

AVALIAÇÃO DA VIA PI3K/Akt/mTOR NO CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL: UM ESTUDO GENÉTICO BASEADO POR HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU* FLUORESCENTE

Palavras-Chave: CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL, VIAS DE SINALIZAÇÃO, HIBRIDIZAÇÃO *IN SITU*

Autores:

GUILHERME ARRUDA VIEIRA, FCM-UNICAMP

Prof^(a). Dr^(a). FERNANDA VIVIANE MARIANO (orientadora), FCM-UNICAMP

REYDSON ALCIDES DE LIMA SOUZA (coorientador), FCM - UNICAMP

INTRODUÇÃO:

O carcinoma epidermóide oral (CECO), também conhecido como carcinoma oral de células escamosas, é o tipo mais frequente de câncer da cavidade oral, respondendo por mais de 90% das neoplasias malignas nessa região. Apresenta maior incidência em homens com mais de 45 anos, especialmente aqueles com histórico de tabagismo e etilismo, os quais tem ação sinérgica na carcinogênese do CECO. As áreas mais comumente acometidas são a língua e o assoalho da boca. Entre os principais fatores de risco para o CECO estão o consumo de tabaco e álcool; a infecção pelo HPV (sobretudo os subtipos 16 e 18), no carcinoma de orofaringe; e a exposição à radiação ultravioleta, no câncer de lábio inferior. Novos perfis de pacientes têm emergido, incluindo jovens sem os fatores clássicos de risco, mulheres (jovens e idosas) e indivíduos jovens com infecção pelo HPV.

O tratamento depende do estágio clínico: os estágios I e II costumam ser tratados com cirurgia e radioterapia, enquanto os estágios III e IV podem exigir cirurgia, radioterapia e quimioterapia associadas. É frequente a ocorrência de metástases cervicais, e sua presença reduz a taxa de sobrevivência para aproximadamente 50%. O prognóstico tende a ser mais favorável nos cânceres de lábio e mais desfavorável nos localizados no assoalho bucal. Em pacientes jovens, a doença costuma ter um comportamento mais agressivo, mas os casos relacionados ao HPV de alto risco, em geral, apresentam melhor resposta ao tratamento quimioterápico e maior sobrevida.

O gene PIK3CA está mutado em até 10% dos casos de CECO, especialmente nos associados ao HPV, resultando na ativação da via PI3K/Akt/mTOR. Essas mutações aumentam a proliferação celular e a resistência à apoptose por meio da ativação de AKT e mTOR, além da inibição de proteínas pró-apoptóticas. A perda de função da proteína PTEN também contribui para a superativação dessa via. A amplificação de PIK3CA está relacionada à transição epitelial-mesenquimal, metástases e pior prognóstico. Essa alteração genética também está associada à ativação da via Hippo-YAP, que favorece recidivas. Estudos com inibidores dessa via mostraram resultados promissores.

Dessa forma, torna-se relevante a produção de conhecimento confiável sobre as manifestações do CECO em distintos perfis populacionais, visando fomentar novas pesquisas e identificar possíveis padrões de comportamento tumoral. Assim, os estudos epidemiológicos se configuram como ferramentas fundamentais para esse fim. Compreender as características da população afetada pode auxiliar na identificação de fatores de risco e gerar evidências cientificamente fundamentadas que contribuam para o desenvolvimento de políticas públicas voltadas à prevenção, ao diagnóstico precoce e a terapias mais eficazes e menos mutiladoras para esses pacientes.

METODOLOGIA:

Foram selecionados casos de carcinoma epidermóide oral (CECO) diagnosticados entre 1994 e 2025 no Departamento de Patologia da Faculdade de Ciências Médicas da UNICAMP. Foram coletados dados como idade, sexo, hábitos, localização do tumor, características histopatológicas, estadiamento clínico, tratamento e prognóstico. Foram incluídos 15 casos de CECO por perfil epidemiológico (**Tabela 1**), exceto o grupo 2 em que não foram encontrados casos que se adequaram aos critérios de inclusão, e foram analisadas lâminas coradas em H&E e blocos de parafina com tecido suficiente para testes de FISH.

