



MONIQUE DE JESUS E SILVA SANTOS

Câncer Oral: marcadores celulares para diagnóstico complementar

DUQUE DE CAXIAS

Dezembro

2020

MONIQUE DE JESUS E SILVA SANTOS

Câncer Oral: marcadores celulares para diagnóstico complementar

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação em Biomedicina Translacional (PPG-BIOTRANS), como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Biomédicas.

Orientador:

Prof. Vivaldo Moura Neto

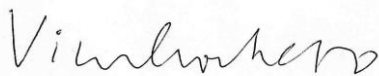
DUQUE DE CAXIAS

Dezembro

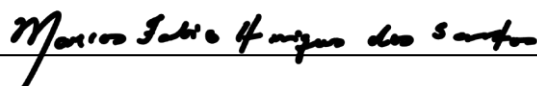
2020

Monique de Jesus e Silva Santos

Dissertação de mestrado apresentada ao Programa de Pós-graduação (PPG-BIOTRANS), como parte dos requisitos para a obtenção do Título de Mestre em Ciências Biomédicas.



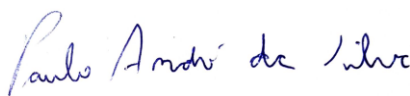
Prof. Dr. Vivaldo Moura Neto (Orientador)
Universidade do Grande Rio – UNIGRANRIO



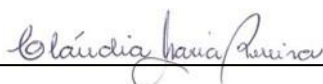
Prof. Dr. Marcos Fabio Henriques dos Santos
Universidade Federal do Rio de Janeiro -UFRJ



Profª Dra. Juliana de Mattos Coelho Aguiar
Universidade Federal do Rio de Janeiro -UFRJ



Prof. Dr. Paulo André da Silva
Universidade do Grande Rio – UNIGRANRIO



Profª. Dra. Cláudia Maria Pereira
(Revisor e suplente interno)
Universidade do Grande Rio – UNIGRANRIO

Prof. Dr. Sergian Vianna Cardoso
Coordenadora Geral do Programa de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional
(PPGBIOTRANS)

Aos meus familiares e amigos que com
simples gestos incentivaram, apoiaram e
acima de tudo acreditaram neste projeto.

Santos, Monique de Jesus e Silva

Câncer Oral: marcadores celulares para diagnóstico complementar.

Monique de Jesus e Silva Santos-2020.89 fls:il;30 cm

Dissertação de Mestrado (Curso de Pós-Graduação em Biomedicina Translacional) –Programa de Pós-graduação em Biomedicina. —Universidade do Grande Rio "Prof. José de Souza Herdy. Escola de ciências da Saúde,2020.

Orientadores PHD Vivaldo Moura Neto

PhD Natália Roberta Roque

Bibliografia f.69-86

1.Câncer oral. 2. Carcinoma de células escamosas oral. 3. Biomarcadores. 4.Sangue periférico. I. PHD Vivaldo Moura Neto-Brasil; PhD Natália Roberta Roque-Brasil. II. Universidade do Grande Rio "Prof. José de Souza Herdy. III. Mestrado

AGRADECIMENTOS

Chegar ao término de uma dissertação de mestrado não se trata de uma tarefa fácil. Exige muita dedicação, horas de estudos e ausências. Admito que, inicialmente, o mestrado era o meu projeto “desafio”. Queria vivenciar o meio da pesquisa, buscar novos conhecimentos e novas experiências de vida, entretanto, agora já ao término desta jornada, vejo que foi muito além do que esperava, acima das expectativas.

Todo esforço valeu a pena. E foi muito gratificante porque durante esta caminhada pude contar com o apoio de pessoas sensacionais, que foram e são importantíssimas para a culminância deste projeto. Pessoas que além do enorme conhecimento científico e técnico, são encorajadoras. Pessoas que nas horas mais difíceis, de desânimo e de total descrença se mostraram firmes e acolhedoras. E a essas pessoas venho demonstrar minha profunda gratidão.

À Deus declaro os meus primeiros agradecimentos. Nos diversos momentos onde acreditei não haver soluções para os problemas que surgiam, Ele, com sua maestria, foi colocando tudo no seu lugar e dando sentido a todas as coisas.

Ao meu orientador, Dr. Vivaldo Moura Neto, deixo os meus agradecimentos especiais, pelo acolhimento, constante aprendizado e apoio emocional. Sempre detentor das palavras de conforto e dos bons olhos e ouvidos quando os meus me tornaram cego e surdo, meu muitíssimo obrigado.

Pela orientação, por compartilhar conhecimentos, pelo carinho, incentivo e preocupação, meus mais sinceros agradecimentos aos Doutores, Cláudia Maria Pereira, Luiz Carlos Moreira, Natalia Roque e Vânia do Carmo Rodrigues. Vocês foram a chama que manteve acesa a determinação de ir além, de enfrentar os obstáculos, de prosseguir.

Pela parceria e disponibilidade, agradeço a Dra Aline Helen da Silva e Dra Leila Chimelli.

Aos mestres que participaram deste momento acadêmico, compartilhando seus saberes e que através dos quais lapidaram e moldaram o profissional que serei a partir deste momento, muito melhor que outrora havia sido, meus sinceros agradecimentos e votos que possamos nos reencontrar.

Aos meus pais, irmã, cunhado e esposo meus pedidos de desculpas por inúmeras ausências e meus agradecimentos pela compreensão, acolhimento e amor que a mim dedicaram.

Ao Grupo Fleury de Medicina Diagnóstica e aos colegas da Hematologia, não poderia deixar de agradecer as palavras de conforto, as flexibilidades de horário e acima de tudo, a torcida. É maravilhoso saber que posso contar com vocês.

Agradeço aos colegas do Laboratório do Instituto Estadual do Cérebro por me acolherem e por toda ajuda disponibilizada.

À minha amiga e companheira de projeto Livia Monteiro de Avellar meus agradecimentos pelo dia-a-dia, pelas trocas de experiências, pelos instantes de pura descontração e por estar dividindo comigo alegrias e aflições.

Por fim, neste momento, peço perdão aqueles que tenham contribuído nesta jornada e que porventura eu possa não ter agradecido adequadamente. Trata-se de um momento de grande emoção. Desejo sinceramente, com profundo sentimento de gratidão dividir os méritos desta conquista, porque ela pertence muito mais a vocês que a mim.

“A tarefa não é tanto ver aquilo que ninguém viu,
mas pensar o que ninguém ainda pensou sobre
aquilo que todo mundo vê.”

Arthur Schopenhauer

RESUMO

O câncer oral (CO) ocupa a 17^a posição dentre os cânceres mais incidentes no mundo. O consumo de tabaco e álcool estão diretamente relacionados com o desenvolvimento desta doença. A biópsia diagnóstica seguida do estudo histopatológico das lesões constitui o “padrão ouro” para o diagnóstico do CO. Trata-se de uma abordagem bastante invasiva, e por vezes, realizada nos estágios avançados da doença. Assim ressalta-se a importância da identificação de métodos de diagnósticos ou auxiliares no prognóstico do CO que sejam menos traumáticos, de baixo custo e mais acessíveis a toda população. Deste modo, o objetivo desta pesquisa foi avaliar se o sangue periférico constitui uma ferramenta auxiliar no diagnóstico do CO, através de uma análise morfológica e quantitativa de seus elementos figurados. Além disso, propôs-se também a identificação de linfócitos T regulatórios (Tregs) nas amostras de tecido destes pacientes com o objetivo de identificar o perfil de linfócitos predominantes no CO bem como compreender o papel dos Tregs nessa patologia. Para isso foi analisado o sangue periférico de 16 pacientes admitidos na Clínica de Estomatologia da Unigranrio e no Centro de Especialidades Odontológicas do Centro de Saúde Anibal Viriato de Azevedo, São João de Meriti, sendo 11 portadores de CCEO e 5 portadores de lesões não carcinoma de células escamosas oral (LCOs). Como resultados observamos alterações quantitativas embora não tenham sido observadas significâncias estatísticas ($p < 0,05$) nos neutrófilos ($p = 0,1127$), linfócitos ($p = 0,4278$), VCM ($p = 0,0699$) e RDW ($p = 0,4941$). Observou-se também o aumento da média da razão neutrófilos-linfócitos (RNL) em pacientes com CCEO quando comparados com pacientes LCOs (CCEO média = 4,77 e LCOs média = 2,10, $p = 0,2339$). Ainda, identificamos a presença de Tregs em material de biópsia de um paciente com CCEO, o que pode indicar a participação destas células neste tipo de tumor. A ausência de significância estatística pode ser resultado do reduzido número amostral analisado. Dessa forma, os dados gerados no presente estudo poderão servir de base para o desenvolvimento de pesquisas mais amplas com o objetivo de caracterizar as alterações hematológicas no sangue periférico assim como o papel da presença dos Tregs de forma a auxiliar no diagnóstico, prognóstico e na sobrevida dos pacientes com CO.

Dessa forma, os dados gerados no presente estudo poderão servir de base para o desenvolvimento de pesquisas mais amplas com o objetivo de caracterizar as alterações hematológicas no sangue periférico e bem como o papel da presença dos Tregs como forma a auxiliar no diagnóstico, prognóstico e na sobrevida no CO.

Palavras-chave: câncer oral, carcinoma de células escamosas oral, biomarcadores, sangue periférico.

ABSTRACT

Oral cancer (OC) ranks 17th among the most incident cancers in the world. Tobacco and alcohol consumption are directly related to the development of this disease. The diagnostic biopsy followed by the histopathological study of the lesions constitutes the “gold standard” for the diagnosis of OC. It is a very invasive approach, and sometimes performed in the advanced stages of the disease. Thus, the importance of identifying diagnostic or auxiliary methods in the prognosis of OC that are less traumatic, low cost and more accessible to the entire population is emphasized. Thus, the objective of this research was to evaluate whether peripheral blood constitutes an auxiliary tool in the diagnosis of OC, through a morphological and quantitative analysis of its figured elements. In addition, it was also proposed to identify regulatory T lymphocytes (Tregs) in the tissue samples of these patients with the aim to identify the lymphocyte profile in OC as well as to understand the Tregs role in this pathology. For this, it was analyzed the peripheral blood of 16 patients admitted at the Stomatology Clinic of Unigranrio and at the Dental Specialties Center of the Centro de Saúde Anibal Viriato de Azevedo, São João de Meriti, 11 patients with OSCC and 5 patients with non-oral squamous cell carcinoma (LCOs) lesions (NOSCC). As a result, we observed quantitative changes although no statistical significance ($p < 0.05$) was found in neutrophils ($p = 0.1127$), lymphocytes ($p = 0.4278$), MCV ($p = 0.0699$) and RDW ($p = 0.4941$). We observed an increase in the neutrophil lymphocyte ratio (RNL) mean in patients with OSCC when compared with NOSCC patients (mean OSCC = 4.77 and mean NOSCC = 2.10, $p = 0.2339$). Yet, we identify the presence of Tregs from a OSCC patient biopsy, which may indicate the participation of these cells in this type of tumor. The lack of statistical significance may be result of the small sample size analyzed. Thus, the data generated in this study may provide a basis for the development of a wider research with the aim to characterize hematologic alterations in peripheric blood as well as the role of Treg presence as a way to assist the diagnosis, prognosis and survival in OC patients.

Key words: oral cancer, oral squamous cell carcinoma, biomarkers, peripheral blood.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	<i>Incidência mundial de câncer da cavidade oral e lábios em ambos os gêneros e todas as idades.</i>	2
Figura 2	<i>Mortalidade mundial de casos de câncer oral e lábios em ambos os gêneros e todas as idades</i>	3
Figura 3	<i>Estimativa da incidência de câncer, de acordo com o gênero, para o ano de 2020</i>	4
Figura 4	<i>Manifestações clínicas do câncer de cavidade oral</i>	6
Figura 5	<i>Linfadenopatia cervical em um paciente portador de CCEO</i>	6
Figura 6	<i>Lesões orais potencialmente malignas</i>	8
Figura 7	<i>Características das displasias orais epiteliais</i>	9
Figura 8	<i>Capacidades adquiridas pelas células durante o desenvolvimento tumoral</i>	10
Figura 9	<i>Aspecto histopatológico de um CCEO bem diferenciado</i>	12
Figura 10	<i>Adenocarcinoma Polimorfo de Baixo Grau</i>	14
Figura 11	<i>Aspectos histológicos do adenocarcinoma polimorfo de baixo grau</i>	15
Figura 12	<i>Carcinoma verrucoso em língua</i>	16
Figura 13	<i>Aspecto histológico do carcinoma verrucoso</i>	17
Figura 14	<i>Líquen plano reticular</i>	18
Figura 15	<i>Líquen plano erosivo</i>	18
Figura 16	<i>Corte histológico de lesão por líquen plano</i>	19
Figura 17	<i>Diferenciação dos linfócitos nTregs e iTregs</i>	25
Figura 18	<i>Fluxograma de trabalho</i>	30
Figura 19	<i>Diagrama informativo sobre o grupo de pacientes analisados</i>	31
Figura 20	<i>Localização anatômica da lesão oral</i>	38
Figura 21	<i>Análise histopatológica das amostras analisadas neste estudo</i>	39
Figura 22	<i>Análise morfológica das células do sangue periférico dos pacientes com CCEO e LCOs</i>	41

Figura 23	<i>Análise do leucograma dos pacientes analisados neste estudo</i>	42
Figura 24	<i>Avaliação quantitativa do número de plaquetas dos pacientes analisados neste estudo</i>	43
Figura 25	<i>Avaliação dos eritrócitos dos pacientes analisados neste estudo</i>	44
Figura 26	<i>Análise quantitativa da Leucometria global, diferencial leucocitária e plaquetas dos pacientes com CCEO</i>	46
Figura 27	<i>Análise quantitativa do eritrograma dos pacientes com CCEO</i>	48
Figura 28	<i>Análise quantitativa da Leucometria global, diferencial leucocitária e plaquetas dos pacientes com LCOs</i>	51
Figura 29	<i>Análise quantitativa do eritrograma dos pacientes com LCOs</i>	53
Figura 30	<i>Análise comparativa da série branca celular dos pacientes com CCEO e LCOs</i>	56
Figura 31	<i>Análise comparativa da série vermelha celular dos pacientes com CCEO e LCOs</i>	58
Figura 32	<i>Análise da razão neutrófilo-linfócito entre os pacientes com CCEO e LCOs</i>	60
Figura 33	<i>Imunofluorescência para Foxp3+ em biópsia de paciente com CCEO</i>	61

LISTA DE QUADROS e TABELAS

Quadro 1	<i>Classificação do Câncer Oral realizada segundo os critérios do Sistema American Joint Committee on Cancer</i>	13
Tabela 1	<i>Dados clinicopatológicos dos pacientes com CCEO e LCOs incluídos nesse estudo</i>	37
Tabela 2	<i>Distribuição do grau de diferenciação histopatológica dos pacientes com CCEO incluídos no estudo</i>	40
Tabela 3	<i>Presença de linfonodos cervicais positivos em pacientes portadores de CCEO</i>	40
Tabela 4	<i>Análise da correlação dos parâmetros celulares com o gênero dos pacientes diagnosticados CCEO</i>	49
Tabela 5	<i>Análise da correlação dos parâmetros celulares com o gênero dos pacientes diagnosticados LCOs</i>	54
Tabela 6	<i>Estatística descritiva dos pacientes com CCEO</i>	57
Tabela 7	<i>Estatística descritiva dos pacientes com LCOs</i>	59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACK	Do inglês, <i>Ammonium Chloride Potassium</i>
AJCC	Do inglês, <i>American Joint Committee on Cancer</i>
APGB	Adenocarcinoma polimorfo de baixo grau
CCEO	Carcinoma de células escamosas oral
CCL22	Do inglês, <i>C-C-motif ligand 22</i>
CCR	Do inglês, <i>C-C chemokine receptor</i>
CD	Do inglês, <i>Cluster of differentiation</i>
CDK6	Do inglês, <i>Cyclin dependente kinase 6</i>
CO	Câncer Oral
CTLA-4	Do inglês, <i>Cytotoxic T-lymphocyte antigen-4</i>
CV	Carcinoma verrucoso
DMSO	Dimetilsulfóxido
DNA	Ácido desoxirribonucleico
EDTA	Ácido etilenodiaminotetracético
EGFR	Do inglês, <i>Epidermal growth factor receptor</i>
ELISA	Do inglês, <i>Enzyme-linked immunosorbent assay</i>
FoxP3	Do inglês, <i>Forkhead box P3</i>
GITR	Do inglês, <i>Glucocorticoid-induced tumor necrosis fator</i>
GM-CSF	Do inglês, <i>Macrophage colony-stimulating fator</i>
HCV	Do inglês, <i>Hepatitis C virus</i>
HGB	Do inglês, <i>Hemoglobin</i>
HLA-DR	Do inglês, <i>Human leucocyte antigen</i>
HPV	Do inglês, <i>Human papillomavirus</i>
IL	Interleucina
INF- γ	Interferon-gama
LCOs	Lesões da cavidade oral não carcinoma de células escamosas oral
IPEX	Do inglês, <i>immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, x linked</i>
iTregs	Linfócitos T regulatórios induzidos
LCOs	Lesões na cavidade oral não carcinoma de células escamosas
LLC-B	Leucemia linfocítica crônica de linfócitos B

LOPMs	Lesões orais pré-malignas
LP	Líquen plano
LT	Leucócitos T
MCP-1	Do inglês, <i>Monocyte Chemoattractant Protein-1</i>
MHC	Complexo principal de histocompatibilidade
miRNAs	Micro RNAs
NK	Do inglês, <i>Natural killer</i>
nTregs	Células T regulatórias naturais
PAAF	Punção aspirativa por agulha fina
PAS	Ácido periódico de Schiff
PBS	Do inglês, <i>Phosphate buffered saline</i>
PDCD4	Do inglês, <i>Programmed cell death protein 4</i>
PLT	Do inglês, <i>Platelet</i>
PPG	Programa de pós-Graduação em Biomedicina translacional
PTEN	Do inglês, <i>Phosphatase and tensin homolog</i>
pTregs	Linfócitos T regulatórios periféricos
RBC	Do inglês, <i>Red blood cell count</i>
RLM	Relação linfócito/monócito
RNA	Ácido ribonucleico
RNL	Relação neutrófilos/linfócitos
TAMs	Macrófagos associados ao tumor
TCR	Receptor de células T
TGF-β	Do inglês, <i>Transforming growth factor beta</i>
TGF-α	Do inglês, <i>Transforming growth factor alpha</i>
Th	Do inglês, <i>T helper cell</i>
TNFR-2	Do inglês, <i>Tumor necrosis fator receptor-2</i>
TNF-α	Do inglês, <i>Fator de necrose tumoral-α</i>
TPM1	Do inglês, <i>Tropomyosin 1</i>
Tregs	Linfócitos T regulatórios
TSG p16	Do inglês, <i>Tumor suppressor genes protein 16</i>
TSG p53	Do inglês, <i>Tumor suppressor genes protein</i>
tTregs	Linfócitos T regulatórios oriundos do timo
UNIGRANRIO	Universidade do Grande Rio

VEGF	Do inglês, Vascular endothelial growth factor
WBC	Do inglês, <i>White blood cells</i>
WHO	Do inglês, <i>World Health Organization</i>

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	1
1.1	<i>Carcinoma de Células Escamosas Oral (CCEO)</i>	2
1.1.1	<i>Epidemiologia</i>	2
1.1.2	<i>Fatores etiológicos do CCEO</i>	4
1.1.3	<i>Fisiopatologia do CCEO</i>	5
1.1.4	<i>Diagnóstico e estadiamento clínico do CCEO</i>	11
1.2	<i>Lesões na cavidade oral não carcinoma de células escamosas (LCOs)</i>	13
1.2.1	<i>Adenocarcinoma polimorfo de baixo grau (APBG)</i>	13
1.2.2	<i>Carcinoma Verrucoso (CV)</i>	15
1.2.3	<i>Líquen plano Bucal (LPB)</i>	17
2	<i>Métodos diagnósticos atuais</i>	19
2.1	<i>Avaliação do sangue periférico</i>	19
2.2	<i>Os monócitos e o câncer oral</i>	20
2.3	<i>Neutrófilos e razão neutrófilo/linfócito (RNL) no câncer oral</i>	21
2.4	<i>Linfócitos T regulatórios (Tregs) e o fator de transcrição forkhead box protein P3 (Foxp3)</i>	22
3	<i>O papel dos Linfócitos T regulatórios (Tregs) nas neoplasias malignas</i>	25
2	JUSTIFICATIVA	28
3	OBJETIVOS	29
3.1	<i>Objetivo Geral</i>	29
3.2	<i>Objetivos Específicos</i>	29
4	METODOLOGIA	30
4.1	<i>Desenho do Estudo</i>	30
4.2	<i>Casuística</i>	30

4.3	<i>Coleta de Sangue</i>	32
4.4	<i>Coleta de fragmento da lesão</i>	32
4.5	<i>Extensão sanguínea para avaliação microscópica da morfologia celular</i>	32
4.6	<i>Determinação quantitativa dos elementos presentes em sangue periférico</i>	33
4.7	<i>Determinação e análise dos linfócitos T regulatórios em biópsias</i>	34
4.8	<i>Análise de dados</i>	35
5	RESULTADOS	36
5.1	<i>Avaliação clínica dos pacientes com CCEO e LCOs</i>	36
5.2	<i>Diagnóstico histológico da lesão para classificação em CCEO ou LCOs</i>	39
5.3	<i>Análise da morfológica das células que constituem o sangue periférico de pacientes com CCEO e LCOs</i>	40
5.4	<i>Análise quantitativa global dos parâmetros avaliados no hemograma</i>	41
5.5	<i>Análise comparativa entre os parâmetros avaliados no hemograma dos pacientes com CCEO e os valores de referência amplamente utilizados</i>	45
5.6	<i>Análise comparativa entre os parâmetros avaliados no hemograma dos pacientes com LCOs e os valores de referência amplamente utilizados</i>	50
5.7	<i>Análise comparativa entre os parâmetros avaliados no hemograma dos pacientes com CCEO e LCOs</i>	55
5.8	<i>Análise da razão neutrófilo- linfócito nos pacientes CCEO e LCOs</i>	59
5.9	<i>Avaliação da presença de Tregs em biópsia de lesão por CCEO</i>	60
6	DISCUSSÃO	62
7	CONCLUSÃO	68
8	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

ANEXO I: <i>Termo de consentimento livre e esclarecido</i>	87
ANEXO II: <i>Questionário utilizado para anamnese</i>	88
ANEXO III: <i>Valores de referência comumente utilizados para análise do perfil de resultados do hemograma completo</i>	89

1 INTRODUÇÃO

O câncer é considerado a segunda principal causa de óbito mundial, sendo que em 2018 foram relatadas de 9,6 milhões de mortes por esta patologia (WORLD HEALTH ORGANIZATION, 2018). Segundo o INCA 2020, no Brasil entre 2020 e 2022 haverá 625 mil novos casos de câncer.

Os cânceres de cabeça e pescoço possuem uma grande incidência mundial (CURADO *et al.*, 2016; GUPTA *et al.*, 2016) e são classificados de acordo com a área anatômica acometida, sendo câncer da cavidade oral, da faringe (nasofaringe, orofaringe e hipofaringe), laringe, seios paranasais e cavidade nasal ou de glândulas salivares (National Cancer Institute, 2017). O câncer oral acomete a mucosa do lábio superior e inferior, os dois terços anteriores da língua, as gengivas, a mucosa jugal, o assoalho bucal, o palato duro e a região trígono retromolar. Entretanto, as regiões mais acometidas por esta doença são a borda lateral de língua, o assoalho bucal e a região do trígono retromolar (National Cancer Institute, 2017).

O carcinoma de células escamosas oral (CCEO) é o tipo histológico mais comum dentre as neoplasias malignas que incidem na cavidade oral, representando 90% dos tumores (CURADO *et al.*, 2016; IRANI, 2016; INCA, 2016). O CCEO ocorre pela multiplicação das células epiteliais, primariamente, “in situ” e posteriormente de forma invasiva (INCA, 2016), com uma sobrevida relativa de 5 anos de cerca de 50% (MORO *et al.*, 2018; IRANI, 2016; EPSTEIN *et al.*, 2008). O aumento de casos desta patologia tem sido observado nos países em desenvolvimento, o que a torna de grande importância clínica e epidemiológica (GUPTA *et al.*, 2016).

Atualmente o “padrão ouro” para o diagnóstico trata-se da realização de biópsia seguida do histopatológico das lesões. Porém essa técnica, apesar de eficaz, é extremamente invasiva e por vezes já realizada num estágio avançado da doença (LINO, 2016; ULAGANATHAN *et al.*, 2017). Portanto, há a necessidade de se buscar por métodos diagnósticos menos traumáticos, e neste contexto os biomarcadores têm sido apontados como ferramentas auxiliares no diagnóstico (ULAGANATHAN *et al.*, 2017).

Por essa razão, nosso projeto almeja verificar a possibilidade da utilização do sangue periférico como ferramenta de diagnóstico complementar, por meio da análise de possíveis alterações quantitativas e qualitativas dos componentes celulares e atuação e prevalência dos linfócitos T regulatórios (Tregs), com o objetivo de propor

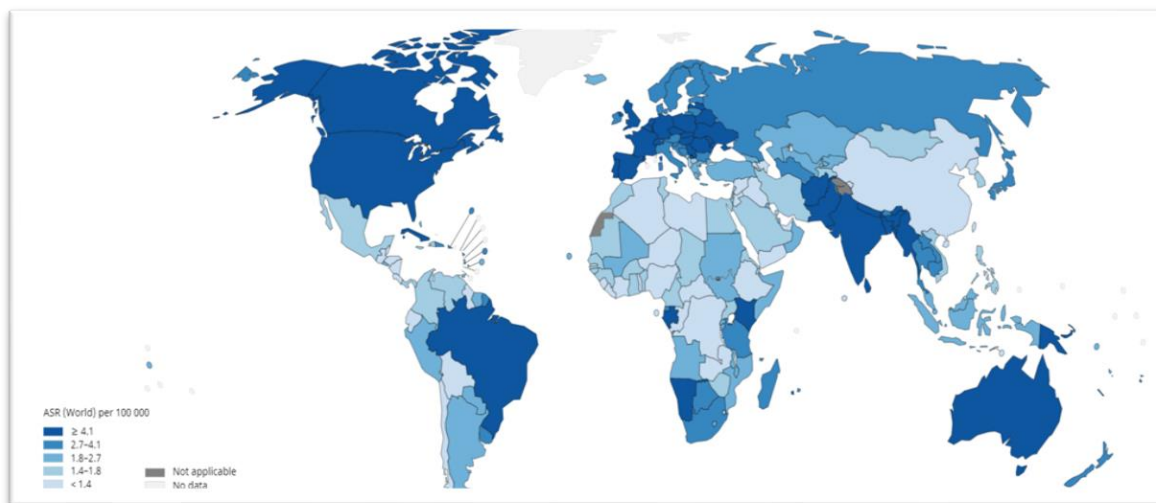
uma alternativa auxiliar no diagnóstico do câncer oral de forma a torná-lo simples, menos traumático, de baixo custo, fácil realização e ampla disponibilidade.

1.1 Carcinoma de Células Escamosas Oral (CCEO)

1.1.1. Epidemiologia

Juntamente com o câncer de lábio, o câncer de cavidade oral ocupa a 17ª posição dentre os tipos de câncer mais frequentes no mundo (WHO, 2018). O câncer da cavidade oral apresenta maior número de casos em países que estão em desenvolvimento, o que demonstra uma grande importância clínica e epidemiológica. Austrália, Índia, países da Europa, Estados Unidos e Brasil são exemplos de países com maior incidência do câncer oral (**Figura 1**) (GUPTA *et al.*, 2016). Dentre os cânceres de cabeça e pescoço, 30% originam-se na cavidade oral e 40 a 50% da orofaringe (SABAS *et al.*, 2012).

Figura 1: Incidência mundial de câncer da cavidade oral e lábios em ambos os gêneros e todas as idades



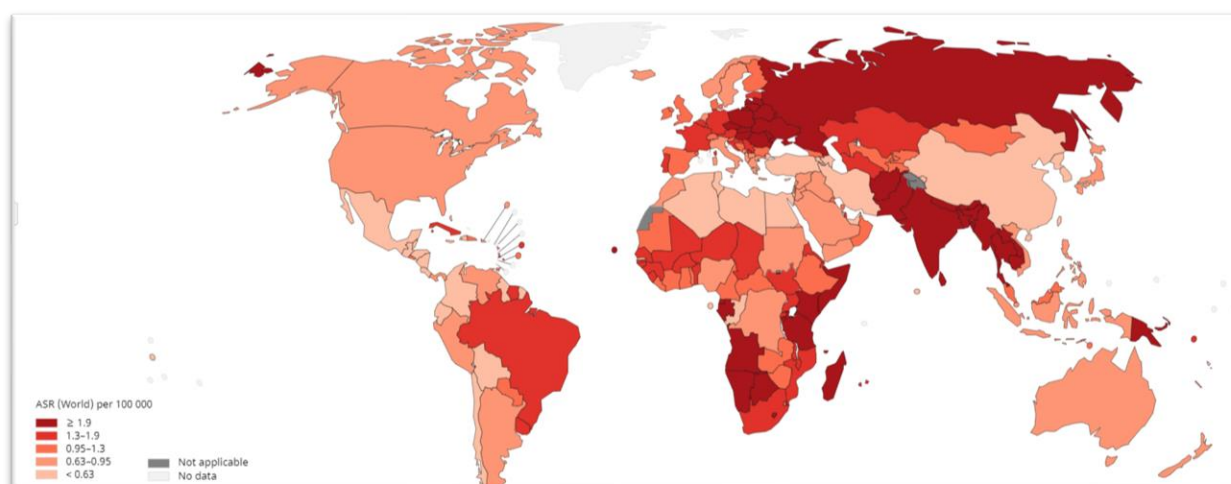
Fonte: IARC-GLOBOCAN, 2018

Legenda: Mapa representativo dos países acometidos pelo câncer oral e de lábios, representados pela cor azul alternando a intensidade da cor de acordo com o grau de incidência local.

Países que apresentam baixos indicadores de desenvolvimento social e econômico, que refletem no acesso da população aos serviços de saúde, assim como de população com maior ingestão de álcool e consumo de tabaco tornam-se mais suscetíveis ao desenvolvimento desta patologia (GUPTA, *et al.*, 2016).

O CCEO acomete em sua maioria indivíduos do gênero masculino, resultado do maior consumo de álcool e tabaco, hábitos mais comuns em indivíduos desse gênero, na faixa etária entre 50 a 70 anos de idade (WHO, 2017). Em 2017, foram atribuídos ao câncer oral 4.923 óbitos em indivíduos do sexo masculino e 1.372 óbitos em indivíduos do sexo feminino (**Figura 2**) (IARC, 2018). Comparando homens e mulheres fumantes e que fazem uso de álcool, observou-se que o gênero feminino vem apresentando ao longo dos anos um maior risco para o desenvolvimento de câncer oral, talvez devido às mudanças de hábitos impulsionados pela vida moderna (MUSCAT *et al.*, 1996).

Figura 2: Mortalidade mundial de casos de câncer oral e lábios em ambos os gêneros e todas as idades



Fonte: IARC - GLOBOCAN, 2018

Legenda: Mapa representativo da taxa de mortalidade mundial câncer oral e lábios, representados pela cor laranja alternando a intensidade da cor de acordo com o grau de mortalidade local.

Para o período entre os anos de 2020 a 2022 presume-se que haverá na população brasileira 11.180 casos de CO em homens e 4.010 em mulheres, que correspondem respectivamente a 10,69 e 3,71 novos casos a cada 100 mil homens e 100 mil mulheres. De acordo com as estimativas do INCA, o gênero masculino ocupa a quinta posição e o gênero feminino a décima terceira entre as neoplasias mais frequentes no Brasil (**Figura 3**) (INCA, 2020).

Figura 3: Estimativa da incidência de câncer, de acordo com o gênero, para o ano de 2020

Localização Primária	Casos	%	Homens	Mulheres	Localização Primária	Casos	%
Próstata	65.840	29,2%			Mama feminina	66.280	29,7%
Côlon e reto	20.520	9,1%			Côlon e reto	20.470	9,2%
Traqueia, brônquio e pulmão	17.760	7,9%			Colo do útero	16.590	7,4%
Estômago	13.360	5,9%			Traqueia, brônquio e pulmão	12.440	5,6%
Cavidade oral	11.180	5,0%			Glândula tireoide	11.950	5,4%
Esôfago	8.690	3,9%			Estômago	7.870	3,5%
Bexiga	7.590	3,4%			Ovário	6.650	3,0%
Linfoma não Hodgkin	6.580	2,9%			Corpo do útero	6.540	2,9%
Laringe	6.470	2,9%			Linfoma não Hodgkin	5.450	2,4%
Leucemias	5.920	2,6%			Sistema nervoso central	5.220	2,3%

*Números arredondados para múltiplos de 10.

Fonte: INCA, 2020.

Legenda: Na figura podemos observar a descrição dos dez tipos de cânceres com maior incidência. O CO no gênero masculino ocupa a 5ª posição e o gênero feminino não se encontra representado.

