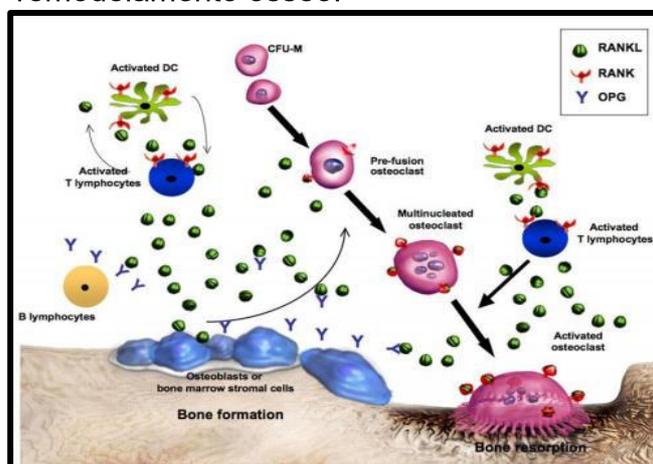
Em uma revisão de literatura, Vaassen et al. (2017) sugeriram que a ativação dos osteoclastos que ocorre posterior à osteoclastogênese é o fator de maior importância para a reabsorção óssea na invasão pelo CEO (CROCKETT et al., 2011; DOUGALL, 2007; JIMI et al., 2011; JOHNSON et al., 2013; JONES; GLIMCHER; ALIPRANTIS, 2011).

O tratamento do CEO deve ser planejado almejando um melhor prognóstico e uma das ferramentas para esse planejamento seria a avaliação do sistema de estadiamento TMN (T: Tamanho; N: Linfonodos Comprometidos; M: Metástase), que se caracteriza como uma classificação anatômica que auxilia na escolha da melhor abordagem terapêutica. Tal sistema foi complementado em sua 8ª edição, pelo AJCC / UICC 2017, incluindo novas considerações de estágio da doença HPV e introduziu duas características histológicas principais no estadiamento T e N (AMIN et al., 2017; DOLENS et al., 2021; HUANG; O'SULLIVAN, 2017). A base de tratamento para o CEO consiste em abordagem cirúrgica (MAHAJAN et al., 2022), e pode ser adotada uma

conduta multimodal, consistindo em cirurgia seguida de adjuvância, podendo ser quimioterapia, radioterapia ou imunoterapia (DOLENS et al., 2021; GOU et al., 2018; JOHNSON et al., 2020).

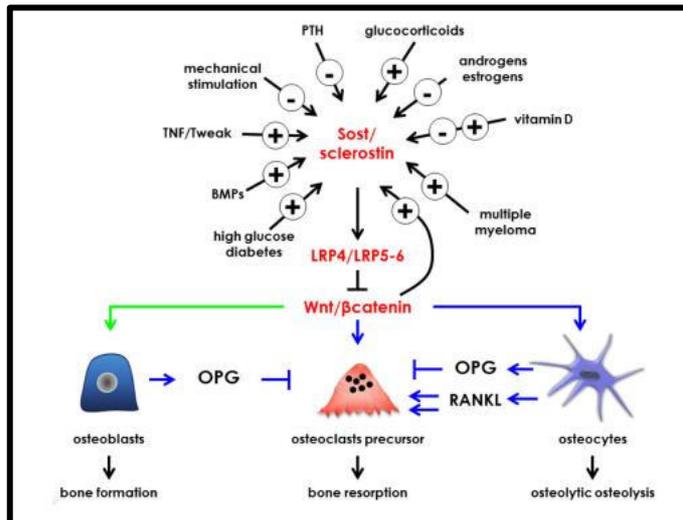
No que se refere à terapêutica cirúrgica, a mandibulectomia se configura como uma abordagem com algumas indicações, dentre elas a remoção do osso invadido. Para além da remoção do osso comprometido, pouco se sabe sobre a interação entre osso e neoplasia e se existe influência do osso e do seu metabolismo nos mecanismos de facilitação e propagação tumoral. A remodelação óssea envolve eventos sequenciais pela reabsorção osteoclasto-mediada e formação osteoblasto-mediada no mesmo sítio. Seu principal objetivo é reparar microdanos e renovar o esqueleto (GASSER; KNEISSEL, 2017). Estudos demonstraram que o sistema composto pelo receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANK), o ligante do receptor ativador do fator nuclear kappa B (RANKL), o membro da superfamília 11B do receptor do fator de necrose tumoral (Osteoprotegerina, OPG) e a proteína codificada pelo gene SOST, Esclerostina, apresentam um papel essencial na remodelação óssea e no sistema imunológico (MING; CRONIN; PENNINGER, 2020). A ativação do receptor do ligante NF- $\kappa$ B (RANK), RANKL, induz a diferenciação de osteoclastos. A OPG inibe a osteoclastogênese (ONO et al., 2020). Além disso, a Esclerostina, um antagonista solúvel da sinalização da via Wnt /  $\beta$ -catenina, secretada principalmente pelos osteócitos, desempenha um papel essencial na biologia dos osteoblastos e osteoclastos nas superfícies ósseas (WANG; MAZUR; WEIN, 2021).

**Figura 1:** Interação entre metabolismo e os genes envolvidos no processo de remodelamento ósseo.



**Fonte:** Adaptado de Ramadan et al.(2020)

**Figura 2:** Mecanismo de ação da via WNT/ $\beta$  – Catenina no metabolismo ósseo.



**Fonte:** Delgado-Calle, Sato e Bellido (2017)

Sobre essa interação do osso com a neoplasia, um estudo pioneiro realizou a correlação entre parâmetros microarquiteturais e análise de expressão gênica de genes do osteometabolismo e descobriu que o córtex da mandíbula nas proximidades do CEO apresentou maior superfície óssea do que o osso na margem cirúrgica (distante do tumor), e com a presença de invasão óssea houve diminuição no grau de anisotropia. Os autores reportaram ainda que RANK, RANKL, OPG e SOST se apresentaram downregulados na maioria dos casos (RABELO et al., 2018a).

Diversos trabalhos têm procurado desvendar a influência do metabolismo ósseo no tumor adjacente e conseqüentemente nas repercussões no *cross-talk* entre osso e neoplasia (LE et al., 2017). Um estudo prévio demonstrou que as características da invasão óssea, a expressão de alguns genes envolvidos na facilitação deste processo e alguns outros fatores tem influência na sobrevida destes pacientes (Tese de Doutorado da Érica Fernanda Patrício da Silva, AC Camargo Cancer Center, dados ainda não publicados). Contudo, nenhum estudo avaliou diretamente a expressão gênica e os parâmetros microarquiteturais do osso e sua relação com a sobrevida global dos pacientes.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

Para melhor embasamento do assunto proposto a seguinte revisão de literatura aborda os assuntos que envolvem o tema central do trabalho.

### **2.1 CARCINOMA EPIDERMOIDE ORAL E A INVASÃO MANDIBULAR**

Dentre as neoplasias malignas, o CEO é mais comum nas vias aéreas digestivas superiores, representando mais de 90% das neoplasias malignas orais e, são caracterizados por apresentarem diferentes níveis de diferenciação e uma propensão para a metástase linfonodal (AHMAD et al., 2019; RABELO et al., 2018a). Segundo o INCA (Instituto Nacional de Câncer), para o Brasil, estimam-se 11.180 casos novos de câncer da cavidade oral em homens e 4.010 em mulheres para o ano de 2020 (INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER, 2021).

Estas lesões são derivadas do epitélio de revestimento da mucosa na cavidade oral, faringe e laringe, apresentando etiologia multifatorial, geralmente associada ao consumo de tabaco, mastigação de Betel, consumo excessivo de álcool, condição bucal não higiênica, infecções virais e também devido à disbiose na composição do microbiota da cavidade oral (SAXENA et al., 2022). Nos últimos anos, a incidência de carcinoma em orofaringe tem como principal agente precursor o papiloma vírus humano (HPV), afetando homens caucasianos mais jovens com menos de 65 anos e, está relacionado ao comportamento que expõem os pacientes ao aumento da infecção oral por HPV (DESS et al., 2019; JOHNSON et al., 2020; YAN et al., 2020). Quanto às suas características histológicas, o grau de diferenciação estabelecido pela Classificação Internacional de Tumores da OMS (Organização Mundial da Saúde), os diferem em: bem diferenciados, moderadamente diferenciados e pouco ou indiferenciados (RIVERA, 2015).

A apresentação clínica do CEO é variada, podendo ser: exofítica, endofítica, leucoplásica, eritroplásica, eritroleucoplásica. A lesão principal do CEO é uma úlcera com os bordos endurecidos. O padrão de crescimento endofítico tem uma área central deprimida, de formato irregular, ulcerada, com uma borda “em rolete”. A destruição do osso subjacente, quando presente, pode ser dolorosa ou completamente indolor e comumente aparece nas radiografias como uma radiolucidez “em roído de traça” com margens mal definidas ou bordas irregulares (uma aparência similar à da osteomielite)

(NEVILLE et al., 2016). No estudo de Mahajan et al. (2022), padrões de envolvimento ósseo foram relatados: infiltração erosiva, ou seja, erosão cortical superficial com erosão cortical externa sutil sem ruptura completa; invasão infiltrativa, que inclui erosão cortical profunda com ruptura cortical externa, atingindo a camada cortical interna, envolvimento medular com doença erodindo ambos os córtices e atingindo a medula mandibular, e envolvimento do canal mandibular com doença erodindo o canal alveolar inferior, obliteração de gordura, ou realce excessivo dentro do forame mandibular, com ou sem alargamento ou erosão do forame, que foi considerado como disseminação perineural.

O CEO pode apresentar dois padrões de invasão óssea: um padrão erosivo, histologicamente visto como uma massa tumoral, separada do osso por uma camada de tecido conjuntivo, permeada por um cordão de osteoclastos, interface fibrosa e numerosos linfócitos entre tumor e tecido ósseo. E um padrão infiltrativo, onde a camada de tecido conjuntivo é rompida, e existem ilhas e cordões de células tumorais que infiltram diretamente o osso (JIMI et al., 2011; WANG et al., 2021; YUE et al., 2020). O estudo de Ahmad et al. (2019) constatou que o padrão infiltrativo de invasão óssea está associado ao acometimento do espaço medular, quando comparado ao padrão erosivo que se restringe a porção cortical.

O tamanho da neoplasia e a presença e extensão da metástase do CEO são os melhores indicadores do prognóstico do paciente. O processo de quantificar esses parâmetros clínicos é denominado estadiamento da doença, elaborado pelo American Joint Committee on Cancer (AJCC), em 2010. O estadiamento da doença considera três parâmetros básicos: T: tamanho do tumor primário, em centímetros; N: envolvimento de linfonodos locais e M – metástases à distância (AMIN et al., 2017). A 8ª edição publicada recentemente instituiu alterações no estadiamento de cabeça e pescoço, com inclusão de variáveis e dados como profundidade de invasão (HUANG; O'SULLIVAN, 2017). Em suma, as características morfológicas heterogêneas e invasão de estruturas anatômicas regionais refletem no estadiamento da doença. Conforme o tumor cresce, ele invade os tecidos circundantes e pode penetrar no osso (CHEN et al., 2011; HOFFMANNOVÁ et al., 2010; LUBEK et al., 2011).

Namin, Zitsch e Layfield (2019) avaliaram precisão, sensibilidade e especificidade da interpretação patológica da invasão mandibular por CEO e, compararam a sensibilidade patológica de detecção de invasão mandibular nos padrões erosivos versus infiltrativos de invasão, identificando invasão mandibular em 84% dos casos,

que foi relatado no estudo como um erro amostral e de variabilidade da interpretação patológica, sugerindo maior precisão na avaliação patológica. Contudo, seus resultados revelaram que a sensibilidade patológica para interpretação da invasão mandibular para os padrões erosivos e infiltrativos de invasão foram 77% (30/39) e 91% (32/35), respectivamente ( $p = 0,08$ ).

As principais formas de tratamento são modalidades de terapia curativa para CEO local ou loco-regional, podendo ser ressecção cirúrgica, radiação e/ou terapia sistêmica. O planejamento do tratamento visa uma abordagem curativa, associada à otimização da preservação da função. Para pacientes com câncer primário pequeno sem envolvimento de linfonodos clínicos, ou envolvimento de apenas um único nódulo, intervenções de modalidade única (ressecção ou radiação) podem alcançar taxas de cura de mais de 80% (LEE et al., 2018). Em pacientes com CEO em estágio inicial, a dissecação eletiva melhora as taxas de sobrevida global em relação ao esvaziamento cervical terapêutico (D'CRUZ et al., 2015).

O CEO é geralmente tratado com ressecção cirúrgica do tumor e consequente esvaziamento cervical quando há evidência de doença cervical ou o risco de metástases regionais é alto. O tratamento adjuvante (radioterapia com ou sem quimioterapia) é usado em casos de alto risco de mau prognóstico. Os pacientes elegíveis para um tratamento mais agressivo devem ser selecionados, caso a caso (ALMANGUSH et al., 2020). Para otimizar o controle da margem cirúrgica, uma osteotomia em bloco com preservação da borda da mandíbula pode ser suficiente no tipo erosivo, enquanto os tumores infiltrativos são tratados por ressecção segmentar (DAVID FRIED et al., 2013; EBRAHIMI et al., 2011). Os diferentes padrões de invasão afetam os protocolos de tratamento utilizados em todo o mundo, pois as margens seguras (ósseas) são essenciais para taxas de sobrevida (SINGH et al., 2019; VAASSEN; SPEEL; KESSLER, 2017).

**Figura 3:** Produto de pelveglossomandibulectomia + ECSHO direito.



**Fonte:** Acervo do Professor Gustavo Davi Rabelo e da Doutora Erica Fernanda Patricio da Silva.

A cirurgia radical deve ser enfatizada para melhorar o prognóstico do câncer bucal. A reabilitação também pode melhorar a qualidade de vida e a sobrevivência dos pacientes. Embora a quimioterapia neoadjuvante não melhore a sobrevivência de pacientes com câncer oral avançado em sua totalidade, ela pode beneficiar os pacientes que apresentam respostas positivas ao tratamento (PATIL et al., 2014).

Uma revisão sistemática e meta-análise realizada por Gou et al. (2017) verificou que os tumores primários se localizavam principalmente na gengiva, assoalho da boca, língua, bochecha, trígono retromolar, orofaringe e amígdalas. A frequência de invasão mandibular estava entre 21% e 62% entre os pacientes com câncer bucal envolvidos nos trabalhos revisados. A meta-análise não encontrou diferença significativa nas taxas de recorrência da doença entre mandibulectomia marginal e segmentar. No entanto, em casos de invasão medular, a adoção da mandibulectomia reduziu a taxa de recorrência da doença em 36%, em dois anos. Não houve diferença significativa nas taxas de sobrevivência relacionadas ao tipo de cirurgia adotada (marginal ou segmentar).

Pacientes com CEO que apresentam alto risco, o EC e QR (quimiorradiação) pós-operatórias concomitantemente melhoram significativamente como taxas de controle local e regional e sobrevivência livre de doença. No entanto, o tratamento combinado está associado a um aumento substancial dos efeitos adversos (BERNIER et al., 2005). Em estágios nodais mais avançados, a radiação pós-operatória ou a adoção da QR mediada por fatores de riscos patológicos, reduz o

risco de recorrência e melhora a sobrevida (BERNIER et al., 2005; TANVETYANON et al., 2014). Em casos de insucesso no tratamento após radiação ou cirurgia de modalidade única, pode ser utilizado o resgate como modalidade alternativa, oferecendo uma grande chance de cura (BERNIER et al., 2005; FORASTIERE et al., 2018).

## **2.2 INVASÃO MANDIBULAR E SOBREVIDA**

Durante a última década, apesar da melhora acentuada no resultado clínico de muitos tipos de tumor, uma taxa de sobrevida geral em 5 anos de CEO permaneceu em ~40 - 50%, principalmente devido à disponibilidade limitada de opções terapêuticas eficazes para pacientes (CANNING et al., 2019).

Kowalski et al. (2020) avaliaram o histórico de 505 pacientes com CEO e 380 orofaríngeos obtidos em 2001-2006 e 2007-2012 e constataram que a maioria dos pacientes com CEO (59%) e orofaríngeo (90%) apresentavam-se nos estágios III-IV. A SG (sobrevida global) em 5 anos para pacientes com CEO foi de 51,7%, sem diferença entre o primeiro e o segundo período. As taxas de SC (sobrevida condicional) em 2007-2012 foram de 65% após o primeiro ano e 86% até o quinto ano. Em casos de carcinoma epidermóide de orofaringe, observou-se uma SG em 5 anos de 45,0% no primeiro período. A sobrevida aumentou para 49,1% de 2007 a 2012, com redução do risco de morte. As marcas do SC de 2007 a 2012 são de 59% após o primeiro ano e 75% até o quinto ano, sugerindo que o aumento significativo da sobrevida para carcinoma orofaríngeo, possivelmente por causa de melhorias na resposta dos pacientes à radioterapia, como terapia de radiação modulada por intensidade e o uso de imagens diagnósticas mais precisas abordagens.

Um estudo de coorte realizado em Taiwan constatou uma taxa geral de mortalidade de 35,3%, sendo observadas maiores razão de risco na região de língua, no assoalho da boca, gengiva, palato duro e na orofaringe. As variáveis sexo masculino e o aumento da idade apresentaram riscos significativamente maiores de morte por câncer oral (SU et al., 2019).

Outro fator relacionado à sobrevida do paciente é o tempo prolongado entre o diagnóstico e o início do tratamento do câncer oral, pois durante esse intervalo de

tempo o tumor tem a capacidade de aumentar de tamanho e evoluir com metástase, comprometendo o prognóstico do paciente (SAKA-HERRÁN et al., 2021).

Uma meta-análise realizada por Bulsara et al. (2018) encontrou doze ensaios clínicos randomizados que avaliaram a cirurgia de esvaziamento cervical (EC) eletivo em pessoas com câncer de cavidade oral; no entanto, a evidência disponível para todas as comparações e resultados é de certeza muito baixa, portanto, não podemos confiar nas descobertas. A evidência é insuficiente para tirar conclusões sobre o EC eletivo de nódulos cervicais clinicamente negativos no momento da remoção do tumor primário em comparação com o EC terapêutico (retardado). Dois estudos combinados na meta-análise sugeriram que não há diferença entre essas intervenções, enquanto um estudo (que avaliou o supraomó-hióideo eletivo) descobriu que ele pode estar associado ao aumento da sobrevida geral e livre de doença. Um estudo descobriu que o EC eletivo reduziu a recorrência loco-regional, enquanto três foram inconclusivos. Não há evidência de que o EC radical aumente a sobrevida geral ou livre de doença em comparação com a cirurgia de EC mais conservador, ou que haja uma diferença na mortalidade entre a vigilância por tomografia por emissão de pósitrons (PET-CT) após QR versus EC planejado (antes ou após a QR). O relato de eventos adversos em todos os ensaios foi pobre e não foi possível comparar a qualidade de vida das pessoas submetidas a tratamentos cirúrgicos diferentes.

A progressão do tumor, medida pelo estadiamento clínico-patológico, aumenta a mortalidade para pacientes com CEO que apresentam atrasos no tratamento (XIAO et al., 2018). Os resultados sugerem que a sobrevivência do câncer oral depende mais da atividade proliferativa do tumor (progressão do tumor) do que de um intervalo de tempo prolongado para o diagnóstico (SEOANE et al., 2010).

A invasão óssea é um fator que permanece em debate em diversos estudos realizados. Uma revisão sistemática e meta-análises realizada por Li et al. (2017) encontrou nos resultados uma relação significativa entre invasão mandibular e sobrevida global ( $p = 0,04$ ), e que o envolvimento medular ( $p = 0,0001$ ) poderia diminuir a sobrevida global, enquanto que o envolvimento cortical ( $p = 0,66$ ) não apresentou significância estatística. O estudo de Mahajan et al. (2022) propôs um novo sistema de estadiamento, classificado de acordo com o envolvimento da região medular e do canal mandibular. Os pacientes sem erosão óssea/erosão cortical superficial e erosão óssea cortical profunda foram estadiados com base no tamanho

e profundidade da invasão. Apenas a invasão medular com ou sem envolvimento do canal mandibular foi considerada como T4a, identificando a erosão óssea cortical profunda em 23% dos pacientes, envolvimento do osso medular em 34% a invasão do canal mandibular em 43% dos pacientes, sendo que os primeiros tiveram uma taxa de sobrevida livre de doença e sobrevida livre de recorrência locorregional significativamente melhor do que aqueles com envolvimento de osso medular com ou sem envolvimento do canal mandibular.

O impacto da inclusão da extensão extranodal na classificação N de AJCC 8° foi analisado em muitos estudos. Almangush et al. (2020), em uma meta-análise, revelaram um aumento incremental no risco de pior sobrevida em tumores com classificação N superior de acordo com AJCC 8°.

### **2.3 SISTEMA RANK, RANKL, OPG, SOST (ESCLEROSTINA) E INVASÃO ÓSSEA**

O sistema RANK/RANKL/OPG pertence à superfamília do receptor do fator de necrose tumoral (TNF) que regula a formação e função dos osteoclastos, sendo essencial no remodelamento e reabsorção óssea (SAMBANDAM et al., 2018).

O gene receptor ativador do fator nuclear NF- $\kappa$ B (RANK) humano (símbolo do gene: TNFRSF11A) está localizado no cromossomo 18 (18q21.33) e codifica um receptor com 616 aminoácidos. Os domínios extracelular e intracelular de RANK são definidos por quatro pseudo-repetições ricas em cisteína na porção terminal amino e três domínios de ligação ao TRAF (TNF receptor-associated factor Family), no terminal carboxi, respectivamente (NAKASHIMA; HAYASHI; TAKAYANAGI, 2012; OKAMOTO et al., 2017). RANK é expresso principalmente em precursores de osteoclastos, osteoclastos maduros e células imunes, como células dendríticas (CDs) e macrófagos. Um estudo recente mostrou que, por meio de mudanças moleculares, altera-se a estrutura do osteoclasto e libera vesículas extracelulares que expressam RANK, que interagem com o RANKL nos osteoblastos, resultando na promoção da formação óssea pela sinalização reversa RANK-RANKL (IKEBUCHI et al., 2018).

