



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
DEPARTAMENTO DE ODONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA**

**AVALIAÇÃO DA PROGRESSÃO TUMORAL EM
CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÁBIO
INFERIOR**

FRANCISCO JADSON LIMA

CAMPINA GRANDE/PB

2012

FRANCISCO JADSON LIMA

**AVALIAÇÃO DA PROGRESSÃO TUMORAL EM
CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÁBIO
INFERIOR**

*Dissertação apresentada como um dos requisitos
para obtenção do título de Mestre em
Odontologia pelo Programa de Pós-Graduação
em Odontologia da Universidade Estadual da
Paraíba (UEPB)*

ORIENTADOR: PROF. DR. GUSTAVO PINA GODOY

CAMPINA GRANDE/PB

2012

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na sua forma impressa como eletrônica. Sua reprodução total ou parcial é permitida exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, desde que na reprodução figure a identificação do autor, título, instituição e ano da dissertação

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA BIBLIOTECA CENTRAL – UEPB

L732a Lima, Francisco Jadson.

Avaliação da progressão tumoral em carcinoma de células escamosas de lábio inferior [manuscrito] / Francisco Jadson Lima. – 2012.

127 f. : il. color.

Digitado

Dissertação (Mestrado em Odontologia) – Universidade Estadual da Paraíba, Pró-Reitoria de Pós-Graduação e Pesquisa, 2012.

“Orientação: Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy, Departamento de Odontologia”.

1. Saúde bucal. 2. Patologia bucal. 3. Neoplasias. 4. Carcinoma. I. Título.

21. ed. CDD 617.6

FRANCISCO JADSON LIMA

AVALIAÇÃO DA PROGRESSÃO TUMORAL EM
CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÁBIO
INFERIOR

APRESENTADA EM: 23 / 07 / 2012

BANCA EXAMINADORA



PROF. DR. GUSTAVO PINÁ GODOY
UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAIBA (UEPB)



PROF. DR. CASSIANO FRANCISCO WEEGE NONAKA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAIBA (UEPB)



PROFa. DRa. LÉLIA BATISTA DE SOUZA
UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO NORTE (UFRN)

CAMPINA GRANDE/PB

2012

DEDICO:

À Deus pelo amor infinito aos seus filhos.

À meu pai, José Patrício, pelo incentivo e o exemplo de homem.

À minha mãe, Margarida, pelo seu carinho irrestrito e sua fé em mim depositada.

Aos meus irmãos, Patrício, Ricardo e Renato, pelo apoio e o respeito às minhas escolhas.

À minha esposa, Luciana, pelo seu amor e companheirismo incondicional e insubstituível.

Ao meu orientador e amigo, Prof. Gustavo, por transparecer em palavras o meu melhor amigo sem deixar de ser um sábio mestre.

AGRADECIMENTOS

Aos meus pais, Margarida e José Patrício, que incondicionalmente depositaram todo o seu amor e dedicação, participando comigo na construção e alcance dos meus objetivos, estando sempre presentes em todos os momentos da minha vida.

Aos meus irmãos, Patrício, Ricardo e Renato, pela união e cumplicidade.

À minha esposa, Luciana, pelo carinho e incentivo que me foi dado para seguir em frente, e por todas as vezes que posso enxergar através de seus olhos um mundo melhor, mais colorido e cheio de sorrisos.

Ao meu orientador e amigo, Prof. Dr. Gustavo Pina Godoy, por ser um exemplo de humildade e dedicação, pela confiança, apoio, incentivo, amizade e por contribuir em minha formação científica e pessoal. Ao longo de alguns anos aprendi com o mestre que o trabalho é a nossa maior motivação, e que alcançar as nossas metas deve ser sempre o nosso foco.

Aos meus colegas de mestrado, pelos momentos de alegria, ensinamentos e aprendizados.

Às Professoras Doutoras Polliana Muniz Alves, Daliana Queiroga de Castro Gomes e ao Professor Doutor Cassiano Francisco Weege Nonaka, pelos incentivos e contribuições durante o desenvolvimento deste trabalho.

À Professora Maria Cássia Ferreira Aguiar, pelo incentivo e apoio durante a realização desta pesquisa, em especial na parte laboratorial.

Ao Professor Doutor Kenio Costa Lima, pelo apoio e ensinamentos dentro deste campo intrigante e ao mesmo tempo encantador da bioestatística.

Ao Professor Doutor Sergio D`avila, por alguns momentos de descontração, outros de ensinamento e mais alguns de conselhos. Como este mesmo diria: *“Melhor ter amigo na praça que dinheiro no banco”*.

Aos professores e equipe do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), por todos os ensinamentos e experiências compartilhadas durante todos esses anos.

À Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), por todas as oportunidades de aprendizado oferecidas durante a graduação e Pós-graduação.

A Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), pela oportunidade concedida por meio do PROCAD, momento riquíssimo de troca de experiências e absorção de novos conhecimentos.

Aos professores, alunos e funcionários do programa de Pós-graduação em odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) dos Laboratórios 3201 e 3202: A todos o meu muito obrigado!

Ao Hospital Napoleão Laureano (João Pessoa-PB), pela contribuição material para o desenvolvimento deste trabalho.

A Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pelo excelente trabalho desenvolvido no nosso país ao incentivar o desenvolvimento através da pesquisa científica, e pela concessão de uma bolsa durante todo o período do mestrado.

'A Vontade de Deus nunca irá
levá-lo aonde a Graça de Deus
não possa protegê-lo'