1.1.2. Fatores etiológicos do CCEO

O CCEO é um tumor maligno e está associado a influências dos fatores sociais e econômicos e de gênero, assim como, ao consumo de tabaco e álcool (GUPTA *et al.*, 2016; CUNHA *et al.*, 2019). Fumar ou mascar o tabaco promove a liberação de radicais livres através de reações oxidativas que irão ocorrer nos tecidos da cavidade oral, além de diversos produtos provenientes da combustão do tabaco como os hidrocarbonetos aromáticos polinucleares que possuem ação cancerígena, o que pode levar a mutações e modificações no ciclo celular. Há um aumento da permeabilidade da mucosa oral, facilitando a passagem de nitrosaminas como a N-nitrosomorfina (FREITAS *et al.*, 2016). O tabaco age modificando a função e proliferação de fibroblastos gengivais, nas células que compõem a membrana e o ligamento periodontal provocando a apoptose precoce. Ainda, favorece a doença periodontal e inibição do sistema imunológico o que acarreta o agravamento de reação inflamatória local (ZHANG *et al.*, 2019).

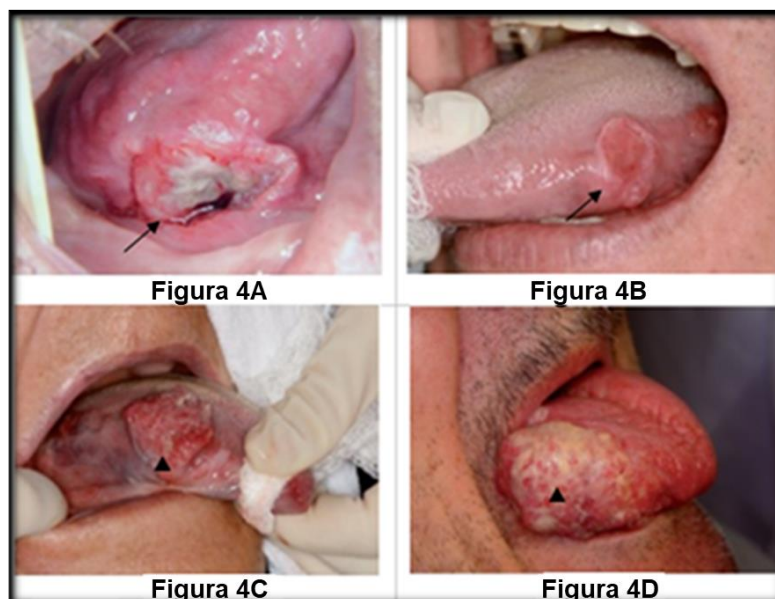
O álcool atua na mutagênese através do seu produto metabólico primário, o acetaldeído (KORTE *et al.*, 1981). O álcool é convertido em acetaldeído pela enzima álcool desidrogenase e uma vez como acetaldeído sofre ação do aldeído desidrogenase, convertendo-se em acetato (BRENNAN *et al.*, 2004). A maior parte da metabolização do álcool ocorre no fígado, mas a mucosa oral também participa desse processo pela presença da enzima álcool desidrogenase. Contudo, a mucosa oral é desprovida da atividade do aldeído desidrogenase, dessa forma ocorre o acúmulo de

acetaldeído nos tecidos orais (DONG *et al.*, 1996). O álcool promove o aumento da permeabilidade da membrana das células da cavidade oral que acaba por facilitar a passagem de agentes cancerígenos (IRANI, 2016; HOWIE *et al.*, 2001) e possui também função potencializadora na deficiência de ferro, vitamina A,B2 e β -caroteno devido a sua ação inibitória de absorção de nutrientes e vitaminas (MUSCAT *et al.*, 1996).

1.1.3 Fisiopatologia do CCEO

O CCEO inicialmente é assintomático, entretanto nos estágios avançados da doença pode ocorrer dor local (PEREIRA *et al.*, 2017) e dor no ouvido, assim como sangramentos, mobilidade dos dentes, dificuldades de deglutição, respiração e na fala, parestesia e dificuldades de abertura das maxilas (trismo muscular). O CCEO pode apresentar-se como ulcerações, lesões exofíticas ou endofíticas, com bordas em rolete (**Figura 4A a 4D**), com áreas de necrose e ceratinização. Dependendo do estágio do CCEO o paciente pode apresentar linfadenopatia cervical ipsilateral (do mesmo lado da localização do tumor) (**Figura 5**) ou contralateral (do lado oposto do tumor) em alguns pacientes e nos casos de maior gravidade, fístulas cutâneas, sangramento, anemia e caquexia (LEMOS *et al.*, 2013).

Figura 4: Manifestações clínicas do câncer de cavidade oral



Fonte: Lemos *et al.*, 2013 (Adaptado)

Legenda: Apresentação clínica do CCEO. Em (A) lesão ulcerada com bordas elevadas (bordas em rolete) (seta), com áreas centrais de necrose em borda lateral de língua e assoalho do lado direito (seta); Em (B) - lesão endofítica de bordas elevadas em borda lateral de língua do lado esquerdo; (C) e (D) – lesão exofítica com aspecto verrucoso (cabeça de seta).

Figura 5: Linfadenopatia cervical em um paciente portador de CCEO



Fonte: Arquivo pessoal.

Legenda: Imagem demonstrando um paciente portador de CCEO apresentando linfadenopatia cervical, ipsilateral. Este linfonodo apresentou-se clinicamente como sésil, endurecido e indolor.

A língua tem sido descrita como o órgão mais acometido pelo CCEO seguida do assoalho da boca. Este fato é explicado pelo fato destas duas regiões serem recobertas por epitélio estratificado pavimentoso não queratinizado. Sendo assim, os agentes cancerígenos dissolvidos na saliva ficam por um maior tempo de contato com as células escamosas epiteliais o que tornaria esse órgão mais predisposto ao desenvolvimento de câncer (IRANI, 2016).

O CCEO dentre as neoplasias orais é o de maior representatividade. Surge pela multiplicação desordenada das células epiteliais orais, inicialmente de forma local e posteriormente invasiva (IRANI, 2016; INCA, 2016). O CCEO, representa cerca de 90% dos tumores malignos que incidem na cavidade oral (CURADO *et al.*, 2016; IRANI, 2016; INCA, 2016). Este subtipo histológico pode ser originário de lesões orais potencialmente malignas (LOPMs) (**Figuras 6A e 6B**) ou podem evoluir para um CCEO *de novo* (ULAGANATHAN *et al.*, 2017). Sendo importante para o controle e aumento da sobrevida em CCEO o acompanhamento de possíveis evoluções das LOPMs (IRANI, 2016; LINO, 2016).

As LOPMs apresentam risco significativo de desenvolvimento de câncer. Estas por sua vez, podem surgir em diferentes sítios anatômicos da cavidade oral, sendo que o grau de displasia e/ou alterações moleculares presentes favorecem a transformação maligna destas lesões (WARNAKULASURIYA *et al.*, 2007). Dentre as LOPMs mais comumente encontradas podemos citar a leucoplasia e a eritroplasia (ULAGANATHAN *et al.*, 2017). A leucoplasia, é a mais frequente das LOPMs, estando associada ao tabagismo. Ela é definida como qualquer mancha ou placa branca que não pode ser caracterizada como nenhuma outra lesão branca bucal, e pode apresentar-se com superfície homogênea, nodular ou verrucosa na cavidade oral (WHO, 2017). A eritroplasia é das LOPMs, a considerada com maior potencial de malignidade, também associada ao consumo de tabaco. Apresenta-se como uma mancha ou placa avermelhada, não podendo ser caracterizada como nenhuma outra lesão vermelha da cavidade oral. Pode apresentar-se plana e com superfície lisa ou granular (WHO, 2017). A eritroplasia pode apresentar-se também de forma “mista” associadas a áreas de leucoplasia, conferindo à lesão um aspecto avermelhado e esbranquiçado, recebendo a denominação de lesão eritroleucoplásica ou leucoreritroplásica (WARNAKULASURIYA *et al.*, 2007). Cerca de 12% das LOPMs podem se transformar em carcinoma e essa transformação está diretamente

correlacionada com o grau de displasias destas lesões. Quanto maior severidade das displasias maior as chances das LOPMs se tornarem CCEO (WHO, 2017).

Figura 6: Lesões orais potencialmente malignas

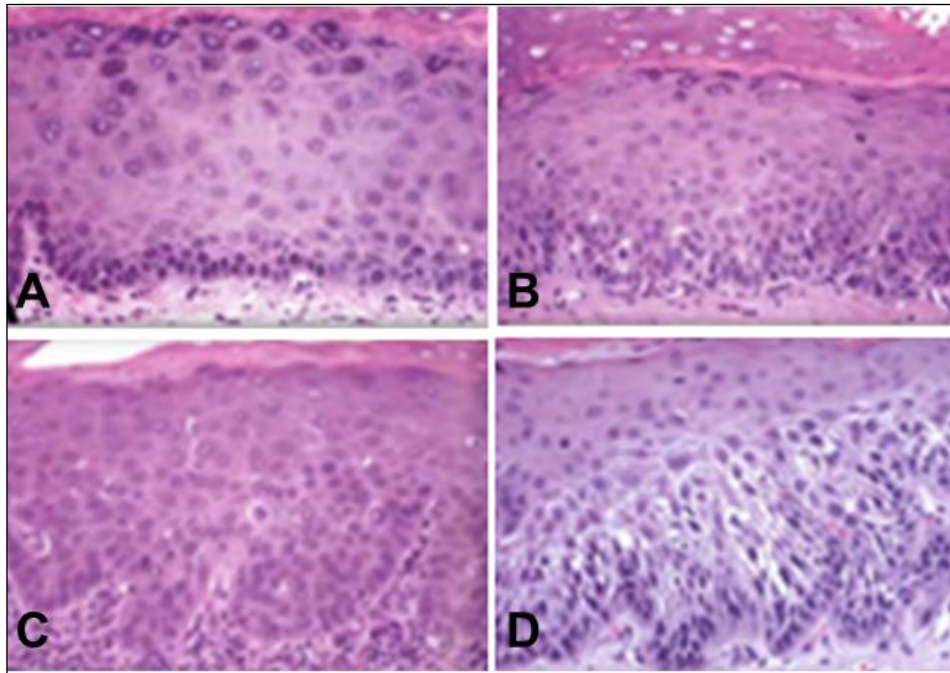


Fonte: Ulaganathan *et al.*, 2017 (Adaptado)

Legenda: Em **(A)** podemos observar uma lesão eritroplásica, em rebordo gengival, estendendo-se para fundo de saco de vestibulo (seta); em **(B)** placa leucoplásica de contorno irregular em borda de língua direita, estendendo-se para assoalho bucal (cabeça de seta).

O potencial de transformação das LOPMs em lesões malignas é correlacionado de acordo com a gravidade da displasia encontrada, que leva em consideração o número das camadas do epitélio afetadas, presença de pleomorfismo celular, atipia nuclear e presença de figuras de mitoses e aumento da relação núcleo/citoplasma (**Figura 7A-7D**). Em relação ao número de camadas de epitélio, uma displasia considerada “leve” apresenta atipia celular até o terço basal, a “moderada” se estende ao terço médio e a displasia “grave” acomete o terço superior (WHO, 2017).

Figura 7: Características das displasias orais epiteliais

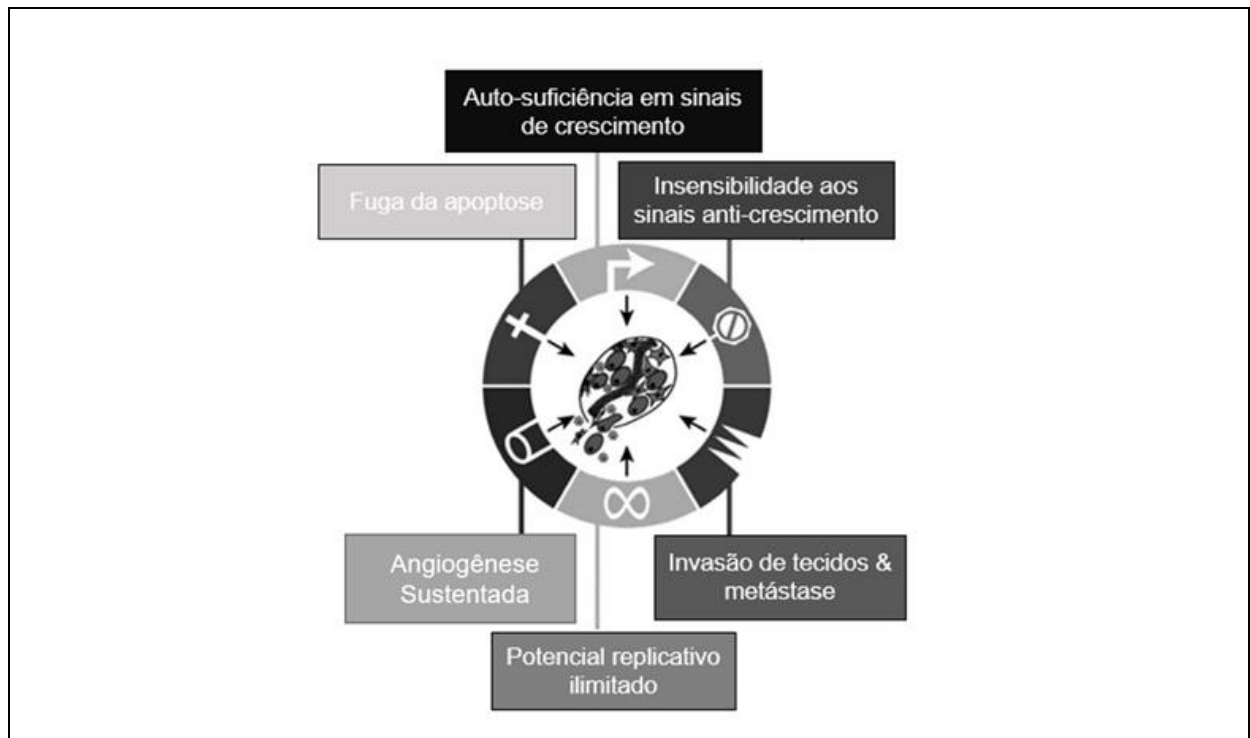


Fonte: WHO, 2017 (Adaptado)

Legenda: Cortes histológicos de epitélio corados por Hematoxilina e Eosina evidenciando: **(A)** presença de hiperqueratose com citologia e arquitetura do epitélio normais; em **(B)** displasia leve com despolarização das células basais, núcleo com variações de tamanho e presença de hipercromasia, sendo as alterações limitadas ao terço basal; em **(C)** displasia moderada com variação no tamanho do núcleo celular e hipercromatismo, atipias se estendem ao terço médio epitelial e em **(D)** displasia grave, apresentando variação anormal de tamanho e forma nuclear que se estendem ao terço superior epitelial.

A grande diversidade de genótipos das células cancerígenas é decorrente da manifestação de seis alterações em processos fisiológicos, que agindo coletivamente, resultam na transformação celular maligna (**Figura 8**) como: i) autonomia de crescimento; ii) escape da apoptose e da sinalização para inibição de crescimento; iii) replicação sem limites; iv) angiogênese; v) poder de invasão; e vi) metástase (HANAHAAN e WEINBERG, 2000).

Figura 8: Alterações fisiológicas celulares responsáveis pelo desenvolvimento tumoral



Fonte: Adaptado de Hanahan & Weinberg, 2000

Legenda: Figura representativa das alterações celulares responsáveis pelo escape aos mecanismos anticâncer: autossuficiência em sinais de crescimento e insensibilidade aos sinais anti-crescimento pelo aumento do receptor de fator de crescimento epidérmico-EGFR; invasão de tecidos e metástase pelo envolvimento da E-caderina ao promover a adesão celular; potencial replicativo ilimitado através da ativação da atividade da telomerase e a hipermetilação do DNA; angiogênese sustentada pelo aumento da expressão de fator de crescimento endotelial vascular –VEGF e fuga da apoptose devido a mutações em genes supressores de tumor.

Algumas hipóteses têm sido propostas para esclarecer os eventos necessários para que ocorra a transformação neoplásica da mucosa oral saudável para o CCEO. As alterações nos cromossomos 3p14 e 9p21 seriam as primeiras a surgirem seguidas por mutações no cromossomo 17p13 estando relacionadas a perda de genes supressores de tumor, favorecendo as transformações malignas (KUPFERMAN *et al.*, 2006; WHO, 2017). O aparecimento do carcinoma de células escamosas epiteliais ocorreria de forma ordenada histologicamente e marcada por modificações cromossomais (KUPFERMAN *et al.*, 2006; DOMÍNGUEZ-VIGIL *et al.*, 2018). O aumento da metilação é um evento epigenético que resulta no silenciamento de expressão gênica. Outra hipótese proposta é que uma única célula epitelial com alterações genéticas inicie uma expansão clonal formando um epitélio com potencial maligno que continuaria sua migração para mucosas histologicamente normais e essa

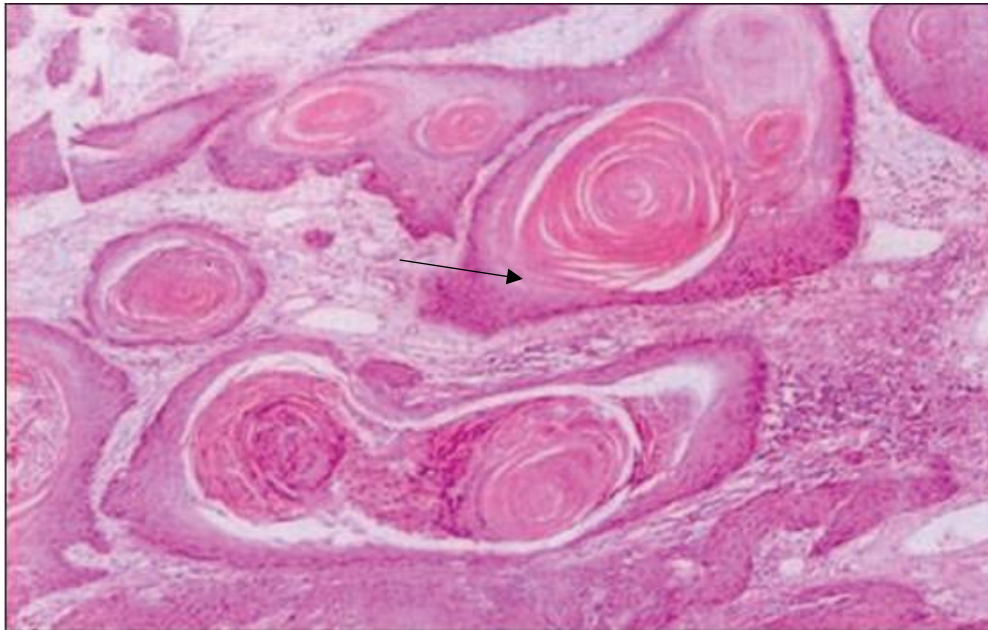
instabilidade genética associadas a influência de agentes mutagênicos como o álcool, o tabaco, o HPV ou até mesmo a associação dos três fatores favorece a transformação neoplásica (KUPFERMAN *et al.*, 2006).

O tratamento para o câncer oral pode consistir em cirurgia, radioterapia e quimioterapia, sendo sua escolha dependente do tamanho e da localização tumoral (AMAR *et al.*, 2003; JUNIOR *et al.*, 2013). Nos estágios avançados do CCEO o tratamento padrão trata-se de cirurgia seguida de radioterapia, embora para este último sua indicação seja motivo de questionamentos (AMAR *et al.*, 2003). Em casos de recidivas loco-regional a cirurgia de resgate é a melhor opção de tratamento, estando a radioterapia e a quimioterapia indicadas para as lesões que não possam ser ressecáveis ou quando o estado clínico geral do paciente não permite a cirurgia (CHEDID *et al.*, 2009).

1.1.4 Diagnóstico e estadiamento clínico do CCEO

O diagnóstico do CCEO é realizado através da realização de uma biópsia incisional seguida de análise histopatológica (LINO, 2016; ULAGANATHAN *et al.*, 2017). Microscopicamente, é possível visualizar aglomerados de células epiteliais aumentadas, apresentando com citoplasma eosinofílico e núcleos redondos, pleomorfismo celular e nuclear, assim como hipercromasia e figuras de mitose (**Figura 9**). Para análise de metástase em linfonodos a técnica utilizada é a punção aspiratória por agulha fina (PAAF), onde o material aspirado é investigado sobre a presença de células queratinizadas e possível necrose com processo inflamatório (WHO, 2017).

Figura 9: Aspecto histopatológico de um CCEO bem diferenciado



Fonte: Rahaman e Mujib, 2014.

Legenda: Neste corte histológico é possível observar a invasão de células epiteliais no conjuntivo, com a formação de ninhos de células tumorais e produção de pérolas de queratina (seta).

Para a realização do estadiamento clínico é recomendado o uso dos critérios estabelecidos pelo *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) baseados no o TNM, onde T(*tumor*) corresponde ao tamanho lesão (sua extensão), N (*node*), refere-se à presença de linfonodos positivos, ou seja, a presença de metástase locorregional; e M (*metastasis*) avalia a presença de metástase à distância (**Quadro 1**) (SOCIEDADE BRASILEIRA DE ONCOLOGIA CLÍNICA, 2017). A avaliação da sobrevida e a escolha da terapia a ser utilizada no tratamento do câncer oral levam em consideração a classificação TMN (KREPPEL *et al.*, 2010).

Quadro 1: Classificação do Câncer Oral realizada segundo os critérios do Sistema *American Joint Committee on Cancer*

TUMOR PRIMÁRIO (T)	
TX	Tumor primário não pode ser avaliado
T0	Sem evidência de presença de tumor primário
TIS	Presença de Carcinoma in situ
T1	Tumor $\leq$ 2cm de diâmetro
T2	Tumor > 2cm e até 4cm de diâmetro
T3	Tumor > 4cm de diâmetro
T4A	Tumor com invasão de estruturas adjacentes
T4B	Tumor com invasão de espaço mastigatório, lâminas pterigoides ou base do crânio ou artéria carótida interna
Linfonodos Regionais (N)	
NX	Linfonodos não podem ser avaliados
N0	Não há metástase em linfonodos regionais
N1	Metástase em um linfonodo homolateral $\leq$ 3cm de diâmetro
N2	Metástase em um linfonodo homolateral >3cm e até 6cm de diâmetro. Presença de múltiplos linfonodos homolaterais <6cm de diâmetro ou linfonodos bilaterais ou contralaterais < 6cm de diâmetro
N2A	Metástase em um único linfonodo homolateral >3cm e até 6cm de diâmetro
N2B	Metástase em múltiplos linfonodos homolaterais >6cm de diâmetro
N2C	Metástase em linfonodos bilaterais ou contralaterais <6cm de diâmetro
N3	Metástase em linfonodo >6cm de diâmetro
Metástase à distância (M)	
MX	Não há como avaliar a metástase à distância
M0	Não há evidências de metástase à distância
M1	Presença de metástase à distância

Fonte: Ministério da Saúde, 2004 e SBOC.,2017 (Adaptado)

1.2 Lesões na cavidade oral não carcinoma de células escamosas (LCOs)

Além do CCEO, outras lesões malignas ou com potencial de cancerização que acometem a cavidade oral, merecem atenção e devem ser mencionadas. São elas: o adenocarcinoma polimorfo de baixo grau, o carcinoma verrucoso e o líquen plano.

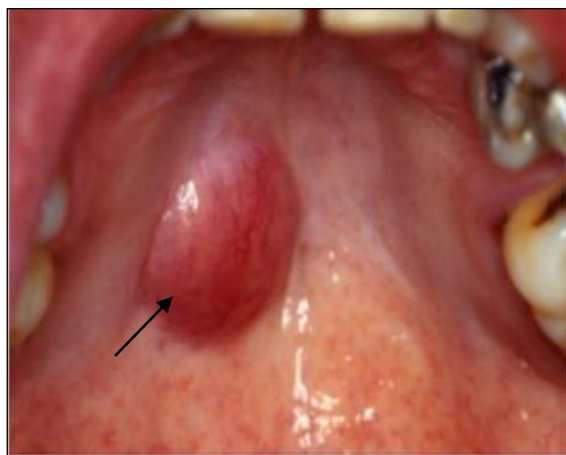
1.2.1 Adenocarcinoma polimorfo de baixo grau (APBG)

O adenocarcinoma polimorfo de baixo grau (APBG) foi descrito pela primeira vez como “carcinoma lobular” devido as semelhanças com os infiltrados celulares

presentes no carcinoma da mama (FREEDMAN & LUMERMAN, 1983). Neste mesmo ano, Batsakis *et al.* (1983) observaram diversos tumores que denominaram como “adenocarcinoma do ducto terminal”, sugerindo sua origem ao segmento terminal/distal dos ductos salivares (BATSAKIS *et al.*, 1983). Entretanto foi em 1984 que Evans e Batsakis implementaram o termo “adenocarcinoma polimorfo de baixo grau” (EVANS & BATSAKIS, 1984).

Mulheres entre 60 a 70 anos de idades são as mais acometidas pelo APBG (FERNANDES *et al.*, 2013). Essa neoplasia maligna acomete a região da cabeça e pescoço, frequentemente em glândulas salivares menores, considerada maligna e rara (BERG *et al.*, 2018; POORTEN *et al.*, 2018; BRITO *et al.*, 2016; FERNANDES *et al.*, 2013). A região anatômica de maior frequência é o palato duro e palato mole (**Figura 10**) (FERNANDES *et al.*, 2013; BRITO *et al.*, 2016; POORTEN *et al.*, 2018).

Figura 10: Adenocarcinoma Polimorfo de Baixo Grau



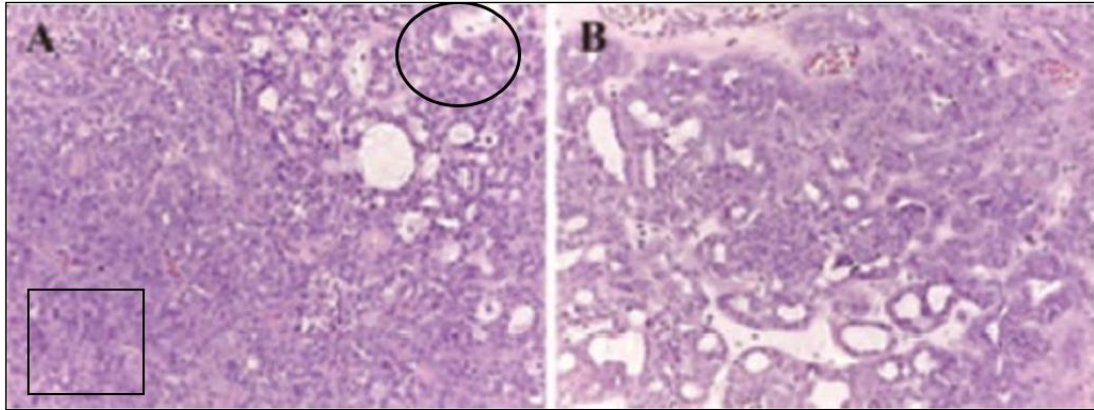
Fonte : Poorten *et al.*, 2018

Legenda: Massa tumoral, exofítica (seta), situada do lado direito do palato duro, próxima à linha média. A lesão apresenta superfície lisa e de coloração semelhante a mucosa. É possível verificar na superfície da lesão a presença de vasos telangectásicos.

O APBG pode apresentar crescimento lento seguido eventualmente de dor local e ulceração na mucosa de revestimento (POORTEN *et al.*, 2018; BRITO *et al.*, 2016; FERNANDES *et al.*, 2013). Na análise histológica, macroscopicamente o tumor pode se apresentar não encapsulado; e microscopicamente pode apresentar infiltração marginal entre os tecidos adjacentes, com padrões arquitetônicos distintos (BRITO *et al.*, 2016; FERNANDES *et al.*, 2013), podendo ser classificado como sólido, cribiforme, tubular, trabecular, fascicular ou papilar, com células tumorais esféricas e/ou

poligonais, com núcleos ora esféricos ora ovais ou menos frequentes, os fusiformes, com citoplasma de coloração variada (**Figura 11**) (FERNANDES *et al.*, 2013). Esse pleomorfismo citológico torna o APBG de difícil diagnóstico (BRITO *et al.*, 2016).

Figura 11: Aspectos histológicos do adenocarcinoma polimorfo de baixo grau



Fonte: Brito *et al.*, 2016 (Adaptado)

Legenda: Em (A) Área com padrão sólido (quadrado) e área com padrão cribiforme (círculo); em (B) Padrão tubular do estroma mucoide e de vasos sanguíneos (H/E 400x).

O APBG possui bom prognóstico devido ao seu potencial de malignidade ser considerado baixo (POORTEN *et al.*, 2018; BRITO *et al.*, 2016; FERNANDES *et al.*, 2013).

1.2.2 Carcinoma Verrucoso (CV)

Em 1948 Ackerman descreveu pela primeira vez o carcinoma verrucoso (CV) como uma variante do CCEO (THOMPSON, 2019; TABUCHI *et al.*, 2020; HUGHES *et al.*, 2020), sendo por essa razão chamado de “tumor de Ackerman” (THOMPSON, 2019). Como uma variante do CCEO, o CV é associado ao consumo de álcool e tabaco (THOMPSON, 2019; AKRISH *et al.*, 2019). O CV acomete com maior frequência as mulheres na cavidade oral, seguido da laringe, trato sinonasal e faringe (THOMPSON, 2019).

O CV apresenta crescimento lento (AKRISH *et al.*, 2019; TABUCHI *et al.*, 2020; HUGHES *et al.*, 2020) exofítico e verrucoso (**Figura 12**) (THOMPSON, 2019; AKRISH *et al.*, 2019), boa diferenciação e distribuição local (TABUCHI *et al.*, 2020; HUGHES *et al.*, 2020).

Figura 12: Carcinoma verrucoso em língua

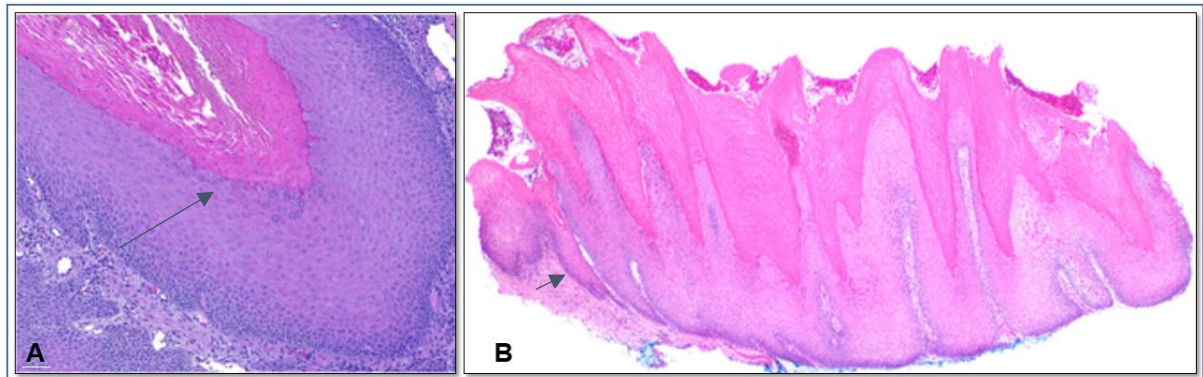


Fonte: Thompson, 2019 (Adaptado).

Legenda: Placa, esbranquiçada, de contorno irregular, com superfície verrucosa em borda lateral de língua (seta).

Histologicamente observa-se no CV a presença de maturação celular, ausência de pleomorfismo e de mitoses (ou raras mitoses), hiperplasia epitelial de projeções múltiplas, filiformes, de epitélio escamoso bem diferenciado associado a acentuada queratose e infiltração estromal abaixo da membrana basal do epitélio (**Figura 13**) (THOMPSON, 2019).

Figura 13: Aspecto histológico do carcinoma verrucoso.



Fonte: Thompson, 2019 (Adaptado)

Legenda: Imagem de um corte histológico corado por Hematoxilina-Eosina de um carcinoma verrucoso. Em **(A)**, epitélio apresentando obstrução por queratina e em **(B)**, infiltração localizada abaixo do epitélio adjacente (setas).

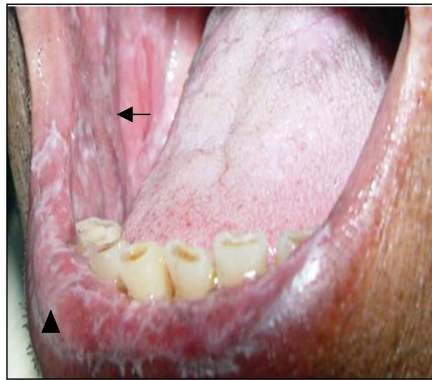
1.2.3 Líquen plano Bucal (LPB)

O líquen plano bucal (LP) foi descrito pela primeira vez em 1866 pelo médico inglês Erasmus Wilson (CANTO *et al.*, 2010). É uma patologia inflamatória e crônica que acomete o epitélio escamoso estratificado e embora sua etiologia não ser totalmente elucidada (CANTO *et al.*, 2010; FRAGA *et al.*, 2011; YU *et al.*, 2020), há uma associação a resposta autoimune celular mediada por células T (CANTO *et al.*, 2010; FRAGA *et al.*, 2011). As células T promovem apoptose e degeneração das células da camada basal da mucosa oral e liberam quimiocinas que favorecem o processo inflamatório (CANTO *et al.*, 2010). Outras etiologias vêm sendo sugeridas, como transtornos emocionais, infecções, doenças sistêmicas, procedimentos odontológicos (CANTO *et al.*, 2010; FRAGA *et al.*, 2011; YU *et al.*, 2020), diabetes, neoplasias, predisposições genéticas (CANTO *et al.*, 2010), consumo de álcool e tabaco e alimentos cítricos e condimentados (FRAGA *et al.*, 2011). Estudos recentes associam LPB com a hepatite C por sugerir que a infecção pelo vírus da hepatite C (HCV) possa desencadear um processo autoimune (FRAGA *et al.*, 2011).