O gene ligante do receptor ativador do fator nuclear NF- $\kappa$ B (RANKL) humano (símbolo do gene: TNFSF11) está localizado no cromossomo 13 (13q14.11) e codifica uma glicoproteína com 317 aminoácidos. RANKL é uma proteína transmembrana do tipo II com um domínio extracelular sem carboxi terminal

(NAKASHIMA; HAYASHI; TAKAYANAGI, 2012; OKAMOTO et al., 2017). Foi demonstrado que as células tumorais do CEO expressam altos níveis de RANKL e que, além disso, sua expressão é autorregulada nestas células neoplásicas; contudo, os mecanismos reguladores da expressão de RANKL e um papel funcional na progressão do tumor ainda não são claros (SAMBANDAM et al., 2018).

O gene osteoprotegerina (OPG) humano (símbolo do gene: TNFRSF11B) está localizado no cromossomo 8 (8q24.12) e codifica um receptor com 401 aminoácidos. Os domínios de OPG classificam quatro pseudo-repetições ricas em cisteína no terminal amino e dois domínios de morte no terminal carboxi, respectivamente (NAKASHIMA; HAYASHI; TAKAYANAGI, 2012; OKAMOTO et al., 2017). OPG é exportado para o espaço extracelular como um receptor chamariz solúvel sem qualquer estrutura transmembrana. A supressão da OPG em células estromais de CEO induzem a osteoclastogênese (MICHALEK et al., 2019).

A reabsorção óssea pelos osteoclastos é uma etapa importante no processo de invasão óssea pelos CEOs. Algumas citocinas (por exemplo, TNF $\alpha$  e PTHrP) levam à expressão do RANKL ou supressão da OPG nas células de CEO e nas células do estroma canceroso para induzir a osteoclastogênese. CEOs fornecem um microambiente adequado à osteoclastogênese e para regular o equilíbrio de RANKL e OPG (MICHALEK et al., 2019).

Para além da osteoclastogênese e reabsorção, atenção deve ser dada também para a formação óssea. A Esclerostina é uma glicoproteína codificada pelo gene SOST, secretada principalmente por osteócitos maduros, e é um antagonista da sinalização Wnt/ $\beta$ -catenina, inibindo a formação óssea (SEMĚNOV; TAMAI; HE, 2005). Embora SOST (Esclerostina) tenha sido definida como um antagonista da proteína morfogenética do osso (BMP), ela agora é estudada principalmente como um regulador negativo da sinalização Wnt (DELGADO-CALLE; SATO; BELLIDO, 2017; VAN BEZOOIJEN et al., 2004). A desregulação da expressão de SOST (Esclerostina) também está relacionada à fisiopatologia de distúrbios esqueléticos caracterizados pela perda de massa óssea, bem como pelos efeitos prejudiciais de alguns cânceres no osso (WANG; MAZUR; WEIN, 2021).

A invasão óssea pelo CEO já está bem definida em alguns aspectos, porém, permanece incerto todo o mecanismo envolvido neste processo. O microambiente tumoral é composto por uma rede complexa e interconectada de protagonistas, incluindo fatores solúveis como citocinas e componentes da matriz extracelular,

interagindo com fibroblastos, células endoteliais, células imunes e vários tipos celulares específicos, como os osteoblastos, que realizam comunicações intercelulares diretas e/ou de forma autócrina/parácrina/endócrina envolvendo citocinas e fatores de crescimento. Dentre essas glicoproteínas, o RANKL detectado no microambiente tumoral e seu receptor RANK, que é frequentemente expresso por células cancerígenas, participam de todas as etapas do desenvolvimento do câncer. Suas atividades são marcadamente reguladas pela OPG (RENEMA et al., 2016).

### **3 OBJETIVO**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar parâmetros microarquiteturais e de expressão gênica da cortical mandibular em pacientes com carcinoma epidermóide oral submetidos à mandibulectomia, além da influência destes parâmetros na sobrevida global destes indivíduos.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

- Acessar os parâmetros microarquiteturais da cortical mandibular de pacientes com CEO, por meio da microtomografia, e identificar a influência destes na sobrevida global;
- Avaliar a expressão gênica de RANK, RANKL, OPG e SOST na mandíbula de pacientes com CEO e sua influência na sobrevida global;
- Avaliar a influência de alguns dados clínicos e histopatológicos na sobrevida global.

## 4 MATERIAIS E MÉTODOS

A seguinte seção apresenta os recursos utilizados para desenvolvimento do projeto.

### 4.1 CASUÍSTICA

O estudo em questão foi composto por 24 pacientes diagnosticados com CEO na cavidade bucal, atendidos no A.C. Camargo Cancer Center, sendo adotadas propostas terapêuticas de uma abordagem cirúrgica com inclusão de mandibulectomia. Realizou-se avaliações dos dados referentes ao comprometimento mandibular e à respectiva classificação TNM, por meio da coleta de anotações clínicas dos médicos e demais profissionais da equipe multidisciplinar, além dos exames complementares disponíveis, sendo estes: exames de imagem (TC e radiografia), laudos prévios e todas as análises realizadas pelo departamento de Anatomia-Patológica da instituição.

Todos os pacientes assinaram termo de consentimento livre e esclarecido concordando em participar do estudo. Este projeto é uma extensão do estudo intitulado “Avaliação do osso mandibular em pacientes com lesões benignas e malignas da cavidade oral”, aprovado no Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Juiz de Fora (UFJF – CAAE: 85565618.3.1001.5147 - Parecer: 2.757.535) e do AC Camargo Cancer Center (CAAE: 85565618.3.3001.5432 – Parecer número: 3.195.138).

As etapas laboratoriais foram realizadas em dois momentos distintos. Os resultados parciais do trabalho foram obtidos em 2018, onde realizou-se a avaliação de 18 amostras na primeira parte do estudo, e foram apresentados no evento 44º Congresso Brasileiro De Estomatologia e Patologia Oral (DA SILVA et al., 2020). A segunda parte do estudo foi realizada em 2021, com o processamento e análise de outras 9 amostras coletadas entre 2018 e 2021. Destas novas amostras, duas foram retiradas do estudo por não amplificarem para a maioria dos genes, e uma amostra foi excluída por não conter material suficiente para análise, sendo então avaliadas ao final desta parte do estudo um total de 6 amostras. Ressalta-se que houve menor número de coletas neste período, parte devido ao reflexo da pandemia de COVID-19.

#### **4.1.1 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO:**

- Pacientes maiores de 18 anos de idade, que apresentavam CEO, com ou sem envolvimento mandibular, que tiveram como opção terapêutica a cirurgia de mandibulectomia de ressecção marginal ou em bloco.

#### **4.1.2 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO:**

- Pacientes em uso de medicamentos que alteram o turnover ósseo, como bisfosfonatos e Denosumab® e aqueles em uso prolongado (mais de 3 meses) de corticosteroides.
- Gestantes.
- Foram excluídos do estudo 2 fragmentos coletados de pacientes que foram submetidos a terapia de radiação prévia a coleta.

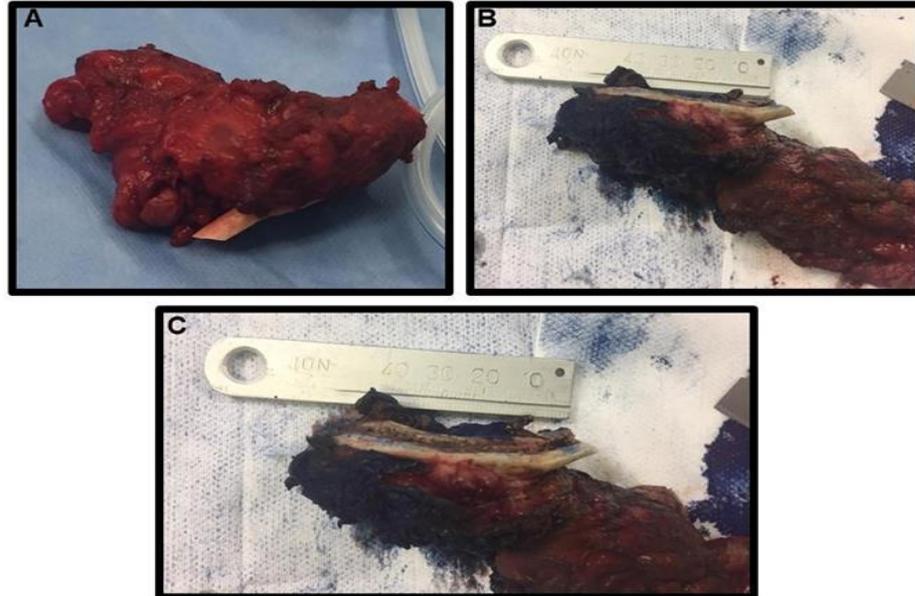
## **4.2 AMOSTRAS**

Amostras foram coletadas para as partes laboratoriais durante a etapa clínica.

### **4.2.1 ETAPA CLÍNICA**

Após a cirurgia de ressecção realizada pelos profissionais do Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço do AC Camargo Cancer Center, o produto final da cirurgia era encaminhado para sala de congelamento dentro do centro cirúrgico, para conferência de margens por congelamento, e para posterior processamento e análise anátomo-patológica. A coleta das amostras ósseas na peça cirúrgica foi realizada a uma distância de 5 mm distante da interface osso/neoplasia, com orientação do Patologista responsável pelo caso, presente no momento da coleta (Figura 4).

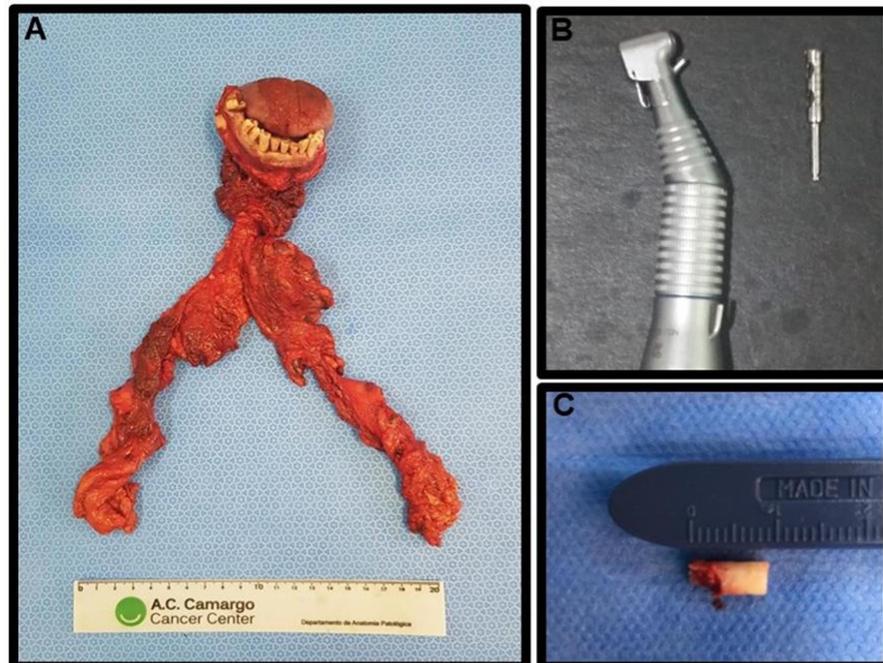
**Figura 4:** Avaliação macroscópica da peça cirúrgica da ressecção do CEC incluindo mandibulectomia marginal à esquerda, ampliada para musculatura digástrico milo-hióideo e com esvaziamento cervical níveis IA e III. **A)** Visão superior da peça. **B)** Visão lateral da peça. **C)** Visão lateral aproximada, evidenciando o osso incluído na mandibulectomia (tábuas corticais e osso esponjoso no interior).



**Fonte:** Érica Fernanda Patrício da Silva, 2019.

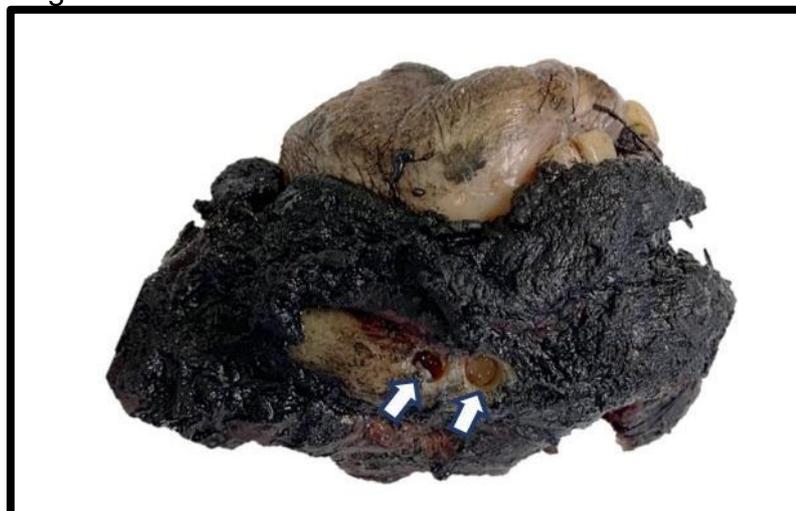
Dois fragmentos ósseos foram coletados utilizando uma trefina acoplada a um motor de implante (Figura 5). Um fragmento foi incluído em solução de álcool etílico à 70% para fixação, para posterior inclusão e realização da Microtomografia Computadorizada; e o outro fragmento ósseo foi armazenado em nitrogênio líquido para a análise da expressão gênica por reação em cadeia da polimerase quantitativa, dos genes RANK, RANKL, OPG e SOST (Figura 5 e 6).

**Figura 5:** Peça cirúrgica onde foi realizada ressecção ampla de neoplasia. **A)** Peça cirúrgica resultante da pelveglossomandibulectomia com esvaziamento cervical bilateral para tratamento do CEC. **B)** Contra-ângulo e trefina utilizados para realização das coletas. **C)** Amostra coletada da peça cirúrgica a partir do critério de distância da neoplasia (nota-se fratura na amostra, na parte trabecular, proveniente do manejo para sua retirada da peça cirúrgica).



**Fonte:** Érica Fernanda Patrício da Silva, 2019.

**Figura 6:** Peça cirúrgica resultante de produto de pelveglossomandibulectomia de ramo ascendente a direita até ramo horizontal a esquerda concomitante à esvaziamento cervical supraomo-hióideo bilateral. As setas em branco indicam a região de coleta dos dois fragmentos ósseos.



**Fonte:** Érica Fernanda Patrício da Silva, 2019.

## **4.2.2 ETAPAS LABORATORIAIS**

Os fragmentos destinados à análise da expressão gênica foram avaliados quanto à disponibilidade de material passível para análise (RNA), no serviço de Anatomia Patológica, junto ao Biobanco da Instituição, seguindo protocolo institucional.

### **4 2 2 1 EXTRAÇÃO DO RNA TOTAL**

Por se tratar de material mineralizado o osso foi triturado em nitrogênio líquido com auxílio de um triturador ósseo para implantes dentais. O RNA foi processado de acordo com o protocolo operacional padrão do Biobanco (OLIVIERI et al., 2014). O material correspondente a amostra (30mg) foi homogeneizado no equipamento Precellys® (Bertin Technologies, Montigny-leBretonneux, França) com 400 µL do tampão RLT com β-Mercaptoethanol (β-ME) de acordo com as recomendações do fabricante para o Kit de extração QIAasympphony (Qiagen, CA, EUA). Foi utilizado o equipamento QIAasympphony (Qiagen, CA, EUA) para a extração forma automatizada do material, adotando o protocol miRNA CT 400V8, que permite a recuperação do RNA total, inclusive o miRNA. O equipamento Nanodrop™ ND-1000 (Thermo Scientific, DE, EUA) avaliou a pureza do RNA e a sua concentração foi mensurada no Qubit (Thermo Scientific). A integridade foi determinada pelo equipamento Tapestation 4200 (Agilent Technologies, CA, EUA). O critério utilizado para avaliar a integridade do RNA foi a quantificação fotométrica por medidas de razão entre absorbâncias medidas a 260 nm e 280 nm, a forma mais conhecida de controle de qualidade de uma extração de DNA ou RNA.

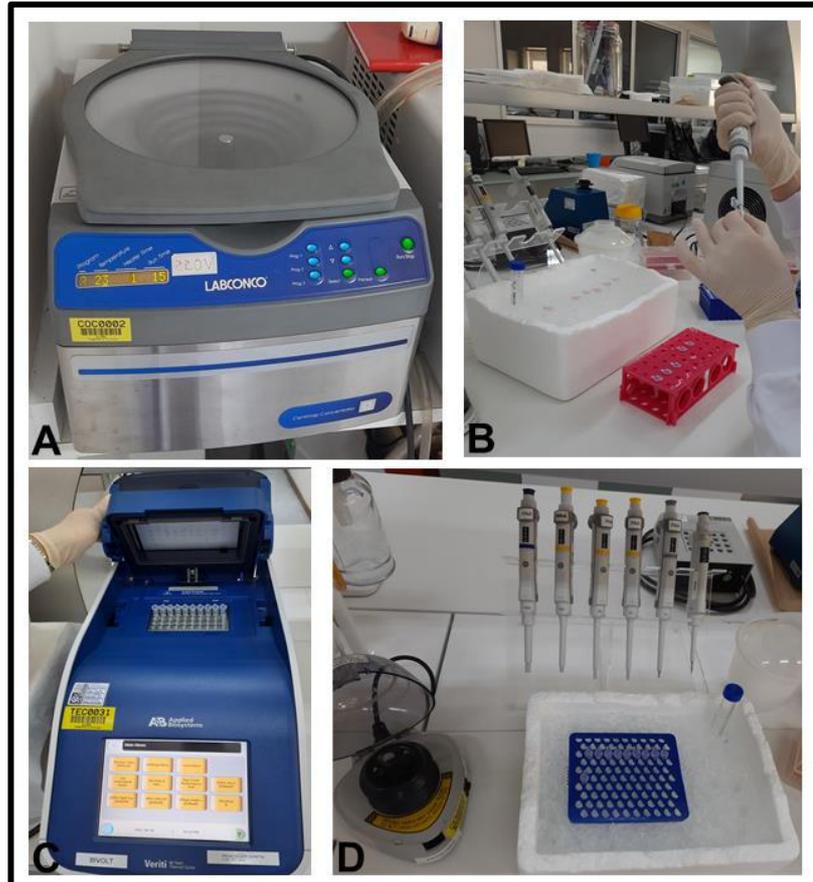
#### **4.2.2.2 SÍNTESE DE cDNA:**

Para síntese de cDNA, foi utilizado o kit High Capacity cDNA Reverse Transcription, seguindo o protocolo do fabricante.

Para a confecção da primeira placa foi preparado um mix contendo para cada amostra: 2,0 µL de 10X RTBuffer, 0,8 µL de 25X DNTP mix, 2,0 µL de 10X Random primers, 1,0 µL de Multiscribe e 1,0 µL de RNase Inh.

Após a ciclagem, as amostras foram diluídas em água para 2 ng/  $\mu\text{l}$  (figura 7).

**Figura 7:** Síntese de cDNA. A: Centrifuga utilizada para a secagem das amostras. B: Adição do material para a síntese de cDNA. C: Termociclador. D: Diluição do cDNA.



Fonte: A autora, 2021.

#### 4.2.2.3 AMPLIFICAÇÃO POR PCR QUANTITATIVA EM TEMPO REAL (qPCR)

O volume final de reação foi de 20  $\mu\text{L}$  para cada amostra, sendo que cada tubo continha 10  $\mu\text{L}$  de TaqMan® Universal PCR Master Mix II (1505037), 4,0  $\mu\text{L}$  de água ultrapura, 5,0  $\mu\text{L}$  (10ng) do cDNA e 1  $\mu\text{L}$  de TaqMan Gene Expression Assay, específico para cada gene e disponíveis comercialmente (Applied Biosystems) (URIBE; ROJAS; ROSAS, 2013).

A amplificação foi feita em 40 ciclos de 95°C por 15 segundos e 60°C por 1 minuto, precedidos por um período de 50°C por 2 minutos e 95°C por 10 minutos, no aparelho 7900HT Fast Real-Time PCR System (Applied Biosystems). O nível de expressão de cada gene foi quantificado relativamente à expressão de um controle

(referência), selecionado utilizando-se a ferramenta NormFinder, disponível em: <<https://moma.dk/normfinder-software>>.

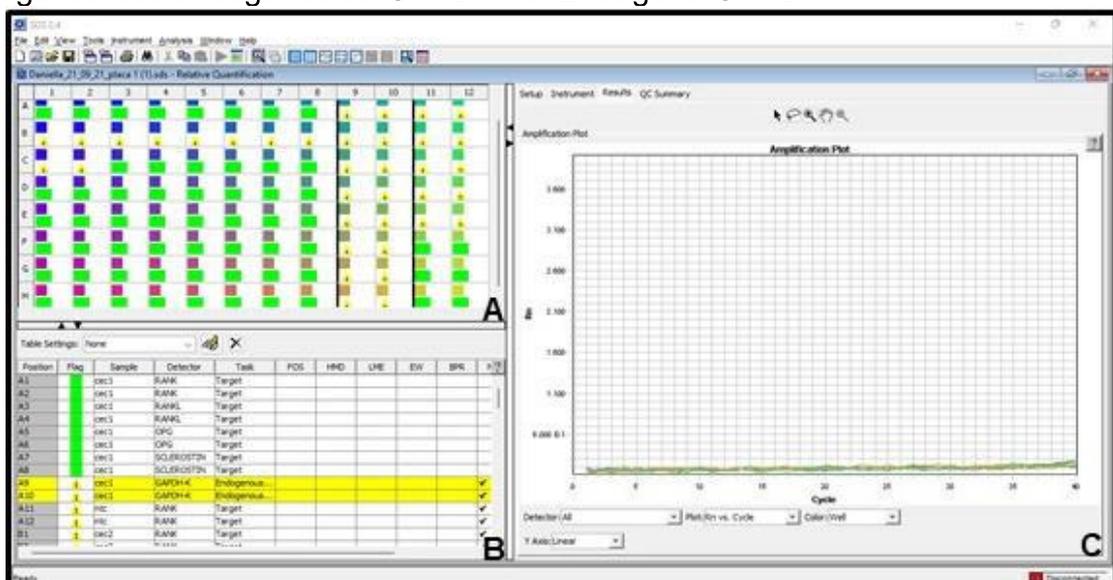
A sequência de nucleotídeos usada foi obtida na base de dados Gene (PubMed), o número de pares de base e a referência comercial dos mesmos conforme a **Tabela 1**. Os experimentos foram realizados em duplicata, conforme a imagem (Figura 8).