Tabela 1. Perfis epidemiológicos do carcinoma epidermoide oral

| Autores | Grupo | Descrição |
|--|---------|--|
| (Hanna et al. 2018; Hilly et al. 2013; Johnson et al. 2020; Toner and O'Regan 2009) | Grupo 1 | Pacientes com idade ≤ 45 anos, homens, tumores de cavidade oral, tabagistas e etilistas, HPV-independente. |
| (Johnson et al. 2020; Toner and O'Regan 2009) | Grupo 2 | Pacientes com idade ≤ 45 anos, homens, tumores de orofaringe, não-tabagistas e não-etilistas, HPV-associado. |
| (Ferreira e Costa et al. 2022; Johnson et al. 2020; Satgunaseelan et al. 2020; Toner and O'Regan 2009) | Grupo 3 | Pacientes com idade ≤ 45 anos, em sua maioria mulheres, tumores de cavidade oral, não-tabagistas e não-etilistas, HPV-independente. |
| (DeAngelis et al. 2018; Harada et al. 2023; Koo et al. 2013) | Grupo 4 | Pacientes com idade ≥ 70 anos, em sua maioria mulheres, tumores de cavidade oral, não-tabagistas e não-etilistas, HPV-independente. |

Legenda: HPV: papilomavírus humano

Contudo, durante o desenvolvimento do projeto, a realização do FISH foi inviabilizada até o momento devido a uma combinação de fatores que impactaram diretamente a execução do experimento. Entre as limitações enfrentadas, destacam-se questões pessoais de saúde que afetaram a disponibilidade para o trabalho prático em laboratório, restrições orçamentárias relacionadas à verba destinada ao projeto, e a demora no processo de orçamento para aquisição das sondas específicas, cuja importação envolve prazos prolongados de encomenda. Esses fatores, em conjunto, comprometeram o cronograma previsto e impossibilitaram a aplicação da técnica no período estabelecido.

A técnica de hibridização fluorescente *in situ* FISH será padronizada com casos previamente diagnosticados, utilizando cortes de 3 μm e o kit ZytoLight®. Os genes-alvo serão o PIK3CA, AKT, mTOR, PTEN e FOXO. A reação ocorrerá em dois dias, com preparo, aplicação das sondas, incubação e coloração com DAPI. As lâminas deverão ser analisadas em microscópio de fluorescência, com leitura de 100 núcleos por sonda. Sinais separados indicam positividade, conforme critérios do fabricante. Os dados serão então tabulados no Excel® e analisados estatisticamente para comparação entre os grupos.

Com isso, serão apresentados os resultados da pesquisa epidemiológica realizada acerca dos subgrupos que serão estudados com análise genética em um segundo momento.

RESULTADOS E DISCUSSÃO:

Foram incluídos 45 casos no total, sendo 15 em cada grupo com exceção do grupo 2, no qual não foram encontrados, até o momento, casos compatíveis com os critérios de inclusão no grupo, que serão pesquisados futuramente em bases de dados mais recentes do DP.

Os casos foram agrupados nos seus respectivos grupos epidemiológicos (**Tabela 2**).

Tabela 2. Características clínico-patológicas dos perfis epidemiológicos dos 45 casos