O LPB é mais comum no gênero feminino que no masculino, sendo normalmente acometidas mulheres de meia-idade (CANTO *et al.*, 2010; FRAGA *et al.*, 2011; YU *et al.*, 2020). Possui características diferentes, porém de fácil identificação onde normalmente se apresentam na forma reticular ou erosiva e não raramente na forma papilar, em placas, bolhosas e atróficas (CANTO *et al.*, 2010; FRAGA *et al.*, 2011).

A forma reticular é a mais comum onde surgem estrias finas e brancas (estrias de Wickham), inicialmente descritas em 1895 por Louis-Frédéric Wickham. As lesões são assintomáticas, bilaterais e simétricas onde a mucosa jugal normalmente é acometida (**Figura 14**) (CANTO *et al.*, 2010; FRAGA *et al.*, 2011)

Figura 14: Líquen plano reticular

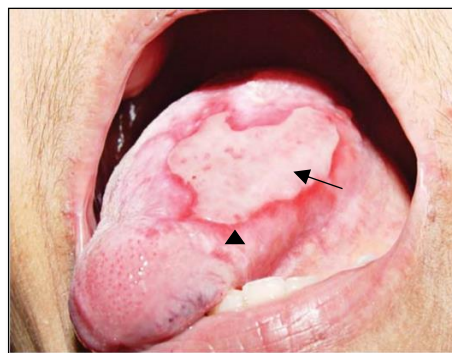


Fonte: Canto *et al.*, 2010 (Adaptado).

Legenda: Imagem de um paciente portador de líquen plano reticulado bucal. Nota-se a presença de placas brancas em forma de rendilhado e finas estrias brancas em mucosa labial (cabeça de seta) e mucosa jugal (seta).

A forma erosiva por ser sintomática possui maior significância clínica (CANTO *et al.*, 2010; FRAGA *et al.*, 2011; YU *et al.*, 2020). A lesão apresenta-se por áreas atróficas, ulceradas e eritematosas cercadas por estrias finas queratinizadas ou rendilhadas (**Figura 15**) (CANTO *et al.*, 2010; FRAGA *et al.*, 2011)

Figura 15: Líquen plano erosivo

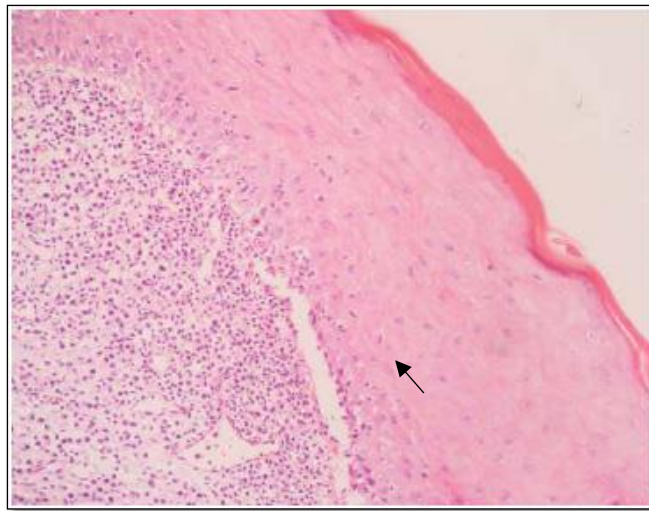


Fonte: Canto *et al.*, 2010 (Adaptado)

Legenda: Nesta imagem observa-se a presença de uma extensa lesão de aspecto ulcerado (seta), com contorno eritematoso, em borda lateral de língua (cabeça de seta).

Histologicamente o LPB apresenta camada basal liquefeita (**Figura 16**), infiltração por células T, presença de inúmeros corpos de *Civatte* (*queratinócitos apoptóticos*), cristas interpapilares ausentes, hiperplásicas ou mais frequentes, em forma de “dentes de serra”, camada espinhosa com variações de espessura e hiperqueratose (CANTO *et al.*, 2010; FRAGA *et al.*, 2011)

Figura 16: Corte histológico de lesão por líquen plano.



Fonte: Canto *et al.*, 2010 (Adaptado).

Legenda: hiperqueratose, presença de queratinócitos vacuolizados (seta), infiltrado inflamatório denso de linfócitos em forma de banda e comprometimento da interface epitélio-conjuntivo.

2 Métodos diagnósticos atuais

Diferentes técnicas têm sido utilizadas para a realização do diagnóstico de câncer oral, entretanto, o padrão ouro continua sendo o estudo histopatológico da lesão (LINO, 2016; ULAGANATHAN, *et al.*, 2017).

2.1 Avaliação do sangue periférico

A solicitação de análise do sangue periférico é prática rotineira durante a maioria das consultas médicas, onde é requisitado a realização do exame de hemograma completo que avalia de forma quantitativa e qualitativa os elementos celulares do sangue e é utilizado para procura, monitoramento de doenças e tomada de decisões

terapêuticas, sendo também um exame de baixo custo e alto benefício (FAILACE, 2003).

Diversos trabalhos têm revelado a importância da análise do sangue periférico através da quantificação da leucometria global, dos neutrófilos, linfócitos, monócitos e a razão neutrófilos/linfócitos (RNL) na sobrevida de pacientes com doenças malignas (BOBDEY *et al.*, 2017; DIAO *et al.*, 2019) como o câncer de mama (HORNYCHOVÁ *et al.*, 2008), câncer do sistema digestório (BRUCKNER *et al.*, 1982), cânceres hepáticos (CHEW *et al.*, 2012), linfomas de Hodgkin (KOH *et al.*, 2012) e câncer de pulmão (TIBALDI *et al.*, 2008). Tanto no microambiente tumoral quanto no sangue periférico a infiltração de neutrófilos e macrófagos tem sido apontado como prognóstico desfavorável para o paciente, assim como a infiltração linfocitária tem sido descrita como um melhor prognóstico (VALERO *et al.*, 2020).

Dados da literatura vêm demonstrando o importante papel desempenhado pelas células inflamatórias e nos tumores malignos, a citar: i) os linfócitos possuem uma importante função na identificação e destruição de células malignas, ii) o microambiente tumoral do CO possui um desequilíbrio de citocinas; iii) as respostas inflamatórias favorecem o desenvolvimento e metástase tumoral (BOBDEY *et al.*, 2017), e iv) os processos inflamatórios resultam em estresse oxidativo crônico e consequente liberação de radicais livres de oxigênio que possuem importante papel no desenvolvimento dos cânceres (NAKAMURA *et al.*, 1988; HUSSAIN *et al.*, 1994).

As análises coletivas dos parâmetros hematológicos podem ser utilizadas como biomarcadores na orientação terapêutica e prognóstica (DIAO *et al.*, 2019). Durante a análise do sangue periférico também é possível identificar alterações quantitativas e citomorfológicas já descritas como sugestivas de diagnóstico para diversas patologias (CHAUFFAILLE, 2016).

2.2 Os monócitos e o câncer oral

O elevado número de monócitos, denominado de monocitose, e o prognóstico desfavorável deste achado no câncer não foi totalmente esclarecido até o momento (BOBDEY *et al.*, 2017). Os monócitos liberam proteína quimioatraente de monócitos (MCP-1) que medeia a infiltração de macrófagos no microambiente tumoral e promove a liberação de mediadores inflamatórios como TGF- α , TNF- α , IL-1 e IL-6 que favorecem a angiogênese e a metástase (TSAI *et al.*, 2014; BOBDEY *et al.*, 2017). A

monocitose pode ser decorrente da produção aumentada pela medula óssea de células mielomonocíticas que se infiltram no microambiente tumoral e se diferenciam em macrófagos, que sintetizam fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), TNF- α e metaloproteinase na matriz, o que resulta no prognóstico desfavorável para pacientes acometidos por diversos tipos de cânceres (TSAI *et al.*, 2014). As metaloproteinases da matriz favorecem a carcinogênese através da degradação de proteínas da matriz extracelular além de promover o rearranjo de seus componentes estruturais, o que facilita a migração das células tumorais (VASCONCELOS *et al.*, 2013).

Grande parte dos macrófagos associados ao tumor (TAMs) são monócitos circulantes que se infiltraram no microambiente tumoral e se diferenciaram em macrófagos (SONG *et al.*, 2018). Pesquisas realizadas por Bobdey *et al.* (2017) e VALERO *et al.* (2020) demonstraram, respectivamente, que a contagem de monócitos $<0,500 \times 10^9 / L$; $p = 0,001$ e $<0,300 \times 10^9/L$; $p < 0,001$ pode estar relacionada com um aumento na sobrevida de pacientes com CO. A relação linfócitos/monócitos (RLM) presente no sangue periférico também é um indicador fácil e de simples determinação que pode ser utilizado para avaliar de forma sistêmica o processo inflamatório, porém há poucos estudos que avaliam os possíveis impactos da RLM em tumores da cavidade oral (FURUKAWA *et al.*, 2019).

2.3 Neutrófilos e razão neutrófilo/linfócito (RNL) no câncer oral

Os neutrófilos produzem citocinas e fatores angiogênicos que promovem o desenvolvimento tumoral, assim como os linfócitos possuem importante papel na vigilância realizada pelo sistema imunológico buscando a eliminação de células tumorais (ZHANG *et al.*, 2019), além de promover a inibição da resposta imune pela supressão da atividade citolítica de células imunológicas como células T e células matadoras naturais (TEMPLETON *et al.*, 2014).

O aumento de neutrófilos, a neutrofilia, é considerada um marcador sistêmico de inflamação assim como a diminuição de linfócitos, a linfopenia, reflete a imunossupressão (MATTAVELLI *et al.*, 2019) e, portanto, a razão neutrófilos/linfócitos (RNL) poderá ser um potencial marcador biológico da resposta inflamatória. O processo inflamatório exacerbado favorece o desenvolvimento tumoral (AN *et al.*,

2011). A RNL é o resultado da divisão do valor absoluto de neutrófilos pelo valor absoluto de linfócitos presentes na corrente sanguínea (BOBDEY *et al.*, 2017).

Pesquisas demonstram que uma elevada RNL antes do início do tratamento de pacientes portadores de câncer oral, pode ser associada com piores taxas de sobrevida nesses pacientes (TEMPLETON *et al.*, 2014; BOBDEY *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2019). Por outro lado, um estudo recente demonstrou a associação entre a diminuição da RNL e o bom prognóstico no CCEO em estágio inicial (MATTAVELLI *et al.*, 2019). Bobdey *et al.* (2017) e Valero *et al.* (2020) demonstraram respectivamente, que valores de RNL $<2,38$ e $<2,90$ poderiam ser utilizados como indicadores de uma maior sobrevida dos pacientes. Já Mattavelli *et al.* (2019) relata que tanto valor baixo, quanto valores altos de RNL podem impactar negativamente na sobrevida, e que o ideal seriam valores intermediários. Em estudo retrospectivo onde foram avaliados 1202 casos de CCEO foi estabelecido um ponto duplo de corte entre 1,94 e 3,66, classificando os pacientes em grupos com risco baixo $<1,94$, intermediário 1,94 - 3,66 e alto $> 3,66$ (CHEN *et al.*, 2017).

Embora alguns trabalhos tenham utilizado a quantificação dos leucócitos no sangue periférico como ferramenta de prognóstico antes de qualquer intervenção terapêutica, poucos focaram na validação de pontos de corte previamente estabelecidos ou na definição de cortes universais que podem ser utilizados nas rotinas clínicas diárias (VALERO *et al.*, 2020). Por esse motivo ainda se faz necessário estudos adicionais para implementação do uso desses dados complementares nas rotinas médicas (BOBDEY *et al.*, 2017; MATTAVELLI *et al.*, 2019; VALERO *et al.*, 2020).

2.4 Linfócitos T regulatórios (Tregs) e o fator de transcrição forkhead box protein P3 (Foxp3)

Nos primeiros anos da década de 70, Sakakura e colaboradores, através de experimentos com camundongos de 3 dias de idade e timectomizados, observaram lesões nos ovários semelhantes a ovários irradiados (SAKAKURA *et al.*, 1970). Naquela época, ainda não se sabia sobre a existência de linfócitos que atuavam na regulação do sistema imunológico promovendo a supressão de doenças autoimunes. Posteriormente, em 1972, Gershon e colaboradores denominaram tais células como células supressoras (GERSHON *et al.*, 1972). Entretanto, somente em 1995,

Sakaguchi e colaboradores notaram uma subpopulação linfócitos, CD4⁺ que apresentavam uma alta expressão do receptor IL-2Ra (CD25⁺), com um papel imunossupressor e que atuavam na manutenção da tolerância imunológica, e as denominaram de linfócitos T regulatórios (Tregs) (COOLS *et al*, 2007; SAKAGUCHI, 1995). Os autores observaram que a eliminação de esplenócitos CD25⁺ em roedores induzia a distúrbios auto-imunes e a transferência desta população celular era capaz de auto-imunidade. Entretanto a eliminação dessas células induzia à melhora na resposta imune a antígenos não próprios, porém desencadeava uma resposta auto-imune a antígenos próprio (SAKAGUCHI, 1995).

Os linfócitos Tregs possuem a sua origem a partir de células tronco hematopoiéticas na medula óssea. As células tronco hematopoiéticas dão origem as células multipotentes linfóides (progenitores linfóides) que irão originar os precursores dos linfócitos T. Os precursores dos linfócitos T (pró-linfócitos) migram para o timo. Neste local são selecionadas as células que expressam receptores pré-antígenos, sendo denominadas de pré-linfócitos. A seleção destas células está baseada em sua competência funcional e darão origem aos linfócitos imaturos (também chamadas de células T maduras) que irão amadurecer no caminho do córtex do timo em direção a medula do timo onde se encontram os linfócitos maduros *naïve* (ou virgens). Nesse caminho, aqueles linfócitos imaturos que entram em contato e possuem alta afinidade pelos auto-antígenos (antígenos próprios) passam pelo processo de seleção negativa da tolerância central das células T. Esses linfócitos irão morrer por apoptose e assim evitar o ataque a células próprias do organismo o que resultaria no desenvolvimento de doenças autoimunes. Contudo, algumas dessas células auto-reativas que não são deletadas se diferenciam nos linfócitos Tregs. Os linfócitos maduros *naïve* irão entrar no sangue e migrar para os órgãos linfoides periféricos (linfonodos, baço, tecidos linfóides mucoso e cutâneo) onde após serem ativados pelos antígenos não próprios irão se proliferar (expansão clonal). Uma parte desses linfócitos irá se diferenciar em linfócitos efetores (CD4⁺ e CD8⁺, também denominados de auxiliares e citotóxicos, respectivamente) e outros em linfócitos de memória (ABBAS, 2015).

Os linfócitos Tregs podem ter a sua origem no timo sendo denominadas tTregs ou Tregs naturais (nTregs) bem como podem ser diferenciados na periferia a partir de linfócitos *naïve* TCD4⁺ sendo denominadas Tregs periféricas ou induzidas (pTregs ou iTregs) (JOSEFOWICZ *et al.*, 2012; BLUESTONE *et al.*, 2003).

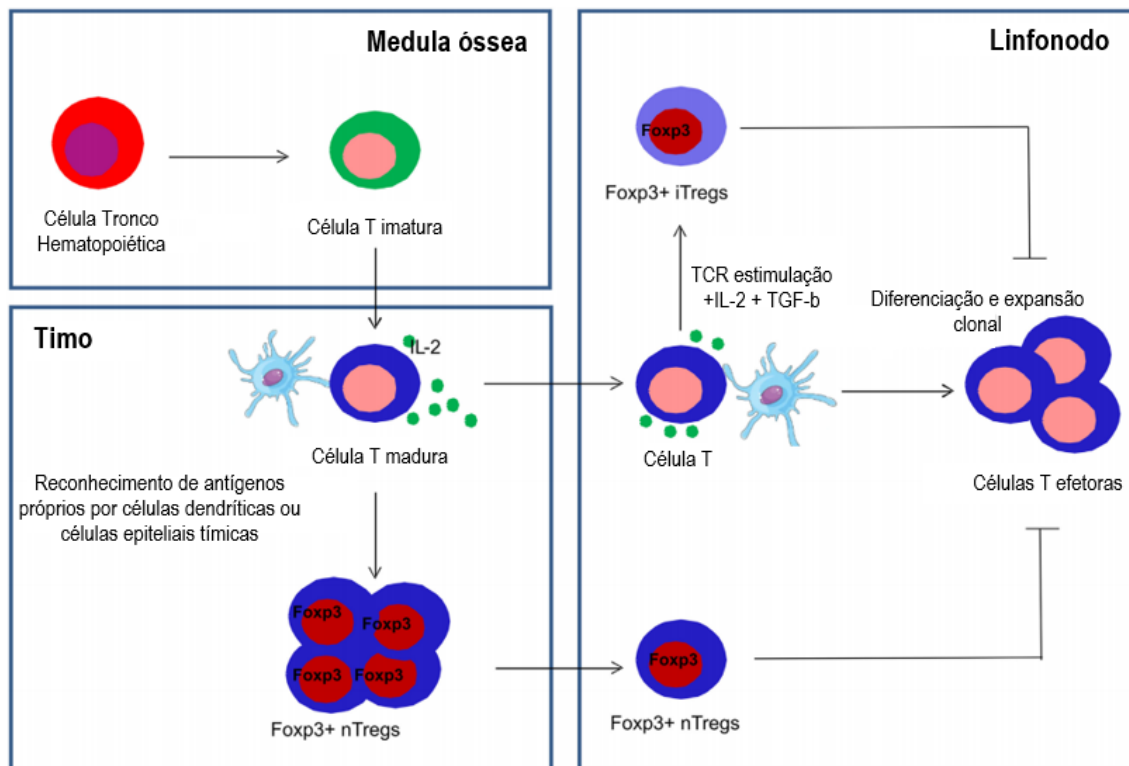
Como descrito anteriormente, os linfócitos no timo que reconhecem e se ligam aos antígenos próprios via receptores MHC-TCR com alta afinidade passam pela seleção negativa, sendo deletados antes de atingirem a maturidade também chamada de deleção clonal ou tolerância central (LEDERBERG, 1959; KISIELOW, 2019). Contudo, aqueles linfócitos CD4⁺ que reconhecem antígenos próprios com afinidade intermediária irão ser diferenciados em tTregs (FAMILI *et al.*, 2016). O importante papel das moléculas co-estimulatórias CD28 (presentes nos linfócitos T) e CD80/CD86 (células dendríticas, células epiteliais tímicas medulares e células B) na ontogênese dos Tregs têm sido descrito (SHARPE 2002). Estudos utilizando camundongos deficientes para essas moléculas demonstram uma diminuição no número de Tregs (SALOMON *et al.*, 2000; TANG *et al.*, 2003). Corroborando com esses dados, a ativação do CD28 está relacionada com a síntese de IL-2, citocina necessária para a diferenciação dos Tregs (MALEK *et al.*, 2002; JENKINS, 1991).

Foi descrito que células de camundongos deficientes em IL-2 e IL-2Ra possuem uma diminuição de aproximadamente 50% da expressão do fator de transcrição *forkhead box protein P3* (Foxp3) (FONTENOT *et al.*, 2005). No entanto, Tai e colaboradores. (2005) observaram o aumento da expressão do Foxp3 e diferenciação dos Tregs através da ativação do CD28 independente da presença de IL-2 (TAI *et al.*, 2005).

Foxp3 faz parte da família dos fatores de transcrição *the forkhead-winged-helix*, sendo responsável por regular a diferenciação e função supressora dos Tregs (GAVIN *et al.*, 2007; WILLIAMS *et al.*, 2007). A caracterização da importância do Foxp3 na supressão imunológica está relacionada com a identificação da mutação nesse gene com a manifestação de uma síndrome inflamatória e autoimune denominada de síndrome de IPEX (do inglês, *immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, X linked*) (BRUNKOW *et al.*, 2001; WILDIN *et al.*, 2001). Onde a perda de função da proteína Foxp3 ocasiona um conjunto de manifestações clínicas de desregulação imune e precocemente fatal (GAMBINERI *et al.*, 2003). De fato, a expressão do Foxp3 foi observada em linfócitos TCD4⁺ com fenótipo supressor independente da expressão de CD25 (FONTENOT *et al.*, 2005). Concordando com essas observações, Williams e col., observaram que a inibição da expressão do Foxp3 resulta na perda da função reguladora dos linfócitos (WILLIAMS, 2007).

Diferente dos tTregs, originados no timo, os iTregs são originados a partir dos CD4⁺ Foxp3⁻ na periferia, através da sinalização via receptor TCR (TCR+MHC). O reconhecimento brando das moléculas co-estimulatórias (CD28) na presença de TGF- β e IL-2 é responsável pela ativação do Foxp3 (CHEN, 2003; HORWITZ, 2008; LAURENCE, 2007). Ainda, as iTregs são descritos como capazes de sintetizar a citocina anti-inflamatória IL-10 (GREGORI, 2018) (**Figura 17**),

Figura 17: Diferenciação dos linfócitos nTregs e iTregs



Fonte: OGONEK *et al.*, 2016

Legenda: células T regulatórias naturais são diferenciadas no timo, sendo caracterizadas por CD4 + CD25 + FoxP3⁺. As células T regulatórias induzidas são diferenciadas nos órgãos linfoides periféricos pela ação do TGF- β e da interleucina-2 que resulta na ativação do Foxp3.

3. O papel dos Linfócitos T regulatórios (Tregs) nas neoplasias malignas

A presença dos Tregs no ambiente tumoral pode tanto ser atribuído as tTregs quanto as iTregs (DENG, 2018). As tTregs, são descritas migrando para o ambiente tumoral induzidas pela presença de mediadores quimiotáticos como CCL28, CCL5, CCL8/CCR5 e CCR4/CCL22 em diversos tipos de tumores (FACCIABENE *et al.*, 2011; WANG, 2017; HALVORSEN *et al.*, 2016; WARD *et al.*, 2015; KLARQUIST *et*

al., 2016). Acredita-se que o CCL22, através da sua ligação ao receptor CCR4, expresso na superfície dos linfócitos Tregs (WIEDEMANN *et al.*, 2016; ASSEMAN *et al.*, 1999), recrute estes Tregs para o microambiente tumoral promovendo a supressão da resposta imune antitumoral (WIEDEMANN *et al.*, 2016). Níveis elevados de CCL22 têm sido descritos em tumores como a leucemia linfocítica crônica de linfócitos B (LLC-B), linfoma de Hodgkin e cânceres de mama, pulmão e gastrointestinais (WIEDEMANN *et al.*, 2016; WÅGSÄTER *et al.*, 2008). Alguns desses tumores, com altos níveis de CCL22 apresentam em seus tecidos grande infiltração de Tregs (WIEDEMANN *et al.*, 2016; GOYNE *et al.*, 2014). A avaliação da quimiocina CCL22 (*C-C-motif ligand 22*) e a quantificação dos Tregs tem demonstrado grande potencial para uso diagnóstico (WIEDEMANN *et al.*, 2016; GOYNE *et al.*, 2014).

A presença das iTregs também estão relacionadas a neoplasias sendo a sua diferenciação a partir dos linfócitos TCD4⁺ Foxp3⁻ (HAN *et al.*, 2011; AI, 2009). Contudo, Waight e col., (2015), observaram que apesar da neutralização do TGF- β estar relacionado a uma diminuição dos iTregs, no modelo utilizando camundongos xenotransplantados com células tumorais 4T1, a frequência dos Tregs intratumorais não foi alterada sugerindo a preponderância dos tTregs no microambiente tumoral (WAIGHT, 2015).

Apesar de muito ter se estudado sobre o papel dos Tregs nos tumores, este ainda não está totalmente esclarecido no câncer oral. Os Tregs possuem ação na supressão do sistema imune e em neoplasias como câncer de ovário, pulmão, glioblastoma e linfoma não-Hodgkin, tem sido descrito o seu envolvimento com a progressão do tumor através dessa supressão. Nesse cenário, possui um papel pró-tumoral e dessa forma um prognóstico desfavorável para o paciente (YANG *et al.*, 2006; SAYOUR *et al.*, 2015; TAO *et al.*, 2012; CURIEL *et al.*, 2004). Contudo, em algumas neoplasias como colorretal e cânceres gástricos, a presença dos Tregs tem sido relacionada a um prognóstico favorável para o paciente controlando a progressão do tumor através da diminuição da inflamação relacionada a transformação neoplásica (HAAS *et al.*, 2009; SALAMA *et al.*, 2009).

No câncer oral, a observação da presença dos Tregs tanto no sangue periférico quanto em biópsias de pacientes tem sido alvo de debate em relação a sua função no microambiente tumoral. O'Higgins e colaboradores, em uma revisão sistemática

analisaram 45 artigos, onde desse total, 34 artigos relacionaram a presença dos Tregs com o prognóstico do paciente. Cerca de 25 artigos observaram o aumento dessas células relacionado com um prognóstico desfavorável para o paciente e 9 artigos descreveram um prognóstico favorável sendo esse último descrito na presença da infecção pelo HPV (O'HIGGINS *et al.*, 2018). Os Tregs são promissores alvos terapêuticos além de ser um potencial biomarcador do prognóstico do paciente. Contudo, essas células ainda precisam ser mais bem caracterizadas no contexto do câncer oral (O'HIGGINS *et al.*, 2018).

2 JUSTIFICATIVA

Uma grande incidência de câncer oral tem sido observada, principalmente no gênero masculino (CURADO *et al.*, 2016; GUPTA *et al.*, 2016), sendo o carcinoma de células escamosas oral o mais comumente diagnosticado (CURADO *et al.*, 2016; IRANI, 2016; INCA, 2016). Os países em desenvolvimento têm apresentado um aumento de casos desse tipo histológico, tornando o CO de grande interesse clínico e epidemiológico (GUPTA *et al.*, 2016).

O estudo histológico das lesões é o método diagnóstico comumente utilizado apesar de ser considerado um procedimento doloroso (LINO, 2016; ULAGANATHAN *et al.*, 2017). A utilização de marcadores biológicos como método de diagnóstico é a grande promessa, embora os custos da sua utilização tem sido um dos entraves para sua ampla utilização (ULAGANATHAN *et al.*, 2017).

Atualmente, sabe-se que tanto os processos inflamatórios quanto o microambiente tumoral podem produzir e liberar citocinas que influenciam na infiltração de células do sistema imunológico no microambiente do tumor (BALKWILL, 2004). Em casos de metástases, as células tumorais aumentam a expressão de receptores de quimiocinas viabilizando o seu deslocamento para linfonodos ou outros locais distantes do tumor primário (MARCUIZZI *et al.*, 2018).

No câncer oral o prognóstico desfavorável de um paciente tem sido associado a níveis aumentados de citocinas que favorecem reações inflamatórias. O papel do sistema imune neste tipo de câncer ainda não foi totalmente elucidado, sendo necessário mais estudos para seu entendimento (BOBDEY *et al.*, 2017). Por esses motivos e por ainda não haver um consenso quanto ao uso do sangue periférico no diagnóstico de câncer oral, nosso projeto avaliou de forma quantitativa e qualitativa as células que compõem o sangue periférico contribuindo para tornar o diagnóstico em câncer oral menos traumático e acessível a todos que sofrem com esta enfermidade.

3. OBJETIVOS

3.1. *Objetivo Geral*

O objetivo desta pesquisa foi identificar se o sangue periférico constitui uma ferramenta auxiliar no diagnóstico do CO, através de uma análise morfológica e quantitativa de seus elementos figurados. Além disso, propôs-se também a identificação de linfócitos Tregs nas amostras de tecido destes pacientes no intuito de compreender o papel desses linfócitos no CO.

3.2. *Objetivos Específicos*

(I) Investigar possíveis alterações quantitativas e qualitativas em células do sangue periférico de pacientes diagnosticados com CCEO e LCOs antes do tratamento que possam ser correlacionadas com tal enfermidade;

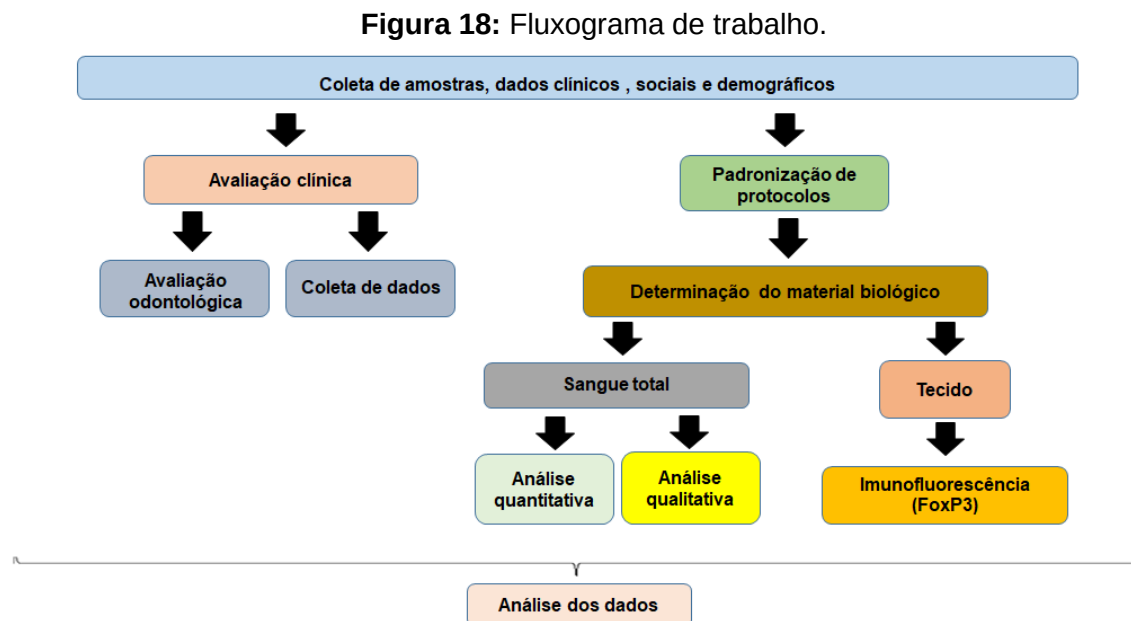
(II) Identificar o papel da razão neutrófilo-linfócito a partir das células presentes no sangue de pacientes com CCEO e LCOs antes do tratamento, relacionando esses achados com a gravidade da doença;

(III) Investigar a prevalência dos linfócitos T regulatórios em biópsia de pacientes com CCEO e LCOs antes do tratamento e seu papel na patologia.

4. METODOLOGIA

4.1 Desenho do Estudo

Para explicação e compreensão da metodologia utilizada neste estudo, o fluxograma (**Figura 18**) abaixo descreve as etapas clínicas e moleculares empregadas neste estudo.

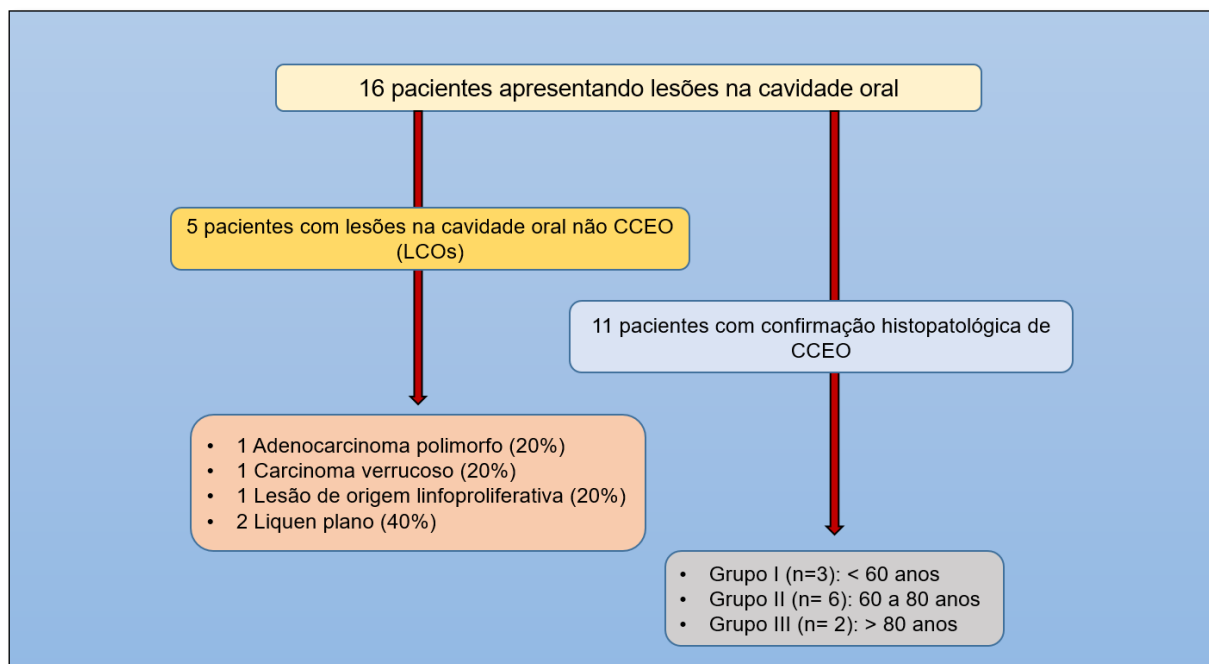


Legenda: Neste estudo foram realizadas avaliações clínicas odontológicas, avaliações hematológicas e histopatológicas

4.2 Casuística

Este estudo trata-se de um estudo prospectivo, de amostragem por conveniência, sendo a população estudada composta por 16 pacientes voluntários que buscaram atendimento médico na Clínica de Estomatologia da UNIGRANRIO-Caxias e no CEO- Centro de Especialidades Odontológicas do Centro de Saúde Anibal Viriato de Azevedo – São João de Meriti, 11 portadores de CCEO e 5 pacientes portadores de lesões na cavidade oral não carcinoma, submetidos à biópsia diagnóstica pela Estomatologista Dra. Vânia do Carmo Rodrigues (**Figura 23**). Os pacientes diagnosticados com CCEO foram classificados de acordo com a idade: grupo I < 60 anos, grupo II de 60 a 80 anos e grupo III > 80 anos.