**Tabela 1:** Sequência de nucleotídeos dos genes estudados.

Gene	PB	Lote
RANK	75	HS00921372_m1
RANKL	67	HS00243522_m1
OPG	74	HS00900358_m1
SOST	81	HS00228830_m1

Fonte: A Autora, 2021.

**Figura 8:** Applied Biosystems 7900HT. Interface do software do sistema RT-qPCR – Placa 1. **A:** Poços contendo os genes avaliados. **B:** Em amarelo os genes dos endógenos de GAPDH. **C:** Endógeno GAPDH.



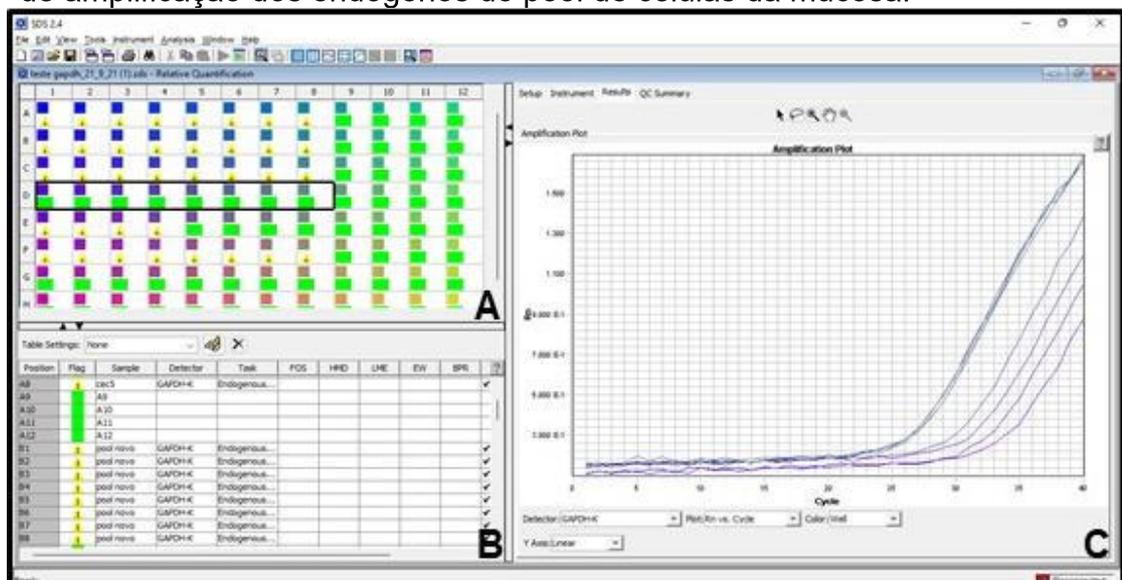
Fonte: A Autora, 2021.

O endógeno GAPDH não amplificou para nenhuma amostra atual, no entanto, em 2015 ele foi utilizado para a análise das amostras, uma vez que ocorreu à amplificação do mesmo. Dessa forma, foi realizado um teste com 4 tubos do endógeno de GAPDH, com o pool de células ósseas sintetizadas em 2015, uma

amostra da análise anterior, um pool de células ósseas sintetizadas atualmente e um pool de células de tecido mucoso.

Tanto para as células de tecido ósseo sintetizadas anteriormente quanto as atuais não houve amplificação. A amostra da análise anterior teve amplificação tardia (como ocorreu na análise do primeiro momento do estudo). O pool de tecido mucoso amplificou, comprovando que o endógeno GAPDH funcionou corretamente (**Figura 9**).

**Figura 9:** Applied Biosystems 7900HT. Interface do software do sistema RT-qPCR – Teste de GAPDH. **A:** Poços com os endógenos de GAPDH avaliados. **B:** Em verde, endógenos do pool de células da mucosa. **C:** Curva de amplificação dos endógenos do pool de células da mucosa.

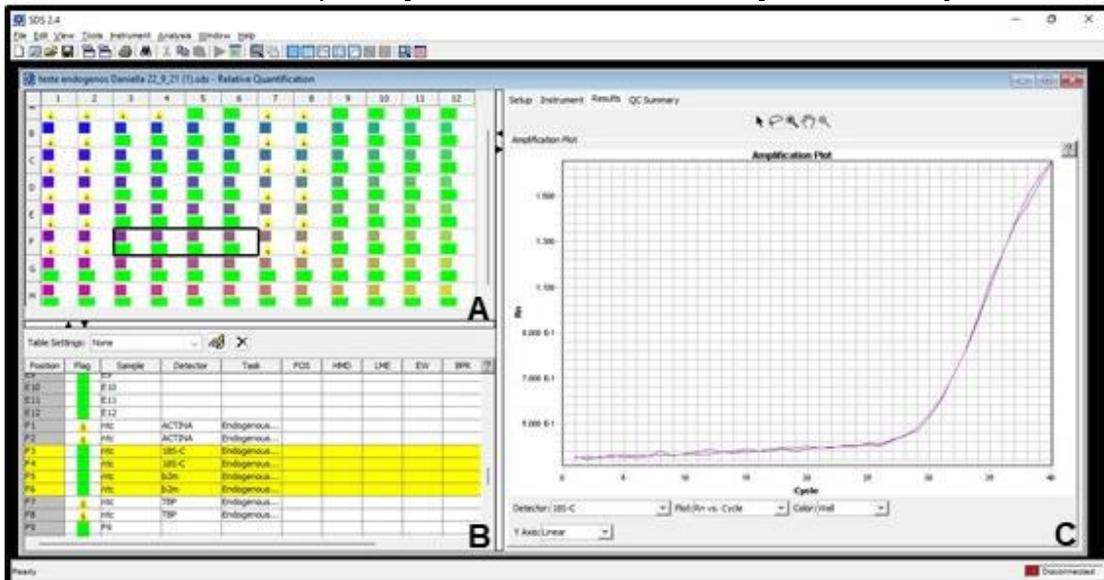


Fonte: A Autora, 2021.

Foi realizado um teste de endógenos para definir qual teria melhor amplificação para as amostras do estudo nesta segunda fase. Foram testados os endógenos:  $\beta$ -actina, 18S, TATA-binding protein (TBP) e  $\beta$ -2-microglobulina (B2M). O teste foi realizado em 4 amostras de osso próximo a lesão, uma amostra do pool de células antigo e uma amostra do pool de células novo. O mix preparado seguiu o padrão adotado na primeira placa de qPCR.

Não ocorreu amplificação para os genes  $\beta$ -actina e TBP. Houve amplificação para os genes 18S e B2M, porém, o NTC também amplificou, indicando contaminação dos assays dos endógenos, conforme a imagem (**Figura 10**).

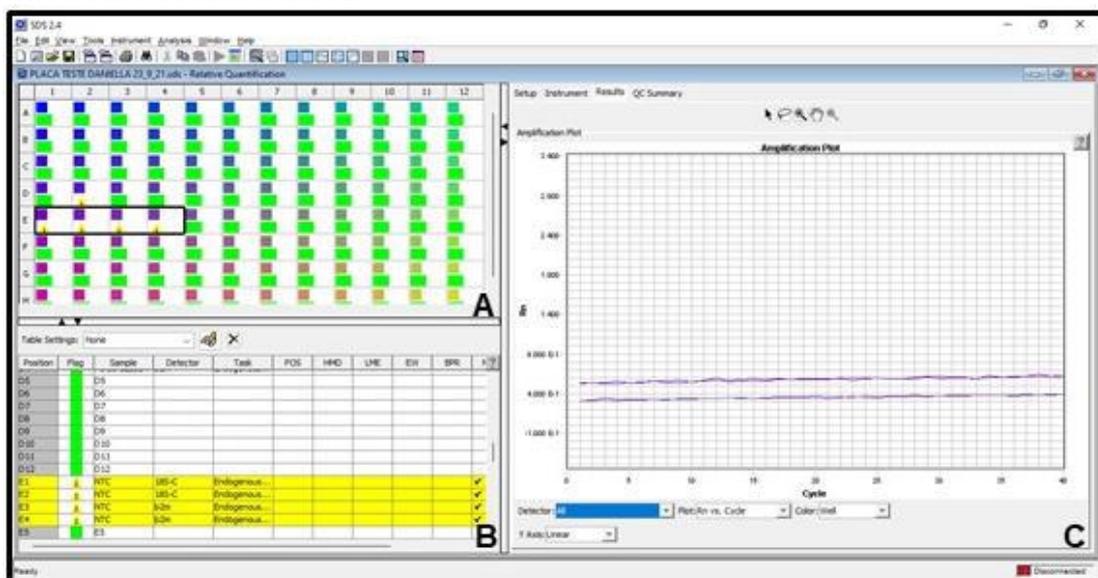
**Figura 10:** Applied Biosystems 7900HT. Interface do software do sistema RT-qPCR – Teste 1 de endógenos. **A:** Poços referentes aos endógenos 18s e b2m. **B:** Curva de amplificação indicando contaminação dos assays.



Fonte: A Autora, 2021.

Foram testados novamente os assays utilizados e outros novos dos genes 18S e B2M, constatando-se que eles não estavam contaminados (**Figura 11**).

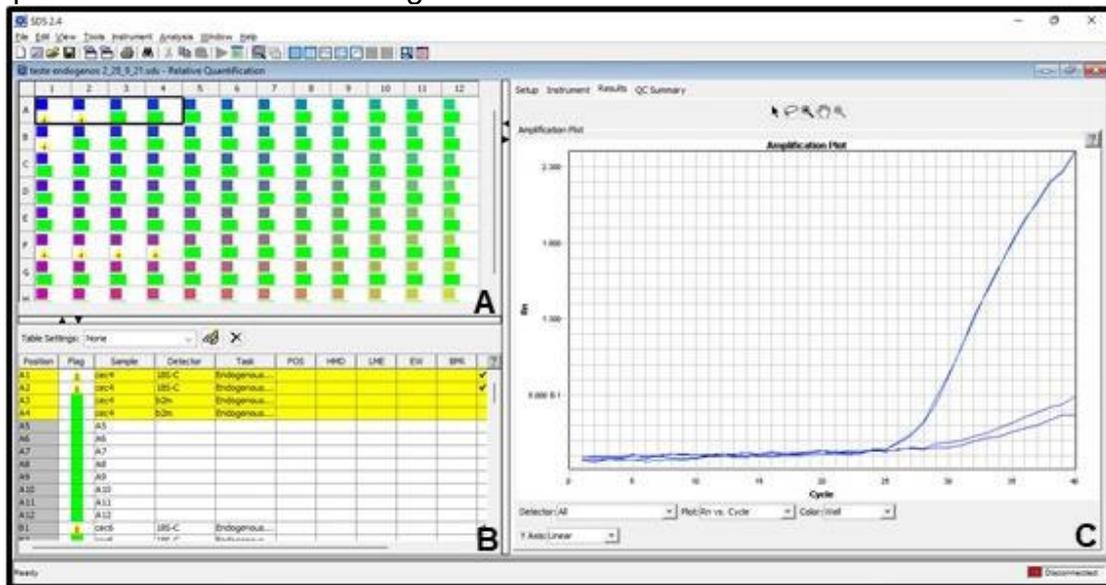
**Figura 11:** Applied Biosystems 7900HT. Interface do software do sistema RT-qPCR – Teste 2 de endógenos. **A:** Poços dos genes 18s e b2m. **B:** NTCs para 18s e b2m. **C:** Gráfico sem amplificação, indicando que os genes não estão contaminados.



Fonte: A Autora, 2021.

Foi necessária nova síntese de cDNA das amostras, pois a quantidade era insuficiente para o novo teste de endógenos e para a avaliação da expressão dos demais genes. Realizou-se um novo teste de endógenos com os genes 18S e B2M, pois foram os que tiveram melhor amplificação (**Figura 12**).

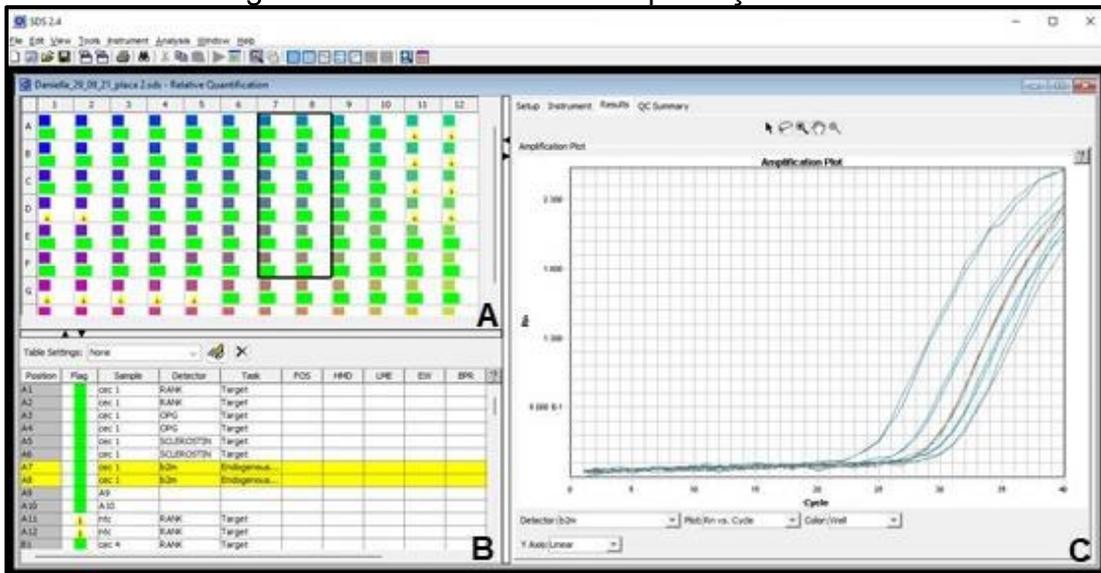
**Figura 12:** Applied Biosystems 7900HT. Interface do software do sistema RT-qPCR – Seleção do endógeno. **A:** Poços com os genes avaliados. **B:** Endógenos 18s e b2m. **C:** Curva de amplificação para os endógenos. A primeira curva refere-se ao gene b2m.



Fonte: A Autora, 2021.

Para a análise foi selecionado o gene  $\beta$ -2-microglobulina (Pb: 75; HS99999907\_m1). Em suma, nesta segunda parte do estudo, foram utilizadas 6 amostras de osso cortical, que foram coletadas a 5 mm de distância do tumor e 1 *pool* composto por 3 amostras de tecido ósseo saudável (o *pool* de amostras de tecido saudável é o mesmo utilizado na primeira parte do estudo em 2015, que ficou armazenado deste então. São 3 amostras de osso coletadas de pacientes com lesões benignas centrais, e a remoção do fragmento ósseo foi realizada nas margens cirúrgicas, em uma distância segura definida pelo cirurgião Bucomaxilofacial). O gráfico pode ser visto na imagem (**Figura 13**).

**Figura 13:** Applied Biosystems 7900HT. Interface do software do sistema RT-qPCR – Amplificação para  $\beta$ -2-microglobulina. **A:** Poços das amostras ósseas. **B:** Endógenos b2m. **C:** Curva de amplificação de b2m.



Fonte: A Autora,2022.

#### 4.2.2.4 CRITÉRIOS PARA A CATEGORIZAÇÃO DOS GENES AVALIADOS

O cálculo do nível de expressão de cada gene alvo foi realizado utilizando o método  $2^{-\Delta\Delta C_T}$ , para a quantificação relativa, onde  $\Delta C_T$  (threshold cycle) é o ciclo da PCR em tempo real, no qual a amplificação atinge a fase logarítmica, sendo o resultado dado pela diferença de expressão entre gene alvo e controle endógeno da amostra (LIVAK; SCHMITTGEN, 2001).

Para classificar os genes do estudo, utilizou-se como critério a classificação dos genes em downregulados, onde sua expressão é menor que 0,5, normal onde sua expressão se encontra entre 0,5 e 2 e, sua superexpressão ocorre em casos maior que 2, de acordo com Rabelo et al. (2018) e Livak e Schmittgen (2001).

#### 4.2.3 MICROTOMOGRAFIA COMPUTADORIZADA ( $\mu$ CT)

As amostras ósseas que foram incluídas em metil metacrilato foram analisadas no microtomógrafo Scanco40 ( $\mu$ CT - Scanco  $\mu$ CT 40, Brüttisellen, Switzerland), com um tamanho de voxel isotrópico de 19  $\mu$ m (fonte de raios X: 55 kVp, 144  $\mu$ A), sendo avaliados os seguintes parâmetros: volume ósseo (VO, %), superfície óssea (SO, mm), porosidade cortical (PC, %), número de poros (NC, n),

dimensão fractal (DF, #) e densidade mineral óssea (DMO, g/cm<sup>3</sup> HA - Hidroxiapatita). Para a avaliação foi utilizado um threshold global de 440. Dez imagens foram salvas em formato TIFF para o cálculo da DF, utilizando o método baseado na análise das imagens em escala de cinza (RABELO et al., 2018b).

### 4.3 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Para as variáveis qualitativas foi realizada uma análise descritiva, com as distribuições de frequência absoluta (n) e relativa (%). Para as variáveis quantitativas, foi realizada a análise das principais medidas, a média, intervalo de confiança, desvio padrão e mediana.

A análise da sobrevida global foi realizada com estimador de Kaplan-Meier, para estimar as curvas de sobrevivência, a comparação os grupos foi realizada pelo teste de log-rank.

A partir da análise de sobrevida, foi realizada a regressão de Cox, para estimar o papel de variáveis independentes que agem multiplicativamente sobre o risco relativo.

Para a comparação dos parâmetros microarquiteturais entre os casos com e sem invasão óssea foram utilizados o teste de Mann-Whitney para o VO e o teste t não pareado para SO, DMO e FD.

Para todos os testes se adotou o nível de significância de 5%, por meio do software SPSS versão 24.

## 5 RESULTADOS

Os próximos itens apresentam os resultados encontrados.

### 5.1 DADOS EPIDEMIOLÓGICOS E SOBREVIDA

Foram avaliadas 24 amostras, sendo 7 de pacientes do sexo feminino (29,2%) e 17 do sexo masculino (70,8%). A média de idade foi de 59,71 anos e a mediana foi de 62 anos. Quanto ao grau de diferenciação, 75% (n=18) dos tumores se apresentaram moderadamente diferenciados, 8,3% (n=2) pouco diferenciados e 16,7% (n=4) bem diferenciados. A média de tamanho do tumor em centímetros foi de 4,1 ( $\pm 2,18$ ). Gengiva, região retromolar e assoalho bucal foram os sítios primários de desenvolvimento em 7 casos cada um deles, e a língua foi o sítio de desenvolvimento em 3 casos. A invasão óssea foi identificada em 33,3% (n=8) dos casos e a não invasão em 66,7% (n=16).

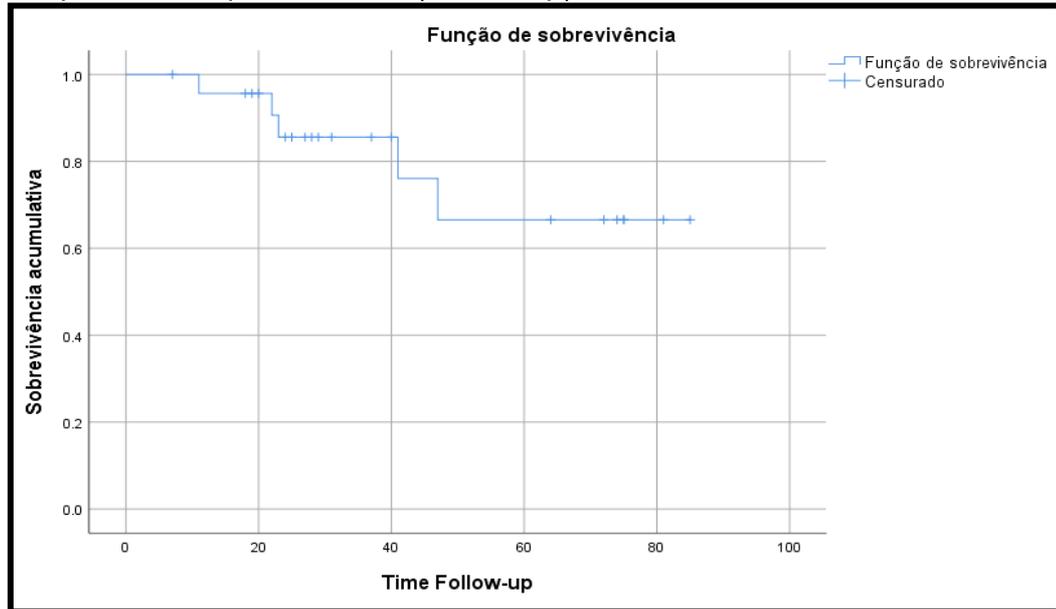
Em relação a invasão muscular esquelética, em 70,8% (n=17) dos casos essa foi constatada e não foi encontrada em 29,2% (n=2) dos pacientes. O comprometimento linfonodal ocorreu em 41,7% (n=10) dos casos e o não comprometimento em 58,3% (n=14).

A região anterior de mandíbula foi o local que apresentou 37,5% (n=9) dos tumores e a porção posterior apresentou 62,5% (n=15) dos tumores.

