



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
FACULDADE DE MEDICINA
DEPARTAMENTO DE PATOLOGIA E MEDICINA LEGAL
MESTRADO EM PATOLOGIA

TARCÍSIO TEOBALDO BEZERRA

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO E IMUNOHISTOQUÍMICO COM
BAX, BCL-2 E P27 EM CARCINOMA ESPINOCELULAR
INVASIVO DA BOCA**

FORTALEZA

2007

TARCÍSIO TEOBALDO BEZERRA

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO E IMUNOHISTOQUÍMICO COM
BAX, BCL-2 E P27 EM CARCINOMA ESPINOCELULAR
INVASIVO DA BOCA**

Dissertação submetida à Coordenação do
Curso de Pós-Graduação em Patologia, da
Universidade Federal do Ceará, como
requisito parcial para obtenção do grau de
Mestre em Patologia.

Orientadora:

Prof^a.Dr^a.Márcia Valéria Pitombeira Ferreira

FORTALEZA

2007

FICHA CATALOGRÁFICA

Preparada pela Biblioteca de Ciências da Saúde da
Universidade Federal do Ceará

©reprodução autorizada pelo autor

B Bezerra, Tarcisio Teobaldo

Estudo Epidemiológico e Imunohistoquímico em
Carcinoma Espinocelular Bucal com BAX, BCL-2 e P27 /
Tarcisio Teobaldo Bezerra. – Fortaleza, 2007.

77f.: il.

Orientadora: Profa. Dra. Márcia Valéria Pitombeira
Ferreira.

Dissertação. Universidade Federal do Ceará.
Faculdade de Medicina, 2007.

1. 2. 3. - Fortaleza-CE. I. Ferreira, Márcia Valéria
Pitombeira. (Orient.) II. Título

CDD: _____

TARCÍSIO TEOBALDO BEZERRA

**ESTUDO EPIDEMIOLÓGICO E IMUNOHISTOQUÍMICO COM
BAX, BCL-2 E P27 EM CARCINOMA ESPINOCELULAR
INVASIVO DA BOCA**

Dissertação submetida à Coordenação do Curso de Pós-Graduação em Patologia, da Universidade Federal do Ceará, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Patologia.

Aprovada em ___/___/___

BANCA EXAMINADORA

Professor Dr.
Universidade

Professor Dr.
Universidade

Professor Dr.
Universidade

AGRADECIMENTOS

A Deus por ter-me feito tão “insistente”.

Aos pacientes da Santa Casa da Misericórdia de Fortaleza pela cooperação em um momento tão difícil em suas vidas.

Aos médicos: Dr. José Wilson Mourão de Farias; Marcelo Esmeraldo de Holanda; Sérgio Barros; Fernando Porto e Márcio Studart pelo apoio recebido.

A secretária Vera do Setor de Oncologia.

Aos técnicos em enfermagem Murilo e Tereza pela prestatividade.

A professora doutora Márcia Valéria Pitombeira Ferreira por ter-me acolhido mesmo sem nunca ter me visto na vida.

A professora doutora Sílvia Helena Barem Rabenhorst pelo acolhimento no laboratório.

Ao doutor Mário Henrique Girão Faria pela inestimável ajuda nas reações de imunohistoquímica.

A técnica em citologia Margarete pelo tempo na confecção das lâminas e dos blocos.

À CAPES pela minha aceitação no programa de Demanda Social.

Ao doutor Marco Botelho pela prestatividade nas análises estatísticas.

A doutora Míren Uribe e ao senhor Assis pelos dados de base populacional.

“A inspiração existe, mas tem de te encontrar a trabalhar”.

Picasso

RESUMO

Avaliou-se a expressão das proteínas bax, bcl-2 e P27 no carcinoma espinocelular invasivo da cavidade bucal através da técnica da imunohistoquímica para conhecer-se o perfil apoptótico destes tumores. Buscou-se detectar os fatores epidemiológicos e o comportamento clínico dos pacientes acometidos por esta neoplasia. Procurou-se empregar parâmetros estatísticos diferentes do odds ratio para comparações posteriores. Analisando-se quarenta e oito pacientes da Santa Casa da Misericórdia de Fortaleza, Ceará foi possível conhecer os fatores sexo, escolaridade, renda familiar, tabagismo (forma e tempo de consumo, tempo de abandono, quantidade consumida), etilismo (tipo de bebida, tempo de consumo, quantidade consumida, frequência). Com a análise do laudo histopatológico da peça cirúrgica soube-se das informações referentes ao tumor em si (localização, gradação histológica, tamanho, linfonodos envolvidos). Obteve-se fragmentos das peças cirúrgicas e foram confeccionadas lâminas para a verificação da invasividade através da coloração em hematoxilina e eosina. Em seguida foi realizada a reação de imunohistoquímica pelo método da estrepto-avidina-biotina-peroxidase objetivando-se avaliar a expressão das proteínas supracitadas. As lâminas com marcação positiva foram submetidas a contagem de no mínimo mil células e este resultado foi empregado nos métodos LI (*Labelling Index*) e HS (*HScore*). A avaliação dos resultados foi através de métodos descritivos, sendo os testes realizados o qui-quadrado e o teste exato de Fisher com nível de significância a dez por cento. Os resultados apontaram uma média de idade de cinquenta e sete anos e o maior número de indivíduos do sexo masculino, analfabetos, com renda familiar de um salário-mínimo na sua maioria. A forma de consumo de tabaco, em maior número encontrada, foi o cigarro industrializado com vinte anos de consumo. A ingestão de bebidas destiladas superou a de fermentadas com média de vinte anos. O soalho bucal foi a localização com maior número de casos, com uma média de tamanho de três e meio centímetros, o estadiamento patológico predominante foi o pT2, com gradação histológica moderadamente diferenciada em maior quantidade. Dentre os cruzamentos realizados, houve correlação estatística entre o tamanho de tumores com as faixas etárias ($P=0,084$ para $\alpha=10\%$); tamanho dos tumores com envolvimento de linfonodos ($P=0,085$ para $\alpha=10\%$); sexo dos pacientes com envolvimento dos linfonodos ($P=0,03$ para $\alpha=10\%$). Os resultados das reações de imunohistoquímica mostraram um maior percentual de casos positivos para bax (77,1%) seguido de P27 (45,9%) e bcl-2 (16,6%). As médias dos LI encontradas apontaram bax com 67,766; seguida de bcl-2 com 10,804; e P27 com 7,989. Cruzando-se os H-scores dos marcadores entre si encontrou-se correlação positiva entre bax e P27 (0,245 na correlação de Pearson). Os parâmetros estatísticos avaliados foram: média e seu erro padrão; mediana; moda; desvio padrão; curtose e seu erro padrão; mínimo; máximo e quartis. Os resultados mostram uma tendência a apoptose nos carcinomas espinocelulares bucais.

Palavras-chave: Epidemiologia; Imunoistoquímica; Carcinoma de Células Escamosas, Neoplasias bucais; Prognóstico. Proteína bcl-2, Proteína Bax, Inibidor de Quinase Dependente de Ciclina p27.

ABSTRACT

The evaluation of the expression of bax, bcl-2 and p27 proteins at invasive squamous cell carcinoma of oral cavity was done using the immunohistochemistry technique to know about apoptotic profile of these neoplasms. The epidemiological factors and the clinical behavior of the patients were detected, too. Statistical parameters different from odds ratio was employed for future comparisons. Forty-eight patients from Santa Casa da Misericórdia de Fortaleza, Ceará, Brazil was analyzed and with this analysis was possible to know the prognostic factors: sex of patients, instruction grade, familiar gains, tobacco consumption (form of consumption, duration of consumption, period of forsaking and quantity consumed), alcohol consumption (nature of drinking, duration of consumption, period of forsaking, quantity consumed, periodicity). In a posterior moment, with the histopathological report from the surgical specimen was possible to know about localization of neoplasm, size of neoplasm, histological grade, nodes involvement and invasiveness. Pieces of the neoplasm were achieved from surgical specimen and glass slides were done to analyze the invasiveness by hematoxilin-eosin coloration. After the immunohistochemistry reaction by streptoavidin biotin technique was done to evaluate the expression of proteins above. The glass slides with positive reaction were submitted under a counting and, at least, one thousand cells were counted. The results from counting were submitted under the LI(Labelling Index) and HS(H Score) methods. The evaluation of the results was made using descriptive methods and the statistical tests were qui-square and Fisher's exact test with 10% significance. The results showed the mean age was 57 years old, more males than females, analphabets and one minimum wage the mean familiar gain. The main form of tobacco consumption was industrialized cigarette with 20 years of consumption. The swallow of distillers drinking was bigger than fermentation ones with 20 years of drinking at mean. The floor of the mouth was the anatomic site with more number of cases and the mean size of neoplasm was 1.4 inches. The preponderant pathological staging detected was pT2 and the preponderant histological grade was moderately differentiated. Among the cross tabs realized, there were statistical correlation between size of tumors and age ($P=0.084$; $\alpha=10\%$), between size of tumors and nodes involvement ($P=0,085$; $\alpha=10\%$), between sex of patients and nodes involvement ($P=0.03$; $\alpha=10\%$). The results from immunohistochemical reactions were more positive to bax (77.1% of positive cases), P27(45.9% of positive cases) and bcl-2 (16.6% of positive cases). The mean of LI showed bax at first position (67.766); second bcl-2 (10.804) and P27(7.989). The cross tabs among HS showed statistical positive correlation between bax and P27 (0.245 at Pearson's correlation). The statistical parameters were: mean and its standard error, median, mode, standard deviation, kurtosis and its standard error, minimum, maximum and percentiles. The conclusions showed apoptosis propensity at oral squamous cell carcinoma.

Keywords: Epidemiology; Imunohistochemistry; Carcinoma, Squamous Cell; Mouth Neoplasms; Prognosis; Bcl-2 Protein; Bax Protein; P27 Kinase Inhibitor Protein.

LISTA DE TABELAS

TABELA 1	Distribuição das faixas etárias de uma amostra de pacientes obtida no serviço de cabeça e pescoço da Santa Casa da Misericórdia de Fortaleza de abril de 2005 a dezembro de 2006	41
TABELA 2	Distribuição do grau de escolaridade de uma amostra de pacientes obtidas no serviço de cabeça e pescoço da Santa Casa da Misericórdia de Fortaleza de abril de 2005 a dezembro de 2006	43
TABELA 3	Distribuição da renda familiar estimada em salários mínimos dos pacientes de uma amostra obtida no serviço de cabeça e pescoço da Santa Casa da Misericórdia de Fortaleza de abril de 2005 a dezembro de 2006	43
TABELA 4	Distribuição de tempo de tabagismo dos indivíduos de uma amostra obtida no serviço de cabeça e pescoço da Santa Casa da Misericórdia de Fortaleza de abril de 2005 a dezembro de 2006	44
TABELA 5	Distribuição de tempo livre de tabagismo de uma amostra de pacientes obtida no serviço de cabeça e pescoço da Santa Casa da Misericórdia de Fortaleza de abril de 2005 a dezembro de 2006	45
TABELA 6	Distribuição da quantidade de cigarros industrializados consumidos diariamente por uma amostra de pacientes do serviço de cabeça e pescoço da Santa Casa da Misericórdia de Fortaleza de abril de 2005 a dezembro de 2006	46
TABELA 7	Distribuição segundo a localização do tumor primário de uma amostra de pacientes do serviço de cabeça e pescoço da Santa Casa da Misericórdia de Fortaleza de abril de 2005 a dezembro de 2006	47
TABELA 8	Distribuição do tamanho dos tumores obtido pelo estadiamento patológico de uma amostra de pacientes do serviço de cabeça e pescoço da Santa Casa da Misericórdia de Fortaleza de abril de 2005 a dezembro de 2006	47

TABELA 9	Distribuição segundo estadiamento patológico de linfonodos de uma amostra de pacientes do serviço de cabeça e pescoço da Santa Casa da Misericórdia de Fortaleza de abril de 2005 a dezembro de 2006.....	48
TABELA 10	Distribuição segundo as gradações histológicas dos tumores obtidos em uma amostra de pacientes do serviço de cabeça e pescoço da Santa Casa da Misericórdia de Fortaleza de abril de 2005 a dezembro de 2006.....	48
TABELA 11	Correlação entre as faixas etárias e tamanho dos tumores de uma amostra de pacientes do serviço de cabeça e pescoço da Santa Casa de Fortaleza de abril de 2005 a dezembro de 2006.....	49
TABELA 12	Correlação segundo faixas etárias e o estadiamento patológico dos linfonodos de uma amostra de pacientes do serviço de cabeça e pescoço da Santa Casa de Fortaleza de abril de 2005 a dezembro de 2006.....	49
TABELA 13	Correlação entre tamanho dos tumores e o estadiamento patológico de linfonodos de uma amostra de pacientes do serviço de cabeça e pescoço da Santa Casa de Fortaleza de abril de 2005 a dezembro de 2006.....	50
TABELA 14	Correlação segundo sexo dos pacientes e do tamanho dos tumores de uma amostra de pacientes do serviço de cabeça e pescoço da Santa Casa de Fortaleza de abril de 2005 a dezembro de 2006.....	50
TABELA 15	Correlação entre sexo dos pacientes e estadiamento patológico dos linfonodos regionais de uma amostra de pacientes do serviço de cabeça e pescoço da Santa Casa de Fortaleza de abril de 2005 a dezembro de 2006.....	51
TABELA 16	Correlações entre os HScores dos marcadores bcl-2, bax e P27 de uma amostra obtida no serviço de cabeça e pescoço da Santa Casa da Misericórdia de Fortaleza no período de abril de 2005 a dezembro de 2006.....	57
TABELA 17	Distribuição dos valores estatísticos dos Hscores e LI resultantes da contagem de células de carcinoma espinocelular bucal oriundos de amostra de pacientes da Santa Casa da Misericórdia de Fortaleza	58

LISTA DE GRÁFICOS

GRÁFICO 1	Distribuição da procedência dos pacientes da amostra obtida no serviço de cabeça e pescoço da Santa Casa da Misericórdia de Fortaleza de abril de 2005 a dezembro de 2006	42
GRÁFICO 2	Distribuição dos percentuais de casos com marcação positiva para as proteínas bcl-2, bax e P27 de uma amostra de pacientes do serviço de cabeça e pescoço da Santa Casa da Misericórdia de Fortaleza de abril de 2005 a dezembro de 2006	52
GRÁFICO 3	Média dos valores dos índices de marcação (LI) de uma amostra de pacientes do serviço de cabeça e pescoço da Santa Casa da Misericórdia de Fortaleza de abril de 2005 a dezembro de 2006	56
GRÁFICO 4	Média dos H Scores (HS) de uma amostra de pacientes do serviço de cabeça e pescoço da Santa Casa da Misericórdia de Fortaleza de abril de 2005 a dezembro de 2006	56

LISTA DE FIGURAS

FIGURA 1	CB 22 , marcação moderada para bcl2 obtida em uma amostra tumoral de paciente do serviço de cabeça e pescoço da Santa Casa de Fortaleza de abril de 2005 a dezembro de 2006	53
FIGURA 2	CB 17, marcação moderada para bcl2 obtida em uma amostra tumoral de paciente do serviço de cabeça e pescoço da Santa Casa de Fortaleza de abril de 2005 a dezembro de 2006.....	53
FIGURA 3	CB 21, marcação forte para P27 obtida em uma amostra tumoral de paciente do serviço de cabeça e pescoço da Santa Casa de Fortaleza de abril de 2005 a dezembro de 2006	54
FIGURA 4	CB 37 marcação moderada para P27 obtida em uma amostra tumoral de paciente do serviço de cabeça e pescoço da Santa Casa de Fortaleza de abril de 2005 a dezembro de 2006	54
FIGURA 5	CB 35 marcação forte para bax obtida em uma amostra tumoral de paciente do serviço de cabeça e pescoço da Santa Casa de Fortaleza de abril de 2005 a dezembro de 2006.....	55
FIGURA 6	CB 51 marcação moderada para bax resultante de uma amostra tumoral de paciente do serviço de cabeça e pescoço da Santa Casa de Fortaleza de abril de 2005 a dezembro de 2006.....	55

LISTA DE ABREVIATURAS

°C	–	Graus Celsius
DAB	–	Diaminobenzidina
pH	–	Potencial hidrogeniônico
mM	–	Concentração milimolar
LI	–	Labelling Index
HS	–	H score
CDK	–	Quinase dependente de ciclina
Kip	–	Proteína Inibidora de Cinase
CKI	–	Inibidor dependente de quinase
EGFR	–	Receptor de Fator de Crescimento Epidérmico
SCF	–	Fator Estimulador de Células-Tronco
Akt	–	Proteína Quinase b
HE	–	Hematoxilina e Eosina
Bax	–	Proteína X associada a bcl-2
Bcl-2	–	Linfoma de Células B -2
P27	–	Inibidor de Quinase Dependente de Ciclina P27
UICC	–	International Union Against Cancer
OMS	–	Organização Mundial de Saúde
C-CDK	–	Ciclina –Cinase Dependente de Ciclina
INK-4	–	Cinase Dependente de ciclina 4
ARF	–	Fator de Ribosilação do ADP.
TGF	–	Fator de Crescimento Tumoral
PBK	–	Proteína Cinase B
hKIS	–	Estamina Interativa Cinase Humana

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	15
1.1	Epidemiologia	15
1.2	Carcinógenos bucais	15
1.3	Fatores prognósticos no carcinoma bucal	17
1.4	O ciclo celular	25
1.5	Proteínas avaliadas neste estudo	31
2	OBJETIVOS	35
3	METODOLOGIA	36
3.1	Crêterios de inclusãõ/exclusãõ da amostra	36
3.2	Têcnica da preparaçãõ da lâmina em HE	37
3.3	Têcnica da imunohistoquímica	37
3.4	Análises empregadas	39
4	RESULTADOS	41
4.1	Resultados epidemiolôgicos	41
4.2	Resultados imunohistoquímicos	51
5	DISCUSSÃO	59
6	CONCLUSÕES	63
	REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	65
	ANEXOS	74

1 INTRODUÇÃO

1.1 Epidemiologia

De acordo com os últimos dados disponíveis o câncer bucal se situa como o quinto no mundo em incidência¹. Tendo uma previsão de trezentos mil novos casos por ano.

