

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA ORAL**

THAÍS GOMES BENEVENUTO

**ESTUDO COMPARATIVO DA EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DO Ki-67
EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE LÍNGUA EM PACIENTES JOVENS E
IDOSOS**

NATAL, RN

2010

Livros Grátis

<http://www.livrosgratis.com.br>

Milhares de livros grátis para download.

Thaís Gomes Benevenuto

**ESTUDO COMPARATIVO DA EXPRESSÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA DO Ki-67
EM CARCINOMA EPIDERMÓIDE DE LÍNGUA EM PACIENTES JOVENS E
IDOSOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral do Departamento de Odontologia do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, como parte dos requisitos para obtenção do Título de Mestre em Patologia Oral

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Lélia Batista de Souza

NATAL, RN

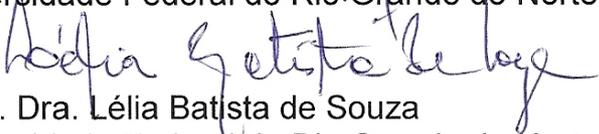
2010

A defesa deste trabalho foi realizada no dia 26 de fevereiro de 2010, em Natal/RN, tendo sido aprovada com conceito "A".

COMISSÃO EXAMINADORA


Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy
Universidade Estadual da Paraíba


Prof. Dr. Leão Pereira Pinto
Universidade Federal do Rio Grande do Norte


Profa. Dra. Lélia Batista de Souza
Universidade Federal do Rio Grande do Norte

DEDICATÓRIA

Ao meu eterno companheiro, não só esta conquista como também todos os dias de minha vida. AMO-TE!

A minha mãe, pela vida e incentivo.

À professora Dra. Lélia Batista de Souza, minha orientadora, pelo apoio e compreensão nos momentos difíceis.

Aos demais professores do Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral, por serem nossos exemplos de dedicação e sabedoria.

Aos meus colegas de mestrado, pelos bons momentos vividos.

A minha querida duplinha Emeline, por sua amizade e por tudo o que você fez por mim, minha gratidão!

Ao colega Cassiano, por me ajudar no desenvolvimento desse trabalho, minha gratidão!

Aos funcionários e técnicos da Patologia Oral, Gracinha, Idelzuíte, Sandrinha, Hévio, Canindé e Lurdinha, pelo convívio harmonioso.

Às bibliotecárias, Mônica e Cecília, pela força nos momentos metodológicos.

Ao CNPq, pelo apoio financeiro através da concessão de bolsa de estudo, facilitando a realização deste mestrado.

Ao Dr. Carlos César, patologista da LIGA Norte Riograndense contra o Câncer, por ter concedido os blocos necessários à realização da presente pesquisa.

À vovó Dica e ao vovô Zeles pelas orações!

A minha sogrinha, pelas orações e força.

Às tias, Fabíola, Marilac, Glória, Beth, e Célia e aos tios Nereu, Djalma e Edgard pelo apoio.

E a todos que estiveram comigo nessa caminhada.

“Hoje levantei cedo pensando no que tenho a fazer antes que o relógio marque meia noite. É minha função escolher que tipo de dia vou ter hoje. Posso reclamar porque está chovendo ou agradecer às águas por lavarem a poluição. Posso ficar triste por não ter dinheiro ou me encorajada para administrar minhas finanças, evitando o desperdício. Posso reclamar sobre minha saúde ou dar graças por estar viva. Posso me queixar dos meus pais por não terem me dado tudo o que eu queria ou posso ser grata por ter nascido. Posso reclamar por ter que ir trabalhar ou agradecer por ter trabalhado. Posso sentir tédio com o trabalho doméstico ou agradecer a Deus por ter um teto para morar. Posso lamentar decepções com amigos ou me entusiasmar com a possibilidade de fazer novas amizades. Se as coisas não saíram como planejei posso ficar feliz por ter hoje para recomeçar. O dia está na minha frente esperando para ser o que eu quiser. E aqui estou eu, a escultora que pode dar forma. Tudo depende de mim.”

Charles Chaplin

RESUMO

O Carcinoma Epidermóide (CE) é a neoplasia maligna de origem epitelial que mais ocorre na cavidade oral, com alta capacidade de invadir estruturas adjacentes. Classicamente, o CEO ocorre mais em homens com idade acima de 50 anos, que fazem uso de tabaco e álcool por longos períodos de tempo, sendo a língua, o sítio anatômico mais frequentemente acometido. Atualmente, vem se percebendo um aumento na incidência dessa lesão em pacientes com idade abaixo dos 40 anos expostos ou não a fatores de risco, principalmente as lesões de língua. O objetivo desta pesquisa foi analisar o índice de proliferação celular, utilizando o anticorpo Ki-67 em CEs de língua em dois grupos de faixas etárias distintas. Também, avaliaram-se as características clínico-patológicas dos casos constantes do estudo. A amostra se constituiu de 16 casos de pacientes com idade até 40 anos e 20 casos de pacientes com idade acima de 50 anos. Em relação às características clínico-patológicas das lesões, o sexo masculino foi o mais acometido para os dois grupos, sendo evidenciado que o hábito de beber e fumar foi frequente tanto para os pacientes com idade até 40 anos (72,7%) como para os pacientes com idade acima dos 50 anos (52,9%). Foi possível observar que houve uma associação estatisticamente significativa entre o grupo de pacientes com idade até 40 anos e a presença de metástase regional ($p = 0,036$), bem como entre o mesmo grupo e os estágios mais avançados da doença ($p = 0,012$). Em relação à gradação histológica de malignidade, houve uma maior frequência de tumores classificados em alto grau de malignidade no grupo de pacientes com até 40 anos (56,2%), mas não foi evidenciada diferença estatística entre os grupos e a gradação histológica de malignidade. Quanto à análise da expressão imuno-histoquímica pelo Ki-67, não houve diferença estatisticamente significativa entre a expressão do anticorpo para os grupos etários estudados nesta pesquisa, assim como não houve associação do índice de positividade para o Ki-67 com os parâmetros clínicos e histomorfológicos. Pode-se concluir que a proliferação celular não foi significativamente diferente entre os grupos que constituíram o presente estudo.

PALAVRA-CHAVE: Carcinoma epidermóide de língua, proliferação celular, antígeno Ki-67, pacientes com idade abaixo de quarenta anos, gradação histológica, fatores de risco.

ABSTRACT

The squamous cell carcinoma (SCC) is the most common malignant neoplasm of epithelial origin in oral cavity and present high capacity to invade adjacent structures. Traditionally, SCC has a predominance of 50 years male patients with long-time use of tobacco and alcohol, and the tongue is the most affected anatomic site. At present, there is an increasing incidence of SCC in patients below 40 years of age, who has been exposed or not to risk factors, mainly for tongue lesions. This study aims to analyze cell proliferation index using Ki-67 antigen in SCC of the tongue for two groups of different age range: until 40 years and older than 50 years. The first group was composed by 16 patients and the second one was composed by 20 patients. Clinicopathological features of the cases were also assessed. There was a male predominance in both groups. Tobacco and alcohol habits were common for patients until 40 years (72,2%), as well as for patients older than 50 years (52,9%). The first group had statistical association with the presence of regional metastases ($p = 0,036$) and with the most advanced stages of the disease ($p = 0,012$). Considering the histological malignancy grading, there was higher incidence (56,2%) of high malignancy grade tumors in the group of patients until 40 years old, but no statistical difference has found between groups and histologic malignancy grading. Regarding the immunohistochemical expression of Ki-67, there was no statistically significant difference between the antibody expression of the groups, as well as between other clinical and histopathological parameters. This study identified no significant difference regarding cell proliferation between the analyzed groups.

KEY-WORDS: Oral squamous cell carcinoma, cell proliferation, Ki-67 antigen, patients younger than forty years old, histological grade, risk factors.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1:	Sistema de gradação de malignidade preconizado por Bryne (1998).....	55
Quadro 2:	Especificidade do anticorpo, clone, diluição, fabricante, recuperação antigênica e tempo de incubação do anticorpo primário.....	57
Quadro 3:	Variáveis independentes e dependentes.....	59
Figura 1:	A e B- carcinoma epidermóide de língua em pacientes com até 40 anos de idade. A- baixo grau de malignidade (H/E, 400x); B- alto grau de malignidade (H/E, 400x); C e D- carcinoma epidermóide de língua em pacientes acima de 50 anos de idade. C- baixo grau de malignidade (H/E, 100x); D- alto grau de malignidade (H/E, 400x).....	77
Figura 2:	A e B- Imunomarcação nuclear do Ki-67 nas células malignas de carcinoma epidermóide de língua em pacientes com até 40 anos de idade. A- baixo grau de malignidade (LSAB, 400x); B- alto grau de malignidade (LSAB, 400x); C e D- Imunorreatividade do Ki-67 nas células malignas de carcinoma epidermóide de língua em pacientes acima de 50 anos de idade. C- baixo grau de malignidade (LSAB, 400x); D- alto grau de malignidade (LSAB, 400x).....	78

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Tamanho da amostra, variação e média de idade (em anos), desvio padrão e intervalo de confiança (IC) nos grupos de pacientes jovens e idosos em relação ao sexo dos pacientes. Natal-RN, 2010.....	62
Tabela 2-	Distribuição dos casos nos grupos de pacientes jovens e idosos, de acordo com a faixa etária e sexo dos pacientes. Natal-RN, 2010.....	62
Tabela 3-	Distribuição dos casos nos grupos de pacientes jovens e idosos, de acordo com a região topográfica da língua e sexo dos pacientes. Natal-RN, 2010.....	63
Tabela 4-	Distribuição dos casos nos grupos de pacientes jovens e idosos, de acordo com a presença ou ausência de hábito e sexo dos pacientes. Natal-RN, 2010.....	64
Tabela 5-	Distribuição dos casos nos grupos de pacientes jovens e idosos, de acordo com o tipo de hábito relatado e sexo dos pacientes. Natal-RN, 2010.....	65
Tabela 6-	Distribuição dos casos nos grupos de pacientes jovens e idosos, de acordo com a presença ou ausência de metástase regional e sexo dos pacientes. Natal-RN, 2010.....	66
Tabela 7-	Distribuição absoluta e relativa e significância estatística da presença ou ausência de metástase regional em relação aos grupos de pacientes jovens e idosos. Natal-RN, 2010.....	66
Tabela 8-	Distribuição dos casos nos grupos de pacientes jovens e idosos, de acordo com a metástase à distância e sexo dos pacientes. Natal-RN, 2010.....	67

Tabela 9-	Distribuição absoluta e relativa e significância estatística da presença ou ausência de metástase à distância em relação aos grupos de pacientes jovens e idosos. Natal-RN, 2010.....	67
Tabela 10-	Tamanho da amostra, variação e média do tamanho do tumor (em cm), desvio padrão e intervalo de confiança (IC) nos grupos abaixo de pacientes jovens e idosos em relação ao sexo dos pacientes. Natal-RN, 2010.....	68
Tabela 11-	Distribuição dos casos nos grupos de pacientes jovens e idosos, de acordo com o estadiamento clínico e sexo dos pacientes. Natal-RN, 2010.....	68
Tabela 12-	Distribuição absoluta e relativa e significância estatística do estadiamento clínico categorizado em relação aos grupos de pacientes jovens e idosos. Natal-RN, 2010.....	69
Tabela 13-	Escore e gradação histológica de malignidade dos casos de Carcinoma Epidermóide de língua em pacientes jovens. Natal-RN, 2010.....	70
Tabela 14-	Escore e gradação histológica de malignidade dos casos de Carcinoma Epidermóide de língua em pacientes idosos. Natal-RN, 2010.....	71
Tabela 15-	Distribuição dos casos nos grupos de pacientes jovens e idosos, de acordo com a gradação histológica de malignidade e sexo dos pacientes. Natal-RN, 2010.....	72
Tabela 16-	Distribuição absoluta e relativa e significância estatística da gradação histológica de malignidade em relação aos grupos de pacientes jovens e idosos. Brasil, Natal-RN, 2010.....	72
Tabela 17-	Distribuição absoluta e relativa e significância estatística da gradação histológica de malignidade em relação ao estadiamento clínico categorizado. Natal-RN, 2010.....	73

Tabela 18-	Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média e soma dos postos, estatística U e significância estatística para o índice de positividade (IP), em relação aos grupos de pacientes jovens e idosos. Natal, RN – 2010.....	73
Tabela 19-	Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média e soma dos postos, estatística U e significância estatística para o índice de positividade (IP), em relação à gradação histológica de malignidade dos tumores. Natal, RN – 2010.....	74
Tabela 20-	Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média e soma dos postos, estatística U e significância estatística para o índice de positividade (IP), em relação à presença ou ausência de metástase regional. Natal, RN – 2010.....	75
Tabela 21-	Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média e soma dos postos, estatística U e significância estatística para o índice de positividade (IP), em relação à presença ou ausência de metástase à distância. Natal, RN – 2010.....	75
Tabela 22-	Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média e soma dos postos, estatística U e significância estatística para o índice de positividade (IP), em relação ao estadiamento clínico categorizado. Natal, RN – 2010.....	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AgNOR: Do inglês “Argyrophilic Proteins Related to Nucleolar Organizer Regions”, traduzido como Proteínas Relacionadas às Regiões Organizadoras Nucleolares

BrdU: Bromodesoxiuridina

BSA: Do inglês “Bovine Serum Albumin”, traduzido como Albumina de Soro Bovino

CDC2: Do inglês “Cell Cycle Control 2”, traduzido como Proteína Controladora do Ciclo Celular 2

CDK: Quinase dependente de ciclina

CE: Carcinoma Epidermóide

CEO: Carcinoma Epidermóide Oral

DNA: Do inglês “Deoxyribonucleic Acid”, traduzido como Ácido Desoxirribonucleico

FAS: Do inglês “Fatty Acid Synthase”, traduzido como Ácido Graxo Sintase

G₀: Intervalo de latência no qual as células se encontram fora do ciclo celular

G₁: Fase pré-sintética

G₂: Fase pré-mitótica

H/E: Hematoxilina/Eosina

HPV: Do inglês “Human Papillomavirus”, traduzido como Papilomavírus Humano

HSV: Do inglês “Herpes Simplex Virus”, traduzido como Vírus Herpes Simples

IC: Intervalo de confiança

IgG: Referente à imunoglobulina do tipo G

INCA: Instituto Nacional do Câncer

IP: Índice de positividade

kDA: quilodalton

Ki-67: Refere-se ao antígeno celular ou anticorpo imuno-histoquímico Ki-67

L428: Linhagem celular derivada de linfoma de Hodgkin

LSAB: Do inglês “Labeled Streptavidin-Biotin”, traduzido como Streptoavidina-Biotina conjugado

M: Período mitótico do ciclo celular

MIB-1: Anticorpo monoclonal anti-Ki-67

NORs: Do inglês “Nucleolar Organizer Regions”, traduzido como Regiões Organizadoras Nucleolares

p21: Referente à proteína p21

p53: Referente à proteína p53 ou ao gene supressor de tumor p53

PCNA: Do inglês “Proliferating Cell Nuclear Antigen”, traduzido como Antígeno Nuclear de Proliferação Celular

Rb: Referente à proteína retinoblastoma

RNA: Do inglês “Ribonucleic Acid”, traduzido como Ácido Ribonucleico

S: Fase do ciclo celular em que ocorre a síntese de DNA

SEER: Do inglês “National Cancer Institute’s Surveillance, Epidemiology, and End Results”, traduzido como Vigilância, Epidemiologia e Resultados finais do Instituto Nacional do Câncer

TNM: Sistema Tumor - Linfonodos – Metástase

UICC: União Internacional Contra o Câncer

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	25
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	28
2.1	CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL.....	28
2.1.1	Considerações gerais.....	28
2.1.2	Estadiamento clínico (TNM).....	35
2.1.3	Gradação histológica de malignidade.....	37
2.2	CICLO CELULAR.....	40
2.3	PROLIFERAÇÃO CELULAR E MARCADORES BIOLÓGICOS.....	41
3	PROPOSIÇÃO.....	49
4	MATERIAIS E MÉTODOS.....	51
4.1	IMPLICAÇÕES ÉTICAS.....	51
4.2	CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO.....	51
4.3	POPULAÇÃO.....	51
4.4	AMOSTRA.....	52
4.5	CRITÉRIOS DE SELEÇÃO DA AMOSTRA.....	52
4.5.1	Critérios de inclusão.....	52
4.5.2	Critérios de exclusão.....	52
4.6	ESTUDO CLÍNICO.....	53
4.7	METODOLOGIA.....	53
4.7.1	Estudo morfológico.....	53
4.7.2	Análise morfológica.....	54
4.7.3	Estudo imuno-histoquímico.....	55
4.7.4	Análise de expressão imuno-histoquímica.....	58
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	58
4.9	VARIÁVEIS ESTUDADAS.....	59
5	RESULTADOS.....	61
5.1	ANÁLISE DOS DADOS CLÍNICOS.....	61
5.2	ANÁLISE DOS DADOS MORFOLÓGICOS.....	70
5.3	ANÁLISE DA IMUNORREATIVIDADE DO Ki-67.....	73

6	DISCUSSÃO.....	80
7	CONCLUSÃO.....	91
	REFERÊNCIAS.....	93
	APÊNDICES.....	107
	ANEXOS.....	111

1 INTRODUÇÃO

O câncer de boca está entre os dez tipos de câncer mais frequentes no Brasil e a estimativa de incidência para o ano de 2010 no país é de 14.120 novos casos, indicando esse tumor como o 5º mais frequente entre os homens com taxa estimada de 10,69 casos para cada 100.000 homens e o 7º entre as mulheres com taxa estimada de 3,76 casos para cada 100.000 mulheres. A estimativa para a região Nordeste é de 2.810 novos casos, representando uma taxa de 6,56 casos para cada 100.000 homens e 3,81 casos para cada 100.000 mulheres (INCA, 2010). Especificamente para o Rio Grande do Norte estima-se 210 novos casos, representando uma taxa de 7,64 casos para cada 100.000 homens e 5,87 casos para cada 100.000 mulheres. (INCA, 2010).

O Carcinoma Epidermóide Oral (CEO) que corresponde de 90% a 95% de todas as neoplasias malignas da cavidade oral ocorre frequentemente em homens com idade acima dos 50 anos e a localização anatômica mais comumente acometida é a língua (DEDIVITIS et al., 2004; PARKIN et al., 2005; ABDO et al., 2007). A lesão em indivíduos jovens é pouco frequente, apresentando uma incidência entre 0,4% a 12,4% de todos os casos dessa doença (LLEWELLYN; JOHNSON; WARNAKULASURIYA, 2001; IAMAROON et al., 2004; SIRIWARDENA et al., 2007; RIBEIRO et al., 2009).

A contribuição dos fatores de risco tradicionais, o tabaco e o álcool, na etiopatogenia do CEO em pacientes jovens não está bem estabelecida (HIROTA et al., 2008). Têm sido relatados, como possíveis fatores importantes desse processo, agentes infecciosos como o papilomavírus humano (HPV) e o vírus herpes simples (HSV), hábitos alimentares (LLEWELLYN; JOHNSON; WARNAKULASURIYA, 2001), drogas imunossupressoras (FORTINA et al., 2004), condição socioeconômica (ARBES et al., 1999) e predisposição genética (FOULKES et al., 1996). Adicionalmente, pesquisas têm sugerido o potencial biológico mais agressivo dos CEOs em pacientes jovens, resultando em um pior prognóstico (BYERS, 1975; AMSTERDAM; STRAWITZ, 1982; SON; KAPP, 1985; KURIACOSE et al. 1992; SARKIRA; HARARI 1994; GARAVELLO; SPREAFICO; GAINI, 2007). Outros estudos retrospectivos afirmam não existir diferenças significativas no comportamento biológico entre lesões de CEO em pacientes jovens e idosos. (ATULA et al., 1996; PITMAN et al., 2000; PYTYNIA et al., 2004).

Diversos estudos mostram que a proliferação celular é um parâmetro importante frente ao comportamento da lesão (HARPOLE et al., 1995; BROWN; GATTER,

2002). Pesquisas realizadas com marcadores de proliferação celular, como AgNOR, PCNA e Ki-67, demonstram que há uma correlação entre a expressão desses marcadores em relação ao prognóstico da doença (ESPOSITO et al., 2000; TUMULURI; THOMAS; FRASER, 2002).

O Ki-67 é conhecido por ser um importante marcador de proliferação celular (BRAUN; PAPADOPOULOS; MÜLLER-HERMELINK, 1988; van DIERENDONCK et al., 1989). O índice de proliferação celular, avaliado pela imunoexpressão do Ki-67 mostrou ser de relevância prognóstica em alguns tipos de tumores como carcinomas de cérvix uterino, sarcomas de tecidos moles e melanomas (GARZETTI et al., 1995; CHOONG et al., 1994; RAMSEY et al., 1995). Outros estudos realizados em carcinomas de pulmão e câncer colorretal não foram capazes de identificar utilidade prognóstica na imunoexpressão do Ki-67 (BROWN et al., 1988; ÖFNER; GROTHAUS; RIEDMANN, 1996).

Desta forma, este trabalho tem por objetivo comparar o índice de proliferação celular por meio da expressão imuno-histoquímica do Ki-67 em carcinoma epidermóide oral em dois grupos de faixa etária distintas com a finalidade de melhor esclarecer sua possível diferença na proliferação celular entre pacientes com até 40 anos de idade e acima de 50 anos de idade e relacionar os resultados com o prognóstico da lesão.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL

2.1.1 Considerações Gerais

O Carcinoma Epidermóide (CE) representa uma neoplasia de origem epitelial, com invasão para o tecido conjuntivo de sustentação e estruturas adjacentes como, as vias sanguíneas e linfáticas, bem como causar metástase para linfonodos regionais e órgãos distantes. Atinge principalmente áreas da pele expostas ao sol, originando-se na camada intermediária da epiderme. Quando em boca, pode acometer diferentes regiões como língua, mucosa jugal, gengivas superior e inferior, palato duro e mole, assoalho bucal e região retromolar (NEVILLE, et al., 2009).

Um importante crescimento da incidência do câncer oral em pessoas adultas jovens tem sido evidenciado mundialmente, sugerindo que esse pode ser um tipo diferente de câncer por causa do comportamento biológico pelo visto mais agressivo (BYERS, 1975; KURIAKOSE et al., 1992; MYRES et al., 2000; LLEWELLYN; JOHNSON; WARNAKULASURIYA, 2004; IAMAROON et al., 2004; SASAKI et al., 2005).

Em um estudo de casos de CEO com ênfase nos aspectos clínicos e patológicos da lesão, realizado na Índia por Sherin et al. (2008), foi percebido que durante o período de 2002 a 2007 a incidência de CEO em pacientes adultos jovens aumentou 7,5% nesse período. Em relação aos aspectos clínicos constaram que, a maioria dos pacientes com menos de 40 anos encontravam-se na quarta década de vida, o sexo masculino foi o mais acometido, a língua foi a região anatômica mais frequente (27%), seguida pela mucosa jugal (20%), histologicamente as lesões moderadamente diferenciadas foram as mais comuns (67%). Assim, constaram que o CEO em pacientes adultos jovens esta aumentando na região do Calicut e não perceberam a presença de fatores de risco para este grupo.

Byers, em 1975, estudou onze casos de CE de língua em pacientes com idade abaixo de 30 anos, no período de 1956 a 1973 no hospital M D Anderson nos Estados Unidos, o que correspondeu a 3% de todos os CE dessa localização anatômica. Ao avaliar a presença de fatores de risco como, fumo e álcool, o mesmo percebeu que esses pacientes não

apresentavam nenhum fator de risco associado ao desenvolvimento desse neoplasma. Constatou que em seis casos (55%) já existia o comprometimento linfonodal no momento do diagnóstico e a maioria dos CE de língua foram histologicamente classificados como pobremente diferenciado. Esse conjunto de fatores o levou a concluir que, os pacientes adultos jovens tenderam a apresentar uma frequência maior de tumores anaplásicos e com isso resultando em um comportamento mais agressivo e um prognóstico pior.