A tabela abaixo representa as variáveis do estudo que apresentaram valores de p com significância estatística e valores que apresentam uma tendência em possuir significância estatística e risco relativo na comparação das curvas, relacionadas a sobrevida global:

O cálculo da sobrevida dos pacientes foi realizado baseado nas informações obtidas nos prontuários dos pacientes até o mês de dezembro de 2021. Dos 24 pacientes avaliados, 5 foram ao óbito em decorrência da doença durante o estudo, levando a uma taxa de sobrevida de 79,2%. A média de sobrevivência estimada por Kaplan- Meier, em meses, foi de 67,69% (IC= 54,82 – 80,55), conforme o gráfico 1.

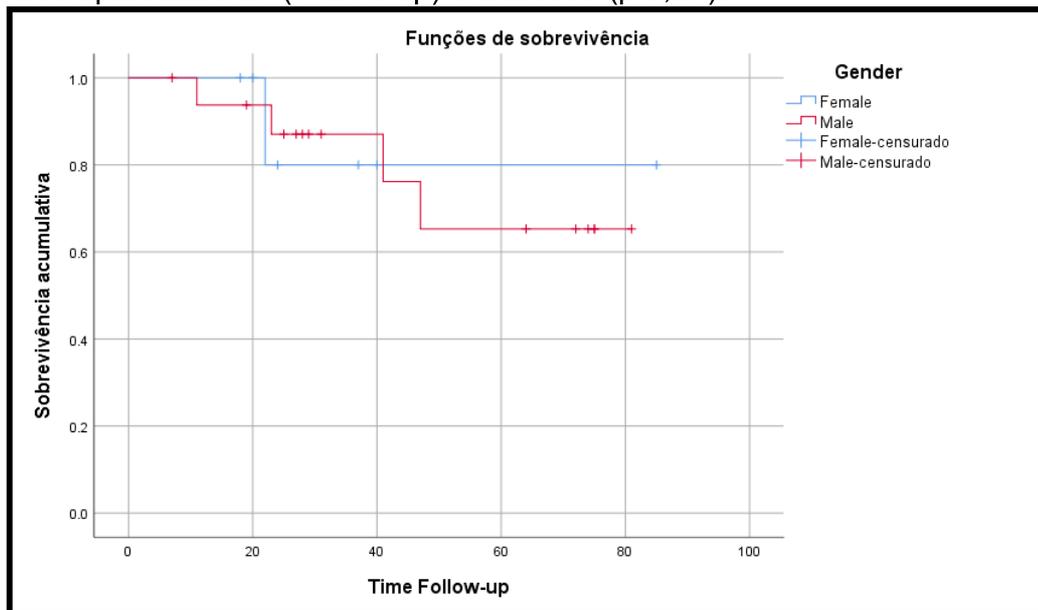
**Gráfico 1:** Sobrevida em meses representada pela linha azul. Eixo X: tempo de acompanhamento (Follow-up) em meses.



Fonte: A Autora, 2022.

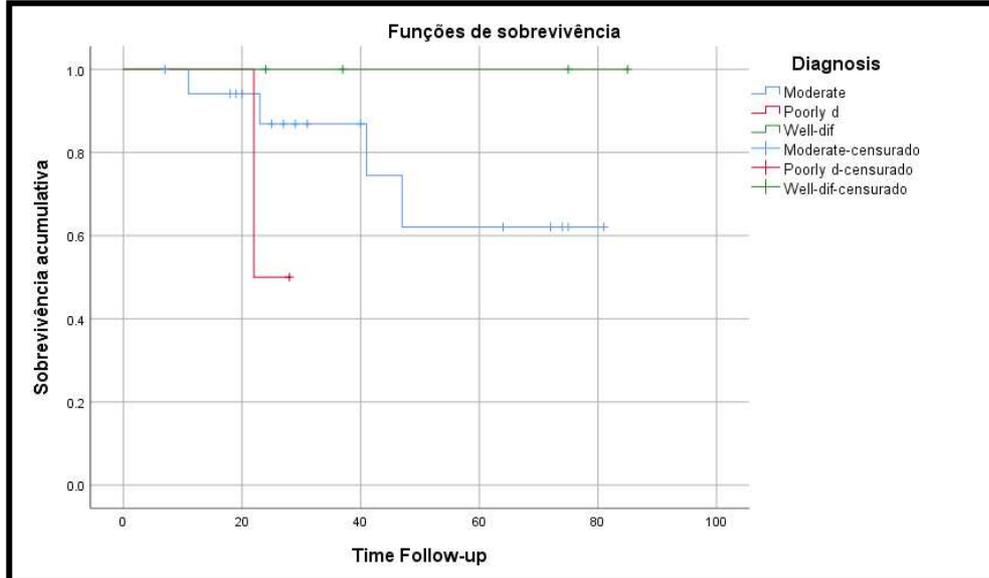
A distribuição das curvas de sobrevivência das variáveis sexo, grau de diferenciação tumoral, região da mandíbula, invasão óssea, invasão muscular e esquelética, estão representadas respectivamente nos gráficos 2, 3 e 4.

**Gráfico 2:** Curva de sobrevivência associada ao sexo. Linha azul para o sexo feminino e linha vermelha para o sexo masculino. Eixo X: tempo de acompanhamento (Follow-up) em meses (p 0,97).



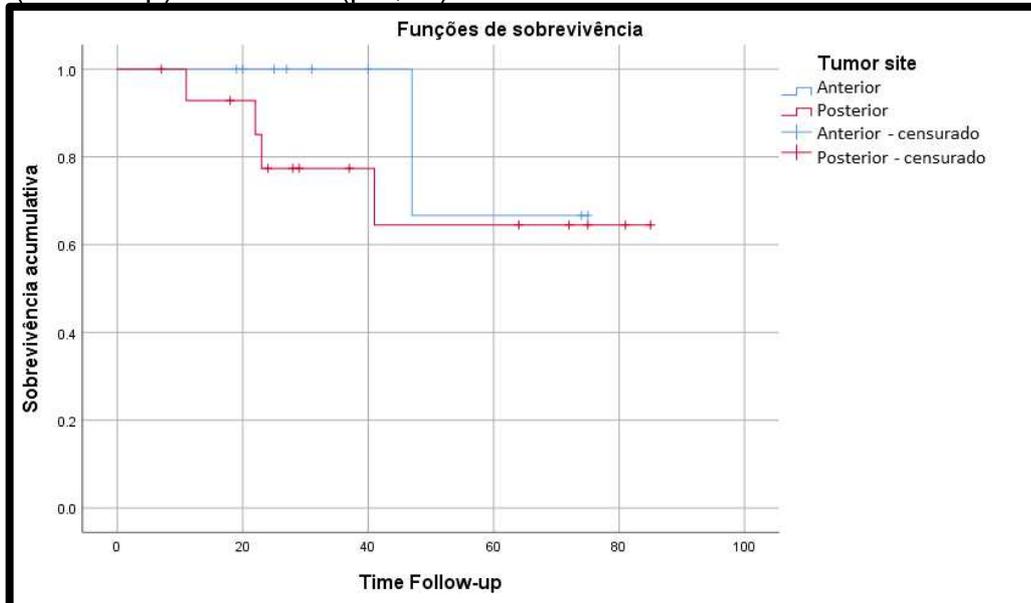
Fonte: A Autora, 2022.

**Gráfico 3:** Sobrevida associada ao grau de diferenciação. A linha azul representa tumores com grau de diferenciação moderado, linha vermelha para tumores pouco diferenciados e a verde se refere a tumores muito diferenciados. Eixo X: tempo de acompanhamento (Follow-up) em meses (p 0,17).



Fonte: A Autora, 2022.

**Gráfico 4:** Função de sobrevivência relacionada ao sítio de acometimento mandibular. Linha azul para o sítio anterior e linha vermelha para o sítio posterior. Eixo X: tempo de acompanhamento (Follow-up) em meses (p 0,42).

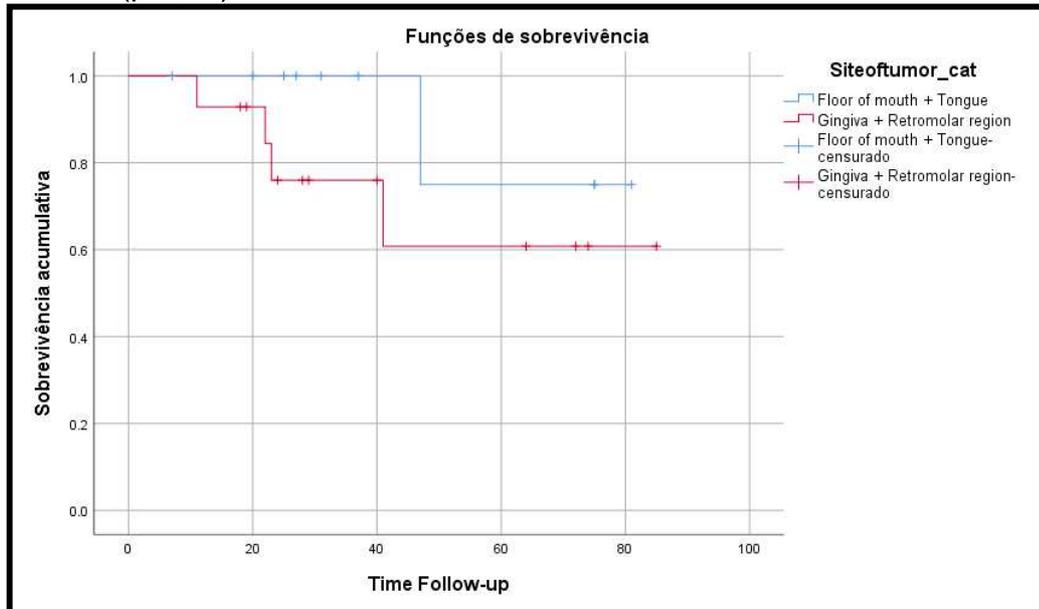


Fonte: A Autora, 2022.

Em relação ao sítio tumoral específico, devido ao tamanho da amostra ser pequeno, foi feito o agrupamento das localizações, de acordo com a tabela 2 e

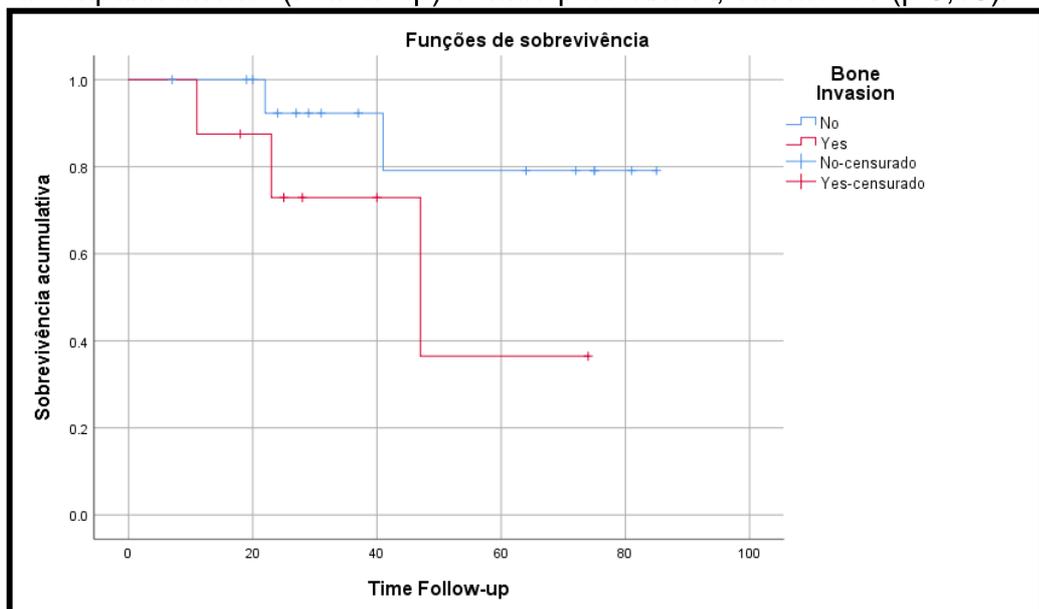
gráfico 5. Também não houve significância da sobrevida em termos do sítio primário de desenvolvimento do CEO.

**Gráfico 5:** Sobrevida relacionada ao acometimento tumoral agrupando os sítios específicos. A linha azul descreve as regiões de assoalho de boca e língua e a linha vermelha representa a área retromolar e de gengiva. O eixo X representa de acompanhamento (Follow-up) em meses (p 0,27).



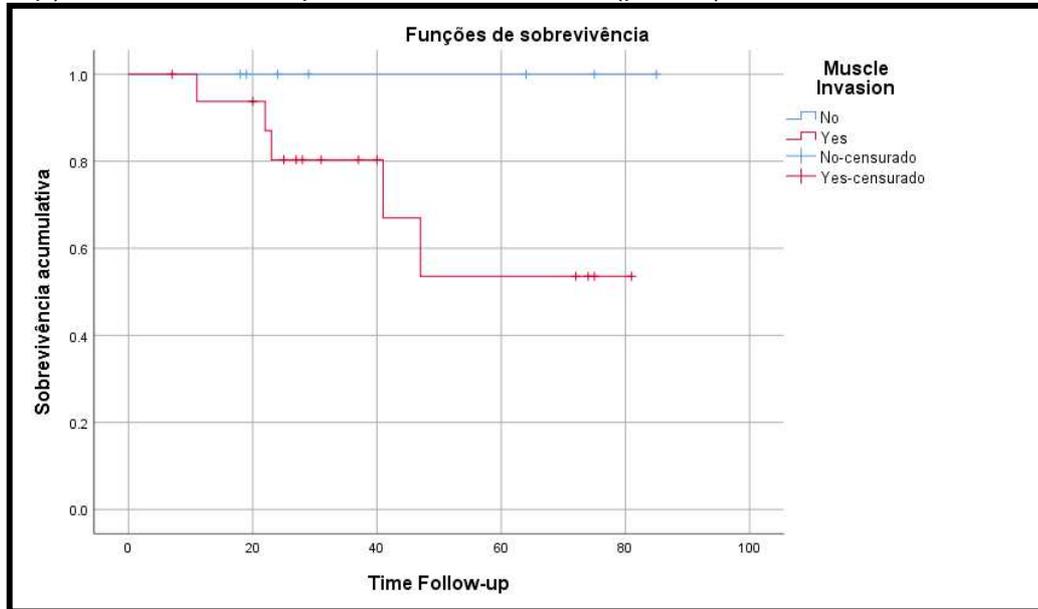
Fonte: A Autora, 2022.

**Gráfico 6:** Sobrevida relacionada a invasão óssea. A linha vermelha representa os casos em que houve invasão óssea e a linha azul se refere aos casos onde não ocorreu a invasão óssea. O tempo de acompanhamento (Follow-up) é dado pelo eixo X, em meses (p 0,13).



Fonte: A Autora, 2022.

**Gráfico 7:** Sobrevida relacionada a invasão muscular esquelética. A linha azul se refere aos casos em que não ocorreu invasão muscular esquelética e a linha vermelha representa os casos em que houve invasão muscular esquelética. O tempo de acompanhamento (Follow-up), em meses, é representado no eixo X (p 0,13).



Fonte: A Autora, 2022.

Para as variáveis numéricas, foi feito ponto de corte que maximiza a diferença entre as curvas de Kaplan – Mayer, aplicando-se a regressão de Cox. A tabela 2 apresenta as variáveis idade e tamanho do tumor, onde os valores de p e risco relativo apresentaram significância estatística, e as demais variáveis que tiveram uma tendência em ter uma significância estatística.

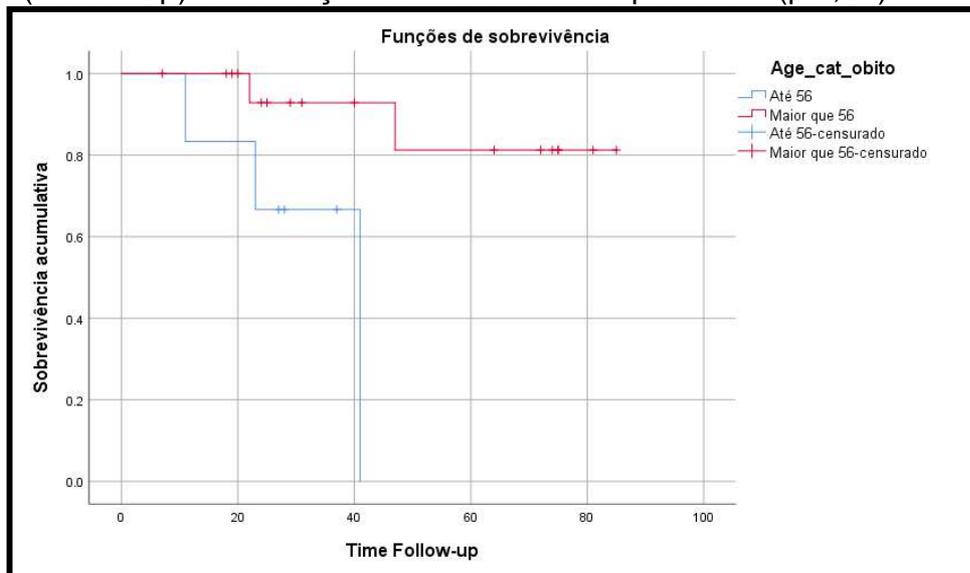
**Tabela 2-** Valores de p com significância estatística e valores que apresentam uma tendência em possuir significância estatística e risco relativo na comparação das curvas, relacionadas a sobrevida global.

Variável	p	Risco relativo (RR)	IC (Intervalo de confiança)
Idade	0,04*	11,31	1,11 - 115,04
Tamanho do tumor	0,02*	7,52	1,24 - 45,52
Invasão óssea	0,15	3,6	0,65 – 22,24
Linfonodos comprometidos	0,11	5,71	0,63 – 51,25
SO	0,19	4,35	0,48 – 39,5
PC	0,13	5,24	0,58 – 47,05

Fonte: A Autora, 2022.

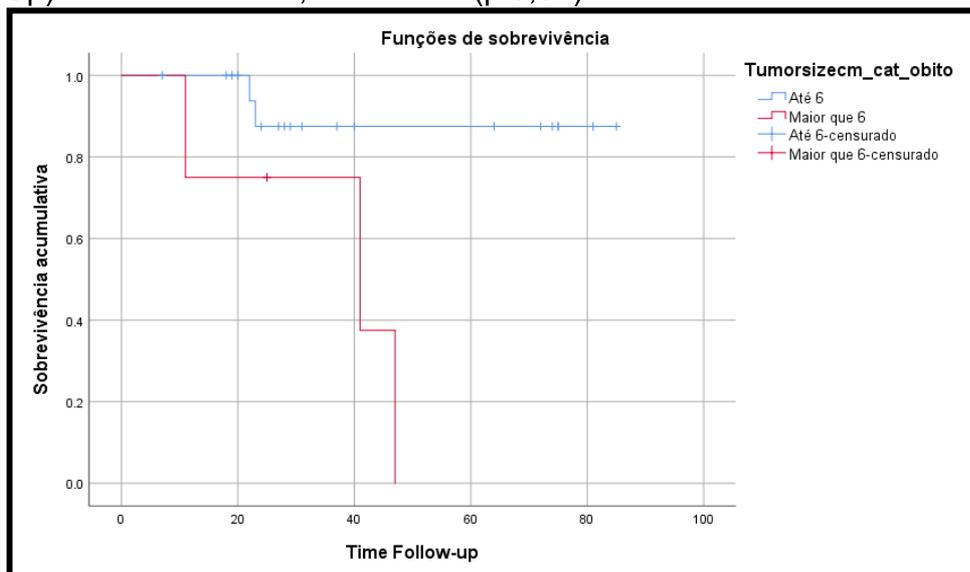
As variáveis que apresentaram significância estatística foram a idade e o tamanho do tumor, apresentando  $p=0,01$  para ambas. Os gráficos 8 e 9 representam as curvas de sobrevida para tais variáveis.

**Gráfico 8:** Função de sobrevivência para idade. A linha em vermelho se refere a indivíduos com idade maior que 56 anos e a curva azul caracteriza amostras de pacientes com até 56 anos de idade. O eixo X representa, em meses, o acompanhamento (Follow-Up) da condição de sobrevida dos pacientes ( $p 0,01$ ).



**Fonte:** A Autora, 2022.

**Gráfico 9:** Função de sobrevivência para tamanho do tumor. A linha azul se refere a tumores de até 6 cm e a linha vermelha representa tumores maiores que 6 cm. O tempo de acompanhamento (Follow-Up) é visto no eixo X, em meses ( $p 0,01$ ).

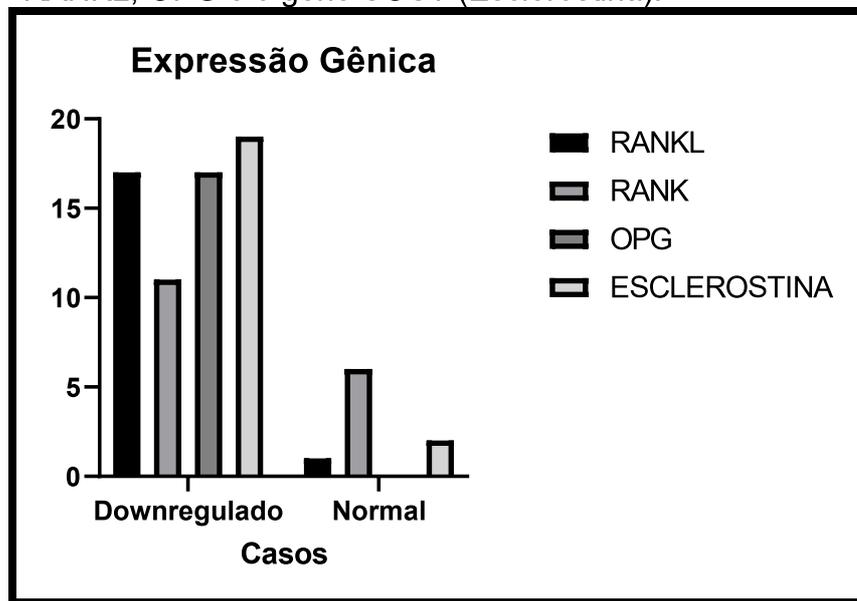


**Fonte:** A Autora, 2022.

## 5.2 EXPRESSÃO GÊNICA E SOBREVIDA

O gráfico 10 representa a situação da expressão gênica a partir da categorização dos mesmos, para todos os genes avaliados. Em nenhum dos casos houve superexpressão gênica e, na maioria dos casos, os genes se apresentaram em downregulação. Nota-se que para o gene OPG se apresentou downregulado, ou seja, sua expressão estava abaixo dos níveis normais em 100% dos casos.