A incidência anual é variável dentre as nações sendo de 1500 novos casos na Noruega², de 4% nos homens e 1% nas mulheres na Itália³, 19% de novos casos em homens e 7% nas mulheres na Índia⁴, nos Estados Unidos sua incidência é da ordem de 6%⁵.

As taxas de mortalidade nos Estados Unidos da América são da ordem de 7550 pessoas para 2007, sendo 5180 homens e 2370 mulheres⁶.

No Brasil, o câncer bucal se situa atualmente como a nona neoplasia em incidência estimando-se 13.470 novos casos para 2006⁷. Sendo São Paulo o estado da federação com maior número de casos previstos para 2006 com 4330⁷. No nordeste brasileiro existe a previsão de 2170 casos novos dos quais 780 nas capitais sendo a Bahia o estado com maior número de casos: 700⁷.

No estado do Ceará projetam-se um total de 400 novos casos para o mesmo período, sendo 220 em homens e 180 nas mulheres⁷, constituindo-se o terceiro em incidência no nordeste. Em Fortaleza estimam-se 80 casos novos em pacientes do sexo masculino e 30 em pacientes do sexo feminino⁷.

De acordo com o Registro de Câncer de Base Populacional⁸ durante o período de 1990 a 1994 houve um total de 238 casos de carcinoma espinocelular na boca na cidade de Fortaleza excluídos os lábios. Sendo assim distribuídos: em indivíduos do sexo masculino 155 no total, nesta ordem: língua (exceto base) 73, gengiva 7, soalho 16, outras partes da boca 59. Em mulheres 81 no total sendo: língua (exceto base) 25, gengiva 8, soalho 9, outras partes da boca 39.

O mesmo registro anterior⁸ durante o período de 1995 a 1999 mostrou um aumento no número de casos totalizando 347 casos novos em Fortaleza. Com a seguinte

distribuição em homens: língua (exceto base) 79, gengiva 9, soalho 27, palato 27, outras partes da boca 91. Em mulheres: língua (exceto base) 38, gengiva 2, soalho 10, palato 19, outras partes da boca 45.

Com relação ao Registro de Câncer de Base Hospitalar ⁹ no período de 2000 a 2006 foram catalogadas as seguintes localizações: palato: 66 homens e 37 mulheres, vestibulo e área retromolar: 63 homens e 40 mulheres, língua (exceto base): 94 homens e 37 mulheres, gengiva: 2 mulheres, soalho bucal: 66 homens e 25 mulheres.

1.2 Carcinógenos bucais

1.2.1 Tabaco

O tabaco, um dos principais suspeitos na etiologia do câncer bucal foi introduzido como hábito graças à colonização hispânica na América no século XVI ¹⁰. A princípio era consumido envolvido em tubos. O primeiro cigarro parecido com os produzidos atualmente surgiu na Espanha em meados do século XVII.

As primeiras suspeitas da associação tabaco câncer bucal datam do início do século XVIII ao verificarem-se lesões nos lábios em pacientes usuários de tubos de tabaco ¹⁰.

Atualmente o tabagismo é amplamente difundido no mundo das mais variadas formas: cigarros industrializados, cigarros de palha, charutos, fumos de rolo, cachimbos além de fumo “invertido”, betel.

Tendo como principais componentes químicos potencialmente carcinógenos os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, nitrosaminas e formaldeídos. Estes componentes agem ao serem convertidos através das enzimas relacionadas a CYP em metabólitos reativos que lesam o DNA. Outro mecanismo já conhecido é o de induzirem mutações na proteína P53 e na proteína do retinoblastoma ¹¹.

1.2.2 Álcool

Este agente não é considerado “per se” como um carcinógeno. Por este fato várias propostas tentam explicar como o etanol atua local ou sistemicamente contribuindo para o câncer bucal ¹².

O principal metabólito do etanol é o acetaldeído. Em ratos o acetaldeído interfere na síntese e no reparo do DNA, induz troca de cromátides irmãs, produz mutações genéticas pontuais e inibe a O⁶metilguanitransferase cuja função é reparar defeitos causados por agentes alquilantes e estimula a produção de anticorpos ao ligar-se a estruturas celulares ¹².

1.2.2.1 Efeito local

O etanol leva a um aumento da permeabilidade na mucosa bucal permitindo a entrada de outros carcinógenos através da mucosa, além de alguns agentes mutagênicos serem solúveis em álcool e penetrarem com mais facilidade ¹².

O etanol é predominantemente metabolizado ao nível hepático, contudo, descobriu-se que este produto também é trabalhado localmente pelas bactérias aeróbias intrabucais e pelas células da mucosa bucal pela ação da enzima álcool desidrogenase e pelo citocromo P450E1. Isto ajuda a esclarecer uma possível associação entre indivíduos alcoólatras e com baixa higiene bucal apresentarem altos níveis de acetaldeído diluído na saliva ¹². Também o citocromo P450 pode levar a produção de carcinógenos localmente.

Na cavidade bucal o acetaldeído é metabolizado pelas células da mucosa através da enzima aldeído desidrogenase para levar ao produto final desta reação, o acetato.

1.2.2.2 Efeito sistêmico

O principal ponto de metabolismo é o fígado onde as enzimas acima citadas concentram-se em maior quantidade e onde ocorre o maior acúmulo de metabólitos carcinógenos produzidos ¹².

1.2.3 Vírus

Foi, por algum tempo, motivo de especulação a ação carcinogênica viral. Atualmente são conhecidas duas grandes famílias virais com ação carcinogênica: a família do vírus do herpes (tipo 1, tipo 6, tipo 8, Epstein-Barr) e a família do vírus do papiloma (tipo 16, tipo 18)¹⁰.

A ação destes vírus envolve mutações em oncogenes, genes supressores tumorais ou qualquer outro gene que dê a célula a possibilidade de torná-la mais susceptível a sofrer alguma outra transformação maligna.

1.3 Fatores prognósticos no carcinoma bucal

Os fatores prognósticos são, um campo onde se procura determinar o comportamento clínico dos tumores e sua relação com o paciente. Nesta dissertação foram divididos, para fins de melhor compreensão em fatores estabelecidos na prática clínica e em fatores prognósticos aguardando validação tanto clínica quanto estatística para consolidarem-se porque já são alvo de constantes pesquisas.

1.3.1 Fatores prognósticos estabelecidos

1.3.1.1 Localização

Um dos fatores importantes na classificação é a localização do tumor. Há autores relatando que tumores supra-claviculares com comprometimento de linfonodos são a mais freqüente causa de falha no tratamento¹³. Cerca de 15% dos pacientes com tumores primários localizados no rebordo alveolar desenvolverão um segundo tumor primário metacrônico ou sincrônico¹³. Existe também a chance de tumores desta região metastatizarem para o fígado, ventrículo direito e ossos mais facilmente do que os encontrados primariamente noutras localizações.

Dentre os locais de pior prognóstico nos cânceres bucais o trígono retromolar e a língua merecem comentários.

O trígono retromolar é uma área de incidência incomum, contudo a capacidade de disseminação para a maxila ou espaço mastigatório o tornam uma das piores localizações para ressecção¹⁴.

Para outros autores todavia¹⁵, a língua é o pior sítio primário para a localização de um tumor, principalmente as neoplasias malignas localizadas mais posteriormente. Isto devido os cânceres de base de língua serem assintomáticos e de difícil exame clínico.

Em geral, quanto maior a drenagem linfática recebida de um sítio primário, maior sua chance de disseminação metastática e pior prognóstico¹⁶.

1.3.1.2 Tamanho do tumor:

Um dos fatores prognósticos mais importantes, para determinar se o cirurgião será capaz de obter margens cirúrgicas livres e a dose de uma possível radioterapia posterior¹⁷.

Como outros cânceres, de modo geral neoplasias malignas de maior tamanho têm pior prognóstico, sendo diretamente relacionado com o tempo de duração^{18, 19}. Tumores de até 2 centímetros no maior diâmetro respondem melhor aos tratamentos e tem boa sobrevida¹⁹.

1.3.1.3 Invasão óssea:

Outro fator que influencia diretamente no tipo de tratamento. Em pacientes cujo tratamento foi a ressecção da mandíbula, foi detectado um padrão infiltrativo de invasão óssea; este padrão era preditivo para sobrevida prevalecendo sobre os fatores prognósticos dos tecidos moles acima do osso removido. Isto pode explicar as incertezas na significância no envolvimento dos ossos e uma futura alteração na classificação TNM (pT4) neste tipo de tumor¹⁷.

1.3.1.4 Invasão perineural:

A capacidade de um carcinoma bucal em acompanhar o trajeto de um nervo ou o invadir ²⁰. Carcinomas que acompanham o trajeto de um nervo têm maior chance de disseminação em maior profundidade e maiores chances de metástases ²¹.

1.3.1.5 Gradação histológica:

O primeiro método de avaliação da gradação histológica foi introduzido por Broder em 1927 e baseava-se na proporção entre células diferenciadas e indiferenciadas ou anaplásicas ²².

Atualmente o sistema de gradação mais aceito é o da OMS o qual compreende três categorias: grau 1, bem-diferenciado; grau 2, moderadamente diferenciado; grau 3, pobremente diferenciado. Como os tumores são capazes de apresentar mais de um grau dependendo da área avaliada, neste caso, o maior grau determina a categoria. A UICC também recomenda a mesma terminologia ¹⁷.

A relação entre prognóstico e gradação ²³ já é bastante estabelecida na literatura. Os piores prognósticos são aqueles em que os pacientes possuem tumores com gradação histológica mais avançada.

Há autores que preconizam um sistema de gradação mais amplo; consistindo em cinco parâmetros ²⁴: grau de ceratinização, número de mitoses, polimorfismo nuclear, modo de invasão e infiltração linfoplasmocitária. Estes parâmetros são graduados em pontuações de 1 a 4. Os tumores com pontuações de 5 a 8 são bem diferenciados, com pontuações 9 a 12 são moderadamente diferenciados e de 13 a 20 são pouco diferenciados. Estes tumores apresentam respectivamente 82%, 26%, 16% de taxa de sobrevida em 5 anos ²⁴.

O sistema aceito tanto pela OMS e pela UICC apresenta pobre correlação entre os resultados e a resposta ao tratamento de cada paciente individualmente quando comparado com o de Anneroth ¹⁷.

1.3.1.6 Diferenciação:

Os carcinomas variam, de bem diferenciados a indiferenciados. Esta variação tem a ver com o grau de semelhança com as células de origem.

Carcinomas indiferenciados tendem a ter maior número de mitoses, portanto, maior tamanho e pior prognóstico ²⁵.

1.3.1.7 Profundidade da invasão:

Relaciona-se, juntamente com o tamanho do tumor e envolvimento de linfonodos, como um dos parâmetros mais importantes no prognóstico do paciente. Estudiosos desta característica ²⁴ utilizam os parâmetros utilizados na gradação histológica de Anneroth ²³. Neste sistema ele considera grau 1 quando o tumor apresenta uma borda bem delimitada; grau 2 o tumor mostra uma borda infiltrativa em cordões de células tumorais; no grau 3 há invasividade em pequenos grupos ou cordões celulares de até 15 células; no grau 4 há uma marcada disseminação de células isoladas ou em pequenos grupos disseminadas no estroma. Há autores que confirmaram a utilidade da gradação do bordo invasivo para carcinoma lingual e demonstram correlação entre a invasividade por pequenos grupos de células com metástases e recorrência local ²⁶. Outros autores que encontraram esta relação com tumores de laringe e palato. O significado da invasividade como um fator prognóstico é considerado ser um dos mais acurados parâmetros entre observadores.

Deve-se fazer uma distinção entre profundidade de invasão e espessura do tumor.

A profundidade de invasão é a extensão tumoral através dos tecidos abaixo da superfície epitelial. Esta definição é confirmada por vários autores ^{27, 20}.

A espessura do tumor é definida como a maior distância, em linha reta, entre a porção mais extensa do tumor até a sua porção invasiva mais profunda ²⁰.

Neoplasias malignas com profundidade de invasão maior ou igual a cinco milímetros têm maior risco de metástases para os linfonodos cervicais ²⁰.

1.3.1.8 Envolvimento de linfonodos e metástases:

O envolvimento de linfonodos regionais é o fator mais importante na predição de metástases à distância, além de sucesso ou falha no tratamento. O número de linfonodos afetados, bem como suas dimensões e localização são de suma importância no prognóstico^{28,29}.

Alguns trabalhos mostram que o comprometimento da cápsula dos linfonodos contribui negativamente para a sobrevida do paciente. Estes têm chances significativamente maiores de disseminação que os sem extravasamento capsular³⁰. Contudo no estudo de outros autores³¹ não foi encontrada associação significativa entre a sobrevida, a proporção de metástases à distância com o rompimento da cápsula. Isto pode ser explicado pelo fato de na cabeça e no pescoço, diferentes sítios primários apresentam diferentes padrões metastáticos.

O envolvimento bilateral das cadeias ganglionares também é de mau prognóstico pois o risco de metástases para órgãos aumenta grandemente. Já o envolvimento de linfonodos contralateralmente ao tumor primário é raro, sem o envolvimento ipsilateral. Os carcinomas de lábio apresentam potencial metastático considerável em relação a outros tumores bucais³².

Os pulmões são o sítio mais comum de metástases para os carcinomas bucais em geral. Metástases para ossos e fígado ocorrem menos frequentemente³³.

1.3.1.9 Estadiamento clínico:

Baseia-se na classificação TNM onde são atribuídas letras T (tumor), N (linfonodos) e M (metástase) além de algarismos de zero a quatro com a finalidade de ter-se uma padronização em termos de potencial de disseminação, protocolos de tratamento e sobrevida do paciente. Recomenda-se o exame de no mínimo 10 linfonodos cervicais para a verificação da negatividade de metástase.

Os tumores de cabeça e pescoço são usualmente identificados em estágios avançados, à maioria no estágio IV. Autores alemães, em estudo retrospectivo incluindo 3247 pacientes com carcinomas de cabeça e pescoço, encontraram 42% dos pacientes em estágio IV. Destes tumores 28% eram tumores da cavidade bucal T₄ e 31% N₂A³⁴. De acordo com o estudo do exército norte-americano³⁵ os pacientes frequentemente se apresentam com doença

avançada no diagnóstico inicial e mais da metade apresentam envolvimento de linfonodos regionais. A relação entre o número de linfonodos envolvidos e o risco de metástases foi confirmada por diversos autores ³⁶. No Brasil a maioria dos casos de cânceres de boca também se apresenta em estágio clínicos avançados ³⁷.

FATORES PROGNÓSTICOS AINDA EM PESQUISA:

1 Eosinofilia:

Eosinofilia se relaciona com a presença de eosinófilos ao redor da neoplasia. Os eosinófilos, em altas taxas, liberam citocinas relacionadas à lise celular contribuindo para um melhor prognóstico em pacientes com carcinoma espinocelular bucal ³⁸.

2 Reação desmoplásica:

Muitos autores internacionais ³⁹ seguem a definição de Haneke para definir carcinoma espinocelular desmoplástico; são aqueles em que traves de células tumorais crescem periféricamente associadas a estroma fibroso produzido por uma intensa ativação de fibroblastos. Carcinomas espinocelulares com esta característica são menos diferenciados e capazes de metastatizarem com mais facilidade que os não desmoplásticos ³⁹.

3 Ploidia do DNA:

Refere-se ao conteúdo de DNA tumoral da cavidade bucal. Pesquisadores ^{40, 41} observaram que os tumores aneuplóides de cabeça e pescoço, incluindo os da cavidade bucal, tendem a ser mais avançados e clinicamente mais agressivos que os tumores diplóides. O grau de aneuploidia dos tumores bucais aumenta significativamente com o decréscimo da sua diferenciação.

Carcinomas espinocelulares com DNA aneuplóide são mais sensíveis a radioterapia e quimioterapia com cisplatina. Provavelmente devido ao alto grau de mitoses nas suas células ⁴².

Leucoplasias, eritroleucoplasias, líquen plano, lesões hiperkeratóticas, além de tumores malignos apresentam um padrão de DNA diplóide ⁴².

4 Antígeno H:

Perda do antígeno H, foi relacionada com a variabilidade nos graus de diferenciação e potencial metastático ^{43,44}.

O antígeno H é o carboidrato precursor dos antígenos de superfície sanguíneos A e B. Pacientes com carcinoma bucal pertencentes ao grupo sanguíneo A não apresentam este antígeno na maioria das células neoplásicas por deleção genética ⁴⁴.

5 Gene P53:

O gene P53 é o gene mais comumente mutado em vários tipos de câncer incluindo o câncer bucal ⁴⁵. Este gene codifica a proteína de mesmo nome cuja função é parar o ciclo celular no ponto de verificação G₁/S e induzir a apoptose no ponto G₂/M ⁴⁶ atuando como um supressor tumoral ⁴⁷. Alterações no gene podem levar a uma inativação desta proteína por alterações na sua estrutura de ligação com o DNA ⁴⁸. A P53 pode todavia estar super expressa, sem ser necessariamente funcional ^{49, 50}. E ainda pode ocorrer deleção herdada e adquirida deste gene. P53 parece ser um dos eventos precoces na carcinogênese bucal ⁵⁰. A super expressão de P53 mostrou associação significativa com menor sobrevida livre de doença ⁴⁹.