Garavello, Spreafico e Gaini (2007) realizaram um estudo constituído por 46 casos de CEO em pacientes com menos de 40 anos. Constataram uma taxa de recorrência significativamente mais alta para esses pacientes ($p = 0,011$). A média de recorrência da doença foi de 18 meses (4 – 48) para os pacientes adultos jovens, enquanto, para os pacientes com idade acima de 40 anos, notaram uma média de 23 meses (4 – 50). Para esses autores, os resultados obtidos mostram que a idade é um preditor independente para uma pior sobrevida para o grupo de pacientes mais jovens, e, portanto, os clínicos devem considerar a possibilidade de tratar esses pacientes de forma diferente dos pacientes mais velhos. Evidenciaram também que o número de óbitos em decorrência da doença foi maior nos pacientes adultos jovens (50%).

Mudanças recentes na epidemiologia do câncer de cabeça e pescoço têm sido amplamente observadas. Uma revisão sobre o assunto realizada por Curado e Hashibe (2009) na França concluiu que, de um modo geral, a incidência de câncer de cabeça e pescoço está aumentando em mulheres, principalmente nos países das regiões norte e oeste da Europa, enquanto diminui em homens na maior parte das regiões geográficas. Em relação aos fatores de risco, mostrou que, o hábito de mascar tabaco, que pode ser comercializado sob a forma de balas, tem sido um novo fator de risco reconhecido mundialmente, principalmente para os pacientes que não fumam cigarro como crianças e adolescentes em decorrência da apresentação comercial, para o desenvolvimento do câncer tanto na cavidade oral como para faringe.

Kuriacose et al. (1992) realizaram uma pesquisa com o objetivo de comparar o CEO entre pacientes com idade abaixo de 35 anos e pacientes com idade acima de 60 anos, no período de 1988 a 1990, na Índia. Como resultado, perceberam que o grupo mais jovem apresentava uma maior frequência feminina, uma distribuição por todas as classes sociais e pouca associação aos fatores de risco tradicionais. Observaram, também, que não houve diferença significativa entre os grupos em relação ao estadiamento clínico, ambos apresentaram maior frequência para o estágio III.

Veness et al. (2003) objetivaram estudar o CE de língua em região anterior em pacientes com idade abaixo de 40 anos, com o intuito de verificar se a idade poderia influenciar no desenvolvimento da lesão. Perceberam, uma taxa maior de ocorrência em mulheres com menos de 40 anos (40,9%) e um baixo consumo de tabaco para esse o grupo. Constataram, que os pacientes mais velhos estavam mais propensos a se apresentarem em estágios mais avançados, enquanto os pacientes adultos jovens apresentaram uma maior incidência de metástase regional. No entanto, não encontraram que a idade possa ser um preditivo independente de uma pior sobrevida, mas que a taxa de recorrência para o grupo jovem é preocupante.

A análise da base de dados *National Cancer Institute's Surveillance, Epidemiology, and End Results (SEER)*, nos Estados Unidos, forneceu evidência para um aumento na porcentagem dos casos de CE de língua ocorrendo em adultos com idade abaixo de 40 anos, de 3% em 1973 para, aproximadamente, 6% em 1993 (MYERS et al., 2000), mas essa incidência vem aumentando em vários países e regiões do mundo, incluindo Índia, Paquistão, Austrália e América do Sul (IAMAROON et al., 2004). Um estudo descritivo em brasileiros indicou que dos 400 casos diagnosticados como CEO durante um período de quinze anos, foi encontrada uma taxa de 12% de acometimento deste neoplasma em pacientes com idade abaixo dos 40 anos (RIBEIRO et al., 2008). Outro estudo de análise comparativa realizado no Brasil encontrou uma taxa de 10,7% dos casos diagnosticados em pacientes com idade abaixo dos 40 anos. Em estudo epidemiológico de pacientes com câncer de cabeça e pescoço realizado por Alvarenga et al. (2008) em hospital universitário no noroeste de São Paulo, foi encontrada uma taxa de 2,11% de pacientes entre 30 e 40 anos dos 427 que apresentaram CEO. Chidzonga e Mahomva (2006) realizaram um estudo epidemiológico descritivo em uma população do Zimbábue no período de 1982 – 1991 e observaram que, dos 358 casos diagnosticados com CEO, 66 casos (18,4%) eram em pacientes com idade abaixo de 40 anos.

Os mecanismos envolvidos na carcinogênese nesta faixa etária permanecem controversos na literatura. Os pacientes adultos jovens com CEO não apresentam com frequência os hábitos de fumar e beber e acredita-se também que o tempo de exposição a esses carcinógenos é curto para promover a transformação maligna (KURIACOSE et al., 1992; MACKENZIE et al., 2000; SASAKI et al., 2005, ANDISHEH-TADBIR ;MEHRABANI; HEYDARI, 2010). Para Atula et al. (1996) consideraram que a causa do CE de língua nesses pacientes aparenta ser multifatorial. Cusumano e Persky (1988) relataram tratar se de uma entidade distinta da doença em decorrência da ausência de fatores de riscos

tradicionais. Outros aspectos como, análise cromossomal, molecular e biológica das células tumorais em pacientes mais jovens podem facilitar o entendimento no desenvolvimento do CEO nessa população (SARKARIA; HARARI, 1994).

Existe uma discordância na literatura a respeito do prognóstico de pacientes com CE de língua em relação à faixa etária. Carniol e Fried (1982), Clark, Rosen e Laperriere (1982), McGregor, Davis e Robins (1983), Lacy et al. (2000), Hafkamp, Manni e Speel (2004) e Gilroy et al. (2005) relatam que o prognóstico em pacientes jovens é melhor. Estudos retrospectivos desenvolvidos por Byers (1975), Amsterdam e Strawitz (1982), Son e Kapp (1985), Kuriacose et al. (1992), Sarkaria e Harari (1994) e Garavello, Spreafico e Gaini (2007) apresentaram que o câncer segue um curso mais agressivo em pacientes adultos jovens. Por sua vez, Atula et al. (1996), Pitman et al. (2000), Pytynia et al. (2004) não perceberam diferenças significantes no prognóstico entre os diferentes grupos etários.

Vargas et al. (2000), objetivaram estudar retrospectivamente dois grupos com CE localizado no terço anterior de língua, cada um contendo 17 pacientes. O primeiro grupo constituído somente por mulheres jovens com menos de 40 anos e o segundo formado por homens e mulheres mais velhos. Os resultados deste estudo demonstraram que as mulheres jovens apresentavam taxas significativamente maiores de recorrência e intervalos de reaparecimento menores, quando comparados aos pacientes mais velhos. Para os autores, mulheres jovens com CEs localizados no terço anterior da língua deveriam ser submetidas a um tratamento inicial mais radical, com subsequente acompanhamento periódico mais frequente.

Em comparação com os pacientes mais jovens, os indivíduos com menos de 40 anos apresentam a forma mais severa da doença, representadas por taxas altas de recorrência loco-regional (FRIEDLANDER et al., 1998) e maior taxa de mortalidade (SARKARIA; HARARI, 1994) e, geralmente, há falta de fatores de risco clássicos associados (CUSUMANO; PERSKY, 1988; SANKARANARAYANAN et al., 1989; KURIACOSE et al., 1992; MAKCKENZIE et al., 2000; IAMAROON et al., 2004; LLEWELYN; JOHNSON; WARNAKULASURIYA, 2004; SASAKI et al., 2005; GAWECKI et al., 2007; CHITAPANARUX et al., 2006; ANDISHEH-TADIR et al., 2010). Llewellyn, Johnson e Warnakulasuriya (2001) consideram que pacientes adultos jovens acometidos pelo CEO estão expostos aos mesmos fatores de riscos conhecidos, enquanto outros autores, como Cusumano e Persky (1988), Sankaranarayanan et al. (1989) e Sasaki et al. (2005), argumentam que muitos dos pacientes em seus estudos nunca fumaram ou tiveram hábito de consumir álcool e,

além disso, que a exposição a esses carcinógenos para os pacientes adultos jovens seria muito curta para induzir a carcinogênese oral.

Em estudo realizado por Liang et al. (2008), foi sugerido que pode existir uma etiologia viral alternativa, representada principalmente pelo HPV, para o desenvolvimento de câncer de língua em pacientes jovens que não são usuários de tabaco e álcool, sendo esse um dos principais locais de ocorrência da infecção por esse vírus. Segundo Curado e Hashibe (2009), a incidência de câncer em região de base de língua e tonsilas tem aumentado em pessoas com menos de 45 anos. Para esses autores, isso é atribuído ao aumento da prevalência de infecção pelo HPV, da prática de sexo oral e do número de parceiros sexuais.

De acordo com Oliveira et al. (2003), a participação do HPV na carcinogênese oral estaria restrita a um determinado grupo de carcinomas, mas que sua ação nesse processo é sinérgica, estando associada a outros carcinógenos químicos e físicos, como fumo e álcool. Apenas uma reduzida porcentagem de carcinomas orais estaria associada exclusivamente à ação das proteínas virais, sem qualquer participação do fumo e/ou álcool.

Fatores genéticos também devem ser avaliados como uma alternativa para a etiopatogenia do câncer oral em adultos jovens, podendo estar associados à incidência e à progressão da doença (GAWECKI et al., 2007; STOLK-LIEFFERINK et al., 2008; SIEGELMANN-DANIELI et al., 1998; FOULKES et al., 1996). De Paula et al. (2009) fizeram uma análise de 724 casos de CE de cabeça e pescoço com foco em pacientes adultos jovens e puderam observar uma associação significativa entre a idade e história familiar de câncer ($p < 0,05$), principalmente na população com idade abaixo de 40 anos, em que constataram uma maior ocorrência de história familiar de câncer. Ype et al. (2001), encontraram história de câncer na família mais frequente em pacientes com menos de 40 anos (12,2%) comparado ao encontrado no grupo de pacientes com mais de 40 anos (2,6%).

Koch et al. (1995) realizaram um estudo com pacientes acima de 75 anos, diagnosticados com CE de cabeça e pescoço, e constataram uma baixa frequência do abuso no consumo de tabaco e álcool. Estes autores sugerem que os indivíduos mais velhos possuem mais mutações genéticas como resultado de sua longevidade e que sua capacidade para reparar os danos no DNA é reduzida. Embora o estudo de Koch et al. (1995) tenha focado apenas pacientes idosos, para Pitman et al. (2000), uma causa similar poderia ser sugerida para pacientes adultos jovens sem fatores de risco tradicionais que possuem erros inatos na capacidade para reparar o dano no DNA.

No estudo clínico realizado por Popovtzer (2004), foi observado que, dentro do grupo de pacientes com menos de 45 anos, havia dois tipos de comportamento biológico

distintos: um mais agressivo, levando a taxa de mortalidade de 40% em dois anos, e outro mais indolente, com uma taxa de sobrevida maior. Já no grupo de pacientes mais velhos, constatou-se um comportamento mais homogêneo e uma baixa taxa de mortalidade nos primeiros dois anos.

Funk et al. (2002) sugeriram que o grupo de pacientes “jovens” com CEO pode ser composto de vários subgrupos de pacientes e propuseram três subgrupos. O grupo I é composto por pacientes com idade inferior a 35 anos, apresentando predominância do sexo feminino, pouco ou nenhum fator de risco, maior agressividade da doença e pior prognóstico. O grupo II é constituído por indivíduos com menos de 40 anos de idade, com predomínio do sexo masculino, com uso abusivo de tabaco e álcool, que clinicamente se apresentam com câncer avançado e o prognóstico proporcional ao estágio presente. Esses pacientes tiveram uma exposição significativa ao álcool e ao tabaco em idade precoce. O Grupo III é formado por pacientes com menos de 40 anos, em que cerca de metade tem uma história de uso de tabaco. Esse grupo apresenta uma ligeira predominância do sexo masculino, maior frequência da fase inicial do câncer e tumores bem diferenciados, além de uma resposta ao tratamento melhor ou equivalente ao observado em pacientes idosos com doença em estágio semelhante.

Schantz et al. (1989) relatam que a fragilidade no cromossomo de linfócitos em pacientes jovens com câncer de cabeça e pescoço, após a exposição à bleomicina, foi maior que em pacientes mais velhos. O resultado desse estudo sugere que a incidência aumentada do câncer de cabeça e pescoço em adultos jovens pode ser devido à consequência de uma interação sinérgica entre uma sensibilidade intrínseca definida geneticamente para mutagênicos e a exposição à carcinógenos.

Sorensen et al. (1997) demonstraram que a mutação do p53 é menos comum em câncer de língua em pacientes adultos jovens sem o histórico de uso de álcool e tabaco. Por sua vez, Atula et al. (1996) e Regezi et al. (1999) compararam a mutação do p53, p21 e Rb em pacientes com idade abaixo e acima de 40 anos e não encontraram nenhuma diferença significativa. Lingen et al. (2000) demonstraram altos níveis de mutação no p53 entre os pacientes com menos de 40 anos não fumantes e sugeriram que a etiologia para a mutação nesse grupo é diferente, podendo, assim, levar a um comportamento distinto da doença. De Paula et al. (2009) avaliaram a expressão da proteína p53 pela utilização do kit LSAB e obtiveram como resultado uma expressão significativamente maior em pacientes com idade abaixo dos 40 anos ($p < 0,05$) e notaram também que os pacientes mais jovens apresentavam consumo de álcool e tabaco similar aos pacientes mais velhos, diante do encontrado pela pesquisa os autores sugeriram que distúrbios genéticos na via da p53 pode ter um

envolvimento significativo no surgimento precoce da doença. Jin et al. (1999) notaram que regiões cromossômicas com frequentes alterações genéticas envolvidas na tumorigênese escamosa em adultos jovens são semelhantes aos relatados em pacientes com idade mais avançada.

Clinicamente, o CEO possui aspectos variados tanto no padrão de crescimento quanto em sua coloração e apresenta-se como uma lesão exofítica ou endofítica. A primeira gera um aumento de volume com superfície irregular vegetante, papilar ou verruciforme; enquanto a segunda possui uma área central deprimida, de formato também irregular, geralmente encontrando-se ulcerada, com bordas elevadas ou em rolete que resultam da invasão do tumor para dentro do tecido, bem como nas laterais abaixo do epitélio adjacente e, na palpação, a lesão apresenta-se endurecida. Em relação a sua coloração, essas lesões podem ser leucoplásicas, eritroplásicas ou eritroleucoplásicas, sendo os dois primeiros indicativos de uma fase inicial. A presença de dor em estágios iniciais da doença é rara, o que pode levar à demora na procura por cuidados profissionais (NEVILLE et al., 2009).

Outra característica que demonstra o poder invasivo da lesão é a destruição de ossos adjacentes, que radiograficamente evidencia uma radiolucidez “em roído de traça”, com margens mal definidas ou bordas irregulares. O sítio anatômico mais acometido, especialmente em pacientes jovens, é a língua geralmente as superfícies laterais posteriores e ventral, seguidas do lábio inferior, soalho de boca, palato mole, gengiva, mucosa jugal, mucosa labial e palato duro (ODUKOYA et al., 1986; SIRIWARDENA et al., 2006; SOUZA; SAKAE; GUEDES, 2008; EFFIOM et al., 2008; NEVILLE et al., 2009). Em uma análise epidemiológica do CE de língua no sul da Austrália, Lam, Logan e Luke (2006) dos 611 casos estudados, 50 casos (8,18%) ocorreram em pacientes com menos de 40 anos e o sítio anatômico mais acometido foi a língua (44,9%). Analisando qual a região foi mais comum, encontraram que, a base de língua foi a mais frequente entre os homens, seguida pelo ápice e borda lateral. Em uma análise retrospectiva das características clínicas e histopatológicas feita por Ribeiro et al. (2009), foi encontrado como sítio anatômico mais frequente o soalho de boca, estando a língua em segundo lugar e o lábio inferior, em terceiro. Ho et al.(2008), encontraram a mucosa jugal como área mais acometida pelo CEO em pacientes adultos jovens Porém, em pesquisa realizada por Hirota et al. (2008), em relação ao sítio anatômico mais acometido, a língua ficou em primeiro lugar seguido pelo soalho bucal e lábio inferior.

Histologicamente, o CEO pode surgir a partir de um epitélio displásico caracterizado por lençóis, ilhas e cordões invasivos de células epiteliais malignas. A invasão é representada pela extensão irregular do epitélio lesional para o interior do tecido conjuntivo

por meio da degradação da membrana basal. As células malignas podem se estender profundamente no interior do tecido adiposo, músculos e ossos subjacentes, destruindo o tecido original à medida que progridem, bem como circundar vasos sanguíneos e linfáticos. As células neoplásicas apresentam citoplasma eosinofílico abundante com núcleos grandes, geralmente hipercromáticos e relação núcleo-citoplasma alterada. Graus variados de pleomorfismo celular e nuclear são visualizados. Presença de pérolas de ceratina, que se caracterizam por focos arredondados de camadas concêntricas de células ceratinizadas, pode ser observada em lesão bem diferenciada, uma vez que a ceratina é um produto do epitélio escamoso. Células individuais também podem sofrer ceratinização celular individual, fenômeno conhecido como disceratose (NEVILLE et al., 2009).

A avaliação histológica do grau com que esses tumores se assemelham ao seu tecido de origem é denominada gradação. A gradação histopatológica de um tumor está de alguma forma relacionada ao seu comportamento biológico. Assim, ao longo das últimas décadas, muitos pesquisadores têm proposto vários sistemas de avaliação histopatológica com múltiplos parâmetros na tentativa de proporcionar um critério mais objetivo que se correlacione com o prognóstico (NEVILLE et al., 2009).

A terapêutica a ser utilizada para o tratamento do CEO depende em qual estágio se encontra a lesão. Existem três modalidades clássicas de tratamento, remoção cirúrgica, radioterapia e quimioterapia, podendo existir também combinação entre as formas de terapia. A remoção cirúrgica do tumor deverá ser realizada com uma ampla excisão, com margem de 1,0 a 1,5 cm de tecido mole com aparência clínica de normalidade na periferia do espécime. Outra modalidade é a radioterapia sendo indicada tanto para tratamento primário como para metástase oculta em linfonodos regionais (cl clinicamente não detectáveis). E por último tem-se a quimioterapia que ainda não apresenta resultados concordantes no tratamento de CEO (REGEZI; SCIUBBA; JORDAN, 2008).

2.1.2 Estadiamento clínico (TNM)

O sistema de estadiamento TNM foi desenvolvido por Pierre Denoix na França, entre os anos de 1943 e 1952. A prática de separar os casos de câncer em grupos, de acordo com os denominados estágios, passou a existir do fato de que as taxas de sobrevivência eram maiores nos casos de doenças localizadas do que aqueles casos nos quais a doença já

tinha se estendido para órgãos distantes (BRASIL, 2004). O TNM auxilia na descrição da extensão local do tumor primário (T), assim como o envolvimento de linfonodos regionais das cadeias de drenagem linfática do órgão em que o tumor se localiza (N) e a presença ou ausência de metástase à distância (M). Esse sistema foi idealizado pela União Internacional Contra o Câncer (UICC) com a finalidade de auxiliar no planejamento terapêutico, avaliar o prognóstico, facilitar a troca de informações entre os centros de tratamento e contribuir para a pesquisa contínua do câncer humano. Estes parâmetros recebem graduações, geralmente de T0 a T4, de N0 a N3 e de M0 a M1, respectivamente (BRASIL, 2004).

Além das graduações numéricas, as categorias T e N podem ser subclassificadas em graduações alfabéticas (a, b, c). Tanto as graduações numéricas como as alfabéticas anunciam o nível de evolução do tumor e dos linfonodos afetados. O símbolo "X" é utilizado quando uma categoria não pode ser devidamente avaliada. Quando as categorias T, N e M são agrupadas em combinações pré-estabelecidas, ficam distribuídas em estágios que, geralmente, variam de I a IV. Esses estágios podem ser subclassificados em A e B, para expressar o nível de evolução da doença (INCA, 2009).

O estadiamento pode ser tanto clínico como patológico. O primeiro (cTNM) é estabelecido na evidência obtida antes do tratamento, a partir dos dados de exame físico, que fornecem indícios a respeito da extensão do câncer, podendo determinar a posição e o tamanho do tumor, bem como a sua propagação, e dos exames complementares, como os de imagem, exames laboratoriais, endoscopia e biópsia. O segundo (pTNM) baseia-se nos achados cirúrgicos e no exame anatomopatológico da peça, sendo estabelecido após tratamento cirúrgico e determina a extensão da doença com maior precisão. O estágio clínico é essencial para selecionar e avaliar o tratamento, enquanto o histopatológico provê dados mais precisos para avaliar o prognóstico. O estadiamento patológico pode ou não coincidir com o estadiamento clínico e não é aplicável a todos os tumores (BRASIL, 2004).

Costa et al. (2002) investigaram a existência de correlação da classificação clínica TNM com gradação histológica de malignidade e localização anatômica do CEO e constaram que 14,17% dos casos em língua apresentavam-se em estágio T₄ e que 17,5% dos casos localizados em lábio inferior encontravam-se em estágio T₁. Portanto, nesse estudo foi observada correlação entre a classificação clínica TNM e as diferentes localizações anatômicas dos CEO.

Costa et al. (2005) realizaram um estudo retrospectivo buscando correlacionar a classificação TNM com aspectos histológicos de malignidade em CEO, utilizando grau de ceratinização, pleomorfismo nuclear, padrão de invasão e infiltrado inflamatório em 38 casos,

obtiveram como resultado uma correlação positiva estatisticamente significativa entre TNM de forma categorizada com o pleomorfismo celular ($p = 0,004$), e com o grau de ceratinização ($p = 0,025$). Concluiu que os resultados significantes indicam que as áreas mais invasivas podem ser responsáveis pelo comportamento clínico do tumor.

Dantas et al. (2003) avaliaram a correlação entre TNM e escores histológicos de malignidade e a correlação destes parâmetros com o prognóstico em 16 casos de CEO. Foi constatado que existiu correlação significativa entre TNM e prognóstico e que o estadiamento clínico constituiu um indicador prognóstico importante do CEO.

Silveira et al. (2007) encontraram uma associação significativa entre o estadiamento clínico e o desfecho da doença (morte ou remissão), em 86,7% dos casos em estágio inicial da doença apresentaram remissão da doença, mostrando com isso que o TNM é um parâmetro de prognóstico eficiente.

Coaracy et al. (2008) pesquisaram a existência de correlação entre os dados clínicos e histopatológicos de 90 casos de CEO, aplicaram o teste de correlação de Pearson e não encontram correlação significativa entre a classificação clínica TNM e a gradação histológica de malignidade desenvolvida por Wahi (1971). Porém, encontraram relação significativa entre essa gradação e o parâmetro clínico tamanho do tumor primário (T).

2.1.3 Gradação histológica de malignidade

Há muitos anos, o sistema de estadiamento clínico de tumores TNM tem sido o padrão de classificação adotado para caracterizar os tumores, propor a terapia mais adequada e, assim, estimar a sobrevida dos pacientes, o que auxilia na seleção da terapia adjuvante pós-operatória e na estimativa do prognóstico (PATEL; SHAH, 2005). Entretanto, observa-se que existem pacientes portadores de carcinomas de cavidade oral em estágios precoces que morrem rapidamente, mesmo recebendo tratamento adequado (ANNEROTH; BATSAKIS; LUNA, 1987). Neste sentido, as classificações histopatológicas para os carcinomas epidermóides orais surgiram na tentativa de explicar o comportamento biológico discrepante de tumores com características clínicas semelhantes, fornecer informações a respeito dos aspectos morfológicos para auxiliar na interpretação da agressividade tumoral, prover fatores prognósticos suplementares com a finalidade de aperfeiçoar o valor do estadiamento clínico TNM e auxiliar na escolha terapêutica (BRYNE et al., 1989; LOURENÇO et al., 2007).