**Gráfico 10:** Situação da expressão gênica para RANK, RANKL, OPG e o gene SOST (Esclerostina).



Fonte: A Autora, 2022.

Em relação a invasão óssea, a tabela 3 categoriza os casos de invasão e não invasão, de acordo com o comportamento dos genes avaliados.

**Tabela 3:** Invasão óssea para os genes RANK, RANKL, OPG e SOST(Esclerostina).

	Invasão		Não invasão	
	Normal	Down	Normal	Down
<b>RANK</b>	3	4	3	7
<b>RANKL</b>	0	7	1	10
<b>OPG</b>	0	7	0	10
<b>SOST (Esclerostina)</b>	0	7	2	11

Fonte: A Autora, 2022.

A situação para expressão gênica para os genes RANK, RANKL, OPG e SOST (Esclerostina) está listada nas tabelas 4, 5, 6 e 7 e gráficos 11 e 12. Não houve significância estatística para nenhum dos genes em sua relação com a sobrevivência global. Reitera-se que para nenhum dos genes houve situação de superexpressão, dessa forma, foi categorizado em todas as situações de expressão como downregulado ou normal. Para OPG em todos os casos os genes se apresentaram downregulados.

**Tabela 4:** Situação da expressão de RANK.

	<b>N</b>	<b>%</b>
<b>Downregulado</b>	10	41,7
<b>Normal</b>	7	29,2
<b>Total</b>	24	100
<b>Não analisado</b>	7	

**Fonte:** A Autora, 2022.

**Tabela 5:** Situação da expressão de RANKL.

	<b>N</b>	<b>%</b>
<b>Downregulado</b>	17	70,8
<b>Normal</b>	1	4,2
<b>Total</b>	24	100
<b>Não analisado</b>	6	

**Fonte:** A Autora, 2022.

**Tabela 6:** Situação da expressão de OPG.

	<b>N</b>	<b>%</b>
<b>Downregulado</b>	17	70,8
<b>Total</b>	24	100
<b>Não analisado</b>	7	

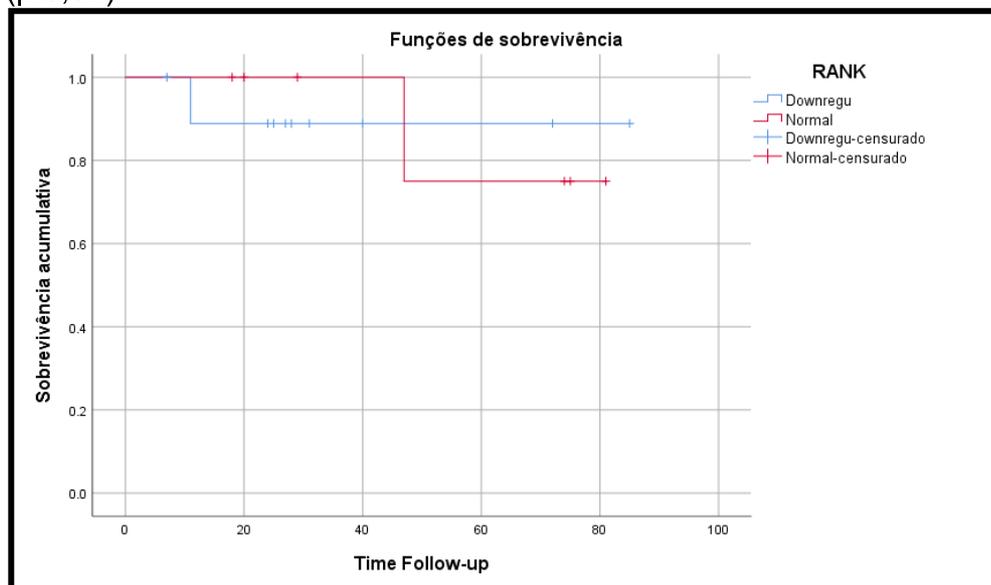
**Fonte:** A Autora, 2022.

**Tabela 7:** Situação da expressão do gene SOST (Esclerostina).

	N	%
<b>Downregulado</b>	18	75
<b>Normal</b>	2	8,3
<b>Total</b>	24	100
<b>Não analisado</b>	4	

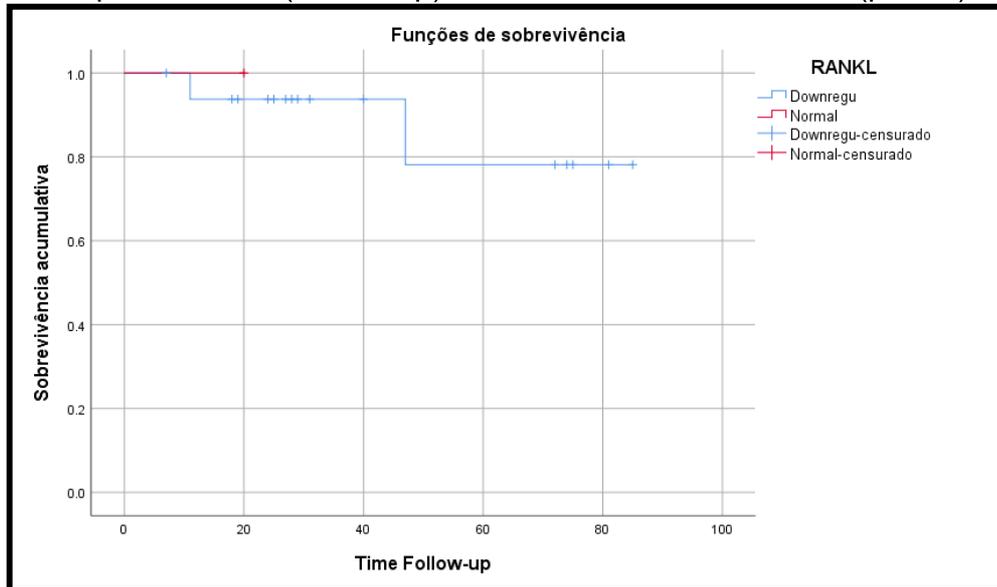
Fonte: A Autora, 2022.

**Gráfico 11:** Função de sobrevivência para RANK. A linha azul representa RANK expresso em situação de downregulação e a linha vermelha representa o gene em situação de expressão normal. O de acompanhamento (Follow-up) é representado em meses pelo eixo X (p 0,87).



Fonte: A Autora, 2022.

**Gráfico 12:** Função de sobrevivência para RANKL. A linha em vermelho representa a expressão de RANKL normal e a linha azul representa o gene expresso em downregulação. O acompanhamento (Follow-up) é dado em meses no eixo X (p 0,80).



**Fonte:** A Autora, 2022.

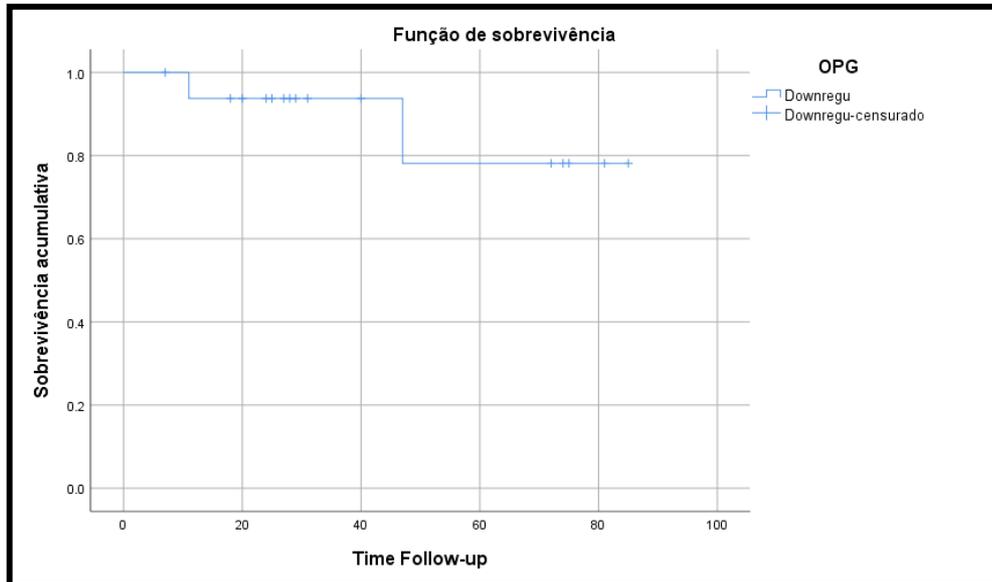
Para OPG a estatística de log-rank não pôde ser aplicada, pois todos os casos se apresentaram no mesmo grupo. Os dados relativos à OPG estão apresentados nas tabelas 8 e 9 e nos gráficos 13 e 14.

**Tabela 8:** Situação da expressão gênica para OPG

	N	Óbito	Censurado	%
<b>Downregulado</b>	17	2	15	74,43

**Fonte:** A Autora, 2022.

**Gráfico 13:** Função de sobrevivência para OPG. A linha azul representa a situação gênica de downregulação em todos os casos. O eixo X se refere ao acompanhamento (Follow-Up), dado em meses.



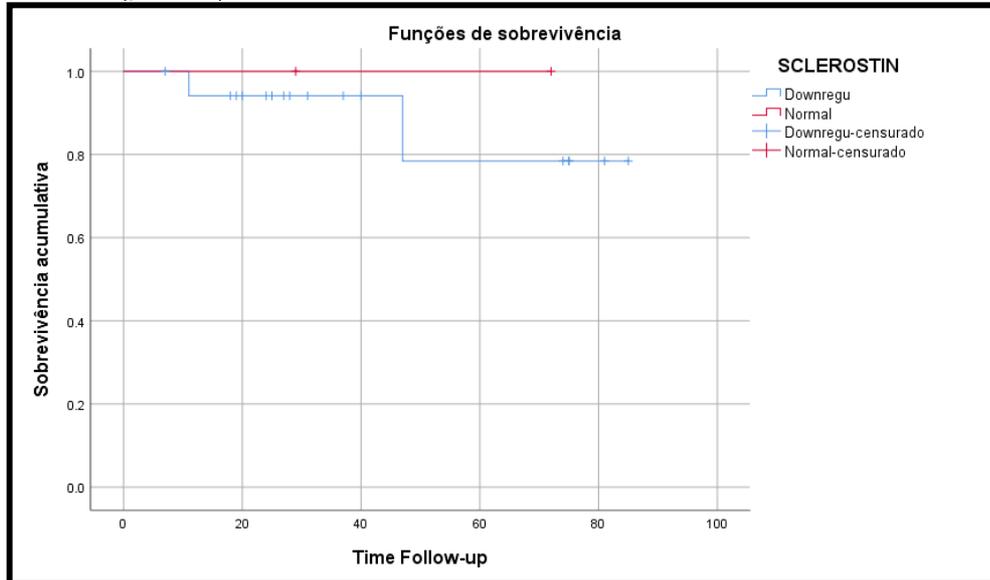
Fonte: A Autora, 2022.

**Tabela 9:** Situação da expressão gênica para o gene SOST (Esclerostina).

	N	Óbito	Censurado
Downregulado	8	2	16
Normal	2	0	2
Geral	20	2	18

Fonte: A Autora, 2022.

**Gráfico 14:** Função de sobrevivência para SOST (Esclerostina). A linha azul representa a situação do gene SOST em downregulação e a linha vermelha representa o gene SOST em expressão normal. O eixo X caracteriza o tempo de acompanhamento (Follow-Up), em meses (p 0,59).



Fonte: A Autora, 2022.

### 5.3 MICROTOMOGRAFIA E ANÁLISE DA SOBREVIDA

Entre as variáveis relacionadas aos parâmetros microarquiteturais, nenhuma variável apresentou significância estatística. Os valores de média, mediana, intervalo de confiança e desvio padrão, encontrados para os parâmetros estruturais: volume ósseo (VO), superfície óssea (SO), grau de anisotropia (A), porosidade cortical (PC), número de poros nos canais (NPC), densidade mineral óssea (DMO) e dimensão fractal (DF), se encontram disponíveis na tabela 10 e nos gráficos 15, 16, 17, 18, 19, 20 e 21.

**Tabela 10:** Valores encontrados na análise microarquitetural óssea.

Parâmetros	N	Média	Mediana
VO (%)	24	96,71	98,05
SO (mm)	24	4,31	4,19
A (#)	18	0,77	0,79
PC (%)	24	3,29	1,94
NC (n)	18	38,89	32,00
DMO (g/cm <sup>3</sup> HA)	24	1,07	1,08

DF (#) 23 1,21 1,23

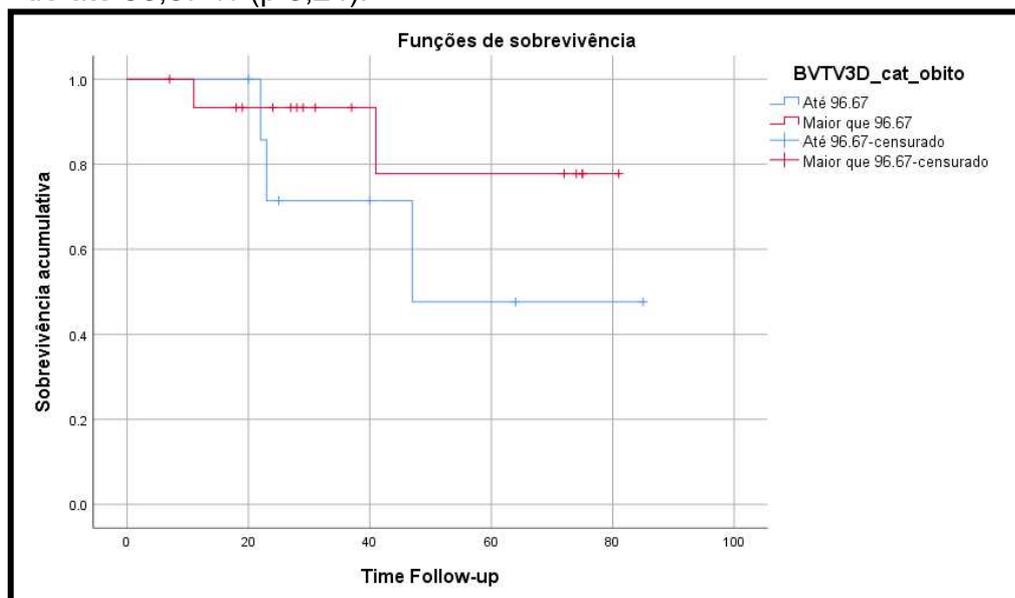
Fonte: A Autora, 2022.

**Tabela 11:** Comparação da microarquitetura cortical entre os casos com invasão óssea e sem invasão óssea.

Parâmetros	p	Invasão Óssea	Sem Invasão Óssea
VO (%)	0,52	97,18 (93,25; 99,21)	98,05 (96,57; 99,33)
SO (mm)	0,44	3,87±1,18	4,52±2,19
DMO (g/cm <sup>3</sup> HA)	0,87	1,07±0,08	1,07±0,05
DF (#)	0,20	1,24±0,07	1,18±0,12

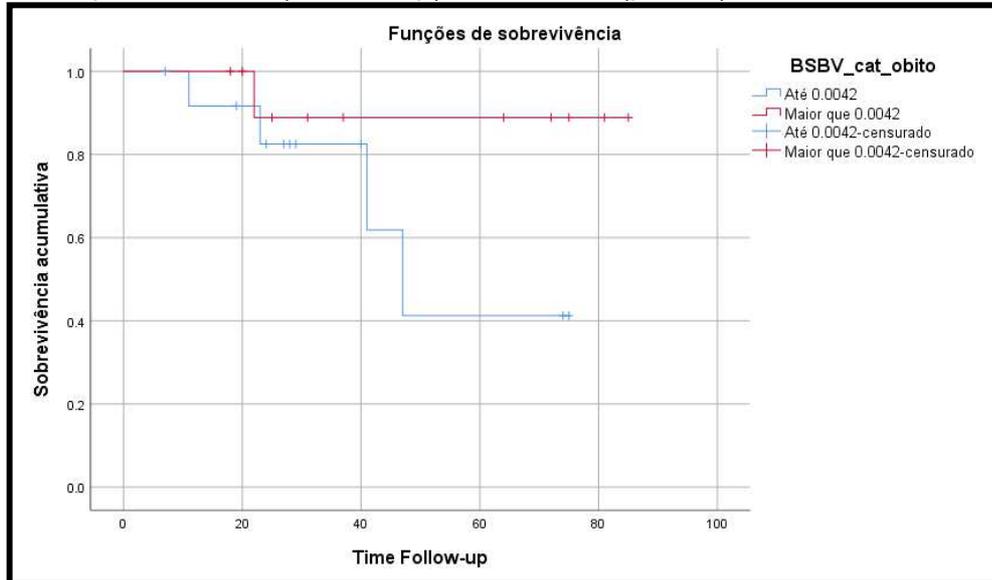
Fonte: A Autora(2022).

**Gráfico 15:** Função de sobrevivência para volume ósseo. A linha em vermelho representa os casos em que o volume ósseo foi maior que 96,67 % e a linha azul se refere aos casos em que o volume ósseo foi de até 96,67 % (p 0,24).



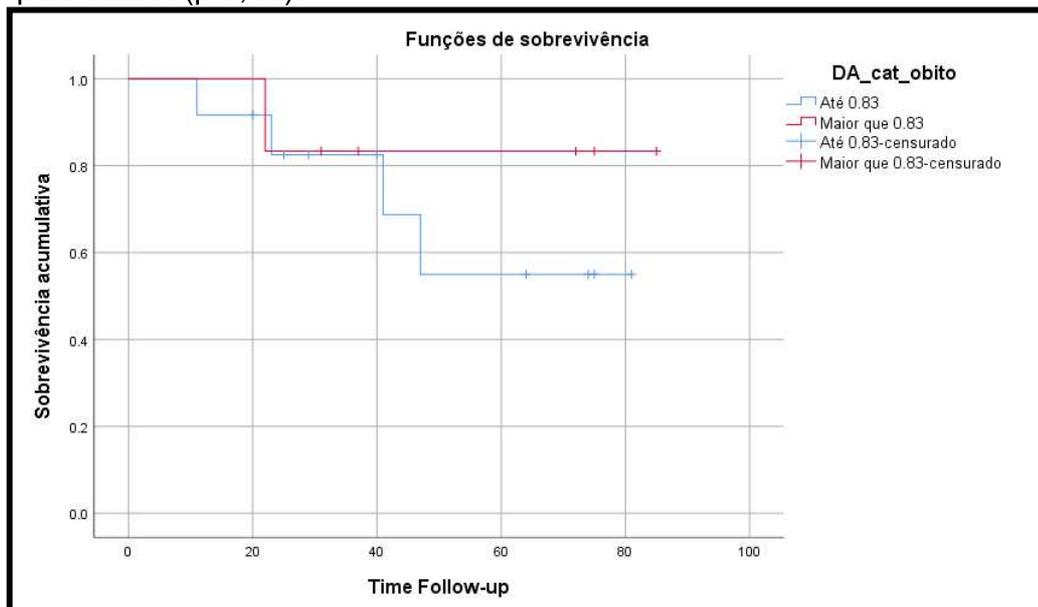
Fonte: A Autora, 2022.

**Gráfico 16:** Função de sobrevivência para superfície óssea. A linha vermelha se refere a amostras que apresentaram superfície óssea de área maior que  $0.0042 \mu\text{m}$  e a azul representa amostras com até  $0,0042 \mu\text{m}$  de superfície óssea. O eixo X representa o acompanhamento (Follow-Up), em meses (p 0,15).



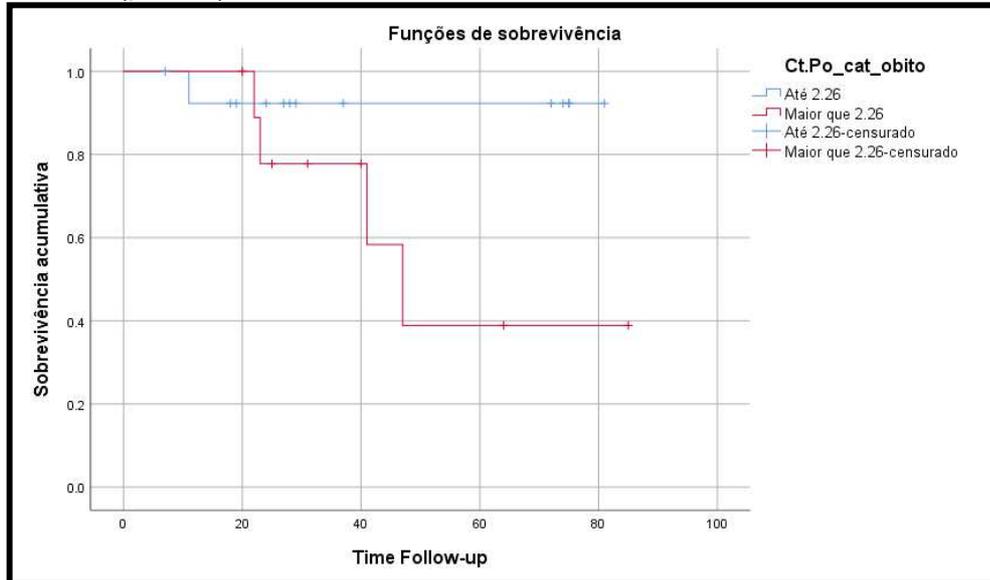
Fonte: A Autora, 2022.