6 Gene P16:

Este gene codifica uma proteína supressora tumoral ligando-se as cinases dependentes de ciclinas 4 e 6 evitando a formação do complexo com as ciclinas D, impedindo a entrada da célula na fase G1 do ciclo celular. Uma vez que este complexo cinases dependentes de ciclinas 4/6 e ciclina D não irão fosforilar a proteína do retinoblastoma ⁵¹. Recentemente verificou-se que a perda da expressão de P16 em cultura de células tumorais

relacionou-se com a imortalidade destas células⁵². A perda da expressão da P16 relacionou-se com menor tempo de sobrevida livre de doença⁴⁹.

7 Gene P21:

Este gene localiza-se no cromossomo 6p21.2. A proteína derivada deste gene, proteína P21, é regulada pela proteína P53 cuja função é parar o ciclo celular na fase final de G₁S.

Já foi documentado que alterações nos níveis de P53 e P21 são eventos precoces no câncer lingual. Os pacientes em que os tumores expressão a P21 têm melhor prognóstico com maiores chances de sobrevida⁵³.

8 Gene da ciclina D1:

Gene relacionado ao ciclo celular. Sua proteína tem a função de fosforilar a proteína do retinoblastoma (RB) possibilitando a passagem do ponto G₁ para S²¹. A superexpressão da proteína está relacionada à presença de metástases²¹. Porém há autores que discordam deste valor prognóstico^{54,55}.

9 Ciclina A:

Proteína necessária à passagem do ciclo celular na fase G₂/M. Altas concentrações de ciclina A estão relacionadas com estágios mais avançados da neoplasia, maior tamanho do tumor e comprometimento dos linfonodos²¹.

10 P34^{CDC2}:

Regula a entrada da célula na mitose. Em carcinomas espinocelulares de língua com detecção de P34^{CDC2} foi associado com baixos índices de sobrevida⁵⁶.

11 *Locus* 3q 26.3:

Carcinomas de revestimento escamoso da região cabeça e pescoço apresentam alta prevalência de amplificação do gene 3q26.3. Muitos estudos têm sugerido que esta

amplificação tem significância biológica e clínica. A amplificação deste *locus* 3q26.3 está relacionada em 5,1 vezes maiores níveis de recorrência tumoral e 7,6 vezes maior chance de mortalidade⁵⁷.

1.4 O ciclo celular

No ciclo celular ocorrerá a produção de duas células-filhas idênticas à célula-mãe original. Sendo responsável, através da divisão celular, pela integridade da manutenção de organismos vivos, é alvo de constante vigilância por complexos mecanismos de inibição e controle com o objetivo de impedir um possível surgimento de mutações deletérias ao organismo como um todo. Mutações estas capazes de levar a um surgimento de uma neoplasia maligna e esta levar a morte do organismo vivo. É durante o ciclo celular que atuam as proteínas-alvo por este trabalho analisadas; fazendo estas parte do intrincado mecanismo de controle supracitado.

A mitose das células eucariontes é regulada por sistemas que se relacionam em momentos diferentes do ciclo celular.

O ciclo é dividido em fases de repouso (G_0), preparatórias (G_1 e G_2) e efetoras (S e M) sendo cada fase efetora, precedida da sua fase de preparação, culminando com a obtenção de 2 células-filhas iguais⁵⁸.

O estímulo necessário à replicação é obtido do meio externo (hormônios, fatores de crescimento, integrinas, citocinas), desencadeando uma série de reações a partir da membrana até o núcleo⁵⁹.

Tais estímulos atuam através de receptores específicos na membrana plasmática, os quais alteram as proteínas em cadeia ao longo do citoplasma até chegarem ao seu destino. Estes estímulos são também conhecidos como sinais de transdução⁴⁸.

As fases G_1 , S e G_2 formam o conjunto denominado de interfase.

1.4.1 Fase G_0

Conhecida como fase de latência onde a célula entra em repouso mitogênico. Nesta fase as células desempenham suas funções fisiológicas as quais foram programadas geneticamente até receberem novos estímulos à mitose ⁶⁰. Em G₀ as células diminuem de tamanho porque suas moléculas de RNA e suas proteínas são degradadas mais rapidamente que são sintetizadas ⁶⁰. Síntese macromolecular é aproximadamente um terço da velocidade em G₀ que em G₁. Atividade de transporte através da membrana é mais lenta em G₀. A quantidade de polissomos é menor que a de monossomos.

1.4.2 Fase G₁

Para que a célula possa avançar ao longo do ciclo e duplicar seu material genético, deve ultrapassar o ponto conhecido como “ponto-R” de restrição ^{61, 62} onde, após dele, a seqüência de replicação não poderá ser revertida. A passagem é regulada por fatores de crescimento externos ligados a receptores de superfície celular conhecidos como receptores com atividade tirosina-quinase intrínseca. Após a sinalização, ocorre a fosforilação de treoninas, serinas e tirosinas com o intuito de transmitir o sinal através do citoplasma, e finalmente chegar ao núcleo e ativar a indução gênica.

Após o “ponto-R” os estímulos externos não são necessários e a seqüência continua por conta da própria célula em mitose ⁶⁰.

Os eventos da duplicação são coordenados pelas moléculas chamadas ciclinas (C) e pelas quinases – dependentes – de - ciclina (CDK) ^{63, 65}. A função das CDK é de fosforilar as ciclinas durante o ciclo.

A ativação das CDK ocorre depois de ligarem-se as ciclinas, formando holoenzimas ativadas ⁶⁵. As ciclinas diferentes são sintetizadas durante cada fase do ciclo, enquanto as CDK existem constitutivamente na sua forma inativa.

A ultrapassagem além do “ponto R”, ainda na fase G₁, é mediada pela ciclina D (subtipos D₁, D₂ e D₃) interagindo com as CDK₄ e CDK₆ formando as holoenzimas necessárias ⁶⁵. Já a CDK₂ é sintetizada para completar a fase G₁ e iniciar a fase S, sendo ativada pelos subtipos das ciclinas E (E₁ e E₂). A CDK₃ permanece ainda desconhecida quanto a sua função ⁵⁸.

O substrato das holoenzimas ciclinas e quinases-dependentes-de-ciclina 4,6 e 2 são os membros da família da proteína do retinoblastoma (PR) ⁶⁶. Estas proteínas têm a função de liberarem ou não o ciclo de acordo com seu grau de fosforilação. No estado hipofosforilado, a PR encontra-se associada à família de fatores de transcrição E2F bloqueando o ciclo ⁶⁶. O complexo formado (PR-E2F) vai reprimir os promotores histona desacetilase e o complexo de remodeladores de cromossomos ⁶¹. No estado hiperfosforilado a PR libera o E2F para se ligar ao DNA e induzir a transcrição genética ⁶⁶.

Na transição para a fase S ocorre a queda nos níveis de atividade da CDK₂ por degradação da ciclina E pela CDK4/FBW7/AGO.

1.4.3 Fase S

Nesta fase, a célula duplicará seu conteúdo nuclear de forma precisa e em poucas horas. Isto é conseguido porque a replicação começa em vários locais ao longo do cromossomo ⁶⁷.

O complexo ciclina E-CDK₂, no final da fase G₁, permite a ativação da E2F e transcrição das DNA polimerases levando a síntese de fatores de transcrição e, formação das cadeias de DNA. Ocorre a síntese dos subtipos da ciclina A (A₁ e A₂) ligando-se ao CDK₂ ⁵⁸. A formação deste complexo continua até ao final da fase M, onde cai drasticamente.

1.4.4 Fase G₂

A menor das fases onde ocorre intensa síntese protéica preparando a célula para a fase M ⁶⁸.

Quando culturas sincrônicas de células humanas são tratadas com inibidores de síntese de DNA, o grau de síntese protéica nestas células diminui; e estas células não se desenvolvem além da fase G₂ quando comparado com células não-tratadas com inibidores ⁶⁹.

1.4.5 Fase M

Para adentrar esta fase, o ciclo celular já atravessou o ponto de restrição G₂/M. Na maioria das células eucariontes, esta entrada é barrada pela presença de DNA não replicado ou defeituoso ⁶⁹.

É nesta fase, que a célula divide seus cromossomos. É subdividida em prófase, prometáfase, anáfase e telófase.

Durante a prófase ocorre a condensação dos cromossomos. Os microtúbulos e microfilamentos do citoesqueleto são rearranjados ⁷⁰. O rearranjo dos microtúbulos é causado pelas mudanças no centróssomo, os quais são os centros de arranjo da célula nesta fase; servindo como “guia” da movimentação dos cromossomos.

Ocorre a dispersão do complexo de Golgi em vesículas. Síntese de RNA e a pinocitose param ⁷⁰. A síntese de proteínas reduz a 25% da sua capacidade.

A prometáfase caracteriza-se pelas interações entre os cromossomos e as fibras de fuso dispostas em feixe dos microtúbulos junto a outras proteínas que emanam dos centróssomos ⁷⁰.

Localizado em um “lócus” de cada cromossomo, o centrômero liga-se às fibras de fuso interagindo com as mesmas.

Como resultado ocorre o rompimento da membrana nuclear para permitir a migração aos pólos da célula. A movimentação das cromátides para os pólos da célula leva a separação das cromátides-irmãs em direções opostas “puxadas” pelas fibras interpolares.

A velocidade da movimentação dos cromossomos é da ordem de 0,05 a 1µm/s no início da prófase caindo para 0,01 a 0,05µm/s a medida que a fase continua ⁷⁰.

Na anáfase ocorre a reorganização da membrana nuclear e a separação dos cromossomos em velocidade constante, porém maior que na prometáfase, os quais se agrupam em massas. O citoplasma é dividido em partes iguais através da ação das fibras contráteis de actina e miosina contendo aproximadamente metade dos constituintes celulares ⁷⁰.

Na telófase fechando a fase M, ocorre a reformulação do núcleo, descondensação dos cromossomos para restabelecer a condição de interfase.

1.4.6 Pontos de verificação e inibidores do ciclo celular

Os pontos de verificação são paradas durante o ciclo celular com o objetivo de permitir a procura, localização e correção quando possível, de defeitos no DNA. Caso o reparo não seja possível, ocorre o acionamento das vias de morte celular programada. O primeiro ponto é o G₁/S, e o segundo é chamado G₂/M. Eliminação dos pontos de verificação resulta em morte celular, infidelidade na distribuição das organelas ou de cromossomos, ou ainda suscetibilidade aumentada às perturbações vindas do meio externo ⁷¹.

O primeiro ponto avalia a presença de DNA defeituoso, isto se deve ao fato de que a partir da fase S a divisão celular é irreversível. O segundo verifica o grau de segurança na duplicação final do material genético para adentrar a fase M e as cromátides-irmãs possam ser separadas ⁴⁸.

Associadas as CDK e as ciclinas atuam moléculas cuja função é inibir a atividade dos conjuntos C-CDK. São conhecidos como inibidores dependentes-de-quinases. São componentes de duas grandes famílias: as famílias CIP/KIP e a INK4/ARF ⁴⁸.

O gene KIP1 não foi logo reconhecido como um gene antitumoral pois o mesmo se encontrava anulado ou silenciado em tumores ⁶⁵.

Os inibidores CIP/KIP são as proteínas P21^{cip/waf1}, P27^{kip1} e P57^{kip2} ⁷². Elas atuam nos complexos ciclina D-CDK₄ e CDK₆ além da ciclina E-CDK₂. Por exemplo, quando os níveis de ciclina D são elevados por estímulo mitogênico, a P27 se redistribui do complexo ciclina E-CDK₂ para ciclina D-CDK₄ ou D-CDK₆ ⁷³. Por outro lado, baixos níveis de P27 combinados com altos níveis de ciclina E são péssimo prognóstico para o paciente em muitas formas de neoplasias malignas. Inibição do complexo ciclina E-CDK pela P27 leva a parada do ciclo na fase G₁. A P27 foi identificada em células cujo fator beta de transformação de crescimento foi inibido por contato.

Níveis de P21 e P27 são alvo de regulação por proteólise de ubiquitina. P21 serve para coordenar a parada do ciclo celular e os mecanismos de reparo do DNA. A atividade da

P21 é controlada pela P53 (no ponto G₁/S) cuja função é de acompanhar o ciclo desencadeando os pontos de verificação; suspendendo a progressão e ativando as vias apoptóticas caso o reparo não seja possível ⁷⁴.

A família INK4/ARF é constituída das proteínas P14^{ARF}, P15^{INK4B}, P16^{INK4A}, P18^{INK4C}, e P19^{INK4D}. A ação destes inibidores restringe-se aos CDK₄ e CDK₆ ^{73, 75, 76}.

Os genes INK-4a e INK-4b localizam-se no braço curto do cromossomo 9 ^{65,75}. Enquanto INK4c foi localizada no cromossomo 1 e a INK4d no cromossomo 19 ⁶⁵.

Sabe-se atualmente que perda de função das INK-4a ocorre em cânceres humanos (melanomas) além de carcinomas pancreáticos.

P14^{ARF} atua através da via da proteína p53 para regular o avanço do ciclo celular ⁷⁵.

P15^{INK4B} relaciona-se com a resposta ao TGF beta. Nas células epiteliais a parada na fase G₁ envolve a indução de P15^{INK4B}.

P16^{INK4A} por sua vez, atua na proteína do retinoblastoma (RB). A P16 inibe as quinases-dependentes-de-ciclina D evitando a formação do complexo com as CDK₄/CDK₆ ⁷⁵.

P18 relaciona-se para mediar os complexos CDK₄ e CDK₆ durante a diferenciação celular ⁶³.

Recentemente um novo inibidor foi descoberto em queratinócitos: o P12^{DOC-1}. Este inibidor foi encontrado no cromossomo 12q24 e liga-se a CDK₂ impedindo sua ligação com a ciclina E, bem como, com a ciclina A. Também suprime a replicação do DNA ligando-se a alfa/prime DNA polimerase ^{77, 66}.

1.4.7 Proteínas do ciclo celular, alteradas no câncer bucal

Alterações no câncer bucal com relação ao ciclo celular podem ocorrer em vários setores desde receptores de superfície celular, sinais de transdução e alterações nos genes que

controlam o crescimento celular. As alterações mais comumente encontradas na literatura sobre câncer de boca e ciclo celular são: perda P16 (69,2% dos casos), P27 (35,9%), P12 (71,8%), P53 (46%); superexpressão da ciclina D1 (39%) e EGFR (39%)^{78, 64}.

1.5 Proteínas relacionadas ao ciclo celular, avaliadas neste estudo

1.5.1 Proteína bcl-2

O gene bcl-2 permite a célula prolongar sua vida e garantir a integridade de processos responsáveis à regulação morfogênética de vários tecidos humanos^{79, 80}.

Bcl-2 localiza-se na membrana mitocondrial, tem o comprimento de 25 Kilodáltons⁸¹, possui uma região hidrofóbica terminal C que atua como uma âncora membranar⁸². Esta localização permite interagir com o processo de fosforilação oxidativa.

A proteína bcl-2 foi detectada originalmente em linfomas foliculares humanos. Fruto da translocação t(14;18) (q32;q21)^{82, 83, 84}. Localiza-se no cromossomo 18q21. Como resultado desta translocação forma-se um segmento de gene fusionado bcl-2/imunoglobulina e o bcl-2 perde sua regulação normal sendo superexpresso⁸⁴.

Bcl-2 superexpresso atua como inibidor da apoptose em vários processos neoplásicos humanos: mamários, prostáticos, neuronais^{83, 85}.

Outros autores sugerem que bcl-2 está envolvido na seleção e manutenção de células na fase G₀ por longos períodos de tempo. Esta manutenção permite que as células escapem da apoptose^{86, 87}.

Na cavidade bucal foi demonstrada a expressão de bcl-2 no epitélio displásico e neoplásico nos graus mais variados de tumorigênese⁸⁸.

1.5.2 Proteína bax

Esta proteína é homóloga a bcl-2 em aproximadamente 21% ⁸⁹ na sua seqüência de aminoácidos e tem como função acelerar a via de morte celular programada ⁹⁰.

O gene bax, em ratos pode codificar três proteínas diferentes: bax alfa (21 kd); bax beta (24kd) e bax gama (5kd) ⁸⁹.

Vários sinais podem ativar as vias de morte celular programada como o TNF, Faz, o receptor 1 para o TNF além de anticorpos específicos. Os receptores ativados transmitem o sinal através das caspases às organelas alvo (núcleo, mitocôndria, retículo endoplasmático) ⁹¹.

As caspases envolvidas na regulação e/ou execução da apoptose são: caspases 2; 3; 6; 7; 8; 9; 10; 12; 13 e 14. Todas compartilham cisteína e esta, por sua vez, é envolvida diretamente na catálise. As caspases são sintetizadas como proenzimas precursoras sendo processadas nas suas formas ativas pela clivagem de seus resíduos de aspartato ⁹².

Para explicar a função da proteína bax e seu antagonismo com a bcl-2 foi proposto o modelo do “reostato” ⁹². Em condições normais ocorre a formação de heterodímeros bcl-2/bax; ao alterar-se este equilíbrio em formação ao homodímero bcl-2/bcl-2 a célula fica protegida da morte celular. Contudo ao predominar o homodímero bax/bax permite a entrada na via de apoptose ⁹².

Supõe-se que a formação de homodímeros bax/bax atue na mitocôndria liberando o citocromo C para o citosol ⁹². Estudos *in vivo* detectaram que ao adicionar-se bax a mitocôndrias isoladas em cultura induz-se a liberação do citocromo C. Este mecanismo é suprimido ao adicionar-se bcl_{XL} ⁹².