No século XVII, já se considerava que o tipo histológico, o tamanho, a localização e os suprimentos sanguíneos e linfáticos de um tumor maligno, bem como a idade do paciente, consistiam em importantes variáveis para se determinar a malignidade dos CEs. Entretanto, questionava-se o motivo de haver diferentes padrões de comportamento em neoplasias malignas de mesma origem e que ocupavam o mesmo sítio anatómico (BRODERS, 1941).

Em 1920, em um artigo intitulado "Epitelioma de células escamosas de lábio: um estudo de quinhentos e trinta e sete casos", Broders (1941) propôs um método para a gradação do carcinoma de células escamosas. O mesmo iniciou uma gradação quantitativa dos carcinomas com um sistema originalmente baseado na proporção de células altamente diferenciadas em todo o tumor (BRYNE et al., 1989). A classificação estabelecida em 1920 e, posteriormente, revisada em 1925 baseou-se no princípio fundamental de diferenciação celular, sendo totalmente dissociada da história clínica (LOURENÇO et al., 2007).

Os carcinomas foram divididos em quatro graus, variando de 1 a 4. Carcinomas grau 1 apresentavam até 25% de células indiferenciadas. Aqueles de grau 2 possuíam de 25% a 50% de indiferenciação. Os de grau 3 apresentavam células indiferenciadas ocupando de 50% a 75% do tumor e, naqueles de grau 4, observava-se indiferenciação de 75% a 100% do tumor (BRODERS, 1941). Uma falta de correlação relatada entre a gradação de Broders (1941) e o prognóstico de CE pode ser explicada pelo fato de que, geralmente, os CEs exibem uma população heterogênea de células com prováveis diferenças no comportamento invasivo e metastático do tumor (BRYNE et al., 1989).

Em 1971, foi publicado pela Organização Mundial de Saúde (OMS) o sistema de gradação histopatológica de malignidade desenvolvido por Wahi (1971), que constava de uma escala que teve por base a proliferação e diferenciação das células tumorais, variando entre três níveis. Os casos diferenciados, denominados de grau I, apresentam, histologicamente, muitas pérolas de ceratina, mitoses atípicas escassas, pouco pleomorfismo celular e nuclear; os moderadamente diferenciados, classificados como grau II, possuem uma quantidade reduzida de pérolas de ceratina, mitose atípicas presentes em pouca quantidade e moderado pleomorfismo celular e nuclear; e os indiferenciados, denominados de grau III, apresentam pérolas córneas raras, intenso pleomorfismo celular e nuclear e mitoses atípicas em grande número.

Anneroth e Hansen (1984) criaram um sistema multifatorial de gradação histopatológica de malignidade para os carcinomas de cavidade oral. O sistema proposto teve como referência outra classificação multifatorial elaborada por Jakobsson et al. (1973), para

carcinomas de laringe, que abordava oito parâmetros morfológicos, considerando tanto a população celular tumoral quanto a interface entre as células tumorais e o tecido hospedeiro (relação tumor/ hospedeiro) (ANNEROOTH, HANSEN, 1984).

Anneroth, Batsakis e Luna (1987), avaliaram três aspectos das células tumorais nas partes menos diferenciadas e três aspectos histológicos da relação entre as células do tumor e do tecido conjuntivo. Essas seis variáveis foram: grau de ceratinização, pleomorfismo nuclear, número de mitoses, padrão de invasão, estágio da invasão e infiltração de leucócitos.

Bryne et al. (1989) introduziram uma nova gradação histopatológica de malignidade para o CEO baseada em modificações do sistema proposto por Anneroth Batsakis e Luna (1987), utilizando amostras provenientes de biópsias incisionais de tumores da mucosa oral e alveolar. Primeiramente, apenas as áreas mais anaplásicas dos sítios de maior invasividade dos tumores foram avaliadas. Os autores afirmaram que as células das partes mais profundas da invasão de um tumor mostraram alterações mais parecidas com aquelas observadas em metástases que células em áreas de menos invasividade, além de possuírem maior probabilidade de causar a disseminação do tumor, sendo, portanto, consideradas como as células que iriam ditar o comportamento clínico da lesão maligna. Além disso, também foi proposta a remoção do parâmetro estágio de invasão, presente na classificação de Anneroth, Batsakis e Luna (1987). Nessa nova classificação proposta por Bryne et al. (1989), os pacientes também recebem escores para cada uma das características histopatológicas analisadas; ao final, todos os cinco escores são somados, fornecendo o grau de malignidade do tumor, em que um alto escore indica um pior prognóstico. Comparando o valor prognóstico desse sistema de gradação com o de Broders (1941), foi verificado que a nova gradação de malignidade, ao contrário da de Broders (1941), é um fator prognóstico altamente significativo em CEO. Isso sugere que, histologicamente, os aspectos das áreas invasivas do tumor são importantes para predizer seu comportamento clínico. (BRYNE et al., 1989).

Bryne (1991) publicou um trabalho em que a reprodutibilidade da gradação histopatológica proposta por eles foi calculado pelo método estatístico Kappa, que evidencia se a concordância existente entre observadores seria maior do que a concordância obtida ao acaso. O valor desta estatística, quanto há concordância absoluta, foi de 0,44. A autora afirmou ainda que a concordância entre os observadores poderia ser melhorada pela simplificação, definição de critérios rígidos e calibração dos patologistas (BRYNE, 1991). Assim, em 1992, o sistema de gradação de malignidade proposto por Bryne et al. (1992) foi simplificado, sendo removido o parâmetro morfológico número de mitoses, presente na

publicação original de 1989 (BRYNE et al., 1989). Esta alteração manteve o valor prognóstico do sistema de gradação e aumentou a reprodutibilidade ($kappa=0,63$). Os autores afirmam que este novo sistema apresenta vantagens em relação aos outros, uma vez que possui alto valor prognóstico, sendo mais rápido de ser realizado, pois apenas as áreas de invasão são utilizadas na gradação.

Bryne (1998) ressaltou a hipótese de que as características moleculares e morfológicas no *front* de invasão são as mais importantes para o prognóstico do paciente. Eventos considerados importantes para a disseminação tumoral, como o ganho ou perda de moléculas de adesão, aumento da proliferação celular, secreção de enzimas proteolíticas, iniciação da angiogênese e diminuição da apoptose, que ocorrem na interface tumor/hospedeiro, frequentemente se apresentam diferentes em outras partes (central e superficial) de um mesmo tumor. Baseada nesta hipótese Bryne (1998) criou o sistema de gradação histológica do *front* de invasão para o carcinoma de células escamosas de cavidade oral. Somente as áreas mais invasivas do tumor são graduadas. Os escores para cada parâmetro são posteriormente somados, gerando um único escore de malignidade, sendo que um alto valor indica um pior prognóstico (BRYNE, 1998).

A classificação histopatológica de malignidade proposta pela OMS (CARDESA et al., 2005), baseou-se no grau de diferenciação celular e permitiu o agrupamento dessa neoplasia maligna em três categorias. Os carcinomas de células escamosas de cavidade oral puderam, então, ser classificados em pouco, moderadamente e bem diferenciados. Os bem diferenciados foram assim denominados quando sua arquitetura tecidual se assemelhou a um padrão normal de epitélio escamoso. Já aqueles que se mostraram pouco diferenciados, caracterizaram-se pelo predomínio de células imaturas, numerosas mitoses típicas e atípicas, bem como mínima ceratinização. Os CEs moderadamente diferenciados apresentaram certo grau de pleomorfismo nuclear, atividade mitótica e pouca ceratinização (CARDESA et al., 2005).

2.2 CICLO CELULAR

A desregulação do maquinário do ciclo celular é um marco fundamental na progressão do câncer. Os programas celulares de proliferação, diferenciação, senescência e apoptose estão intimamente relacionados com o maquinário regulador do ciclo celular. Muitas

dessas alterações moleculares que causam comportamento biológico anormal das células cancerígenas são baseadas em aberrações da regulação do ciclo celular. Por exemplo, tolerância ao dano de DNA, resistência a apoptose, e progressão de células com oncogênese ativada e/ou genes supressores de tumor inativados através de múltiplos pontos de controle resultando em instabilidade genômica aumentada, todos afetam e/ou são afetados pelas proteínas reguladoras do ciclo celular (LUNDBERG; WEINBERG, 1999).

A decisão para ativar a cascata de eventos levando a síntese de DNA e, por fim, a divisão celular ocorre no ponto de restrição. A soma de sinais acumulados nos primeiros dois terços da fase G_1 pode iniciar a progressão do ciclo celular, causar uma reversão da célula para a fase G_0 (ou quiescente), ou levar à diferenciação celular. Após passar do ponto de restrição no final da fase G_1 , uma célula negligenciará sinais exógenos e entrará na síntese de DNA. Assim, os mecanismos moleculares que controlam a progressão através do ponto de restrição são de importância central na administração da entrada no ciclo celular. Depois da síntese de DNA, grandes prejuízos intracelulares, como dano genômico ou interrupção metabólica podem parar a progressão do ciclo celular, e as células ficarão presas em outros pontos de checagem nas fases S, G_2 ou M (TODD et al., 2002).

As ciclinas e as quinases dependentes de ciclinas (CDKs) formam o cerne da regulação do ciclo celular (SHERR, 2000). A expressão das ciclinas é dependente da fase do ciclo celular e é regulada pela transcrição, pós-transcrição, tradução e pós-tradução. Os membros da família da ciclina interagem com as CDKs, e esses complexos resultantes são requeridos para passar por fases específicas do ciclo celular. Ciclinas tipo D interagem com CDK4 e CDK6 e são necessárias para transição de G_0 para G_1 . A ciclina E se liga a CDK2 e medeia à entrada da fase S. O complexo ciclina A/CDK2 regula a passagem pela fase S. Depois, em conjunção com a proteína controladora do ciclo celular 2 (CDC2), a ciclina A também induz a fase G_2 do ciclo celular. A ciclina B1 e CDC2 iniciam os eventos moleculares associados à mitose (LUNDBERG; WEINBERG, 1999).

2.3 PROLIFERAÇÃO CELULAR E MARCADORES BIOLÓGICOS

A proliferação celular é um processo biológico de importância vital para todos os organismos vivos. É definida como o aumento no número de células resultando do término do ciclo celular (PARDEE, 1989; RABENHORST; BURINI; SCHMITT, 1993) e está

associada a uma progressão ordenada através do ciclo celular, que é governada por complexos de proteína estimulatórios ou inibitórios exercendo funções reguladoras (BANKFALVI; PIFFKO, 2000). Na carcinogênese o controle desse importante processo biológico encontra-se completamente desregulado por alterações cromossômicas ou citogenéticas (BANKFALVI; PIFFKO, 2000; TUMULURI; THOMAS; FRASER, 2002). Bacchi e Gown (1993) relataram que uma proliferação celular anormal mostra-se como um precursor e pode ser um indicador da tumorigênese. Estudos em biologia molecular do CE de cabeça e pescoço sugerem que vias específicas são relevantes para o desenvolvimento e progressão desta doença. Nas últimas décadas, pesquisas científicas relacionadas a esses eventos têm sido realizadas para investigar parâmetros biológicos, diagnósticos e prognósticos (COHEN, 2004; NAGAI, 1999; HARDISSON, 2003). Estes incluem fatores de crescimento e seus receptores, transdutores de sinal, fatores de transcrição, proteínas relacionadas com a proliferação celular, apoptose, hipóxia e angiogênese, além de genes supressores tumorais (SCULLY; FIELD; TANZAWA, 2000; HARDISSON, 2003; COHEN, 2004).

Evidências sugerem que células presentes no *front* invasivo tumoral do carcinoma apresentam características moleculares diferentes quando comparadas às áreas superficiais do tumor, tornando o *front* invasivo tumoral a área mais importante do tumor para avaliação do prognóstico (BRYNE, 1998; BANKFALVI; PIFFKO, 2000). Esses eventos moleculares no *front* invasivo incluem angiogênese aumentada (BERNSTEIN; LIOTTA, 1994), expressão aberrante de moléculas relacionadas à adesão, como as caderinas (BRYNE, 1991; DOWNER; SPEIGHT, 1993), produção aumentada de enzimas capazes de degradar a matriz extracelular (KURAHARA et al., 1999). Além disso, estudos demonstram que em comparação com outras áreas do tumor, o *front* invasivo exibe expressão aumentada de moléculas relacionadas à proliferação celular (PIFFKO et al., 1997; JACOB et al., 1996).

Diversas técnicas foram desenvolvidas para detectar e quantificar as células proliferantes. A forma pioneira era baseada na contagem de figuras de mitoses utilizando o microscópio de luz, mas nessa forma somente as células na fase M podiam ser quantificadas em decorrência da sua característica específica na coloração em hematoxilina/eosina (H/E) (BAAK, 1990). Posteriormente, implementaram-se técnicas capazes de avaliar células que se apresentavam na fase S do ciclo celular. Uma delas se baseava na utilização da timidina marcada pelo trítio (timidina tritiada), e a outra envolvia a utilização de outro análogo pirimidínico, a Bromodesoxiuridina (BrdU). Os resultados obtidos com as duas técnicas eram similares. No entanto, a técnica da BrdU apresentava a desvantagem de necessitar de administração prévia deste análogo pirimidínico nos pacientes. Na época, ambas foram

elencadas como padrão-ouro para detectar células na fase S (van DIEST; BRUGAL; BAAK, 1998).

A técnica histoquímica de AgNOR (regiões organizadoras nucleolares argirofílicas), mais simples, rápida e barata, baseia-se na ligação da prata coloidal às proteínas acídicas, não histonas, associadas as regiões organizadoras nucleolares (NORs), utilizada para detectar células em proliferação (KHAN et al., 1993). As NORs são segmentos de DNA que transcrevem o RNA ribossômico, localizados nos braços curtos dos cromossomos acrocêntricos 13, 14, 15, 21 e 22, estando diretamente relacionadas com a síntese proteica e apresentam-se em quantidade maior durante a atividade celular (CROCKER; NAR, 1987).

Estudos em CE observaram que o conteúdo de AgNOR de núcleos de células por análise de imagem foi significativamente maior no *front* invasivo quando comparado com as partes centrais do tumor. O AgNOR quando avaliado em casos de carcinomas orais no *front* invasivo apresentou alta correlação com o prognóstico, maior que quando o marcador foi registrado em todo o tumor (BRYNE, 1998). Em pesquisa realizada por Piffko et al. (1997) em 80 pacientes com CE, a quantidade de AgNORs no *front* de invasão tumoral foi relatada como o fator prognóstico independente mais significante. Esse achado não apenas provê uma base funcional para a relevância clínica bem estabelecida da gradação histológica do *front* do tumor, mas também sugere o uso de uma abordagem cirúrgica agressiva para aqueles pacientes com uma alta quantidade de AgNOR.

A técnica imuno-histoquímica atualmente tem sido a mais utilizada para avaliar a proliferação celular. Os anticorpos utilizados com maior frequência são aqueles capazes de identificar o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e o antígeno Ki-67 (TUMULURI; THOMAS; FRASER, 2002; KUOKAWA et al., 2005; KRECICKI et al., 1999; FUMIC-DUNKIC et al., 2003).

O antígeno de proliferação celular (PCNA) é uma proteína nuclear de 36 kDA, que se apresenta em altas concentrações no final da fase G₁ e início da fase S. A imunomarcagem para o PCNA tem sido muito utilizada na avaliação da proliferação celular de diversos tumores (BRAVO, 1986; PRELICH et al., 1987). No entanto, estudos têm demonstrado que o PCNA auxilia a DNA polimerase delta, que atua tanto na replicação como no reparo de moléculas do DNA, através da remoção de nucleotídeos, formando um complexo quaternário com a proteína p21, ciclina D e a CDK (XIONG; ZHANG; BEACH, 1992). Dessa forma, a expressão deste antígeno não está relacionada apenas à proliferação celular (KELMAN, 1997). Em um estudo realizado por Siriwardena et al. (2007) encontraram uma correlação com maior atividade mitótica e um maior índice de PCNA em relação a metástase

linfonodal em pacientes mais velhos, constatando assim, tumores mais proliferativos nesses pacientes e uma maior metástase para linfonodos.

O Ki-67, um importante biomarcador, é uma proteína nuclear não-histona, com peso molecular aparente de 345 a 349 kDA, codificada por um gene localizado no cromossomo 10q25, contendo sítios de fosforilação para uma variedade de quinases (SCHLÜTER et al., 1993; ENDL; GERDES, 2000; MacCALLUM; HALL, 2000).

O anticorpo monoclonal Ki-67 foi identificado pela primeira vez na Universidade de Kiel, na Alemanha, no ano de 1983, na 67ª placa de cultura tecidual, sendo assim uma IgG₁ de camundongo produzida contra uma porção nuclear da linhagem celular L428 da doença de Hodgkin (TUMULURI; THOMAS; FRASER, 2002; BARBOSA et al., 2003).

Durante a mitose, a fosforilação e a desfosforilação do Ki-67 ocorrem na decomposição e na reorganização do núcleo, duas ocasiões marcantes do ciclo celular. Essas modificações são acompanhadas pela redistribuição do Ki-67 do interior dos núcleos para a periferia dos cromossomos condensados e vice e versa (ENDL; GERDES, 2000; SCHOLZEN; GERDES, 2000). A expressão do Ki-67 ocorre durante todas as fases do ciclo celular, exceto na fase G₀ e o início da fase G₁, e aumenta à medida que a proliferação celular progride, principalmente na fase S, com picos nas fases G₂ e M, sendo degradado rapidamente após a mitose (KUROKAWA et al., 2005; BRUNO; DARZINKIEWICZ, 1992). A expressão celular do Ki-67 tem fornecido uma medida da proliferação do tumor (ISOLA et al., 1990; SCAGLIOTTI et al., 1993) e pode ser expresso quando a síntese de DNA é bloqueada ou quando as células entram em apoptose (van OIJEN et al., 1998).

Embora reconhecida como uma proteína reguladora do ciclo celular, a função específica do Ki-67 permanece indefinida, principalmente devido a sua falta de homologia com outras proteínas (SCHOLZEN; GERDES, 2000). Algumas funções propostas para o Ki-67 incluem organização e manutenção da arquitetura do DNA e síntese de ribossomos durante a mitose (BRIDGER et al., 1998; MacCALLUM; HALL, 2000). Acredita-se que a síntese protéica determinante para esse antígeno no ciclo celular seja controlada pelo cromossomo 10 (GARRIDO et al., 1992; KEY et al., 1993).

Inicialmente, a sua aplicabilidade era restrita a material fresco, o que impossibilitava a utilização do anticorpo Ki-67 em material embocado em parafina. Em função dessa limitação desenvolveram-se anticorpos equivalentes a ele, principalmente MIB-1, 3 e 5, que tornaram possível o estudo da proliferação celular em material arquivado de diversos tumores (KUBBUTAT et al., 1994).

O valor prognóstico do Ki-67 tem sido relatado em vários tumores, incluindo câncer de mama, pulmão, cérvix, próstata e cérebro (SCAGLIOTTI et al., 1993; SHIBA et al., 2000; PENCE et al., 1993; HARPOLE et al., 1995; BROWN; GATTER, 2002).

Myong et al. (2006) correlacionaram os marcadores de proliferação celular PCNA e Ki-67 com a sobrevida e metástase linfonodal em 113 pacientes com CEO. O estudo mostrou que a imunomarcagem de ambos foi uma ferramenta diagnóstica importante na detecção de linfonodos clinicamente negativo que são considerados fatores de metástase oculta.

Em um estudo realizado por Roland et al. (1994) na Inglaterra, ao estudarem o Ki-67 em câncer de cabeça e pescoço constataram que não houve relação entre os escores do anticorpo com gradação histológica de malignidade, bem como não encontraram diferença estatisticamente significativa entre esse marcador e a metástase linfonodal, demonstrando que os índices de Ki-67 não apresentaram correlação com os parâmetros clínicos ou morfológico.

Piffko et al. (1996) demonstraram que o *front* de invasão tumoral é constituído de sub-populações celulares, que apresentam uma alta atividade proliferativa. Entretanto, a determinação da atividade proliferativa pela marcação do Ki-67 nessa área do tumor não forneceu nenhuma informação prognóstica.

Esposito et al. (2000) estudaram a expressão do Ki-67 e PCNA em CE do trato aerodigestivo superior correlacionando com parâmetros clínico-patológicos. Nesse estudo puderam observar que a expressão do Ki-67 apresentou correlação com o sítio primário do tumor, apresentando índices mais elevados em tumores localizados em laringe e hipofaringe. Porém, não houve correlação entre a expressão do Ki-67 e a do PCNA em relação ao estadiamento clínico e gradação histológica de malignidade preconizada por Broders (1941). De acordo com os resultados obtidos, os autores concluíram que a determinação da imunorreatividade dos marcadores estudados mostrou-se ser um método objetivo para avaliar a proliferação celular que pode subsidiar as informações a respeito do prognóstico.

Piattelli et al. (2002) pesquisaram de forma comparativa a expressão do Ki-67 em mucosa oral normal, leucoplasias, displasias e carcinomas, encontrando uma clara progressão dos índices de proliferação celular entre mucosa oral normal (5,2%), leucoplasia (9,0%), e displasia leve (15,3%). Entretanto, observaram também um índice elevado nos casos de displasia severa e carcinoma *in situ* (28,6%) quando comparado ao carcinoma invasivo (21,6%), refletindo um aumento significativo da proliferação celular nos estágios iniciais da transformação maligna.

Kim et al. (2007) pesquisaram o valor prognóstico da expressão do Ki-67 e da anidrase carbônica e, por meio de estudo imuno-histoquímico em 60 casos de CE de língua. Os resultados revelaram uma alta expressão da anidrase carbônica e do Ki-67 e estiveram associados com uma taxa de sobrevida pior, sugerindo que ambos podem ser úteis para prever o prognóstico de CE localizados em língua.

Vicente et al. (2002) verificaram a expressão imuno-histoquímica do Ki-67 em 35 pacientes com CEO e constataram que o índice de marcação deste anticorpo foi significativamente maior nos tumores de alto grau de malignidade.

Bettendorf e Herrmann (2002) estudaram a relevância prognóstica da marcação do Ki-67 em 329 casos de CEO e observaram que o índice de marcação do anticorpo foi correlacionado com a gradação histológica de malignidade de acordo com Wahi (1971), proporção da relação entre estroma e tumor, tamanho do tumor, espessura do tumor, profundidade de invasão, envolvimento de linfonodos e a taxa de sobrevida de 5 anos. Verificaram, também, que houve uma correlação inversa significativamente mais alta encontrada entre o índice de marcação do Ki-67, a proporção estroma/tumor e o grau de ceratinização; enquanto nenhuma correlação pôde ser estabelecida entre o índice de marcação do Ki-67 e todos os outros padrões clínicos e histológicos. A marcação do Ki-67 sozinha não teve relevância prognóstica em câncer oral.

Silva et al. (2004) avaliaram a expressão do FAS, Erb2 e Ki-67, em 62 casos de CEO, em relação aos aspectos clínico-patológicos e encontraram uma associação significativa entre a expressão do Ki-67 com um prognóstico pior ($p = 0,03$), pois os tumores com altos níveis de marcação desse anticorpo apresentavam uma redução na taxa de sobrevida em comparação aos que apresentavam baixos índices de proliferação celular.

Silva et al. (2008) observaram que o índice de proliferação celular revelado pela positividade do Ki-67 foi significativamente associado com o estágio clínico da doença ($p < 0,05$) e a gradação histológica de malignidade para os tumores classificados com moderadamente diferenciados e indiferenciados ($p < 0,05$) e constataram também que uma maior marcação do Ki-67 ocorreu em pacientes com idade acima de 59 anos ($p < 0,05$). Além disso, encontraram uma associação significativa entre o índice do Ki-67 e um risco maior de recorrência, indicando que o mesmo pode prever tanto na sobrevida geral como na sobrevida livre da doença.