**Gráfico 17:** Função de sobrevivência para o grau de anisotropia. A linha azul representa os casos em que o grau de anisotropia foi de até 0,83 e a linha vermelha se refere àqueles em que foi maior que 0,83. O acompanhamento (Follow-Up) foi realizado em meses, representado pelo eixo X (p 0,48).



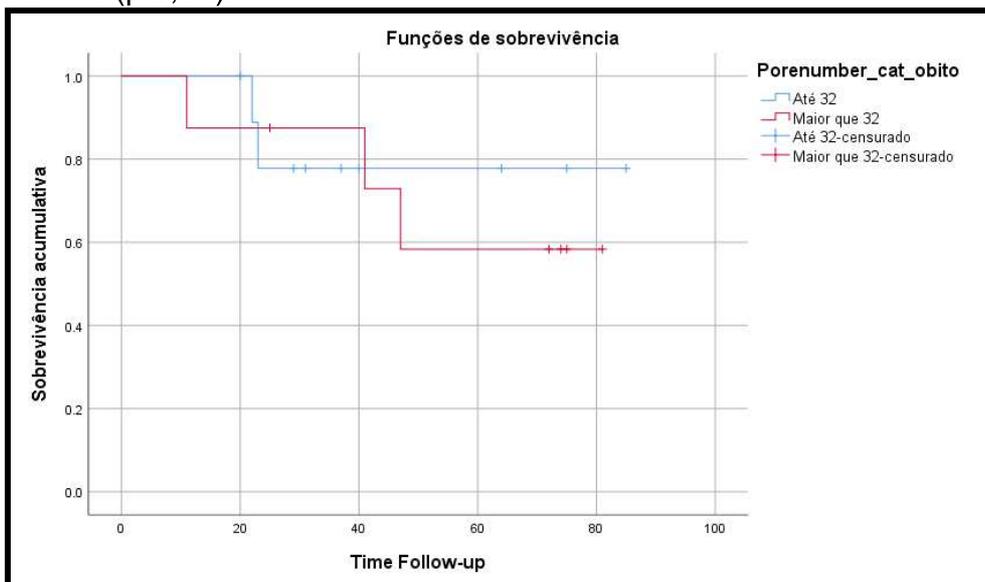
Fonte: A Autora, 2022.

**Gráfico 18:** Função de sobrevivência para porosidade cortical. A linha azul representa os casos em que a porosidade cortical foi de até 2,26 e a linha vermelha se refere aos casos que ultrapassaram tal valor. O eixo X caracteriza o acompanhamento (Follow-Up), em meses (p 0,09).



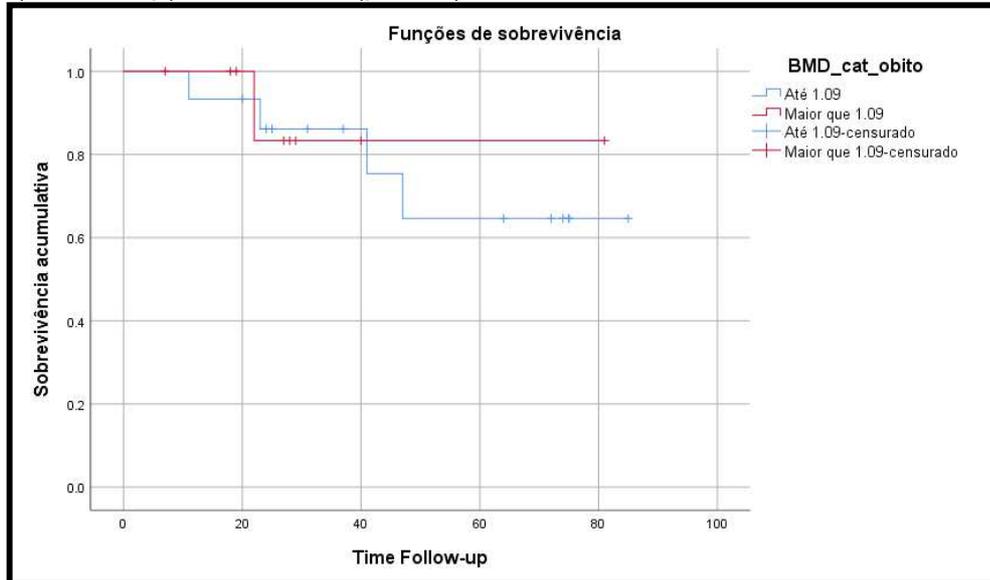
Fonte: A Autora, 2022.

**Gráfico 19:** Função de sobrevivência para número de canais. A linha azul representa os casos com até 32 canais e a linha vermelha se refere aos casos em que as amostras apresentaram mais de 32 canais. O eixo X representa o acompanhamento (Follow-Up), em meses (p 0,74).



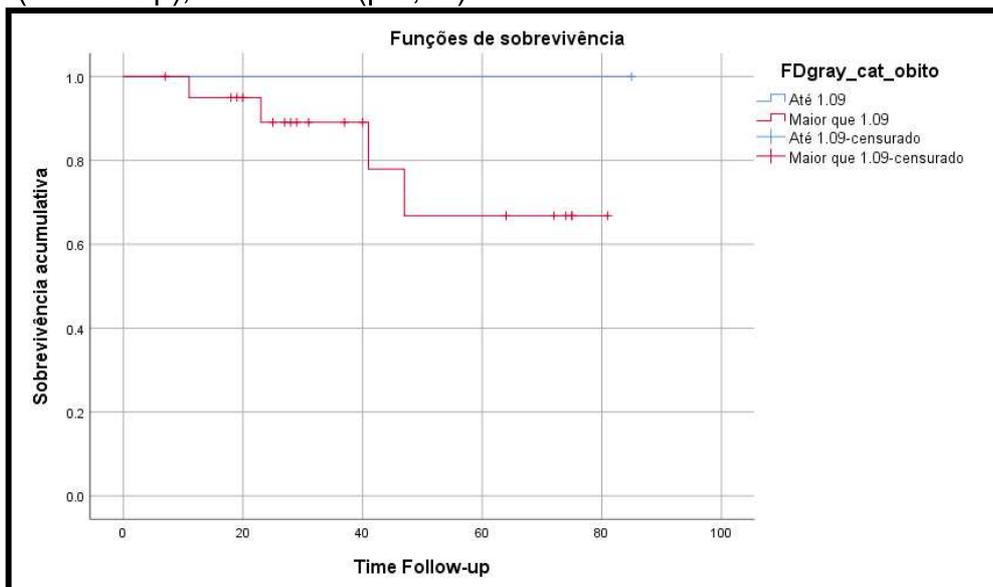
Fonte: A Autora, 2022.

**Gráfico 20:** Função de sobrevivência para densidade mineral óssea. A linha em azul representa os casos em que a densidade mineral óssea foi de até 1,09 e as em vermelho se refere aos casos em que esse valor foi ultrapassado. O eixo X representa o acompanhamento (Follow-Up), em meses (p 0,84).



Fonte: A Autora, 2022.

**Gráfico 21:** Função de sobrevivência para Dimensão Fractal. A linha azul representa os casos em que a dimensão fractal foi de até 1,09 e a linha vermelha representa os casos em que tal parâmetro foi superior a esse valor. O eixo X caracteriza o acompanhamento (Follow-Up), em meses (p 0,53).



Fonte: A Autora, 2022

## 6 DISCUSSÃO

Para o desenvolvimento específico deste estudo, foi selecionado um grupo de pacientes submetidos à mandibulectomia marginal ou segmentar pela possibilidade de se obter material ósseo para as análises molecular e microarquitetural. Nas condições desse estudo, observamos que os pacientes submetidos à mandibulectomia para tratamento de CEO foram mais frequentes no sexo masculino, o que já era esperado de acordo com o que se tem em termos de predominância de carcinoma epidermóide na população brasileira. Considerando a região da lesão de CEO e sua relação em posição com a mandíbula, os sítios tumorais primários estavam predominantemente localizados na região posterior. Sobre a neoplasia em si, houve uma frequência maior de tumores moderadamente diferenciados e com uma média de tamanho de um pouco mais que quatro centímetros. É sabido que as características histopatológicas da lesão estão associadas ao potencial de agressividade do tumor, uma vez que o perfil de diferenciação celular influencia na capacidade de progressão da neoplasia e, conseqüentemente, no seu potencial de agressividade e invasão óssea (SIRIWARDENA et al., 2020).

Considerando as características da neoplasia e sua relação espacial com a mandíbula, em nosso estudo a invasão óssea ocorreu em 33,3% dos casos. Na revisão sistemática e meta-análise de Dolens et al. (2021), que abordou os achados histopatológicos no prognóstico do carcinoma epidermóide, o risco de invasão foi evidenciado em oito estudos, mas apenas três diferenciavam a invasão em cortical e medular. Os autores encontraram um risco de 1,91, incluindo 1.603 pacientes na análise. Outros estudos também relataram que pacientes com invasão óssea apresentaram maiores taxas de razão de risco associadas ao óbito (ASH et al., 2000; DAVID FRIED et al., 2013; EBRAHIMI et al., 2011). Embora nosso estudo tenha identificado uma ausência de significância, sugeriu-se uma tendência estatística, e pode se considerar que o risco relativo de 3,6 vezes maior para invasão óssea poderia ser achado com um número maior de pacientes. De qualquer forma, a intenção era identificar indicadores relacionados ao osso que influenciassem na sobrevida, e o que se encontrou foi que a invasão óssea pode ser um deles, mas que no caso, as características deste estudo foram consideradas, e como não houve análise direta no fronte de invasão e na interface osso e tumor, pode ser que maiores alterações não foram evidenciadas. Na análise deste estudo feita no osso periférico ao CEO, com uma

distância de 5 mm da parte de contato da mandíbula com a lesão, já foi possível observar que existem mudanças para além da invasão óssea propriamente dita, e estas podem sim ter influência na sobrevida.

Nosso estudo apontou que pacientes com idade inferior a 56 anos possuem risco maior de ir ao óbito. O risco relativo foi de 11,3 mais para pacientes abaixo dos 56 anos de idade para a pior sobrevida global, podendo ser afirmado com 95% de confiança que esse risco varia entre 1,1 e 115 vezes ( $p=0,04$ ). Ainda há certa escassez na literatura sobre informações do curso clínico e desenvolvimento de CEO em pacientes jovens, no entanto, os achados deste trabalho foram de encontro com um estudo que evidenciou que mulheres abaixo dos 40 anos apresentam menores taxas de sobrevida devido a maior agressividade do tumor, taxas mais altas de doença recorrente e intervalo menor para recorrência (VARGAS et al., 2000). Já na meta-análise realizada por Lee et al. em 2021 (LEE et al., 2021), incluindo pacientes jovens com até 40 anos de idade e CEO, foi revelado que estes pacientes não apresentaram piores resultados de sobrevida do que pacientes mais velhos após terapia definitiva. Contudo, o mesmo estudo sugere que a idade por si só não é um marcador prognóstico para piores taxas de sobrevida, o que corrobora com o estudo de SU et al. (2019), onde se relatou que o aumento de idade apresentou risco significativamente maior para morte por câncer oral. Enfim, nossos achados mostraram que pacientes menores de 56 anos de idade tem sim um pior desfecho de sobrevida global.

A média de idade dos pacientes no nosso estudo foi de 59,71 anos. Tais achados podem estar relacionados a fatores genéticos (SAXENA et al., 2022), exposição frequente à fatores de risco, como álcool, produtos de maior probabilidade de dependência à nicotina (um dos principais fatores de risco para desenvolvimento do CEO), como tabaco, cigarros eletrônicos, charutos, cachimbo, usuários de narguilé e tabaco sem fumaça (JOHNSON et al., 2018; SUNG et al., 2018). Na maioria dos casos, o CEO é identificado em estágios avançados da doença, levando a adoção de condutas terapêuticas mais radicais, mandibulectomia e ressecções segmentar extensas, indicando piores taxas de sobrevida após a terapia definitiva (KOWALSKI et al., 2005; LEE et al., 2021), reforçando as hipóteses citadas anteriormente.

O tamanho do tumor foi um fator que estava relacionado a sobrevida, ou seja, tumores maiores apresentaram maior risco de óbito. Nesse sentido, o estadiamento é um aspecto que está intimamente ligado a progressão do tamanho do tumor (XIAO et

al., 2018). Um estudo realizado por Mahajan et al. (2022) propôs uma nova classificação de estadiamento, realizando alterações nas classificações propostas pela 8ª edição do AJCC, considerando em estágio T4a apenas tumores com invasão medular, com ou sem envolvimento do canal mandibular e comparou as duas formas de classificações, sugerindo que a última apresenta uma melhor predição para análise de sobrevida. Foi observado por tal análise que a erosão óssea cortical pode não afetar a sobrevida e que apenas a invasão medular afeta o prognóstico. Em nosso estudo, dos 24 casos, 8 apresentaram envolvimento ósseo e apenas 2 pacientes tiveram invasão medular completa comprovada. Pacientes com tumores menores têm melhor prognóstico, e isso enfatiza a importância da detecção precoce (BJERKLI et al., 2020). O tempo entre o início do tratamento está diretamente relacionado a progressão do tumor e um diagnóstico clínico-patológico desfavorável, levando a diminuição da sobrevida dos pacientes (XIAO et al., 2018).

Do ponto de vista molecular, na análise de expressão gênica dos quatro genes analisados, todos envolvidos no metabolismo e remodelação óssea, encontramos que em 9 (RANK: 6 , RANKL: 1, SOST: 2) havia uma situação normal de expressão e em 63 (RANK: 11 , RANKL: 17, OPG: 17, SOST: 18) situações havia a condição de downregulação. A condição de superexpressão gênica não ocorreu em nenhum dos casos analisados para os 4 genes. O microambiente tumoral é complexo e apresenta uma série de vias metabólicas que sinalizam para diversas funções. Nesse sentido, sugere-se que pela ausência de uma superexpressão na totalidade das amostras no osso adjacente a neoplasia, possivelmente as tais proteínas produtos destes genes podem estar sendo disponibilizadas em outras células neste microambiente. Ainda, é provável que uma sinalização pela neoplasia, na interface com o osso, poderia estar disponibilizando diversas destas moléculas no microambiente tumoral. Dessa forma, pode ser que o osso adjacente ao tumor esteja nessa situação de inércia de sinalização, onde a maioria dos genes do osteometabolismo se encontram com expressão baixa, sendo o sistema RANK/RANKL/OPG suprimido neste osso tão perto de uma neoplasia maligna.

Já foi evidenciado que vesículas extracelulares contendo produtos dos genes RANK, RANKL e OPG atuam como reguladores intercelulares e podem estar mediando diversos processos, dentre eles o remodelamento ósseo (HOLLIDAY; PATEL; RODY, 2021). Sabe-se também que estas vesículas podem liberar o ligante indutor de apoptose relacionado ao ligante do fator de necrose tumoral (TRAIL), que induz a

expressão de RANKL em células tumorais e, pode atuar também na modulação da atividade autofágica de células tumorais, desempenhando papel em seu crescimento e na progressão do desenvolvimento tumoral (ETHIRAJ et al., 2020). Neste sentido, mesmo que não pelas células neoplásicas, mas com certeza mediada por elas, é de se pensar que a baixa sinalização na mandíbula próxima ao tumor pode sim estar ligada ao fato que a neoplasia já emite sinais suficientes quando em situação de alteração no microambiente e adequação do meio para a progressão tumoral.

No presente estudo, a OPG, um dos principais reguladores da osteoclastogênese (TIMMEN et al., 2020), que atua como um importante mediador inibitório da sinalização RANK/RANKL (NOZAWA et al., 2018), se apresentou downregulada em todos os casos, reforçando o comportamento sugerido que remete à uma inércia no metabolismo do osso analisado. Talvez fosse de se esperar que os genes relacionados ao metabolismo ósseo estivessem em situações de maior expressão, já que se imagina que existe um processo de remodelação em curso no osso adjacente, que está se adaptando às agressões recebidas pela neoplasia. Mesmo sabendo que nas amostras deste trabalho nem todas tinham invasão óssea francamente comprovada, há de se esperar que estivesse remodelação mínima no osso que tem uma neoplasia maligna em sua proximidade. Sabe-se que a OPG participa de vários processos fisiológicos e patológicos, atuando na homeostase óssea e já foi encontrada em algumas situações expressa em casos de metástase óssea (WANG et al., 2022).

Outro gene que apresentou resultados próximos ao da OPG foi o SOST que codifica a Esclerostina, produzido principalmente por osteócitos, sendo um importante regulador de ação parácrina da sinalização WNT e na atividade de osteoblastos e osteoclastos nas superfícies ósseas (SAPIR-KOREN; LIVSHITS, 2014; WANG; MAZUR; WEIN, 2021). Nossos achados mostraram que o SOST estava em sua maioria em baixa expressão, contrariando as hipóteses iniciais. A Esclerostina é considerada o mais potente inibidor da formação óssea, e em princípio tivemos a hipótese de que o gene SOST estivesse superexpresso, para que ocorresse a invasão tumoral no osso, talvez a Esclerostina estivesse em altos níveis para coibir a formação óssea. No entanto, este achado não ocorreu, e acreditamos que assim como a principal via metabólica estava em baixa sinalização, talvez isso também se refletiu na via do SOST.

Sobre a análise microarquitetural, os resultados obtidos demonstraram que o osso avaliado não apresentou alterações microestruturais comparando os casos com e sem invasão. Um estudo primário do nosso grupo, conduzido por Rabelo et al. (2018),

mostrou que exceto pelo grau de anisotropia, os outros parâmetros arquiteturais não estavam diferentes comparando osso próximo ao tumor e osso da margem. Contando com os achados prévios e os novos achados neste estudo, talvez mudanças significativas ficassem confinadas à interface osso/neoplasia, e não exatamente na adjacência a 5 mm de distância dessa interface. Estes achados da microarquitetura cortical podem ser influentes para a sobrevida livre de doença (desfecho até metástase regional ou recidiva), e não necessariamente impactar na sobrevida global, o que pode ser verificado em estudos futuros.

O estudo em questão foi composto por um grupo homogêneo de pacientes, onde se obedeceu aos critérios de inclusão, sendo selecionados indivíduos com lesão maligna que apresentavam uma relação com a mandíbula, havendo a obrigatoriedade de realização de mandibulectomia, com a possibilidade da coleta de fragmentos ósseos passíveis de análise e que não interferisse no trabalho do médico-patologista (distante da interface osso/tumor). Frente a essa situação, houve uma limitação em relação ao tamanho da amostra, devido a tal especificidade da pesquisa. Ainda, conseguir um tempo considerável de *follow-up* dos pacientes para a análise de sobrevida foi influenciado, entre outros fatores, pela pandemia da COVID-19. Sobre as limitações na análise molecular, a quantidade de material passível de análise e os recursos financeiros disponíveis para a realização do projeto (disponibilidade de alíquotas para o RNA extraído) foram também fatores considerados para uma menor quantidade de amostras.

## 7 CONCLUSÃO

- Conclui-se que há uma situação predominante de downregulação dos genes analisados, o que sugere uma inércia metabólica óssea parcial na mandíbula na região próxima às lesões de carcinoma epidermóide, também pautada na ausência de casos em situação de superexpressão.
- A Osteoprotegerina se apresentou em downregulação em 100% dos casos.
- Pacientes com idade inferior a 56 anos e com tumores de tamanho maior que 6 cm tiveram pior desfecho com piores taxas de sobrevida global.
- Não houve influência da expressão gênica e da microarquitetura na sobrevida global dos pacientes avaliados.

## REFERÊNCIAS

AHMAD, Jumah G.; NAMIN, Arya W.; JORGENSEN, Jeffrey B.; ZITSCH, Robert P.; LAYFIELD, Lester J. Mandibular Invasion by Oral Squamous Cell Carcinoma: Clinicopathologic Features of 74 Cases. **Otolaryngology - Head and Neck Surgery (United States)**, [S. l.], v. 160, n. 6, p. 1034–1041, 2019. ISSN: 10976817. DOI: 10.1177/0194599818821859.

ALMANGUSH, Alhadi; PIRINEN, Matti; YOUSSEF, Omar; MÄKITIE, Antti A.; LEIVO, Ilmo. **Risk stratification in oral squamous cell carcinoma using staging of the eighth American Joint Committee on Cancer: Systematic review and meta-analysis.** **Head and Neck** John Wiley and Sons Inc., 2020. ISSN: 10970347. DOI: 10.1002/hed.26344.

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. ISSN: 1542-4863. DOI: 10.3322/caac.21388.

ASH, Cecil S.; NASON, Richard W.; ABDOH, Ahmed A.; COHEN, Mark A. Prognostic implications of mandibular invasion in oral cancer. **Head and Neck**, [S. l.], v. 22, n. 8, p. 794–798, 2000. ISSN: 10433074. DOI: 10.1002/1097-0347(200012)22:8<794::AID-HED8>3.0.CO;2-W.

BERNIER, J. et al. Postoperative irradiation with or without concomitant chemotherapy for locally advanced head and neck cancer. **Cancer/Radiotherapie**, [S. l.], v. 9, n. 2, p. 203–204, 2005. ISSN: 12783218. DOI: 10.1016/j.canrad.2005.02.001.

BJERKLI, Inger Heidi; HADLER-OLSEN, Elin; NGINAMAU, Elisabeth Sivy; LAURVIK, Helene; SØLAND, Tine M.; COSTEA, Daniela Elena; UHLIN-HANSEN, Lars; STEIGEN, Sonja E. A combined histo-score based on tumor differentiation and lymphocytic infiltrate is a robust prognostic marker for mobile tongue cancer. **Virchows Archiv**, [S. l.], v. 477, n. 6, p. 865–872, 2020. ISSN: 14322307. ISBN: 0042802002875. DOI: 10.1007/s00428-020-02875-9.