Chico Xavier

RESUMO

Fundamento: O carcinoma de células escamosas de lábio inferior (CCELI) é reconhecido como a neoplasia maligna oral de maior incidência, principalmente em populações com alto índice de exposição à radiação solar. **Objetivo:** A presente pesquisa teve como objetivo analisar a imunexpressão das proteínas EGFr, Ki-67 e p27 em CCELI avaliando regiões que representam etapas distintas do desenvolvimento da lesão, com intuito de verificar a utilização destas proteínas como marcadores de progressão tumoral. **Método:** Foi analisada uma amostra de 32 CCELI, tendo como grupo comparativo 32 casos de epitélio oral normal representado por espécimes de fenômeno de retenção de muco. Todos os casos de CCELI foram analisados quanto às suas características clínicas como: sexo, idade, raça, atividade ocupacional, exposição à radiação solar e estadiamento clínico (TNM), e histologicamente quanto à presença de atipia celular em epitélio adjacente ao tumor. No epitélio adjacente foi utilizada a classificação sugerida por Gale *et al.*, (2005) e adaptado por Warnakulasuriya *et al.*, (2008) para graus de displasia epitelial classificando-as em leve, moderada e severa, e para *front* de invasão a classificação de malignidade sugerida por Bryne (1998) e adaptada por Silveira *et al.*, (2010), classificando os casos como de alto e baixo grau de malignidade. Adicionalmente os CCELI foram classificados em tumores bem diferenciados, moderadamente diferenciados e pobremente diferenciados pelos critérios sugeridos por CARDESA *et al.*, (2005). Para análise da imunexpressão da proteína EGFr foi considerada a marcação em membrana citoplasmática e seu padrão de expressão foi classificado em ausente, fraco, moderado e intenso (DINIZ-FREITAS *et al.*, 2007). Para as proteínas Ki-67 e p27 foram contadas as células positivas e negativas em um conjunto de 500 células para obtenção do índice de positividade (ROCHA, SOUZA, PINTO, 2007). **Resultados:** Os resultados revelaram que o sexo masculino (n=23/71,9%), com 61 anos ou mais de idade (n=19/59,3%) e da raça branca (n=22/68,8%) foram mais prevalentes, bem como agricultores (n=25/78,1%), expostos à radiação solar (n=26/81,2%) e com lesões clinicamente nos estádios iniciais I e II (28/87,5%) foram os achados mais frequentes. A displasia epitelial leve (n=18/56,3%), a gradação histopatológica de baixo grau em *front* de invasão tumoral (n=19/59,4%) e os casos bem diferenciados (n=16/50,0%) foram predominantes. A gradação histopatológica no *front* de invasão bem como a gradação em toda extensão tumoral demonstraram associação estatística ($p=0,004$). A diferença de expressão entre CCELI e o epitélio normal não demonstrou significância para KI-67, enquanto a expressão de p27 foi significativa em epitélio adjacente ($p=0,025$), cório tumoral ($p<0,001$) e *front* de invasão ($p<0,001$), enquanto a marcação da proteína EGFr apenas foi significativa em *front* de invasão ($p=0,047$). A análise nas áreas tumorais não mostrou diferença significativa para marcações das proteínas EGFr e Ki-67, enquanto a proteína p27 apresentou uma diminuição progressiva de expressão conforme realizada a análise de epitélio adjacente, passando pelo cório tumoral e chegando a *front* de invasão ($p<0,001$). **Conclusão:** As proteínas EGFr, Ki-67 e p27 estão envolvidas na progressão tumoral, seja relacionadas ao processo de proliferação celular ou a outras vias de sinalizações. Estes achados sugerem utilização das proteínas EGFr e p27 como marcadores de progressão tumoral em CCELI.

Palavras chave: Neoplasias bucais. Neoplasias labiais. Diagnóstico bucal. Marcadores biológicos. Imunohistoquímica.

ABSTRACT

Background: Squamous cell carcinoma of the lower lip (SCCLL) is recognized as the oral malignancy of larger incidence, especially in populations with high exposure to solar radiation. **Objective:** This study aimed to analyze the immunoeexpression of EGFr, Ki-67 and p27 proteins in SCCLL evaluating regions that represent distinct stages of lesion development, in order to verify the use of these proteins as markers of tumor progression. **Method:** We analyzed a sample of 32 SCCLL and 32 cases of normal oral epithelium represented by phenomena of extravasation of mucus as a comparative group. All cases of SCCLL were analyzed based on their clinical characteristics such as gender, age, race, occupational activity, exposure to solar radiation and clinical staging (TNM), and histologically for the presence of cellular atypia in the epithelium adjacent to the tumor and to the front invasion. In the adjacent epithelium was used the classification to degrees of epithelial dysplasia as mild, moderate and severe by Gale et al., (2005) and adapted of Warnakulasuriya *et al.*, (2008), and to the invasive front was used the malignancy classification suggested by Bryne (1998) and adapted by Silveira et al. (2010) classifying the cases into high and low degrees of malignancy. Additionally the entire tumor area was classified according to the histological gradation by Cardesa et al.,(2005) in well-differentiated, moderately differentiated and poorly differentiated tumors. To the analysis of the immunostaining of EGFr protein was considered the mark to the cytoplasmic membrane and its expression pattern was classified as absent, weak, moderate and intense (DINIZ-FREITAS et al., 2007). For p27 and Ki-67 proteins were counted the positive and negative cells in a set of 500 cells to obtain the index of positivity (ROCK, SOUZA, PINTO, 2007). **Results:** The results revealed that males (n = 23/71.9%), 61 years old or older (n = 19/59.3%) and Caucasians (n = 22/68.8%) were more frequent and farmers (n = 25/78.1%), exposed to solar radiation (n = 26/81.2%) and lesions clinically in the early stages I and II (28/87.5%) were the most frequent findings. The mild dysplasia (n = 18/56, 3%), the histological grading in front of low grade (n = 19/59.4%) and the well differentiated cases (n = 16/50.0%) predominated. The front grading and grading across tumor extension showed a statistical association (p = 0.004). The difference in expression between normal epithelium and SCCLL was not significant for KI-67, while the expression of p27 was significant in the adjacent epithelium (p=0.025), tumor chorion (p<0.001) and the front of invasion (p<0.001), and the staining of EGFr protein was significant only in front of invasion (p = 0.047). The analysis of the tumoral areas showed no significant difference in scores of EGFr and Ki-67 proteins, while, the p27 protein showed a progressive decrease of expression as it was performed the analysis of the adjacent epithelium to the front of invasion (p<0.001). **Conclusion:** The protein EGFr and p27 are involved in tumor progression, is related to the process of cellular proliferation or other signaling pathways. These findings suggest the use of proteins as p27 and EGFr markers of tumor progression in CCELLI, and the protein Ki-67 as a marker of cell proliferation.

Key words: Mouth neoplasms. Carcinoma cell squamous. Neoplasms lip. Diagnosis oral. Biological tumor markers. Pathology.

LISTA DE ABREVIATURAS

BAX	Proteína BAX
BCL-2	Do inglês: <i>B-cell lymphoma 2</i> , traduzido como Linfoma de Células B 2
CAPES	Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior
CCE	Carcinoma de Células Escamosas
CCELI	Carcinoma de Células Escamosas de Lábio Inferior
CCEO	Carcinoma de Células Escamosas Oral
CDK	Do inglês: <i>Cyclin-Dependent Kinase</i> , traduzido para quinases dependentes de ciclinas
CDKI	Do inglês: <i>Cyclin-Dependent Kinase Inhibitor</i> , traduzido para inibidor de quinases dependentes de ciclinas.
C-myc	Antígeno C-myc
CNPq	Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico
D2-40	Antígeno D2-40
DNA	Do inglês: <i>Deoxyribonucleic acid</i> , traduzido para ADN ácido desoxirribonucleico
EGFr	Do inglês: <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i> , traduzido como Receptor do Fator de Crescimento Epidérmico
HE	Hematoxilina e Eosina
HPV	Papiloma Vírus Humano
IBGE	Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IM	Índice de Marcação
H-RAS	Antígeno H-RAS
Ki-67	Antígeno Ki-67
MCM-2	Antígeno MCM-2
MDM-2	Antígeno MDM-2
MG	Minas Gerais
OMS	Organização Mundial da Saúde

PB	Paraíba
PCNA	Do inglês: <i>Proliferating Cell Nuclear Antigen</i> , traduzido para antígeno nuclear de proliferação celular
p16	Antígeno p16
p21	Antígeno p21
p27	Antígeno p-27
p53	Antígeno p53
p63	Antígeno p63
TGF-alfa	Do inglês: <i>Transforming growth factor alpha</i> , traduzido para fator de crescimento transformante alfa
TNM	Tumor-Nódulo-Metástase
VGF	Do inglês: <i>nerve growth factor</i> , traduzido para fator de crescimento dos nervos
UEPB	Universidade Estadual da Paraíba
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
UICC	União Internacional Contra o Câncer
UV	Ultra Violeta