Tumuluri, Thomas e Fraser (2004) analisaram, em 47 casos de CEO, a relação entre a densidade da proliferação celular no front de invasão tumoral e o prognóstico e perceberam que a proliferação celular expressa pela marcação do Ki-67, no *front* de invasão

tumoral, apresentou uma relação direta com o estadiamento clínico, principalmente relacionado ao envolvimento de linfonodos, constaram que a maior média de marcação do Ki-67 foi notada em tumores que se apresentavam no estágio N2.

Tumuluri, Thomas e Fraser (2002) analisaram, em 42 casos de CEO, a relação entre o índice de proliferação celular no *front* de invasão tumoral, avaliado por meio da expressão imuno-histoquímica do Ki-67, e a gradação histológica de malignidade, de acordo com os sistemas de Broders (1941) e Bryne et al. (1992) e observaram que tumores classificados como pobremente diferenciados, pelo sistema de gradação de Broders (1941), apresentavam maior média do índice de proliferação celular em comparação com tumores bem diferenciados ($p < 0.05$). De forma similar, tumores classificados como de alto grau, pelo sistema de gradação de Bryne et al. (1992), exibiram maior média do índice de proliferação celular em comparação com tumores de baixo grau. Frente aos resultados obtidos, os autores sugerem que a proliferação celular no *front* invasivo de CEOs revela uma importante associação com a gradação histológica de malignidade do tumor.

Kurokawa et al. (2005) estudaram a expressão imuno-histoquímica do Ki-67 e a p53 em 62 casos de CEO e verificaram que a média do índice de positividade para o Ki-67 era maior nas lesões positivas para a p53 (10,1%), em comparação com as lesões negativas (8,0%). Além disso, os autores constataram uma correlação significativa entre a gradação histológica de malignidade no *front* invasivo, avaliado conforme os parâmetros propostos por Bryne (1998), e o índice de positividade para o Ki-67.

Vieira et al. (2008) analisaram a expressão imuno-histoquímica do Ki-67 em relação a gradação histológica e malignidade e obtiveram, como resultado estatisticamente significativo, uma maior imunorreatividade do Ki-67 para o grupo de CE classificados como indiferenciados (60,3%) e concluíram com isso que a expressão desse marcador evidenciou relação com o índice de mitoses e conseqüentemente a proliferação celular e a gradação histológica de malignidade.

Rocha et al. (2007) compararam os índices de proliferação celular por meio de imuno-histoquímica, utilizando o anticorpo anti-Ki-67 em casos de CEOs HPV positivos e HPV negativos, e não identificaram diferenças estatisticamente significantes entre os índices de proliferação celular entre os dois grupos. Para estes autores, a participação do HPV na etiologia do CEO permanece inconclusiva.

3 PROPOSIÇÃO

Esta pesquisa objetivou comparar o índice de proliferação celular em carcinomas epidermóides de língua, por meio da expressão imuno-histoquímica do Ki-67, entre dois grupos etários constituídos de pacientes adultos com até quarenta anos e pacientes com mais de cinquenta anos de idade, assim como, avaliar possíveis diferenças no índice de proliferação celular em relação ao estadiamento clínico e a gradação histológica de malignidade das lesões. Foi realizada, também, a análise do perfil dos pacientes acometidos por esta neoplasia nestes dois grupos etários. Com este estudo, espera-se contribuir para uma melhor compreensão das possíveis diferenças entre o comportamento dos carcinomas epidermóides de língua nos grupos etários diferentes, utilizados no presente estudo.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 IMPLICAÇÕES ÉTICAS

O Projeto de Pesquisa relativo ao presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Liga Norte Riograndense Contra o Câncer (CEP/LNRCC), sendo aprovado conforme Parecer nº 051/051/2009. (Anexo)

4.2 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

O presente trabalho representou um estudo clínico, morfológico e imuno-histoquímico realizado no *front* de invasão do tumor, constituído por análise quantitativa da expressão do Ki-67 em CEs de língua, em pacientes adultos jovens e idosos. Sendo considerados no primeiro grupo pacientes com idade até quarenta anos e no segundo grupo pacientes com idade acima de 50 anos.

4.3 POPULAÇÃO

O universo desta pesquisa abrangeu os casos de CEs em língua, registrados no Hospital Dr. Luiz Antônio da Liga Norte Riograndense Contra o Câncer na cidade do Natal-RN, Brasil, no período de 2003 a 2008. A escolha dessa localização anatômica foi devido à alta frequência de acometimento descrita na literatura independentemente da idade.

4.4 AMOSTRA

A amostra foi constituída de 16 casos de CE de língua em pacientes adultos jovens com idade até 40 anos e 20 casos de pacientes adultos idosos com idade acima de 50 anos. O fato do menor número de casos no grupo de pacientes com idade até 40 anos deveu-se a dificuldade de obtenção da amostra ou pela escassez de casos dentro desta característica ou pela ausência de tumor nos blocos do material parafinado.

4.5 CRITÉRIOS DE SELEÇÃO DA AMOSTRA

4.5.1 Critérios de Inclusão

- Casos diagnosticados como CE com localização anatômica em língua incluindo suas regiões topográficas e que apresentaram material suficiente para o estudo morfológico e imuno-histoquímico;
- Casos que continham nos prontuários médicos informações em relação à idade e ao sexo dos pacientes;
- Casos de pacientes que não foram submetidos a tratamento prévio quimioterápico e radioterápico;
- Pacientes com idade acima de 18 anos, por serem adultos que não fazem parte do grupo vulnerável

4.5.2 Critérios de exclusão

- Casos que apresentaram material insuficiente para o estudo morfológico e imuno-histoquímico;
- Casos com localização anatômica fora da língua;

- Casos em que cujos prontuários médicos fossem evidenciada a ausência das informações citadas nos critérios de inclusão;
- Casos de pacientes que tivessem sido submetidos a tratamento prévio de quimioterapia e radioterapia;
- Pacientes com idade abaixo de 18 anos, por fazerem parte do grupo vulnerável

4.6 ESTUDO CLÍNICO

Os dados foram coletados dos prontuários médicos dos pacientes atendidos no Hospital Dr. Luiz Antônio, sendo estes dados referentes principalmente a idade, sexo além da informação quanto aos hábitos de tabagismo e etilismo dos pacientes, tamanho do tumor em centímetros e estadiamento clínico. Estes dados foram transcritos para uma ficha clínica previamente preparada para esta pesquisa (Apêndice A) e, posteriormente, esses parâmetros foram utilizados para análise estatística. Os dados referentes ao estadiamento clínico, quando presente no prontuário, foram classificados pelo serviço Médico e Odontológico do referido hospital de acordo com os parâmetros utilizados pela União Internacional Contra o Câncer (U.I.C.C).

4.7 METODOLOGIA

4.7.1 Estudo morfológico

Os blocos de parafina contendo as amostras cirúrgicas obtidas de biópsias excisionais foram submetidos a cortes histológicos de 5 μ de espessura e foram corados pela técnica histoquímica da hematoxilina/eosina (H/E), sendo avaliados em microscopia de luz quanto as características morfológicas e posterior gradação histológica de malignidade. A técnica de coloração pela H/E que foi utilizada seguiu o protocolo do laboratório de Patologia Oral do Departamento de Odontologia da UFRN, conforme descrita a seguir:

- Xilol I (15 minutos)
- Xilol II (15 minutos)
- Álcool etílico absoluto I (3 minutos)
- Álcool etílico absoluto II (3 minutos)
- Álcool etílico absoluto III (3 minutos)
- Água corrente (3 minutos)
- Hematoxilina de Harris (2 a 5 minutos)
- Água corrente (3 minutos)
- Eosina de Lison (1 a 2 minutos)
- Álcool etílico absoluto I (2 minutos)
- Álcool etílico absoluto II (2 minutos)
- Álcool etílico absoluto III (2 minutos)
- Xilol I (3 minutos)
- Xilol II (3 minutos)
- Xilol III (3 minutos)
- Montagem em *PermOUNT*® (Fischer Scientific, Fair Lawn, NJ, USA).

4.7.2 Análise morfológica

Os cortes histológicos foram avaliados por dois examinadores previamente treinados, que realizaram a análise histomorfológica do tumor baseada nos critérios de malignidade, conforme o sistema de gradação histológica sugerido por Bryne (1998). (Quadro 1)

Aspectos morfológicos	Escore de malignidade			
	1	2	3	4
Grau de ceratinização	Alto (mais de 50% das células)	Moderado (20 a 50% das células)	Baixo (5 a 20% das células)	Ausente (0 a 5% das células)
Pleomorfismo nuclear	Pouco (mais de 75% de células maduras)	Moderado (50 a 75% de células maduras)	Intenso (25 a 50 % de células maduras)	Extremo (0 a 25% de células maduras)
Padrão de invasão	Bordas infiltrativas bem delimitadas	Cordões, bandas e/ou trabéculas sólidas infiltrativas	Pequenos grupamentos ou cordões de células infiltrativas (N>15)	Infiltração difusa e pronunciada, em pequenos grupamentos celulares e/ou células individuais (N<15)
Infiltrado inflamatório	Intenso	Moderado	Escasso	Ausente

Quadro 1: Sistema de gradação de malignidade preconizado por Bryne (1998)

A análise das características morfológicas foi realizada no *front* invasivo sob a forma de estudo cego, sem que os examinadores soubessem a qual faixa etária pertencia o caso de CE. A finalidade foi de obter a gradação histológica de cada caso enquadrando-o em alto ou baixo grau de malignidade atribuído pelo escore de 1 a 4 para cada parâmetro morfológico, conforme consta no quadro 2. Para cada caso, foi calculado o somatório total de pontos adquiridos para cada parâmetro, obtendo a pontuação final que determinou a classificação em baixo grau (escore variando de 4 a 8 pontos) ou alto grau (escore total maior que 8 pontos), a classificação utilizada foi modificada por Miranda et al. (2002) conforme citado no estudo de Silveira et al. (2007). Os dados desta avaliação foram devidamente tabulados em ficha previamente elaborada para esta análise. (Apêndice B)

4.7.3 Estudo imuno-histoquímico

Para a técnica da imuno-histoquímica, os blocos parafinados foram submetidos a cortes de 3 μ de espessura e estes foram montados em lâminas de vidro preparadas com

adesivo à base de organossilano (3-aminopropyltriethoxi-silano, Sigma Chemical Co, St Louis, MO, USA), sendo submetidos à técnica da imunoperoxidase pelo método da estreptoavidina-biotina (LSAB, *labeled streptoavidin-biotin*) utilizando anticorpo monoclonal de rato anti-Ki-67.

Como controle positivo para o anticorpo anti-Ki-67 foi utilizado cortes histológicos de tonsilas. Como controle negativo, o anticorpo primário foi substituído por albumina de soro bovino a 1% (*BSA – Bovine Serum Albumin*) em solução tampão.

A técnica utilizada seguiu o protocolo do laboratório de Imuno-histoquímica da Disciplina de Patologia Oral do Departamento de Odontologia da UFRN, conforme descrita a seguir:

- Desparafinização do espécime em banhos de xilol:
 - Xilol I (10 minutos);
 - Xilol II (10 minutos);
- Reidratação em cadeia descendente de etanóis:
 - Álcool etílico absoluto I (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto II (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto III (5 minutos);
 - Álcool etílico 95°GL (5 minutos);
 - Álcool etílico 80°GL (5 minutos);
- Remoção de pigmentos formólicos com hidróxido de amônia a 10% em etanol 95° GL (10 minutos);
- Lavagem em água corrente por 10 minutos;
- Água destilada (2 passagens) por 5 minutos cada;
- Recuperação dos sítios antigênicos (Quadro 2);
- Lavagem em água corrente por 10 minutos;
- Água destilada (2 passagens) por 5 minutos cada;
- Duas passagens, pelo período de 10 minutos cada, em solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) a 10 volumes, para bloqueio da peroxidase endógena tecidual;
- Lavagem em água corrente por 10 minutos;
- Água destilada (2 passagens) por 5 minutos cada;
- Duas passagens em solução tampão TRIS-HCl [0,0499 mol/l] (tris-hidroximetilaminometano, Sigma Chemical, St Louis, MO, USA) com NaCl [0,1454 mol/l] pH 7,4 por 5 minutos cada;
- Incubação com o anticorpo primário (Quadro 2) 60 minutos em temperatura ambiente;

- Duas passagens em solução de TRIS/Tween 20 a 1% pH 7,4 por 5 minutos cada;
- Utilização do Kit LSAB (Dako), ref:K0690, 30 minutos em cada reagente;
- Incubação com o anticorpo secundário;
- Duas passagens em solução tampão TRIS/Tween 20 a 1% pH 7,4 por 5 minutos cada;
- Imersão em TRIS-HCl pH 7,4, duas trocas de 5 minutos cada;
- Aplicação do agente cromógeno diaminobenzidina 25 a 30 mg (3,3-diaminobenzidina, Sigma Chemical Co, St. Louis, MO, USA), diluída em 100 ml TRIS-HCl pH 7,4, acrescida de 1,2 ml de peróxido de hidrogênio (H₂O₂) a 10 volumes durante 3 minutos na câmara escura;
- Lavagem em água corrente por 10 minutos;
- Água destilada (2 passagens) por 5 minutos cada;
- Contra- coloração com hematoxilina de Harris por 10 minutos;
- Lavagem em água corrente por 10 minutos
- Água destilada (2 passagens) por 5 minutos cada;
- Desidratação em cadeia ascendente de etanóis:
 - Álcool etílico 80°GL (2 minutos);
 - Álcool etílico 95°GL (2 minutos);
 - Álcool etílico absoluto I (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto II (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto III (5 minutos);
- Diafanização em dois banhos de xilol:
 - Xilol I (2 minutos);
 - Xilol II (2 minutos);
- Montagem da lamínula contra a lâmina com resina *Permount*[®] (Fischer Scientific, Fair Lawn, NJ, USA).

Especificidade	Clone	Diluição	Fabricante	Recuperação antigênica	Tempo de incubação
Ki-67	MIB-1	1:50	DAKO Denmark	Steamer, EDTA pH 8.0, 60 minutos, 95°C.	60 minutos

Quadro 2: Especificidade do anticorpo, clone, diluição, fabricante, recuperação antigênica e tempo de incubação do anticorpo primário utilizado no estudo.

4.7.4 Análise de expressão imuno-histoquímica

A análise da expressão do anticorpo empregado no presente estudo foi realizada por um examinador, previamente calibrado, sem que o mesmo soubesse a faixa etária a que pertencia o caso de CE. Esta análise foi realizada no *front* de invasão das lesões, sob microscopia de luz (*Olympus CX31, Tokyo, Japan*), utilizando aumento de 100x para selecionar campos de maior imunorreatividade ao anticorpo anti-Ki-67. Nesses campos, sob aumento de 1.000x, foram contadas de forma aleatória e com auxílio de um aparelho de contagem (Leucotron LS-II), 1.000 células neoplásicas. Foram consideradas células positivas aquelas que apresentaram coloração acastanhada nuclear, independente da intensidade da coloração. De posse do número de células positivas neste montante de 1.000 células neoplásicas, foi estabelecido um índice de positividade (IP) para o Ki-67. Para isso, o número de células neoplásicas positivas foi multiplicado por 100 e dividido por 1.000, culminando com a obtenção de resultados percentuais. Essa avaliação foi uma adaptação da metodologia preconizada por Kurokawa et al. (2005). (Apêndice C)

$$\text{IP} = \frac{\text{Número de Células Positivas} \times 100}{1000}$$

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados obtidos dos pacientes foram organizados em tabelas feitas utilizando o programa *Microsoft Excel*, que fizeram parte de um banco de dados que foram, posteriormente, codificados e transferidos para o *software SPSS (Statistical Package for Social Science version 17,0 for Windows XP, Chicago Illinois, USA)*. Esses dados foram submetidos a teste estatístico não paramétrico de *Mann-Whitney* (com nível de significância de 5%) e Qui-quadrado com o objetivo de verificar as hipóteses levantadas na presente pesquisa.

Para analisar a variável independente estadiamento clínico, as lesões foram categorizadas em dois grupos: grupo I compreendia os estágios I e II da doença e o grupo II foi composto pelos estágios III e IV da doença.

O teste de Qui-quadrado foi utilizado para averiguar prováveis diferenças estatísticas entre os grupos estudados em relação à metástase regional e à distância, estadiamento clínico categorizado, gradação histológica de malignidade; bem como entre estadiamento clínico categorizado e gradação histológica de malignidade.

O teste de *Mann-Whitney* foi aplicado para verificar possíveis diferenças estatísticas entre os índices de positividade para o Ki-67, em relação à faixa etária dos pacientes, gradação histológica de malignidade, presença ou ausência de metástase e estadiamento clínico categorizado.

4.9 VARIÁVEIS ESTUDADAS

As variáveis dependentes e independentes avaliadas nesta pesquisa, inseridas no contexto do trabalho, estão demonstradas no quadro a seguir.

Variável	Categoria	Classe
Sexo	1- Feminino 2- Masculino	Categórica nominal
Idade	1- Grupo com idade até 40 anos 2- Grupo acima de 50 anos	Categórica nominal
Hábito	1- Tabagismo 2- Etilismo 3- Tabagismo e Etilismo 4- Ausente	Categórica nominal
Tamanho do tumor	1- 0 a 3 cm 2- 3 a 6 cm 3- Acima de 6 cm	Categórica nominal
TNM	1- Estágio I 2- Estágio II 3- Estágio III 4- Estágio IV	Categórica nominal
Gradação histológica de malignidade	1- Alto 2- Baixo	Categórica nominal
Biomarcador Ki-67	Contagem de células	Quantitativa discreta

Quadro 3: Variáveis independentes e dependente.

5 RESULTADOS

5.1 ANÁLISE DOS DADOS CLÍNICOS

O grupo de pacientes com até 40 anos de idade foi caracterizado pelo acometimento preferencial do sexo masculino ($n = 10$; 62,5%), com uma proporção entre homens e mulheres de 1,66: 1. Os casos foram diagnosticados em indivíduos com 19 e 40 anos inclusive, com uma idade média de 33,50 anos (Tabela 1). Ao analisar a idade dos pacientes em relação ao sexo, esta revelou uma média de idade de 35,70 anos para homens e de 29,83 anos para mulheres (Tabela 1). Com relação à faixa etária, constatou-se predomínio dos casos na 4ª década de vida ($n = 12$; 75,0%). Quando se relacionou esse dado com a variável “sexo”, a 4ª década de vida foi a mais frequente para os homens ($n = 9$; 90,0%) enquanto que, para as mulheres, constatou-se que a metade encontrava-se na 4ª década de vida ($n = 3$; 50,0%) (Tabela 2).

O grupo de pacientes com mais de 50 anos também foi mais frequente em indivíduos do sexo masculino ($n = 13$; 65,0%), com uma proporção entre homens e mulheres de 1,86: 1. Os casos foram diagnosticados em indivíduos com 52 e 96 anos inclusive, com uma idade média de 67,35 anos (Tabela 1). A análise da idade dos pacientes em relação ao sexo revelou uma média de idade de 65,92 anos para homens e de 70 anos para mulheres (Tabela 1). Com relação à faixa etária, constatou-se predomínio dos casos na 6ª década de vida ($n = 8$; 40,0%). Ao analisar esse dado em relação ao sexo, a 6ª década de vida foi a mais frequente para os homens ($n = 7$; 53,8%). Por sua vez, para as mulheres, a 8ª década foi a mais comum ($n = 3$; 42,9%) (Tabela 2).

Tabela 1 – Tamanho da amostra, variação e média de idade (em anos), desvio padrão e intervalo de confiança (IC) nos grupos de pacientes jovens e idosos em relação ao sexo dos pacientes. Natal-RN, 2010

Grupo	Sexo	N	Varição	Média	Desvio padrão	IC (95%)
≤ 40 anos	M	10	27 – 39	35,70	3,91	32,90 – 38,50
	F	6	19 – 40	29,83	8,28	21,14 – 38,52
	Total	16	19 – 40	33,50	6,37	30,10 – 36,90
> 50 anos	M	13	52 – 96	65,92	14,26	57,30 – 74,54
	F	7	53 – 90	70,00	12,12	58,79 – 81,21
	Total	20	52 – 96	67,35	13,37	61,09 – 73,61

Fonte: Hospital Dr. Luiz Antônio, 2003-2008, Brasil, Natal-RN

Legenda: M – Masculino; F – Feminino

Tabela 2 – Distribuição dos casos nos grupos de pacientes jovens e idosos, de acordo com a faixa etária e sexo dos pacientes. Natal-RN, 2010

Grupo	Faixa etária	Sexo				Total	
		Masculino		Feminino		n	%
		n	%	n	%		
≤ 40 anos	11 – 20 anos	0	0,0	1	16,7	1	6,3
	21 – 30 anos	1	10,0	2	33,3	3	18,8
	31 – 40 anos	9	90,0	3	50,0	12	75,0
	Total	10	100,0	6	100,0	16	100,0
> 50 anos	51 – 60 anos	7	53,8	1	14,3	8	40,0
	61 – 70 anos	2	15,4	2	28,6	4	20,0
	71 – 80 anos	1	7,7	3	42,9	4	20,0
	81 – 90 anos	2	15,4	1	14,3	3	15,0
	91 – 100 anos	1	7,7	0	0,0	1	5,0
	Total	13	100,0	7	100,0	20	100,0

Fonte: Hospital Dr. Luiz Antônio, 2003-2008, Brasil, Natal-RN

Ao analisar a distribuição topográfica dos casos foi verificado que esta informação encontrava-se descrita em nove casos (56,3%) do grupo de pacientes com até 40 anos. Deste total, constatou-se como localização mais frequente a borda lateral da língua (n = 6; 66,7%), seguida pelo ventre (n = 2; 22,2%) (Tabela 3). Ao analisar a região da língua mais acometida em relação ao sexo dos pacientes, a borda lateral foi a mais frequente para os

homens (n = 4; 80,0%). Para as mulheres, as frequências foram iguais para a borda lateral (n = 2; 50,0%) e para o ventre (n = 2; 50,0%) (Tabela 3).

Em relação ao grupo de pacientes com mais de 50 anos de idade, a informação da distribuição topográfica na língua estava disponível em 19 casos (95,0%). Deste total, evidenciou-se como localização mais comum a borda lateral (n = 12; 63,2%), seguida pela base (n = 4; 21,1%) (Tabela 3). Ao analisar esta variável em relação ao sexo dos pacientes, verificou-se que a borda lateral se apresentou como sítio mais comum, tanto para homens (n = 9; 75,0%) como para mulheres (n = 3; 42,9%). Para as regiões de ventre, base e ápice, as mulheres apresentaram distribuição igual (n = 1; 14,3%), enquanto os homens, uma maior frequência na base de língua (n = 3; 25,0%) (Tabela 3).

Tabela 3 – Distribuição dos casos nos grupos de pacientes jovens e idosos, de acordo com a região topográfica da língua e sexo dos pacientes. Natal-RN, 2010

Grupo	Região topográfica	Sexo				Total	
		Masculino		Feminino		n	%
		n	%	n	%		
≤ 40 anos	Borda lateral	4	80,0	2	50,0	6	66,7
	Ventre	0	0,0	2	50,0	2	22,2
	Base	1	20,0	0	0,0	1	11,1
	Total*	5	100,0	4	100,0	9	100,0
> 50 anos	Borda lateral	9	75,0	3	42,9	12	63,2
	Ventre	0	0,0	1	14,3	1	5,3
	Base	3	25,0	1	14,3	4	21,1
	Ápice	0	0,0	1	14,3	1	5,3
	Borda lateral e dorso	0	0,0	1	14,3	1	5,3
	Total**	12	100,0	7	100,0	19	100,0

Fonte: Hospital Dr. Luiz Antônio, 2003-2008, Brasil, Natal-RN

*07 casos não apresentavam essa informação

**01 caso não apresentava essa informação

Com respeito à presença ou não dos hábitos de risco (tabagismo ou etilismo), para todos os casos válidos (n= 13; 81,25%) no grupo de pacientes com até 40 anos, somente dois casos (15,4%) relataram ausência e três casos (18,75%) não continham esse dado no prontuário (Tabela 4). No geral, o grupo apresentou como hábito mais frequente o tabagismo e etilismo associados (n = 8; 72,7%), seguido pelo uso isolado do fumo (n = 2; 18,2%) (Tabela 5). Todos os homens (n = 9; 100,0 %) apresentavam algum tipo de hábito. O mais

frequente foi o fumo e o consumo de álcool de forma conjunta (n = 8; 88,9%), seguido pelo tabagismo (n = 1; 11,1%). Para as mulheres, a frequência foi igual tanto para os hábitos de tabagismo (n = 1; 50%) quanto etilismo (n = 1; 50,0%) (Tabela 5).