CANNING, Madison; GUO, Gang; YU, Miao; MYINT, Calvin; GROVES, Michael W.;

BYRD, James Kenneth; CUI, Yan. **Heterogeneity of the head and neck squamous cell carcinoma immune landscape and its impact on immunotherapy.** *Frontiers in Cell and Developmental Biology* Frontiers Media S.A., 2019. ISSN: 2296634X. DOI: 10.3389/fcell.2019.00052.

CHEN, Yih-Long; KUO, Shih-Wei; FRACS; FANG, Ku-Hao; HAO, Sheng-Po; FICS. PROGNOSTIC IMPACT OF MARGINAL MANDIBULECTOMY IN THE PRESENCE OF SUPERFICIAL BONE INVASION AND THE NONONCOLOGIC OUTCOME. **Head and Neck**, [S. l.], v. 36, n. 10, p. 1391, 2011. ISSN: 10970347. DOI: 10.1002/HED.

CROCKETT, J. C.; ROGERS, M. J.; COXON, F. P.; HOCKING, L. J.; HELFRICH, M. H. Bone remodelling at a glance. **Journal of Cell Science**, [S. l.], v. 124, n. 7, p. 991–998, 2011. ISSN: 0021-9533. DOI: 10.1242/jcs.063032.

D'CRUZ, Anil K. et al. Elective versus Therapeutic Neck Dissection in Node-Negative Oral Cancer. **New England Journal of Medicine**, [S. l.], v. 373, n. 6, p. 521–529, 2015. ISSN: 0028-4793. DOI: 10.1056/nejmoa1506007.

DA SILVA, ERICA FERNANDA PATRICIO; RABELO, GUSTAVO DAVI; PINTO, CLÓVIS ANTONIO LOPES; CALSAVARA, VINICIUS FERNANDO; KOWALSKI, LUIZ PAULO; ALVES, FABIO ABREU. Effect of Mandible Alterations on the Prognosis of Patients With Oral Squamous Cell Carcinoma. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, [S. l.], v. 129, n. 1, p. e149, 2020. ISSN: 22124403. DOI: 10.1016/j.oooo.2019.06.642.

DAVID FRIED, BS; BRANDON MULLINS, BS; MARK WEISSLER, MD; CAROL SHORES, MD, PhD; ADAM ZANATION, MD; TREVOR HACKMAN, MD; WILLIAM SHOCKLEY, MD; NEIL HAYES, MD, MPH; BHISHAMJIT S. CHERA, MD1. Prognostic significance of bone invasion for oral cavity squamous cell carcinoma considered T1/T2 by American Joint Committee on Cancer size criteria. **Head and Neck**, [S. l.], v. 36, n. 10, p. 1391, 2013. ISSN: 10970347. DOI: 10.1002/HED.

DELGADO-CALLE, Jesus; SATO, Amy Y.; BELLIDO, Teresita. Role and mechanism of action of sclerostin in bone. **Bone**, [S. l.], v. 96, p. 29–37, 2017. ISSN: 87563282. DOI: 10.1016/j.bone.2016.10.007.

DESS, Robert T. et al. Association of Black Race with Prostate Cancer-Specific and

Other-Cause Mortality. **JAMA Oncology**, [S. l.], v. 5, n. 7, p. 975–983, 2019. ISSN: 23742445. DOI: 10.1001/jamaoncol.2019.0826.

DOLENS, Eder da Silva; DOURADO, Mauricio Rocha; ALMANGUSH, Alhadi; SALO, Tuula A.; GURGEL ROCHA, Clarissa Araujo; DA SILVA, Sabrina Daniela; BRENNAN, Peter A.; COLETTA, Ricardo D. The Impact of Histopathological Features on the Prognosis of Oral Squamous Cell Carcinoma: A Comprehensive Review and Meta-Analysis. **Frontiers in Oncology**, [S. l.], v. 11, n. November, p. 1–13, 2021. ISSN: 2234943X. DOI: 10.3389/fonc.2021.784924.

DOUGALL, William C. RANKL signaling in bone physiology and cancer. **Current Opinion in Supportive and Palliative Care**, [S. l.], v. 1, n. 4, p. 317–322, 2007. ISSN: 1751-4258. DOI: 10.1097/spc.0b013e3282f335be.

EBRAHIMI, Ardalan; MURALI, Rajmohan; GAO, Kan; ELLIOTT, Michael S.; CLARK, Jonathan R. The Prognostic and Staging Implications of Bone Invasion in Oral Squamous Cell Carcinoma. [S. l.], p. 4460–4467, 2011. DOI: 10.1002/cncr.26032.

ETHIRAJ, Purushoth; SAMBANDAM, Yuvaraj; HATHAWAY-SCHRADER, Jessica D.; HAQUE, Azizul; NOVINCE, Chad M.; REDDY, Sakamuri V. RANKL triggers resistance to TRAIL-induced cell death in oral squamous cell carcinoma. **Journal of Cellular Physiology**, [S. l.], v. 235, n. 2, p. 1663–1673, 2020. ISSN: 10974652. DOI: 10.1002/jcp.29086.

FORASTIERE, Arlene A. et al. Use of larynx-preservation strategies in the treatment of laryngeal cancer: American society of clinical oncology clinical practice guideline update. **Journal of Clinical Oncology**, [S. l.], v. 36, n. 11, p. 1143–1169, 2018. ISSN: 15277755. DOI: 10.1200/JCO.2017.75.7385.

GASSER, Jürg Andreas; KNEISSEL, Michaela. **Bone physiology and biology**. [s.l.: s.n.]. ISSN: 21684235. ISBN: 9783319561929. DOI: 10.1007/978-3-319-56192-9\_2.

GOU, L.; YANG, W.; QIAO, X.; YE, L.; YAN, K.; LI, L.; LI, C. Marginal or segmental mandibulectomy: treatment modality selection for oral cancer: a systematic review and meta-analysis. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, [S. l.], v. 47, n. 1, p. 1–10, 2018. ISSN: 13990020. DOI: 10.1016/j.ijom.2017.07.019.

HOFFMANNOVÁ, J.; FOLTÁN, R.; VLK, M.; ŠIPOŠ, M.; HORKÁ, E.; PAVLÍKOVÁ, G.; KUFA, R.; BULÍK, O.; ŠEDÝ, J. Hemimandibulectomy and therapeutic neck

dissection with radiotherapy in the treatment of oral squamous cell carcinoma involving mandible: a critical review of treatment protocol in the years 1994-2004. **International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, [S. l.], v. 39, n. 6, p. 561–567, 2010. ISSN: 09015027. DOI: 10.1016/j.ijom.2010.03.010.

HOLLIDAY, L. Shannon; PATEL, Shivani S.; RODY, Wellington J. RANKL and RANK in extracellular vesicles: surprising new players in bone remodeling. **Extracell Vesicles Circ Nucl Acids**, [S. l.], n. 2, p. 18–28, 2021. ISBN: 0000000000. DOI: 10.20517/evcna.2020.02.RANKL.

HUANG, Shao Hui; O’SULLIVAN, Brian. **Overview of the 8th Edition TNM Classification for Head and Neck Cancer. Current Treatment Options in Oncology** Springer New York LLC, 2017. ISSN: 15346277. DOI: 10.1007/s11864-017-0484-y.

IKEBUCHI, Yuki et al. Coupling of bone resorption and formation by RANKL reverse signalling. **Nature**, [S. l.], v. 561, n. 7722, p. 195–200, 2018. ISSN: 14764687. ISBN: 4158601804827. DOI: 10.1038/s41586-018-0482-7. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1038/s41586-018-0482-7>.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. **Estimativa Incidência de Câncer no Brasil - Biênio 2018-2019Inca**. [s.l: s.n.]. ISBN: 9788573182361. DOI: 978-85-7318-194-4.

JIMI, E.; FURUTA, H.; MATSUO, K.; TOMINAGA, K.; TAKAHASHI, T.; NAKANISHI, O. The cellular and molecular mechanisms of bone invasion by oral squamous cell carcinoma. **Oral Diseases**, [S. l.], p. 462–468, 2011. DOI: 10.1111/j.1601-0825.2010.01781.x.

JOHNSON, Amanda L.; COLLINS, Lauren K.; VILLANTI, Andrea C.; PEARSON, Jennifer L.; NIAURA, Raymond S. Patterns of nicotine and tobacco product use in youth and young adults in the United States, 2011-2015. **Nicotine and Tobacco Research**, [S. l.], v. 20, p. S48–S54, 2018. ISSN: 1469994X. DOI: 10.1093/ntr/nty018.

JOHNSON, Daniel E.; BURTNES, Barbara; LEEMANS, C. René; LUI, Vivian Wai Yan; BAUMAN, Julie E.; GRANDIS, Jennifer R. **Head and neck squamous cell carcinoma. Nature Reviews Disease Primers** Nature Research, 2020. ISSN: 2056676X. DOI: 10.1038/s41572-020-00224-3.

JOHNSON, Nigel R.; GANNON, Orla M.; SAVAGE, Neil W.; BATSTONE, Martin D. Frequency of odontogenic cysts and tumors: a systematic review. *[S. l.]*, p. 1–6, 2013. DOI: 10.1111/jicd.12044.

JONES, Dallas; GLIMCHER, Laurie H.; ALIPRANTIS, Antonios O. Science in medicine Osteoimmunology at the nexus of arthritis, osteoporosis, cancer, and infection. **Clinical Therapeutics**, *[S. l.]*, v. 121, n. 7, 2011. DOI: 10.1172/JCI46262.2534.

KOWALSKI, Luiz Paulo; CARVALHO, André Lopes; MARTINS PRIANTE, Antonio Vitor; MAGRIN, José. Predictive factors for distant metastasis from oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, *[S. l.]*, v. 41, n. 5, p. 534–541, 2005. ISSN: 13688375. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2005.01.012.

LEE, David S. et al. Survival of Young Versus Old Patients With Oral Cavity Squamous Cell Carcinoma: A Meta-Analysis. **Laryngoscope**, *[S. l.]*, v. 131, n. 6, p. 1310–1319, 2021. ISSN: 15314995. DOI: 10.1002/lary.29260.

LEE, Nicholas C. J.; KELLY, Jacqueline R.; PARK, Henry S.; AN, Yi; JUDSON, Benjamin L.; BURTNESS, Barbara A.; HUSAIN, Zain A. Patterns of failure in high-metastatic node number human papillomavirus-positive oropharyngeal carcinoma. **Oral Oncology**, *[S. l.]*, v. 85, n. April, p. 35–39, 2018. ISSN: 18790593. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2018.08.001.

LIVAK, Kenneth J.; SCHMITTGEN, Thomas D. Analysis of relative gene expression data using real-time quantitative PCR and the 2- $\Delta\Delta$ CT method. **Methods**, *[S. l.]*, v. 25, n. 4, p. 402–408, 2001. ISSN: 10462023. DOI: 10.1006/meth.2001.1262.

LUBEK, Joshua; EL-HAKIM, Michel; SALAMA, Andrew R.; LIU, Xinggang; ORD, Robert A. Gingival carcinoma: Retrospective analysis of 72 patients and indications for elective neck dissection. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, *[S. l.]*, v. 49, n. 3, p. 182–185, 2011. ISSN: 02664356. DOI: 10.1016/j.bjoms.2010.04.005. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bjoms.2010.04.005>.

MAHAJAN, Abhishek et al. Prognostic Impact of Pattern of Mandibular Involvement in Gingivo-Buccal Complex Squamous Cell Carcinomas: Marrow and Mandibular Canal Staging System. **Frontiers in Oncology**, *[S. l.]*, v. 11, p. 1–11, 2022. ISSN:

2234-943X. DOI: 10.3389/fonc.2021.752018. Disponível em: <https://www.frontiersin.org/article/10.3389/fonc.2021.752018>.

MICHALEK, Jaroslav; BRYCHTOVA, Svetlana; PINK, Richard; DVORAK, Zdenek. Prognostic and predictive markers for perineural and bone invasion of oral squamous cell carcinoma. **Biomedical Papers**, [S. l.], v. 163, n. 4, p. 302–308, 2019. ISSN: 18047521. DOI: 10.5507/bp.2019.032.

MING, Jie; CRONIN, Shane J. F.; PENNINGER, Josef M. **Targeting the RANKL/RANK/OPG Axis for Cancer Therapy**. **Frontiers in Oncology** Frontiers Media S.A., 2020. ISSN: 2234943X. DOI: 10.3389/fonc.2020.01283.

NAKASHIMA, Tomoki; HAYASHI, Mikihiro; TAKAYANAGI, Hiroshi. **New insights into osteoclastogenic signaling mechanisms**. **Trends in Endocrinology and Metabolism** 2012. ISSN: 10432760. DOI: 10.1016/j.tem.2012.05.005.

NEVILLE, Brad W.; DAMM, Douglas D.; ALLEN, Carl M.; BOUQUOT, Jerry E. **Patologia Oral e Maxilofacial**. [s.l.] : Elsevier, 2016. ISBN: 9788535265644.

NOZAWA, Satoshi; INUBUSHI, Toshihiro; IRIE, Fumitoshi; TAKIGAMI, Iori; MATSUMOTO, Kazu; SHIMIZU, Katsujji; AKIYAMA, Haruhiko; YAMAGUCHI, Yu. Osteoblastic heparan sulfate regulates osteoprotegerin function and bone mass. **JCI insight**, [S. l.], v. 3, n. 3, p. 1–13, 2018. ISSN: 23793708. DOI: 10.1172/jci.insight.89624.

OKAMOTO, Kazuo; NAKASHIMA, Tomoki; SHINOHARA, Masahiro; NEGISHI-KOGA, Takako; KOMATSU, Noriko; TERASHIMA, Asuka; SAWA, Shinichiro; NITTA, Takeshi; TAKAYANAGI, Hiroshi. OSTEOIMMUNOLOGY: THE CONCEPTUAL FRAMEWORK UNIFYING THE IMMUNE AND SKELETAL SYSTEMS. **Physiol Rev**, [S. l.], v. 97, p. 1295–1349, 2017. DOI: 10.1152/physrev.00036.2016.-The. Disponível em: [www.prv.org](http://www.prv.org).

OLIVIERI, Eloisa Helena Ribeiro; DE ANDRADE FRANCO, Luana; PEREIRA, Rafael Gomes; CARVALHO MOTA, Louise Danielle; CAMPOS, Antônio Hugo J. F. M.; CARRARO, Dirce Maria. Biobanking practice: RNA storage at low concentration affects integrity. **Biopreservation and Biobanking**, [S. l.], v. 12, n. 1, p. 46–52, 2014. ISSN: 19475535. DOI: 10.1089/bio.2013.0056.

ONO, Takehito; HAYASHI, Mikihiro; SASAKI, Fumiyuki; NAKASHIMA, Tomoki.

**RANKL biology: Bone metabolism, the immune system, and beyond. Inflammation and Regeneration** BioMed Central Ltd., 2020. ISSN: 18808190. DOI: 10.1186/s41232-019-0111-3.

PATASZ, Paulina; ADAMSKI, Łukasz; GÓRSKA-CHRZĄSTEK, Magdalena; STARZYŃSKA, Anna; STUDNIAREK, Michał. Contemporary diagnostic imaging of oral squamous cell carcinoma – A review of literature. **Polish Journal of Radiology**, [S. l.], v. 82, p. 193–202, 2017. ISSN: 18990967. DOI: 10.12659/PJR.900892.

PATIL, V. M. et al. Neoadjuvant chemotherapy followed by surgery in very locally advanced technically unresectable oral cavity cancers. **Oral Oncology**, [S. l.], v. 50, n. 10, p. 1000–1004, 2014. ISSN: 18790593. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2014.07.015. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2014.07.015>.

PORCHERI, Cristina; MEISEL, Christian Thomas; MITSIADIS, Thimios. Multifactorial contribution of notch signaling in head and neck squamous cell carcinoma. **International Journal of Molecular Sciences**, [S. l.], v. 20, n. 6, p. 1–25, 2019. ISSN: 14220067. DOI: 10.3390/ijms20071520.

RABELO, Gustavo Davi; COUTINHO-CAMILLO, Claudia; KOWALSKI, Luiz Paulo; PORTERO-MUZY, Nathalie; ROUX, Jean Paul; CHAVASSIEUX, Pascale; ALVES, Fabio Abreu. Evaluation of cortical mandibular bone in patients with oral squamous cell carcinoma. **Clinical Oral Investigations**, [S. l.], 2018 a. ISSN: 14363771. ISBN: 1436-3771 (Electronic)1432-6981 (Linking). DOI: 10.1007/s00784-017-2153-8.

RABELO, Gustavo Davi; ROUX, Jean Paul; PORTERO-MUZY, Nathalie; GINEYTS, Evelyne; CHAPURLAT, Roland; CHAVASSIEUX, Pascale. Cortical Fractal Analysis and Collagen Crosslinks Content in Femoral Neck After Osteoporotic Fracture in Postmenopausal Women: Comparison with Osteoarthritis. **Calcified Tissue International**, [S. l.], v. 102, n. 6, p. 644–650, 2018 b. ISSN: 14320827. ISBN: 0123456789. DOI: 10.1007/s00223-017-0378-9. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1007/s00223-017-0378-9>.

RENEMA, Nathalie; NAVET, Benjamin; HEYMANN, Marie Françoise; LEZOT, Frédéric; HEYMANN, Dominique. RANK-RANKL signalling in cancer. **Bioscience Reports**, [S. l.], v. 36, n. 4, p. 1–17, 2016. ISSN: 15734935. DOI:

10.1042/BSR20160150.

RIVERA, César. **Essentials of oral cancer**. *International Journal of Clinical and Experimental Pathology* 2015. ISSN: 19362625. DOI: 10.5281/zenodo.192487.

SAKA-HERRÁN, Constanza; JANÉ-SALAS, Enric; MARI-ROIG, Antoni; ESTRUGO-DEVESA, Albert; LÓPEZ-LÓPEZ, José. Time-to-treatment in oral cancer: Causes and implications for survival. *Cancers*, [S. l.], v. 13, n. 6, p. 1–13, 2021. ISSN: 20726694. DOI: 10.3390/cancers13061321.

SAMBANDAM, Yuvaraj; ETHIRAJ, Purushoth; HATHAWAY-SCHRADER, Jessica D.; NOVINCE, Chad M.; PANNEERSELVAM, Ezhil; SUNDARAM, Kumaran; REDDY, Sakamuri V. Autoregulation of RANK ligand in oral squamous cell carcinoma tumor cells. *Journal of Cellular Physiology*, [S. l.], v. 233, n. 8, p. 6125–6134, 2018. ISSN: 10974652. DOI: 10.1002/jcp.26456.

SAPIR-KOREN, R.; LIVSHITS, G. Osteocyte control of bone remodeling: is sclerostin a key molecular coordinator of the balanced bone resorption-formation cycles? *Osteoporosis International*, [S. l.], p. 2685–2700, 2014. ISSN: 0937941X. DOI: 10.1007/s00198-014-2808-0.

SAXENA, Rituja; PRASOODANAN P K, Vishnu; GUPTA, Sonia Vidushi; GUPTA, Sudheer; WAIKER, Prashant; SAMAIYA, Atul; SHARMA, Ashok K.; SHARMA, Vineet K. Assessing the Effect of Smokeless Tobacco Consumption on Oral Microbiome in Healthy and Oral Cancer Patients. *Frontiers in Cellular and Infection Microbiology*, [S. l.], v. 12, n. March, p. 1–20, 2022. DOI: 10.3389/fcimb.2022.841465.

SEMĚNOV, Mikhail; TAMAI, Keiko; HE, Xi. SOST is a ligand for LRP5/LRP6 and a Wnt signaling inhibitor. *Journal of Biological Chemistry*, [S. l.], v. 280, n. 29, p. 26770–26775, 2005. ISSN: 00219258. DOI: 10.1074/jbc.M504308200.

SEOANE, Juan; PITA-FERNÁNDEZ, Salvador; GÓMEZ, Iria; VAZQUEZ, Inés; LÓPEZ-CEDRÚN, José Luis; DE AGUSTIN, Domingo; VARELA-CENTELLES, Pablo. **Proliferative activity and diagnostic delay in oral cancer**. *Head and Neck* 2010. ISSN: 10433074. DOI: 10.1002/hed.21338.

SINGH, Arjun; MAIR, Manish; SINGHVI, Hitesh; MAHUVAKAR, Ankit; NAIR, Deepa; NAIR, Sudhir; CHATURVEDI, Pankaj. Incidence, predictors and impact of positive

bony margins in surgically treated T4 stage cancers of the oral cavity. **Oral Oncology**, [S. l.], v. 90, n. November 2018, p. 8–12, 2019. ISSN: 18790593. DOI: 10.1016/j.oraloncology.2019.01.011. Disponível em: <https://doi.org/10.1016/j.oraloncology.2019.01.011>.

SIRIWARDENA, B. S. M. S.; KARUNATHILAKA, H. D. N. U.; KUMARASIRI, P. V. R.; TILAKARATNE, W. M. Impact of Histological and Molecular Parameters on Prognosis of Oral Squamous Cell Carcinoma: Analysis of 290 Cases. **BioMed Research International**, [S. l.], v. 2020, 2020. ISSN: 23146141. DOI: 10.1155/2020/2059240.

SU, William Wang Yu et al. Impact of varying anatomic sites on advanced stage and survival of oral cancer: 9-year prospective cohort of 27 717 cases. **Head and Neck**, [S. l.], v. 41, n. 5, p. 1475–1483, 2019. ISSN: 10970347. DOI: 10.1002/hed.25579.

SUNG, Hai Yen; WANG, Yingning; YAO, Tingting; LIGHTWOOD, James; MAX, Wendy. Polytobacco use and nicotine dependence symptoms among US adults, 2012-2014. **Nicotine and Tobacco Research**, [S. l.], v. 20, p. S88–S98, 2018. ISSN: 1469994X. DOI: 10.1093/ntr/nty050.

TANVETYANON, Tawee; PADHYA, Tapan; MCCAFFREY, Judith; KISH, Julie A.; DECONTI, Ronald C.; TROTTI, Andy; RAO, Nikhil G. Postoperative concurrent chemotherapy and radiotherapy for high-risk cutaneous squamous cell carcinoma of the head and neck. **Wiley Online Library**, [S. l.], v. 36, n. 10, 2014. ISSN: 10970347. DOI: 10.1002/HED.