ISTA DE TABELAS

Tabela 1	Caracterização da amostra segundo os dados clínicos analisados: sexo, faixa etária, raça, ocupação e estadiamento clínico (TNM). Campina Grande, Paraíba (2012).	69
Tabela 2	Caracterização da amostra segundo o estudo histopatológico: presença de displasia, grau de displasia (Epitélio Adjacente) (WARNAKULASURIYA <i>et al.</i> , 2008), gradação histopatológica segundo Bryne (1998) e gradação histopatológica (CARDESA <i>et al.</i> , 2005). Campina Grande, Paraíba (2012).	71
Tabela 3	Análise de associação entre a gradação histopatológica segundo Bryne (1998) e displasia epitelial em epitélio adjacente ao tumor e gradação histopatológica (OMS, 2005). Campina Grande, Paraíba (2012).	71
Tabela 4	Análise estatística entre a imunexpressão da proteína EGFr em relação às diferentes áreas tumorais e às características clínicas e histopatológicas estudadas - Campina Grande, Paraíba (2012).	85
Tabela 5	Análise estatística entre a imunexpressão da proteína Ki-67 em relação às diferentes áreas tumorais e às características clínicas e histopatológicas estudadas - Campina Grande, Paraíba (2012).	88
Tabela 6	Análise estatística entre a imunexpressão da proteína p27 em relação às diferentes áreas tumorais e às características clínicas e histopatológicas estudadas - Campina Grande, Paraíba (2012).	91
Tabela 7	Análise estatística entre a imunexpressão das proteínas Ki-67 e p27 nas diferentes áreas tumorais em relação ao grupo comparativo de epitélio normal - Campina Grande, Paraíba (2012).	93
Tabela 8	Análise estatística entre a imunexpressão da proteína EGFr nas diferentes áreas tumorais em relação ao grupo comparativo de epitélio normal - Campina Grande, Paraíba (2012).	93
Tabela 9	Análise estatística entre a diferença dos índices de imunexpressão das proteínas Ki-67 e p27 nas diferentes áreas tumorais - Campina Grande, Paraíba (2012).	94
Tabela 10	Análise estatística entre a diferença de imunexpressão das proteínas Ki-67 e p27 nas diferentes áreas tumorais em relação à imunexpressão da proteína EGFr - Campina Grande, Paraíba (2012).	94

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1** Fotomicrografias de epitélio adjacente a tumores exibindo displasia leve (A), displasia moderada (B) e displasia severa (C) (HE, 400x). 72
- Figura 2** Espécime de CCELI de baixo grau de malignidade (BRYNE, 1998) exibindo abundante ceratinização, pleomorfismo celular moderada, padrão de invasão em cordões delimitados e intenso infiltrado inflamatório (HE, 400x). 73
- Figura 3** Espécime de CCELI de baixo grau de malignidade (BRYNE, 1998) exibindo ausência de ceratinização, pleomorfismo celular acentuado, padrão de invasão em pequenos ninhos e discreto infiltrado inflamatório moderado. 73
- Figura 4** Espécime de CCELI bem diferenciado (A), moderadamente diferenciado (B) e pobremente diferenciado (C) (CARDESA *et al.*, 2005). 74
- Figura 5** Expressão nuclear para proteína Ki-67. A- Tecido epitelial normal. B- Epitélio adjacente a neoplasia. C – Região de cório tumoral. D – Região de *front* de invasão tumoral (LSAB, 400x). 78
- Figura 6** Expressão nuclear para proteína p27. A- Tecido epitelial normal. B- Epitélio adjacente a neoplasia. C – Região de cório tumoral. D – Região de *front* de invasão tumoral (LSAB, 400x). 79
- Figura 7** Expressão em membrana citoplásmatica para proteína EGFr. A- Tecido epitelial normal. B- Epitélio adjacente a neoplasia. C – Região de cório tumoral. D – Região de *front* de invasão tumoral (LSAB, 400x). 81

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Definição das subcategorias do sistema TNM e suas categorias gerais (BARNES <i>et al.</i> , 2005).	28
Quadro 2	Variáveis do estudo.	57
Quadro 3	Critérios utilizados para o diagnóstico de displasia epitelial (GALE <i>et al.</i> , (2005).	59
Quadro 4	Classificação e características dos graus de displasia epitelial, de acordo com Warnakulasuriya <i>et al.</i> (2008).	60
Quadro 5	Sistema de gradação histológica de malignidade no <i>front</i> de invasão proposto por Bryne (1998).	61
Quadro 6	Sistema de gradação histológica de malignidade proposto por CARDESA <i>et al.</i> , (2005).	61
Quadro 7	Especificidade dos anticorpos utilizados.	64
Quadro 8	Classificação da marcação em membrana citoplasmática para proteína EGFr (DINIZ-FREITAS <i>et al.</i> , 2007)	66

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 1	Índice de imunexpressão das proteínas Ki-67 e p27 em epitélio normal e em CCELI, analisando o epitélio adjacente, o cório e o <i>front</i> de invasão. Campina Grande, Paraíba (2012).	80
Gráfico 2	Classificação da imunexpressão das proteínas EGFr em epitélio normal e em CCELI, analisando o epitélio adjacente, o cório e o <i>front</i> de invasão. Campina Grande, Paraíba (2012).	82

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	17
2. REVISÃO DE LITERATURA	19
2.1 CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS	19
2.1.1 Carcinoma de Células Escamosas Oral	19
2.1.2 Carcinoma de Células Escamosas de Lábio Inferior	23
2.2 ESTADIAMENTO CLINICO	27
2.3 GRADAÇÃO HISTOPATOLÓGICA	32
2.4 PROGRESSAO TUMORAL	37
2.4.1 Proteína EGFr	38
2.4.2 Proteína Ki-67	42
2.4.3 Proteína P27	46
3. OBJETIVOS	53
3.1 OBJETIVO GERAL	53
3.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS	53
4.0 METODOLOGIA	54
4.1 IMPLICAÇÃO ÉTICA	54
4.2 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO	54
4.3LOCAL DO ESTUDO	54
4.4 POPULAÇÃO DO ESTUDO	55
4.4.1 Critérios de Inclusão	55
4.4.2 Critérios de Exclusão	56
4.5 AMOSTRA	56
4.6 VARIÁVEIS DO ESTUDO	57
4.7 ESTUDO CLINICO	57
4.8 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO	59
4.9 ESTUDO IMUNOHISTOQUIMICO	62
4.9.1 Método Imunohistoquímico	62

4.9.1 Análise das Células Imunomarcadas	65
4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	67
5. RESULTADOS	68
5.1 RESULTADOS CLÍNICOS	68
5.2 RESULTADOS HISTOPATOLÓGICOS	70
5.3 RESULTADOS IMUNO-HISTOQUÍMICOS	75
5.3.1 Grupo comparativo	75
5.3.2 Epitélio adjacente ao tumor	75
5.3.3 Cório e <i>front</i> de invasão tumoral	76
5.4 ANÁLISE DAS IMUNOEXPRESSIONES EM RELAÇÃO AS VARIÁVEIS DO ESTUDO	82
6. DISCUSSÃO	95
7. CONCLUSÃO	108
REFERÊNCIAS	109
APÊNDICE A - INSTRUMENTO DE PESQUISA	124
ANEXO I- APROVAÇÃO DO COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA	127

1. INTRODUÇÃO

No tocante aos estudos envolvendo o câncer oral, a literatura relata o acometimento em cerca de 7% da população mundial, com o Brasil ocupando o 4º lugar em incidência no mundo (LLEWELLYN, JOHNSON, WARNAKULASURIYA, 2001; GARAVELLO *et al.*, 2008; MARQUES *et al.*, 2008; AGARWAL *et al.*, 2011). Dentre todas as neoplasias nesta região anatômica, destaca-se o Carcinoma de Células Escamosas Oral (CCEO), que representa aproximadamente 95% dos tumores malignos de boca (MONTORO *et al.*, 2008; AGARWAL *et al.*, 2011).