Figura 19- Diagrama informativo sobre o grupo de pacientes analisados



Legenda: Foram incluídos no estudo 16 pacientes com lesões na cavidade oral. O grupo denominado de Lesões na Cavidade Oral não carcinoma de células escamosas (LCOs) estão descritos na tabela (à esquerda). Observamos (à direita, abaixo), a inclusão de 11 pacientes confirmados com carcinoma de células escamosas oral (CCEO).

Todos os participantes se habilitaram de forma voluntária, sendo que a participação destes na pesquisa obedeceu a critérios de inclusão e exclusão descritos a seguir. Todos os procedimentos a serem realizados foram explicados e dúvidas esclarecidas, sendo disponibilizado aos participantes o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE), que após leitura e concordância foram assinados (**ANEXO I**). Em seguida, os voluntários foram submetidos ao questionário para anamnese contendo questionamentos clínicos, sociais e demográficos (**ANEXO II**). Posteriormente foi realizado a coleta de sangue periférico e fragmento da lesão em cavidade oral.

Este projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade do Grande Rio (UNIGRANRIO) sob parecer de nº: 1.796.047.

Para uma melhor seleção dos participantes deste estudo, foram adotados os seguintes critérios de inclusão e exclusão.

Critérios de Inclusão:

- Ter resultado de histopatológico com diagnóstico de carcinoma de células escamosas oral e/ou lesões da cavidade oral não carcinoma;
- Não ter sido submetido à tratamento oncológico prévio.

Critérios de Exclusão para voluntários doentes:

- Diagnóstico prévio de câncer oral e/ou outro tipo de câncer fora da cavidade oral.

4.3 Coleta de Sangue

Foram coletados 4 frascos de sangue periférico, de 4 ml, contendo o anticoagulante: ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) da marca *Vacuplast Collect Line*, distribuído por (Cral - Cotia – S.P/ Brasil. A punção ocorreu utilizando agulhas para coleta múltipla BD (Vacutainer®) 25 mm (Becton Dickinson.-Juiz de Fora - MG-Brasil), com o conector para sistema a vácuo.

4.4 Coleta de fragmento da lesão

As amostras de CCEO e de LCOs foram coletadas e divididas em 2 fragmentos, sendo o primeiro fragmento armazenado em formol tamponado a 10% que foi submetido às análises histopatológicas. O segundo fragmento armazenado em PBS 1x para transporte e congelamento em nitrogênio líquido para realização de imunofluorescência.

4.5 Extensão sanguínea para avaliação microscópica da morfologia celular

Para análise microscópica da morfologia celular das células presentes no sangue periférico, confeccionamos lâminas com extensão sanguínea como descrito a seguir: identificamos a lâmina de vidro com as informações do paciente. Uma pequena gota de sangue foi disposta em uma das extremidades da lâmina de vidro. A lâmina extensora foi posicionada em contato com a gota de sangue num ângulo de 45°. Utilizamos essa lâmina extensora para deslizar sobre a outra lâmina de vidro em

direção oposta a extremidade onde se encontrava a gota de sangue, formando uma fina camada de sangue sobre a lâmina. Deixamos secar e seguimos para coloração com panótico da (NEWPROV Pinhais-PR/Brasil.)

A coloração por Panótico, baseia-se no princípio de coloração hematológica de Romanowsky, onde a lâmina com extensão de sangue periférico foi submetida a ação de um fixador, solução de triarilmetano a 0,1%, e dois corantes: uma solução de xantenos a 0,1% (cora as estruturas basófilas em tom de rosa, como as hemácias devido a hemoglobina e os grânulos dos eosinófilos) e por uma solução de tiazinas a 0,1% (cora estruturas ácidas como os núcleos) por meio de imersões de 5 segundos em cada, segundo protocolo do fabricante.

Foi realizada a análise microscópica da extensão sanguínea com o auxílio do microscópio NIKON – ECLIPSE E100, em objetivas de 40x e 100x, onde o corpo da lâmina foi analisado em zig-zag para avaliação qualitativa dos elementos constituintes do sangue periférico e confirmação quantitativa da diferencial leucocitária.

4.6 Determinação quantitativa dos elementos presentes em sangue periférico

As amostras de sangue coletadas em EDTA dos voluntários, foram analisadas pelo equipamento BC5500 para realização da análise quantitativa dos elementos figurados do sangue, onde 180 µL de sangue total coletado em anticoagulante EDTA foram utilizados para esta análise.

O equipamento BC5500 realizou a determinação e possibilitou a verificação da contagem dos glóbulos brancos (WBC), basófilos absoluto (Bas), neutrófilos (Neu), eosinófilos (Eos), linfócitos (Lym), monócitos (Mon), linfócitos atípicos absoluto (ALY), células imaturas absoluto (LIC), contagem de glóbulos vermelhos (RBC), concentração de hemoglobina (HGB), volume corpuscular médio (MCV), hemoglobina corpuscular média (MCH), concentração de hemoglobina corpuscular média (MCHC), amplitude de distribuição dos eritrócitos medido como coeficiente de variação (RDW-CV), hematócrito (HCT) e contagem de plaquetas (PLT) presentes nas amostras de sangue periférico dos voluntários analisados.

Para determinação da quantificação dos eritrócitos (RBC) e das plaquetas (PLT) foi utilizado o método por impedância elétrica. Esse método consiste na medição de

mudanças na resistência elétrica provocada por uma partícula suspensa em um diluente condutor que passa por uma abertura onde há eletrodos, em ambos os lados, submersos, que criam uma via elétrica. Quando cada partícula passa por essa abertura, ocorre uma mudança na resistência entre os eletrodos, produzindo um pulso elétrico que é medido. A quantidade de pulsos gerados representa o número de partículas que passaram pela abertura. A amplitude de cada pulso é proporcional ao volume de cada partícula.

A determinação da hemoglobina (HGB) ocorreu pela utilização do método colorimétrico. Esse método baseia-se na utilização do lisante M-50LH que converte a hemoglobina em um complexo hemoglobínico que pode ser mensurado a 525 nm, e através de um LED que emite um feixe de luz monocromática, cujo comprimento de onda central é de 525 nm, a luz passa pela amostra e é medida por um sensor óptico. O sinal então é amplificado e a tensão medida e comparada à leitura de referência (amostra contendo apenas diluente), e a HGB medida foi calculada automaticamente.

Para a determinação dos leucócitos (WBC, sigla do inglês *white blood cells*) foi utilizado a citometria de fluxo. Após o sangue ser aspirado ele foi diluído pelo reagente M-50D e injetado no centro de uma célula de fluxo, em uma única direção e velocidade. As células do sangue ficam expostas a um raio laser e a intensidade da luz de dispersão reflete o tamanho celular (luz dispersa de ângulo baixo) e a densidade intracelular (luz dispersa de ângulo alto). O detector óptico recebe e converte essa luz de dispersão em pulsos elétricos. Os dados desses pulsos são utilizados para desenhar o dispersograma. Como descrito pelo fabricante do equipamento BC-5500 (Mindray, China).

4.7 Determinação e análise dos linfócitos T regulatórios em biópsias

Os fragmentos das biópsias coletados para análise patológica foram acondicionados em solução salina tampão fosfato, do inglês *phosphate buffered saline* (PBS) estéril para transporte. Posteriormente, foi preservado em OCT (*Tissue Freezing*), congelado em nitrogênio líquido e embalado em papel alumínio previamente identificado com a identificação interna do paciente e armazenado em temperatura -80°C.

Foram realizados cortes de 12 ou 15 μm no tecido utilizando o criostato Leica CM 1860 e marcação para linfócitos T regulatórios utilizando o anticorpo anti FOXP3 (236A/E7) Invitrogen, Affymetrix Inc., eBioscience, CA, EUA. Os cortes foram colocados em lâminas de vidro previamente tratadas com poli-L-lisina. Para o tratamento com poli-L-lisina as lâminas foram limpas com álcool 70% e posteriormente cobertas por uma solução de 200 μl de poli-L-lisina em 20 ml de H_2O e foram colocadas em estufa a 37°C por 30 minutos. As lâminas foram permeabilizadas com 30 μl de Triton 0,2% cada corte e colocadas em câmara úmida por 40 minutos. Os cortes foram selecionados com caneta hidrofóbica (2 cortes levaram anticorpo primário e um corte levou apenas anticorpo secundário (controle negativo)). Foram adicionados 20 μl de anticorpo primário (Foxp3) já diluído 1:50 em dois cortes e no terceiro corte foram colocados apenas 20 μl de PBS 1x, por 2 hs dentro da câmara úmida. Depois, delicadamente, os cortes foram lavados com 20 μl de PBS 1x, por 3 vezes, por 5 minutos. Foram adicionados 20 μl de anticorpo secundário (anti-mouse) Alexa Fluor 488 já diluído, 1:500 nos 3 cortes por 50 minutos dentro da câmara úmida ao abrigo de luz. Depois, delicadamente, os cortes foram lavados com 20 μl de PBS 1x, 3 vezes, por 5 minutos. Foram colocados 20 μl de DAPI nos 3 cortes por 10 minutos e levados para câmara úmida ao abrigo de luz. Depois, delicadamente, os cortes foram lavados com 20 μl de PBS 1x, 3 vezes, por 5 minutos. O meio de montagem (ProLong Gold Antifade Mountant – Thermo Fisher Scientific) foi adicionado à lâmina. Foi disposto a lamínula sobre a lâmina e o meio de montagem a temperatura ambiente e ao abrigo de luz por 12 h (ou *overnight*). As lâminas foram seladas com esmalte após esse período. Para a realização das análises da presença dos linfócitos T regulatórios foram utilizados o microscópio de fluorescência Leica DMI8 e o software Leica Application Suite X 3.0.2.16120.

4.8 Análises de dados

Neste estudo, todas as análises das variáveis demográficas e clínicas obtidas foram realizadas com a utilização do *software* estatístico IBM-SPSS (versão 19, IBM Brasil, São Paulo, SP, Brasil). Foram calculadas a média da idade e a frequência de gênero da população em estudo. Os testes *t* de *Student* foi utilizado para as variáveis com distribuição normal, respectivamente. Na avaliação das diferenças significativas

das variáveis demográficas e clínicas entre os grupos, foram utilizados o teste U de *Mann-Whitney*. A análise das correlações entre os parâmetros clínicos foi demonstrada a partir do Coeficiente de Correlação de *Spearman*. Para todos os testes estatísticos são considerados significativos valores de $p < 0,05$.

5. RESULTADOS

5.1: Avaliação clínica dos pacientes com CCEO e LCOs

Considerando a epidemiologia e influência dos fatores sociais envolvidos com o acometimento do CCEO já descritos, avaliamos os dados clinicopatológicos, fatores de risco e sítios anatômicos de incidência do CCEO e LCOs nos pacientes incluídos neste estudo (**Tabela 1**).

Foram avaliados 16 pacientes, sendo a maioria composta por homens (62,5%), com idade média de 64,4, sendo a idade mínima de 41 anos e a idade máxima de 86 anos que foram classificados em: grupo I (27,27%), grupo II (54,54%) e grupo III (18,18%). A maioria dos pacientes declarou ser tabagista 56,25%, e 43,75% dos pacientes declararam consumir bebidas alcoólicas. A gengiva, o assoalho lingual e a língua foram as regiões anatômicas mais acometidas pelas lesões representando cada uma delas 18,75% dos casos (**Tabela 1 e Figura 20**). Deste total, 11 pacientes eram portadores de CCEO incidente nas seguintes regiões anatômicas: língua (27,3%), assoalho (27,3%), trígono retromolar (18,2%), mucosa labial (18,2%) e palato (9%).

Tabela 1: Dados clínicopatológicos dos pacientes com CCEO e LCOs incluídos nesse estudo.

Variável	N=16	F.R.
<i>Faixa etária</i>		
Grupo I (< 60 anos)	4	25%
Grupo II (60 a 80 anos)	10	62,5%
Grupo III (> 80 anos)	2	12,5%
<i>Gênero</i>		
Masculino	10	62,5%
Feminino	6	37,5%
<i>Tabagismo</i>		
NUNCA	7	43,75%
SIM	9	56,25%
<i>Etilismo</i>		
NUNCA	9	56,25%
SIM	7	43,75%
<i>Região anatômica da lesão</i>		
Assoalho lingual	3	18,75%
Gengiva	3	18,75%
Língua	3	18,75%
Mucosa jugal	1	6,25%
Mucosa labial	2	12,5%
Palato	2	12,5%
Trígono Retromolar	2	12,5%

Figura 20: Localização anatômica da lesão oral.

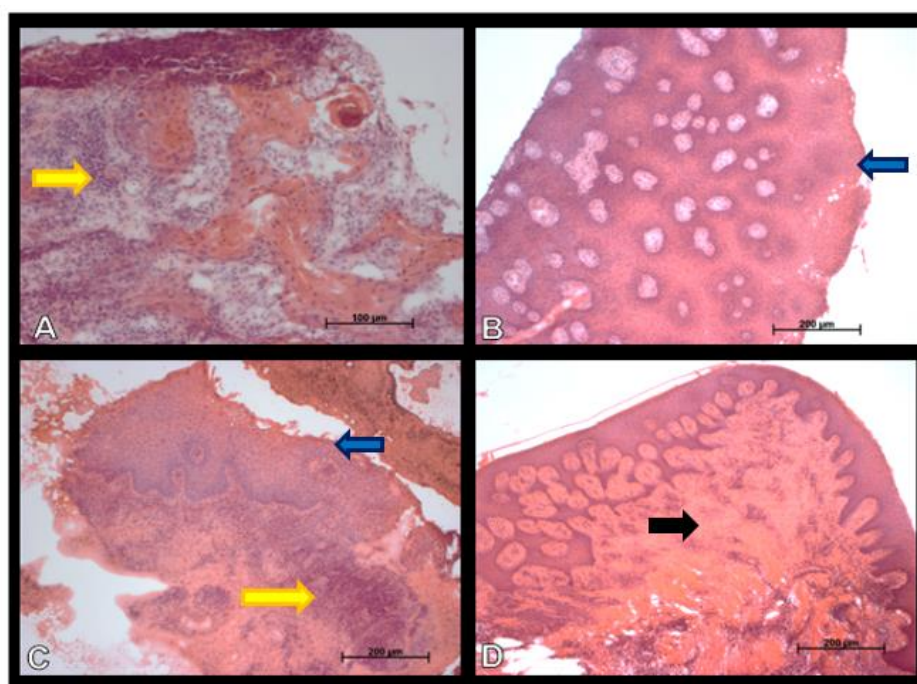


Legenda: Imagens indicando os sítios anatômicos acometidos pelo CCEO e LCOs: Em (A) paciente LCO#09 lesão em palato, (B) paciente CCEO#10-19 lesão em borda de língua, (C) paciente LCO#11-19 lesão na gengiva, (D) paciente CCEO#12-19 lesão na região trígono retromolar, (E) paciente CCEO#13-19 lesão em mucosa labial, (F) paciente CCEO#14-19 lesão na região trígono retromolar, (G) paciente CCEO#15-19 lesão em assoalho lingual, (H) paciente CCEO#16-19 lesão em assoalho lingual, (I) paciente CCEO#18-19 lesão em assoalho lingual, (J) paciente LCO#19-19 lesão na gengiva, (L) paciente CCEO#20-19 lesão na língua, (M) paciente CCEO#21-19 lesão em mucosa labial, (N) paciente LCO#22-20 lesão em mucosa jugal, (O) paciente CCEO#24-20 lesão em palato e (P) paciente CCEO#25-20 lesão na língua. Lesões indicadas com seta.

5.2: Diagnóstico histológico da lesão para classificação em CCEO ou LCOs

A avaliação clínica seguida da análise histopatológica da lesão é utilizada como ferramenta complementar, no auxílio em uma investigação precoce ao diagnóstico do CCEO. Foram investigadas alterações histopatológicas nas amostras dos pacientes, compatíveis com o diagnóstico de CCEO e de uma lesão maligna de origem linfoproliferativa, tais como como presença de infiltrado inflamatório, células epiteliais invadindo o conjuntivo com presença de queratinização e razão núcleo citoplasma. Algumas destas alterações como denso infiltrado inflamatório predominantemente linfocítico (**Figura 21A e 21C**), epitélio escamoso hiperplasiado (**Figura 21B e 21C**), e estroma densamente hialinizado (**Figura 21D**) estão exemplificadas na figura seguinte.

Figura 21: Análise histopatológica das amostras analisadas neste estudo



Legenda: (A) Paciente CCEO#10-19 carcinoma moderadamente diferenciado; (B) Paciente LCO#11-19 lesão maligna de origem linfoproliferativa; em (C) paciente CCEO#16-19 carcinoma de células escamosas bem diferenciado e em (D) paciente CCEO#18-19 carcinoma de células escamosas moderadamente diferenciado. **Seta Azul** : hiperplasia do epitélio escamoso. **Seta amarela**: infiltrado inflamatório predominantemente linfocítico. **Seta preta**: hialinização do estroma.

Em relação ao grau de diferenciação histopatológica desses pacientes, observamos que 100% dos pacientes do Grupo I (<60 anos), apresentaram CCEO moderadamente diferenciados. Já no Grupo II (60 a 80 anos) 75% dos pacientes apresentaram CCEO moderadamente diferenciados. No grupo Grupo III, 50% dos pacientes apresentaram CCEO moderadamente diferenciado e 50% CCEO bem

diferenciado (**Tabela 2**). Nenhum paciente portador de CCEO avaliado neste estudo apresentou CCEO pouco diferenciado.

Tabela 2 – Distribuição do grau de diferenciação histopatológica dos pacientes com CCEO incluídos no estudo. Grupo I (<60 anos), grupo II (60 a 80 anos), grupo III (> 80 anos).

Grau de diferenciação histopatológica	Grupo I (n=3)	Grupo II (n=6)	Grupo III (n=2)
Bem Diferenciado	0 (0%)	1 (25%)	1 (50%)
Moderadamente Diferenciado	3 (100%)	3 (75%)	1 (50%)
Pouco diferenciado	0 (0%)	0 (0%)	0 (0%)

Em relação a presença de linfonodos cervicais positivos em 66,67% dos pacientes do Grupo I apresentaram invasão e 16,67% dos pacientes do Grupo II, entretanto não foi observada invasão loco-regional no Grupo III (**Tabela 3**).

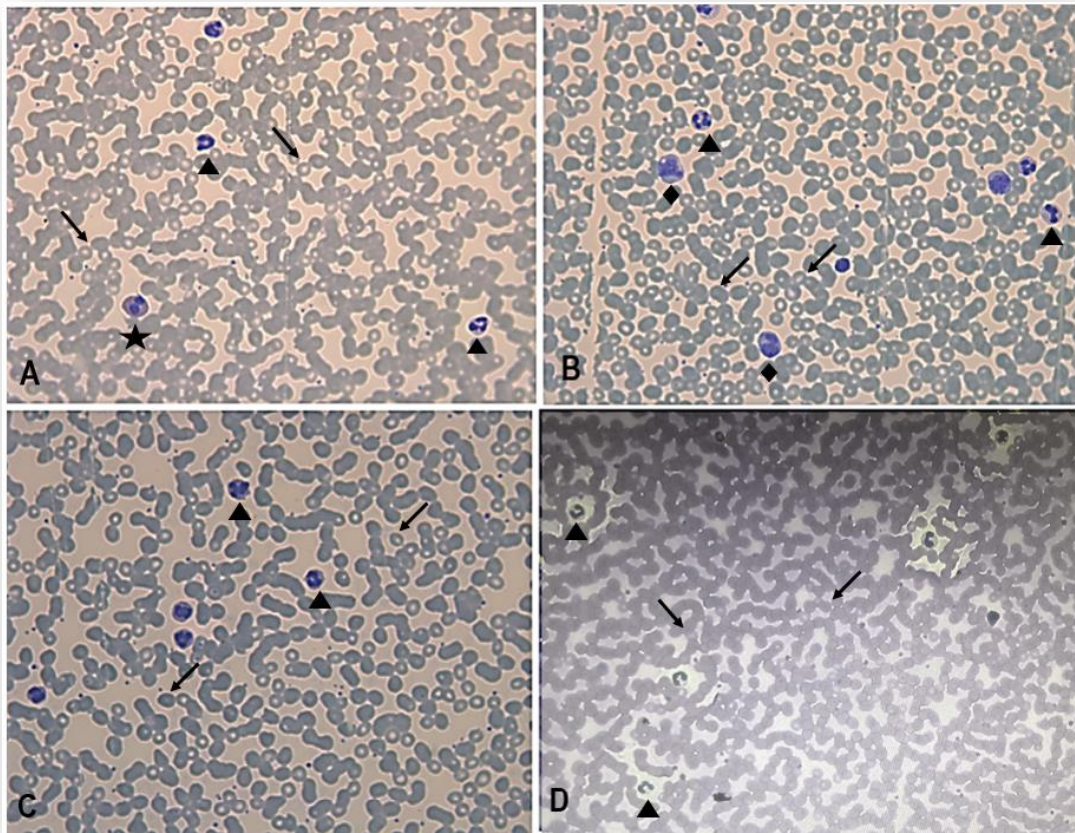
Tabela 3 – Presença de linfonodos cervicais positivos em pacientes portadores de CCEO.

Estadiamento clínico	Grupo I n=3	Grupo II n=6	Grupo III n=2
N			
Presente	2 (66,67%)	1 (16,67%)	0 (0%)
Ausente	1 (33,33%)	5 (83,33%)	2 (1000%)

5.3. Análise da morfológica das células que constituem o sangue periférico de pacientes com CCEO e LCOs

A fim de verificar uma possível alteração morfológica nas células do sangue periférico de pacientes com CCEO e LCOs, foram realizadas extensões sanguíneas, coradas por panótico e visualizadas por microscopia de campo claro. Não foram observadas alterações morfológicas no esfregaço do sangue periférico dos pacientes analisados (**Figura 22**).

Figura 22: Análise morfológica das células do sangue periférico dos pacientes com CCEO e LCOs.

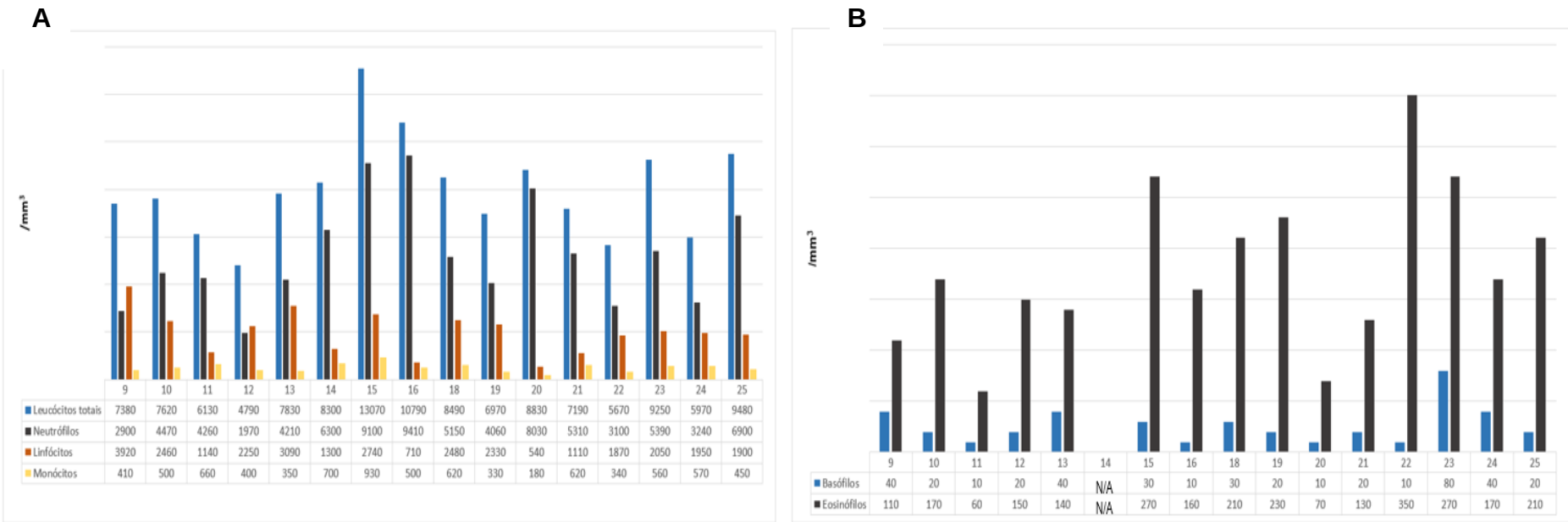


Legenda: O sangue periférico coletado dos pacientes, foi utilizado para a confecção de esfregaços e corados com panótico como descrito em material e métodos. Em **(A)** observamos o paciente CCEO#14-19, **(B)** CCEO#15-19, **(C)** CCEO#16-19 e **(D)** CCEO#18-19. Observamos a presença de hemácias (seta), de neutrófilos (cabeça de seta), eosinófilo (estrela), e monócitos (balão). Imagens adquiridas por microscopia de campo claro.

5.4. Análise quantitativa global dos parâmetros avaliados no hemograma

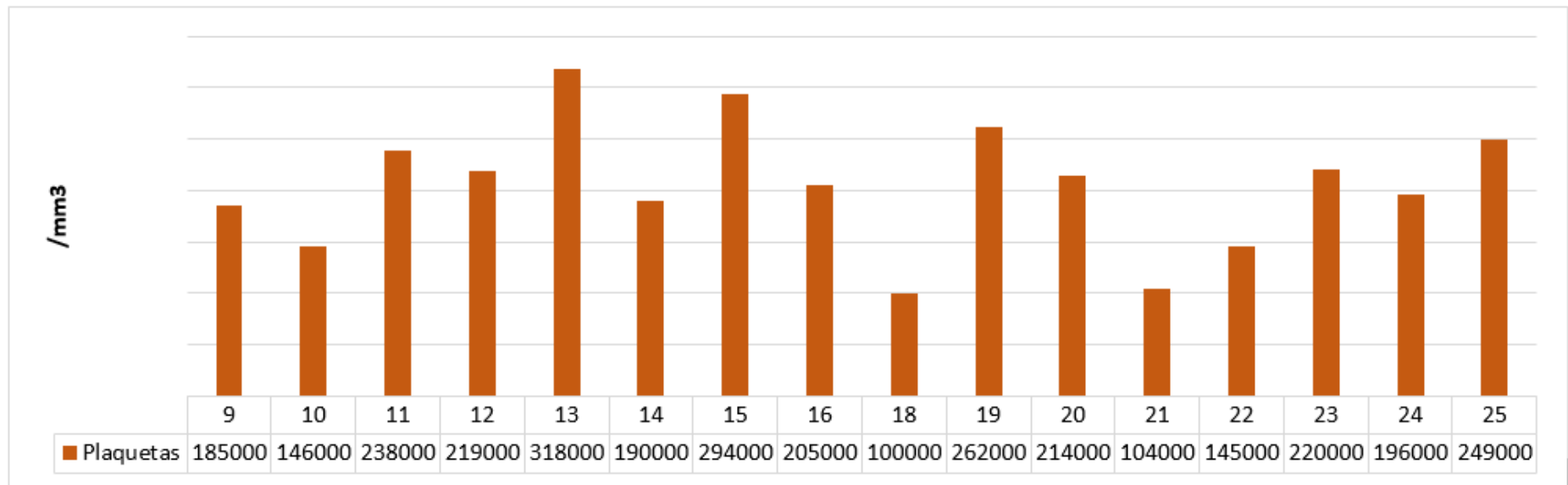
O hemograma é uma técnica que avalia a quantidade e o perfil dos elementos figurados do sangue sendo rotineiramente utilizado para diagnóstico, monitoramento da evolução clínico do paciente e efetividade do tratamento escolhido. Dessa forma submetemos o sangue periférico dos pacientes estudados à análise por equipamento automatizado (BC5500) para quantificação dos leucócitos totais (**Figura 23**), das plaquetas (**Figura 24**) e dos eritrócitos (**Figura 25**) para posterior comparação desses resultados com os valores referenciais utilizados nas rotinas médicas e determinação do perfil dos pacientes CCEO e LCOs. Observamos que os pacientes com CCEO (pacientes identificados como: CCEO15, CCEO16, CCEO20, CCEO21, CCEO25) possuem altos níveis de leucócitos totais também apresentam altos níveis de neutrófilos .

FIGURA 23: Análise do leucograma dos pacientes analisados neste estudo

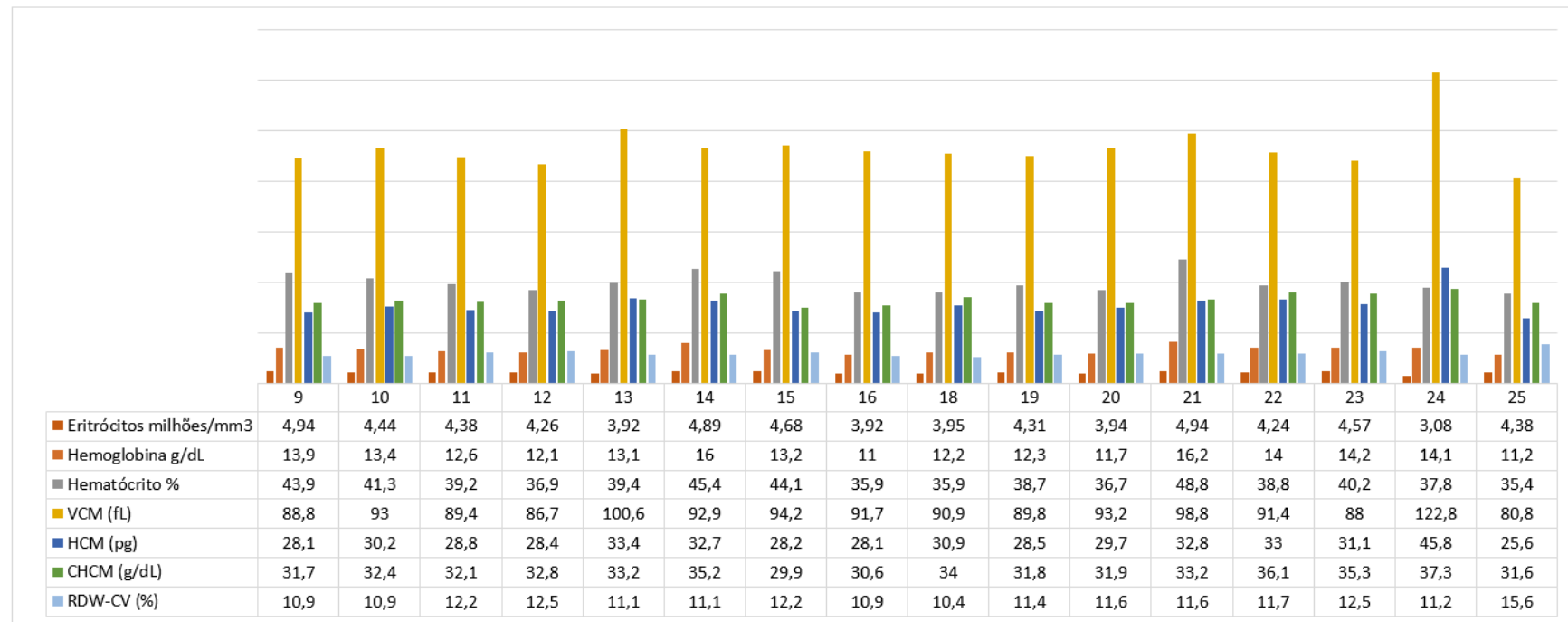


Legenda: Em **A**, Leucócitos totais, neutrófilos, linfócitos e monócitos (milhões /mm³). Em **B**, basófilos e eosinófilos (milhões /mm³). Numeração referente ao código de identificação aplicado para cada paciente (9-25). Para o paciente CCEO 14-19 a quantificação dos basófilos e eosinófilos não se aplica. Avaliação realizada através da análise do equipamento de automação em Hematologia BC5500. Valores absolutos dos pacientes analisados.