1.5.3 Proteína P27^{Kip1}

Esta proteína é pertencente à família Kip ⁷⁷. Foi identificada em complexos associados com a ciclina E/CDK₂ em células retidas pelo TGF beta. Se liga ao complexo ciclina D/CDK₄; ou ciclina A/CDK₂ e inibe suas atividades de cinases. Seu ponto de atuação é a transição G₁/S. Por outro lado, grandes concentrações de P27^{Kip1} em células quiescentes sugerem que esta proteína retém a célula na fase G₀ do ciclo celular e seus níveis caem à medida que o ciclo avança ⁹⁴.

A P27^{Kip1} por sua atuação na parada do ciclo celular é importante na ativação das vias apoptóticas ⁹⁵ impedindo a gênese tumoral. Alterações nesta proteína já foram descritas em tumores gástricos, mamários e colorretais ⁹⁶.

1.5.3.1 Degradação da P27^{Kip1}

A degradação da proteína ocorre através da cascata do sistema ubiquitina-proteassoma. A ligação desta cadeia ao substrato ocorre graças a ação das enzimas E₁, E₂ e E₃. E₁ forma uma ligação tioéster com a ubiquitina em uma reação dependente de ATP. E₂ recebe a molécula de ubiquitina e a transfere à molécula-alvo com a ajuda de E₃ ⁹⁷.

A enzima SCF^{SKP2} originalmente foi identificada como uma proteína interagindo com a ciclina A, sendo atualmente classificada como uma E₃ que se liga a P27^{Kip1} para a ubiquitinação.

Recentemente duas vias de degradação foram identificadas: uma dependente da fosforilação da treonina 187 e outra independente da treonina. A via independente ocorre durante a fase G₁ pela atividade do proteassomo 26S. A via dependente do resíduo de treonina ocorre em G₀, S e G₂. Contudo tais achados ainda são controversos ⁹⁷.

1.5.3.2 Localização citoplasmática da P27^{Kip1}

Com a descoberta da contribuição à resistência dos sinais antiproliferativos graças ao complexo PBK/Akt no câncer de mama chegou-se a uma importante tentativa de explicar como a P27^{Kip1} se acumula no citoplasma.

Akt fosforila P27^{Kip1} em um resíduo de treonina 157 no seu sítio de reconhecimento nuclear impedindo a entrada de P27^{Kip1} no núcleo ⁹⁷ e esta acumulação no citoplasma conduz a um fenótipo mais agressivo de câncer de mama.

Em células normais a região terminal C da P27^{Kip1} contém um sinal de localização nuclear guiando-a ao interior do núcleo. A hKIS é uma proteína nuclear que se liga ao

domínio terminal C, fosforila P27 em serina e conseqüentemente promove a saída do núcleo para o citoplasma⁹⁷.

Como a P27^{kip1} atua entro do núcleo, sua localização citoplasmática provavelmente impede sua atuação. O acúmulo de P27^{kip1} fosforilada em treonina 157 só foi detectado em câncer de mama, inexistindo relatos em câncer de boca.

2 OBJETIVOS

2.1 Objetivo geral

Avaliar a expressão das proteínas bax, bcl-2 e P27 no carcinoma espinocelular invasivo bucal.

2.2 Objetivos específicos

Investigar uma relação entre essas proteínas e o prognóstico do paciente;

Estabelecer, parâmetros estatísticos para os marcadores estudados;

Fazer um estudo de revisão dos fatores prognósticos no câncer bucal;

Revisar o ciclo celular e as proteínas mais alteradas no câncer bucal;

Verificar os principais fatores epidemiológicos e o comprometimento clínico dos pacientes com carcinoma espinocelular bucal na Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza.

3 METODOLOGIA

Foi coletada uma amostra de 53 pacientes no período de abril de 2005 a dezembro de 2006, cujo tratamento foi realizado no Setor de Cirurgia de Cabeça e Pescoço da Santa Casa da Misericórdia de Fortaleza. Sob o protocolo número 277/05 do COMEPE. Contudo foram aproveitadas para este estudo somente 48 indivíduos. As amostras pertencem a pacientes provenientes de várias regiões do Estado do Ceará. Após o exame clínico e anamnese realizados pelo cirurgião de cabeça e pescoço, foi solicitado aos pacientes ou quando estes se mostravam incapacitados, a seus acompanhantes, a assinatura do termo de consentimento informado para em seguida responderem a um questionário. Deste questionário foram retiradas as seguintes informações: sexo, idade, escolaridade, renda familiar com base no salário mínimo (não foi especificada a origem dos proventos), tabagismo (tipo, frequência, quantidade, tempo), etilismo (frequência, quantidade, tempo, tipo). Aplicado o questionário, buscaram-se informações sobre o tumor em si tais como a sua localização, a gradação histológica, seu estadiamento patológico e sua invasividade além da fotocópia do laudo histopatológico da peça cirúrgica. Após a remoção da peça cirúrgica, foram coletadas amostras do tecido neoplásico.

O material foi incluído em parafina, montada uma lâmina em HE para em seguida, ser avaliado por um patologista. Aprovado seguiu para montagem das lâminas para

imunohistoquímica Foram excluídas para este estudo, as regiões dos lábios. O estudo imunohistoquímico foi realizado no LABGEM (laboratório de genética molecular) do Departamento de Patologia e Medicina Legal da Faculdade de Medicina da Universidade Federal do Ceará.

3.1 Critérios de inclusão/exclusão da amostra

3.1.1 Critérios de inclusão

Pacientes virgens de tratamento;

Pacientes com diagnóstico de carcinoma espinocelular bucal;

Pacientes operados em hospital de referência em câncer bucal (Santa Casa da Misericórdia de Fortaleza);

Lesão invasiva;

Pacientes que aceitaram submeterem-se a cirurgia como primeiro tratamento.

3.1.2 Critérios de exclusão

Pacientes com incapacidade mental, silvícolas, presidiários;

Tumores localizados no vermelhão dos lábios.

3.2 Técnica da preparação da lâmina em HE

Os tecidos foram cortados com espessura de cinco micrômetros, desparafinados em xilol, reidratados em concentrações decrescentes de álcool, corados com hematoxilina e eosina, lavados, desidratados em concentrações crescentes de álcool e montados com lamínula para observação em microscopia óptica comum e avaliados por patologista.

3.3 Técnica da imunohistoquímica

3.3.1 Anticorpos e reagentes

Anticorpo monoclonal de camundongo anti-bcl-2 humana clone 124; diluição 1:60 (DAKO Cytomation®, USA).

Anticorpo monoclonal de camundongo anti-p27^{kip1} humana clone SX53G8; diluição 1:50 (DAKO Cytomation®, USA).

Anticorpo policlonal de coelho anti-bax humana; diluição 1:300 (DAKO Cytomation®, USA).

Conjunto para detecção LSAB+ *System*-HRP (DAKO Cytomation®, USA).

Conjunto para revelação DAB+ líquido (DAKO Cytomation®, USA)

Tampão citrato 10mM pH 6,0 (Sigma®, USA).

Tampão citrato 10mM pH 2,0 (Sigma®, USA).

TBS pH 7,6 (50mM Tris-HCl; 150mM NaCl), (Sigma®, USA).

3.3.2 Método de imunohistoquímica

Foi utilizado o método da avidina-biotina-peroxidase, adaptado⁹⁸.

- 1 Passagem das lâminas em estufa pré-aquecida a 70° Celsius por 120 minutos.
- 2 Desparafinação e desidratação em xilol e gradiente decrescente de álcool.
- 3 Hidratação em água corrente por dez minutos.
- 4 Recuperação antigênica em forno de microondas por quinze minutos (aproximadamente 99° C) utilizando tampão citrato pH 6,0 em 10 mM.
- 5 Incubação das lâminas com o anticorpo primário (em diluição previamente padronizada) em geladeira por dezesseis horas a aproximadamente 4°C.
- 6 Detecção com o sistema LSAB+ (DAKO Cytomation®, USA) de acordo com instruções do fabricante.
- 7 Revelação pelo sistema diaminobenzidina (DAB, DAKO Cytomation®, USA) de acordo com as instruções do fabricante.
- 8 Contra-coloração com hematoxilina de Harris a 40%.
- 9 Desidratação em gradiente de álcool.
- 10 Banho em xileno.
- 11 Montagem da lamínula.

Controles positivos foram casos de cânceres previamente positivos para bax, bcl-2 e P27.

Foram considerados controles internos células dos ductos das glândulas salivares e células mononucleares da linhagem linfocítica ao redor da área a ser avaliada.

Foram considerados casos positivos para bax, bcl-2 e P 27 aqueles cujos “cut-off” sejam a partir de 5%.

3.4 Análises empregadas

Para análise estatística dos resultados obtidos foram utilizados os seguintes programas de computador:

Excel XP para tabulação de dados e confecção de gráficos,

SPSS v.10 e EPIINFO v.6 para os cálculos estatísticos.

A análise estatística dos dados epidemiológicos usou métodos descritivos e os testes do qui-quadrado e o exato de Fisher. Escolheu-se o nível de significância a 10%.

A contagem de células necessária para a realização dos cálculos estatísticos foi realizada através de microscopia óptica comum com aumento de 400 vezes. Foram selecionados para a contagem campos aleatórios e representativos do tumor estes campos variaram em quantidade de três a cinco. Um mínimo de mil células foi contado em cada lâmina⁹⁹. Foram também analisadas a intensidade e a distribuição das marcações.

Na análise dos marcadores foi empregado além de métodos descritivos o método do índice de marcação LI e HS cujas fórmulas são mostradas abaixo:

$$LI = (N / 1000) \times 100 \text{ onde;}$$

N= total de células marcadas e contadas;

$$HS = LI \times Y \text{ onde;}$$

Y= intensidade da marcação: (0 não marcado), (1+ fraco), (2+ moderado), (3+ forte)¹⁰⁰.

4 RESULTADOS

4.1 Resultados epidemiológicos

Neste estudo das 48 amostras de pacientes entrevistados e que foram aproveitadas, têm-se 39 amostras de indivíduos do sexo masculino (81,25%) e 9 amostras de indivíduos do sexo feminino (18,75%). A proporção entre homens/mulheres é de aproximadamente 4,33:1. A idade variou de 27 a 87 anos com a média de 59,68 anos. A distribuição por faixa etária encontra-se na **Tabela 1**:

TABELA 1 - Distribuição das faixas etárias de uma amostra de pacientes obtida no Serviço de Cabeça e Pescoço da Santa Casa da Misericórdia de Fortaleza de abril de 2005 a dezembro de 2006.

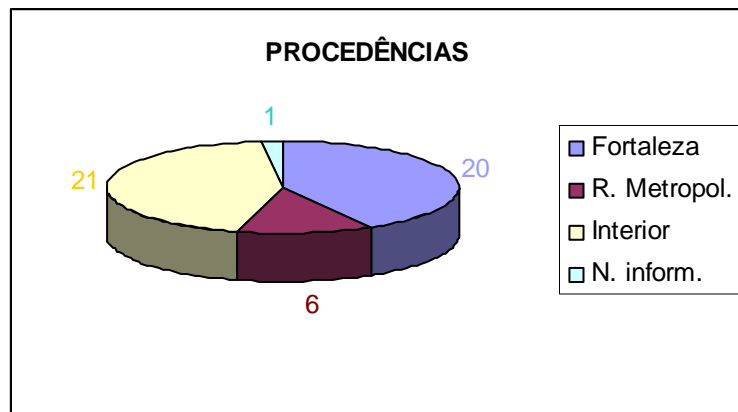
FAIXAS ETÁRIAS	SEXO	
	MASCULINO	FEMININO
<30	1	-
30 —40	1	-
40 —50	7	-
50 —60	16	1
60 —70	9	2
≥70	5	6
TOTAL	39	9

Fonte: Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza (Pesquisa direta)

Média :59,68; Mediana: 58,0; Desvio Padrão: 12,85.

Foi detectado que 27 pacientes provinham da região metropolitana de Fortaleza e 21 do interior do Estado. Esta informação somente não foi obtida em apenas um caso. Estes dados podem ser visto no gráfico a seguir.

Gráfico 1. Distribuição da procedência dos pacientes da amostra obtida no Serviço de Cabeça e Pescoço da Santa Casa da Misericórdia de Fortaleza de abril de 2005 a dezembro de 2006.



Fonte: Santa Casa da Misericórdia (Pesquisa direta)

Com relação à escolaridade houve um valor de 19 pacientes que responderam ter o ensino fundamental incompleto e 23 afirmaram ser analfabetos, conforme **Tabela 2**.

TABELA 2. Distribuição do grau de escolaridade de uma amostra de pacientes obtidas no Serviço de Cabeça e Pescoço da Santa Casa da Misericórdia de Fortaleza de abril de 2005 a dezembro de 2006.

ESCOLARIDADE	QUANTIDADE	PERCENTUAL
Analfabeto	23	47,9
Fundamental incompleto	19	39,6
Fundamental completo	3	6,3
Ensino médio completo	2	4,2
Ensino superior completo	1	2,1
TOTAL	48	100

Fonte: Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza (Pesquisa direta).

É importante salientar que o critério de ensino fundamental completo empregado neste estudo é o exigido pelo Ministério da Educação atualmente, o qual corresponde a todo o antigo primeiro grau.

Quando questionados sobre a renda familiar, houve o predomínio de ganhos variando de 1 a 3 salários-mínimos, totalizando 29 pacientes. Houve omissão desta informação em cerca de 23%, conforme **Tabela 3**.

TABELA 3. Distribuição da renda familiar estimada em salários mínimos dos pacientes de uma amostra obtida no Serviço de Cabeça e Pescoço da Santa Casa da Misericórdia de Fortaleza de abril de 2005 a dezembro de 2006.

RENDA FAMILIAR (S.M.)	ENTREVISTADOS	PERCENT 1	PERCENT 2
1	18	37,5	48,7
2	6	12,5	16,2
3	8	16,7	21,6
4	1	2,1	3,0
5	1	2,1	3,0
6	1	2,1	3,0
Sem renda fixa	2	4,2	6,0
Total válido	37	77,1	100
Não sabe	11	23,0	
TOTAL	48	100	

Fonte: Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza (Pesquisa direta)

Média: 1,86; Mediana: 1,0; Desvio Padrão: 1,31

Ao indagar-se sobre os seus hábitos tabagistas, 47 pacientes responderam consumir tabaco em alguma das formas questionadas, e em algum momento de suas vidas. Somente um afirmou nunca ter fumado.

Outro fator perguntado foi o tempo de consumo de tabaco. Os valores variaram de 10 a 64 anos, com predomínio de 20 anos conforme **Tabela 4**:

TABELA 4. Distribuição de tempo de tabagismo dos indivíduos de uma amostra obtida no Serviço de Cabeça e Pescoço da Santa Casa da Misericórdia de Fortaleza de abril de 2005 a dezembro de 2006.

TEMPO DE TABAGISMO (ANOS)	INDIVÍDUOS	PERCENT 1	PERCENT 2
10 a 19	6	12,5	13,3
20 a 29	17	35,4	38,0
30 a 39	10	21,0	22,2
40 a 49	6	12,5	13,3
50 a 59	2	4,1	4,4
60 a 69	4	8,3	9,0
Total válido	45	94,0	100,0
Não sabe	3	6,3	
TOTAL	48	100,0	

Fonte: Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza (Pesquisa direta)
Média:30,93; Mediana:28,0; Desvio Padrão:14,20

O tempo de abandono do tabagismo, dos 47 pacientes que afirmaram não estar fumando variou de 3 dias a 24 anos, com a média de aproximadamente 18 meses. Os dados podem ser vistos na tabela 5:

TABELA 5. Distribuição de tempo livre de tabagismo de uma amostra de pacientes obtida no Serviço de Cabeça e Pescoço da Santa Casa da Misericórdia de Fortaleza de abril de 2005 a dezembro de 2006.

TEMPO LIVRE DO TABAGISMO (MESES)	NÚMERO DE ENTREVISTADOS	PERCENT 1	PERCENT 2
0— 2	26	54,2	55,3
2— 4	7	14,6	14,9
4— 6	5	10,4	10,6
6— 12	4	8,3	8,5
12— 36	1	2,1	2,1
36— 72	1	2,1	2,1
72— 96	1	2,1	2,1
>120	2	4,2	4,2
Total válido	47	97,9	100,0
Não fumante	1	2,1	
TOTAL	48	100,0	

Fonte: Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza (Pesquisa direta)

Média: 17,87; Mediana: 2,0; Desvio Padrão: 54,43

Sobre o modo de utilização do tabaco, 35 pacientes costumavam usar cigarro com filtro; 20 consumiam cigarro artesanal; 06 faziam uso de cachimbo; 07 mascavam fumo e apenas 01 já tinha feito uso de charuto. Foi observado que muitos pacientes consumiam tabaco em mais de uma das formas perguntadas: cigarro com filtro e cigarro artesanal, 2 pacientes; cigarro artesanal e fumo mascado, 3 indivíduos; cachimbo e fumo mascado, 1 ; cigarro com filtro, cigarro artesanal e fumo mascado, 3 ; cigarro com filtro, cigarro artesanal, fumo mascado, charuto e cachimbo 1 indivíduo.

A quantidade de cigarros fumados diariamente mais informada foi de 20 cigarros diários, as demais quantidades podem ser visualizadas na tabela 6:

TABELA 6. Distribuição da quantidade de cigarros industrializados diários consumidos por uma amostra de pacientes do Serviço de Cabeça e Pescoço da Santa Casa da Misericórdia de Fortaleza de abril de 2005 a dezembro de 2006.