| Características | G1 N (%) | G2 N (%) | G3 N (%) | G4 N (%) |
|--------------------------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
| Sexo | | | | |
| Masculino | 15 (100) | | 07 (46,7) | 02 (13,3) |
| Feminino | 00 (0) | | 08 (53,3) | 13 (86,7) |
| Idade | | | | |
| Média | 41,3±5,45 | | 34,7±7,42 | 82,5±5,76 |
| Mediana, amplitude | 42, 23-45 | | 33, 25-45 | 83, 73-94 |
| Localização | | | | |
| Assoalho oral | 04 (26,7) | | 00 (0) | 03 (20,0) |
| Cavidade oral, SOE | 01 (6,7) | | 01 (6,7) | 00 (0) |
| Gengiva | 00 (0) | | 00 (0) | 01 (6,7) |
| Língua | 04 (26,7) | | 10 (66,7) | 08 (53,3) |
| Mucosa jugal | 00 (0) | | 01 (6,7) | 02 (13,3) |
| Palato duro | 00 (0) | | 02 (13,3) | 00 (0) |
| Trígono retromolar | 06 (40,0) | | 01 (6,7) | 01 (6,7) |
| Apresentação clínica | | | | |
| Lesão ulcerada | 11 (73,3) | | 06 (40,0) | 10 (66,7) |
| Lesão hipertrófica/exofítica | 02 (13,3) | | 03 (20,0) | 00 (0) |
| Lesão leucoplásica | 00 (0) | | 00 (0) | 02 (13,3) |
| Lesão verrucosa/papilomatosa | 00 (0) | | 00 (0) | 01 (6,7) |
| Não informado | 02 (13,3) | | 06 (40,0) | 02 (13,3) |
| Subtipo histológico | | | | |
| Convencional | 15 (100,0) | | 15 (100,0) | 14 (93,3) |
| Verrucoso | 00 (0) | | 00 (0) | 01 (6,7) |
| Diferenciação | | | | |
| Bem diferenciado | 01 (6,7) | | 01 (6,7) | 01 (6,7) |
| Moderadamente diferenciado | 13 (86,7) | | 13 (86,7) | 12 (80,0) |
| Pouco diferenciado/indiferenciado | 01 (6,7) | | 01 (6,7) | 02 (13,3) |
| Status das margens cirúrgicas | | | | |
| Livres | 05 (33,3) | | 09 (60,0) | 05 (33,3) |
| Comprometidas | 04 (26,7) | | 02 (13,3) | 02 (13,3) |
| Não avaliado | 06 (40,0) | | 04 (26,7) | 08 (53,3) |
| Invasão | | | | |
| Angiolinfática | 04 (26,7) | | 02 (13,3) | 02 (13,3) |
| Perineural | 03 (20,0) | | 05 (33,3) | 01 (6,7) |
| Estadiamento clínico | | | | |
| I-II | 00 (0) | | 02 (13,3) | 03 (20,0) |
| III-IV | 07 (46,7) | | 09 (60,0) | 10 (66,7) |
| Não informado | 02 (13,3) | | 04 (26,7) | 02 (13,3) |
| Tratamento inicial* | | | | |
| Cirurgia | 09 (60,0) | | 09 (60,0) | 07 (47,0) |
| Radioterapia | 09 (60,0) | | 13 (87,0) | 12 (80,0) |
| Quimioterapia | 09 (60,0) | | 13 (87,0) | 06 (40,0) |
| Desfecho | | | | |
| Recidiva | 03 (20,0) | | 06 (40,0) | 01 (6,7) |
| Metástase à distância | 04 (26,7) | | 03 (20,0) | 00 (0) |
| Tempo de seguimento (meses) | | | | |
| Média | 22,8±19 | | 37,4±33,6 | 20,4±21,5 |

| | | | |
|------------------------------------|----------------|----------------|-------------|
| Mediana, amplitude | 14,6; 4,8-62,1 | 21,9; 3,2-97,1 | 8,5; 4,9-63 |
| Status no último seguimento | | | |
| Vivo com a doença | 03 (20,0) | 03 (20,0) | 04 (26,7) |
| Vivo sem evidência da doença | 02 (13,3) | 06 (40,0) | 04 (26,7) |
| Morto pela doença | 05 (33,3) | 06 (40,0) | 04 (26,7) |
| Morto por outras causas | 02 (13,3) | 00 (0) | 02 (13,3) |
| Perda de seguimento | 03 (20,0) | 00 (0) | 01 (6,7) |

*Alguns pacientes (30 casos, 66,7%) realizaram mais de uma modalidade terapêutica