Figura 24: Avaliação quantitativa do número de plaquetas dos pacientes analisados neste estudo.



Legenda: Plaquetas (milhões /mm³). Numeração referente ao código de identificação aplicado para cada paciente (9-25). Avaliação realizada através da análise do equipamento de automação em Hematologia BC5500. Valores absolutos dos pacientes analisados.

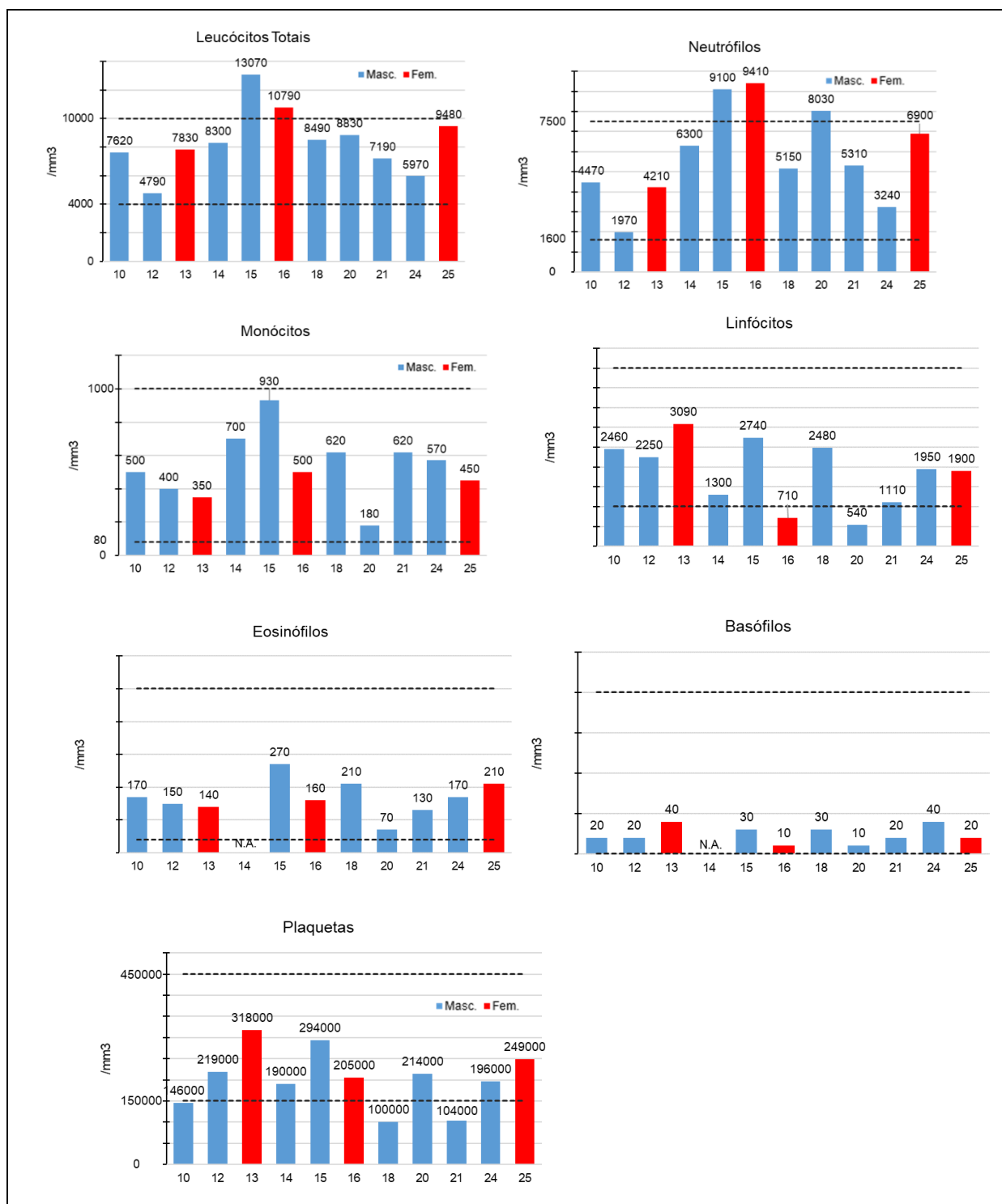
Figura 25: Avaliação dos eritrócitos dos pacientes analisados neste estudo

Legenda: Eritrócitos (milhões/mm³), hemoglobina (g/dL), hematócrito (%), VCM (fL), HCM (pg), CHCM (g/dL), RDW-CV (%). Numeração referente ao código de identificação aplicado para cada paciente (9-25). Avaliação realizada através da análise do equipamento de automação em Hematologia BC5500. Valores absolutos dos pacientes analisados.

5.5: Análise comparativa entre os parâmetros avaliados no hemograma dos pacientes com CCEO e os valores de referência amplamente utilizados.

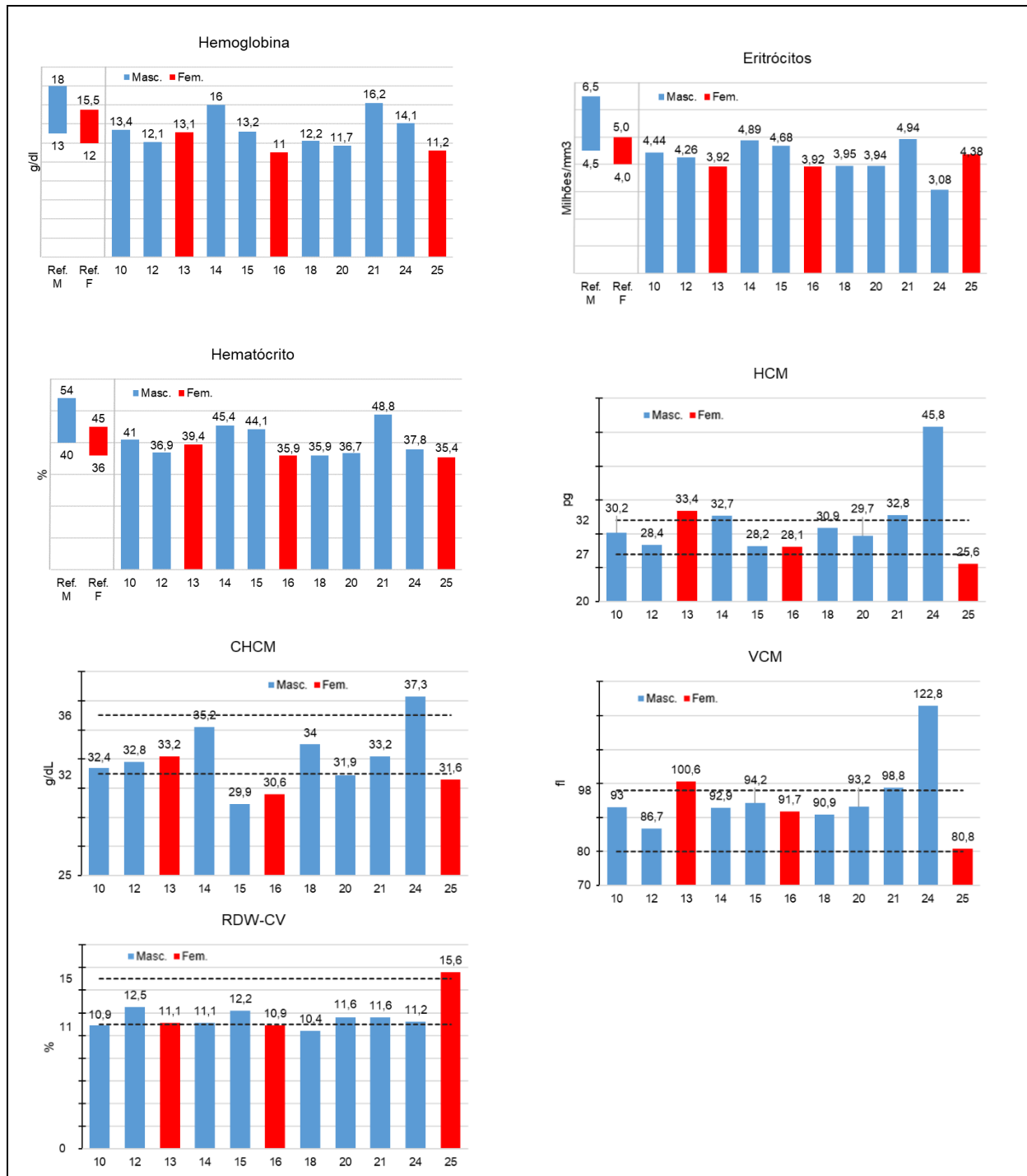
A observação dos elementos figurados do sangue é uma análise rotineira nos consultórios médicos e hospitais, onde esses resultados quando comparados com os valores de referência estabelecidos auxiliam na identificação de patologias. Com o intuito de verificar possíveis padrões de alterações dos elementos que compõem o sangue periférico nos pacientes diagnosticados com CCEO, foi realizada a análise quantitativa desses elementos e sua comparação com os valores de referências amplamente utilizados nas rotinas médicas. Os pacientes com CCEO 15 e 16 apresentaram um aumento nas quantidades de leucócitos totais e os pacientes 15, 16 e 20 apresentaram um aumento no número de neutrófilos quando comparados com os valores de referência da série branca celular (**Figura 26 e Anexo III**). Ainda, os pacientes 18 e 21 bem como 16 e 20 apresentaram valores de plaquetas e linfócitos menores de que os de referência respectivamente. Não foram observadas alterações nos números de monócitos, eosinófilos e basófilos em relação aos números de referência.

Figura 26: Análise quantitativa da leucometria global, diferencial leucocitária e plaquetas dos pacientes com CCEO.



Legenda: Valores leucócitos totais, neutrófilos, linfócitos, monócitos, eosinófilos, basófilos e plaquetas dos pacientes com CCEO foram comparados com os valores de referência. No topo de cada barra podemos observar o número absoluto da quantificação de cada paciente. Linha pontilhada indica o valor de referência para o parâmetro indicado. Barras vermelhas indicam pacientes do sexo feminino e azuis do sexo masculino. O sangue periférico dos pacientes foi analisado no equipamento de automação em Hematologia BC550 e quantificados.

Em relação à série vermelha, foram observados um aumento dos valores de HCM dos pacientes 13, 14, 21 e 24 e um aumento do CHCM do paciente 24. Os pacientes 15, 16, 20 e 25 apresentaram valores de CHCM reduzidos. Os pacientes 13, 21 e 24 obtiveram valores de VCM aumentados. O paciente 25 apresentou uma quantificação elevada do RDW-CV em relação ao valor de referência (**Figura 27**).

Figura 27: Análise quantitativa do eritrograma dos pacientes com CCEO.

Legenda: Valores eritrócitos, hemoglobinas, hematócrito, HCM, CHCM, VCM e RDW-CV avaliados no hemograma dos pacientes com CCEO foram comparados com os valores de referência. No topo de cada barra podemos observar o número absoluto da quantificação de cada paciente. Linha pontilhada indica o valor de referência para o parâmetro indicado. Os valores de referência da hemoglobina e hematócrito estão indicados no canto superior esquerdo por ser um parâmetro com quantificações relacionadas ao gênero. Barras vermelhas indicam pacientes do sexo feminino e azuis do sexo masculino. O sangue periférico do paciente foi analisado no equipamento de automação em Hematologia BC550, e gerado os valores do hemograma.

Não observamos associação em relação aos parâmetros analisados no leucograma e no eritrograma e o sexo em pacientes portadores de CCEO (**Tabela 4**).

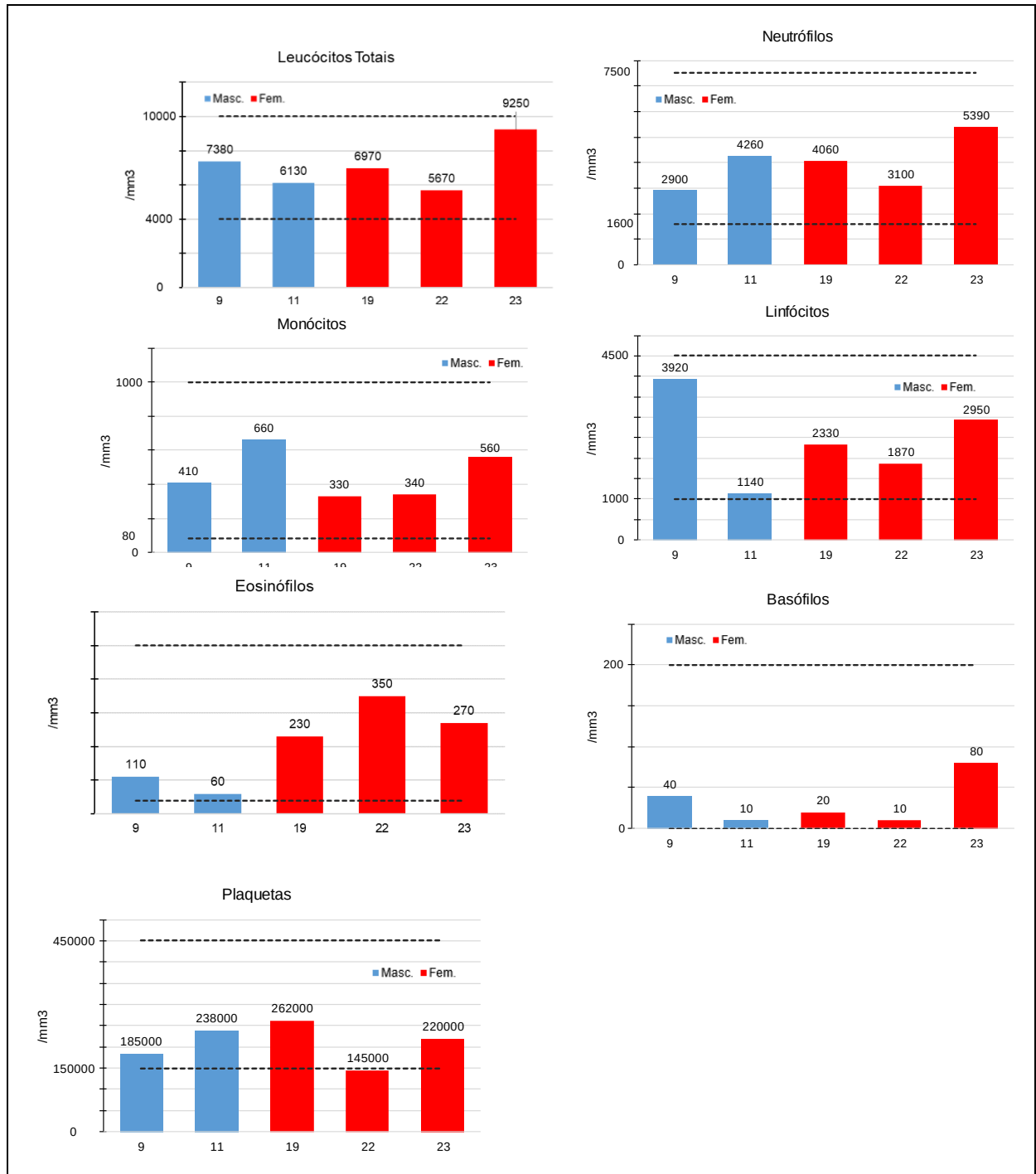
Tabela 4: Análise da correlação dos parâmetros celulares com o gênero dos pacientes diagnosticados com CCEO.

Variável	Sexo	Média	Desvio Padrão	P
Leucócitos	Masculino	8032,50	802,26	0,22
	Feminino	9366,67	1310,09	
Basófilos	Masculino	25,71	7,87	0,67
	Feminino	23,33	15,27	
Eosinófilos	Masculino	190,00	48,99	0,52
	Feminino	170,00	36,05	
Neutrófilos	Masculino	5446,25	852,21	0,41
	Feminino	6840,00	1391,66	
Linfócitos	Masculino	1853,75	314,67	1,00
	Feminino	1900,00	513,86	
Monócitos	Masculino	565,00	69,60	0,18
	Feminino	433,33	113,67	
Hematócrito	Masculino	40,86	1,54	0,12
	Feminino	36,90	2,51	
Eritrócitos	Masculino	4,27	,19	0,22
	Feminino	4,07	,32	
Hemoglobina	Masculino	13,61	,57	0,07
	Feminino	11,77	,93	
VCM	Masculino	96,56	11,12	0,63
	Feminino	91,03	9,91	
HCM	Masculino	32,34	5,70	0,38
	Feminino	29,03	3,98	
CHCM	Masculino	33,34	2,22	0,28
	Feminino	31,80	1,31	
RDW-CV	Masculino	11,44	0,69	1,00
	Feminino	12,53	2,65	
Plaquetas	Masculino	182875,00	22293,35	0,10
	Feminino	257333,33	36404,89	
RNL	Masculino	4,28	1,76	0,84
	Feminino	6,08	2,87	

5.6: Análise comparativa entre os parâmetros avaliados no hemograma dos pacientes com LCOs e os valores de referência amplamente utilizados

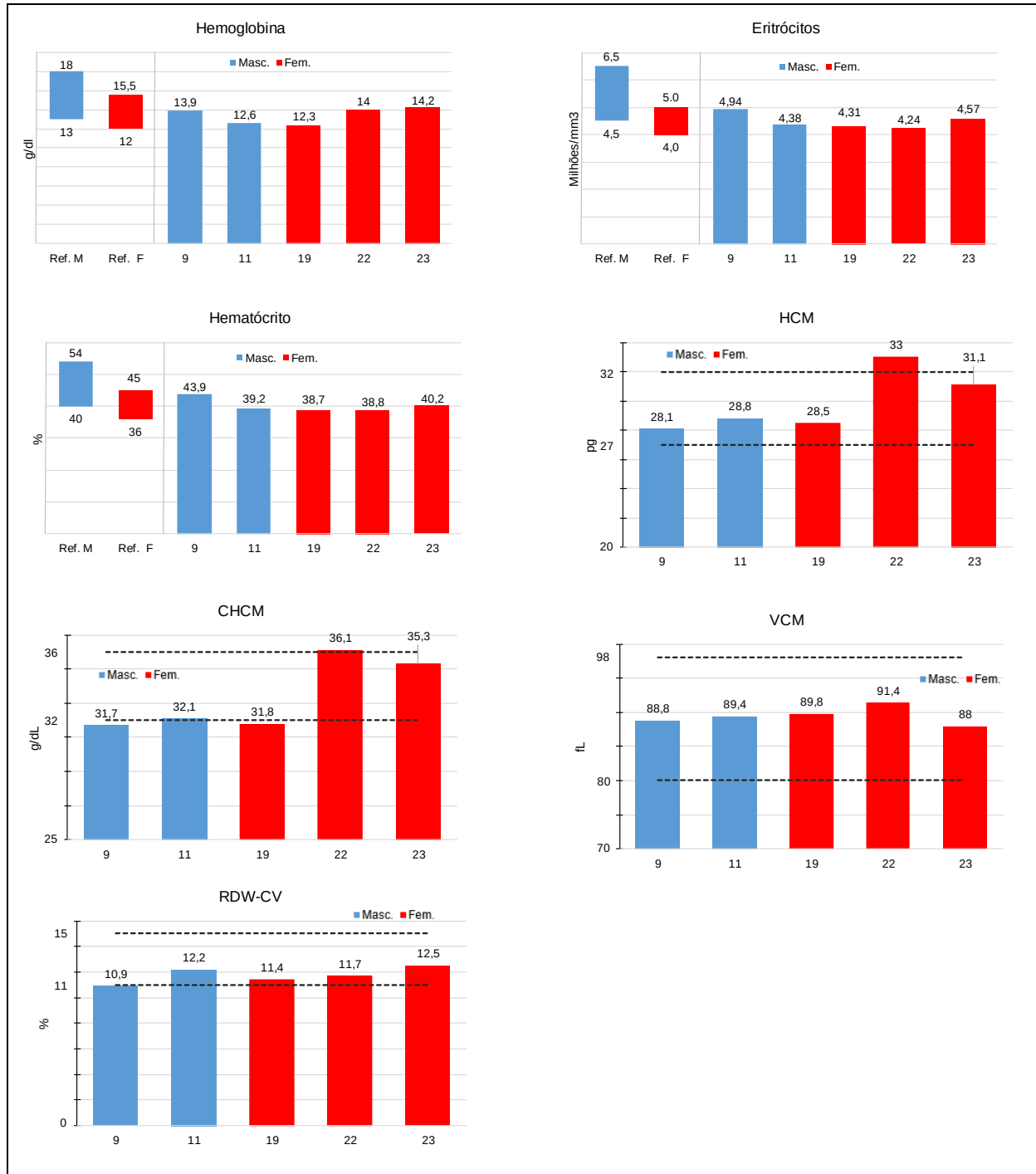
Avaliamos ainda o perfil das células do sangue periférico dos pacientes acometidos com lesões da cavidade oral não tumorais (LCOs). Observamos que o paciente 22 apresentou uma diminuição na quantificação de plaquetas (**Figura 28**). Não foi observada nenhuma outra alteração nos outros parâmetros da série branca para esse paciente. Todos os outros pacientes apresentaram valores sem alteração quanto comparados com os valores de referência.

Figura 28: Análise quantitativa da leucometria global, diferencial leucocitária e plaquetas dos pacientes com LCOs.



Legenda: Valores de leucócitos totais, neutrófilos, linfócitos, monócitos, basófilos, eosinófilos e plaquetas, avaliados no hemograma dos pacientes com LCOs foram comparados aos valores de referência. No topo de cada barra podemos observar o número absoluto da quantificação de cada paciente. Linha pontilhada indica o valor de referência para o parâmetro indicado. Barras vermelhas indicam pacientes do sexo feminino e azuis do sexo masculino. O sangue periférico dos pacientes foi analisado no equipamento de automação em Hematologia BC550 e gerado os valores do hemograma.

Quando avaliamos as quantificações da série vermelha, observamos que o paciente 11 apresentou valores reduzidos de hemoglobina, eritrócito e hematócrito. O paciente 9 e 19 obtiveram valores menores de RDW e CHCM respectivamente em relação aos valores de referência. O paciente 22 apresentou valores de HCM e CHCM elevados. Não observamos nenhuma alteração nos valores de VCM nos pacientes avaliados (**Figura 29**).

Figura 29: Análise quantitativa do eritrograma dos pacientes com LCOs.

Legenda: Valores de eritrócitos, hemoglobinas, hematócrito, HCM, CHCM, VCM e RDW-CV avaliados no hemograma dos pacientes com LCOs foram comparados aos valores de referência. No topo de cada barra podemos observar o número absoluto da quantificação de cada paciente. Linha pontilhada indica o valor de referência para o parâmetro indicado. Os valores de referência da hemoglobina e hematócrito estão indicados no canto superior esquerdo por ser um parâmetro com quantificações relacionadas ao gênero. Barras vermelhas indicam pacientes do sexo feminino e azuis do sexo masculino. O sangue periférico dos pacientes foi analisado no equipamento de automação em Hematologia BC550 e gerado os valores do hemograma.

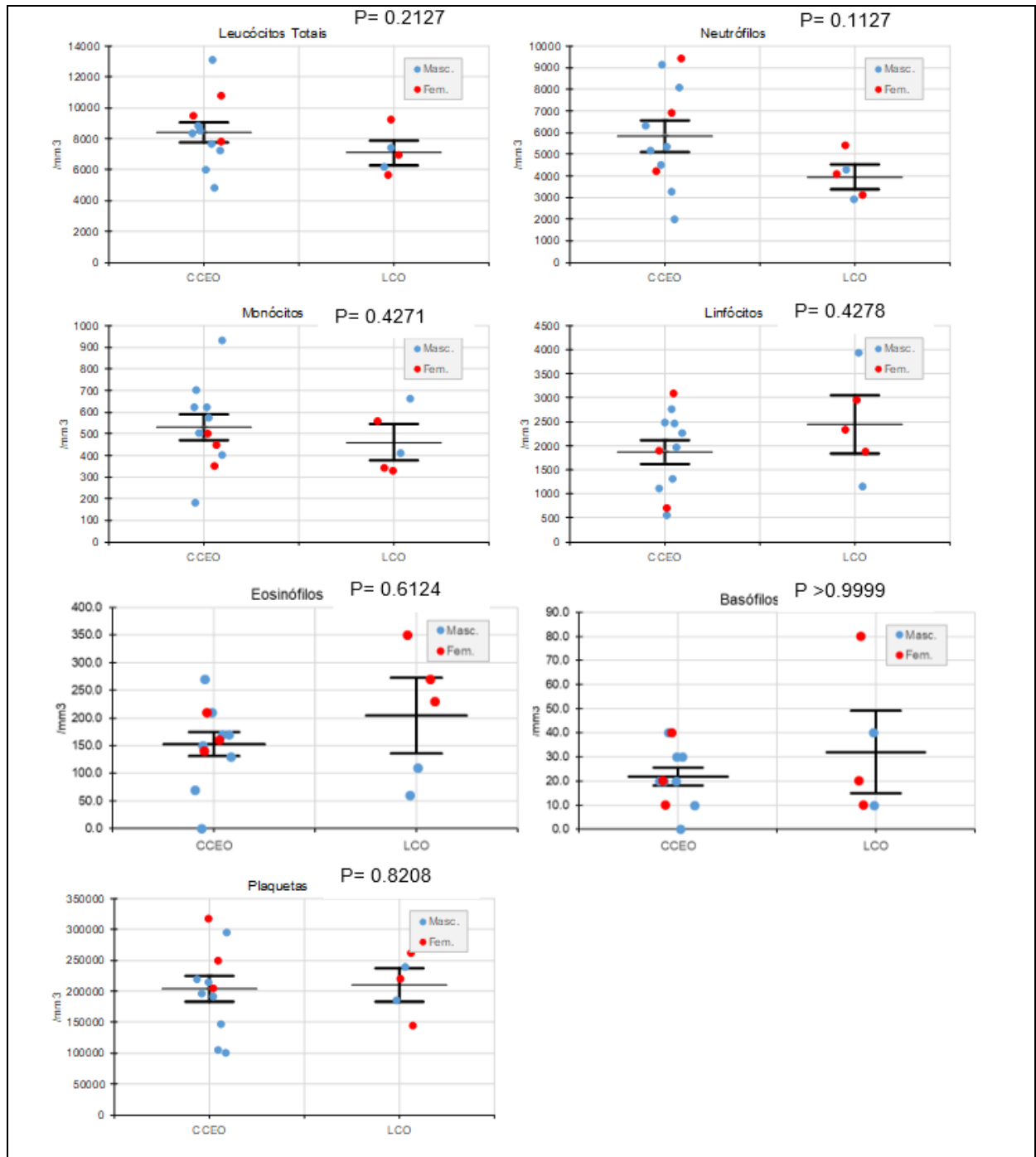
Quando comparadas as variáveis analisadas com o sexo do paciente não foi observada nenhuma diferença significativa nos valores encontrados entre os pacientes do sexo masculino e feminino tanto no leucograma como no eritrograma (Tabela 5).

Tabela 5: Análise da correlação dos parâmetros celulares com o gênero dos pacientes diagnosticados com LCOs.

Variável dependente	Sexo	Média	Desvio Padrão	P
Leucócitos	Masculino	6755,00	1106,76	1,00
	Feminino	7296,67	903,67	
Basófilos	Masculino	25,00	21,21	0,80
	Feminino	36,00	37,86	
Eosinófilos	Masculino	85,00	35,35	0,20
	Feminino	283,33	61,10	
Neutrófilos	Masculino	3580,00	771,33	0,56
	Feminino	4183,33	629,78	
Linfócitos	Masculino	2530,00	813,60	1,00
	Feminino	2083,33	664,30	
Monócitos	Masculino	535,00	104,12	0,23
	Feminino	410,00	85,02	
Hematócrito	Masculino	41,55	1,44	0,25
	Feminino	39,23	1,18	
Eritrócitos	Masculino	4,66	0,19	0,25
	Feminino	4,37	0,15	
Hemoglobina	Masculino	13,25	0,71	0,56
	Feminino	13,50	0,58	
VCM	Masculino	89,10	0,42	0,80
	Feminino	89,73	1,70	
HCM	Masculino	28,45	0,49	0,40
	Feminino	30,87	2,26	
CHCM	Masculino	31,90	0,28	0,40
	Feminino	34,40	2,29	
RDW-CV	Masculino	11,55	0,92	0,80
	Feminino	11,87	0,57	
Plaquetas	Masculino	211500,00	37484,44	1,00
	Feminino	209000,00	30605,92	
RNL	Masculino	2,24	0,92	1,00
	Feminino	2,01	0,75	

5.7. Análise comparativa entre os parâmetros avaliados no hemograma dos pacientes com CCEO e LCOs

Quando comparamos os valores do hemograma entre os pacientes diagnosticados com CCEO e LCOs, observamos que os pacientes com CCEO apresentam um aumento dos leucócitos totais, neutrófilos e monócitos apesar de não ter sido observado diferença estatisticamente significativa (**Figura 30 e Tabela 6**). Na série vermelha, nossos dados sugerem um aumento do VCM do grupo CCEO em relação ao LCO (**Figura 31 e Tabela 7**). Observamos ainda uma diminuição das quantidades de linfócitos e eosinófilos na série branca do grupo CCEO. Não foram observadas diferenças nas plaquetas, hemoglobina, hematócrito, HCM, CHCM e RDW entre os grupos.

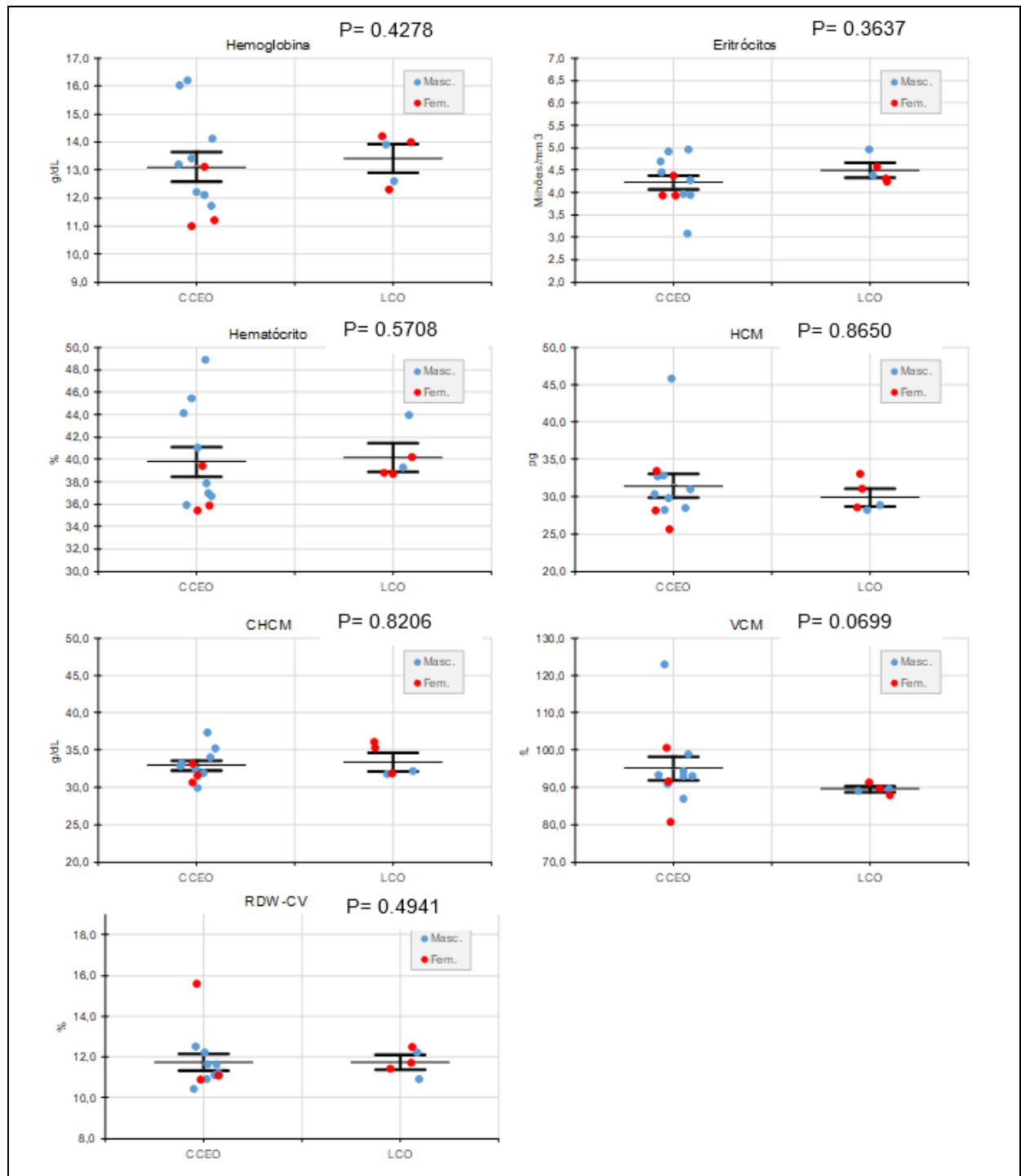
Figura 30: Análise comparativa da série branca celular dos pacientes com CCEO e LCOs.