QUANTIDADE DIÁRIA DE CIGARROS INDUSTRIALIZADOS CONSUMIDOS	INDIVÍDUOS	PERCENT 1	PERCENT 2
0,0	4	8,3	8,7
1 a 10	11	23,0	24,0
11 a 20	22	46,0	48,0
21 a 30	2	4,1	4,3
31 a 40	7	14,6	15,2
TOTAL VÁLIDO	46	95,8	100,0
NÃO SABE	1	2,1	
NÃO TABAGISTA	1	2,1	
TOTAL	48	100,0	

Fonte: Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza (Pesquisa direta)
Média: 18,32; Mediana: 20,00; Desvio Padrão: 12,00

O consumo de bebidas alcoólicas também foi indagado na pesquisa. Dos 48 pacientes analisados, 36 afirmaram ingerir algum tipo de bebida alcoólica, variando de 50 a 3900 mililitros, sendo a média informada de ingestão de álcool de 200 mililitros.

Houve preferência por bebidas destiladas, sendo a cachaça a mais consumida (15 pacientes) a fermentadas (4 pacientes); 17 pacientes confirmaram ingerir as duas formas.

Com relação à frequência de ingestão de álcool, não foi possível uma análise mais detalhada porque os pacientes apresentavam-se receosos ao informar este dado. Porém a resposta que mais se repetiu foi fins-de-semana.

O tempo de ingestão alcoólica foi bastante variado, porém com uma média de 22 anos de consumo.

A localização do tumor ocorreu principalmente no soalho bucal, seguido da língua. Em menor quantidade a mucosa jugal. Associando-se duas localizações, encontra-se uma tendência soalho-língua.

Tabela 7. Distribuição segundo a localização do tumor primário de uma amostra de pacientes do Serviço de Cabeça e Pescoço da Santa Casa da Misericórdia de Fortaleza de abril de 2005 a dezembro de 2006.

LOCALIZAÇÃO	QUANTIDADE	PERCENTUAIS
Soalho	25	52,1
Língua	11	22,9
Fundo-de-saco	3	6,3
Palato	3	6,3
Mucosa jugal	2	4,2
Rebordo alveolar	4	8,3
Total	48	100,0

Fonte: Santa Casa da Misericórdia de Fortaleza (Pesquisa direta)

Com relação ao tamanho dos tumores verificou-se a média de 3,5 centímetros, com predomínio de estágio pT2 como pode ser visualizado na **Tabela 8**. Nota-se ainda que 18% dos casos eram de estágio avançado.

Tabela 8. Distribuição do tamanho dos tumores obtido pelo estadiamento patológico de uma amostra de pacientes do Serviço de Cabeça e Pescoço da Santa Casa da Misericórdia de Fortaleza de abril de 2005 a dezembro de 2006.

TAMANHO DO TUMOR	QUANTIDADE	PERCENT 1	PERCENT 2
pT 1 (1,8 a 2,0 cm)	4	8,3	9,5
pT 2 (2,1 a 4,0 cm)	25	52,1	59,5
pT 3 (3,9 a 7,0 cm)	4	8,3	9,5
pT 4a (2,6 a 6,0 cm)	9	18,8	21,4
Total válido	42	87,5	100,0
Não determinado	6	12,5	
TOTAL	48	100,0	

Fonte: Santa Casa da Misericórdia de Fortaleza (Pesquisa direta)

Houve expressivo isolamento de linfonodos nas peças cirúrgicas com a média de 15 linfonodos dissecados. A maioria dos casos foi de ausência de metástase. Em cerca de 17% dos casos não se obteve esta informação.

Tabela 9. Distribuição segundo estadiamento patológico de linfonodos de uma amostra de pacientes do Serviço de Cabeça e Pescoço da Santa Casa da Misericórdia de Fortaleza de abril de 2005 a dezembro de 2006.

LINFONODOS AFETADOS	QUANTIDADE	PERCENT 1	PERCENT 2
pN 0	18	37,5	45,0
pN 1	7	14,6	17,5
pN 2b	12	25	30,0
pN 2c	3	6,3	7,5
Total válido	40	83,3	100,0
Não determinado	8	16,7	
TOTAL	48	100,0	

Fonte: Santa Casa da Misericórdia de Fortaleza (Pesquisa direta).

A gradação histológica dos carcinomas espinocelulares predominante foi a de moderadamente diferenciado, seguidos de carcinomas bem diferenciados, como visto na **Tabela 10**.

Tabela 10. Distribuição segundo as gradações histológicas dos tumores obtidos em uma amostra de pacientes do Serviço de Cabeça e Pescoço da Santa Casa da Misericórdia de Fortaleza de abril de 2005 a dezembro de 2006.

GRADAÇÃO HISTOLÓGICA	QUANTIDADE	PERCENT 1	PERCENT 2
Bem diferenciado	7	14,6	16,3
Moderadamente diferenciado	35	73,0	81,4
Pobrememente diferenciado	1	2,1	2,3
Total válido	43	89,6	100,0
Não determinado	5	10,4	
TOTAL	48	100,0	

Fonte: Santa Casa da Misericórdia de Fortaleza (Pesquisa direta).

Houve correlação significativa entre as idades dos pacientes com o estadiamento patológico tumoral ($p=0,084$), quando se utiliza o nível de significância a 10%. Os resultados são mostrados na **Tabela 11**.

Tabela 11. Correlação entre as faixas etárias e tamanho dos tumores de uma amostra de pacientes do Serviço de Cabeça e Pescoço da Santa Casa de Fortaleza de abril de 2005 a dezembro de 2006.

FAIXAS ETÁRIAS	pT1+pT2	pT3+pT4a	TOTAL
<50	4	5	9
>50	25	8	33
TOTAL VÁLIDO	29	13	41

Fonte: Santa Casa da Misericórdia de Fortaleza (Pesquisa direta)

X^2 Fisher (one tailed) $p=0,084$

No tocante as faixas etárias dos pacientes e o estadiamento patológico dos linfonodos não se verificou significância estatística ($P=0,195$ para $\alpha=10\%$) conforme **Tabela 12**.

Tabela 12. Correlação segundo faixas etárias e o estadiamento patológico dos linfonodos de uma amostra de pacientes do Serviço de Cabeça e Pescoço da Santa Casa de Fortaleza de abril de 2005 a dezembro de 2006.

FAIXAS ETÁRIAS	LINFONODOS AFETADOS	LINFONODOS NÃO AFETADOS	TOTAL
<50	2	6	8
>50	16	16	32
TOTAL VÁLIDO	18	22	40

Fonte: Santa Casa da Misericórdia de Fortaleza (Pesquisa direta)

X^2 Fisher (one-tailed) $p=0,195$

Na **Tabela 13** verifica-se que houve significância estatística entre o tamanho do tumor e o estadiamento patológico de linfonodos ($P=0,085$ para $\alpha=10\%$).

Tabela 13. Correlação entre tamanho dos tumores e o estadiamento patológico de linfonodos de uma amostra de pacientes do Serviço de Cabeça e Pescoço da Santa Casa de Fortaleza de abril de 2005 a dezembro de 2006.

TAMANHO DOS TUMORES	LINFONODOS NÃO AFETADOS	LINFONODOS AFETADOS	TOTAL
pT1+pT2	13	12	25
pT3+pT4a	3	10	13
TOTAL VÁLIDO	16	22	38

Fonte: Santa Casa da Misericórdia de Fortaleza (Pesquisa direta).

X^2 Fisher (one-tailed) $p=0,085$.

A apresentação dos dados na **Tabela 14** referentes ao sexo dos pacientes com os tamanhos dos tumores não mostrou significância estatística ($P= 0,522$ para $\alpha=10\%$).

Tabela 14. Correlação segundo sexo dos pacientes e do tamanho dos tumores de uma amostra de pacientes do Serviço de Cabeça e Pescoço da Santa Casa de Fortaleza de abril de 2005 a dezembro de 2006.

SEXO	pT1+pT2	pT3+pT4a	TOTAL
Masculino	23	11	34
Feminino	6	2	8
TOTAL VÁLIDO	29	13	42

Fonte: Santa Casa da Misericórdia de Fortaleza (Pesquisa direta).

X^2 Fisher (one-tailed) $p=0,522$.

Com relação ao sexo e estadiamento patológico de linfonodos houve significância estatística ($p= 0,030$ para $\alpha=10\%$).

Tabela 15. Correlação entre sexo dos pacientes e estadiamento patológico dos linfonodos regionais de uma amostra de pacientes do Serviço de Cabeça e Pescoço da Santa Casa de Fortaleza de abril de 2005 a dezembro de 2006.

SEXO	LINFONODOS NÃO AFETADOS	LINFONODOS AFETADOS	TOTAL
Masculino	11	20	31
Feminino	7	2	9
Total válido	18	22	40
TOTAL	18	22	48

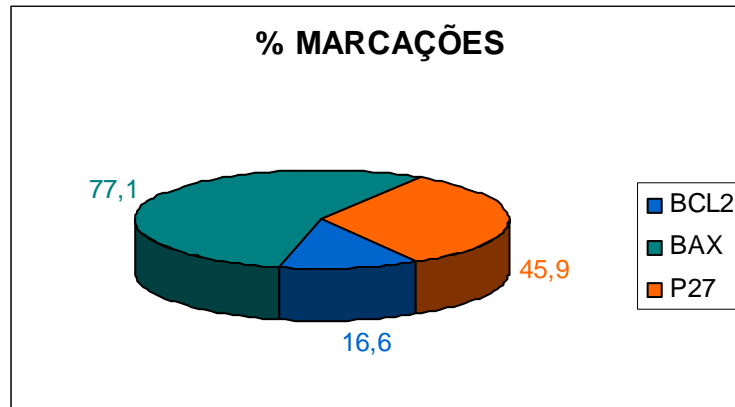
Fonte: Santa Casa da Misericórdia de Fortaleza (Pesquisa direta).
 X^2 Fisher (one-tailed) $p=0,030$.

4.2 Resultados imunohistoquímicos

Os percentuais de marcação em lâminas mostraram diferenças entre as três proteínas avaliadas: bcl2 apresentou 16,6%; bax revelou percentual de 77,1% e P27 com 45,9%.

A distribuição dos percentuais pode ser vista no **gráfico 2**.

Gráfico 2. Distribuição dos percentuais de casos com marcação positiva das proteínas bcl2, bax e P27 de uma amostra de pacientes do serviço de cabeça e pescoço da Santa Casa da Misericórdia de Fortaleza de abril de 2005 a dezembro de 2006.



Avaliando-se a intensidade de marcação tumoral houve ampla maioria de casos com intensidade de marcação moderada nas três proteínas avaliadas: bax apresentou percentual de 75,7%; P27 apresentou 61,2%; bcl-2 devido ao seu baixo percentual de marcação, não teve como ser avaliado.

A marcação positiva de bcl-2 apresentou-se mais intensa nas células mais a periferia das ilhas tumorais e a medida que avançava-se com o microscópio em direção ao centro da ilha a intensidade apresentava-se mais fraca.

A marcação de P 27 (nuclear) não apresentou um local de predominância estando tanto a periferia quanto ao centro das ilhas.

Bax apresentou intensidade mais forte das três proteínas estudadas, e apresentou uma distribuição ampla nas ilhas tumorais indo da periferia até o centro na maioria dos casos ou em uma minoria avaliada, concentrando-se de modo mais forte nas células presentes no centro das ilhas neoplásicas.

Figura 1. CB 22, marcação moderada para bcl2 obtida em uma amostra tumoral de paciente do Serviço de Cabeça e Pescoço da Santa Casa de Fortaleza de abril de 2005 a dezembro de 2006.

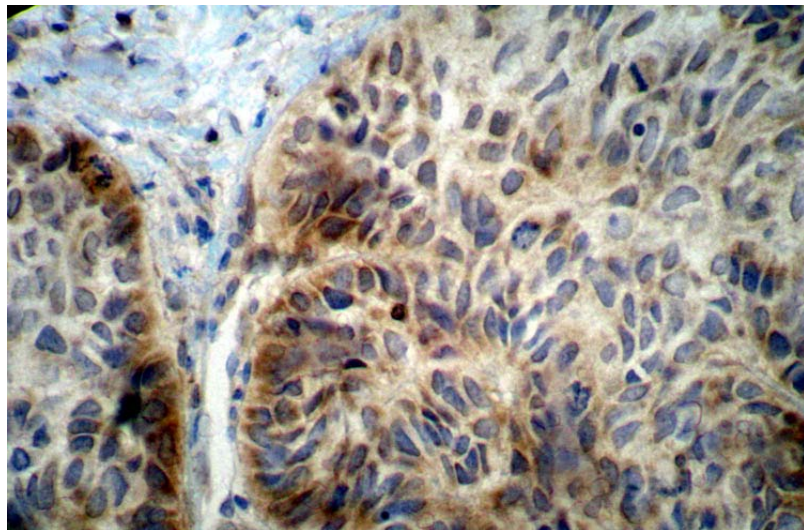


Figura 2. CB 17, marcação moderada para bcl2 obtida em uma amostra tumoral de paciente do Serviço de Cabeça e Pescoço da Santa Casa de Fortaleza de abril de 2005 a dezembro de 2006.

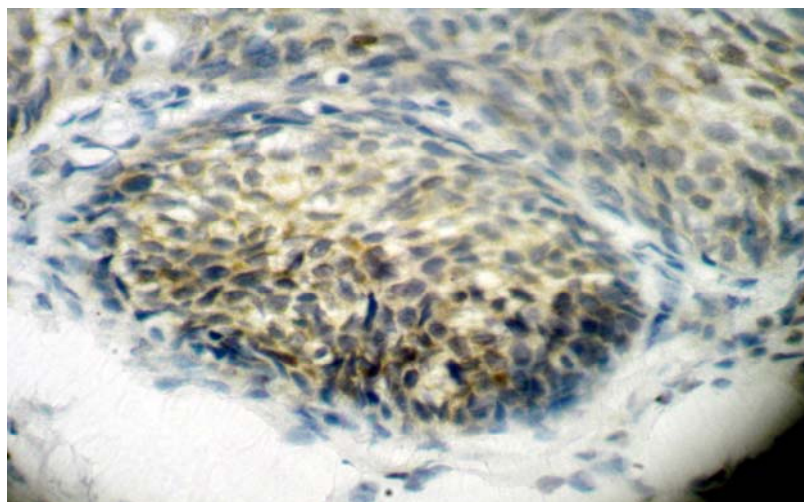


Figura 3. CB 21, marcação forte para P27 obtida em uma amostra tumoral de paciente do Serviço de Cabeça e Pescoço da Santa Casa de Fortaleza de abril de 2005 a dezembro de 2006.

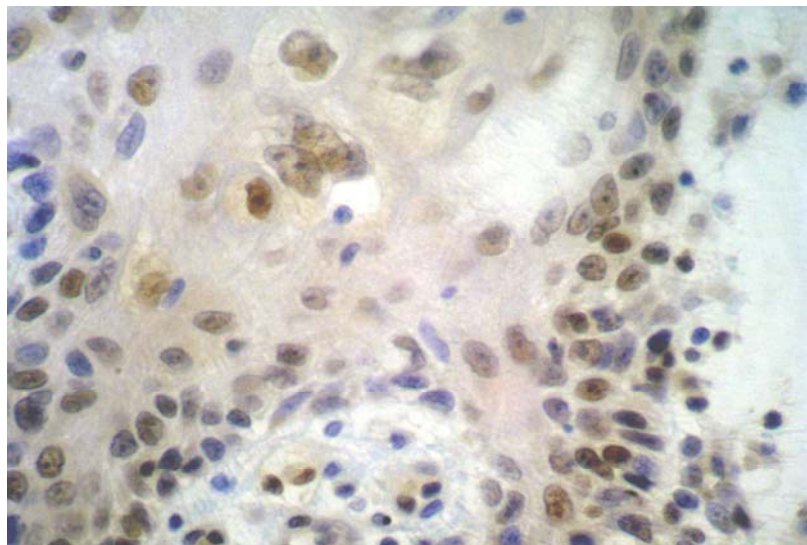


Figura 4. CB 37, marcação moderada para P27 obtida em uma amostra tumoral de paciente do Serviço de Cabeça e Pescoço da Santa Casa de Fortaleza de abril de 2005 a dezembro de 2006.

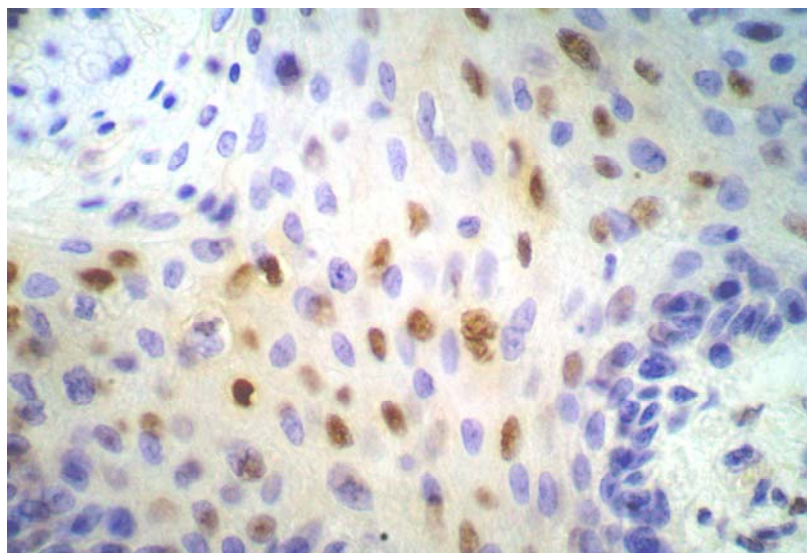


Figura 5. CB 35, marcação forte para bax obtida em uma amostra tumoral de paciente do Serviço de Cabeça e Pescoço da Santa Casa de Fortaleza de abril de 2005 a dezembro de 2006.