Nos últimos anos a incidência de Carcinoma de Células Escamosas de Lábio Inferior (CCELI) vem aumentando, principalmente em função dos hábitos da população, que em especial passou a se expor mais à radiação ultravioleta (UV) (COSTA *et al.*, 2002; HORTA *et al.*, 2007; CANTIN *et al.*, 2008; HASSON *et al.*, 2008; CZERNINSKI; ZINI; SGAN-COHEN, 2010; SOUZA *et al.*, 2011).

Diversos estudos têm sido realizados com o intuito de conhecer melhor o comportamento biológico do CCEO utilizando marcadores moleculares e relacionando estes a sua atividade proliferativa, grau de diferenciação, bem como potencial de invasão e metástases, no entanto, esta progressão tumoral ainda não foi bem esclarecida (BRYNE *et al.*, 1991; ZIOBER; SILVERMAN; KRAMER, 2001; BELBIN *et al.*, 2005; SHAH *et al.*, 2009; SILVEIRA *et al.*, 2010).

Algumas proteínas tem sido estudadas junto ao CCEO, destacando-se dentre estas a proteína EGFr (*epidermal growth factor receptor*) que tem sua superexpressão observada em casos de CCEO e de laringe, associando-se a um prognóstico reservado (GALIZIA *et al.*, 2006; LOTHAIRE *et al.*, 2006; BERLANGA-ACOSTA *et al.*, 2009).

Outras importantes proteínas estudadas são a Ki-67 e a p27, que possuem atividade relacionada ao ciclo celular e à proliferação celular. A proteína Ki-67 tem função

relacionada à da estrutura da cromatina, sendo necessária para a manutenção do ciclo celular e proliferação celular, e a sua superexpressão está relacionada à alta atividade proliferativa. A proteína p27 expressa importante ação inibidora das ciclinas quinase dependentes (CDKI) que atuam inibindo o ciclo celular, e alguns estudos têm referido que a diminuição da sua expressão está relacionada a um aumento da agressividade da lesão, bem como a um pior prognóstico (MINETA *et al.*, 1999; BROWN; GATTER, 2002; KARTENER *et al.*, 2002; TUMULURI; THOMAS; FRASER, 2002; TORRES-REDON *et al.*, 2009; MAZON *et al.*, 2011; PARISANIDIS *et al.*, 2011; RIBEIRO *et al.*, 2011).

A literatura mostra que as proteínas anteriormente citadas possuem intrínseca relação com as atividades celulares, representando importantes fatores de regulação da atividade proliferativa celular, e que as mesmas são expressas e sinalizadas por diferentes vias, mas não necessariamente ocorrendo de forma independente dentro do ciclo celular(SAITO; NAKAJIMA; MOGI, 1999; OKABE *et al.*, 2001; TUMULURI *et al.*, 2002; HIRAISHI *et al.*, 2004; TORRES-REDON *et al.*, 2009; SARKIS *et al.*,2010; PERISANIDI *et al.*, 2011; RIBEIRO *et al.*, 2011).

Neste contexto, o entendimento da relação entre estas proteínas poderia contribuir para a compreensão do processo de progressão tumoral do CCELI. Desta forma, teve o objetivo de analisar as imunoexpressões das proteínas EGFr, p27 e Ki-67 em regiões que representam etapas distintas do desenvolvimento tumoral no CCELI e compará-las com as imunoexpressões apresentadas pelo epitélio de revestimento de mucosa labial morfológicamente normal, com intuito de verificar a participação destas proteínas no processo de progressão tumoral na referida lesão.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS

2.1.1 Carcinoma de Células Escamosas Oral

A Organização Mundial de Saúde (OMS) estima que no ano de 2030 ocorrerá uma incidência de 27 milhões de novos casos de câncer no mundo. Nesta perspectiva, 75 milhões de pessoas passarão a conviver com esta doença, das quais 17 milhões viram a óbito em decorrência do câncer anualmente (BRASIL, 2011).

O câncer oral está entre as dez neoplasias mais comuns do mundo, e embora a ocorrência seja maior nos países orientais, o Brasil possui uma das maiores taxas, ocupando o quarto lugar em incidência no mundo. O câncer oral corresponde em sua grande maioria ao CCEO, perfazendo 95% de todos os casos, os quais estão localizados em sítios intra-orais e nos lábios (LLEWELLYN, JOHNSON; WARNAKULASURIYA, 2001; GARAVELLO *et al.*, 2008; MARQUES *et al.*, 2008; NEVILLE *et al.*, 2009; AGARWAL *et al.*, 2011; ALVES *et al.*, 2011).

O CCEO é a 8ª causa de morte nos Estados Unidos, com aproximadamente 8.000 mortes anuais, tendo no Brasil, bem como na América do Sul, os maiores índices da referida lesão acometendo os homens (GARAVELLO *et al.*, 2008; MARQUES *et al.*, 2008).

Foi estimado para 2012 o surgimento de 518.510 novos casos de câncer no Brasil, onde deste total 88.350 acontecerão em pacientes da região Nordeste, que passará a representar o terceiro lugar em incidência no país. Dentre os novos casos no Brasil, 14.170 corresponderão ao câncer oral, e neste cenário, a região Nordeste tem uma estimativa de 2.550 novos casos, passando a ser a segunda região com maior incidência no país, destacando-se que 1.640 dos casos citados tem a expectativa de acometer os homens e 910

as mulheres. Para o estado da Paraíba foi estimado o diagnóstico de 290 novos casos de câncer oral, sendo 200 em homens e 90 em mulheres (BRASIL, 2012).

De acordo com Brener *et al.*, (2007), Simonato e Miyahara (2007), Neville *et al.*, (2009) e Santos *et al.*, (2009) o CCEO acomete principalmente a língua, sobretudo na borda lateral posterior, sendo mais frequentemente identificado em homens, com idade acima dos 50 anos.

Segundo Ghoshal *et al.*, (2006) a região anatômica mais relacionada ao CCEO na Índia é a mucosa jugal, fato este que está possivelmente relacionado ao hábito das pessoas locais mascarem derivados do tabaco com frequência.