No grupo de pacientes com mais de 50 anos, considerando a presença ou não de hábitos dos pacientes, para todos os casos válidos (n = 19; 95,0%) no estudo verificou-se que somente dois casos (10,5%) relataram ausência de hábitos (Tabela 4). No geral, o grupo apresentou como hábito mais frequente o tabagismo associado ao etilismo (n = 9; 52,9%), seguido pelo tabagismo isolado (n = 7; 41,2%) (Tabela 5). Todos os homens (n = 13; 100,0%) apresentavam algum tipo de hábito, sendo mais frequente o tabagismo associado ao etilismo (n = 9; 69,2%), seguido pelo hábito de fumar isoladamente (n = 3; 23,1%). Em relação aos pacientes do sexo feminino, informações a respeito do tipo de hábito foram constatadas em quatro casos (66,7%), sendo em todos estes (n = 4; 100,0%) reportado o hábito do tabagismo (Tabela 5).

Tabela 4 – Distribuição dos casos nos grupos de pacientes jovens e idosos, de acordo com a presença ou ausência de hábito e sexo dos pacientes. Natal-RN, 2010

Grupo	Hábito	Sexo				Total	
		Masculino		Feminino		n	%
		n	%	n	%		
≤ 40 anos	Presente	9	100,0	2	50,0	11	84,6
	Ausente	0	0,0	2	50,0	2	15,4
	Total*	9	100,0	4	100,0	13	100,0
> 50 anos	Presente	13	100,0	4	66,7	17	89,5
	Ausente	0	0,0	2	33,3	2	10,5
	Total**	13	100,0	6	100,0	19	100,0

Fonte: Hospital Dr. Luiz Antônio, 2003-2008, Brasil, Natal-RN

*03 casos não apresentavam essa informação

**01 caso não apresentava essa informação

Tabela 5 – Distribuição dos casos nos grupos nos grupos de pacientes jovens e idosos, de acordo com o tipo de hábito relatado e sexo dos pacientes. Natal-RN, 2010

Grupo	Tipo de Hábito	Sexo				Total	
		Masculino		Feminino		n	%
		n	%	n	%		
≤ 40 anos	Tabagismo	1	11,1	1	50,0	2	18,2
	Etilismo	0	0,0	1	50,0	1	9,1
	Tabagismo e etilismo	8	88,9	0	0,0	8	72,7
	Total*	9	100,0	2	100,0	11	100,0
> 50 anos	Tabagismo	3	23,1	4	100,0	7	41,2
	Etilismo	1	7,7	0	0,0	1	5,9
	Tabagismo e etilismo	9	69,2	0	0,0	9	52,9
	Total**	13	100,0	4	100,0	17	100,0

Fonte: Hospital Dr. Luiz Antônio, 2003-2008, Brasil, Natal-RN

*05 casos não apresentavam essa informação

**03 casos não apresentavam essa informação

Em relação à presença ou não de metástase regional, do total de casos que apresentavam esta informação (casos válidos neste estudo) ($n = 13$; 75,0%) para o grupo de pacientes com até 40 anos, a presença de lesões metastáticas foi evidenciada em nove casos (69,2%) (Tabela 6). Por sua vez, para o grupo de pacientes com idade acima de 50 anos, do total de casos válidos ($n = 19$; 95,0%), a ausência de metástase foi o achado predominante ($n = 13$; 68,4%) (Tabela 6). A análise estatística, aplicando o teste do Qui-quadrado, revelou associação significativa entre a presença de metástase regional e os pacientes com idade até 40 anos ($p = 0,036$) (Tabela 7).

Tabela 6 – Distribuição dos casos nos grupos de pacientes jovens e idosos, de acordo com a presença ou ausência de metástase regional e sexo dos pacientes. Natal-RN, 2010

Grupo	Metástase regional	Sexo				Total	
		Masculino		Feminino		n	%
		n	%	n	%		
≤ 40 anos	Presente	7	87,5	2	40,0	9	69,2
	Ausente	1	12,5	3	60,0	4	30,8
	Total*	8	100,0	5	100,0	13	100,0
> 50 anos	Presente	5	38,5	1	16,7	6	31,6
	Ausente	8	61,5	5	83,3	13	68,4
	Total**	13	100,0	6	100,0	19	100,0

Fonte: Hospital Dr. Luiz Antônio, 2003-2008, Brasil, Natal-RN

*03 casos não apresentavam essa informação

**01 caso não apresentava essa informação

Tabela 7 – Distribuição absoluta e relativa e significância estatística da presença ou ausência de metástase regional em relação aos grupos de pacientes jovens e idosos. Natal-RN, 2010

Grupo	Metástase regional		Total n (%)	χ^2	p
	Presente	Ausente			
	n (%)	n (%)			
≤ 40 anos	9 (69,2)	4 (30,8)	13 (100,0)	4,394	0,036
> 50 anos	6 (31,6)	13 (68,4)	19 (100,0)		

Fonte: Hospital Dr. Luiz Antônio, 2003-2008, Brasil, Natal-RN

Quando da análise da variável presença ou não de metástase à distância, no grupo de pacientes com até 40 anos, considerando o total de casos válidos (n = 12; 75,0%) foi evidenciado que predominou os casos com ausência de metástase à distância (n = 11; 91,7%) (Tabela 8). De forma similar, quando da análise no grupo de pacientes com idade acima de 50 anos, levando-se em consideração o total de casos válidos (n = 16; 8%), foi constatado predomínio de ausência de metástases à distância (n = 15; 93,8%) (Tabela 8). A análise estatística realizada aplicando o teste do Qui-quadrado não demonstrou diferenças significativas entre os grupos de pacientes jovens e idosos em relação à presença ou ausência de metástase à distância (p = 0,832) (Tabela 9).

Tabela 8 – Distribuição dos casos nos grupos de pacientes jovens e idosos, de acordo com a metástase à distância e sexo dos pacientes. Natal-RN, 2010

Grupo	Metástase à distância	Sexo				Total	
		Masculino		Feminino		n	%
		n	%	n	%		
≤ 40 anos	Presente	1	12,5	0	0,0	1	8,3
	Ausente	7	87,5	4	100,0	11	91,7
	Total*	8	100,0	4	100,0	12	100,0
> 50 anos	Presente	1	10,0	0	0,0	1	6,3
	Ausente	9	90,0	6	100,0	15	93,8
	Total**	10	100,0	6	100,0	16	100,0

Fonte: Hospital Dr. Luiz Antônio, 2003-2008, Brasil, Natal-RN

*04 casos não apresentavam essa informação

**04 casos não apresentavam essa informação

Tabela 9 – Distribuição absoluta e relativa e significância estatística da presença ou ausência de metástase à distância em relação aos grupos de pacientes jovens e idosos. Natal-RN, 2010

Grupo	Metástase à distância		Total n (%)	χ^2	p
	Presente	Ausente			
	n (%)	n (%)			
≤ 40 anos	1 (8,3)	11 (91,7)	12 (100,0)	0,045	0,832
> 50 anos	1 (6,3)	15 (93,8)	16 (100,0)		

Fonte: Hospital Dr. Luiz Antônio, 2003-2008, Brasil, Natal-RN

Outro aspecto analisado no presente estudo foi o tamanho do tumor sendo evidenciado que no grupo de pacientes com idade até 40 anos, o tamanho dos tumores variou de 0,6 cm a 7,0 cm, apresentando uma média de 3,29 cm (Tabela 10). No grupo de pacientes com idades acima dos 50 anos, o tamanho das lesões variou de 1,3 cm a 9,5 cm, com uma média de 3,24 cm (Tabela 10).

Tabela 10 – Tamanho da amostra, variação e média do tamanho do tumor (em cm), desvio padrão e intervalo de confiança (IC) nos grupos de pacientes jovens e idosos em relação ao sexo dos pacientes. Natal-RN, 2010

Grupo	Sexo	n	Varição	Média	Desvio padrão	IC (95%)
≤ 40 anos	M	10	0,6 – 7,0	3,49	2,42	1,75 – 5,22
	F	6	1,1 – 6,5	2,96	2,55	0,28 – 5,64
	Total	16	0,6 – 7,0	3,29	2,40	2,01 – 4,57
> 50 anos	M	13	2,0 – 9,5	3,53	1,96	2,35 – 4,72
	F	7	1,3 – 4,0	2,68	1,03	1,72 – 3,64
	Total	20	1,3 – 9,5	3,24	1,71	2,43 – 4,04

Fonte: Hospital Dr. Luiz Antônio, 2003-2008, Brasil, Natal-RN

Legenda: M – Masculino; F – Feminino

Informação a respeito do estadiamento clínico foi constatada na maioria dos casos do grupo de pacientes com até 40 anos (n = 14; 87,5%). Considerando-se o total de casos válidos para este grupo, o estágio III foi o mais frequente (n = 6; 42,9%), seguido pelo estágio IV (n = 5; 35,7%) (Tabela 11). Para o grupo de pacientes com mais de 50 anos, o estágio II foi o mais frequente (n = 8; 40,0%), seguido pelo estágio I (n = 5; 25,0%) (Tabela 11).

Tabela 11 – Distribuição dos casos nos grupos de pacientes jovens e idosos, de acordo com o estadiamento clínico e sexo dos pacientes. Natal-RN, 2010

Grupo	Estadiamento clínico	Sexo				Total	
		Masculino		Feminino		n	%
		n	%	n	%		
≤ 40 anos	Estágio I	0	0,0	1	20,0	1	7,1
	Estágio II	1	11,1	1	20,0	2	14,3
	Estágio III	5	55,6	1	20,0	6	42,9
	Estágio IV	3	33,3	2	40,0	5	35,7
	Total*	9	100,0	5	100,0	14	100,0
> 50 anos	Estágio I	2	15,4	3	42,9	5	25,0
	Estágio II	5	38,5	3	42,9	8	40,0
	Estágio III	2	15,4	1	14,3	3	15,0
	Estágio IV	4	30,8	0	0,0	4	20,0
	Total	13	100,0	7	100,0	20	100,0

Fonte: Hospital Dr. Luiz Antônio, 2003-2008, Brasil, Natal-RN

* 02 casos não apresentavam essa informação

Com o intuito de verificar possíveis diferenças entre os grupos de pacientes com idades até 40 anos e acima dos 50 anos em relação ao estadiamento clínico, os casos pertencentes aos estágios I e II foram reunidos em um único grupo. De forma similar, os casos que pertenciam aos estágios III e IV foram agrupados em uma única categoria. Após esse procedimento, constatou-se que a maioria dos pacientes com até 40 anos se apresentava nos estágios III e IV ($n = 11$; 78,6%). Por sua vez, a maior proporção dos indivíduos acima de 50 anos se apresentou nos estágios I e II ($n = 13$; 65,0%). A análise estatística aplicando o teste do Qui-quadrado revelou associação significativa do grupo de pacientes com idade até 40 anos com estágios clínicos mais avançados ($p = 0,012$) (Tabela 12).

Tabela 12 – Distribuição absoluta e relativa e significância estatística do estadiamento clínico categorizado em relação aos grupos de pacientes jovens e idosos. Natal-RN, 2010

Grupo	Estadiamento clínico		Total n (%)	χ^2	<i>p</i>
	Estágio I/ II n (%)	Estágio III/ IV n (%)			
≤ 40 anos	3 (21,4)	11 (78,6)	14 (100,0)	6,275	0,012
> 50 anos	13 (65,0)	7 (35,0)	20 (100,0)		

Fonte: Hospital Dr. Luiz Antônio, 2003-2008, Brasil, Natal-RN

5.2 ANÁLISE DOS DADOS MORFOLÓGICOS

Os dados referentes à gradação histológica encontram-se expressos em tabelas tanto para os pacientes com até 40 anos (Tabela 13) e (Figura 1) como para o grupo de pacientes com idade acima de 50 anos (Tabela 14) e (Figura 1).

Tabela 13 – Escores e gradação histológica de malignidade dos casos de Carcinoma Epidermóide de língua em pacientes jovens. Natal-RN, 2010

Caso	Grau de ceratinização	Pleomorfismo nuclear	Padrão de invasão	Infiltrado inflamatório	Escore total	Gradação histológica
1	3	2	1	3	09	Alto grau
2	3	2	2	3	10	Alto grau
3	1	1	2	1	05	Baixo grau
4	2	2	3	3	10	Alto grau
5	2	2	2	3	09	Alto grau
6	4	2	2	2	10	Alto grau
7	4	2	2	3	11	Alto grau
8	1	1	3	1	06	Baixo grau
9	3	2	3	3	11	Alto grau
10	1	1	2	1	05	Baixo grau
11	1	1	2	2	06	Baixo grau
12	1	1	1	3	06	Baixo grau
13	1	2	2	3	08	Baixo grau
14	3	3	3	2	11	Alto grau
15	4	3	3	3	13	Alto grau
16	2	2	1	1	06	Baixo grau

Fonte: Hospital Dr. Luiz Antônio, 2003-2008, Brasil, Natal-RN

Tabela 14 – Escores e gradação histológica de malignidade dos casos de Carcinoma Epidermóide de língua em pacientes idosos. Natal-RN, 2010

Caso	Grau de ceratinização	Pleomorfismo nuclear	Padrão de invasão	Infiltrado inflamatório	Escore total	Gradação histológica
1	2	2	1	2	07	Baixo grau
2	3	3	2	2	10	Alto grau
3	1	3	3	2	09	Alto grau
4	3	3	3	1	10	Alto grau
5	3	3	1	2	09	Alto grau
6	3	3	2	1	09	Alto grau
7	2	2	3	1	08	Baixo grau
8	1	1	2	2	06	Baixo grau
9	3	2	2	2	09	Alto grau
10	1	1	2	1	05	Baixo grau
11	2	2	2	1	07	Baixo grau
12	1	2	2	2	07	Baixo grau
13	3	3	2	1	09	Alto grau
14	2	2	2	2	08	Baixo grau
15	1	1	1	1	04	Baixo grau
16	3	3	2	2	09	Alto grau
17	3	4	2	1	10	Alto grau
18	1	2	1	1	05	Baixo grau
19	3	3	3	3	12	Alto grau
20	1	1	2	1	05	Baixo grau

Fonte: Hospital Dr. Luiz Antônio, 2003-2008, Brasil, Natal-RN

Para o grupo de pacientes com idade até 40 anos, constatou-se uma frequência maior dos casos classificados em alto grau de malignidade ($n = 9$; 56,2%) (Tabela 15). Para o grupo de pacientes com idade acima de 50 anos, a distribuição foi homogênea, apresentando 10 casos (50,0%) classificados em alto grau de malignidade e 10 casos (50,0%) classificados em baixo grau de malignidade (Tabela 15). A análise estatística aplicando o teste do Qui-quadrado não demonstrou diferenças significativas entre os grupos de pacientes jovens e idosos em relação à gradação histológica de malignidade dos tumores ($p = 0,739$) (Tabela 16).

Tabela 15 – Distribuição dos casos nos grupos de pacientes jovens e idosos, de acordo com a gradação histológica de malignidade e sexo dos pacientes. Natal-RN, 2010

Grupo	Gradação histológica	Sexo				Total	
		Masculino		Feminino		n	%
		n	%	n	%		
≤ 40 anos	Alto grau	7	70,0	2	33,3	9	56,2
	Baixo grau	3	30,0	4	66,7	7	43,8
	Total	10	100,0	6	100,0	16	100,0
> 50 anos	Alto grau	7	53,8	3	42,9	10	50,0
	Baixo grau	6	46,2	4	57,1	10	50,0
	Total	13	100,0	7	100,0	20	100,0

Fonte: Hospital Dr. Luiz Antônio, 2003-2008, Brasil, Natal-RN

Tabela 16 – Distribuição absoluta e relativa e significância estatística da gradação histológica de malignidade em relação aos grupos de pacientes jovens e idosos. Brasil, Natal-RN, 2010

Grupo	Gradação histológica		Total n (%)	χ^2	<i>p</i>
	Alto grau	Baixo grau			
	n (%)	n (%)			
≤ 40 anos	9 (56,3)	7 (43,8)	16 (100,0)	0,139	0,739
> 50 anos	10 (50,0)	10 (50,0)	20 (100,0)		

Fonte: Hospital Dr. Luiz Antônio, 2003-2008, Brasil, Natal-RN

Com intuito de verificar possíveis diferenças entre gradação histológica de malignidade dos tumores em relação ao estadiamento clínico, os casos pertencentes aos estágios I e II foram reunidos em um único grupo. De forma similar, os casos que pertenciam aos estágios III e IV foram agrupados em uma única categoria. Após esse procedimento, constatou-se que a maioria dos tumores nos estágios I e II ($n = 12$; 75%) revelava um baixo grau de malignidade, ao passo que a maior proporção das lesões nos estágios III e IV ($n = 14$; 77,8%) exibia um alto grau de malignidade. A análise estatística aplicando o teste do Qui-quadrado revelou associação significativa entre estágios clínicos mais avançados e a presença de tumores com alto grau histológico de malignidade ($p = 0,002$) (Tabela 17).

Tabela 17 – Distribuição absoluta e relativa e significância estatística da gradação histológica de malignidade em relação ao estadiamento clínico categorizado. Natal-RN, 2010

Estadiamento clínico	Gradação histológica		Total n (%)	χ^2	<i>p</i>
	Alto grau n (%)	Baixo grau n (%)			
Estágio I/II	4 (25,0)	12 (75,0)	16 (100,0)	9,471	0,002
Estágio III/IV	14 (77,8)	4 (22,2)	18 (100,0)		

Fonte: Hospital Dr. Luiz Antônio, 2003-2008, Brasil, Natal-RN

5.3 ANÁLISE DA IMUNORREATIVIDADE DO Ki-67

A análise da expressão do Ki-67, por meio do índice de positividade (IP), foi realizada no *front* de invasão da lesão de acordo com a metodologia proposta para esta pesquisa. Em relação ao grupo de pacientes com idade até 40 anos, os tumores apresentaram IPs entre 26,5% e 61,4%, com uma média de 45,28%. Por sua vez, no grupo de pacientes com idade acima de 50 anos, as lesões apresentaram IPs entre 9,0% e 59,4%, com uma média de 42,5%. A análise comparativa dos IPs para o Ki-67 entre os grupos de pacientes jovens e idosos, realizada por meio do teste não-paramétrico de *Mann-Whitney*, não revelou diferença estatisticamente significativa ($p = 0,494$) (Tabela 18) (Figura 2).

Tabela 18 – Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média e soma dos postos, estatística U e significância estatística para o índice de positividade (IP), em relação aos grupos de pacientes jovens e idosos. Natal, RN – 2010

Grupo	n	Mediana	Q ₂₅ -Q ₇₅	Média dos postos	Soma dos postos	U	<i>p</i>
≤ 40 anos	16	44,25	40,87–53,25	19,84	317,50	138,50	0,494
> 50 anos	20	44,15	37,60–48,20	17,43	348,50		

Fonte: Hospital Dr. Luiz Antônio, 2003-2008, Brasil, Natal-RN

Ao avaliar os IPs de todos os casos estudados em relação à gradação histológica, constatou-se, para as lesões com alto grau de malignidade, uma variação de 9,0% a 61,40%, com uma média de 45,76%. Por sua vez, para os casos classificados como de baixo grau de malignidade, evidenciou-se uma variação no IP de 26,5% a 54,3%, com uma média de 41,47%. A análise comparativa dos IPs para o Ki-67 em relação à gradação histológica de malignidade dos tumores, realizada por meio do teste não-paramétrico de *Mann-Whitney*, não revelou diferença estatisticamente significativa entre lesões de alto grau e lesões de baixo grau de malignidade ($p = 0,076$) (Tabela 19).

Tabela 19 – Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média e soma dos postos, estatística U e significância estatística para o índice de positividade (IP), em relação à gradação histológica de malignidade dos tumores. Natal, RN – 2010

Grau histológico	n	Mediana	Q ₂₅ -Q ₇₅	Média dos postos	Soma dos postos	U	<i>p</i>
Alto grau	19	48,20	40,20–56,20	21,45	407,50	105,50	0,076
Baixo grau	17	42,00	37,90–46,85	15,21	258,50		

Fonte: Hospital Dr. Luiz Antônio, 2003-2008, Brasil, Natal-RN

Ao comparar o IP dos casos válidos estudados em relação à presença ou ausência de metástase regional, constatou-se, nos casos com presença de metástase, uma variação no IP de 9,0 % a 61,4%, com uma média de 43,05%. Para os casos sem metástase regional, foi possível observar uma variação no IP de 28,1 % a 59,4%, com uma média de 43,61%. A análise comparativa dos IPs para o Ki-67 em relação à presença ou ausência de metástase, realizada por meio do teste não-paramétrico de *Mann-Whitney*, não revelou diferença estatisticamente significativa entre lesões com ou sem metástase ($p = 0,734$) (Tabela 20).

Tabela 20 – Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média e soma dos postos, estatística U e significância estatística para o índice de positividade (IP), em relação à presença ou ausência de metástase regional. Natal, RN – 2010

Metástase	n	Mediana	Q ₂₅ -Q ₇₅	Média dos postos	Soma dos postos	U	p
Presente	15	46,30	36,10 – 53,90	17,10	256,50	118,50	0,734
Ausente	17	42,80	39,35 – 48,20	15,97	271,50		

Fonte: Hospital Dr. Luiz Antônio, 2003-2008, Brasil, Natal-RN

Ao comparar o IP dos casos válidos estudados em relação à presença ou ausência de metástase à distância, observou-se, nos casos com presença de metástase, uma variação no IP de 48,2 % a 51,3%, com uma média de 49,75%. Para os casos sem metástase à distância, foi possível observar uma variação no IP de 9,0% a 61,4%, com uma média de 42,21%. A análise comparativa dos IPs para o Ki-67 em relação à presença ou ausência de metástase, realizada por meio do teste não-paramétrico de *Mann-Whitney*, não revelou diferença estatisticamente significativa entre lesões com ou sem metástase ($p = 0,181$) (Tabela 21).

Tabela 21 – Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média e soma dos postos, estatística U e significância estatística para o índice de positividade (IP), em relação à presença ou ausência de metástase à distância. Natal, RN – 2010

Metástase	n	Mediana	Q ₂₅ -Q ₇₅	Média dos postos	Soma dos postos	U	p
Presente	2	49,75	40,20 –	22,00	44,00	11,00	0,181
Ausente	26	42,40	36,50 – 48,70	13,92	362,00		

Fonte: Hospital Dr. Luiz Antônio, 2003-2008, Brasil, Natal-RN

Por sua vez, quando se comparou o IP dos casos válidos estudados em relação ao estadiamento clínico, constatou-se, no grupo constituído pelos estágios I/II, uma variação no IP de 28,1% a 59,4%, com uma média de 43,11%. Para o grupo composto pelos estágios III/IV, foi possível observar uma variação no IP de 9,0 % a 61,4%, com uma média de

43,46%. A análise comparativa dos IPs para o Ki-67 em relação ao estadiamento clínico categorizado dos tumores, realizada por meio do teste não-paramétrico de *Mann-Whitney*, não revelou diferença estatisticamente significativa entre os grupos ($p = 0,617$) (Tabela 22).