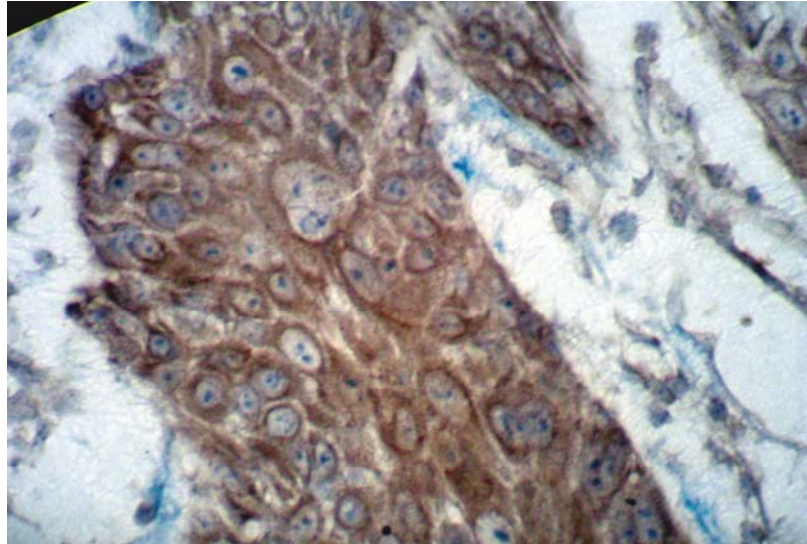
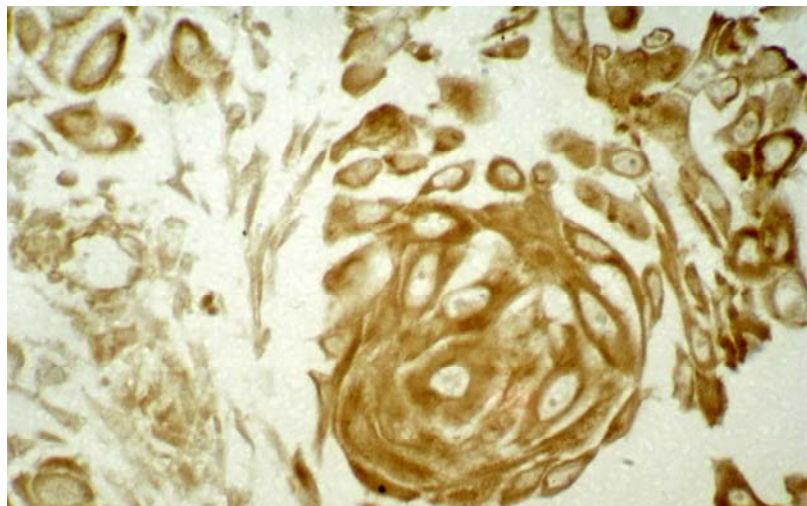
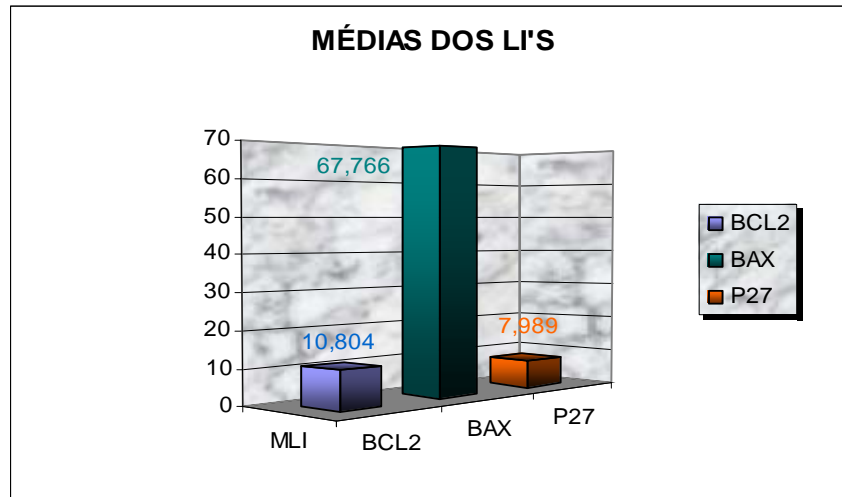


Figura 6. CB 51, marcação moderada para bax resultante de uma amostra tumoral de paciente do Serviço de Cabeça e Pescoço da Santa Casa de Fortaleza de abril de 2005 a dezembro de 2006.



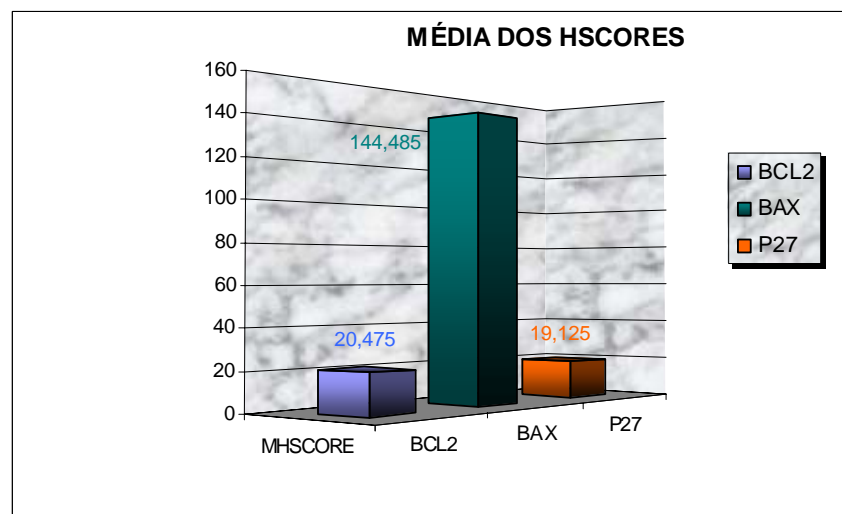
As médias dos índices de marcação (LI) também foram diferentes entre si conforme mostra o **gráfico 3**.

Gráfico 3. Média dos valores dos índices de marcação (LI) de uma amostra de pacientes do Serviço de Cabeça e Pescoço da Santa Casa da Misericórdia de Fortaleza de abril de 2005 a dezembro de 2006.



A média dos HS's permite visualizar também a tendência de apoptose dos tumores analisados. Esta pode ser visualizada no **gráfico 4**.

Gráfico 4. Média dos H Scores (HS) de uma amostra de pacientes do Serviço de Cabeça e Pescoço da Santa Casa da Misericórdia de Fortaleza de abril de 2005 a dezembro de 2006.



Correlacionando-se a localização do tumor com a positividade da marcação tumoral, bcl2 não apresentou uma localização preponderante. Bax entretanto apresentou o soalho bucal com 20 casos (77,09%) seguido da língua com 7 casos (19%). P27, por sua vez apresentou soalho e língua com a mesma quantidade de casos: 8 com um percentual de 36,4% cada.

Ao correlacionarem-se os HS dos marcadores entre si chega-se aos seguintes resultados.

Tabela 16. Correlações entre os HScores dos marcadores bcl2, bax e p27 de uma amostra obtida no Serviço de Cabeça e Pescoço da Santa Casa da Misericórdia de Fortaleza no período de abril de 2005 a dezembro de 2006.

		HSBCL2	HSBAX	HSP27
HSBCL2	Correlação de Pearson	1,00	-0,223	0,095
	Valor Bicaudal	----	0,127	0,519
	N	48	48	48
HSBAX	Correlação de Pearson	-223	1,00	<u>0,245</u>
	Valor Bicaudal	0,127	----	0,093
	N	48	48	48
HSP27	Correlação de Pearson	0,095	0,245	1,00
	Valor Bicaudal	0,519	0,093	----
	N	48	48	48

Na **Tabela 16** constatou-se uma possível falta de correlação entre HSBAX e HSP27.

Ao reunirem-se os dados dos Hscores e do LI dos três marcadores constata-se uma distribuição assimétrica da curva de Gauss. A **Tabela 17** objetiva oferecer parâmetros comparativos entre pesquisas futuras com outros marcadores e outros tumores. Haja vista a dificuldade de análise com odds ratio e valor p.

Tabela 17. Distribuição dos valores estatísticos dos Hscores e LI resultantes da contagem de células de carcinoma espinocelular bucal oriundos de amostra de pacientes da Santa Casa da Misericórdia de Fortaleza.

	HSBCL2	LIBCL2	HSBAX	LIBAX	HSP27	LIP27
N	48	48	48	48	48	48
MÉDIA	20,475	10,804	144,485	69,627	19,066	7,762
ER. PDR. MÉDIA	8,106	3,940	14,326	5,552	6,185	2,162
MEDIANA	0,0	0,0	177,9	88,95	0,0	0,0
MODA	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
D. PADRÃO	56,163	27,299	99,254	38,468	42,855	14,978
INCLINAÇÃO	2,922	2,430	-0,240	-1,311	4,38	3,627
ERR.PADR.INCLINAÇÃO	0,343	0,343	0,343	0,343	0,343	0,343
CURTOSE	7,955	4,424	-1,250	-0,262	23,243	17,297
ERR. PADR. CURTOSE	0,674	0,674	0,674	0,674	0,674	0,674
MÍNIMO	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
MÁXIMO	253,8	94,2	284,1	96,7	264,3	88,1
QUARTIS	25	0,0	0,0	88,2	84,125	0,0
	50	0,0	0,0	177,9	88,95	0,0
	75	0,0	0,0	236,175	92,025	24,75

5 DISCUSSÃO

Dentre os fatores epidemiológicos avaliados, inicia-se a discussão pela idade dos pacientes. A idade média encontrada aqui no Ceará foi de 57 anos com variação de 27 a 87. Esta média etária foi igual à encontrada por outros autores no Rio Grande do Sul ¹⁰¹, próxima a achada em Minas Gerais ¹⁰². Porém em São Paulo ¹⁰³ encontrou-se uma média de 60,7 anos; enquanto no Rio Grande do Norte ¹⁰⁴ foi de 61,9 e em Pernambuco ¹⁰⁵ foi de 61,1 anos. Tais idades foram consideradas em valores absolutos.

O sexo masculino foi o mais acometido pela neoplasia, sendo a relação homem/mulher da ordem de 4,7:1. Tal proporção é semelhante àquela descrita no trabalho do Hospital Santa Maria no Rio Grande do Sul ¹⁰⁶ com 4,9:1.

A procedência dos pacientes revelou uma maior quantidade de Fortaleza e região metropolitana.

O grau de escolaridade em sua maioria foi o de analfabeto, com percentual de 47,9%; o mesmo achado foi descrito em Minas Gerais ¹⁰² com percentual de 44,8%. Com relação ao ensino médio foi da ordem de 4,2% neste trabalho contra 5,8% dos mineiros ¹⁰². Infelizmente outros valores de graus de escolaridade não puderam ser avaliados devido a mudança nos parâmetros do Ministério da Educação e com isto outros artigos publicados não puderam ser utilizados para comparação.

A renda familiar foi outra variável analisada neste estudo. A maioria dos pacientes, 50%, contou usufruir de uma renda familiar mensal de até dois salários-mínimos por mês enquanto 4,2% declararam-se sem renda fixa. Isto pode ser compreendido como consequência da baixa escolaridade mostrando a desigualdade sócio-econômica da população em geral. Não foi encontrado outro trabalho o qual discutisse esta variável.

Com relação aos hábitos dos pacientes, o tabagismo é o fator carcinogênico mais estudado na literatura. Nesta pesquisa quarenta e sete pacientes afirmaram consumir tabaco, seja em forma de cigarros industrializados (o mais frequentemente citado), cigarro artesanal (em segundo lugar) cachimbo, charuto ou fumo de rolo como formas menos citadas.

O cigarro industrializado foi o mais consumido com 87,5% dos entrevistados. Esta forma de cigarro também foi a mais consumida em São Paulo ¹⁰⁷, embora com um percentual menor; 78,28% dos pacientes questionados.

O tempo de consumo de tabaco variou de 10 a 60 anos com média de 22. Na literatura não foram encontrados outros trabalhos para discussão desta variável. Deve-se ainda salientar que não foi objeto de estudo deste trabalho conhecer cada forma de uso de tabaco isoladamente em cada espaço de tempo.

O tempo livre de tabagismo variou de zero a 288 meses no momento da aplicação do questionário epidemiológico. Chamaram a atenção os dois maiores valores (228 e 288 meses) no momento da entrevista. Isto se deve a uma possível ação residual mesmo após dez anos sem a sua utilização. Infelizmente outros trabalhos não avaliam o tempo sem o consumo de tabaco.

Prolongando esta discussão nos hábitos dos pacientes chega-se ao etilismo. Neste trabalho houve um percentual de 75% de pacientes que afirmaram ingerir bebida alcoólica, valor este superior ao relatado na publicação de Minas Gerais ¹⁰² com 48,1%; no Rio Grande do Sul ¹⁰⁶ com 47,58%; e em São Paulo ¹⁰⁷ com 64,75%.

Quando se indagou sobre a quantidade de bebida alcoólica ingerida chegou-se a resultados bastante variados indo de 50 a 3900 mililitros. Deve-se deixar claro que esta quantidade se refere ao total de bebida ingerida e não somente a fração de etanol presente. Novamente não foram localizados artigos com esta análise para comparação com este.

A frequência de ingestão de alcoólica foi também indagada nesta pesquisa; mas os resultados foram confusos porque os pacientes tinham receio de responder a este questionamento. Provavelmente devido ao fato de, ao responderem a esta indagação, estarem indiretamente assumindo um hábito até de uma certa forma é mais reprovado pela sociedade

que o tabagismo. Contudo a resposta mais citada foi fim-de-semana. Não foram encontradas outras publicações com esta análise.

A predileção por bebidas destiladas em relação às fermentadas foi ao encontro da publicação mineira ¹⁰² com 81,9% ; percentual este superior ao detectado por este estudo 31,25%. Dentre os destilados a cachaça foi a bebida de primeira escolha e dentre os fermentados a predileção foi pela cerveja.

Iniciando a discussão dos fatores relacionados a massa neoplásica em si, a primeira variável é a localização do tumor primário. Nesta dissertação foi encontrado o soalho bucal em primeiro lugar com um percentual de 52,1%. Localização esta diferente do relatado em um estudo da Paraíba ¹⁰⁸ onde a língua situou-se em primeiro lugar com 24,9%; já em São Paulo em um estudo com idosos ¹⁰⁹ a língua também foi relatada em primeiro lugar com 41%. Outro estudo do Rio Grande do Sul ¹¹⁰ relatou a gengiva como sítio primário de maior quantidade de casos 25,23%. Em outro estudo paulista ¹¹¹ o lábio foi o local de maior quantidade.

O tamanho do tumor primário mais encontrado foi o de três centímetros no seu maior diâmetro pertencendo portanto ao estadiamento pT2 com 52,1% dos casos. Diferente do relatado em São Paulo ¹⁰³ onde este estadiamento correspondia a apenas 20,51% dos casos. Tamanho este (três centímetros) relativamente pequeno se comparado com a maioria da literatura. Logo de bom prognóstico para o paciente, porém não é possível avaliar este prognóstico em tão curto espaço de tempo de um curso de mestrado.

A quantidade de linfonodos avaliados permitiu estabelecer o estadiamento pN0 na maior quantidade dos pacientes com 37,5%. Este predomínio também foi encontrado na mulher paulista ¹⁰³ com 50,51% dos casos.

Ao analisar-se a gradação histológica foi encontrado o grau de moderadamente diferenciado em 81,39% dos tumores. Percentual diferente do descrito em Sergipe ¹¹² onde o grau histológico bem diferenciado foi maioria com 66,9%.

A relação entre o sexo dos pacientes e o tamanho do tumor também não mostrou significância estatística ($p=0,522$). Isto, pode ser explicado, pelo fato da incidência do tumor (na maioria dos casos) levar em conta os hábitos e não uma possível herança genética.

A relação entre faixa etária e o envolvimento dos linfonodos regionais embora não seja estatisticamente significativa mostrou uma tendência de haver linfonodos metastáticos nas faixas etárias mais elevadas.

Correlacionando-se o tamanho dos tumores com o envolvimento dos linfonodos regionais foi verificado que os pacientes com maiores tumores tendem a apresentar maior número de linfonodos metastatizados.

Partindo para a discussão sobre a imunohistoquímica inicia-se com os percentuais de marcação positiva:

O percentual de casos marcados foi baixo para bcl-2 com 16,6%. Este resultado foi superior aquele encontrado na Espanha ¹¹³ que foi de 8,6%.

O resultado da marcação tumoral em bax foi da ordem de 77,1%; superior ao encontrado na Espanha ¹¹³ que foi de 37,1% .

O valor verificado para P27 foi da ordem de 45,9% mas não foi possível uma comparação devido à ausência de artigos que quantificassem esta variável além da intensidade de marcação.

A correlação entre a localização tumoral e a expressão das proteínas de um modo geral repetiu a tendência soalho-língua. A explicação para este fato decorre da maior exposição destas regiões aos carcinógenos.

Os resultados das reações de imunohistoquímica apontaram uma tendência a apoptose nos tumores avaliados; os resultados dos LI e HS mostram a fraca tendência à

sobrevida dos tumores; em média 10,804%; e 20,475 para bcl-2 enquanto bax obteve 67,766 % e 144,485 respectivamente. Resultados estes mostrando de forma clara a forte tendência a apoptose dos carcinomas espinocelulares bucais analisados. Esta discrepância a favor de bax deslocou a curva de Gauss para assimetria pois os marcadores em questão são fenômenos antagônicos entre si.