Com relação a etiopatogenia não existe um fator causal isolado para o surgimento do CCEO, e neste processo tanto fatores extrínsecos quanto intrínsecos interagem e propiciam o surgimento desta neoplasia. Dentre os fatores intrínsecos, destacam-se as alterações genéticas, deficiências nutricionais e imunossupressão, e quanto aos extrínsecos são citados a radiação solar, tabagismo, alcoolismo e alguns vírus, em especial o Papiloma Vírus Humano (HPV) (NAGPAL; BIBHU, 2003; CAMPISE *et al.*, 2006; NEVILLE *et al.*, 2009; MAZON *et al.*, 2009).

Dentre os fatores extrínsecos para o desenvolvimento do CCEO, o tabagismo e a ingestão regular de álcool são os relacionados com maior frequência, estando presentes em cerca de 90% dos casos, sendo, portanto considerados os principais fatores risco desta neoplasia (GROSHAL *et al.*, 2006; GOUVEIA *et al.*, 2010).

A exposição crônica aos raios UV solares também é associada com o desenvolvimento do câncer, principalmente do CCELI, uma vez que os raios solares têm a capacidade de causar mutações no DNA celular. Essa possibilidade de ação deletéria depende do tipo e intensidade da exposição, bem como da quantidade de agentes protetores presentes na região de incidência solar (NEVILLE; DAY, 2002; NEVILLE *et al.*, 2009).

Os fatores nutricionais são relacionados aos tumores epiteliais por alguns estudos, estando envolvidos em aproximadamente 30% dos cânceres orais em países desenvolvidos. Dentre eles, destaca-se alto consumo de determinados alimentos, tais como: produtos animais, alimentos gordurosos e ricos em açúcar, que durante a sua metabolização produzem abundantemente alguns radicais livres, os quais podem causar danos ao DNA celular e por conseguinte propiciar uma transformação neoplásica quando associados a outros fatores (ZAIN, 2001; TOPORCOV; ANTUNES; TAVARES, 2004; LEITE; GUERRA; MELO, 2005; COLOMBO; RAHAL, 2009).

Outros estudos demonstraram, também, a presença de vírus como o HPV, dentre os fatores extrínsecos capazes de promover alterações no DNA, e por conseguinte, favorecer o surgimento do CCEO. A infecção com HPV dos subtipos 16 e 18 tem sido descrita em cerca de 20% a 30 % das lesões orais, sugerindo-se por esta associação que este subtipos virais podem estar envolvidos no estágio inicial da doença (SUGIYAMA *et al.*, 2003; ROCHA *et al.*, 2007; MAZON *et al.*, 2009).

Dentre os fatores intrínsecos envolvidos no desenvolvimento do CCEO, pode-se citar a importância da predisposição genética. O desenvolvimento do CCEO é caracterizado por um processo complexo, que envolve diversas alterações genéticas, e estas alterações podem favorecer a ativação de oncogenes, tais como: ciclina D1, H-ras, c-myc e EGFR; ou inativação de genes supressores de tumor, como: p16, p21, p27 e p53. Adicionalmente, estudos têm demonstrado que indivíduos da mesma raça ou grupo étnico, exibem diferenças genéticas na capacidade de metabolizar pró-carcinógenos e carcinógenos, ou reparar danos no DNA celular (NISHIMOTO *et al.*, 2004; LEITE; GUERRA; MELO, 2005, COLOMBO, RAHAL, 2009).

O CCEO pode apresentar características clínicas bastante variáveis, bem como apresentar mais de uma característica na mesma lesão. Desta forma, a sua apresentação pode ter aspecto leucoplásico, eritroplásico e/ou associação de ambos, exibindo ou não

ulcerações, e o crescimento podendo ser exofítico ou endofítico. De forma geral, a referida lesão é assintomática, e apenas em alguns casos mais avançados podem apresentar sintomatologia dolorosa (NEVILLE *et al.*, 2009).

O diagnóstico do CCEO é confirmado pelo procedimento da biópsia, e microscopicamente observa-se uma invasão da lâmina própria por lençóis, ninhos, cordões ou até mesmo pequenos grupos de células epiteliais neoplásicas, as quais apresentam alterações morfológicas, tais como: nucléolos proeminentes, hipercromatismo nuclear, pleomorfismo celular, disqueratose, multinucleação, elevado número de mitoses e mitoses atípicas. Quando estas células tumorais invasivas ainda possuem razoável grau de diferenciação, é possível encontrar pérolas de ceratina na região de invasão, além do estroma desmoplásico, rica vascularização e infiltrado inflamatório (SANTOS *et al.*, 2008; PINHEIRO; CARDOSO; PRADO, 2010).

Um correto diagnóstico do CCEO deve ser realizado para que seja instituído o tratamento oncológico apropriado (SANTOS *et al.*, 2008). O tratamento de escolha para o CCEO é a remoção cirúrgica com manutenção das margens livres de neoplasia. Algumas lesões necessitam do tratamento cirúrgico, associado à radioterapia e/ou à quimioterapia, em especial quando houver comprometimento das margens cirúrgicas. A radioterapia e quimioterapia podem ser utilizadas também como tratamento paliativo em lesões que apresentam-se muito extensas e impossibilitam a ressecção cirúrgica (BRENER *et al.*, 2007; NEVILLE *et al.*, 2009).

O CCEO exibe elevadas taxas de mortalidade, mesmo com o avanço das modalidades terapêuticas e esse índice elevado pode ser atribuído principalmente à falha no diagnóstico precoce (BHATTACHARYYA; NAYAK, 2005; CHOI *et al.*, 2006). Neste sentido, Choi *et al.*, (2006) analisaram 861 casos de CCEO quanto às suas características clínicas e tipo de tratamento realizado, e observaram que 63,3% de todos os casos estavam classificados nos estádios clínicos III e IV, e estes, foram tratados em 51,2% através da

combinação de cirurgia, radioterapia e quimioterapia . Estes achados demonstraram o diagnóstico tardio das lesões, o que pode comprometer o êxito do tratamento dos pacientes.

2.1.2 Carcinoma de Células Escamosas de Lábio Inferior

Nos últimos anos a incidência de CCELI aumentou principalmente em função da mudança dos hábitos da população, que passou a se expor mais aos fatores de risco (HASSON *et al.*, 2008, NEVILLE *et al.*, 2009; RIBEIRO *et al.*, 2009; SANTOS *et al.*, 2009; SENA *et al.*, 2010).

Estudos de Costa *et al.*, (2002), Abreu *et al.*, (2004), Horta *et al.*, (2007) e Czerninski, Zini, Sgan-Cohen, (2010) relataram o lábio inferior como a região anatômica mais acometida pelo CCE, seguido pela língua. O CCELI representa cerca de 90% dos carcinomas de lábio, e esta maior incidência em lábio inferior é explicada pela sua maior exposição à radiação solar, já que o lábio superior apresenta-se consideravelmente menos exposto em decorrência da sua localização anatômica (COSTA *et al.*, 2002; ABREU *et al.*, 2004; ANTUNES; ANTUNES, 2004; NEVILLE *et al.*, 2009).