Legenda: Cada linha horizontal representa a média dos valores leucócitos totais, neutrófilos, linfócitos, monócitos, basófilos, eosinófilos e plaquetas, avaliados no hemograma dos pacientes com CCEO e LCOs. Os valores de referência: leucócitos ($4000 - 10000/mm^3$), neutrófilos ($1600 - 7500/mm^3$), monócitos ($80 - 1000/mm^3$), linfócitos ($1000 - 4500/mm^3$), eosinófilos ($40 - 500/mm^3$), basófilos ($0 - 200/mm^3$), plaquetas ($150000 - 450000/mm^3$). O sangue periférico do paciente foi analisado no equipamento de automação em Hematologia BC550 e gerado os valores do hemograma.

Tabela 6: Estatística descritiva dos pacientes com CCEO.

Variável	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão	Ref
Idade	41	86	64,64	13,23	
Leucócitos	4790,00	13070,00	8396,36	2241,086	4000 – 10000/mm ³
Basófilos	10,00	40,00	25,00	9,71	0-200/mm ³
Eosinófilos	130,00	270,00	184,00	44,52	40 - 500/mm ³
Neutrófilos	1970,00	9410,00	5826,36	2377,60	1600 – 7500/mm ³
Linfócitos	540,00	3090,00	1866,36	844,63	1000 - 4500/mm ³
Monócitos	180,00	930,00	529,09	196,64	80 - 1000/mm ³
Hematócrito	35,40	48,80	39,78	4,53	M(40-54) F (36-45) %
Eritrócitos	3,08	4,94	4,218	,54	M(4,5 - 6,5) F(4,0 – 5,0) milhões/mm ³
Hemoglobina	11,00	16,20	13,11	1,76	M(13 – 18) F(12 – 15,5) g/dL
VCM	80,00	122,80	95,05	10,62	80 – 98fL
HCM	22,60	45,80	31,43	5,32	27 – 32pg
CHCM	29,90	27,30	39,91	2,08	32 – 36 g/dL
RDW-CV	10,40	15,60	11,73	1,41	11 – 15%
Plaquetas	100000,00	318000,00	203181,82	69195,11	150000 - 450000/mm ³
RNL	,88	14,87	4,77	4,79	

Figura 31: Análise comparativa da série vermelha celular dos pacientes com CCEO e LCOs.



Legenda: Cada linha horizontal representa a média dos valores eritrócitos, hemoglobina, hematócrito, avaliados no hemograma dos pacientes com CCEO e LCOs. Os valores de referência: Hemoglobina (M(13 – 18) F(12 – 15,5) g/dL), eritrócito (M(4,5 - 6,5) F(4,0 – 5,0) milhões/mm³), hematócrito (M(40-54) F(36-45) %), HCM (27 – 32 pg), CHCM (32 – 36 g/dL), VCM (80 – 98fL), RDW-CV (11 – 15%). O sangue periférico do paciente foi analisado no equipamento de automação em Hematologia BC550 e gerado os valores do hemograma.

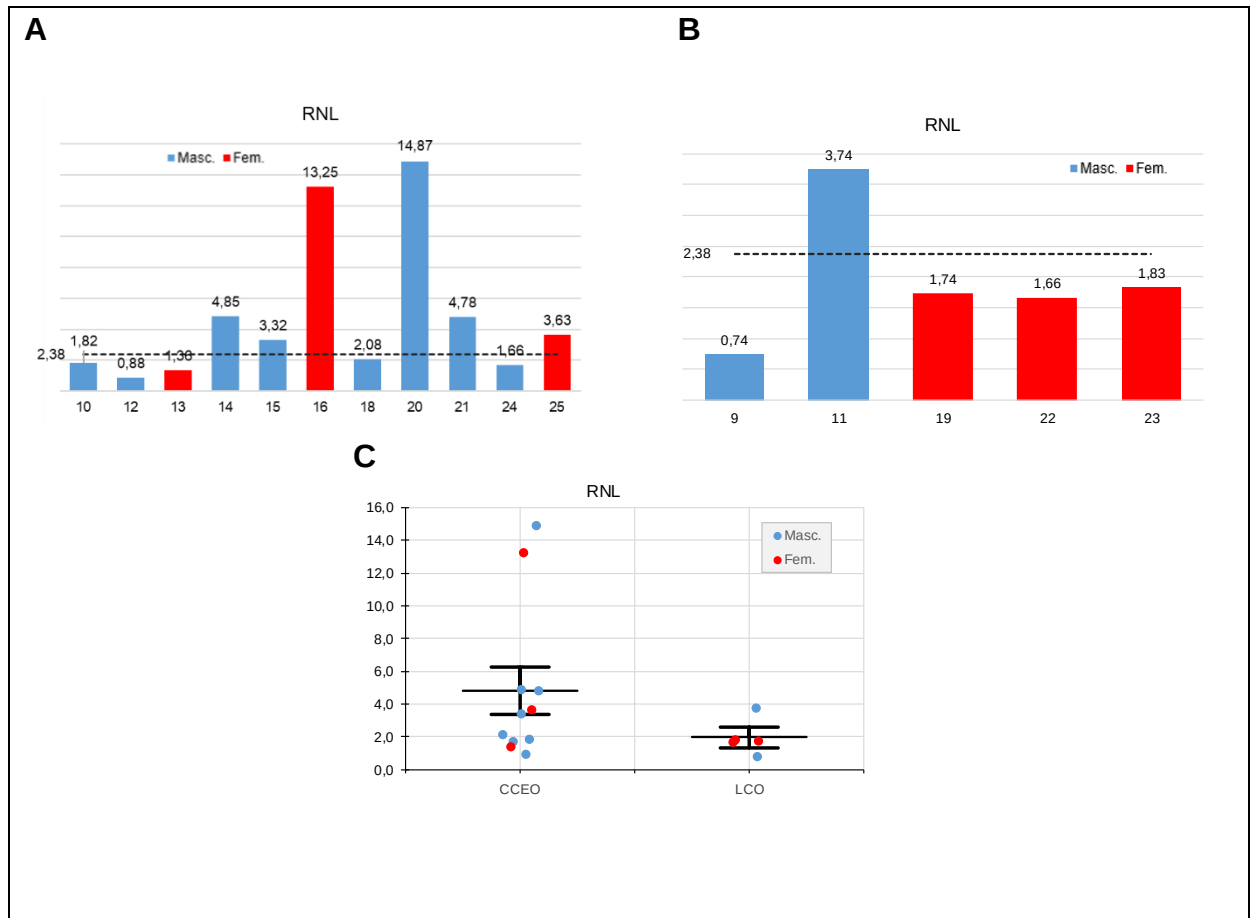
Tabela 7: Estatística descritiva dos pacientes com LCOs.

	Mínimo	Máximo	Média	Desvio Padrão	Ref
Idade	53	71	63,80	6,61	
Leucócitos	5670,00	9250,00	7080,00	1387,59	4000 – 10000/mm ³
Basófilo	10,00	80,00	89,48	1,26	0-200/mm ³
Eosinófilo	60,00	350,00	204,00	118,23	40 - 500/mm ³
Neutrófilos	2900,00	5390,00	3942,00	1000,81	1600 – 7500/mm ³
Linfócitos	1140,00	3920,00	2262,00	1026,04	1000 - 4500/mm ³
Monócitos	330,00	660,00	460,00	144,74	80 - 1000/mm ³
Hematócrito	38,70	43,90	40,16	2,17	M(40-54) F (36-45) %
Eritrócitos	4,24	4,94	4,49	,28	M(4,5 - 6,5) F(4,0 – 5,0) milhões/mm ³
Hemoglobina	12,30	14,20	13,40	,88	M(13 – 18) F(12 – 15,5) g/dL
VCM	88,00	91,40	89,50	1,26	80 – 98fL
HCM	28,10	33,00	29,90	2,08	27 – 32pg
CHCM	31,70	36,10	33,40	2,12	32 – 36 g/dL
RDW-CV	10,90	12,50	11,74	0,63	11 – 15%
Plaquetas	145000,00	262000,00	210000,00	45929,30	150000 - 450000/mm ³
RNL	,74	3,74	2,10	1,13	

5.8: Análise da razão neutrófilo- linfócito nos pacientes CCEO e LCOs

A literatura recente sugere a relação da razão neutrófilo/linfócito (RNL) como indicador de prognóstico da evolução do câncer oral. Avaliamos então esse parâmetro com os grupos já diagnosticados com o CCEO e o grupo com LCO. Observamos que os pacientes 14, 15, 16, 20, 21 e 25 do grupo CCEO apresentaram valores de RNL acima de 2,38 (valor referência para essa análise) (**Figura 32A**). No grupo LCOs observamos que somente o paciente 11 apresentou uma taxa elevada de RNL quando comparados com outros pacientes do mesmo grupo (**Figura 32B**). Apesar de não ter sido estatisticamente significativa, podemos observar um aumento do RNL no grupo CCEO quando comparado com o grupo LCOs (**Figura 32C**).

Figura 32: Análise da razão neutrófilo/linfócito entre os pacientes com CCEO e LCOs.



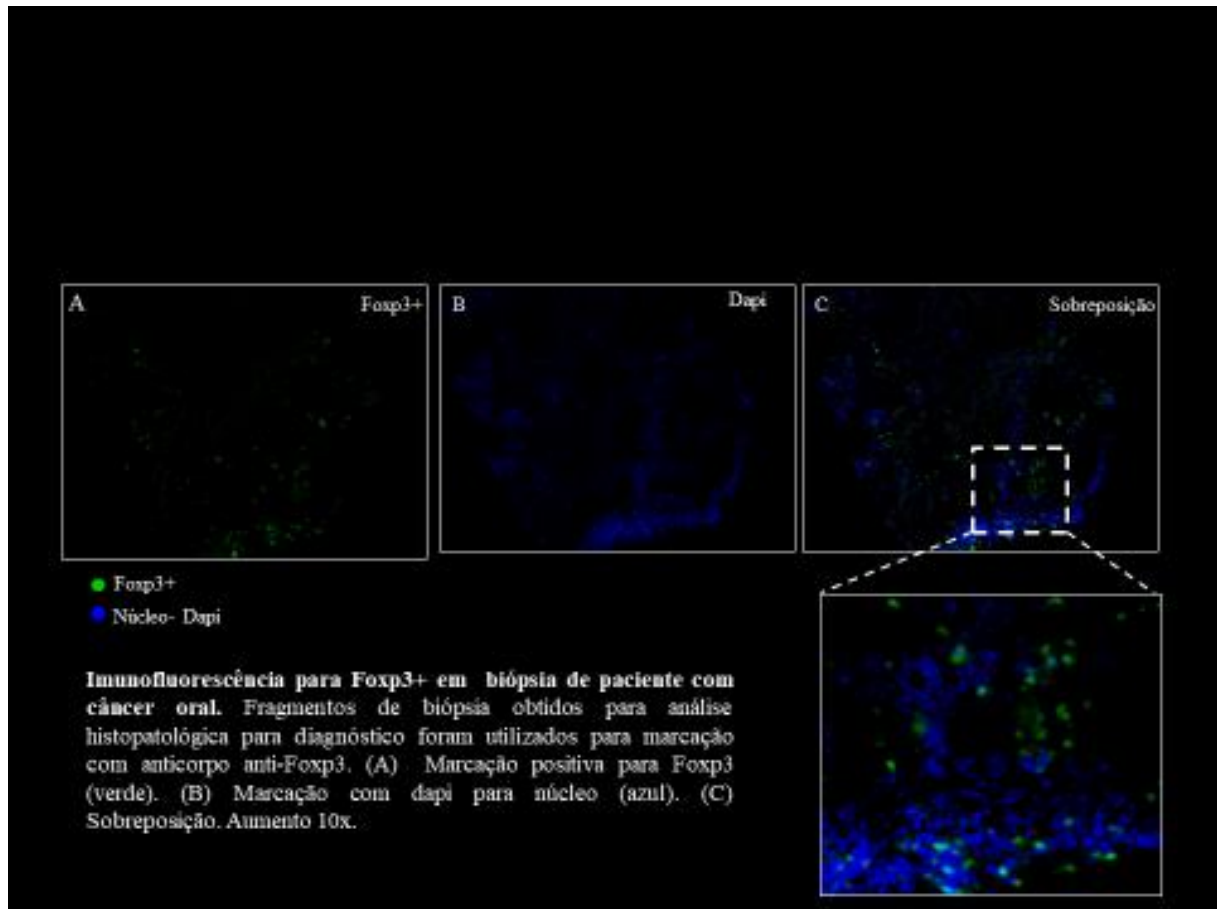
Legenda: Em (A) CCEO, (B) LCOs, (C) observamos a média entre os grupos analisados. O sangue periférico dos pacientes foi analisado no equipamento de automação em Hematologia BC550 e gerado os valores do hemograma.

5.9: Avaliação da presença de Tregs em biópsia de lesão por CCEO

Os linfócitos T regulatórios (Tregs) são um subtipo de linfócito TCD4+ que possuem funções imunoreguladoras, desativando a resposta imune. Diversos trabalhos têm demonstrado a presença dos Tregs no câncer oral, contudo a sua função nesse tipo de tumor ainda não se encontra totalmente esclarecida.

Nesse próximo experimento, utilizamos a biópsia de paciente diagnosticado com CCEO e fizemos a marcação por imunofluorescência para o fator de transcrição Foxp3, amplamente utilizado na identificação de Tregs. Observamos marcações positivas para Foxp3 na biópsia de paciente com CCEO (**Figura 33**).

Figura 33: Imunofluorescência para Foxp3+ em biópsia de paciente com CCEO.



Legenda: Fragmentos de biópsia obtidos para análise histopatológica para diagnóstico foram utilizados para marcação com anticorpo anti-Foxp3. **(A)** Marcação positiva para Foxp3 (verde). **(B)** Marcação com DAPI para núcleo (azul). **(C)** Sobreposição.

6 DISCUSSÃO

O diagnóstico precoce do câncer é fundamental para o aumento da sobrevida do paciente. Para o diagnóstico do câncer oral é necessário um dentista com experiência na identificação de lesões orais com potenciais de malignidades, o que é de difícil acesso para uma parte da população. Dessa forma, propomos nessa dissertação uma avaliação a partir do hemograma de pacientes com CCEO a fim de auxiliar o dentista bem como o médico de família a identificar possíveis alterações que possam antecipar o diagnóstico desta malignidade.

Nesse estudo observamos uma preponderância de pacientes do gênero masculino (62,5%), na faixa etária de 60 a 80 anos (62,5%), com histórico de tabagismo (56,25%), sendo o assoalho lingual, a gengiva e a língua as regiões anatômicas mais acometidas (18,75%). Avaliando os grupos de pacientes individualmente, os pacientes diagnosticados com CCEO apresentaram como as regiões anatômicas de maior comprometimento a língua e o assoalho lingual representando 27,3%, seguida da região trígono retromolar com 18,2% e o gênero masculino também de maior representatividade (72,3%) neste grupo. Nossos dados estão de acordo com os da literatura mostrando um maior acometimento do gênero masculino, na faixa etária maior de 60 anos e usuários de tabaco (INCA, 2020, BRUNISCHAKI *et al.*, 2018; JIANG X *et al.*, 2019, GIRARDI *et al.*, 2017) e as regiões anatômicas de maior comprometimento a língua e o assoalho lingual (IRANI, 2016; LEMOS *et al.*, 2013).

Em relação ao grau de diferenciação histopatológica, mais de 50% dos pacientes apresentaram tumores moderadamente diferenciados. Nossos dados corroboram com Filho e colaboradores, que observaram em seu estudo, realizado em São Paulo entre os anos de 1997 a 2000, que o grau histológico moderadamente diferenciado estava presente em 52,4% dos pacientes portadores de CCEO avaliados (FILHO *et al.*, 2006). A presença de tumores moderadamente diferenciados foi relacionada com a possibilidade de 54% da recidiva em pacientes acometidos com carcinoma de mucosa bucal (PADMA, 2017).

Um dado interesse obtido neste presente estudo foi a presença de linfonodos cervicais fixos e endurecidos e indolores em 66,67% dos pacientes do Grupo I (<60 anos) em relação a 16,67% do Grupo II (60 – 80 anos), o que parece sugerir um perfil mais invasivo em pacientes de faixa etária menor de 60 anos, pois a presença de

linfonodos cervicais caracteriza metástase, portanto, um comportamento tumoral agressivo. Relação semelhante foi encontrada por Sarkaria e cols (1994) que por uma revisão sistemática observaram que 5 de 6 pacientes abaixo de 40 anos apresentaram acometimento loco-regional e tiveram um prognóstico desfavorável indicando um perfil diferencial quando comparado com pacientes com idades superiores.

Análises citomorfológicas do sangue periférico já são descritas e comumente utilizadas no auxílio do diagnóstico de alguns tumores (LORENZI *et al.*, 2018; CHAUFFAILLE *et al.*, 2016). É amplamente descrito que alguns linfomas e síndromes mielodisplásicas podem apresentar alterações celulares como: macrócitos, poiquilocitoses (ovalócitos, acantócitos, eliptócitos e dacriócitos), inclusões nos neutrófilos (pontilhados basofílico e Corps de Howell Jolly, neutrófilos com citoplasma desgranulado e núcleo hiposegmentado (pseudopelger) linfócitos apresentando citoplasma com vilosidades polares curtas (HENRY *et al.*, 1928; LORENZI *et al.*, 2018; CHAUFFAILLE *et al.*, 2016). A morfologia das células presentes no esfregaço sanguíneo dos pacientes avaliados neste presente estudo foi analisada, entretanto não foi observada alteração.

Diversos trabalhos têm demonstrado a importância do ambiente tumoral e da inflamação associada com a proliferação, invasão e metástase de células tumorais (MEADS *et al.*, 2009; HANAHAN *et al.*, 2011; DIAKOS *et al.*, 2014). Avaliamos os parâmetros hematológicos em busca de marcadores para correlacionarmos com a patologia.

Dessa forma, observamos altos níveis de leucócitos totais quando avaliamos a quantidade de células presentes no sangue periférico desses pacientes. Em parte, o aumento de neutrófilos observados podem estar relacionados com os altos números de leucócitos totais. O aumento de neutrófilos tem sido descrito em diversos tumores como câncer de ovário, mama e de laringe (BRUCKNER *et al.*, 1982; HORNYCHOVÁ *et al.*, 2008; TIBALDI *et al.*, 2008; CHEW *et al.*, 2012; AZAB *et al.*, 2012; VALERO *et al.*, 2020) sendo relacionado a uma resposta inflamatória local e sistêmica e um prognóstico desfavorável para o paciente (SHINRIKI *et al.*, 2009; BEKES, 2011; YAN *et al.*, 2013; MARGETTS *et al.*, 2018).

Dados recentes da literatura mostram o papel dos neutrófilos favorecendo a degradação da matriz celular e a invasão do CCEO de maneira dependente do

mediador pró-inflamatório TNF- α (GLOGAUER, 2015). Apesar dos pacientes diagnosticados com CCEO 15 e CCEO 16 apresentarem altos valores de leucócitos totais e esses, estarem relacionados com um valor aumentado de neutrófilos o paciente 20, apresentou um valor aumentado de neutrófilos tendo mantido os valores de leucócitos totais dentro dos limites de referência. Esses dados nos sugerem que esses pacientes possuem uma resposta inflamatória que pode ser prejudicial em relação à evolução do tumor e um indício de um prognóstico desfavorável para esses pacientes.

Observamos ainda um aumento no número médio de neutrófilos dos pacientes CCEO comparados com os LCOs, embora este dado não tenha sido estatisticamente significativo ($P=0,127$). Entretanto Phulari e colaboradores também observaram em seus experimentos um aumento da quantificação absoluta de neutrófilos em voluntários com CCEO quando comparados com voluntários saudáveis (PHULARI *et al.*, 2019). Nossos dados sugerem que a quantificação dos neutrófilos pode ser utilizada como parâmetro prognóstico para CCEO.

As plaquetas também são usadas como marcadores de inflamação e avaliadas em diversos tipos de tumores (FRANCO *et al.*, 2015). No CCEO, altos valores de plaquetas têm sido relacionados com a gravidade da doença (DIAO *et al.*, 2019; PARK *et al.*, 2017). Dos pacientes analisados, somente o paciente 22 com LCO apresentou alteração na quantificação das plaquetas. O valor reduzido de plaquetas está de acordo com a menor gravidade da doença (DIAO *et al.*, 2019).

O papel dos linfócitos nos CCEOs ainda não está claro. Os linfócitos CD4, CD8 e NK estão envolvidos com uma resposta anti-tumoral, e o linfócito Treg com uma resposta pró tumoral desativando a resposta imune (LIU *et al.*, 2016; LAKSHMI NARENDRA *et al.*, 2013). Faz-se necessário identificar os subtipos de linfócitos presentes no sangue a fim de correlacionar a sua prevalência com a gravidade da doença. Na literatura tem sido descrito que em valores absolutos, baixas quantidades de linfócitos circulantes estão relacionadas com prognóstico desfavorável em pacientes positivos para HPV com câncer orofaríngeo (HUANG *et al.*, 2015). Dados semelhantes foram observados em pacientes com CCEO (DIAO *et al.*, 2019). Observamos que os pacientes CCEO 16 e 20 apresentam valores abaixo dos de referência sugerindo uma gravidade da doença.

O papel da razão neutrófilo/linfócito tem sido bastante discutido (AN *et al.*, 2011, AZAB *et al.*, 2012, TEMPLETON *et al.*, 2014, BOBDEY *et al.*, 2017, ZHANG *et al.*, 2019, MATTAVELLI *et al.*, 2019). O valor aumentado de RNL encontrado no paciente com CCEO 20 pode ser atribuído aos altos níveis de neutrófilos e valores de linfócitos abaixo dos valores de referência (**Figura 32A e Figura 26**). Os altos valores de RNL dos pacientes com CCEO 15 e 16 podem ser justificados devido à alta quantificação de neutrófilos. Apesar dos pacientes com CCEO 14, 21 e 25 terem mantido níveis de leucócitos totais, linfócitos e neutrófilos dentro dos valores de referência, esses apresentaram uma razão RNL aumentada. Nestes pacientes os neutrófilos representaram, respectivamente, 75.9%, 73.85% e 72.78% da composição do sangue periférico, o que condiz com uma resposta inflamatória. Corroborando com pesquisas anteriores, nossos dados também demonstraram aumento da RNL nos pacientes: CCEO 14, CCEO 15, CCEO 16, CCEO 21 e CCEO 25 que são os mesmos que possuem uma avaliação histopatológica mais comprometida (moderada à bem diferenciada), sendo associada a menores taxas de sobrevida (TEMPLETON *et al.*, 2014; BOBDEY *et al.*, 2017; ZHANG *et al.*, 2019). O que nos leva à hipótese da utilização da RNL como ferramenta complementar na avaliação prognóstica desses pacientes. No grupo de pacientes LCOs analisados, somente o paciente 11 apresentou valores de RNL elevado. Esses dados em conjunto com as análises dos valores de RBC sugerem um prognóstico desfavorável para o paciente 11. Avaliamos ainda a média dos valores de RNL dos pacientes com CCEO e LCOs. Apesar dos nossos dados não terem sido significantes estatisticamente, observamos um aumento na média (4,77) do RNL nos pacientes com CCEO em relação aos LCOs (2,10) concordando com dados da literatura que mostram o aumento desse parâmetro nos pacientes com câncer (PHULARI *et al.*, 2019; AZAB *et al.*, 2012; NAKASHIMA, 2016).

Em um ensaio elegante, Shaban *et al.*, estabeleceram uma quantificação automatizada de linfócitos infiltrados no tumor como ensaio prognóstico (SHABAN *et al.*, 2019), considerando os relatos sobre a presença dessas células como sendo favorável para o paciente (ANGELL, 2013; DIAO, 2019). Esse estudo, não levou em consideração a presença dos linfócitos Tregs. O papel dos Tregs no CCEO é controverso. A presença dessa subpopulação de linfócitos tem sido relacionada com um prognóstico desfavorável para o paciente com tumor de cabeça e pescoço (LIANG *et al.*, 2011; SUN *et al.*, 2012). Contudo, há relatos demonstrando a presença dessas

células com um prognóstico favorável para o paciente (SUN *et al.*, 2006; BRON *et al.*, 2013). Considerando que a inflamação exacerbada como discutida anteriormente é um fator promotor da tumorigênese, (SHANG *et al.*, 2015), e que valores aumentados de células inflamatórias foram observados em grande parte dos pacientes CCEO avaliados neste estudo, a presença dos Tregs nesse contexto provavelmente poderia ser benéfica para os pacientes pela sua ação de controle do processo inflamatório.

Dessa forma, iniciamos a investigação da presença dos Tregs nas biópsias dos pacientes a fim de esclarecer o papel dessas células nos pacientes CCEO e LCOs bem como a sua correlação com os parâmetros anteriormente analisados. Analisamos a presença de Foxp3, marcador amplamente utilizado na identificação de linfócitos regulatórios caracterizados por desativar a resposta imune. Nossos dados mostraram a presença dessas células na biópsia de paciente com CCEO sugerindo uma participação dos Tregs no câncer oral. Esses dados são promissores, contudo, ainda é necessário investigar e quantificar o percentual dessas células nas amostras dos pacientes incluídos no estudo.

A necessidade de ferro tem sido descrita necessária para crescimento de algumas células tumorais (HANN *et al.*, 1990; WANG *et al.*, 2014). E essa característica tem sido relacionada com alteração da série vermelha celular apresentada por alguns pacientes. Já foi descrito na literatura o aumento do CHCM e HCM relacionado com o aumento do tamanho do tumor (BHATTATHIRI *et al.*, 2001). Nos pacientes analisados, foram demonstrados valores superiores aos valores de referência para o HCM nos pacientes com CCEO 13, 14, 21 e 24 e no paciente 22 com LCO. Observamos ainda um aumento do CHCM no paciente 24 com CCEO e no paciente 22 com LCOs. No nosso estudo, o paciente 19 com LCOs obteve menor valor de CHCM bem como os pacientes 15, 16, 20 e 25 com CCEO, sugerindo um melhor prognóstico para esses pacientes. Quando avaliamos os pacientes com LCOs, observamos valores reduzidos de hemoglobina e eritrócitos (RBC) no paciente 11. Dados da literatura sugerem que os baixos níveis de Hb, RBC podem estar relacionados com a hemólise ocasionada pelo tumor estando envolvida com a sua agressividade (BHATTATHIRI *et al.*, 2001). De fato, esse paciente foi diagnosticado com uma lesão maligna linfoproliferativa. Esses dados concordam com nossas

análises da média dos valores dos eritrócitos. Nossos dados mostram uma pequena diminuição nesses valores no grupo CCEO quando comparados com o LCO.

RDW (do inglês, *Red cell distribution width*) ou amplitude de distribuição de células vermelhas, avalia a variação do tamanho das hemácias sendo um parâmetro de identificação diferencial de anemia (FAILACE, 2003; MATOS *et al.*, 2008). Altos níveis de RDW tem sido relacionado com inflamação crônica e mal nutrição. Considerando o papel da inflamação crônica no desenvolvimento dos tumores (MANTOVANI, 2008), analisamos os valores de RDW encontrados nos pacientes CCEO e LCOs. O paciente 25 com CCEO apresentou uma quantificação elevada do RDW-CV em relação ao valor de referência. No grupo LCOs, o paciente 9 apresentou valores menores. Vários estudos têm relacionado altos valores de RDW com um prognóstico favorável para o paciente de câncer de mama e câncer de pulmão (WANG, 2015; KOMA *et al.*, 2013). Contudo, um estudo recente com pacientes diagnosticados com câncer oral não observou uma relação entre os níveis de RDW e a sobrevivência dos pacientes ou na recorrência do tumor (TANGTHONGKUM *et al.*, 2017).

O volume corpuscular médio, (VCM), tem sido apresentado como um possível biomarcador de CCEO (SUDESHNA INGALE, 2016). Concordando com nossos dados, onde somente os pacientes do grupo CCEO (13, 21 e 24) apresentaram valores aumentados para esse parâmetro. Esse dado é interessante considerando a relação do aumento do VCM com a ingestão de álcool (WICKRAMASINGHE, 1994) sendo o álcool um fator de risco para o câncer oral (KORTE *et al.*, 1981, DONG *et al.*, 1996, IRANI, 2016, HOWIE *et al.*, 2001, GUPTA *et al.*, 2016, CUNHA *et al.*, 2019).

Nossas análises sugerem que os valores de neutrófilo, linfócito, VCM, RDW podem ser utilizados como biomarcadores no auxílio da identificação precoce de pacientes com alterações neoplásticas orais. Identificamos a necessidade de analisar um maior número de pacientes a fim de identificar a presença ou não de diferença estatística entre os grupos CCEO e LCOs. Além da necessidade de comparar os pacientes CCEO e LCOs com voluntários saudáveis. Contudo, considerando a instituição futura da medicina personalizada, nossos dados são promissores na identificação do prognóstico do paciente individualmente.

7. CONCLUSÃO

Nessa dissertação avaliamos as células que compõem o sangue periférico dos pacientes com CCEO e LCOs, onde não foram observadas alterações qualitativas nas células analisadas. Contudo, observamos alterações quantitativas nos valores de neutrófilos, linfócitos, VCM, RDW de pacientes diagnosticados com CCEO antes do tratamento, sugerindo uma possível correlação desses parâmetros com o câncer oral.

Os pacientes com CCEO apresentaram um aumento da média da RNL quando comparada com a média dos pacientes com LCOs, apesar de não ter tido significância estatística ($p=0.2339$). Recomenda-se a investigação desta variável em um maior número amostral e a comparação com pacientes portadores de mucosa oral saudável. Um paciente do grupo LCOs, diagnosticado com lesão maligna de origem linfoproliferativa, apresentou aumento nesta RNL em comparação aos demais pacientes deste grupo, o que pode sugerir um prognóstico desfavorável.

Demonstramos ainda a presença de linfócitos T regulatórios em biópsia de paciente com CCEO sugerindo a participação dessas células na patologia. Recomenda-se, portanto, que sejam realizadas investigações adicionais para classificar o linfócito envolvido neste tipo de malignidade para colaborar na melhor compreensão da fisiopatologia deste tumor.