O cruzamento entre os HS demonstrou correlação de Pearson muito próxima de zero entre HSBAX e HSP27. Isto pode ser entendido como uma falta de interação direta entre bax e P27. Porque a atuação de bax não se deve de modo direto a atuação de P27 no ciclo celular e outros inibidores podem também atuar ativando as vias de morte celular programada. As demais variáveis estatísticas mostram uma tendência a uma distribuição assimétrica da curva de Gauss, principalmente os quartis.

6 CONCLUSÕES

O carcinoma espinocelular bucal situou-se, em maior quantidade na faixa de 50 a 60 anos e em maior número em indivíduos do sexo masculino;

O grau de escolaridade na sua maioria foi de analfabetos;

A renda em sua maioria foi de 1 salário mínimo;

A forma de tabagismo preponderante foi o cigarro industrializado (20 unidades diárias) e o tempo de tabagismo em sua maioria foi 20 anos;

O consumo de destilados foi encontrado em maior quantidade, e o tempo de ingestão mais informado foi de 20 anos;

O soalho bucal foi a localização de maior incidência;

O tamanho de tumor em média foi de 3,5cm, sendo o tamanho predominante 3,0 centímetros;

O estadiamento patológico tumoral predominante foi pT2;

Os carcinomas espinocelulares apresentaram na sua maioria gradação histológica de moderadamente diferenciados;

O estadiamento patológico dos linfonodos resultou em maior quantidade, no estadiamento pN0;

Houve correlação entre tamanho do tumor e presença de metástase;

A variável sexo não influenciou no tamanho do tumor;

Pacientes mais idosos tendem a apresentar maiores neoplasias;

Das três proteínas avaliadas, bax apresentou maior percentual de marcação, seguida de P27 e em menor quantidade bcl-2; contudo os valores de HS apontaram um maior percentual de bax, bcl-2 e P27 nesta ordem;

O sítio anatômico que mais apresentou marcações foi o soalho;

Os tumores bucais avaliados apresentam tendência a apoptose, o que é bom para o prognóstico do paciente. Mas é necessário lembrar que o prognóstico envolve a interação de diversos outros parâmetros.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 Lee, H.J. Guo, H.Y. Lee, S.K. Jeon, B.H. Jun, C.D. Lee, S.K. Et al. Effects of nicotine on proliferation, cell cycle, and differentiation in immortalized and malignant oral keratinocytes. **J Oral Pathol Med** ,v.34, p.436-443,2005.
- 2 Sudbø, J. Novel management of oral cancer: a paradigm of predictive oncology. **Clinical Medicine and Research** , v. 2, n. 4, p. 233-242, 2004
- 3 Nicotera, G. Gnisci, F. Bianco, A. Angelillo, I.F. Dental hygienistis and oral cancer prevention: knowledge, attitudes and behaviors in Italy. **Oral Oncology**, v. 40, p. 638-644, 2004.
- 4 Jane, C. Nerurkar, A.V. Shirsat, N.V. Deshpande, R.B. Amrapurkar, A.D. Karjodkar, F.R. Increased survivin expression in high-grade oral squamous cell carcinoma: a study in Indian tobacco chewers. **J Oral Pathol Med**,v. 35, p. 595-601, 2006
- 5 Hsu, S. Singh, B. Schuster, G. Induction of apoptosis I oral cancer cells: agents and mechanisms for potential therapy and prevention. **Oral Oncology**, v. 40, p. 461-473, 2004.
- 6 American Cancer Society. **Detailed guide Oral Cavity and Oropharyngeal Cancer. What are the key statistics about oral cavity and Oropharyngeal Cancer?** Disponível em <http://www.americancancersociety.org>. Acessado em 20 de outubro de 2007.
- 7 Instituto Nacional do Câncer. **Estimativa 2006: incidência de câncer no Brasil**.Rio de Janeiro 2005.INCA Disponível em <http://www.inca.gov.br>. Acessado em 27 de setembro de 2006.
- 8 SECRETARIA DE SAÚDE DO ESTADO DO CEARÁ. Registro de Câncer de Base Populacional. **Distribuição dos casos de câncer, segundo a localização primária e tipo histológico-Fortaleza-área de cobertura, 1990-1999**. Fortaleza, 2007. 4p.
- 9 HOSPITAL DO CÂNCER- INSTITUTO DO CÂNCER DO CEARÁ. Registro de Câncer de Base Hospitalar. Distribuição dos casos de câncer, segundo a localização primária, tipo histológico, 2000-2006. Fortaleza, 2007. 6p.
- 10 Silverman Jr, S. **Oral cancer**. fourth edition. Canada. BC Decker. 1998. p 7-8, 20-21.
- 11 Sham, A.S.K. Cheung, L.K. Jin, I.J. Corbet, E.F. The effects of tobacco use on oral health. **Hong Kong Med J**, v. 9, n. 4, p. 271-277, 2003.

- 12 Ruiz, E.F. Peláez, M.A.C. Lapidra, R.C.C. Gómez, G.E. López, L.A.M. Efectos del consumo de alcohol etílico em la cavidad oral:relación com el câncer oral. **Med Oral**, v. 9, n. 14-23, 2004.
- 13 Ildstad, S.T. Bigelow, M.E. Remensnyder, J.P. Squamous cell carcinoma of the alveolar ridge and palate. A 15 year survey. **Ann Surg** , v.199, n.4, p.445-453, 1984.
- 14 Hao, S.P. Tsang, N.M. Chang, K.P. Chen, C.K. Huang, S.S. Treatment of squamous cell carcinoma of the retromolar trigone. **The Laryngoscope**, v.116, p.916-920, 2006.
- 15 Lam, L. Logan, R.M. Luke, C. Epidemiological analysis of tongue cancer in south austrália for the 24-year period, 1977-2001. **Australian Dental Journal**, v.51, n.1, p.16-22, 2006.
- 16 Garzino-Demo, P. Dell'Acqua, A. Dalmaso, P. Fasolis, M. La Terra Maggiore, G.M. Ramieri, G. Berrone, S. et al. Clinicopathological parameters and outcome of 245 patients operated for oral squamous cell carcinoma. **Journal of Cranio-Maxillofacial Surgery**, v.34, p.344-350, 2006.
- 17 Woolgar, J.A. Histopathological prognosticators in oral and oropharygeal squamous cell carcinoma. **Oral Oncology** , v. 42, p. 229-239,2006.
- 18 Ildstad, S.T. Bigelow, M.E. Remensnyder, J.P. Intra-oral cancer at massachutetts general hospital. **Ann Surg** 1983, January, p.34-41,1983.
- 19 Moore, C. Flynn, M.B. Greenberg, R.A. Evaluation of size in prognosis of oral cancer. **Cancer**, July 1, p.158-162, 1986.
- 20 Kane, S.V. Gupta, M. Kakade, A.C. Cruz, A.D. Depth of invasion is the most significant histological predictor of subclinical cervical lymph node metastasis in early squamous carcinomas of the oral cavity. **EJSO**, v.32, p. 795-803,2006.
- 21 Massano, J. Regateiro, F.S. Januário, G. Ferreira, A. Oral squamous cell carcinoma: review of prognostic and predictive factors. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.102, p. 67-76, 2006.
- 22 Kurokawa, H. Zhang, M. Matsumoto, S. Yamashita, Y. Tomoyose, T. Tanaka, T. et al. The high prognostic value of the histologic grade at the deep invasive front of tongue squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med**, v.34, p.329-333, 2005.
- 23 Anneroth, G. Hansen, L.S. Silverman jr, S. Malignancy grading in oral squamous cell carcinoma I. squamous cell carcinoma of the tongue and floor of mouth: histologic grading in the clinical evaluation. **J Oral Pathol**, v. 15, p.162-68, 1986.
- 24 Bryne, M. Nielsen, K. Koppang, H.S. Dabelsteen, E. Reproducibility of two malignancy grading systems with reportedly prognostic value for oral cancer patients. **J Oral Pathol Med**, v.20, p.369-372, 1991.

- 25 Hemmer, J. Kreidler, J. Flow cytometric DNA ploidy analysis of squamous cell carcinomas of the oral cavity: comparison with clinical staging and histologic grading. **Cancer**, v. 15, p.317-320, July. 1990.
- 26 Odell, E.W. Jani, P. Ahluwalia, S.M. Levison, D.A. The prognostic value of individual histologic grading parameters in small lingual squamous cell carcinomas. The importance of the pattern of invasion. **Cancer** , v. 74, n. 3, p. 789-794, 1994.
- 27 Bell, R.B. Kademani, D. Homer, L Dierks, E.J. Potter, B.E. Tongue cancer: is there a difference in survival compared with other subsites in the oral cavity? **J Oral Maxillofac Surg**, v.65, p.229-236, 2007.
- 28 Givens jr, C.D. Johns, M.E. Cantrell, R.W. Carcinoma of the tonsil. Analysis of 162 cases. **Arch Otolaryngol**, v. 107, p. 730-34, 1981.
- 29 Grandi, C. Alloisio, M. Moglia, D. Podrecca, S. Sala, L. Salvatori, P. et al. Prognostic significance of lymphatic spread in head and neck carcinomas: therapeutic implications. **Head and Neck Surgery**, v. 8, p.67-73, 1985.
- 30 Myers, J.N. Greenberg, J.S. Mo, V. Roberts, D. Extracapsular spread. A significant predictor of treatment failure in patients with squamous cell carcinoma of the tongue. **Cancer**, v. 92, p.3030-3036, 2001.
- 31 Greenberg, J.S. Fowler, R. Gomez, J. Mo. V. Roberts, D. El Naggar, A.K. et al. Extent of extracapsular spread. A critical prognosticator in oral tongue cancer. **Cancer**, v. 97, n. 6, p. 1464-1470, 2006.
- 32 Stein, A.L. Tahan, S.R. Histologic correlates of metastasis in primary invasive squamous cell carcinomas of the lip. **Journal Cutan Pathol**, v. 21, p. 16-21, 1994.
- 33 AJCC. **Cancer standing handbook**. Springer 2002; 35-46.
- 34 Iro, H. Waldfahrer, F. Evaluation of the newly updated TNM classification of head and neck carcinoma with data from 3247 patients. **Cancer**, v. 83, n. 10, p. 2201-2207, 1998.
- 35 Mills, S.E. Gaffey, M.J. Frierson Jr, H.F. **Conventional squamous cell carcinoma**. Armed Forces Institute of Pathology. Atlas of pathology. Tumors of the upper aerodigestive tract and ear. Third series. Washington, DC; 2000. p.54-55.
- 36 Garavello, W. Ciardo, A. Spreafico, R. Gaini, R.M. Risk factors for distant metastases in head and neck squamous cell carcinoma. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 132, p. 762-766, 2006.
- 37 Fundação Oncocentro. **Boletim do registro hospitalar de câncer**. Ano 2 boletim 11 setembro 2002. [Site na Internet]. Disponível em <http://www.fosp.saude.sp.gov.br/docs/boletins/rhc11.pdf>. Acessado em 20 de novembro de 2006.

- 38 Dorta, R.G. Landman, G. Kowalski, L.P. Lauris, J.R.P. Latorre, M.R.D.O. Oliveira, D.T. Tumor-associated tissue eosinophilia as a prognostic factor in oral squamous cell carcinomas. **Histopathology**, v. 41, p. 152-157, 2002.
- 39 Brueniger, H. Schaumburg-Lever, G. Holzschuh, J. Horny, H.P. Desmoplastic squamous cell carcinoma of skin and vermilion surface. **Cancer**, v. 79, n. 5, p. 915-919, 1997.
- 40 Tylor, M. Wingren, S. Olofsson, J. Heterogeneity of squamous cell carcinomas of the oral cavity studied by flow cytometry. **Pathol Res Pract**, v. 187, p. 30-35, 1991.
- 41 Hemmer, J. Kreidler, J. Flow cytometric DNA ploidy analysis of squamous cell carcinoma of the oral cavity: comparison with clinical staging and histologic grading. **Cancer**, v. 66, p. 317-320, 1990.
- 42 Pektas, Z.Ö. Keskin, A. Günhan, Ö. Karslioglu, Y. Evaluation of nuclear morphometry and DNA ploidy status for detection of malignant and premalignant oral lesions: quantitative cytologic assessment and review of methods for cytomorphometric measurements. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 64, p. 628-635, 2006.
- 43 Bryne, M. Thrane, P.S. Dabelsteen, E. Loss of expression of blood group antigen H is associated with cellular invasion and spread of oral squamous cell carcinomas. **Cancer**, v. 67, p. 613-618, 1991.
- 44 Bryne, M. Koppang, H.S. Lilleng, R. Kjaerheim, A. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. **Journal Pathol**, v. 166, p. 375-381, 1992.
- 45 Jane, C. Nerurkar, A.V. Shirsat, N.V. Deshpande, R.B. Amrapurkar, A.D. Karjodkar, F.R. Increased surviving expression in high-grade oral squamous cell carcinoma: a study in Indian tobacco chewers. **J Oral Pathol Med**, v. 35, p. 595-601, 2006.
- 46 Novellino, A.T.N. de Amorim, R.F.B. Queiroz, L.M.G. Freitas, R. de A.F. Análise da imunoexpressão do PCNA e p53 em carcinoma de células escamosas oral: correlação com a gradação histológica de malignidade e características clínicas. **Acta Cirur Bras**, v. 18, n. 5, p. 458-464, 2003.
- 47 Vora, H.H. Trivedi, T.I. Shukla, S.N. Shah, N.G. Goswami, J.V. Shah, P.M. P53 expression in leukoplakia and carcinoma of the tongue. **Int J Biol Markers**, v. 21, n. 2, p. 74-80, 2006.
- 48 Kumar, V. Abbas, A.K. Fausto, N. **Neoplasia**. Em Elsevier editora. Robins e Cotran Patologia- bases patológicas das doenças. 7ª ed. São Paulo: Elsevier; 2005. p.304-315.
- 49 Satyan, K.M. Sailasree, R. Jayasurya, R. Lakshminarayanan, K. Abraham, T. Nalinakumari, K.R. et al. Carcinoma of the tongue and the buccal mucosa represent different biological subentities of the oral carcinoma. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 132, n. 9, p. 601-609, 2006.

- 50 Parise jr, O. Carvalho, L.V. Miguel, R.E.V. Kowalski, L.P. Prognostic impact of p53, c-erB-2 and epidermal growth factor receptor on head and neck carcinoma. **São Paulo Medical Journal**, v. 122, n. 6, p. 264-268, 2004.
- 51 De-Paula, A.M.B. Cardoso, S.V. Gómez, R.S. Imunolocalização das proteínas dos genes supressores p53 e p16 CDKN2 no *front* invasivo do carcinoma epidermóide da cavidade bucal. **J Bras Patol Med Labol**, v. 42, n. 4, p. 285-291, 2006.
- 52 Hunter, K.D. Thurlow, J.K. Fleming, J. Drake, P.J. Vass, J.K. Kalna, G. et al . Divergent routes to oral cancer. **Cancer Res**, v. 66, n. 15, p. 7405-7413, 2006.
- 53 Yuen, P.W. Chow, V. Choy, J. Lam, K.Y. Ho, W.K. Wei, W.I. The clinicopathologic significance of p53 and p21 expression in the surgical management of lingual squamous cell carcinoma. **Anathomic Pathology**, v. 116, p. 240-245, 2001.
- 54 Bettendorf, O. Piffkò, J. Bànkfalvi, A. Prognostic and predictive factors in oral squamous cell cancer: important tools for planning individual therapy? **Oral Oncol**, v. 40, p.110-119, 2004.
- 55 Scully, C. Field, J.K. Tanzawa, H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 3: clinico-pathological applications. **Oral Oncol**, v. 36, p. 404-413, 2000.
- 56 Wada, S. Yue, L. Furuta, I. Prognostic significance of p34^{CDC2} expression in tongue squamous cell carcinoma. **Oral Oncol**, v. 40, p. 164-169, 2004.
- 57 Singh, B. Stoffel, A. Gogineti, S. Poluri, A. Pfister, D.G. Shaha, A.R. et al. Amplification of the 3q26.3 locus is associated with progression to invasive cancer and is a negative prognostic factor in head and neck squamous cell carcinomas. **American J Pathol**, v. 161, p. 365-371, 2002.
- 58 Malumbres, M. Barbacid, M. To cycle or not to cycle: a critical decision in cancer. **Nature**, December , n. 1, p. 222-231, 2001.
- 59 Cross, M. Dexter, T.M. Growth factors in development, transformation, and tumorigenesis. **Cell**, v. 64, p. 271-280, 1991.
- 60 Pardee, A. G₁ events and regulation of cell proliferation. **Science**, v. 246, p. 603-608, 1989.
- 61 Planas-Silva, M.D. Weinberg, R.A. The restriction point and control of cell proliferation. **Curr Opinion in Cell Biology**, v. 9, p. 768-772, 1997.
- 62 Pardee, A.B. A restriction point for control of normal cell proliferation. **Proc Nat Acad Sci**, v. 71, n. 4, p.1286-1290, 1974.