No grupo 1, o tempo médio de evolução do início dos sintomas até o diagnóstico foi de $6,5 \pm 3$ meses. Em relação aos fatores de risco, 13 (86,7%) pacientes eram tabagistas ativos e 2 (13,3%) ex-tabagistas, com média de anos-maço de $52,2 \pm 63,3$. Além disso, 9 (60%) pacientes eram etilistas ativos e 6 (40%) ex-etilistas, com média de $25 \pm 12,3$ anos de consumo. Neste grupo, a grande maioria dos pacientes apresentavam os fatores de risco clássicos para o desenvolvimento do CECO, como já é bem estabelecido pela literatura (Adeyemi et al., 2011). Em relação ao estadiamento clínico, a maior parte dos casos foram classificados em estágios avançados com 7 casos (46,7%) em estágios III-IV, o que se relaciona com piores prognósticos e maior risco do surgimento de metástases e recidivas (Brito et al, 2018). Em dois casos (13,3%) essa informação não foi relatada. Com relação ao tratamento, 5 (33,3%) pacientes realizaram cirurgia como única modalidade terapêutica, 5 casos (33,3%) realizaram quimioterapia + radioterapia, 4 (26,7%) realizaram cirurgia + quimioterapia + radioterapia. Em um caso (6,7%), não havia informação sobre o tratamento. Em relação ao comportamento tumoral, 3 casos (20%) apresentaram recidiva local ao longo do acompanhamento e 4 (26,7%) tiveram metástase à distância, sendo 2 (50%) pulmonares, 2 (50%) linfonodais e 1 (25%) óssea, fato que está de acordo com a tendência observada do CECO de provocar metástases que afetam linfonodos regionais em região de pescoço e pulmão (Thomson, 2018).

No grupo 3 o tempo médio de evolução do início dos sintomas até o diagnóstico foi de $9,2 \pm 9,9$ meses, sendo que a maior parte dos casos receberam estadiamento avançado, com 9 (60%) casos em estágios III-IV e 2 (13,3%) estágios I-II, o que vem sendo exposto pela literatura recente sobre o comportamento mais agressivo dos tumores de boca em pacientes jovens (Toner; O'Regan, 2009). Assim como vem sendo observado nos trabalhos recentes (Toner; O'Regan, 2009), a maior parte dos casos (10, 66,7%) em jovens com menos de 45 anos de idade acometeram a língua. Com relação ao tratamento, 8 (53,3%) pacientes realizaram o esquema cirurgia + quimioterapia + radioterapia e 5 (33,3%) realizaram quimioterapia + radioterapia. Em um caso (6,7%), não havia informação sobre o tratamento. Em relação ao desfecho, 6 (40%) pacientes tiveram recidiva local e 3 (20%) sofreram metástase à distância, sendo que 100% delas foram linfonodais e 1 (33,3%) caso com concomitante acometimento pulmonar, números que também corroboram com a agressividade do CECO nessa faixa etária.

No grupo 4, o tempo médio de evolução do início dos sintomas até o diagnóstico foi de $9,9 \pm 9,6$ meses e a média de idade foi de $80,2 \pm 7$ anos e representa a população mais idosa do estudo, um grupo que vem sendo mais estudado nos últimos anos em razão do aumento dos casos de CECO nessa população (Hilly, 2013). A maioria dos casos acometeram a língua (8 – 53,3%) e a maioria dos pacientes (12 – 80%) passaram por tratamento radioterápico, com resultados semelhantes ao encontrados em outros estudos, como o de Hilly, 2013. A maior parte dos casos foram estadiados em graus avançados, sendo 10 (66,7%) como graus III-IV e 3 (20%) como graus I-II, sendo que 2 (13,3%) casos não foram avaliados. Com relação ao tratamento, 5 (33,3%) pacientes realizaram exclusivamente radioterapia, 3 (20%) apenas cirurgia e 3 (20%) realizaram o esquema quimioterapia + radioterapia. Em relação ao desfecho, 1 (6,7%) paciente sofreu recidiva local e não ocorreram metástases à distância no grupo.