TIMMEN, Melanie; HIDDING, Heriburg; GÖTTE, Martin; KHASSAWNA, Thaqif El; KRONENBERG, Daniel; STANGE, Richard. The heparan sulfate proteoglycan Syndecan-1 influences local bone cell communication via the RANKL/OPG axis. **Scientific Reports**, [S. l.], v. 10, n. 1, p. 1–12, 2020. ISSN: 20452322. ISBN: 0123456789. DOI: 10.1038/s41598-020-77510-3. Disponível em: <https://doi.org/10.1038/s41598-020-77510-3>.

URIBE, S.; ROJAS, L. A.; ROSAS, C. F. Accuracy of imaging methods for detection of bone tissue invasion in patients with oral squamous cell carcinoma. **Dentomaxillofacial Radiology**, [S. l.], v. 42, n. 6, 2013. ISSN: 0250832X. DOI: 10.1259/dmfr.20120346.

VAASSEN, Laretta A. A.; SPEEL, Ernst Jan M.; KESSLER, Peter A. W. H. Bone invasion by oral squamous cell carcinoma: Molecular alterations leading to osteoclastogenesis – a review of literature. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, [S. l.], v. 45, n. 9, p. 1464–1471, 2017. ISSN: 18784119. DOI: 10.1016/j.jcms.2017.04.012. Disponível em: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jcms.2017.04.012>.

VAN BEZOOIJEN, Rutger L. et al. Sclerostin Is an Osteocyte-expressed Negative Regulator of Bone Formation, but Not a Classical BMP Antagonist. **Journal of Experimental Medicine**, [S. l.], v. 199, n. 6, p. 805–814, 2004. ISSN: 00221007. DOI: 10.1084/jem.20031454.

VARGAS, Hannah; PITMAN, Karen T.; JOHNSON, Jonas T.; GALATI, Lisa T. More aggressive behavior of squamous cell carcinoma of the anterior tongue in young women. **Laryngoscope**, [S. l.], v. 110, n. 10, p. 1623–1626, 2000. ISSN: 0023852X. DOI: 10.1097/00005537-200010000-00009.

WANG, Jialiang S.; MAZUR, Courtney M.; WEIN, Marc N. **Sclerostin and Osteocalcin: Candidate Bone-Produced Hormones**. **Frontiers in Endocrinology** Frontiers Media S.A., 2021. ISSN: 16642392. DOI: 10.3389/fendo.2021.584147.

WANG, Yufei; LIU, Yiyang; HUANG, Zhao; CHEN, Xiaoping; ZHANG, Bixiang. The roles of osteoprotegerin in cancer , far beyond a bone player. **Official journal of CDDpress**, [S. l.], n. April, p. 1–9, 2022. ISBN: 4142002201. DOI: 10.1038/s41420-022-01042-0.

WANG, Zezheng; ZHANG, Shuang; PU, Yumei; WANG, Yuxin; LIN, Zitong; WANG, Zhiyong. Accuracy of cone-beam computed tomography for the evaluation of mandible invasion by oral squamous cell carcinoma. **BMC Oral Health**, [S. l.], v. 21, n. 1, p. 1–8, 2021. ISSN: 14726831. DOI: 10.1186/s12903-021-01567-3. Disponível em: <https://doi.org/10.1186/s12903-021-01567-3>.

XIAO, Roy; WARD, Matthew C.; YANG, Kailin; ADELSTEIN, David J.; KOYFMAN, Shlomo A.; PRENDES, Brandon L.; BURKEY, Brian B. Increased pathologic upstaging with rising time to treatment initiation for head and neck cancer: A mechanism for increased mortality. **Cancer**, [S. l.], v. 124, n. 7, p. 1400–1414, 2018.

ISSN: 10970142. DOI: 10.1002/cncr.31213.

YAN, Flora et al. The evolution of care of cancers of the head and neck region: State of the science in 2020. **Cancers**, [S. l.], v. 12, n. 6, p. 1–24, 2020. ISSN: 20726694. DOI: 10.3390/cancers12061543.

YUE, Lauren E. et al. Oral squamous carcinoma: Aggressive tumor pattern of invasion predicts direct mandible invasion. **Head and Neck**, [S. l.], v. 42, n. 11, p. 3171–3178, 2020. ISSN: 10970347. DOI: 10.1002/hed.26360.

## ANEXO 1



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** Avaliação do osso mandibular em pacientes com lesões benignas e malignas da cavidade oral

**Pesquisador:** Gustavo Davi Rabelo

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 85555618.3.1001.5147

**Instituição Proponente:** FACULDADE DE ODONTOLOGIA

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

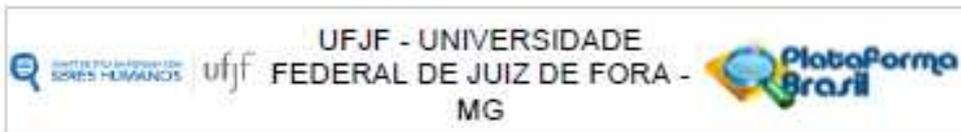
#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 2.757.535

#### Apresentação do Projeto:

O presente estudo prospectivo consta de uma análise multimodal de amostras ósseas advindas de pacientes com lesões benignas e malignas da cavidade oral que apresentem envolvimento mandibular. Após a cirurgia de ressecção ou cirurgia de acesso, amostras ósseas serão obtidas na mandíbula em área adjacente às lesões neoplásicas para o grupo teste, e amostras para o grupo controle serão obtidas em osso normal no momento cirúrgico da osteotomia para acesso aos dentes que serão extraídos. De cada paciente serão coletados dados no prontuário e ficha clínica, respeitando critérios de ética em pesquisa, não permitindo subsequente identificação dos mesmos. Todos os pacientes assinarão termo de consentimento livre e esclarecido concordando em participar do estudo e serão classificados e categorizados, obedecendo aos critérios de inclusão e exclusão. Todas as amostras serão exaustivamente avaliadas por técnicas de microtomografia, histomorfometria, imunistoquímica, microscopia de força atômica e análise dos microdanos. O projeto será realizado na Instituição proponente com a participação de duas outras instituições coparticipantes. Apresentação do projeto está clara, detalhada de forma objetiva, descreve as bases científicas que justificam o estudo, estando de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12 de 2012, item III.

**Endereço:** JOSE LOURENCO KELMER S/N  
**Bairro:** SAO PEDRO **CEP:** 38.038-900  
**UF:** MG **Município:** JUIZ DE FORA  
**Telefone:** (32)2102-3788 **Fax:** (32)1102-3788 **E-mail:** cep.propesq@ufjf.edu.br



Continuação do Parecer: 2.757.535

**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:**

O objetivo do presente projeto é avaliar o tecido ósseo adjacente às neoplasias orais em relação à morfologia e comportamento celular, na tentativa de identificar alterações estruturais, presença de microdanos e alterações na expressão de proteínas envolvidas no turnover ósseo.

**Objetivo Secundário:**

- Análise da microarquitetura
  - Avaliação da microarquitetura do osso cortical e trabecular por meio de microtomografia e histomorfometria, com complementação pelas técnicas de análise de textura, para comparação entre os grupos teste (benignas e malignas) e entre grupo teste e controle.
- Análise do conteúdo mineral
  - Avaliação do conteúdo mineral e do colágeno por meio de espectroscopia FTIR e histologia nos grupos teste e controle.
- Análise do conteúdo e comportamento celular
  - Avaliação qualitativa e quantitativa dos osteócitos (quantidade, localização, tamanho das lacunas, interconectividade), expressão das proteínas RANK, RANKL e OPG, avaliação de osteoblastos e osteoclastos (quantidade e localização) nos grupos teste e controle.
- Análise dos microdanos
  - Avaliação da presença dos microdanos (microcracks) por meio de análise em luz fluorescente e luz polarizada, e microscopia confocal, em osso não-desmineralizado incluído em metimetacrilato nos grupos teste e controle.
- Análise da rugosidade superficial
  - Avaliação da rugosidade por meio de microscopia de força atômica nos grupos teste e controle.
- Correlação dos resultados com os dados clínico-demográficos.

Os objetivos da pesquisa estão claros bem delineados, apresenta clareza e compatibilidade com a proposta, tendo adequação da metodologia aos objetivos pretendido, de acordo com as atribuições definidas na Norma Operacional CNS 001 de 2013, Item 3.4.1 - 4.

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

Para os pacientes com lesão benigna ou do grupo controle poderá haver um desconforto mínimo decorrente da cirurgia, como por exemplo desconfortos inerentes à procedimentos de cirurgia oral menor, dentre eles presença de hematoma, dor, infecção ou edema. No entanto, a remoção das amostras ósseas não aumenta ou potencializa esse desconforto. De toda forma, cuidados pós-operatórios serão tomados conforme protocolo de atendimento padrão da Instituição, incluindo

Endereço: JOSE LOURENCO KELMER S/N  
 Bairro: SAO PEDRO CEP: 36.036-900  
 UF: MG Município: JUIZ DE FORA  
 Telefone: (32)2102-3788 Fax: (32)1102-3788 E-mail: cep.propesq@ufjf.edu.br



Continuação do Parecer: 2.757.535

prescrição de medicamentos para prevenção de infecções e controle da dor. Para os pacientes com lesão maligna não haverá nenhum desconforto para o paciente relacionado à coleta, uma vez que nestes casos o estudo se concentra na remoção e avaliação de fragmentos ósseos removidos diretamente da peça cirúrgica ressecada, onde no caso, não haverá coleta direta de material no paciente. Reitera-se que este paciente do grupo de lesões malignas estão sendo atendidos em um centro de Oncologia, e passam por este tipo de tratamento com todos cuidados e manobras necessárias para correta condução do caso, incluindo internação em Unidade de Terapia Intensiva no pós-cirúrgico e acompanhamento por equipe multiprofissional até o final do tratamento. Para ambos os grupos existe um risco mínimo de identificação do paciente, que será evitado utilizando códigos de identificação nas tabelas, fichas e planilhas no desenvolvimento do projeto e em nenhum momento será utilizado o nome ou outros dados pessoais do participante. Os benefícios quanto à realização do trabalho são relacionados a um melhor entendimento da interação que acontece entre neoplasia e osso adjacente, na tentativa de identificar possíveis manobras futuras que poderão vir a serem empregadas na prevenção da invasão óssea nos casos de neoplasias malignas em sítios orais ou na progressão das neoplasias benignas. Ainda, com os conhecimentos adquiridos, existe um benefício direto à sociedade, por meio de criação de material de propriedade intelectual na literatura científica mundial.

Identificação dos riscos e as possibilidades de desconfortos e benefícios esperados, estão adequadamente descritos. A avaliação dos Riscos e Benefícios estão de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466/12 de 2012, Itens III; III.2 e V.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

O projeto está bem estruturado, delineado e fundamentado, sustenta os objetivos do estudo em sua metodologia de forma clara e objetiva, e se apresenta em consonância com os princípios éticos norteadores da ética na pesquisa científica envolvendo seres humanos elencados na resolução 466/12 do CNS e com a Norma Operacional Nº 001/2013 CNS.

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

O protocolo de pesquisa está em configuração adequada, apresenta FOLHA DE ROSTO devidamente preenchida, com o título em português, identifica o patrocinador pela pesquisa, estando de acordo com as atribuições definidas na Norma Operacional CNS 001 de 2013 item 3.3 letra a; e 3.4.1 item 16. Apresenta o TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE ESCLARECIDO em linguagem clara para compreensão dos participantes, apresenta justificativa e objetivo, campo para identificação do participante, descreve de forma suficiente os procedimentos, informa que uma das vias do TCLE será entregue aos participantes, assegura a liberdade do participante recusar

Endereço: JOSE LOURENCO KELMER S/N  
 Bairro: SAO PEDRO CEP: 36.036-000  
 UF: MG Município: JUIZ DE FORA  
 Telefone: (32)2102-3788 Fax: (32)1102-3788 E-mail: cep.procesq@ufjf.edu.br



Continuação do Parecer: 2.757.535

ou retirar o consentimento sem penalidades, garante sigilo e anonimato, explicita riscos e desconfortos esperados, indenização diante de eventuais danos decorrentes da pesquisa, contato do pesquisador e do CEP e informa que os dados da pesquisa ficarão arquivados com o pesquisador pelo período de cinco anos, de acordo com as atribuições definidas na Resolução CNS 466 de 2012, Itens: IV letra b; IV.3 letras a, b, d, e, f, g e h; IV. 5 letra d e XI.2 letra f. O Pesquisador apresenta titulação e experiência compatível com o projeto de pesquisa, estando de acordo com as atribuições definidas no Manual Operacional para CPEs. Apresenta DECLARAÇÃO de infraestrutura e de concordância com a realização da pesquisa de acordo com as atribuições definidas na Norma Operacional CNS 001 de 2013 Item 3.3 letra h.

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

Diante do exposto, o projeto está aprovado, pois está de acordo com os princípios éticos norteadores da ética em pesquisa estabelecido na Res. 466/12 CNS e com a Norma Operacional Nº 001/2013 CNS. Data prevista para o término da pesquisa: março de 2020.

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Diante do exposto, o Comitê de Ética em Pesquisa CEP/UFJF, de acordo com as atribuições definidas na Res. CNS 466/12 e com a Norma Operacional Nº 001/2013 CNS, manifesta-se pela APROVAÇÃO do protocolo de pesquisa proposto. Vale lembrar ao pesquisador responsável pelo projeto, o compromisso de envio ao CEP de relatórios parciais e/ou total de sua pesquisa informando o andamento da mesma, comunicando também eventos adversos e eventuais modificações no protocolo.

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1092872.pdf	04/07/2018 14:08:21		Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_GrupoTestUFJF_R1.doc	22/05/2018 08:45:47	Gustavo Davi Rabelo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento /	TCLE_GrupoTesteACCamargo.doc	21/05/2018 16:06:26	Gustavo Davi Rabelo	Aceito

Endereço: JOSE LOURENCO KELMER S/N  
 Bairro: SAO PEDRO CEP: 36.036-900  
 UF: MG Município: JUIZ DE FORA  
 Telefone: (32)1102-3788 Fax: (32)1102-3788 E-mail: cep.propesq@ufjf.edu.br



Continuação do Parecer: 2.757.538

Justificativa de Ausência	TCLE_GrupoTesteACCamargo.doc	21/05/2018 16:06:26	Gustavo Davi Rabelo	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_UFJF.docx	21/05/2018 15:48:24	Gustavo Davi Rabelo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_GrupoControleUFJF_R1.doc	21/05/2018 15:47:28	Gustavo Davi Rabelo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_UFU.pdf	16/03/2018 11:38:06	Gustavo Davi Rabelo	Aceito
Declaração de Pesquisadores	Declaracao_ACCamargo.pdf	16/03/2018 11:37:51	Gustavo Davi Rabelo	Aceito
Outros	Termo_sigilo.pdf	14/03/2018 16:35:35	Gustavo Davi Rabelo	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto_final.pdf	14/03/2018 16:31:27	Gustavo Davi Rabelo	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

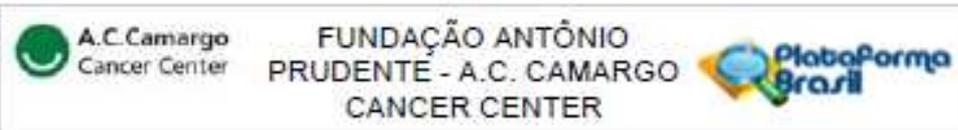
JUIZ DE FORA, 05 de Julho de 2018

Assinado por:

Patricia Aparecida Fontes Vieira  
(Coordenador)

Endereço: JOSE LOURENCO KELMER S/N  
Bairro: SAO PEDRO CEP: 36.038-900  
UF: MG Município: JUIZ DE FORA  
Telefone: (32)2102-3788 Fax: (32)1102-3788 E-mail: cep.propesq@ufjf.edu.br

## ANEXO 2



**PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**

Elaborado pela Instituição Coparticipante

**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

**Título da Pesquisa:** Avaliação do osso mandibular em pacientes com lesões benignas e malignas da cavidade oral

**Pesquisador:** Gustavo Davi Rabelo

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 85565618.3.3001.5432

**Instituição Proponente:** FUNDACAO ANTONIO PRUDENTE

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

**DADOS DO PARECER**

**Número do Parecer:** 3.195.138

**Apresentação do Projeto:**

Trata-se de estudo prospectivo que se propõe a realizar "análise multimodal de amostras ósseas advindas de pacientes com lesões benignas e malignas da cavidade oral que apresentem envolvimento mandibular (...) obtidas na mandíbula em área adjacente às lesões neoplásicas para o grupo teste", e, para o grupo controle, "em osso normal no momento cirúrgico da osteotomia para acesso aos dentes que serão extraídos"

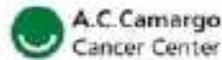
**Objetivo da Pesquisa:**

**Objetivo Primário:** "avaliar o tecido ósseo adjacente às neoplasias orais em relação a morfologia e comportamento celular, na tentativa de identificar alterações estruturais, presença de microdanos e alterações na expressão de proteínas envolvidas no turnover ósseo"

**Objetivo Secundário:**

- "avaliação da microarquitetura do osso cortical e trabecular por meio de microtomografia e histomorfometria, com complementação pelas técnicas de análise de textura, para comparação entre os grupos teste (benignas e malignas) e entre grupo teste e controle";
- "avaliação do conteúdo mineral e do colágeno por meio de espectroscopia FTIR e histologia nos grupos teste e controle";

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211  
 Bairro: Liberdade CEP: 01.509-900  
 UF: SP Município: SAO PAULO  
 Telefone: (11)2180-5020 Fax: (11)2180-5020 E-mail: cep\_hcancer@accamargo.org.br



FUNDAÇÃO ANTÔNIO  
PRUDENTE - A.C. CAMARGO  
CANCER CENTER



Continuação do Parecer: 3.195.138

entre outros

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:**

**Benefícios:**

- "melhor entendimento da interação que acontece entre neoplasia e osso adjacente, na tentativa de identificar possíveis manobras futuras que poderão vir a serem empregadas na prevenção da invasão óssea nos casos de neoplasias malignas em sítios orais ou na progressão das neoplasias benignas";
- "criação de material de propriedade intelectual na literatura científica mundial";

**Riscos:**

- "desconforto mínimo decorrente da cirurgia (...) No entanto, a remoção das amostras ósseas não aumenta ou potencializa esse desconforto."
- "risco mínimo de identificação do paciente, que será evitado utilizando códigos de identificação nas tabelas, fichas e planilhas no desenvolvimento do projeto (...)."

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:**

As pendências apontadas foram respondidas:

- Os critérios de inclusão e exclusão foram esclarecidos;
- A lista de informações a serem coletadas foi anexada: "provém de uma ficha clínica que foi anexada junto ao projeto".

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

O TCLE foi revisto e citação à eventual acesso à amostras genéticas foi retirada do mesmo, assim como ao arquivamento e descarte de dados pessoais após 5 anos.

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

**Aprovação**

**Considerações Finais a critério do CEP:**

Nota: Informações a respeito do andamento do referido projeto deverão ser encaminhadas ao CEP dentro de 06 meses a partir desta data em relatório (modelo CEP).

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
informações	PE_INFORMAÇÕES_BASICAS_DO_P	13/02/2019		Aceito

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211  
 Bairro: Liberdade CEP: 01.500-900  
 UF: SP Município: SÃO PAULO  
 Telefone: (11)2180-5020 Fax: (11)2180-5020 E-mail: cep\_hcancer@accamargo.org.br



FUNDAÇÃO ANTÔNIO  
PRUDENTE - A.C. CAMARGO  
CANCER CENTER



Continuação do Parecer: 3.195.135

Básicas do Projeto	ETO_1175211.pdf	12:45:27		Aceito
Outros	Ficha_projeto.doc	13/02/2019 12:44:14	Gustavo Davi Rabelo	Aceito
Recurso Anexado pelo Pesquisador	Carta_resposta2.pdf	13/02/2019 12:43:55	Gustavo Davi Rabelo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	tclea_3.doc	13/02/2019 12:42:33	Gustavo Davi Rabelo	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_R2.docx	13/02/2019 12:42:14	Gustavo Davi Rabelo	Aceito
Folha de Rosto	Folhaderosto.pdf	13/12/2018 12:43:55	Gustavo Davi Rabelo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_GrupoTesteUFJF_R1.doc	22/05/2018 08:45:47	Gustavo Davi Rabelo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_GrupoTesteACCamargo.doc	21/05/2018 16:06:26	Gustavo Davi Rabelo	Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_UFJF.docx	21/05/2018 15:48:24	Gustavo Davi Rabelo	Aceito
TCLE / Termos de Assentimento / Justificativa de Ausência	TCLE_GrupoControleUFJF_R1.doc	21/05/2018 15:47:26	Gustavo Davi Rabelo	Aceito
Outros	Termo_sigilo.pdf	14/03/2018 16:35:35	Gustavo Davi Rabelo	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

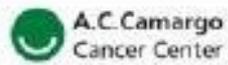
Necessita Apreciação da CONEP:

Não

SAO PAULO, 13 de Março de 2019

Assinado por:  
MICHELE CHRISTINE LANDEMBERGER  
(Coordenador(a))

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211  
Bairro: Liberdade CEP: 01.500-000  
UF: SP Município: SAO PAULO  
Telefone: (11)2180-5020 Fax: (11)2180-5020 E-mail: cep\_cancer@accamargo.org.br



A.C. Camargo  
Cancer Center

FUNDAÇÃO ANTÔNIO  
PRUDENTE - A.C. CAMARGO  
CANCER CENTER



Continuação do Pacar: 3.195.135

Endereço: Rua Professor Antônio Prudente, 211  
Bairro: Liberdade CEP: 01.509-900  
UF: SP Município: SAO PAULO  
Telefone: (11)2189-5020 Fax: (11)2189-5020 E-mail: cep\_hcancer@accamargo.org.br

Página 04 de 04