Tabela 22 – Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média e soma dos postos, estatística U e significância estatística para o índice de positividade (IP), em relação ao estadiamento clínico categorizado. Natal, RN – 2010

Estadiamento clínico	n	Mediana	Q ₂₅ -Q ₇₅	Média dos postos	Soma dos postos	U	p
Estágio I/II	16	42,40	37,60 – 48,20	16,59	265,50	129,50	0,617
Estágio III/IV	18	45,85	39,17 – 51,95	18,31	329,50		

Fonte: Hospital Dr. Luiz Antônio, 2003-2008, Brasil, Natal-RN

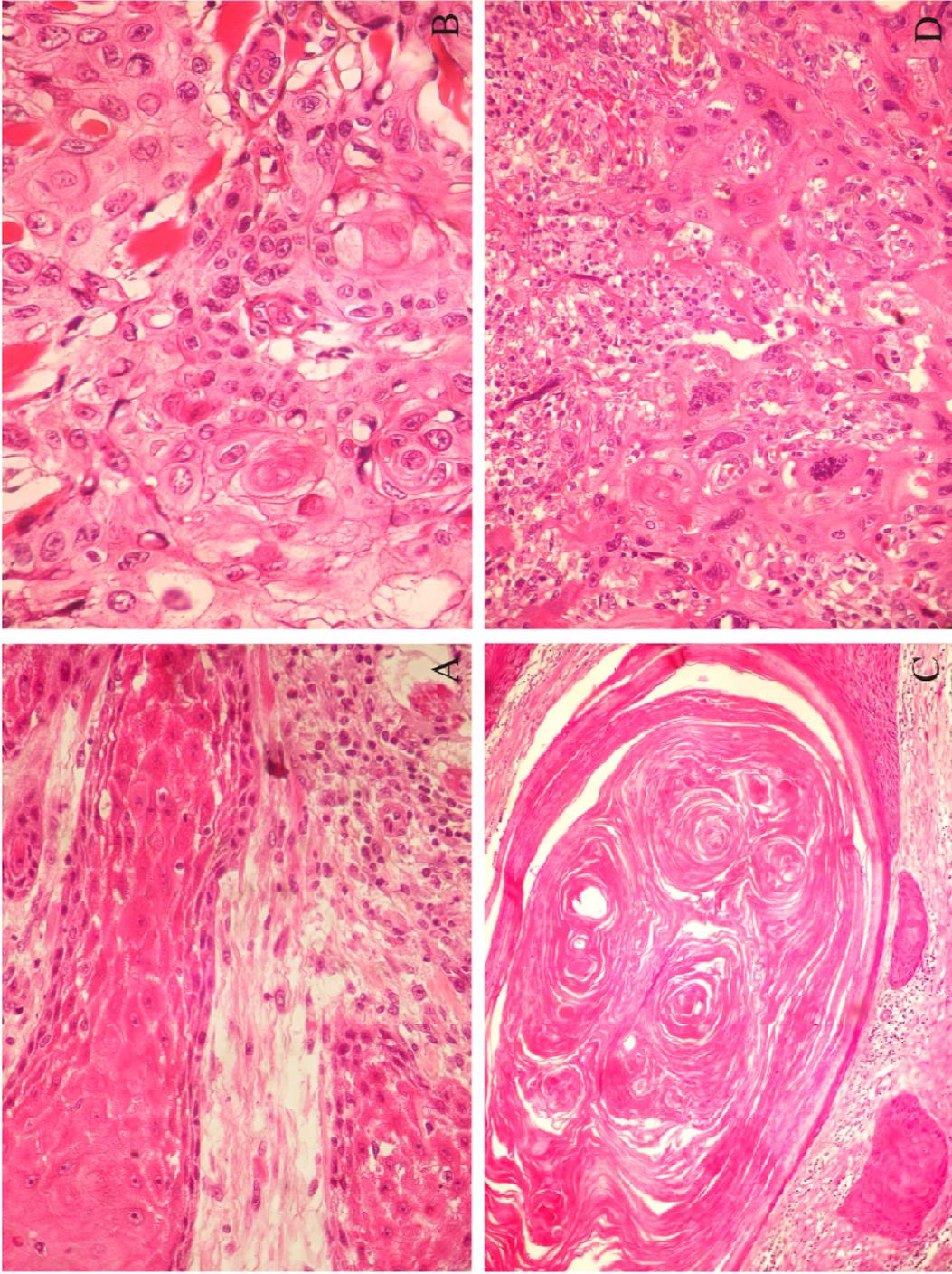


Figura 1 – A e B - carcinoma epidermóide de língua em pacientes com até 40 anos de idade. A - baixo grau de malignidade (H/E, 400x); B - alto grau de malignidade (H/E, 400x); C e D - carcinoma epidermóide de língua em pacientes acima dos 50 anos de idade. C - baixo grau de malignidade (H/E, 100x); D - alto grau de malignidade (H/E, 400x).

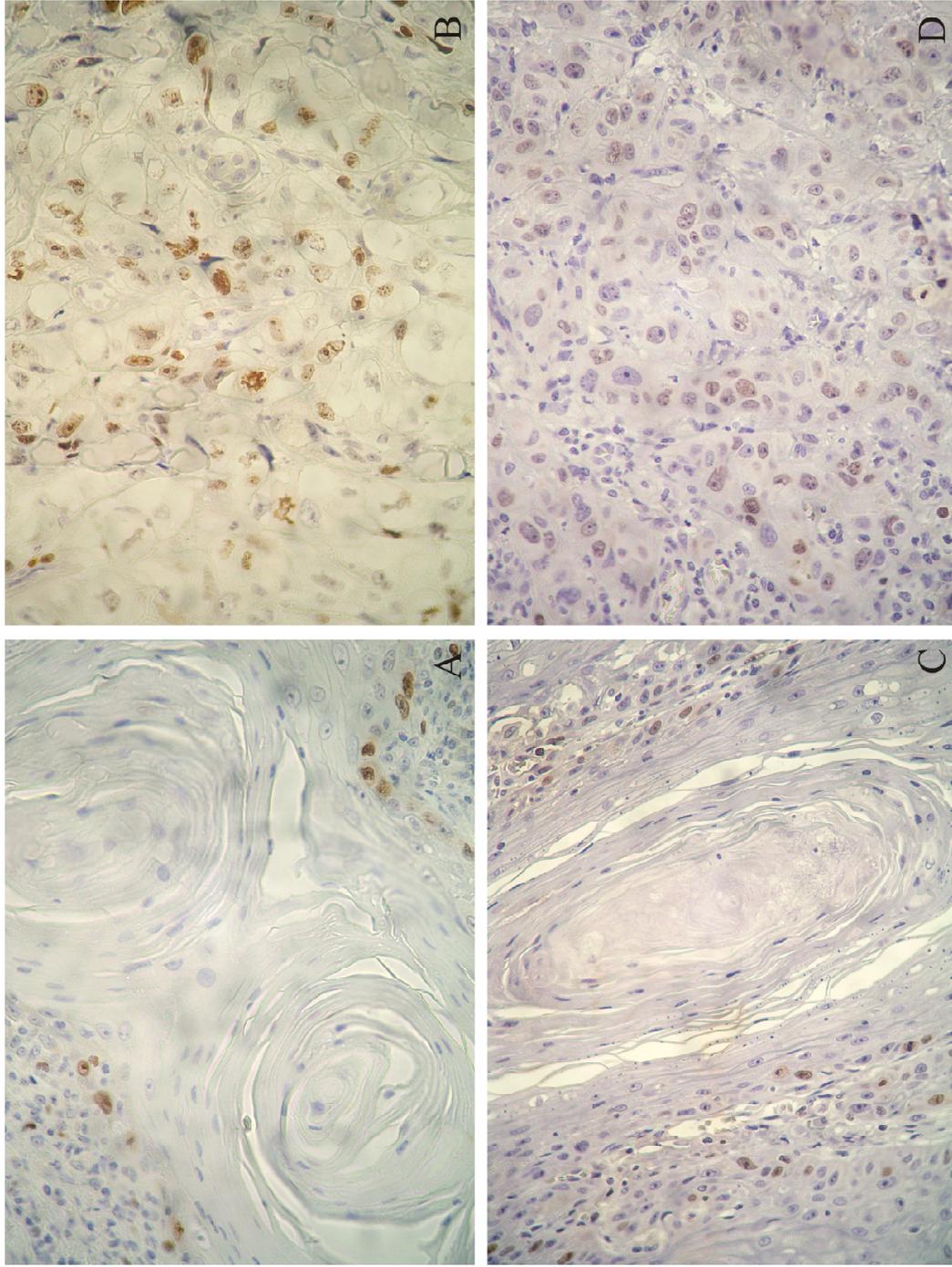


Figura 2 – A e B - Imunomarcagem nuclear do Ki-67 nas células malignas de carcinoma epidermóide de língua em pacientes com até 40 anos de idade. A - baixo grau de malignidade (I.S.A.B, 400x); B - alto grau de malignidade (I.S.A.B, 400x); C e D - Imunorreatividade do Ki-67 nas células malignas de carcinoma epidermóide de língua em pacientes acima dos 50 anos de idade. C - baixo grau de malignidade

6 DISCUSSÃO

O CE é a neoplasia maligna mais comum da cavidade oral, correspondendo a mais de 90% de todos os cânceres orais. Segundo o Instituto Nacional do Câncer brasileiro (INCA), espera-se para o ano de 2010 um total de 14.120 novos casos para todo o país (INCA, 2010). Mundialmente, tem-se observado um aumento na incidência dessa neoplasia mas, em alguns países, como Índia, Paquistão e Tailândia há uma prevalência significativamente mais alta (IAMAROON et al., 2004).

Estudos epidemiológicos mostram que o CEO acomete preferencialmente homens entre a sexta e a oitava décadas de vida e, geralmente, os pacientes possuem hábitos de risco para o desenvolvimento do câncer oral, como consumo de tabaco e álcool de forma isolada ou associada de maneira contínua, sendo a língua, o sítio anatômico mais frequentemente afetado (IAMAROON et al., 2004; GARAVELLO; SPREAFICO; GAINI; 2007; RIBEIRO et al., 2009). A incidência do CEO, especialmente em pacientes jovens, é relativamente baixa, variando de 0,4% a 6,0% de todos os casos relatados (CUSUMANO et al., 1998, IAMAROON et al., 2004, SIRIWARDENA et al., 2007), entretanto, um estudo retrospectivo realizado recentemente no Brasil apresentou uma taxa de 12,0% de ocorrência em pacientes com menos de quarenta anos de idade (RIBEIRO et al., 2009). Chidzonga e Mahomva (2006) por sua vez, também evidenciaram em uma população africana, que 18,4% dos CEOs ocorreram em pessoas com idade abaixo de 40 anos. Outro estudo realizado por Iamaroon et al.(2004) com 587 casos de CEO no norte da Tailândia estes autores encontraram uma ocorrência de 12,8% em pacientes com menos de 40 anos de idade. Veness et al. (2003) encontraram um percentual de 13,4% de pacientes com menos de 40 anos diagnosticados com CE de língua. Todos estes achados podem ser um indicativo de que, mesmo sendo pouco frequente em pacientes jovens, a incidência do CEO neste grupo etário vem aumentando em várias partes do mundo.

No presente estudo foi evidenciada predileção para o sexo masculino, tanto para o grupo de pacientes com até 40 anos (62,5%), com uma proporção homem: mulher de 1,66:1, como para o grupo com mais de 50 anos (65,0%), no qual foi evidenciada uma proporção entre homens e mulheres de 1,86:1, fato este já consagrado na literatura mundial.

Os achados desta pesquisa em relação ao grupo de pacientes jovens foram semelhantes aos encontrados nos estudos de Iamaroon et al. (2004), Sasaki et al. (2005), Sherin et al. (2008), Ribeiro et al. (2009) e Andisheh-Tadbir, Mehralani e Heydan (2010) porém, divergiu dos resultados do estudo de Kuriakose et al. (1992) e Veness et al. (2003) no qual foi relataram uma maior frequência em mulheres, para o grupo de pacientes jovens.

Quando se analisa o aspecto relacionado à localização anatômica da lesão, de modo geral, a literatura demonstra que a língua é mais frequentemente afetada pelo carcinoma epidermóide, independentemente da idade do paciente (KURIACOSE et al., 1992; MACKENZIE et al., 2000; IAMAROON et al., 2004; CHITAPANARUX et al., 2006; HIROTA et al., 2008; De PAULA et al., 2009; ANDISHEH-TADBIR; MEHRALANI; HEYDAN, 2010). Em pesquisa realizada por Myres et al. (2000), observou-se que de 5,0% a 10,0% dos cânceres de língua ocorriam em pacientes com idade abaixo de 40 anos sendo que, em muitos desses casos, não foram identificados os fatores de risco tradicionais.

Ao analisar os resultados desta pesquisa, em relação à distribuição topográfica na língua, os casos para os grupos com idade até 40 anos e acima dos 50 anos foram semelhantes, ambos apresentando a borda lateral de língua como a região mais frequentemente acometida com índices de 66,7% e 63,2%, respectivamente. Ao avaliar essa região da língua em relação ao sexo dos pacientes, constatou-se um acometimento maior nos homens pertencentes ao grupo com idade até 40 anos (80,0%). Para os pacientes do grupo com idade acima de 50 anos, a borda de língua foi a região mais comum tanto para os homens (75,0%) como para as mulheres (42,9%). Este achado é concordante com a pesquisa realizada no Brasil por Hirota et al. (2008), que encontraram a borda lateral como a região da língua mais acometida para ambos os grupos, com maior ocorrência no grupo de pacientes com menos de 40 anos (76,9%). Por outro lado, em uma análise epidemiológica do câncer de língua realizada por Lam, Logan e Luke (2006), foi constatado que a região da língua mais envolvida para os homens foi a base, seguida pelo ápice e a borda lateral. Na presente pesquisa, a base de língua foi a segunda região mais frequente.

Quando se analisa os fatores de risco associados ao câncer oral, vários estudos demonstram relação com o hábito de fumar e consumir álcool e, estima-se que esses fatores estão associados em 75% dos casos de CEO (Llewellyn et al., 2004; SASAKI et al., 2005). Porém, o significado desses fatores de risco tradicionais na carcinogênese oral em pacientes jovens, permanece controverso. Nesta pesquisa, observou-se um predomínio da presença de

hábitos, sendo estes evidenciados em 84,6% dos casos, no grupo com idade abaixo dos 40 anos. Quando analisado qual tipo de hábito estava presente, destacou-se a informação do uso de tabaco e álcool utilizados de forma conjunta (72,70%), corroborando os achados de Llewellyn et al. (2004), os quais relataram que os pacientes com menos de 40 anos apresentaram fatores de risco similares aos encontrados na população em geral. Também, no estudo realizado por Iamaroon et al. (2004) com 75 casos de CEO em pacientes tailandeses com idade abaixo de 45 anos, os autores observaram que os fatores de risco tradicionais permaneceram importantes no desenvolvimento do câncer oral naquela população. Ribeiro et al. (2009), em estudo retrospectivo em pacientes jovens brasileiros, constataram a presença do consumo de tabaco e álcool nesse grupo etário. Hirota et al. (2008), analisando a presença do consumo de tabaco e/ou álcool em um grupo de pacientes com menos de 40 anos, verificaram a presença destes hábitos em 92,3% dos casos enquanto que para o grupo de pacientes com idade acima dos 40 anos, em 60,5% dos casos, havia referência do uso de bebida alcoólica e de fumo. Contrariamente, a pesquisa realizada na Austrália, por Veness et al. (2003), indicou que a frequência do hábito de fumar era menor no grupo de pacientes com idade abaixo dos 40 anos. Em um trabalho atual, realizado por Andisheh-Tadbir, Mehrabani e Heydari (2010) com 186 pacientes iranianos com CE de cabeça e pescoço, constatou-se que a maioria dos pacientes com idade abaixo de 40 anos (68,4%) não apresentava nenhum fator de risco associado à doença, achado este contrário ao encontrado na presente pesquisa.

Sasaki et al. (2005) observaram que tanto os pacientes com idade abaixo dos 40 anos quanto aqueles acima dos 40 anos de idade, estão expostos de maneira similar aos fatores de risco tradicionais. De acordo ainda com estes autores, embora os pacientes mais jovens apresentem menor tempo de exposição aos fatores de risco e, conseqüentemente, menor tempo para a ação carcinogênica do fumo e do álcool, mesmo assim as lesões foram semelhantes àquelas do grupo mais velho, tanto do ponto de vista clínico quanto morfológico. Entretanto, outros autores, como Kuriacose et al. (1992) e Mackenzie et al. (2000), sugeriram que esses fatores de risco tradicionais não estão presentes em pacientes com menos de 40 anos. Possíveis explicações para essa divergência podem estar relacionadas com variações geográficas, bem como aspectos socioeconômicos e culturais das populações analisadas. Em trabalho realizado no Brasil por De Paula et al. (2009), foi percebido que a maioria dos pacientes com idade abaixo de 45 anos relataram o consumo de álcool e tabaco por um longo período, refletindo com isso a relação dos fatores socioeconômicos com o alto consumo de bebidas alcoólicas e cigarro, que é muito alto no país.

Os fatores envolvidos no desenvolvimento do CEO, como alterações genéticas, modificações moleculares, deficiências nutricionais, imunossupressão, ocupação profissional, aspectos relacionados ao estilo de vida do indivíduo, exposição a fatores carcinogênicos químicos e físicos e fatores histomorfológicos, associando-se de maneira complexa e variada, são os motivadores de muitos estudos que visam conseguir dados relevantes em relação às características do desenvolvimento do CEO, bem como avaliar o prognóstico da doença.

Quando se analisa o prognóstico de pacientes com CEO, para pacientes com idade abaixo dos 40 anos, a literatura apresenta informações contraditórias o que gera controvérsias ao assunto. Aspectos como localização primária do tumor, presença de metástase regional ou à distância e características clínicas e morfológicas da lesão são fatores que influenciam tanto no prognóstico, como na sobrevida do paciente.

Para melhor entender o comportamento clínico dessa lesão, a União Internacional Contra o Câncer desenvolveu o sistema TNM que tem por objetivo classificar os casos de câncer em grupos, de acordo com os estágios clínicos e para isto são avaliados o tamanho do tumor (T), envolvimento de linfonodos regionais (N) e a presença ou não de metástase à distância (M). Essa classificação surgiu ao se perceber que pacientes que apresentavam tumores localizados possuíam taxas de sobrevida maiores àqueles que já se apresentavam de modo disseminado (BRASIL, 2004).

No presente estudo, buscou-se verificar a presença ou ausência de metástase regional, sendo constatado que no grupo de pacientes com até 40 anos, lesões metastáticas para linfonodos regionais esteve presente em 69,20% dos casos. No entanto, quando comparado ao grupo de pacientes com mais de 50 anos este não apresentava metástase para linfonodos regionais em 68,4% dos casos. Aplicado o teste do Qui-quadrado, o mesmo demonstrou haver uma associação significativa do grupo com menos de 40 anos com a presença de metástase regional ($p = 0,036$). Esses resultados diferiram dos obtidos por Friedlander et al. (1998), os quais relataram que pacientes com menos de 40 anos, no momento inicial do diagnóstico, não apresentavam metástase linfonodal e de Ribeiro et al. (2008) que relataram em seu estudo ausência de metástase regional por ocasião do diagnóstico inicial dos pacientes com menos de 40 anos, porém nossos resultados foram similares aos encontrados no estudo de Veness et al. (2003) na Austrália, que mostraram haver uma maior proporção de pacientes com menos de 40 anos apresentando metástase regional (45,5%) quando comparado com os pacientes mais velhos (24,7%) e com o estudo de Iype et al.

(2001) que encontraram envolvimento dos linfonodos regionais em 51,3% dos casos de pacientes com menos de 40 anos na Índia. Por sua vez, Siriwardena et al. (2007) apresentaram taxas significativamente maiores de metástase linfonodal no grupo de pacientes com idade acima de 40 anos.

Outro aspecto analisado no presente estudo, com o intuito de verificar possíveis variações que interferissem no prognóstico dos pacientes jovens acometidos pela neoplasia em estudo, foi quanto o estadiamento clínico. Os resultados dessa pesquisa demonstraram que, nos pacientes com até 40 anos, houve um predomínio do estágio III, correspondendo a 42,9% dos casos. Entretanto, para os pacientes com idade acima dos 50 anos, o estágio mais frequente foi o II (40,0% dos casos), achado este semelhante ao encontrado por Silveira et al. (2007) em que a maioria dos casos com idade acima de 40 anos encontrava-se no estágio II. Ainda reportando-se ao estudo de Silveira et al. (2007), apenas um caso com idade de 40 anos no momento do diagnóstico, já estava no último estágio clínico (IV) e apresentava baixo grau de malignidade. Em trabalho realizado por Ho et al. (2008) foi evidenciado que para 28 casos pertencentes ao grupo de pacientes com menos de 40 anos, onze casos (39,3%) estavam classificados no estágio IV, achado similar ao encontrado na presente pesquisa enquanto que para o grupo com idade acima de 40 anos, houve uma frequência maior de casos classificados nos estágios I e II (46,4%).

Ainda com o objetivo de verificar se havia diferenças entre os grupos, foram agrupados os casos dos estágios I e II em um único grupo e o mesmo foi feito para os estágios III e IV. Assim, foi possível observar que a maioria dos pacientes com menos de 40 anos (78,6%) apresentava-se nos estágios III e IV, indicando um estado mais avançado da doença, enquanto que no grupo com mais de 40 anos, predominaram os estágios I e II, demonstrando dessa forma, um estado mais precoce da lesão. Aplicado o teste do Qui-quadrado, evidenciou-se uma associação significativa do grupo com até 40 anos com estadiamentos clínicos mais avançados, no momento do diagnóstico inicial ($p = 0,012$). Esse resultado apresenta consonância com os achados de Iype et al. (2001), em que constataram que os pacientes com menos de 35 anos já estavam nos estágios III e IV da doença, de Chitapanarux et al. (2006) que evidenciaram um percentual de 55% dos casos em jovens tailandeses classificados no estágio III e IV e de Siegelmann-Danieli et al. (1998) que encontraram que pacientes com idade abaixo de 45 anos já apresentavam estágio clínico mais avançado quando comparado ao grupo controle, no momento do diagnóstico.

Ao analisar os dados deste trabalho em relação ao grupo de pacientes até 40 anos com a presença de metástase regional e estágios mais avançados da doença no momento do diagnóstico inicial, sugere-se que pode ser possível um comportamento biológico mais agressivo dos tumores no grupo de pacientes com idade até 40 anos do que no grupo de pacientes com idade acima dos 50 anos, mesmo que ambos estejam expostos aos mesmos fatores de risco (RIBEIRO et al., 2009; HIROTA et al., 2008; VENESS et al., 2003; SASAKI et al., 2005).

Além dos aspectos clínicos do CE de língua indicarem valor prognóstico para a lesão, há também outros aspectos para avaliar o comportamento biológico dessas lesões tais como suas características morfológicas e este fato motivou a criação de diversos sistemas de gradação histológica de malignidade, como os propostos por Broders (1920, 1941), Wahi (1971), Anneroth e Hansen (1984), Anneroth, Batsakis e Luna (1987), Bryne et al. (1989), Bryne (1998) e Cardesa et al. (2005), tendo como objetivo central entender a agressividade do tumor por meio das alterações morfológicas apresentadas.

Vários estudos foram realizados, principalmente os desenvolvidos por Bryne no final dos anos 80 e durante a década de 90, sugerindo evidências de que em carcinomas, células malignas presentes em regiões mais profundas do tumor, conhecidas como *front* de invasão tumoral, possuem características moleculares mais diferenciadas, com a capacidade de metastatizar, quando comparadas com regiões superficiais e centrais do tumor, tornando essa região a área mais importante do tumor para determinação do seu prognóstico. Baseado neste aspecto, os resultados do estudo de Kurokawa et al. (2005) confirmam este fato uma vez que foi encontrado que elevados escores de gradação no *front* invasivo foram altamente prognósticos em casos de CE de língua. Entretanto, ainda permanece controverso nas pesquisas realizadas mundialmente se é possível prever o comportamento biológico do CE associando fatores prognósticos clínicos, histológicos ou moleculares (BANKFALVI, PIFFKO, 2000).