CONCLUSÕES:

Apesar da amostra reduzida de pacientes nos grupos epidemiológicos analisados, observa-se uma transformação no perfil tradicional do CECO, com aumento de casos em populações antes menos afetadas, como pacientes jovens com tumores relacionados ao HPV e mulheres idosas sem os fatores de risco clássicos, como o tabagismo e o consumo de álcool. Assim, esses novos perfis apresentam especificidades quanto à origem, evolução clínica, resposta ao tratamento e prognóstico, aspectos que devem ser considerados tanto na formulação de políticas

públicas de prevenção quanto na definição de abordagens terapêuticas mais eficazes e menos invasivas. Além disso, o reconhecimento das diversas formas de apresentação do CECO permite a realização de diagnósticos mais precoces, o que resulta em melhores prognósticos e maior taxa de sobrevivência dos pacientes.

BIBLIOGRAFIA

- ADEYEMI, B. F.; OLUSANYA, A. A.; LAWOYIN, J. O. **Oral Squamous Cell Carcinoma, Socioeconomic Status and History of Exposure to Alcohol and Tobacco**. *Journal of the National Medical Association*, v. 103, n. 6, p. 498–502, jun. 2011.
- BRITO, R. T. DE et al. **Profile of patients and factors related to the clinical staging of oral squamous cell carcinoma**. *Revista de Salud Pública*, v. 20, n. 2, p. 221–225, 1 mar. 2018.
- COHEN, Y. et al. **Mutational analysis of PTEN/PIK3CA/AKT pathway in oral squamous cell carcinoma**. *Oral Oncology*, v. 47, n. 10, p. 946–950, out. 2011.
- HILLY, O. et al. **Carcinoma of the oral tongue in patients younger than 30 years: Comparison with patients older than 60 years**. *Oral Oncology*, v. 49, n. 10, p. 987–990, out. 2013.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR GOMES DA SILVA. **Estimativa 2020: incidência de câncer no Brasil**. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. – Rio de Janeiro: INCA, 2019. p. 38- 39.
- KOWALSKI, Luiz Paulo; ALVES, Fábio Abreu. **Carcinoma epidermóide**. In: ALMEIDA, Oslei Paes de (org.). *Patologia oral*. 1. ed. São Paulo: Artes Médicas, 2016. p. 88- 93.
- MIRANDA-FILHO, A.; BRAY, F. **Global patterns and trends in cancers of the lip, tongue and mouth**. *Oral Oncology*, v. 102, p. 104551, mar. 2020.
- NG, J. H. et al. **Changing epidemiology of oral squamous cell carcinoma of the tongue: A global study**. *Head & Neck*, v. 39, n. 2, p. 297–304, 2017.
- STARZYŃSKA, A. et al. **Prognostic value of the PIK3CA, AKT, and PTEN mutations in oral squamous cell carcinoma: literature review**. *Archives of Medical Science*, v. 17, n. 1, p. 207–217, 5 jan. 2021.
- SUNG, H. et al. **Global Cancer Statistics 2020: GLOBOCAN Estimates of Incidence and Mortality Worldwide for 36 Cancers in 185 Countries**. *CA: A Cancer Journal for Clinicians*, v. 71, n. 3, p. 209–249, mai. 2021.
- THOMSON, P. J. **Perspectives on oral squamous cell carcinoma prevention—proliferation, position, progression and prediction**. *Journal of Oral Pathology & Medicine*, v. 47, n. 9, p. 803–807, 2018.
- TONER, M.; O'REGAN, E. M. **Head and Neck Squamous Cell Carcinoma in the Young: A Spectrum or a Distinct Group? Part 1**. *Head and Neck Pathology*, v. 3, n. 3, p. 246–248, set. 2009.
- WOOLGAR, J. A. et al. **Prognostic biological features in neck dissection specimens**. *European Archives of Oto-Rhino-Laryngology*, v. 270, n. 5, p. 1581–1592, maio 2013.