Embora o nosso número de amostras tenha sido reduzido, nossos dados podem contribuir como base para pesquisas mais amplas objetivando identificar uma assinatura baseada na avaliação do sangue periférico assim como dos linfócitos Tregs que possam contribuir no diagnóstico, prognóstico e na avaliação da sobrevida em pacientes com câncer oral.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Ai WZ, Hou JZ, Zeiser R, Czerwinski D, Negrin RS and Levy R. Follicular lymphoma B cells induce the conversion of conventional CD4+ T cells to T-regulatory cells. *Int J Cancer* 2009; 124: 239-244
2. Akrish, Sharon, Lana Eskander-Hashoul, Adi Rachmiel, and Ofer Ben-Izhak. 2019. "Clinicopathologic Analysis of Verrucous Hyperplasia, Verrucous Carcinoma and Squamous Cell Carcinoma as Part of the Clinicopathologic Spectrum of Oral Proliferative Verrucous Leukoplakia: A Literature Review and Analysis." *Pathology Research and Practice* 215(12):152670. Retrieved (<https://doi.org/10.1016/j.prp.2019.152670>)
3. Almeida, Vinicius L. et al. 2019. "Influência de Interleucinas No Prognóstico de Pacientes Portadores de Carcinoma de Células Escamosas Intraoral." *J Bras Pato Med Lab* 55(5):559–67
4. Alnemri ES, Livingston DJ, Nicholson DW, et al. Human ICE/CED-3 protease nomenclature. *Cell*. 1996; 87(2):171
5. AMAR, Ali et al . Tratamento cirúrgico do carcinoma epidermóide de língua e soalho de boca localmente avançado: efeito da radioterapia pós-operatória. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.**, São Paulo , v. 69, n. 4, p. 480-483, ago. 2003 . Disponível em <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0034-72992003000400007&lng=pt&nrm=iso>. acessos em 01 set. 2020. <https://doi.org/10.1590/S0034-72992003000400007>.
6. AMORIM FILHO, Francisco S. et al. Paradigma da disseminação linfática no carcinoma espinocelular da base da língua. *Rev. Col. Bras. Cir.*, Rio de Janeiro, v. 33, n. 2, p. 79-83, abr. 2006
7. An X, Ding P-R, Wang F-H, Jiang W-Q, Li Y-H. Elevated neutrophil to lymphocyte ratio predicts poor prognosis in nasopharyngeal carcinoma. *Tumor Biol* [Internet]. 2011 Apr 30 [cited 2018 Feb 17];32(2):317–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21052888>
8. Andersson BÅ, Lewin F, Lundgren J, et al. Plasma tumor necrosis factor-α and C-reactive protein as biomarker for survival in head and neck squamous cell carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2014;140(3):515-519. doi:10.1007/s00432-014-1592-8
9. Angell, H. & Galon, J. From the immune contexture to the Immunoscore: the role of prognostic and predictive immune markers in cancer. *Curr. opinion immunology* 25, 261–267 (2013)
10. Antoni, Kelem De, Myrian Camara, and Caren Serra. 2019. "Revista Odonto Ciência Cell Carcinoma at the Time of Diagnosis : A Cross-Sectional." 33(1):2–5.
11. Antunes, Daniella Moraes. 2015. "Efeito dos tratamentos com ácido acetilsalicílico e celecoxibe na expressão de citocinas e no comportamento de linhagens celulares de carcinoma epidermoide de boca"
12. Arantes, Diego Antonio Costa. 2015. "AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO SALIVAR E TECIDUAL DAS CITOCINAS TGF-β E IL-10 EM PACIENTES COM CARCINOMA ESPINOCELULAR DE CAVIDADE ORAL"

13. Asseman C, Mauze S, Leach MW, Coffman RL, Powrie F. An essential role for interleukin 10 in the function of regulatory T cells that inhibit intestinal inflammation. *J Exp Med* [Internet]. 1999 Oct 4;190(7):995–1004. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10510089>
14. Astradsson T, Sellberg F, Berglund D, Ehrsson YT, Laurell GFE. Systemic Inflammatory Reaction in Patients With Head and Neck Cancer-An Explorative Study. *Front Oncol*. 2019;9:1177. doi: 10.3389/fonc.2019.01177. eCollection 2019. PubMed PMID: 31750257; PubMed Central PMCID: PMC6848384
15. Azab B, Bhatt VR, Phookan J, Murukutla S, Kohn N, Terjanian T, et al. Usefulness of the Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio in Predicting Short- and Long-Term Mortality in Breast Cancer Patients. *Ann Surg Oncol* [Internet]. 2012 Jan 3;19(1):217–24. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21638095>
16. Badoual, C.; Hans, S.; Rodriguez, J.; Peyrard, S.; Klein, C.; Agueznay Nel, H.; Mosseri, V.; Laccourreye, O.; Bruneval, P.; Fridman, W.H.; et al. Prognostic value of tumor-infiltrating CD4+ T-cell subpopulations in head and neck cancers. *Clin. Cancer Res*. 2006, 12, 465–472
17. Balkwill, F. Cancer and the chemokine network. *Nat Rev Cancer* 4, 540–550 (2004). <https://doi.org/10.1038/nrc1388>.
18. BARBOSA, Túlio V.; ROSAS, Marilene P.; COSTA, Anderson C. and RAPOPORT, Abrão. Valor prognóstico do Ki-67 no carcinoma indiferenciado de grandes células de glândula salivar maior: estudo de 11 casos. *Rev. Bras. Otorrinolaringol.* [online]. 2003, vol.69, n.5, pp.629-634. ISSN 0034-7299. <http://dx.doi.org/10.1590/S0034-72992003000500007>
19. Batsakis JG, Kraemer B, Sciubba JJ. The pathology of head and neck tumors: the myoepithelial cell and its participation in salivary gland neoplasia, Part 17. *Head Neck Surg*. 1983;5(3):222-233. doi:10.1002/hed.2890050307
20. Bekes EM, Schweighofer B, Kupriyanova TA, Zajac E, Ardi VC, Quigley JP, et al. Tumor-recruited neutrophils and neutrophil TIMP-free MMP-9 regulate coordinately the levels of tumor angiogenesis and efficiency of malignant cell intravasation. *Am J Pathol* (2011) 179(3):1455–70. doi:10.1016/j.ajpath.2011.05.031
21. Berg, Jenna et al. 2018. “Primary Intestinal-Type Adenocarcinoma of the Oral Tongue: Case Report and Review of Histologic Origin and Oncologic Management.” *Head and Neck* 40(7):E68–72
22. Bhattathiri VN. Relation of erythrocyte and iron indices to oral cancer growth. *Radiother Oncol*. 2001 May;59(2):221-6. doi: 10.1016/s0167-8140(01)00326-7. PMID: 11325453.
23. Bluestone, J. A., A. K. Abbas. 2003. Natural versus adaptive regulatory T cells. *Nat. Rev. Immunol.* 3: 253-257
24. Bobdey S, Ganesh B, Mishra P, Jain A. Role of Monocyte Count and Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio in Survival of Oral Cancer Patients. *Int Arch Otorhinolaryngol* [Internet]. 2017 Jan;21(1):21–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28050203>
25. Brennan P, Lewis S, Hashibe M, Bell DA, Boffetta P, Bouchardy C, et al. Pooled analysis of alcohol dehydrogenase genotypes and head and neck cancer: a

- HuGE review. *Am J Epidemiol* [Internet]. 2004 Jan 1;159(1):1–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14693654>
26. Brennan P, Lewis S, Hashibe M, Bell DA, Boffetta P, Bouchardy C, et al. Pooled analysis of alcohol dehydrogenase genotypes and head and neck cancer: a HuGE review. *Am J Epidemiol* [Internet]. 2004 Jan 1;159(1):1–16. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14693654>
 27. Brito, Livia et al. 2016. “Adenocarcinoma Polimorfo De Baixo Grau De Grandes Proporções Em Paciente Idoso: Relato De Caso Não Usual.” *Odontol.Clin.-Cient., Recife*. 15(1):63–66
 28. Bron, L.; Jandus, C.; Andrejevic-Blant, S.; Speiser, D.E.; Monnier, P.; Romero, P.; Rivals, J.P. Prognostic value of arginase-II expression and regulatory T-cell infiltration in head and neck squamous cell carcinoma. *Int. J.Cancer* 2013, 132, E85–E93
 29. Bruckner HW, Lavin PT, Plaxe SC, Storch JA, Livstone EM. Absolute granulocyte, lymphocyte, and monocyte counts. Useful determinants of prognosis for patients with metastatic cancer of the stomach. *JAMA* [Internet]. 1982 Feb 19;247(7):1004–6. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7035703>
 30. Brunkow ME, Jeffery EW, Hjerrild KA, Paepers B, Clark LB, et al. 2001. Disruption of a new forkhead/winged-helix protein, scurfy, results in the fatal lymphoproliferative disorder of the scurfy mouse. *Nat. Genet.* 27:68–73
 31. Budihardjo I, Oliver H, Lutter M, et al. Biochemical pathways of caspases activation during apoptosis. *Annu Ver Cell Dev Biol.* 1999;15:269-90
 32. Cancer-related inflammation and treatment effectiveness. Diakos CI, Charles KA, McMillan DC, Clarke SJ *Lancet Oncol.* 2014 Oct; 15(11):e493-503
 33. CANTO, Alan Motta do et al . Oral lichen planus (OLP): clinical and complementary diagnosis. **An. Bras. Dermatol.**, Rio de Janeiro , v. 85, n. 5, p. 669-675, out. 2010
 34. Capote-Moreno A, Brabyn P, Muñoz-Guerra MF, et al. Oral squamous cell carcinoma: epidemiological study and risk factor assessment based on a 39-year series [published online ahead of print, 2020 Apr 29]. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2020;S0901-5027(20)30100-4. doi:10.1016/j.ijom.2020.03.009
 35. Castaño Z, Fillmore CM, Kim CF, McAllister SS. The bed and the bugs: interactions between the tumor microenvironment and cancer stem cells. *Seminars in Cancer Biology.* 2012 Oct;22(5-6):462-470. DOI: 10.1016/j.semcancer.2012.04.006.
 36. CELULAR MOLECULAR Abbas, A.; Lichtmann, A.; Pillai, S. Editora Elsevier 8ª edição/2015
 37. Chedid, Helma Maria et al. 2009. “The Follow up for the Locoregional Recurrences of Oral and Oropharyngeal Cancer.” *International Archives of Otorhinolaryngology* 13(1):69–77.
 38. Chen F, Lin L, Yan L, Qiu Y, Cai L, He B. Preoperative neutrophil-to-lymphocyte ratio predicts the prognosis of oral squamous cell carcinoma: a large-sample prospective study. *J Oral Maxillofac Surg.* (2017) 75:1275–82. 10.1016/j.joms.2016.11.022. [[PubMed](#)] [[CrossRef](#)] [[Google Scholar](#)]

39. Chen W, Jin W, Hardegen N, Lei K-JJ, Li L, Marinos N, et al. Conversion of peripheral CD4⁺CD25⁻ naive T cells to CD4⁺CD25⁺ regulatory T cells by TGF- β induction of transcription factor Foxp3. *J Exp Med*. (2003) 198:1875–86. doi: 10.1084/jem.20030152
40. Chew V, Chen J, Lee D, Loh E, Lee J, Lim KH, et al. Chemokine-driven lymphocyte infiltration: an early intratumoural event determining long-term survival in resectable hepatocellular carcinoma. *Gut* [Internet]. 2012 Mar ;61(3):427–38. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21930732>
41. Cools, Nathalie, Peter Ponsaerts, Viggo F. I. Van Tendeloo, and Zwi N. Berneman. 2007. "Regulatory T Cells and Human Disease." *Clinical and Developmental Immunology* 2007.
42. Cruvinel, Wilson de Melo et al. 2008. "Células T Regulatórias Naturais (TREGS) Em Doenças Reumáticas." *Revista Brasileira de Reumatologia* 48(6):342–55
43. Cunha, Amanda Ramos da, Taiane Schaedler Prass, and Fernando Neves Hugo. 2019. "Mortality from Oral and Oropharyngeal Cancer in Brazil: Impact of the National Oral Health Policy." *Cadernos de Saúde Pública* 35(12). Retrieved December 10, 2019 (http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-311X2019001405007&tlng=en)
44. Curado, Maria Paula et al. 2016. "Oral and Oropharynx Cancer in South America." *Translational Research in Oral Oncology* 1:2057178X1665376
45. Curiel, T.J.; Coukos, G.; Zou, L.; Alvarez, X.; Cheng, P.; Mottram, P.; Evdemon-Hogan, M.; Conejo-Garcia, J.R.; Zhang, L.; Burow, M.; et al. Specific recruitment of regulatory T cells in ovarian carcinoma fosters immune privilege and predicts reduced survival. *Nat. Med.* 2004, 10, 942–949
46. Datta M, Laronde D, Palcic B, Guillaud M. The role of DNA image cytometry in screening oral potentially malignant lesions using brushings: A systematic review. *Oral Oncol.* 2019 Sep;96:51-59. doi: 10.1016/j.oraloncology.2019.07.006. Epub 2019 Jul 10. Review. PubMed PMID: 31422213
47. de Freitas, R. M., A. M. X. Rodrigues, A. F. de Matos Júnior, and G. A. L. de Oliveira. 2016. "Fatores de Risco e Principais Alterações Citopatológicas Do câNcer Bucal: Uma Revisão de Literatura." *Rbac* 48(1):13–18. Retrieved (http://sbac.org.br/rbac/wp-content/uploads/2016/05/ARTIGO-2_RBAC-48-1-2016-ref.-120-corr.pdf)
48. Diagnósticos em hematologia / organizadora Maria de Lourdes L.F. Chauffaille. – Barueri, SP: Manole, 2016
49. Diakos CI, Charles KA, McMillan DC, Clarke SJ. Cancer-related inflammation and treatment effectiveness. *Lancet Oncol.* 2014 Oct;15(11):e493-503. doi: 10.1016/S1470-2045(14)70263-3. PMID: 25281468.
50. Diao, Pengfei et al. 2019. "Preoperative Circulating Platelet, Neutrophil, and Lymphocyte Counts Predict Survival in Oral Cancer." *Oral Diseases* 25(4):1057–66
51. Do Canto, A. M., H. Müller, R. R. De Freitas, and P. S. Da Silva Santos. 2010. "Oral Lichen Planus (OLP): Clinical and Complementary Diagnosis | Líquen Plano Oral (LPO): Diagnóstico Clínico e Complementar." *Anais Brasileiros de Dermatologia* 85(5):669–75

52. Domínguez-Vigil IG, Moreno-Martínez AK, Wang JY, Roehrl MHA, Barrera-Saldaña HA. The dawn of the liquid biopsy in the fight against cancer. *Oncotarget*. 2018 Jan 5;9(2):2912-2922. doi: 10.18632/oncotarget.23131. e Collection 2018 Jan 5. Review. PubMed PMID: 29416824; PubMed Central PMCID: PMC5788692
53. Dong YJ, Peng TK, Yin SJ. Expression and activities of class IV alcohol dehydrogenase and class III aldehyde dehydrogenase in human mouth. *Alcohol* [Internet]. 13(3):257–62. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8734840>
54. Dr. Sudeshna Ingale, 2016. “MCV- An emerging biomarker in oral squamous cell carcinoma”, *International Journal of Current Research*, 39958-39961.
55. Duffy SA, Taylor JM, Terrell JE, Islam M, Li Y, Fowler KE, et al. Interleukin-6 predicts recurrence and survival among head and neck cancer patients. *Cancer*. 2008;113(4):750
56. El-Naggar A.K., Chan J.K.C., Grandis J.R., Takata T., Slootweg P.J. (Eds): *WHO Classification of Head and Neck Tumours* (4th edition). IARC: Lyon 2017
57. Elevated neutrophil-to-lymphocyte ratio in squamous cell carcinoma of larynx compared to benign and precancerous laryngeal lesions. Kum RO, Ozcan M, Baklaci D, Kum NY, Yilmaz YF, Gungor V, Unal A *Asian Pac J Cancer Prev*. 2014; 15(17):7351-5
58. Epstein JB, Gorsky M, Cabay JR, Day T, Golsalves W. Screening for and diagnosis of oral premalignant lesions and oropharyngeal squamous cell carcinoma. role of primary care physicians. *Can Fam Physician*. 2008;54(6): 870-5. Review.
59. Evans HL, Batsakis JG. Polymorphous low-grade adenocarcinoma of minor salivary glands. A study of 14 cases of a distinctive neoplasm. *Cancer*. 1984;53(4):935-942. doi:10.1002/1097-0142(19840215)53:4<935::aid-cncr2820530420>3.0.co;2-v
60. Facciabene A, Peng X, Hagemann IS, Balint K, Barchetti A, Wang LP, Gimotty PA, Gilks CB, Lal P, Zhang L and Coukos G. Tumour hypoxia promotes tolerance and angiogenesis via CCL28 and T(reg) cells. *Nature* 2011; 475: 226-230
61. Failace, Renato. *Hemograma: manual de interpretação/ Renato Failace- 4.ed. – Porto Alegre: Artmed, 2003*
62. Famili F, Wiekmeijer A-S, Staal F. The development of T cells from stem cells in mice and humans. *Future Sci*. (2017) 3:FSO186. doi: 10.4155/fsoa-2016-0095
63. Fernandes, Karin Sá et al. 2013. “Adenocarcinoma Polimorfo de Baixo Grau : Relato de Caso Clínico.” *Sci Invest Dent* 16(1):5–9
64. Ferreira da Silva, Herivaldo et al. n.d. *Autores*. Retrieved July 22, 2019 (<https://53748h.ha.azioncdn.net/images/p/101-hemogramas-capitulo-modelo.pdf>)
65. Festjens N, Cornelis S, Lamkanfi M, et al. Caspase-containing complexes in the regulation of cell death and inflammation. *Biol Chem*. 2006;387 (8): 1005-16
66. Fontenot JD, Rasmussen JP, Gavin MA, Rudensky AY. 2005. A function for interleukin 2 in Foxp3-expressing regulatory T cells. *Nat. Immunol*. 6:1142–51

67. Fontenot JD, Rasmussen JP, Williams LM, Dooley JL, Farr AG, Rudensky AY. Regulatory T cell lineage specification by the forkhead transcription factor foxp3 2005
68. Fraga, Humberto Fernandes et al. 2011. "A Importância Do Diagnóstico Do Líquen Plano Bucal The Importance of Diagnostic of Oral Lichen Planus." *J Health Sci Inst* 29(1):27–30
69. Franco AT, Corken A, Ware J. Platelets at the interface of thrombosis, inflammation, and cancer. *Blood*. 2015;126(5):582-588. doi:10.1182/blood-2014-08-531582
70. Frankel, A. H. and A. M. Warren. 1986. "Verrucous Squamous Cell Carcinoma." *Journal of Foot Surgery* 25(4):307–10
71. Freedman PD, Lumerman H. Lobular carcinoma of intraoral minor salivary gland origin. Report of twelve cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1983;56(2):157-166. doi:10.1016/0030-4220(83)90282-7
72. Furukawa K, Kawasaki G, Naruse T, Umeda M. Prognostic Significance of Pretreatment Lymphocyte-to-Monocyte Ratio in Patients with Tongue Cancer. *Anticancer Res*. 2019 Jan;39(1):405-412. doi: 10.21873/anticancer.13126. PubMed PMID: 30591487
73. GALBIATTI, Ana Livia Silva et al . Câncer de cabeça e pescoço: causas, prevenção e tratamento. *Braz. j. otorhinolaryngol.*, São Paulo , v. 79, n. 2, p. 239-247, Apr. 2013 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1808-86942013000200018&lng=en&nrm=iso>. <http://dx.doi.org/10.5935/1808-8694.20130041>
74. Gambineri E, Torgerson TR, Ochs HD. 2003. Immune dysregulation, polyendocrinopathy, enteropathy, and X-linked inheritance (IPEX), a syndrome of systemic autoimmunity caused by mutations of FOXP3, a critical regulator of T-cell homeostasis. *Curr. Opin. Rheumatol*. 15:430–35
75. Gavin MA, Rasmussen JP, Fontenot JD, Vasta V, Manganiello VC, Beavo JA, Rudensky AY. Foxp3-dependent programme of regulatory T-cell differentiation. *Nature*. 2007;445:771–5
76. Germano, Adriano Rocha. 2017. "Relato de Caso Desafio Clinicopatológico No Diagnóstico Da Leucoplasia Verrucosa Proliferativa - Relato de Caso." 68–71.
77. Gershon RK, Cohen P, Hencin R, Liehaber AS. Suppressor T cells. *J immunol* 1972; 108: 586-90.
78. Girardi FM, Fuga GR, Callai T, Bianchi MF. HISTOPATHOLOGICAL DIFFERENCES BETWEEN GENDERS IN PATIENTS WITH ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA. *Clin Biomed Res [Internet]*. 2017 [cited 2018 Feb 17];37(3):147–50. Available from: <http://doi.editoracubo.com.br/10.4322/2357-9730.72986>
79. GLOBOCAN: Estimated Cancer Incidence, Mortality and Prevalence Worldwide in 2012. International Agency for Research on Cancer -2012. Disponível em<<http://globocan.iarc.fr/Pages/Map.aspx#>>
80. Glogauer JE, Sun CX, Bradley G, Magalhaes MA. Neutrophils Increase Oral Squamous Cell Carcinoma Invasion through an Invadopodia-Dependent

- Pathway. *Cancer Immunol Res.* 2015; 3:1218–26. <https://doi.org/10.1158/2326-6066.CIR-15-0017>
81. Goertzen C, Mahdi H, Laliberte C, Meirson T, Eymael D, Gil-Henn H, Magalhaes M. Oral inflammation promotes oral squamous cell carcinoma invasion. *Oncotarget.* 2018 Jun 26;9(49):29047-29063. doi: 10.18632/oncotarget.25540. PMID: 30018735; PMCID: PMC6044370.
 82. Gombos K, Horváth R, Szele E, Juhász K, Gocze K, Somlai K, Pajkos G, Ember I, Olasz L. miRNA expression profiles of oral squamous cell carcinomas. *Anticancer Res.* 2013 Apr;33(4):1511-7. PubMed PMID: 23564792
 83. Goyne HE, Stone PJB, Burnett AF, Cannon MJ. Ovarian Tumor Ascites CD14+ Cells Suppress Dendritic Cell-activated CD4+ T-cell Responses Through IL-10 Secretion and Indoleamine 2,3-Dioxygenase. *J Immunother [Internet].* 2014 Apr [cited 2018 Feb 17];37(3):163–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24598451>
 84. Gray, Jenny, Adnan Al Maghlouth, Hussain Al Hussain, and Mohammed Al Sheef. 2019. "Impact of Oral and Oropharyngeal Cancer Diagnosis on Smoking Cessation Patients and Cohabiting Smokers." *Tobacco Induced Diseases* 17(October). (<http://www.journalssystem.com/tid/Impact-of-oral-and-oropharyngeal-cancer-diagnosis-on-smoking-cessation-following,109413,0,2.html>)
 85. Gregori S, Roncarolo MG. Engineered T regulatory Type 1 cells for clinical application. *Front Immunol.* (2018) 9:233. doi: 10.3389/fimmu.2018.00233
 86. Gupta N, Gupta R, Acharya AK, Patthi B, Goud V, Reddy S, et al. Changing Trends in oral cancer - a global scenario. *Nepal J Epidemiol [Internet].* 2016 Dec [cited 2018 Feb 17];6(4):613–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/28804673>
 87. Haas, M.; Dimmler, A.; Hohenberger, W.; Grabenbauer, G.G.; Niedobitek, G.; Distel, L.V. Stromal regulatory T-cells are associated with a favourable prognosis in gastric cancer of the cardia. *BMC Gastroenterol.* 2009
 88. Halvorsen EC, Hamilton MJ, Young A, Wadsworth BJ, LePard NE, Lee HN, Firmino N, Collier JL and Bennewith KL. Maraviroc decreases CCL8-mediated migration of CCR5(+) regulatory T cells and reduces metastatic tumor growth in the lungs. *Oncoimmunology* 2016;5: e1150398
 89. Han Y, Wu J, Bi L, Xiong S, Gao S, Yin L, Jiang L, Chen C, Yu K and Zhang S. Malignant B cells induce the conversion of CD4+CD25- T cells to regulatory T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *PLoS One* 2011; 6: e28649
 90. Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell* 2000;100:57–70.
 91. Hann HW, Stahlhut MW, Hann CL. Effect of iron and desferoxamine on cell growth and in vitro ferritin synthesis in human hepatoma cell lines. *Hepatology* 1990
 92. Hefler L, Tempfer C, Heinze G, Mayerhofer K, Breitenacker G, Leodolter S, et al. Monocyte chemoattractant protein-1 serum levels in ovarian cancer patients. *Br J Cancer [Internet].* 1999 Nov 15;81(5):855–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/10555758>
 93. Henry JB 1928-, Gubert IC. Diagnósticos clínicos e tratamento por métodos laboratoriais [Internet]. 20. ed. Barueri SP: Manole. Available

- from:<http://www.worldcat.org/title/diagnosticos-clinicos-e-tratamentopor-metodos-laboratoriais/oclc/496248185>
94. Hirota, Silvio, Suemi Marui, and Dante Migliari. 2020. "Does Autoimmune Thyroid Disorder Act as a Predisposing Factor in the Development of Oral Lichen Planus?" *Oral Diseases* 0–2
 95. Hoffbrand A V., Moss PAH, Petit JE. Fundamentos em hematologia [Internet]. Artmed; 2007. Available from: http://www.bibcentral.ufpa.br/arquivos/160000/160700/19_160763.htm
 96. Hornychová H, Melichar B, Tomšová M, Mergancová J, Urminská H, Ryška A. Tumor-Infiltrating Lymphocytes Predict Response to Neoadjuvant Chemotherapy in Patients with Breast Carcinoma. *Cancer Invest* [Internet]. 2008 Jan 11;26(10):1024–31. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/19093260>
 97. Horwitz DA, Zheng SG, Wang J, Gray JD. Critical role of IL-2 and TGFbeta in generation, function and stabilization of Foxp3+CD4+ Treg. *Eur J Immunol*. (2008) 38:912–5. doi: 10.1002/eji.200738109
 98. Howie NM, Trigkas TK, Cruchley AT, Wertz PW, Squier CA, Williams DM. Short-term exposure to alcohol increases the permeability of human oral mucosa. *Oral Dis* [Internet]. 2001 Nov;7(6):349–54. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11834098>
 99. <http://www.inca.gov.br/estimativa/2018/introducao.asp>
 100. Huang, Shao Hui et al. 2015. "Prognostic Value of Pretreatment Circulating Neutrophils, Monocytes, and Lymphocytes in Oropharyngeal Cancer Stratified by Human Papillomavirus Status." *Cancer* 121(4):545–55.
 101. Humanized anti-interleukin-6 receptor antibody suppresses tumor angiogenesis and in vivo growth of human oral squamous cell carcinoma. Shinriki S, Jono H, Ota K, Ueda M, Kudo M, Ota T, Oike Y, Endo M, Ibusuki M, Hiraki A, Nakayama H, Yoshitake Y, Shinohara M, Ando Y *Clin Cancer Res*. 2009 Sep 1; 15(17):5426-34
 102. Hussain SP, Aguilar F, Amstad P, Cerutti P. Oxy-radical induced mutagenesis of hotspot codons 248 and 249 of the human p53 gene. *Oncogene* 1994; 9 (8) 2277-2281
 103. INCA 2018. INSTITUTO NACIONAL DO CANCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2018: Incidência no Brasil. 2018
 104. INCA 2020. INSTITUTO NACIONAL DO CANCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2020: Incidência no Brasil. 2020
 105. INCA. INSTITUTO NACIONAL DE CANCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. Estimativa 2016: incidência de câncer no Brasil
 106. Ingale, Sudeshna, Sushma Bommanavar, Bommanavar Rajendra K. Baad, Nupura Vibhute, and Uzma Belgaumi. 2020. "MCV-AN EMERGING BIOMARKER IN ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA MCV- AN EMERGING BIOMARKER IN ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA." (February).
 107. Irani S. Lesões pré-cancerígenas na região oral e maxilofacial: uma revisão de literatura com foco especial na etiopatogenia. *Iran J Pathol* . Queda de 2016; 11 (4) : 303-322 . Reveja. PubMed PMID: 28855922 ; PubMed Central PMCID: PMC5563928

108. It is likely that Hassall's corpuscles provide developing lymphocytes with signals to help them differentiate in the thymus (Marinova et al., 2009). Marinova, T.T., Spassov, L.D., Vlassov, V.I., Pashev, V.V., Markova, M.D., Ganev, V.S., Dzhupanova, R.S., Angelov, D.N., 2009. Aged human thymus Hassall's corpuscles are immunoreactive for IGF-I and IGF-I receptor. *Anat. Rec. (Hoboken)* 292 (7), 960–965
109. Jenkins, M.K., Taylor, P.S., Norton, S.D. & Urdahl, K.B. CD28 delivers a costimulatory signal involved in antigen-specific IL-2 production by human T cells. *J. Immunol.* 147, 2461–2466 (1991)
110. Jiang* X, Wu* J, Wang J, Huang R. Tobacco and oral squamous cell carcinoma: A review of carcinogenic pathways. *Tobacco Induced Diseases.* 2019;17(April):29. doi:10.18332/tid/105844
111. Johnson, Cameron and Andrew Read-Fuller. 2020. "Mandibular Metastasis from Lung Adenocarcinoma as the First Sign of Occult Malignancy." *Baylor University Medical Center Proceedings* 33(2):261–62. Retrieved (<https://doi.org/10.1080/08998280.2020.1719783>)
112. Josefowicz, S. Z., Lu, L. F. & Rudensky, A. Y. Regulatory T cells: mechanisms of differentiation and function. *Annu. Rev. Immunol.* 30, 531–564 (2012)
113. Kisielow J, Obermair FJ, Kopf M. Deciphering CD4⁺ T cell specificity using novel MHC-TCR chimeric receptors. *Nat Immunol.* 2019 May;20(5):652–662. doi: 10.1038/s41590-019-0335-z. Epub 2019 Mar 11. Erratum in: *Nat Immunol.* 2019 Apr 3; PMID: 30858620.
114. Klarquist J, Tobin K, Farhangi Oskuei P, et al. Ccl22 Diverts T Regulatory Cells and Controls the Growth of Melanoma. *Cancer Res.* 2016;76(21):6230–6240. doi:10.1158/0008-5472.CAN-16-0618
115. Koh YW, Kang HJ, Park C, Yoon DH, Kim S, Suh C, et al. The Ratio of the Absolute Lymphocyte Count to the Absolute Monocyte Count Is Associated with Prognosis in Hodgkin's Lymphoma: Correlation with Tumor-Associated Macrophages. *Oncologist [Internet].* 2012 Jun 1 ;17(6):871– 80. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22588324>
116. Koma Y, Onishi A, Matsuoka H, Oda N, Yokota N, Matsumoto Y et al (2013) Increased red blood cell distribution width associates with cancer stage and prognosis in patients with lung cancer. *PLoS One* 8(11):e80240. doi:10.1371/journal.pone.0080240
117. Korte A, Obe G, Ingwersen I, Rückert G. Influence of chronic ethanol uptake and acute acetaldehyde treatment on the chromosomes of bone-marrow cells and peripheral lymphocytes of Chinese hamsters. *Mutat Res [Internet].* 1981 Apr;88(4):389–95. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/7195980>
118. Kreppel M, Eich HT, Kübler A, Zöller JE, Scheer M. Prognostic value of the sixth edition of the UICC's TNM classification and stage grouping for oral cancer. *J Surg Oncol.* 2010 Oct 1;102(5):443–9. doi: 10.1002/jso.21547. PubMed PMID: 20872947
119. Kulbe H, Thompson R, Wilson JL, Robinson S, Hagemann T, Fatah R, et al. The inflammatory cytokine tumor necrosis factor- α generates an

- autocrine tumor-promoting network in epithelial ovarian cancer cells. *Cancer Res.* 2007;67(2):585-92
120. Kupferman ME, Myers JN. Molecular biology of oral cavity squamous cell carcinoma. *Otolaryngol Clin North Am.* 2006 Apr;39(2):229-47. doi: 10.1016/j.otc.2005.11.003. Review. PubMed PMID: 16580909
 121. Lakshmi Narendra, B., K. Eshvendar Reddy, S. Shantikumar, S. Ramakrishna. 2013. Immune system: a double-edged sword in cancer. *Inflamm. Res.* 62: 823–83
 122. Laurence A, Tato CM, Davidson TS, Kanno Y, Chen Z, Yao Z, et al. Interleukin-2 signaling via STAT5 constrains T helper 17 cell generation. *Immunity* (2007) 26:371–81. doi: 10.1016/j.immuni.2007.02.009
 123. Lederberg J (1959) Genes and antibodies. *Science* 129:1649–1653
 124. LEMOS JUNIOR, Celso Augusto; ALVES, Fábio de Abreu; PEREIRA, Cassius Carvalho Torres e BIAZEVIC, Maria Gabriela Haye. Câncer de boca baseado em evidências científicas. *Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.* [online]. 2013, vol.67, n.3, pp. 178-186. ISSN 0004-5276
 125. LEMOS JUNIOR, Celso Augusto; ALVES, Fábio de Abreu; PEREIRA, Cassius Carvalho Torres e BIAZEVIC, Maria Gabriela Haye. **Câncer de boca baseado em evidências científicas.** *Rev. Assoc. Paul. Cir. Dent.* [online]. 2013, vol.67, n.3, pp. 178-186. ISSN 0004-5276.
 126. Li X, Liu K, Zhou W, Jiang Z. MiR-155 targeting FoxO3a regulates oral cancer cell proliferation, apoptosis, and DDP resistance through targeting FoxO3a. *Cancer Biomark.* 2020;27(1):105-111. doi: 10.3233/CBM-190555. PubMed PMID: 31771044
 127. Liang, Y.J.; Liu, H.C.; Su, Y.X.; Zhang, T.H.; Chu, M.; Liang, L.Z.; Liao, G.Q. Foxp3 expressed by tongue squamous cell carcinoma cells correlates with clinicopathologic features and overall survival in tongue squamous cell carcinoma patients. *Oral Oncol.* 2011, 47, 566–570
 128. Lino JLM. Diagnóstico precoce em cancro oral. 2016 Oct 14; Available from: <https://bdigital.ufp.pt/handle/10284/5782>
 129. Liu, S., D. Liu, J. Li, D. Zhang, Q. Chen. 2016. Regulatory T cells in oral squamous cell carcinoma. *J. Oral Pathol. Med.* 45: 635–639
 130. Liyanage UK, Moore TT, Joo H-G, Tanaka Y, Herrmann V, Doherty G, et al. Prevalence of regulatory T cells is increased in peripheral blood and tumor microenvironment of patients with pancreas or breast adenocarcinoma. *J Immunol* [Internet]. 2002 Sep 1 ;169(5):2756–61. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12193750>
 131. Lopes CB, Magalhães LL, Teófilo CR, Alves APNN, Montenegro RC, Negrini M, Ribeiro-Dos-Santos Â. Differential expression of hsa-miR-221, hsa-miR-21, hsa-miR-135b, and hsa-miR-29c suggests a field effect in oral cancer. *BMC Cancer.* 2018 Jul 6;18(1):721. doi: 10.1186/s12885-018-4631-z. PubMed PMID: 29976158; PubMed Central PMCID: PMC6034275
 132. Lucena, Eudes, Alessandra Miranda, Fábio Araújo, Carlos Galvão, and Ana Medeiros. 2011. “Collection Method and the Quality of the Smears from Oral Mucosa.” *Revista de Cirurgia e Traumatologia Buco-Maxilo-Facial* 11(2):55–62