Considerando os aspectos morfológicos analisados nessa pesquisa, para o grupo com até 40 anos, houve uma maior tendência dos casos serem classificados em alto grau de malignidade (56,2%). No entanto, no grupo de pacientes acima de 50 anos, houve uma distribuição equilibrada entre os casos graduados em alto e baixo grau de malignidade, com 50% em cada grau. Esses achados foram similares aos encontrados por Silveira et al. (2007), em que a distribuição foi igual entre alto e baixo grau de malignidade. Entretanto,

quando aplicados testes estatísticos, não foi evidenciada diferença estatística significativa entre os grupos ($p = 0,739$). Considerando este aspecto, Atula et al. (1996) relatam que, de um modo geral, há pouca evidência de que lesões em pacientes com idade abaixo dos 40 anos são histologicamente diferentes ou mais agressivas que aquelas de pacientes com idade acima de 40 anos. Estes resultados se assemelham aos evidenciados por Effiom et al. (2008) que encontraram uma maior frequência do subtipo histológico pobremente diferenciado para 47,6% dos 233 casos que compuseram a amostra do estudo. No entanto, no estudo de Odukoya et al. (1986) os mesmos evidenciaram que os casos de CEOs pobremente diferenciados estavam presentes no grupo formado por pacientes com idades entre 31 e 40 anos.

Diferentemente do observado no presente estudo, os trabalhos apresentados por Atula et al. (1996), Sasaki et al., (2005), Iamaroon et al. (2004), Ribeiro et al. (2008), Garavello, Speafico e Gaini (2007), Chitapanarux et al. (2006), Chidzonga (2006) e Sherin et al. (2008) constataram que a maioria dos pacientes apresentava lesões classificadas de bem a moderadamente diferenciada, sugerindo que, histologicamente, o CE de língua em pacientes com menos de 40 anos não seja muito diferente do grupo de pacientes clássicos. Talvez, uma possível explicação para essa disparidade nos resultados encontrados possa ser tanto em relação à subjetividade dos sistemas de gradação histológica de malignidade, concordando com o raciocínio de Chidzonga (2006), como em relação à utilização de metodologias diferentes para gradação histológica de malignidade.

Ao aplicar o teste do Qui-quadrado, foi possível evidenciar associação significativa entre os estágios clínicos mais avançados da doença com tumores classificados em alto grau de malignidade ($p = 0,002$), sugerindo que os graus histológicos da lesão podem indicar o comportamento biológico do CE de língua. Entretanto, esses achados foram discordantes dos estudos de Iamaroon et al. (2004) que não encontraram correlação significativa entre a gradação histológica de malignidade e o estadiamento clínico, tanto no grupo de pacientes com menos de 45 anos quanto para pacientes acima de 45 anos. No estudo realizado por Silveira et al. (2007) não foi evidenciada associação significativa entre o sistema de gradação histológica de malignidade e o estadiamento clínico, concluindo os autores que a característica morfológica não pode ser utilizada como indicador do comportamento biológico do CEO.

Dessa forma, observa-se que as pesquisas revelam resultados conflitantes em relação à utilização de fatores clínicos e morfológicos como possíveis indicadores do prognóstico e comportamento biológico em carcinomas epidermóides orais e, devido a isso, muitos estudos estão sendo desenvolvidos utilizando outros fatores, como a avaliação do ciclo celular (KUROKAWA et al., 2005), alterações moleculares (SILVA et al., 2004) e fatores genéticos (FOULKES et al., 1996), na tentativa de melhor elucidar esse comportamento agressivo dos carcinomas, principalmente em língua que apresentam altos índices de metástase para linfonodos cervicais (MYOUNG et al., 2006).

A capacidade proliferativa aumentada é uma das principais características para a formação dos tumores (RABENHORST, BURINI, SCHMITT, 1993) sendo que esta atividade proliferativa das células neoplásicas geralmente indica o grau de agressividade do tumor por relacionar-se com o grau de malignidade do mesmo (TUMULURI et al., 2002; TUMULURI et al., 2004). Alguns estudos têm sido realizados com a finalidade de se detectar e quantificar as células tumorais em proliferação como um parâmetro importante para o prognóstico do paciente, bem como correlacioná-la com algumas características clínico-patológicas, tais como estágio TNM, grau histológico de malignidade, recidiva tumoral e sobrevida do paciente (VICENTE et al., 2002; FUMIC-DUNKIC et al., 2003; SILVA et al., 2004; KUROKAWA et al., 2005).

Variados métodos de detecção e quantificação de células proliferantes foram desenvolvidos e protocolados, tais como a tradicional contagem de mitoses em microscopia de luz, o estudo da incorporação da timidina tritiada e posteriormente da bromodesoxiuridina (BrdU), histoquímica (técnica AgNOR) e a imuno-histoquímica (van DIEST; BRUGAL; BAAK, 1998; KRECICKI et al., 1999; FUMIC-DUNKIC et al., 2003). Dentre os marcadores imuno-histoquímicos, os mais comumente utilizados nas pesquisas para estudar a proliferação celular são o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) e o antígeno Ki-67, que são considerados ferramentas importantes para analisar a proliferação de células do tumor de uma forma rápida e prática (TUMULURI et al., 2002; MYONG et al., 2006).

Nesta pesquisa, utilizou-se o marcador imuno-histoquímico Ki-67, uma vez que é relatado na literatura que o mesmo é expresso somente em células proliferantes, isto é, células que se encontram nas fases G₁, S, G₂ e M, tornando-se ausente nas células quiescentes. Após a mitose, o antígeno é rapidamente degradado, indicando assim que sua expressão

encontra-se restrita aos eventos proliferativos (KUROKAWA et al., 2005; BRUNO, DARZINKIEWICZ, 1992).

No presente estudo, a análise da expressão do Ki-67 por meio do índice de positividade (IP) foi realizada no *front* de invasão tumoral por ser considerada a região mais representativa da lesão em relação às alterações celulares (KUROKAWA et al., 2005). Não foram observadas diferenças significativas em relação aos IPs entre os grupos de pacientes jovens e idosos ($p = 0,494$), indicando que para esse estudo a idade do paciente parece não ter influenciado na proliferação celular. De forma similar, Tumuluri et al.(2004), avaliando dois casos em pacientes com idade abaixo de 40 anos e quarenta e cinco casos de pacientes com idade acima de 40 anos, não observaram diferença significativa entre os grupos em relação à proliferação celular no *front* de invasão do tumor ($p = 0,52$). Entretanto, Silva et al. (2008) ao avaliarem 102 casos de CEO puderam constatar um maior índice de marcação para o Ki-67 em pacientes com idade acima de 59 anos ($p < 0,05$).

Ao avaliar os IPs de todos os casos estudados, na presente pesquisa, em relação à gradação histológica de malignidade, não foi possível observar diferença estatística ($p = 0,076$), divergindo dos achados reportados por Tumuluri et al. (2004) e Kurokawa et al. (2005). Estes autores observaram que a proliferação celular, medida pela expressão do Ki-67, no *front* de invasão tumoral apresentou uma forte correlação positiva com o grau histológico de malignidade em CEO. De acordo com Kurokawa et al. (2005), valores mais altos dos índices de marcação para o Ki-67 podem indicar uma biologia mais agressiva para o tumor. Uma possível explicação para essa divergência pode estar relacionada à utilização de metodologias diversificadas. Kurokawa et al.(2005), para obtenção do índice de marcação do Ki-67, realizaram a contagem de 1000 células neoplásicas utilizando a microscopia de luz em aumento de 200x no *front* de invasão tumoral. Por sua vez, Tumuluri et al. (2004) realizaram a análise quantitativa do Ki-67 utilizando imagens capturadas por uma macro desenvolvida especialmente para o estudo.

Quando realizada a análise estatística dos IPs para o Ki-67 em relação às metástases tanto regionais ($p = 0,734$) como à distância ($p = 0,181$), neste estudo não foi possível verificar diferenças estatísticas significantes. Em relação à metástase regional, o resultado encontrado nesta pesquisa foi concordante com os estudos de Roland et al. (1994) e Piffko et al. (1996), os quais não encontraram relação significativa entre proliferação celular e envolvimento linfonodal. Para a metástase à distância, o resultado encontrado na presente

pesquisa foi compatível ao reportado no estudo de Roland et al. (1994), que não constataram relação entre a expressão do Ki-67 e a presença de metástase. Entretanto, foi discordante do achado por Tumuluri et al (2004), que observaram uma média de marcação do Ki-67 maior (66%) em tumores que apresentavam metástase à distância quando comparados com tumores sem metástase, esse achado foi estatisticamente significativo ($p = 0,045$). De acordo com estes autores, tumores com alto índice de proliferação celular podem indicar um potencial de metástase à distância.

Ao comparar o IP para o Ki-67 em relação ao estadiamento clínico categorizado, no presente estudo, não se constatou diferença estatisticamente significativa ($p = 0,617$). Este resultado discorda do encontrado por Tumuluri et al. (2004), que observaram relação direta entre proliferação celular no *front* de invasão tumoral e o estadiamento clínico. No estudo destes autores, os tumores pertencentes aos estágios III e IV apresentaram uma média do índice de marcação para o Ki-67 maior do que os tumores categorizados nos estágios I e II ($p = 0,034$). Em consonância com os achados descritos por Tumuluri et al. (2004), Silva et al. (2008) observaram uma associação estatisticamente significativa entre o índice de proliferação celular, expresso pela positividade para o Ki-67, com o estágio clínico da doença. De acordo com Silva et al. (2008), pacientes que apresentavam tumores com altos índices de positividade para o Ki-67, possuíam uma taxa de sobrevida reduzida.

Frente aos achados dessa pesquisa, verificamos que a maior agressividade relatada para os casos de CEO em pacientes jovens pode não está relacionada com a proliferação celular uma vez que não foi evidenciada diferença entre os índices de proliferação nos dois grupos estudados. Além disto, foi evidenciada a participação dos fatores de risco tradicionais no grupo de pacientes com idade até 40 anos uma vez que em 84,6 % dos casos havia relato de sua presença. Sendo assim, outros aspectos ainda não esclarecidos podem estar relacionados com a agressividade relatada nesses casos merecendo a atenção dos estudiosos no assunto e na busca de mais informações que possam auxiliar o entendimento dessas lesões em pacientes jovens.

6 CONCLUSÃO

- Não houve diferença estatisticamente significativa entre os índices de proliferação celular, obtidos pela expressão do Ki-67, dos CEs de língua entre o grupo de pacientes com até 40 anos e o grupo acima de 50 anos de idade;
- Não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos de pacientes com idade até 40 anos e o grupo acima de 50 anos em relação à gradação histológica de malignidade dos CEs de língua;
- Os fatores de risco associados ao câncer oral, representados pelo uso do fumo e do álcool, estavam presentes no grupo de pacientes com até 40 anos;
- Foi evidenciada uma associação estatisticamente significante entre o grupo de pacientes com idade até 40 anos e metástase regional ($p= 0,036$) bem como os estágios clínicos mais avançados da doença ($p= 0,012$).

REFERÊNCIAS

- ABDO, M.; et al. Time elapsed between the first symptoms, diagnosis and treatment of oral cancer patients in Belo Horizonte, Brazil. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal**, v. 12, n. 7, p. 469-473, 2007.
- ALVARENGA, L. M.; et al. Epidemiologic evaluation of head and neck patients in a university hospital of Northwestern São Paulo State. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.**, v. 74, n. 1, p. 68-73, 2008.
- AMSTERDAM, J. T.; STRAWITZ, J. G. Squamous cell carcinoma of the oral cavity in young adults. **J. Surg. Oncol.**, v.19, p. 65–68, 1982.
- ANDISHEH-TADBIR, A; MEHRABANI, D.; HEYDARI, S. T. Sociodemographic and etiological differences of head and neck squamous cell carcinoma in young and old patients in southern Iran. **J. Craniofac.Surg.**, v. 21, p. 126-128, 2010.
- ANNEROTH, G.; BATSAKIS, J. B.; LUNA, M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. **Scand. J. Dent. Res.**, v. 95, p. 229-249, 1987.
- ANNEROTH, G.; HANSEN, L. S. A methodologic study of histologic classification and grading of malignancy in oral squamous cell carcinoma. **Scand. J. Dent. Res.**, v. 92, p. 448-468. 1984.
- ARBES, S. J. Jr.; et al. Factors contributing to the poorer survival of black americans diagnosed with oral cancer (United States). **Cancer Causes and Control.**, v. 10, p. 513, 1999.
- ATULA S.; et al. Cancer of the tongue in patients younger than 40 years: a distinct entity. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, v. 122, p. 1313-1319, 1996.
- BAAK, J. P. A. Mitosis counting in tumours. **Hum. Pathol.**, v. 21, p. 683–685, 1990.
- BACCHI, C. E.; GOWN, A. M. Detection of cell proliferation in tissue sections. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 26, n. 7, p. 677-687, 1993.
- BANKFALVI, A.; PIFFKO, J. Prognostic and predictive factors in oral cancer: the role of invasive tumour front. **J. Oral. Pathol. Med.**, v. 29, p. 291-298, 2000.

BARBOSA, T. V.; et al. Prognostic significance of Ki-67 in great cell undifferentiated carcinoma of the major salivary glands: study of 11 cases. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.**, v. 69, n. 5, p. 629-634, 2003.

BERNSTEIN, L. R.; LIOTTA, L. A. Molecular mediators of interactions with extracellular matrix components in metastasis and angiogenesis. **Curr. Opin. Oncol.**, v. 6, p. 106-113, 1994.

BETTENDORF, O.; HERMANN, G. Prognostic relevance of ki-67 antigen expression in 329 cases of oral squamous cell carcinoma. **ORL**, v. 64, p. 200-205, 2002.

BRASIL. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. **TNM: classificação de tumores malignos**. 6^a ed, Rio de Janeiro, INCA, 2004. 254 p.

BRAUN, N.; PAPADOPOULOS, T.; MÜLLER-HERMELINK, H. K. Cell cycle dependent distribution of the proliferation-associated Ki-67 antigen in human embryonic lung cells. **Virchows Arch. B Cell Pathol.**, v. 56, p. 25-33, 1988.

BRAVO, R. Synthesis of the nuclear protein cyclin (PCNA) and its relationship with DNA replication. **Exp. Cell Res.**, v. 163, p. 287- 293, 1986.

BRIDGER, J. M.; KILL, I. R.; LICHTER, P. Association of pKi-67 with satellite DNA of the human genome in early G1 cells. **Chromosome Res.**, v. 6, p. 13-24, 1998.

BRODERS, A. C. The microscopic grading of cancer. **Surg. Clin. North Am.**, v. 21, n. 4, p. 947-962, 1941.

BROWN, D. C.; et al. Carcinoma of the cervix uteri: An assessment of the tumour proliferation using the monoclonal antibody Ki-67. **Br. J. Cancer.**, v. 57, p. 178-181, 1988.

BROWN, D. C.; GATTER, K. C. Ki67 protein: the immaculate deception? **Histopathology**, v. 40, p. 2-11, 2002.

BRUNO, S.; DARZYNKIEWICZ, Z. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear, protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. **Cell Prolif.**, v. 25, p. 31-40, 1992.

BRYNE, M. Is the invasive front of an oral carcinoma the most important area for prognostication? **Oral Dis.**, v. 4, p. 70-77, 1998.

BRYNE, M. Prognostic value of various cellular and molecular features in oral squamous cell carcinomas: a review. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 20, p. 414-420, 1991.

BRYNE, M.; et al. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. **J. Pathol.**, v. 166, p. 375-381, 1992.

BRYNE, M.; et al. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 18, p. 432-437, 1989.

BYERS, R. M. Squamous cell carcinoma of the oral tongue in patients less than thirty years of age. **Am. J. Surg.**, v. 130, v. 4, p. 475-478, 1975.

CARDESA, A.; et al. Carcinoma de célula pavimentosa. In: BARNES, L.; EVESON, J. W.; REICHART, P.; SIDRANSKY, D. **Pathology and Genetics of head and neck tumors**. São Paulo: Santos, 2005. 118-121.

CARNIOL, P. J.; FRIED, M. P. Head and neck carcinoma in patients under 40 years of age. **Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.**, v. 91, p. 152-155, 1982.

CHIDZONGA, M. M. Oral malignant neoplasia: a survey of 428 cases in two Zimbabwean hospitals. **Oral Oncology**, v. 42, p. 177-183, 2006.

CHIDZONGA, M. M.; MAHOMVA, L. Squamous cell carcinoma of the oral cavity, maxillary antrum and lip in a Zimbabwean population: a descriptive epidemiological study. **Oral Oncology**, v. 42, p. 184-189, 2006.

CHITAPANARUX, I. Oral cavity cancers at a young age: analysis of patient, tumor and treatment characteristics in Chiang Mai University Hospital. **Oral Oncology**, v. 42, p. 83-88, 2006.

CHOONG, P. F.; et al. Prognostic value of Ki-67 expression in 182 soft tissue sarcomas. Proliferation – a marker of metastasis? **APMIS**, v. 102, p. 915-924, 1994.

CLARK, R. M.; ROSEN, I. B.; LAPERRIERE, N. J. Malignant tumors of the head and neck in a young population. **Am. J. Surg.**, v. 144, p. 459-462, 1982.

COARACY, A. E. V.; et al. Correlation between the clinical and histologic data of oral squamous cell carcinoma from Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, in São Luís, MA, Brasil. **J. Bras. Pathol. Med. Lab.**, v. 44, n. 1, p. 31-35, 2008.

COHEN, E. E. W. Novel therapeutic targets in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Semin. Oncol.**, v. 31, p. 755-768, 2004.

COSTA, A. L. L.; et al. Correlation between TNM classification and malignancy histological feature of oral squamous cell carcinoma. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.**, v. 71, n. 2, p. 181-187, 2005.

COSTA, A. L. L.; et al. Correlation between TNM classification, histological grading and anatomical location in oral squamous cell carcinoma. **Pesqui. Odontol. Bras.**, v. 16, n. 3, p. 216-220, 2002.

CROCKER, J.; NAR, P. Nucleolar organizer regions in lymphomas. **J. Pathol.**, v. 151, p. 111-118, 1987.

CURADO M.P.; HASHIBE M. Recent changes in the epidemiology of head and neck cancer. **Curr. Opin. Oncol.**, v.21, p. 194-200, 2009.

CUSUMANO, R. J.; PERSKY, M. S. Squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx in young adults. **Head Neck Surg.**, v. 10, n.4, p. 229-234, 1988.

DANTAS, D. D. L.; et al. Clinical-pathological parameters in squamous cell carcinoma of the tongue. **Braz. Dent. J.**, v. 14, n. 1, p. 22-25, 2003.

DE PAULA, A. M. B. et al. Analysis of 724 cases of primary head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) with a focus on young patients and p53 immunolocalization. **Oral Oncology**, v. 45, p. 777-782, 2009.

DEDIVITIS, R. A.; et al. Características clínico-epidemiológicas no carcinoma espinocelular de boca e orofaringe. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.**, v. 70, p. 35-40, 2004.

DOWNER, C. S.; SPEIGHT, P. M. E-cadherin expression in normal, hyperplastic and malignant oral epithelium. **Oral Oncol. Eur. J. Cancer**, v. 29b, p. 303-305, 1993.

EFFIOM, O. A.; et al. Oral Squamous cell carcinoma: a clinicopathologic review of 233 cases in Lagos, Nigeria. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 66, p. 1595-1599, 2008.

ENDL, E.; GERDES, J. The Ki-67 protein: fascinating forms and an unknown function. **Exp. Cell Res.**, v. 257, p. 231-237, 2000.

ESPOSITO, J. P.; et al. Immunohistochemical expression of markers PCNA, ki67 and p53 in squamous cell carcinomas of upper aerodigestive tract. **Rev. Col. Bras. Cir.**, v. 27, n. 5, p. 327-331, 2000.

FORTINA, A. B.; et al. Immunosuppressive level and other risk factors for basal cell carcinoma and squamous cell carcinoma in heart transplant recipients. **Arch. Dermatol.**, v. 140, n. 9, p. 1079-1085, 2004.

FOULKES, W. D.; et al. Familial risks of squamous cell carcinoma of the head and neck: retrospective case-control study. **BMJ**, v. 313, n. 7059, p. 716-721, 1996.

FRIEDLANDER, P. L.; et al. Squamous cell carcinoma of the tongue in young patients: A matched-pair analysis. **Head Neck**, v. 20, p. 363-368, 1998.

FUMIC-DUNKIC, L.; et al. Retrospective analysis of Ki-67 antigen expression in paraffin tissue blocks of laryngeal squamous cell carcinoma. **Am. J. Otolaryngol.**, v. 24, n. 2, p. 106-110, 2003.

FUNK, G. F.; et al. Presentation, treatment, and outcome of oral cavity cancer: a national cancer data base report. **Head Neck**, v. 24, p. 165-180, 2002.

GARAVELLO, W.; SPREAFICO, R.; GAINI, R. M. Oral tongue cancer in young patients: a matched analysis. **Oral Oncology**, v. 43, p. 894-897, 2007.

GARRIDO, M. C.; et al. Monoclonal antibody JC1. New reagent for studying cell proliferation. **J. Clin. Pathol.**, v. 45, p. 860-865, 1992.

GARZETTI, G. G.; et al. MIB 1 immunostaining in stage I squamous cervical carcinoma: Relationship with natural killer cell activity. **Gynecol. Oncol.**, v. 58, p. 28-33, 1995.

GAWECKI, W.; et al. The role of genetic factor in etiopathogenesis of squamous cell carcinoma of the head and neck in young adults. **Eur. Arch. Otorhinolaryngol.**, v. 264, p. 1459-1465, 2007.

GILROY, J. S.; et al. Impact of young age on prognosis for head and neck cancer: a matchedpair analysis. **Head Neck**, v. 27, p. 269-273, 2005.

HAFKAMP, H. C.; MANNI, J. J.; SPEEL, E. J. M. Role of human papillomavirus in the development of head and neck squamous cell carcinomas. **Acta Otolaryngol.**, v. 124, p. 520-526, 2004.

HARDISSON, D. Molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. **Eur. Arch. Otorhinolaryngol.**, v. 260, p. 502-508, 2003.

HARPOLE, D. H. J.; et al. A prognostic model of recurrence and death in stage I non-small cell lung cancer utilizing presentation, histopathology, and oncoprotein expression. **Cancer Res.**, v. 55, p. 51-56, 1995.

HIROTA, S. K.; et al. Risk factors for oral squamous carcinoma in young and older Brazilian patients: A comparative analysis. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal**, v. 13, n. 4, p. 227-231, 2008.

HO, H.; et al. Squamous cell carcinoma of the oral cavity in young patients: a matched-pair analysis. **Eur. Arch. Otorhinolaryngol.**, v. 265, Suppl 1, p. S57-S61, 2008.

IAMAROON, A.; et al. Analysis of 587 cases of oral squamous cell carcinoma in northern Thailand with a focus on young people. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 33, p. 84-88, 2004.

INCA. Estimativa - Incidência de câncer no Brasil 2009. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativa/2010>>. Acesso em: 04 jan 2010.

ISOLA, J. J.; et al. Evaluation of cell proliferation in breast carcinoma: comparison of Ki-67 immunohistochemical study, DNA flow cytometric analysis, and mitotic count. **Cancer**, v. 65, p. 1180-1184, 1990.

IYPE, E. M.; et al. Squamous cell carcinoma of the tongue among young Indian adults. **Neoplasia**, v. 3, n. 4, p. 273 – 277, 2001.

JACOB, R.; et al. Heterogeneity of squamous cell carcinomas of the head and neck- analysis of tumor biologic factors and proliferation rates. **Laryngoscope**, v. 106, p. 1170-1175, 1996.

JAKOBSSON, P. A.; et al. Histologic classification and grading of malignancy in carcinoma of the larynx (a pilot study). **Acta Radiol. Ther. Phys. Biol.**, v. 12, p. 1-8, 1973.