Estudos relataram que aproximadamente 80% a 90% dos casos CCELI acometem indivíduos do sexo masculino. A faixa etária de acometimento é bastante variável, contudo a sua maior concentração ocorre entre a quinta e sexta década de vida (SANTOS *et al.*, 1996; McCAMBE *et al.*, 2000; LUNA-ORTIZ *et al.*, 2004; NEVILLE *et al.*, 2009; SENA *et al.*, 2010). Observa-se, ainda, que são raros os casos em pacientes negros e indivíduos abaixo dos 40 anos de idade (ABREU *et al.*, 2004).

O desenvolvimento de vários cânceres, incluído o CCELI, está associado à exposição aos agentes carcinógenos, principalmente os ambientais, destacando-se dentre esses os de natureza física e química. Tais agentes podem causar algum grau de desordem no DNA, comprometendo a normalidade celular, o que pode favorecer a evolução para uma

transformação maligna (WUNSCH-FILHO; GATTÁS, 2001; DUARTE, BORROTO, MARTINEZ, 2011).

O DNA e as proteínas celulares são cromóforos, ou seja, absorvem a radiação UV e sofrem a sua ação direta. A interferência da exposição solar crônica sobre o metabolismo das células, em especial os ceratinócitos e fibroblastos, gera uma sobrecarga que acaba esgotando os mecanismos celulares de defesa, quando então a célula inicia o processo de senescência. Nesta situação, o estresse oxidativo causa mutações no DNA, defeitos e alterações funcionais nas proteínas, e peroxidação dos lipídios das membranas celulares, o que interfere na sua permeabilidade, e acarreta em alterações no transporte e nas sinalizações transmembranas (MONTAGNER; COSTA, 2009).

Ainda no tocante à etiopatogenia do CCELI, o tabagismo parece também ser importante fator de risco nesta neoplasia, sendo observado que lesão em fumantes acomete especificamente a região do lábio que serve de apoio para o cigarro, cachimbo ou charuto (REGEZI, SCIUBBA, 2000; SENA *et al.*, 2010).

Dados epidemiológicos e moleculares sugeriram a existência de uma estreita associação entre a excessiva exposição à radiação UV e o desenvolvimento do CCELI, originando-se a partir da proliferação de células escamosas atípicas inicialmente em lesões não-invasivas, dentre as quais se destaca a queilite actínica (MARTINEZ *et al.*, 2006; SILVEIRA *et al.*, 2009; PIÑERA-MARQUES *et al.*, 2010).

A atividade ocupacional já foi relacionada à queilite actínica, uma lesão análoga a ceratose actínica, e que antecede 90% dos casos de CCELI, sendo mais observada em trabalhadores com exposição direta ao sol como os agricultores, pescadores, motoboys e guardas de trânsito (CAVALCANTE, ANBINDER, CARVALHO, 2008; PINERA-MARQUES *et al.*, 2010).

Estudos relataram um maior acometimento do CCELI em camponeses e em populações oriundas da zona rural, uma vez que esses indivíduos tendem a passar maior

parte do dia sob a incidência da radiação UV, sem a proteção necessária, condição amplamente relacionada à etiopatogenia do CCELI (SANTOS *et al.*, 1996; ANTUNES, ANTUNES *et al.*, 2004; DIAZ; GIRALT, 2009; DUARTE; BORROTO; MARTÍNEZ, 2011).

O aspecto clínico do CCELI pode variar a depender das características do paciente e de crescimento da lesão, bem como do tempo de duração, intensidade e frequência de exposição aos fatores de risco. O CCELI se localiza frequentemente no vermelhão do lábio inferior em um dos lados da linha média, sendo frequente o relato inicial de uma úlcera com borda rígida, ou lesões exofíticas que apresentam crescimento lento (NEVILLE *et al.*, 2009; DIAZ; GIRALT, 2009; PEREIRA-FILHO, 2011).

Em levantamento epidemiológico sobre o CCELI Diaz e Giralt (2009) e Duarte, Borroto e Martínez (2011) observaram uma maior prevalência de lesões exofíticas com aspecto misto, as quais demonstravam, na mesma lesão, áreas em placas esbranquiçadas e áreas ulceradas.

O CCELI não apresenta diferenças microscópicas em relação as outras localizações intra orais, sendo classificado em bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pobremente diferenciado. Para essa classificação, são observadas as características morfológicas que denotam atipia celular, dentre estas o grau de ceratinização, o pleomorfismo celular e o hiperchromatismo nuclear (ALVEZ *et al.*, 2011; DUARTE; BORROTO; MARTÍNEZ, 2011; PINERA-MARQUES *et al.*, 2011).

Segundo Canto e Devesa (2002), Lopez *et al.*, (2008) e Sena *et al.*, (2010) o CCELI tende a ter baixa agressividade, apresentando um crescimento lento e produzindo metástases tardiamente. O CCELI apresenta bom prognóstico, em especial quando diagnosticado precocemente, com taxa de sobrevivência em 5 anos identificada em aproximadamente 90% dos casos. Entretanto, as lesões mais extensas podem inviabilizar o sucesso no tratamento e

assim piorar o prognóstico dos pacientes (HORTA *et al.*, 2007; HASSON *et al.*, 2008; WARNAKULASURIYA, 2010).

O tratamento de escolha para os tumores de lábio inferior é a ressecção cirúrgica mantendo as margens livres, e com posterior reconstrução labial estética. A radioterapia pode ser indicada para lesões que impossibilitem a ressecção cirúrgica, e a quimioterapia como tratamento adjuvante nos casos de metástases linfonodais, invasão angiolinfática, perineural e/ou em casos de recorrência (FAULHABER *et al.*, 2010; CASAL *et al.*, 2010; PIRGOUSIS; FERNANDES, 2011). O esvaziamento cervical deve ser procedido quando houver confirmação ou suspeita de metástases para os linfonodos localizados nesta região (CHENG; SCHIMIDT, 2008; PERREIRA-FILHO *et al.*, 2011).

Estudos têm demonstrado que a relação entre as características clínicas, diferenciação histopatológica e o comportamento biológico do CCELI pode ser utilizada como fator prognóstico de grande valor no planejamento, tratamento e acompanhamento desta lesão. A compreensão destes aspectos pode ajudar a identificar pacientes com maior risco de apresentar metástases nos linfonodos regionais ou que posteriormente podem desenvolver recidiva regional (BRYNE, 1998; SAWAIR *et al.*, 2003; VIEIRA *et al.*, 2008; VIEIRA *et al.*, 2009; RIBEIRO *et al.*, 2009).

2.2 ESTADIAMENTO CLÍNICO

O estadiamento clínico de tumores orais tem sido utilizado para facilitar o plano de tratamento, bem como para propiciar um melhor acompanhamento da evolução da doença no paciente (COSTA; ARAÚJO JÚNIOR; RAMOS, 2005).

A classificação de tumores malignos através do sistema tumor-nódulo-metástases (TNM), consiste em um dos melhores indicadores de prognóstico de pacientes com câncer. Em pacientes com câncer de lábio, como nas demais localizações anatômicas, observa-se

redução do índice de sobrevida com o avanço do estadiamento clínico (SANTOS *et al.*, 1996; COSTA *et al.*, 2002; BRENER *et al.*, 2007; SENA *et al.*, 2010).