133. Ma L, Fisk JM, Zhang RR, Ulukus EC, Crum CP, Zheng W. Eosinophilic dysplasia of the cervix: a newly recognized variant of cervical squamous intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol.* 2004 Nov;28(11):1474-84. doi: 10.1097/01.pas.0000141407.10204.c5. PubMed PMID: 15489651
134. Mahdi, Dr. Hayder, Ms. Denise Lopez Eymael, Dr. Aiman Ali, and Dr. Marco Magalhaes. 2019. "CHARACTERIZATION OF THE INFLAMMATORY INFILTRATES IN ORAL EPITHELIAL DYSPLASIA AND ORAL SQUAMOUS CELL CARCINOMA USING A NEW MFCA METHOD." *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology* 128(1):e57. Retrieved (<https://doi.org/10.1016/j.oooo.2019.02.131>)
135. Mahdi, Hayder Ali. 2017. "Characterization of the Inflammatory Infiltrates Associated with Oral Epithelial Dysplasia and Oral Squamous Cell Carcinoma"
136. Malek, T.R. et al., 2002 e Jenkins, M.K 1991
137. Malek, T.R., Yu, A., Vincek, V., Scibelli, P. & Kong, L. CD4 regulatory T cells prevent lethal autoimmunity in IL-2Rb-deficient mice. Implications for the nonredundant function of IL-2. *Immunity* 17, 167–178 (2002)
138. Manchanda P, Sharma SC, Das SN. Differential regulation of IL-2 and IL-4 in patients with tobacco-related oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis.* 2006 Sep;12(5):455-62. doi: 10.1111/j.1601-0825.2005.01220.x. PubMed PMID: 16910915
139. Manikandan M, Deva Magendhra Rao AK, Arunkumar G, Manickavasagam M, Rajkumar KS, Rajaraman R, Munirajan AK. Oral squamous cell carcinoma: microRNA expression profiling and integrative analyses for elucidation of tumorigenesis mechanism. *Mol Cancer.* 2016 Apr 7;15:28. doi: 10.1186/s12943-016-0512-8. PubMed PMID: 27056547; PubMed Central PMCID: PMC4823852
140. Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F (2008) Cancer-related inflammation. *Nature* 454: 436-444. doi:<https://doi.org/10.1038/nature07205>
141. Marcuzzi, Elisabetta et al. "Chemokines and Chemokine Receptors: Orchestrating Tumor Metastasis." *International journal of molecular sciences* vol. 20, 196. 27 Dec. 2018, doi:10.3390/ijms20010096
142. Margetts J, Ogle LF, Chan SL, Chan AWH, Chan KCA, Jamieson D, Willoughby CE, Mann DA, Wilson CL, Manas DM, Yeo W, Reeves HL. Neutrophils: driving progression and poor prognosis in hepatocellular carcinoma? *Br J Cancer.* 2018 Jan;118(2):248-257. doi: 10.1038/bjc.2017.386. Epub 2017 Nov 9. PMID: 29123264; PMCID: PMC5785742.
143. MATOS, Januária F. et al . Índice de anisocitose eritrocitária (RDW): diferenciação das anemias microcíticas e hipocrômicas. **Rev. Bras. Hematol. Hemoter.**, São José do Rio Preto , v. 30, n. 2, p. 120-123, Apr. 2008 . Available from http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1516-84842008000200009&lng=en&nrm=iso
144. Mattavelli, Davide et al. 2019. "Prognostic Nomograms in Oral Squamous Cell Carcinoma: The Negative Impact of Low Neutrophil to Lymphocyte Ratio." *Frontiers in Oncology* 9(APR):1–13

145. MCV- an emerging biomarker in oral squamous cell carcinoma Dr. Sudeshna Ingale, Dr. Sushma Bommanavar, Dr. Rajendra K Baad, Dr. Nupura Vibhute, Dr. Uzma Belgaumi, Dr. Vidya Kadashetti and Dr. Ananya Ghan 2016
146. Meads, Mark B., Robert A. Gatenby, and William S. Dalton. 2009. "Environment-Mediated Drug Resistance: A Major Contributor to Minimal Residual Disease." *Nature Reviews Cancer* 9(9):665–74
147. Mendes De Freitas, Rivelilson, Aldenora Maria, Ximenes Rodrigues, Anselmo Ferreira De Matos Júnior, and Guilherme Antônio Lopes De Oliveira. 2016. "Risk Factors and Major Cytopathological Changes of Oral Cancer: A Review of Literature." *Rbac* 48(1):13–18. Retrieved (http://www.rbac.org.br/wp-content/uploads/2016/05/ARTIGO-2_VOL-48_1_2016-ref-120.pdf%0Ahttp://sbac.org.br/rbac/wp-content/uploads/2016/05/ARTIGO-2_RBAC-48-1-2016-ref.-120-corr.pdf)
148. Mescouto Melo, Karina and Beatriz Tavares Costa Carvalho. 2009. "Células T Regulatórias: Mecanismos de Ação e Função Nas Doenças Humanas T Regulatory Cell: Mechanism of Action and Function in Human Diseases." *Rev. Bras. de Alergia e Imunopatologia*. 3:294–301
149. Ministério da Saúde. 2004. *Classificação de Tumores Malignos*. Retrieved (<http://www1.inca.gov.br/tratamento/tnm/index.asp>)
150. Monti Hughes, Andrea, Analía Méndez, María Elina Itoiz, and Amanda E. Schwint. 2020. "Nucleolar Organizer Regions in Human Oral Verrucous Carcinoma and Adjacent Lining Epithelium." *Biotechnic and Histochemistry* 00(00):1–6. Retrieved (<https://doi.org/10.1080/10520295.2020.1735005>)
151. Moraes FR de. Ploidia de DNA, grau nuclear e alterações arquiteturais no carcinoma in situ e no carcinoma ductal invasivo da mama feminina: uma contribuição para o estudo do modelo de progressão de doença [Internet]. [São Paulo]: Biblioteca Digital de Teses e Dissertações da Universidade de São Paulo; 2005. Available from: <http://www.teses.usp.br/teses/disponiveis/10/10133/tde-21052007-143934/>
152. MORO, Juliana da Silva et al . Câncer de boca e orofaringe: epidemiologia e análise da sobrevida. **Einstein (São Paulo)**, São Paulo , v. 16, n. 2, eAO4248, 2018 . Available from <http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S1679-45082018000200205&lng=en&nrm=iso>. access on 02 Sept. 2020. Epub June 07, 2018. <https://doi.org/10.1590/s1679-45082018ao4248>.
153. Muscat JE, Richie JP, Thompson S, Wynder EL. Gender differences in smoking and risk for oral cancer. *Cancer Res* [Internet]. 1996 Nov 15 ;56(22):5192–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/8912856>
154. Nagadia R, Pandit P, Coman WB, Cooper-White J, Punyadeera C. miRNAs in head and neck cancer revisited. *Cell Oncol (Dordr)*. 2013 Feb;36(1):1-7. doi: 10.1007/s13402-012-0122-4. Epub 2013 Jan 22. Review. PubMed PMID: 23338821
155. Nakamura Y, Gindhart TD, Winterstein D, Tomita I, Seed JL, Colburn NH. Early superoxide dismutase-sensitive event promotes neoplastic transformation in mouse epidermal JB6 cells. *Carcinogenesis* 1988; 9 (2) 203-207

156. Nakashima H, Matsuoka Y, Yoshida R, Nagata M, Hirosue A, Kawahara K, Sakata J, Arita H, Hiraki A, Nakayama H BMC Cancer. 2016 Jan 26; 16():41
157. NOVELLINO, Adriana Terezinha Neves et al. Análise da imunoexpressão do PCNA e p53 em carcinoma de células escamosas oral: correlação com a gradação histológica de malignidade e características clínicas. Acta Cir. Bras., São Paulo , v. 18, n. 5, p. 458-464, Oct. 2003 . Available from http://www.scielo.br/scielo.php?script=sci_arttext&pid=S0102-86502003000500012&lng=en&nrm=iso. <http://dx.doi.org/10.1590/S0102-86502003000500012>
158. Ogonek J, Kralj Juric M, Ghimire S, Varanasi PR, Holler E, Greinix H, Weissinger E. Immune Reconstitution after Allogeneic Hematopoietic Stem Cell Transplantation. Front Immunol. 2016 Nov 17;7:507. doi: 10.3389/fimmu.2016.00507. PMID: 27909435; PMCID: PMC5112259.
159. O'Higgins, Caoimhín et al. "Deciphering the Role of Regulatory CD4 T Cells in Oral and Oropharyngeal Cancer: A Systematic Review." *Frontiers in oncology* vol. 8 442. 15 Oct. 2018, doi:10.3389/fonc.2018.00442
160. O'Sullivan B, Shap J: New TNM staging criteria for head and neck tumors. Semin Surg Oncol 2003;21:30–42
161. Padma R, Kalaivani A, Sundaresan S, Sathish P. The relationship between histological differentiation and disease recurrence of primary oral squamous cell carcinoma. J Oral Maxillofac Pathol. 2017;21(3):461. doi:10.4103/jomfp.JOMFP_241_16
162. Park JW, Kim CH, Ha YC, Kim MY, Park SM. Count of platelet and mean platelet volume score: serologic prognostic factor in patients with oral squamous cell carcinoma. J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg. 2017 Oct;43(5):305-311. doi: 10.5125/jkaoms.2017.43.5.305. Epub 2017 Oct 26. PubMed PMID: 29142864; PubMed Central PMCID: PMC5685859
163. Pereira CM, Sehnem D, da Fonseca EO, et al. miRNAs: alvos importantes para pesquisas sobre dor no câncer oral. *Biomed Res Int* . 2017; 2017: 4043516. doi: 10.1155 / 2017/4043516
164. Phulari RGS, Rathore RS, Shah AK, Agnani SS. Neutrophil: Lymphocyte ratio and oral squamous cell carcinoma: A preliminary study. J Oral Maxillofac Pathol. 2019;23(1):78-81. doi:10.4103/jomfp.JOMFP_160_17
165. Pollard JW. Tumour-educated macrophages promote tumour progression and metastasis. Nat Rev Cancer [Internet]. 2004 Jan 1;4(1):71– 8. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14708027>
166. Prati RC, Batista GEDAPA, Monard MC. Curvas ROC para avaliação de classificadores. IEEE Lat Am Trans. 2008
167. Pre-treatment neutrophil to lymphocyte ratio predicts the chemoradiotherapy outcome and survival in patients with oral squamous cell carcinoma: a retrospective study
168. Ramos, Ruth Tramontani et al. 2017. "Leucoplasia Oral: Conceitos e Repercussões Clínicas." *Revistas* 74(1):51
169. Rapado-González Ó, López-López R, López-Cedrún JL, Triana-Martínez G, Muínelo-Romay L, Suárez-Cunqueiro MM. Cell-Free microRNAs as Potential Oral Cancer Biomarkers: From Diagnosis to Therapy. Cells. 2019 Dec

- 17;8(12). doi: 10.3390/cells8121653. Review. PubMed PMID: 31861130; PubMed Central PMCID: PMC6952938
170. Rapado-González O, Martínez-Reglero C, Salgado-Barreira A, López-López R, Suárez-Cunqueiro MM, Muínelo-Romay L. miRNAs in liquid biopsy for oral squamous cell carcinoma diagnosis: Systematic review and meta-analysis. Oral Oncol. 2019 Dec;99:104465. doi: 10.1016/j.oraloncology.2019.104465. Epub 2019 Nov 20. Review. PubMed PMID: 31756680
 171. Reboiras-López, M. et al. 2012. "Comparison of Three Sampling Instruments, Cytobrush, Curette and OralCDx, for Liquid-Based Cytology of the Oral Mucosa." *Biotechnic and Histochemistry* 87(1):51–58
 172. Renato Failace - Hemograma - Manual De Interpretação, 5ª Edição (Artmed) [Internet]. Available from: <http://www.ebah.com.br/content/ABAAAg-EAAB/renato-failace-hemograma-manual-interpretacao-5-edicao-artmed>
 173. Rodrigues, André Fellype Freitas. 2015. "Sistema Imunológico no combate ao câncer: Evasão da Vigilância Imunológica." *Aging* 7(11):956–63
 174. Sabas Carlos Vieira et al. 1. ed. Teresina, PI: Fundação Quixote, 2012
 175. Salama, P.; Phillips, M.; Grieu, F.; Morris, M.; Zeps, N.; Joseph, D.; Platell, C.; Iacopetta, B. Tumor-infiltrating FOXP3+ T regulatory cells show strong prognostic significance in colorectal cancer. *J. Clin. Oncol.* 2009, 27, 186–192
 176. Salcedo M de M, Silveira GP, Zettler CG. [Immunohistochemical expression of p16 and herpes simplex virus type 2 in squamous intraepithelial lesions and cervical cancer]. Rev Bras Ginecol Obstet. 2008 Feb;30(2):61-6. doi: 10.1590/s0100-72032008000200003. PubMed PMID: 19142477
 177. Sakaguchi S, Sakaguchi N, Asano M, Itoh M, Toda M. Immunologic self-tolerance maintained by activated T cells expressing IL-2 receptor alpha-chains (CD25). Breakdown of a single mechanism of self-tolerance causes various autoimmune diseases. *J Immunol.* 1995 Aug 1;155(3):1151-64. PMID: 7636184.
 178. Sarkaria, J.N. and Harari, P.M. (1994), Oral tongue cancer in young adults less than 40 years of age: Rationale for aggressive therapy. *Head Neck*, 16: 107-111. doi:[10.1002/hed.2880160202](https://doi.org/10.1002/hed.2880160202)
 179. Salomon, B. et al. B7/CD28 costimulation is essential for the homeostasis of the CD4+CD25+ immunoregulatory T cells that control autoimmune diabetes. *Immunity* 12, 431–440 (2000)
 180. Sayour EJ, McLendon P, McLendon R, De Leon G, Reynolds R, Kresak J, Sampson JH, Mitchell DA. Increased proportion of FoxP3+ regulatory T cells in tumor infiltrating lymphocytes is associated with tumor recurrence and reduced survival in patients with glioblastoma. *Cancer Immunol Immunother.* 2015 Apr;64(4) 419-427. doi:10.1007/s00262-014-1651-7. PMID: 25555571; PMCID: PMC4774199
 181. Skálová A, Stenman G, Simpson RHW, Hellquist H, Slouka D, Svoboda T, Bishop JA, Hunt JL, Nibu KI, Rinaldo A, Vander Poorten V, Devaney KO, Steiner P, Ferlito A. The Role of Molecular Testing in the Differential Diagnosis of Salivary Gland Carcinomas. *Am J Surg Pathol.* 2018 Feb;42(2):e11-e27. doi: 10.1097/PAS.0000000000000980. PMID: 29076877.

182. SBOC. 2017. "Cabeça e Pescoço." *Sociedade Brasileira De Oncologia Clinica*
183. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol.* 2000 Mar;182(3):311-22. doi: 10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9. Review. PubMed PMID: 10653597
184. Shang, B.; Liu, Y.; Jiang, S.J.; Liu, Y. Prognostic value of tumor-infiltrating FoxP3+ regulatory T cells in cancers: A systematic review and meta-analysis. *Sci. Rep.* 2015, 5, 15179
185. Sharpe, A.H. & Freeman, G.J. The B7–CD28 superfamily. *Nat. Rev. Immunol.* 2, 116–126 (2002)
186. Silva, Guilherme De Souza and Fatores Preditores De. 2013. "Metástase Cervical E Padrão De Disseminação Regional Nas Formas Clássica E Folicular Do Carcinoma Papilífero Da."
187. Siqueira-Batista, Rodrigo et al. 2012. "Linfócitos T CD4+CD25+ e a Regulação Do Sistema Imunológico: Perspectivas Para o Entendimento Fisiopatológico Da Sepse." *Revista Brasileira de Terapia Intensiva* 24(3):294–301
188. Song Y, Zhou Q, Zhu H, Jing Y, Zhang X, Yang Y, Hu Q, Huang X, Ni Y. Frequency of circulating CD14⁺⁺ CD16⁺ intermediate monocytes as potential biomarker for the diagnosis of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2018 Nov;47(10):923-929. doi: 10.1111/jop.12760. Epub 2018 Aug 3. PubMed PMID: 29961993.
189. Sousa, Isabel Garcia. 2015. "Linfócitos T: Uma Análise Do Perfil Diferencial Da Expressão Gênica Na Imunorregulação." Retrieved (http://repositorio.unb.br/bitstream/10482/20514/1/2016_IsabelGarciaSousa.pdf)
190. Sun, D.S.; Zhao, M.Q.; Xia, M.; Li, L.; Jiang, Y.H. The correlation between tumor-infiltrating Foxp3+ regulatory T cells and cyclooxygenase-2 expression and their association with recurrence in resected head and neck cancers. *Med. Oncol.* 2012, 29, 707–713
191. Tabuchi S, Koyanagi K, Nagata K, Ozawa S, Kawachi S. Verrucous carcinoma of the esophagus: a case report and literature review. *Surg Case Rep.* 2020 Feb 7;6(1):35. doi: 10.1186/s40792-020-0801-8. PubMed PMID: 32030515; PubMed Central PMCID: PMC7005233
192. Tai X, Cowan M, Feigenbaum L, Singer A. CD28 costimulation of developing thymocytes induces Foxp3 expression and regulatory T cell differentiation independently of interleukin 2. *Nat Immunol.* 2005
193. Tang Q, Henriksen KJ, Boden EK, et al. Cutting edge: CD28 controls peripheral homeostasis of CD4+CD25+ regulatory T cells. *J Immunol.* 2003;171(7):3348-3352. doi:10.4049/jimmunol.171.7.3348
194. Tangthongkum M, Tiyanuchit S, Kirtsreesakul V, Supanimitjaroenporn P, Sinkitjaroenchai W. Razão de plaquetas para linfócitos e largura de distribuição de glóbulos vermelhos como fatores prognósticos para sobrevivência e recorrência em pacientes com câncer oral. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2017; 274 (11): 3985–3992.

195. Tao, H.; Mimura, Y.; Aoe, K.; Kobayashi, S.; Yamamoto, H.; Matsuda, E.; Okabe, K.; Matsumoto, T.; Sugi, K.; Ueoka, H. Prognostic potential of FOXP3 expression in non-small cell lung cancer cells combined with tumor-infiltrating regulatory T cells. *Lung Cancer* 2012, 75, 95–101
196. Templeton, Arnoud J. et al. 2014. "Prognostic Role of Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio in Solid Tumors: A Systematic Review and Meta-Analysis." *Journal of the National Cancer Institute* 106(6):1–11
197. Therezinha F. Lorenzi - Manual De Hematologia Propedêutica E Clínica, 4a Edição (Guanabara Koogan).pdf - Hematologia - riqueemenezes - <http://minhateca.com.br> [Internet]. Available from: [http://docs4.minhateca.com.br/620664488,BR,0,0,Therezinha-F.-Lorenzi--Manual-De-Hematologia-Propedêutica-E-Clínica,-4a-Edição-\(GuanabaraKoogan\).pdf](http://docs4.minhateca.com.br/620664488,BR,0,0,Therezinha-F.-Lorenzi--Manual-De-Hematologia-Propedêutica-E-Clínica,-4a-Edição-(GuanabaraKoogan).pdf)
198. Thompson, L. D. R. (2019). Verrucous Squamous Cell Carcinoma. *Ear, Nose & Throat Journal*. <https://doi.org/10.1177/0145561319871712>
199. Tibaldi C, Vasile E, Bernardini I, Orlandini C, Andreuccetti M, Falcone A. Baseline elevated leukocyte count in peripheral blood is associated with poor survival in patients with advanced non-small cell lung cancer: a prognostic model. *J Cancer Res Clin Oncol* [Internet]. 2008 Oct 18 ;134(10):1143–9. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18347812>
200. Tsai YD, Wang CP, Chen CY, Lin LW, Hwang TZ, Lu LF, Hsu HF, Chung FM, Lee YJ, Hwang JY. Pretreatment circulating monocyte count associated with poor prognosis in patients with oral cavity cancer. *Head Neck*. 2014 Jul;36(7):947-53. doi: 10.1002/hed.23400. Epub 2014 Jan 16. PubMed PMID: 23733351
201. Ur Rahaman, Syed & Mujib, Br. (2014). Histopathological correlation of oral squamous cell carcinoma among younger and older patients. *Journal of oral and maxillofacial pathology : JOMFP*. 18. 183-8. 10.4103/0973-029X.140734.
202. U.S. Department of Health and Human Services. 2017. "Head and Neck Cancers - National Cancer Institute." *National Cancer Institute*. Retrieved (<https://www.cancer.gov/types/head-and-neck/head-neck-fact-sheet%0Ahttps://www.cancer.gov/types/head-and-neck/head-neck-fact-sheet%0Ahttps://www.cancer.gov/types/head-and-neck/head-neck-fact-sheet#r9>)
203. Ulaganathan G, Mohamed Niazi KT, Srinivasan S, Balaji VR, Manikandan D, Hameed KAS, Banumathi A. A Clinicopathological Study of Various Oral Cancer Diagnostic Techniques. *J Pharm Bioallied Sci*. 2017 Nov;9(Suppl 1):S4-S10. doi: 10.4103/jpbs.JPBS_110_17. Review. PubMed PMID: 29284926; PubMed Central PMCID: PMC5731041
204. Usefulness of the neutrophil-to-lymphocyte ratio in predicting short- and long-term mortality in breast cancer patients. Azab B, Bhatt VR, Phookan J, Murukutla S, Kohn N, Terjanian T, Widmann WD *Ann Surg Oncol*. 2012 Jan; 19(1):217-24

205. Valero, Cristina et al. 2020. "Pretreatment Peripheral Blood Leukocytes Are Independent Predictors of Survival in Oral Cavity Cancer." *Cancer* 126(5):994–1003
206. Vander Poorten, Vincent et al. 2018. "Polymorphous Adenocarcinoma of the Salivary Glands: Reappraisal and Update." *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology* 275(7):1681–95. Retrieved (<http://dx.doi.org/10.1007/s00405-018-4985-5>)
207. VASCONCELOS, Lianne D'Oleron Lima; MOREIRA, Nathalia Vieitez Rodrigues; SILVA, Leorik Pereira da e SOBRAL, Ana Paula Veras. **Expressão da metaloproteinase 9 no carcinoma de células escamosas oral.** *Rev. cir. traumatol. buco-maxilo-fac.* [online]. 2013, vol.13, n.4, pp. 89-94. ISSN 1808-5210.
208. Wågsäter D, Dienus O, Löfgren S, Hugander A, Dimberg J. Quantification of the chemokines CCL17 and CCL22 in human colorectal adenocarcinomas. *Mol Med Rep* [Internet]. [cited 2018 Feb 17];1(2):211–7. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21479399>
209. Waight JD, Takai S, Marelli B, Qin G, Hance KW, Zhang D, Tighe R, Lan Y, Lo KM, Sabzevari H, Hofmeister R and Wilson NS. Cutting edge: epigenetic regulation of Foxp3 defines a stable population of CD4+ regulatory T cells in tumors from mice and humans. *J Immunol* 2015; 194: 878-882
210. Wang C, Civan J, Lai Y, Cristofanilli M, Hyslop T, Palazzo JP et al (2015) Racial disparity in breast cancer survival: the impact of pre-treatment hematologic variables. *Cancer Causes Control* 26(1):45–56
211. Wang W, Deng Z, Hatcher H, Miller LD, Di X, et al. 2014. IRP2 regulates breast tumor growth. *Cancer Res.* 74: 497–507
212. Wang X, Lang M, Zhao T, Feng X, Zheng C, Huang C, Hao J, Dong J, Luo L, Li X, Lan C, Yu W, Yu M, Yang S and Ren H. Cancer-FOXP3 directly activated CCL5 to recruit FOXP3(+)Treg cells in pancreatic ductal adenocarcinoma. *Oncogene* 2017; 36: 3048-3058
213. Ward ST, Li KK, Hepburn E, Weston CJ, Curbishley SM, Reynolds GM, Hejmadi RK, Bicknell R, Eksteen B, Ismail T, Rot A and Adams DH. The effects of CCR5 inhibition on regulatory T-cell recruitment to colorectal cancer. *Br J Cancer* 2015; 112: 319-328
214. Warnakulasuriya S, Johnson NW, van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med.* 2007 Nov;36(10):575-80. doi: 10.1111/j.1600-0714.2007.00582.x. PMID: 17944749.
215. Wickramasinghe SN, Comdan B, Hasan R, Marjot OH. Correlation between acetaldehyde-modified haemoglobin, carbohydrate-deficient transferrin (CDT) and haematological abnormalities in chronic alcoholism. *Alcohol Alcohol* 1994;29:415±423
216. Wiedemann GM, Knott MML, Vetter VK, Rapp M, Haubner S, Fessler J, et al. Cancer cell-derived IL-1 α induces CCL22 and the recruitment of regulatory T cells. *Oncoimmunology* [Internet]. 2016 Sep 25;5(9):e1175794. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27757295>

217. Wildin RS, Ramsdell F, Peake J, Faravelli F, Casanova JL, et al. 2001. X-linked neonatal diabetes mellitus, enteropathy and endocrinopathy syndrome is the human equivalent of mouse scurfy. *Nat. Genet.* 27:18–20
218. Williams LM, Rudensky AY. Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. *Nat Immunol.* 2007
219. Williams LM, Rudensky AY. Maintenance of the Foxp3-dependent developmental program in mature regulatory T cells requires continued expression of Foxp3. *Nat Immunol.* 2007;8:277–84
220. WORLD HEALTH ORGANIZATION, W. Cancer- 2018. Disponível em:< <http://www.who.int/cancer/en/> >
221. Yan, Bin et al. 2013. “IL-6 Cooperates with G-CSF To Induce Protumor Function of Neutrophils in Bone Marrow by Enhancing STAT3 Activation.” *The Journal of Immunology* 190(11):5882–93.
222. Yang ZZ, Novak AJ, Stenson MJ, Witzig TE, Ansell SM. Intratumoral CD4+CD25+ regulatory T-cell-mediated suppression of infiltrating CD4+ T cells in B-cell non-Hodgkin lymphoma. *Blood.* 2006 May 1;107(9):3639-46. doi: 10.1182/blood-2005-08-3376. Epub 2006 Jan 10. PMID: 16403912; PMCID: PMC1895773.
223. Yoon AJ, Wang S, Kutler DI, Carvajal RD, Philipone E, Wang T, Peters SM, LaRoche D, Hernandez BY, McDowell BD, Stewart CR, Momen-Heravi F, Santella RM. MicroRNA-based risk scoring system to identify early-stage oral squamous cell carcinoma patients at high-risk for cancer-specific mortality. *Head Neck.* 2020 Jan 25;. doi: 10.1002/hed.26089. [Epub ahead of print] PubMed PMID: 31981257
224. Yu, Fei Yan et al. 2020. “Dysbiosis of Saliva Microbiome in Patients with Oral Lichen Planus.” *BMC Microbiology* 20(1):1–12
225. Zhang, Baixia, Wei Du, Kang Gan, Qigen Fang, and Xu Zhang. 2019. “Significance of the Neutrophil-to-Lymphocyte Ratio in Young Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma.” *Cancer Management and Research* 11:7597–7603
226. Zhang, Yixin, Jinxiu He, Bing He, Ruijie Huang, and Mingyun Li. 2019. “Effect of Tobacco on Periodontal Disease and Oral Cancer.” *Tobacco Induced Diseases* 17(May):40. Retrieved September 15, 2019 (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31516483>)

ANEXO I: Termo de consentimento livre e esclarecido



TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

(De acordo com as normas da Resolução nº 466, do Conselho Nacional de Saúde de 12/12/2012)

Você está sendo convidado para participar da pesquisa O PAPEL DOS miRNAs NA MODULAÇÃO DAS VIAS GLICOLÍTICAS ENVOLVIDAS NA ONCOGÊNESE ORAL. Você foi selecionado por ordem de atendimento e sua participação não é obrigatória. A qualquer momento você pode desistir de participar e retirar seu consentimento. Sua recusa não trará nenhum prejuízo em sua relação com o pesquisador ou com a instituição Unigranrio.

O objetivo principal deste estudo é analisar o perfil de expressão de moléculas (miRNAs) reguladores de proteínas envolvidas no desenvolvimento de câncer oral em amostras de biópsias da mucosa oral e sangue periférico em indivíduos portadores de carcinoma de células escamosas oral comparados a uma população controle (saudável).

Sua participação nesta pesquisa consistirá em ceder amostras de sua biópsia, que é o material que será retirado para diagnóstico patológico, assim como uma amostra de sangue.

Os riscos relacionados com sua participação são pequenos, porque todos os procedimentos realizados são rotineiros e seguem rigorosamente os protocolos de biossegurança. Ou seja, utilizamos materiais descartáveis e instrumentais esterilizados.

Os benefícios relacionados com a sua participação são contribuição para estudos que ajudem a compreender o desenvolvimento do câncer oral e de seu diagnóstico precoce.

As informações obtidas através dessa pesquisa serão confidenciais e asseguramos o sigilo sobre sua participação. Os dados não serão divulgados de forma a possibilitar sua identificação. Todas as amostras coletadas serão codificadas e os pesquisadores manterão sigilo sobre seus dados pessoais.

Uma cópia deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido ficará com o senhor (a), podendo tirar suas dúvidas sobre o projeto e sua participação, agora ou a qualquer momento com os pesquisadores responsáveis Carina Maciel da Silva Boghossian (e-mail: carinabogho@yahoo.com.br; telefone: 21-972009913) e Cláudia Maria Pereira (e-mail: claudemarie_br@yahoo.com.br; telefone: 21-999113269).

Pesquisador Responsável

Declaro que entendi os objetivos, riscos e benefícios de minha participação na pesquisa e concordo em participar.

O pesquisador me informou que o projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da UNIGRANRIO, localizada na R. Prof. José de Souza Herdy, 1160 – CEP 25071-202 TELEFONE (21).2672-7733, ENDEREÇO ELETRÔNICO: cep@unigranrio.com.br.

Rio de Janeiro, ____ de ____ de 20__.

Sujeito da pesquisa

Pai / Mãe ou Responsável Legal

ANEXO II: Questionário utilizado para anamnese

Universidade do Grande Rio Faculdade de Odontologia	
Críticas de Inclusão Sem tratamento prévio Carcinoma de Células Escamosas Língua oral, gengiva superior, gengiva inferior, assoalho bucal, palato duro, região jugal, sulcos buco-alveolares, dentes retromolar	Críticas de Exclusão Tratamento prévio Outros tumores de Cabeça e Pescoço previamente tratados Tumores múltiplos simultâneos RT ou QT prévias
IDENTIFICAÇÃO E DADOS DEMOGRÁFICOS	
1. Número do estudo: _____ 2. Nome do paciente: _____ 3. Data de nascimento: _____ 4. Gênero: () Masculino () Feminino 5. Raça: () Branca () Amarela () Negra () Outra _____ 6. Naturalidade: _____ 7. Procedência (local de residência anterior a atual): _____ 8. Endereço: _____ 9. Telefone: Res: _____ Cel: _____ 10. Profissão: _____	
HISTÓRIA CLÍNICA	
11. História familiar de câncer: () Não () Sim. Grau de parentesco () Pai () Mãe () Irmão () Outro(s) _____ () Desconhece 12. Uso de tabaco: () Não () Sim. Tempo _____ Tipo _____ Quantidade (dia) _____ Marca _____ 13. Uso de álcool: () Não () Sim. Tempo _____ Tipo _____ Frequência _____ 14. Prática sexo oral: () Sempre () Nunca () Às vezes. 15. Uso de preservativo: () Sempre () Nunca () Às vezes. 16. Portador de alguma alteração sistêmica () Não () Sim. Qual? _____ 17. Medicamentos: _____	
LOCO-REGIONAL	
18. Local de remoção do tecido: () ponta de língua () corpo de língua () ponta e corpo de língua () borda lateral de língua () sulco pelve-lingual () assoalho () gengiva inferior () gengiva superior () trigono retromolar () fundo de sulco de vestibulo () tuberosidade () palato duro () palato mole () mucosa labial () mucosa jugal Outras: _____	
CIRURGIA	
19. Data da coleta: ____/____/____ 20. Tipo de cirurgia: _____	
Nome do coletor de Dados: _____	

ANEXO III: Valores de referência comumente utilizados para análise do perfil de resultados do hemograma completo

Eritrograma		
Hemácias	H: 4,5 – 6,5 / M: 4,0 – 5,0	milhões/mm ³
Hemoglobina	H: 13 – 18 / M: 12 – 15,5	g/L
Hematócrito	H: 40 – 54 / M: 36 – 45	%
VCM	80 – 98	fL
HCM	27 – 32	pg
CHCM	32 – 36	g/dL
RDW	11 – 15	%
Leucograma		
	%	/mm ³
Leucócitos		4000 – 10000
Neutrófilos	40 – 75	1600 – 7500
Promielócitos	0	0
Mielócitos	0	0
Metamielócitos	0 – 1	0 – 100
Bastões	0 – 5	0 – 500
Segmentados	40 – 75	1600 – 7500
Eosinófilos	1 – 5	40 – 500
Basófilos	0 – 2	0 – 200
Linfócitos	25 – 45	1000 – 4500
Monócitos	2 – 10	80 – 1000
Blastos	0	0
Plaquetograma		
Plaquetas	150000 - 450000	/mm ³
Contagem de Reticulócitos	%	/mm ³
	0,5 – 1,5	25000 – 75000

Fonte: Ferreira *et al.*, 2019