JIN, Y.; et al. Genetic alterations in oral squamous cell carcinoma of young adults. **Oral Oncology**, v. 35, p. 251-256, 1999.

KELMAN, Z. PCNA: structure, functions and interactions. **Oncogene**, v. 14, p. 629-640, 1997.

KEY, G.; et al. New antiserum against Ki-67 antigen suitable for double immunostaining of parinf wax sections. **J. Clin. Pathol.**, v. 46, p. 1080-1084, 1993.

- KHAN, M. A. et al. Comparing flow cytometric analysis and nucleolar organizer region enumeration in archival oral premalignant lesions. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 22, n. 6, p. 257-262, 1993.
- KIM, S. J.; et al. Prognostic Value of Carbonic Anhydrase IX and Ki-67 Expression in Squamous Cell Carcinoma of the Tongue. **Jpn J. Clin. Oncol.**, v. 37, n. 11, p. 812-819, 2007.
- KOCH, W. M.; et al. Squamous cell carcinoma of the head and neck in the elderly. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, v. 121, n. 3, p. 262–265, 1995.
- KRECICKI, T.; et al. Epidermal growth factor receptor (EGFR), proliferating cell nuclear antigen (PCNA) and Ki-67 antigen in laryngeal epithelial lesions. **Oral Oncology**, v. 35, n. 2, p. 180-186, 1999.
- KUBBUTAT, M. H.; et AL. Epitope analysis of antibodies recognizing the cell proliferation associated nuclear antigen previously defined by the antibody Ki-67 (Ki-67 protein). **J. Clin. Pathol.**, v. 47, n. 6, p. 524-528, 1994.
- KURAHARA, S.; et al. Expression of MMPs, MT-MMP and TIMPs in squamous cell carcinoma of oral cavity: correlations with tumour invasion and metastasis. **Head Neck**, v. 21, p. 627-638, 1999.
- KURIAKOSE, M.; et al. Comparison of oral squamous cell carcinoma in younger and older patients in India. **Oral Oncology**, v. 28b, p. 113-120, 1992.
- KUROKAWA, H.; et al. The relationship of the histologic grade at the deep invasive front and the expression of Ki-67 antigen and p53 protein in oral squamous cell carcinoma. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 34, p. 602-607, 2005.
- LACY, P. D.; et al. Head and neck squamous cell carcinoma: better to be young. **Otolaryngol. Head Neck Surg.**, v. 122, p. 253–258, 2000.
- LAM, L.; LOGAN, R. M.; LUKE, C. Epidemiological analysis of tongue cancer in south Australia for the 24-year period, 1977–2001. **Aust. Dental J.**, v. 51, n. 1, p. 16-22, 2006.
- LIANG, X. H.; et al. Prevalence and significance of human papillomavirus in oral tongue cancer: the Mayo Clinic experience. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 66, p. 1875-1880, 2008.
- LINGEN, M. W.; et al. Overexpression of p53 in squamous cell carcinoma of the tongue in young patients with no known risk factors is not associated with mutations in exons 5–9. **Head Neck**, v. 22, p. 328–335, 2000.

LLEWELLYN, C. D.; JOHNSON, N. W.; WARNAKULASURIYA K, A. A. S. Risk factors for oral cancer in newly diagnosed patients aged 45 years and younger: a case-control study in Southern England. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 33, p. 525–532, 2004.

LLEWELLYN, C. D.; JOHNSON, N. W.; WARNAKULASURIYAK, A. A. S. Risk factors for squamous cell carcinoma of the oral cavity in young people: a comprehensive literature review. **Oral Oncology**, v.37, n. 5, p. 401-18, 2001.

LOURENÇO, S. Q. C.; et al. Histological Classifications of Oral Squamous Cell Carcinoma: a Review of the Proposed Systems. **Rev. Bras. Cancerol.**, v. 53, n. 3, p. 325-333, 2007.

LUNDBERG, A. S.; WEINBERG, R. A. Control of the cell cycle and apoptosis. **Eur. J. Cancer**, v. 35, p.1886-1894, 1999.

MacCALLUM, D. E.; HALL, P. A. The location of pKi-67 in the outer dense fibrillary compartment of the nucleolus points to a role in ribosome biogenesis during the cell division cycle. **J. Pathol.**, v. 190, p. 537-544, 2000.

MACKENZIE, J.; et al. Increasing incidence of oral cancer amongst young persons: what is the aetiology? **Oral Oncology**, v. 36, p. 387–389, 2000.

McGREGOR, G. I.; DAVIS, N.; ROBINS, R. E. Squamous cell carcinoma of the tongue and lower oral cavity in patients under 40 years of age. **Am. J. Surg.**, v. 146, p. 88–92, 1983.

MYERS, J. N.; et al. Squamous cell carcinoma of the tongue in young adults: increasing incidence and factors predicting treatment outcomes. **Otolaryngol. Head Neck Surg.**, v. 122, p. 44–51, 2000.

MYOUNG, H.; et al. Correlation of proliferative markers (Ki-67 and PCNA) with survival and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma: a clinical and histopathological analysis of 113 patients. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 35, p. 1005–1010, 2006.

NAGAI, M. A. Genetic alterations in head and neck squamous cell carcinomas. **Braz. J. Med. Biol. Res.**, v. 32, p. 897-904, 1999.

NEVILLE, B. W.; et al. **Patologia oral e maxilofacial**. 3ªed. Rio de Janeiro: Elvevier, 2009. 972 p.

ODUKOYA, O.; et al. Squamous cell carcinoma of the oral cavity. **J. Max.Fac. Surg.**, v. 14, p. 267-269, 1986.

ÖFNER, D.; GROTHAUS, A.; RIEDMANN, B. MIB-1 in colorectal carcinomas: Its evaluation by three different methods reveals lack of prognostic significance. **An. Cell Path.**, v. 12, p. 61–70, 1996.

OLIVEIRA, M. C.; et al. HPV e carcinogênese oral: revisão bibliográfica. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.**, v. 69, n. 4, p. 553-559, 2003.

PARDEE, A. B. G₁ events and regulation of cell proliferation. **Science**, v. 246, p. 603-608, 1989.

PARKIN, D. M.; et al. Global cancer statistics, 2002. **CA Cancer J. Clin.**, v. 55, p. 74–108, 2005.

PATEL, S. G.; SHAH, J. P. TNM staging of cancers of the head and neck: striving for a uniformity among diversity. **CA Cancer J. Clin.**, v. 55, p. 242-58, 2005.

PENCE, J. C.; et al. Prognostic significance of the proliferation index in surgically resected non-small cell lung cancer. **Arch. Surg.**, v. 128, p. 1382-1390, 1993.

PIATTELLI, A.; et al. Prevalence of p53, bcl-2, and ki-67 immunoreactivity and of apoptosis in normal oral epithelium and in premalignant and malignant lesions of the oral cavity. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 60, p. 532-540, 2002.

PIFFKO, J.; et al. In situ assessment of cell proliferation at the invasive front of oral squamous cell carcinomas. **Virchows Arch.**, v. 429, p. 229-234, 1996.

PIFFKO, J.; et al. Standardized AgNOR analysis of the invasive tumour front in oral squamous cell carcinomas. **J. Pathol.**, v. 182, p. 450–456, 1997.

PITMAN, K. T.; et al. Cancer of the tongue in patients less than forty. **Head Neck**, v. 22, p. 297–302, 2000.

POPOVTZER, A.; et al. Squamous cell Carcinoma of the oral tongue in young patients. **Laryngoscope**, v. 114, p. 915-917, 2004.

PRELICH, G. et al. Functional identity of proliferating cell nuclear antigen and a DNA polymerase-d auxiliary protein. **Nature**, v. 326, n. 2, p. 517-519, 1987.

PYTYNIA, K. B., et al. Matched analysis of survival in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck diagnosed before and after 40 years of age. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, v. 130, p. 869–873, 2004.

RABENHORST, S.; BURINI, R. C.; SCHMITT, C. L. Proliferative-cell markers. **Rev. Bras. Pat. Clin.**, v. 29, n. 1, p. 24-29, 1993.

RAMSEY, J. A.; et al. MIB- 1 proliferative activity is a significant prognostic factor in primary thick cutaneous melanomas. **J. Invest. Dermatol.**, v. 105, p. 22-26, 1995.

REGEZI, J. A.; et al. p53, p21, Rb and MDM2 proteins in tongue carcinoma from patients <35 versus >75 years. **Oral Oncol.**, v. 35, p. 379-383, 1999.

REGEZI, J. A.; SCIUBBA, J. J.; JORDAN, R. C. K. **Patologia oral correlações clinicopatológicas**. 5ª ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. 417 p.

RIBEIRO, A. C. P.; et al. Clinical and histopathological analysis of oral squamous cell carcinoma in young people: a descriptive study in Brazilians. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 47, p. 95-98, 2009.

ROCHA, D. A.; SOUZA, L. B.; PEREIRA PINTO, L. Análise comparativa da proliferação celular entre carcinomas de células escamosas orais HPV- positivos e HPV- negativos. **J. Bras. Patol. Med. Lab.**, v. 43, n. 4, p. 269-274, 2007.

ROLAND, N. J.; et al. Has the cellular proliferation marker Ki-67 any clinical relevance in squamous cell carcinoma of the head and neck? **Clin. Otolaryngol. Allied. Sci.**, v. 19, n. 1, p. 13-18, 1994.

SANKARANARAYANAN, R.; et al. Aetiology of oral cancer in patients less than or equal to 30 years of age. **Br. J. Cancer**, v. 59 n. 3, p. 439-940, 1989.

SARKARIA, J. N.; HARARI, P. M. Oral tongue cancer in young adults less than 40 years of age: rationale for aggressive therapy. **Head Neck**, v. 16, p. 107-111, 1994.

SASAKI, T.; et al. Clinicopathological features of squamous cell carcinoma of the oral cavity in patients <40 years of age. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 834, p. 129-133, 2005.

SCAGLIOTTI, G. V.; et al. Prognostic significance of Ki67 labelling in resected non small cell lung cancer. **Eur. J. Cancer**, v. 29a, p. 363-365, 1993.

SCHANTZ, S. P.; et al. Young adults with head and neck cancer express increased susceptibility to mutagen-induced chromosome damage. **JAMA**, v. 262, p. 3313-3315, 1989.

SCHLÜTER, C.; et al. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. **J. Cell Biol.**, v. 123, p. 513-522, 1993.

SCHOLZEN, T.; GERDES, J. The Ki-67 protein: from known and the unknown. **J. Cell Physiol.**, v. 182, p. 311-322, 2000.

SCULLY, C.; FIELD, J. K.; TANZAWA, H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma 3: clinicopathological applications. **Oral Oncol.**, v. 36, p. 404-413, 2000.

SHERIN, S.; et al. Changing trends in oral cancer. **Indian J. Cancer**, v. 45, n. 3, p. 93-96, 2008.

SHERR, C. J. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. **Cancer Res.**, v. 60, p. 3689-3695, 2000.

SHIBA, M.; et al. Ki-67 immunostaining and other prognostic factors including tobacco smoking in patients with resected nonsmall cell lung carcinoma. **Cancer**, v. 89, p. 1457-1465, 2000.

SIEGELMANN-DANIELI, N.; et al. Oral tongue cancer in patients less than 45 years old: institutional experience and comparison with older patients. **J. Clin. Oncol.**, v. 16; p. 745-753, 1998.

SILVA, S. D. ErbB2 and fatty acid synthase (FAS) expression in 102 squamous cell carcinomas of the tongue: correlation with clinical outcomes. **Oral Oncology**, v. 44, p. 484-490, 2008.

SILVA, S. D.; et al. Expression of fatty acid synthase, ErbB2 and Ki-67 in head and neck squamous cell carcinoma. A clinicopathological study. **Oral Oncology**, v. 40, p. 688-696, 2004.

SILVEIRA, E. J. D. S.; et al. Correlation of clinical, histological, and cytokeratin profiles of squamous cell carcinoma of the oral tongue with prognosis. **Int. J. Surg. Pathol.**, v. 15, n. 4, p. 376-383, 2007.

SIRIWARDENA, B. S. M. S.; et al. Analysis of histopathological and immunohistochemical differences of oral squamous cell carcinoma in young and old patients in Sri Lanka. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 36, p. 357-362, 2007.

SIRIWARDENA, B. S. M. S.; et al. Demographic, aetiological and survival differences of oral squamous cell carcinoma in the young and the old in Sri Lanka. **Oral Oncology**, v. 42, p. 831– 836, 2006.

SON, Y.; KAPP, D. S. Oral cavity and oropharyngeal cancer in younger population. **Cancer**, v. 55 p. 441-444, 1985.

SORENSEN, D. M.; et al. Absence of p53 mutations in squamous carcinomas of the tongue in nonsmoking and nondrinking patients younger than 40 years. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, v. 123, p. 503–506, 1997.

SOUZA, R. M.; SAKAE, T. M.; GUEDES, A. L. Características clínico epidemiológicas de pacientes portadores de carcinomas da cavidade oral e orofaringe em clínica privada no sul do Brasil. **ACM Arq. Catarin. Med.**, v. 37, n. 2, p. 32-41, 2008.

STOLK-LIEFFERINK, S. A. H.; et al. Oral squamous cell carcinoma in children; review of an unusual entity. **Int. J. Pediatr. Otorhinolaryngol.**, v. 72, p. 127-131, 2008.

TODD, R.; et al. Cell cycle dysregulation in oral cancer. **Crit. Rev. Oral Biol. Med.**, v. 13, n. 1, p. 51-61, 2002.

TUMULURI, M.; THOMAS, G. A.; FRASER, I. S. Analysis of the ki-67 antigen et the invasive tumor of human oral squamous cell carcinoma. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 31, n. 10, p. 598-604, 2002.

TUMULURI, V.; et al. The relationship of proliferating cell density at the invasive tumour front with prognostic and risk factors in human oral squamous cell carcinoma. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 33, p. 204-208, 2004.

van DIERENDONCK, J. H.; et al. Nuclear distribution of the Ki-67 antigen during the cell cycle: Comparison with growth factor in human breast cancer cells. **Cancer Res.**, v. 49, p. 2999–3006, 1989.

van DIEST, P. J.; BRUGAL, G.; BAAK, J. P. A. Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value. **J. Clin. Pathol.**, v. 51, p. 716–724, 1998.

van OIJEN, M.; et al. Positivity of the proliferation marker Ki-67 in noncycling cells. **Am. J. Clin. Pathol.**, v. 110, p. 24–31, 1998.

VARGAS, H.; et al. More aggressive behavior of squamous cell carcinoma of the anterior tongue in young women. **Laryngoscope**, v. 110, p. 1623–1626, 2000.

VENESS, M. J.; et al. Anterior tongue cancer: age is not a predictor of outcome and should not alter treatment. **ANZ J. Surg.**, v. 73, p. 899-904, 2003.

VICENTE, J. C. et al. Expression of ciclin D1 and Ki-67 in squamous cell carcinoma of the oral cavity: clinicopathological and prognostic significance. **Oral Oncol.**, v. 38, n. 3, p. 301-308, 2002.

VIEIRA, F. L. D.; et al. Cellular profile of the peritumoral inflammatory infiltrate in squamous cells carcinoma of oral mucosa: Correlation with the expression of Ki67 and histologic grading. **BMC Oral Health**, v. 8, p. 25, 2008.

WAHL, P. M. **Tipos histológicos de tumores orales y orofaríngeos**. Ginebra: Organización Mundial de la Salud, 1971.

XIONG, Y.; ZHANG, H.; BEACH, D. D type cyclins associate with multiple protein kinases and the DNA replication and repair factor PCNA. **Cell**, v. 71, p. 505-514, 1992.

APÊNDICES**APÊNDICE A**

Universidade Federal do Rio Grande do Norte
Centro de Ciências da Saúde
Departamento de Odontologia
Programa de Pós-Graduação em Patologia Oral
Projeto de Pesquisa:

**Estudo comparativo da expressão do Ki-67 em carcinoma epidermóide de língua em
pacientes jovens e idosos
Ficha para coleta de dados**

Nº do prontuário: _____ **Nº do bloco:** _____ **Idade:** _____

Sexo: () 1- masc; 2 - fem.

Hábito: () 1- fuma; 2- bebe; 3 - fuma e bebe; 4 - não possui nenhum hábito; 9 - não informado

TNM: ___ 1-Estag. I; 2- Estag.II; 3- Estag.III; 4- Estag.IV, 9- não informado

Tamanho do tumor: ___ 1- 0-2 cm; 2- 2-4 cm; 3- acima de 4 cm; 9- não informado

Observações: _____

APÊNDICE B**Ficha para anotação da análise histomorfológica**

Caso	Grau de ceratinização	Pleomorfismo nuclear	Padrão de invasão	Infiltrado inflamatório	Escore total	Gradação histológica
01						
02						
03						
04						
05						
06						
07						
08						
09						
10						
11						
12						
13						
14						
15						
16						
17						
18						
19						
20						
21						
22						
23						
24						
25						
26						
27						
28						
29						
30						
31						
32						
33						
34						
35						
36						
37						
38						
39						
40						

ANEXOS



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM PATOLOGIA ORAL**

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Este é um convite para você participar da pesquisa **“Estudo comparativo da expressão do Ki-67 em carcinoma epidermóide de língua em pacientes jovens e idosos”** que é coordenada pela Prof^ª. Dr^ª. Lélia Batista de Souza. Sua participação é voluntária, o que significa que você poderá desistir a qualquer momento, retirando seu consentimento, sem que isso lhe traga nenhum prejuízo ou penalidade.

Essa pesquisa procura estudar o papel da proliferação celular através do uso desses dois marcadores na tentativa de melhor conhecer o mecanismo de progressão do tumor e assim estabelecer medidas que possam contribuir nos tratamentos empregados até o momento para este tipo de lesão. Caso decida aceitar o convite, o (a) senhor (a) permitirá a utilização dos blocos de parafina contendo amostra da lesão que foi removida por indicação cirúrgica objetivando o diagnóstico e tratamento. Destes blocos serão obtidos cortes histológicos para confecção de lâminas para o estudo, não havendo qualquer prejuízo para você. Após a obtenção dos cortes histológicos para o referido projeto, os blocos serão devolvidos para os Arquivos do Serviço Anatomopatológico do Hospital Dr. Luiz Antônio da Liga Norte Riograndense Contra o Câncer.

Todas as informações obtidas serão sigilosas e seu nome não será identificado em nenhum momento. Os dados serão guardados em local seguro e a divulgação dos resultados será feita de forma a não identificar os voluntários.

Se você tiver algum gasto que seja devido à sua participação na pesquisa, você será ressarcido, caso solicite. Em qualquer momento, se você sofrer algum dano comprovadamente decorrente desta pesquisa, você terá direito à indenização.

Você ficará com uma cópia deste Termo e toda a dúvida que você tiver a respeito desta pesquisa, poderá perguntar diretamente para a Dr^a. Lélia Batista de Souza, no Departamento de Odontologia da UFRN situado na Av. Salgado Filho, 1787- Lagoa Nova- CEP: 59056-000, na disciplina de Patologia Oral, ou pelo telefone (84)3215-4132.

Consentimento Livre e Esclarecido

Eu, _____, declaro que compreendi os objetivos desta pesquisa, como ela será realizada, os riscos e benefícios envolvidos e concordo em participar voluntariamente da pesquisa.

“Estudo comparativo da expressão do Ki-67 em carcinoma epidermóide de língua em pacientes jovens e idosos”

Assinatura do Participante



Prof^a. Dr^a. Lélia Batista de Souza.

Pesquisadora responsável

Av. Sen. Salgado Filho, 1787, Lagoa Nova, CEP: 59056-000 – Natal/RN

ANEXOS



Liga
Contra o
Câncer

LIGA NORTE RIOGRANDENSE CONTRA O CÂNCER
DEPARTAMENTO DE ENSINO, PESQUISA
E EDUCAÇÃO COMUNITÁRIA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

Natal, 30 de setembro de 2009.

Parecer Consubstanciado Nº. 051/051/2009.

Protocolo de Estudo: “Estudo comparativo da expressão do MCM-2 e Ki-67 em Carcinoma de língua em pacientes jovens e idosos”

Pesquisadores Responsáveis: Thaís Gomes Benevenuto e Profa. Dra Lélia Batista

Documentos presentes e adequados:

- ✓ TCLE, com alterações sugeridas pelo CEP/LNRCC

Parecer: O termo de consentimento, bem como no projeto foi incluída a informação que o bloco do paciente será devolvido para a instituição tão logo as lâminas sejam confeccionadas, pois se for necessário uma revisão do diagnóstico anatomo-patológico para uma decisão do tratamento oncológico deste paciente, o material estará disponível, e assim não retardará o novo tratamento proposto.

Portanto, o Comitê de Ética da Liga Norte Riograndense expressa o seu parecer a este estudo como **APROVADO**.

Informações ao pesquisador: segundo a Comissão Nacional de Ética em Pesquisa – CONEP, através do “Manual Operacional para Comitês de Ética em Pesquisa” e resolução 196/96 do CNS o pesquisador responsável deverá:

1. Entregar ao sujeito da pesquisa uma cópia do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido – TCLE, na íntegra, por ele assinada (Res. 196/96 – CNS);
2. Desenvolver a pesquisa conforme foi delineada no protocolo aprovado (Res. 196/96 – CNS);
3. Apresentar ao CEP/LNRCC eventuais emendas ou extensões ao protocolo original, com justificativa;
4. Apresentar ao CEP/LNRCC relatórios parciais (a cada 6 meses) e final após conclusão da pesquisa.

OBS: Informamos também que nenhum dos pesquisadores envolvidos no estudo participou e também não aprovou ou expressou sua opinião através de procuração a membros do CEP para análise, aprovação ou não, dos documentos referidos.

Dr. Edilmar de Moura Santos
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa da
Liga Norte Riograndense Contra o Câncer

Livros Grátis

(<http://www.livrosgratis.com.br>)

Milhares de Livros para Download:

[Baixar livros de Administração](#)

[Baixar livros de Agronomia](#)

[Baixar livros de Arquitetura](#)

[Baixar livros de Artes](#)

[Baixar livros de Astronomia](#)

[Baixar livros de Biologia Geral](#)

[Baixar livros de Ciência da Computação](#)

[Baixar livros de Ciência da Informação](#)

[Baixar livros de Ciência Política](#)

[Baixar livros de Ciências da Saúde](#)

[Baixar livros de Comunicação](#)

[Baixar livros do Conselho Nacional de Educação - CNE](#)

[Baixar livros de Defesa civil](#)

[Baixar livros de Direito](#)

[Baixar livros de Direitos humanos](#)

[Baixar livros de Economia](#)

[Baixar livros de Economia Doméstica](#)

[Baixar livros de Educação](#)

[Baixar livros de Educação - Trânsito](#)

[Baixar livros de Educação Física](#)

[Baixar livros de Engenharia Aeroespacial](#)

[Baixar livros de Farmácia](#)

[Baixar livros de Filosofia](#)

[Baixar livros de Física](#)

[Baixar livros de Geociências](#)

[Baixar livros de Geografia](#)

[Baixar livros de História](#)

[Baixar livros de Línguas](#)

[Baixar livros de Literatura](#)
[Baixar livros de Literatura de Cordel](#)
[Baixar livros de Literatura Infantil](#)
[Baixar livros de Matemática](#)
[Baixar livros de Medicina](#)
[Baixar livros de Medicina Veterinária](#)
[Baixar livros de Meio Ambiente](#)
[Baixar livros de Meteorologia](#)
[Baixar Monografias e TCC](#)
[Baixar livros Multidisciplinar](#)
[Baixar livros de Música](#)
[Baixar livros de Psicologia](#)
[Baixar livros de Química](#)
[Baixar livros de Saúde Coletiva](#)
[Baixar livros de Serviço Social](#)
[Baixar livros de Sociologia](#)
[Baixar livros de Teologia](#)
[Baixar livros de Trabalho](#)
[Baixar livros de Turismo](#)