O principal sistema utilizado para classificar o estadiamento clínico dos tumores da cavidade bucal é o sistema TNM, amplamente utilizado para avaliar o prognóstico do CCEO (SAWAIR *et al.*, 2003; COSTA; ARAÚJO JÚNIOR; RAMOS, 2005; MARTINS NETO; OLIVEIRA; PISTÓIA, 2011).

Este sistema foi proposto por Pierre Denoix, na França, entre os anos de 1943 e 1952, e em 1950 a União Internacional Contra o Câncer (UICC) sugeriu esta forma de estadiamento para tumores malignos. No decorrer das décadas subsequentes os resultados em relação ao estadiamento e classificação TNM mostraram-se eficientes, e consequentemente sua aplicação permaneceu como uma maneira mais fácil, rápida e de baixo custo no planejamento para tratamento de tumores malignos. Uma das finalidades deste sistema é possibilitar uma comunicação entre profissionais em qualquer localidade utilizando uma linguagem comum (BRASIL, 2004; UICC, 2012).

O Sistema TNM para descrever a extensão anatômica da doença tem por base a avaliação de três componentes: T - a extensão do tumor primário; N - a ausência ou presença bem como a extensão de metástases em linfonodos regionais; M - a ausência ou presença de metástase à distância. Os detalhes desta classificação estão no Quadro 1. (SOBIN, WITTERIND, 2002).

ESTADIAMENTO CLÍNICO PARA LÁBIO E CAVIDADE ORAL	
TX	O tumor primário não pode ser avaliado
T0	Não há evidências de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	< 2 cm
T2	> 2 até 4 cm
T3	> 4 cm
T4a	<i>Lábio</i> : invade cortical óssea, nervo alveolar inferior, assoalho da boca, pele.
T4b	<i>Cavidade oral</i> : invade cortical óssea, músculos profundos extrínsecos da língua, seios maxilares, pele. Espaço mastigador, lâminas pterigóides, base do crânio, artéria carótida interna
NX	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástase em linfonodos regionais
N1	Homolateral, único, < 3 cm
N2	(a) Homolateral, único, > 3 até 6 cm (b) Homolateral, múltiplo, < 6 cm (c) Bilateral, contralateral, < 6 cm
N3	> 6 cm
MX	A presença de metástase à distância não pode ser avaliada
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Metástase à distância
CLASSIFICAÇÃO	
Estádio I	T1 N0 M0
Estádio II	T2 N0 M0
Estádio III	T1, T2, T3 / N0, N1 / M0
Estádio IVA	T1, T2, T3, T4 / N0, N1, N2 / M0
Estádio IVB	Qualquer T / N3 / M0
Estádio IVC	Qualquer T / Qualquer N / M1

Quadro 1 – Definição das subcategorias do sistema TNM e suas categorias gerais (BARNES *et al.*, 2005).

Segundo Gouveia *et al.*, (2010) a classificação segundo o estadiamento clínico pode variar consideravelmente a depender de razões sócio-demográficas e localização anatômica da lesão.

Pode ser destacado ainda que quando a lesão é submetida à ressecção cirúrgica, é possível determinar-se também o estágio patológico desta (pTNM). A classificação pTNM é baseada nas evidências obtidas antes do tratamento, suplementada ou modificada pela evidência adicional conseguida através da cirurgia e do exame histopatológico do tumor ou dos linfonodos regionais. O suplemento ou modificação ocorre principalmente quanto à

presença de comprometimentos linfonodais, e adicionalmente na presença de metástases à distância. As informações adicionais da classificação pTNM podem auxiliar na seleção da terapia adjuvante pós-operatória e na estimativa do prognóstico (BRASIL, 2004; BARNES *et al.*, 2005; PATEL; SHAH, 2005).

Lindenblatt *et al.*, (2009) analisaram 44 casos de CCEO aplicando tanto o estadiamento clínico quanto o estadiamento patológico. Em relação ao estadiamento clínico (cTNM), 25 (56,7%) casos foram agrupados nos estádios I e II, enquanto que 19 (43,3%) nos estádios III e IV. Quanto ao estadiamento patológico (pTNM), constatou-se que 21 (47,7%) casos foram classificados nos estádios I e II, e 23 (52,3%) casos nos estádio III e IV. Os autores ressaltaram que o estágio clínico reflete as características histopatológicas, porém o estadiamento patológico deve ser realizado como complemento diagnóstico e adicional para o prognóstico.

Em estudo realizado por Daher, Pereira e Oliveira (2008), foram avaliados 101 casos de CCEO quanto ao estadiamento clínico utilizando a classificação TNM, e foi verificado que as lesões mais encontradas foram diagnosticadas nos estádios III e IV, perfazendo um total de 74,48% dos casos. Tal fato sugeriu que o diagnóstico destes tumores intra-orais foram realizados tardiamente.

Ribeiro *et al.*, (2009) estudaram 46 casos de CCEO em pacientes jovens, verificando que os casos de CCEO localizados em língua e assoalho bucal foram mais prevalentes e estes estavam diagnosticados nos estádios clínicos III e IV. Os dados deste estudo sugeriram que os casos de CCEO em pacientes jovens apresentam um comportamento mais agressivo.

Em um estudo comparativo entre atividade proliferativa e angiogênese em CCE de língua provenientes de pacientes jovens (≤ 40 anos) e não jovens (> 50 anos), Benevenuto *et al.*, (2012) analisaram estadiamento clínico, gradação histológica e índices angiogênicos e de proliferação celular. No tocante ao estadiamento clínico, os autores observaram uma

frequência significativamente maior de lesões com estadiamento avançado (estádios III ou IV) em pacientes jovens, denotando uma maior agressividade da neoplasia nesta faixa etária.

Em um levantamento epidemiológico com 861 casos de CCEO em adultos na Coréia, Choi *et al.*, (2006) encontraram uma grande prevalência de tumores de língua, rebordo alveolar e palato correspondendo a 44% de todos os casos, com os tumores de lábio compondo apenas 2,8% da amostra. Os autores analisaram todas as lesões e encontraram os estádios III e IV em 63,3% de todos os casos, levando a concluir que o CCEO no momento do diagnóstico encontra-se em estádios mais avançados, o que na maioria dos casos compromete o sucesso do tratamento.

Abreu *et al.*, (2004) estudaram 57 pacientes com CCE de lábio, dos quais 90% localizados em lábio inferior. Quando os autores verificaram a invasão tumoral dos tecidos regionais, foi observado que a invasão do tecido muscular ocorreu em lesões a partir de 1cm, a invasão de nervos foi identificada nas lesões a partir de 1,5cm, enquanto que nas lesões maiores de 2cm já havia a invasão dos vasos sanguíneos. Os resultados apontaram uma relação direta entre as lesões a partir de 0,5cm e o aumento no número de metástases e da recidiva local. Os autores sugeriram que a classificação TNM, ao considerar T a partir de 2cm, não consegue refletir a realidade para as neoplasias localizadas em lábio.

O CCELI possui como característica o crescimento lento e a possibilidade de produzir metástases cervicais em apenas cerca de 3% a 29% dos casos em estágio inicial. Uma sobrevida de 5 anos é verificada em torno de 90% em casos com T1N0, caindo bruscamente para cerca de 50% quando ocorre o comprometimento dos linfonodos regionais (SALGARELLI *et al.*, 2009).