- 63 Sandhu, C. Slingerrland, J. Deregulation of cell cycle in cancer. **Cancer Detection and Prevention**, v. 24, n. 2, p. 107-118, 2000.
- 64 Morgan, D.O. Principles of cdk regulation. **Nature**, v. 374, p. 131-134, 1995.
- 65 Sheer, C.J. The pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. **Cancer Research**, v. 60, p. 3689-3695, 2000.
- 66 Todd, R. Hinds, P.W. Munger, K. Rustgi, A.K. Opitz, O.G. Suliman, Y. et al. Cell cycle disregulation in oral cancer. **Crit Rev Oral Biol Med**, v.13, n. 1, p. 51-61, 2002.
- 67 Laskey, R.A. Fairman, M.P. Blow, J.J. S fase of the cell cycle. **Science**, v. 246, p. 609-614, 1989.
- 68 Crews, C.M. Mohan, R. Small-molecule inhibitors of the cell cycle. **Curr Opin in Chem Biol**, v. 4 p. 47-53, 2000.
- 69 Murray, A.W. Creative blocks: cell cycle checkpoints and feedback controls. **Nature**, v. 359, p. 599-604, 1992.
- 70 Mcintosh, J.R. Koonce, M.P. Mitosis. **Science**, v. 246, p.622-628, 1989.
- 71 Hartwell, L.H. Weinert, T.A. Checkpoints: controls that ensure the order of cell cycle events. **Science**, v. 246, p. 629-634, 1989.
- 72 Tong, W. Pollard, J.W. Genetic evidence for the interactions of cyclin d1 and p27^{kip1} in mice. **Moll Cell Biol**, v.21, n. 4, p. 1319-1328, 2001.
- 73 Blain, S.W. Montalvo, E. Massagué, J. Differential interaction of the cyclin-dependent kinase (cdk) inhibitor p27^{kip1} with cyclin a-cdk2 and cyclin d2-cdk4. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 272, n. 41, p. 25863-25872, 1997.
- 74 Neves, A.C. Mesquita, R.A. Novelli, M.D. Toddai, E. de Sousa, S.O.M. Comparison between immunohistochemical expression of cyclin d1 and p21 and histological malignancy graduation of oral squamous cell carcinomas. **Braz Dent J** v. 15, n. 2, p. 93-98, 2004.
- 75 Kwong, R.A. Kalish, L.H. Nguyen, T.V. Kench, J.G. Bova, R.J. Cole, I.E. et al. P14arf protein is a predictor of both relapse and survival in squamous cell carcinoma of the anterior tongue. **Clin Cancer Res**, v.11, n. 11, p. 4107-4116, 2005.
- 76 Kresty, L.A. Mallery, S.R. Knobloch, T.J. Song, H. Lloyd, M. Casto, B.C. et al. Alterations of p16ink4a and p14arf in patients with severe oral epithelial dysplasia. **Cancer Research**, v. 62, p. 5295-5300, 2002.

- 77 Shintani, S. Mihara, M. Nakahara, Y. Kiyota, A. Ueyama, Y. Matsumura, T. et al. Expression of cell cycle control proteins in normal epithelium, premalignant and malignant lesions of oral cavity. **Oral Oncology**, v. 38, p. 235-243, 2002.
- 78 Shiraki, M. Odajima, T. Ikeda, T. Sasaki, A. Satoh, M. Yamaguchi, A. et al. Combined expression of p53, cyclin D1 and epidermal growth factor receptor improves estimation of prognosis in curatively resected oral cancer. **Modern Pathol**, v. 18, p. 1482-1489, 2005.
- 79 Chan, W.K. Mole, M.M. Levison, D.A. Ball, R.Y. Lu, Q.L. Patel, K. et al. Nuclear and cytoplasmic *bcl-2* expression in endometrial hyperplasia and adenocarcinoma. **Journal of Pathology**, v. 177, p.241-246, 1995.
- 80 Lipponen, P. Pietiläinen, T. Kosma, V.M. Aaltomaa, S. Eskelinen, M. Syrjänen, K. Apoptosis suppressing protein *bcl-2* is expressed in well-differentiated breast carcinomas with favourable prognosis. **Journal of Pathology**, v. 177, p. 49-55, 1995.
- 81 Ohbu, M. Saegusa, M. Kobayashi, N. Tsukamoto, H. Mieno, H. Kakita, A. et al. Expression of *bcl-2* protein in esophageal squamous cell carcinomas and its association with lymph node metastasis. **Cancer**, v. 79, n. 7, p. 1287-1293, 1997.
- 82 Korsmeyer, S.T. *Bcl-2* initiates a new category of oncogenes: regulators of cell death. **Blood**, v. 80, n. 4, p. 879-886, 1992.
- 83 Ben-Ezra, J.M. Kornstein, M.J. Grimes, M.M. Krystal, G. Small cell carcinomas of the lung express the *bcl-2* protein. **American J Pathol**, v. 145, n. 5, p. 1036-1040, 1994.
- 84 Salo, A. Servomaa, K. Kiuru, A. Pulkkinen, J. Grénman, R. Heino, K.P. et al. The *bcl-2* gene status of human head and neck cancer cell lines. **Acta Otolaryngol**, n. 529, p. 233-236, 1997.
- 85 Harada, H. Mitsuyasu, T. Seta, Y. Maruoka, Y. Toyoshima, K. Yasumoto, S. Overexpression of *bcl-2* protein inhibits terminal differentiation of oral keratinocytes *in vitro*. **J Oral Pathol Med**, v. 27, p. 11-17, 1998.
- 86 Lipponen, P.K. Aaltomaa, S. Eskelinen, M. Expression of the apoptosis suppressing *bcl-2* protein in transitional cell bladder tumors. **Histopathology**, v. 28, p. 135-140, 1996.
- 87 Hockenbery, D.M. Zutter, M. Hickey, W. Nahm, M. *Bcl-2* protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. **Proc. Natl. Acad. Sci**, v. 88, p. 6961-6965, 1991.
- 88 Singh, B.B. Chandler jr, F.W. Whitaker, S.B. Nelson, A.E.F. Immunohistochemical evaluation of *bcl-2* oncoprotein in oral dysplasia and carcinoma. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol & Endodontics**, v. 85, n. 6, p. 692-698, 1998.

- 89 Krajewski, S. Krajewska, M. Shabaik, A. Miyashita, T. Wang, H.G. Reed, J.C. Immunohistochemical determination of *in vivo* distribution of bax, a dominant inhibitor of bcl2. **Am J Pathol**, v. 145, n. 6, p. 1323-1336, 1994.
- 90 Ito, T. Fujieda, S. Tsuzuki, H. Sunaga, H. Fan, G.K. Sugimoto, C. et al. Decreased expression of bax is correlated with poor prognosis in oral and oropharyngeal carcinoma. **Cancer Letters**, v. 140, p. 81-91, 1999.
- 91 Loro, L.L. Vintermyr, O.K. Liavaag, P.G. Jonsson, R. Johannessen, A.C. Oral squamous cell carcinoma is associated with decreased bcl-2/bax expression ratio and increased apoptosis. **Human Pathol**, v. 30, n. 9, p. 1097-1105, 1999.
- 92 Zörnig, M. Hueber, A.O. Baum, W. Evan, G. Apoptosis regulators and their role in tumorigenesis. *Biochimica et Biophysica Acta*, v. 1551, F1-F37, 2001.
- 93 Papa, F. Scacco, S. Vergari, R. de Benedittis, M. Petruzzi, M. lo Muzio, L. et al. Expression and subcellular distribution of bcl-2 and bax proteins in serum-starved human keratinocytes and mouth carcinoma epidermoid cultures. **Life Sciences**, v. 73, p. 2865-2872, 2003.
- 94 Kuo, M.Y.P. Hsu, H.Y. Kok, S.H. Kuo, R.C. Yang, H. Hahn, L.J. et al. Prognostic role of p27^{kip1} expression in oral squamous cell carcinoma in Taiwan. **Oral Oncology**, v. 38, p. 172-178, 2002.
- 95 Tsuzuki, H. Fujieda, S. Sunaga, H. Narita, N. Tokuriki, M. Saito, H. Expression of p27 and apoptosis in oral leukoplakia. **Anticancer Research**, v. 23, p. 1265-1270, 2003.
- 96 Ito, R. Yasui, W. Ogawa, Y. Toyosawa, S. Tahara, E. Ijuhin, N. Reduced expression of cyclin-dependent kinase inhibitor p27^{kip1} in oral malignant tumors. **Pathobiology**, v. 67, p. 169-173, 1999.
- 97 Kudo, Y. Kitajima, S. Ogawa, I. Miyauchi, M. Takata, T. Down-regulation of cdk inhibitor p27 in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, v. 41, p. 105-116, 2005.
- 98 Hsu, S.M. Raine, L. Fanger, H. Use of avidin-biotin peroxidase complex (ABC) in immunoperoxidase techniques: a comparison between ABC and unlabeled antibody (PAP) procedures. **J. Histochem. Cytochem**, v. 29, p. 577-580, 1981.
- 99 Landberg, G. Ross, G. Proliferating cell nuclear antigen and Ki-67 antigen expression in human haematopoietic cells during growth stimulation and differentiation. **Cell Prolif**, v. 26, p. 427-437, 1993.
- 100 McCarty Jr, K.S. et al. Estrogen receptor analyses. correlation of biochemical and immunohistochemical methods using monoclonal antireceptor antibodies. **Arch Pathol Lab Med**, v. 109, n. 8, p. 716-721, 1985.

101 Pithan, S.A. Cherubini, K. Figueiredo, M.A.Z. Yurgel, L.S. Perfil epidemiológico do carcinoma espinocelular de boca em pacientes do serviço de estomatologia do hospital São Lucas da PUCRS. **Revista odonto ciência**, v. 44, n. 19, p. 126-130, 2004.

102 Abdo, E.N. Garrocho, A.A. de Aguiar, M.C.F. Perfil do paciente portador de carcinoma epidermóide da cavidade bucal, em tratamento no hospital Mário Penna em Belo Horizonte. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 48, n. 3, p. 357-362, 2002.

103 de Carvalho, M.B. Lenzi, J. Lehn, C.N. Fava, A.S. Amar, A. Kanda, J.L. Walder, F. Menezes, M.B. Franzi, S.A. de Magalhães, M.R. et al. Características clínico-epidemiológicas do carcinoma epidermóide de cavidade oral no sexo feminino. **Revista Ass Méd. Bras**, v. 47, n. 3, p. 208-214, 2001.

104 Amorim, A.G. de Amorim, R.F.B. Freitas, R.A. Estudo epidemiológico do carcinoma epidermóide oral: análise de 85 casos. **Odontol. Clin. Científ**, v. 1, n. 1, p. 41-45, 2002.

105 Antunes, A.A. Takano, J.H. Queiroz, T.C. Vidal, A.K.L. Perfil epidemiológico do câncer bucal no CEON/HUOC/UPE e HCP. **Odontol. Clin. Científ**, v. 2, n. 3, p. 181-186, 2003.

106 Danesi, C.C. Marconato, M.C. Spara, L. Câncer de boca: um estudo no hospital universitário de santa maria. **Rev. Bras. Cancerologia**, v. 46, n. 2, p. 179-182, 2000.

107 Moreira, C.A. Lopes, A. Donato, A.C. Milner, E. Mistro, F.Z. Kignel, S. Epidemiologia do carcinoma espinocelular da boca: análise de 244 casos. **Revista Paulista de Odontologia**, v. 19 n. 6, p. 24-27, 1997.

108 da Rosa, M.R.D. Falcão, A.V. Sampaio, G.S. Epidemiologia do câncer bucal no estado da Paraíba-Brasil (1978-1993). **Rev. Bras. de Ciências da Saúde**, v. 1, n. 1/3, p. 17-22, 1997.

109 Perussi, M.R. Denardin, O.V.P. Fava, A.S. Rapoport, A. Carcinoma epidermóide da boca em idosos de São Paulo. **Revista Ass Méd. Bras**, v. 48, n. 4, p. 341-344, 2002.

110 Grandi, G. Cançado, R.P. Sant'Ana Filho, M. Estudo epidemiológico dos diagnósticos histopatológicos das neoplasias da cavidade bucal e anexos. **RBO**, v. 62, p. 20-24, 2005.

111 Magrini, E. Piovesan, H. Souza, C.A.F. dos Santos, M.M. Pimenta, G.H. Magrini, G.A. Neoplasias da cavidade oral. estudo do tipo histológico, localização, cor, sexo e faixa etária. **JBM**, v. 78, n. 6, p. 146-151, 2000.

112 Hora, I.A.A. Pinto, L.P. de Souza, L.B. Freitas, R.A. Estudo epidemiológico do carcinoma epidermóide de boca no estado de Sergipe. **Cienc. Odontol. Bras**, v. 6, n. 2, p. 41-48, 2003.

113 de Vicente, J.C. Olay, S. Lequerica-Fernandez, P. Sánchez-Mayoral, J. Junquera, L.M. Fresno, M.F. Expression of bcl-2 but not bax has a prognostic significance in tongue carcinoma. **J Oral Pathol Med**. v. 35, p. 140-145, 2006.

ANEXOS

ANEXO A

Questionário epidemiológico

CB

CADASTRO PARTICIPANTE VOLUNTÁRIO EM PESQUISA
“EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS BAX, BCL-2 E P27 NO CARCINOMA ESPINOCELULAR BUCAL”

1 – Identificação:

Paciente: _____ Idade: _____
 Identidade: _____ Prontuário: _____ SCMF / HUWC / ICC / _____
 Estado civil: _____ - Nascimento ____/____/____ - Sexo: Masc. / Femin.
 Pele: Leucoderma / Melanoderma / Feoderma / Indígena - Ocupação: _____
 Naturalidade (origem): _____ Zona Urbana / Zona Rural - Telefone: _____
 Endereço: _____
 _____ Zona Urbana / Zona Rural

2 – Dados Sociológicos:

Escolaridade: _____ Renda Familiar: _____
 Recolhimento de lixo: Não / Sim Esgoto: Não / Sim
 Água Encanada: Não / Sim Fluoretação da Água: Não / Sim
 Atendimento Médico: Não / Sim - Referenciado: Não / Sim, qual: _____
 Atendimento Odontológico: Não / Sim - Foi consultado o Dentista: Não / Sim
 Veículo próprio: Não / Sim Televisão: Não / Sim
 Geladeira: Não / Sim Chefe da Família: Não / Sim

3 – Exame clínico e anamnese:

Fumo: Não, nunca fumou;
 Atualmente não, parou de fumar a _____ (dias / meses / anos);
 Sim;
 Frequência: _____; Quantidade: _____; Tempo: _____;
 Tipo: Cigarro com filtro / Cigarro de palha / Cachimbo / Charuto / Mascado
 Alcool: Não / Sim
 Frequência: _____; Quantidade: _____; Tempo: _____;
 Tipo: Destilados / Fermentados / Ambos
 Drogas Ilícitas: Não / Sim, Tipo: _____; Quantidade: _____; Tempo: _____;
 Prótese: Não / Sim
 Tipo: _____; Permanência: (atual) _____ / (total) _____
 Presença de Cáries: Não / Sim Lesão de Mucosa Oral: Não / Sim
 Gengivite: Não / Sim Periodontite: Não / Sim
 Presença de Irritantes locais: Não / Sim Uso de Alimentos quentes: Não / Sim
 Ingestão de Bebidas quentes: Não / Sim Uso de Alimentos picantes: Não / Sim
 Exposição ao sol: Não / Sim Outras radiações: Não / Sim

ANEXO B

Procedências dos pacientes

Procedências	Quantidades
Fortaleza	20
Caucaia	4
Cascavel	1
Aquiraz	1
Mombaça	1
Tauá	2
Russas	1
Ipueiras	2
Nova Olinda	1
Aracati	1
Ipu	1
Madalena	1
Pedra Branca	1
Acarape	1
Pacatuba	1
Itaiçaba	1
Itapipoca	1
Mombaça	1
Juazeiro do Norte	1
Guaraciaba do Norte	1
Iguatu	1
Icapuí	1
Jaguaribe	1
Não informado	1
Total	48

ANEXO C

PROTOCOLO DE IMUNOHISTOQUÍMICA
 CÂNCER BUCAL
 P-27; Bax; Bcl-2
 Tarcísio Teobaldo Bezerra
 Data: ___/___/___

N°	lâminas	diluição	Ac.	observações	N°	lâminas	diluição	Ac.	observações
1					11				
2					12				
3					13				
4					14				
5					15				
6					16				
7					17				
8					18				
9					19				
10					20				

TÉCNICA EMPREGADA (ESTREPTO-AVIDINA-BIOTINA-PEROXIDASE)

1. Incubação das lâminas em estufa a ___°C por ___ minutos.
2. Passagem em xilol aquecido a ___°C por ___ minutos.
3. Deixar esfriar por 10 minutos.
4. Passagem em três banhos de xilol frio.
5. Passagem em gradiente decrescente de álcool.
6. Lavagem em água a temperatura ambiente por ___ minutos.
7. Tampão citrato pH ___ em Mo., por ___ minutos. (Após prévio aquecimento em Mo., por 3 minutos.)
8. Lavagem em TBS.
9. **** *Para o Bax: Incubação das lâminas em proteinase "K" em estufa a ___°C por ___ minutos. Resfriar.*
10. Imersão em peróxido de hidrogênio a 3% por ___ minutos.
11. Lavagem em TBS.
12. Incubação com anticorpo primário a 4°C "overnight".
13. Lavagem em TBS.
14. Incubação com anticorpo secundário biotilado (AMARELO) por ___ minutos.
15. Lavagem em TBS.
16. Incubação com o complexo SAP (VERMELHO) por ___ minutos.
17. Preparação e incubação do cromógeno DAB/Peroxidase:

Tris-HCl pH 7,6	1000 µl	
DAB líquido	8 µl	
H ₂ O ₂ 10 volumes	20 µl	

18. Lavagem em TBS.
19. Contra-coloração com hematoxilina de Harris ou Metil Green.
20. Lavagem em água a temperatura ambiente.
21. Passagem em gradientes crescentes de álcool.
22. Passagem em três banhos de xilol frio.
23. Montagem da lâmina.

ESPAÇO PARA CÁLCULOS

Solução total: 150µl x ____ lâminas=	Diluição do Ac. primário:	Tris-HCl:	DAB:
H ₂ O ₂ :			