Costa *et al.*, (2002) analisaram 120 casos de CCEO com intuito de verificar a existência de correlação da classificação clínica TNM com a gradação histológica de malignidade bem como a localização anatômica do tumor. Os autores encontraram o CCELI em 31,6% de todos os casos, seguido pelos tumores em língua em 28,3% dos casos. Quanto

à classificação TNM foi verificado que a maioria dos casos de CCELI estavam classificados em estádios iniciais (I e II), enquanto que os tumores localizados em língua correspondiam a estádios mais avançados (III e IV). Os resultados sugeriram que a localização anatômica está associada com o momento diagnóstico, com conseguinte relação com a classificação TNM.

Duarte, Borroto e Martínez (2011) analisaram 100 casos de CCE de lábio, com intuito de descrever o comportamento desta neoplasia. Foi observado um predomínio do CCELI em 84,4% dos casos, e quando analisados em relação ao estadiamento clínico, 90% dos casos estavam classificados nos estádios I e II. Os autores sugeriram que os CCE de lábio são usualmente diagnosticados precocemente, e conseqüentemente possuem um melhor prognóstico.

O estadiamento clínico foi apontado como importante fator prognóstico para câncer de lábio, por outro lado, as classificações histopatológicas podem prover fatores prognósticos suplementares a fim de valorizar o estadiamento TNM e auxiliar na escolha terapêutica (ANNEROTH; BATSAKIS; LUNA, 1987; LOURENÇO *et al.*, 2007; SENA *et al.*, 2010).

2.3 GRADAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Diversos estudos foram realizados com o intuito de conhecer melhor o comportamento biológico do câncer oral, uma vez que o prognóstico desta lesão está relacionado com a sua atividade proliferativa, grau de diferenciação e potencial de invasão e metástase. As referidas pesquisas ressaltaram ainda que neste processo de invasão tumoral, as células neoplásicas interagem com as células do estroma e com os componentes da matriz extracelular (ANNEROTH; HANSEN, 1984; BRYNE *et al.*, 1991; BRYNE, 1998; ZIOBER; SILVERMAN; KRAMER, 2001; LOURENÇO *et al.*, 2007; SILVEIRA *et al.*, 2010).

Vários autores, em diferentes épocas, propuseram novos sistemas de gradação histopatológica para o CCEO que pudessem prever seu comportamento clínico e a sobrevida dos pacientes (ANNEROTH; HANSEN, 1984; BRYNE *et al.*, 1991; BRYNE *et al.*, 1992; BRYNE, 1998; BARNES *et al.*, 2005).

O primeiro método para gradação histopatológica do CCEO foi proposto por Broders, em 1920, o qual se baseava somente no grau de diferenciação celular e a sua relação com o tratamento e prognóstico, mas não a associava com história clínica (MARTINS NETO; OLIVEIRA; PISTÓIA, 2011).

Nesta classificação de Broders em 1920, os CCEO foram divididos em quatro grupos com graus diferentes. As lesões eram classificadas em grau I quando apresentavam até 25% de células indiferenciadas, grau II quando eram observadas de 25% a 50% das células indiferenciadas, grau III quando 50% a 75% das células tumorais exibiam indiferenciação e grau IV quando era observada indiferenciação entre 75% a 100% das células tumorais. Alguns autores, como Anneroth e Hansen (1984), questionaram o valor da classificação de Broders e dessa forma, novas classificações foram surgindo (LOURENÇO *et al.*, 2007).

Anneroth e Hansen (1984) propuseram um sistema de classificação multifatorial para a classificação histopatológica e gradação de malignidade utilizando 52 casos de CCEO. A gradação histopatológica de malignidade foi realizada em cada caso, utilizando sete critérios morfológicos, onde quatro destes analisavam as populações de células tumorais (quanto à estrutura celular, tendência à ceratinização, aberrações nucleares e número de mitoses) e mais três critérios adicionais (relação tumor-hospedeiro, estágio de invasão e a resposta inflamatória). Cada um dos parâmetros morfológicos foi graduado de 1 a 4 pontos com base nos achados microscópicos, e após serem somados esses parâmetros foram classificando em bem diferenciado, moderadamente diferenciado, pouco diferenciado e indiferenciado.

O método desenvolvido por Bryne *et al.* (1989) é citado como mais apropriado do que os métodos propostos por Broders (1920) e Anneroth (1984) por ser menos demorado e porque grandes áreas do tumor podem ser desconsideradas, sendo citado como de grande valor prognóstico (SAWAIR *et al.*, 2003).

Bryne *et al.*, (1989) avaliaram sistemas de gradação de malignidade anteriormente propostos por outros autores utilizando 68 casos de CCEO que apresentaram quantidade de material suficiente para ser procedida a avaliação. Tal avaliação considerava fatores como: grau de ceratinização, pleomorfismo celular e número de mitoses, padrão de invasão, estágio de invasão e infiltrado inflamatório. Os autores propuseram uma modificação, onde seria considerada apenas a área mais anaplásica do tumor, a região invasiva das neoplasias para análise da gradação de malignidade. Diante destes critérios foram atribuídos escores de 1 a 4, sendo que a soma destes determinava o grau de diferenciação em bem diferenciados (4 a 8 pontos), moderadamente diferenciados (9 a 12 pontos) e pouco diferenciados (13 a 16 pontos).

Alguns anos depois, Bryne *et al.*, (1992) avaliaram o sistema proposto em 1989 fazendo adaptações, e esta nova análise mostrou confiabilidade quanto à classificação de malignidade para CCEO. Nesta nova avaliação, os autores propuseram a remoção do

parâmetro que quantificava o número de mitoses, desta forma o valor prognóstico continuaria significativo e a reprodutibilidade aumentaria.

Após revisão de trabalhos sobre gradação de malignidade, Bryne (1998), reforçou a influência do *front* de invasão como uma das áreas de maior importância durante o estudo de uma neoplasia. A referida autora enfatizou que a grande parte dos eventos moleculares ocorre nesta região de *front* de invasão, e que a avaliação também através dos marcadores biológicos pode revelar novas informações e contribuir para determinar o prognóstico do CCEO.

A OMS em 2005 publicou outra classificação histopatológica proposta por Cardesa et al., que fundamentou-se na classificação de Broders (1920), porém apresentando tênues diferenças. Os autores recomendaram para o CCEO três categorias: I (bem diferenciado), II (moderadamente diferenciado) e III (pouco diferenciado). Para tal classificação os autores tomaram como critérios a análise de características como: o grau de ceratinização, pleomorfismo celular, hipercromatismo nuclear, atividade mitótica e atipia celular. Adicionalmente, ressalta-se que na mesma lesão podem ser verificadas alterações distintas em diferentes áreas durante a análise de toda a extensão tumoral, e assim deve-se considerar o conjunto de alterações histopatológicas mais desfavoráveis para determinar a categorização final da neoplasia.

Alguns trabalhos utilizaram a gradação proposta por Bryne (1998) para *front* de invasão, sob forma de duas categorias, a primeira para tumores de baixo grau e a segunda aos tumores com alto grau de malignidade. Este parâmetro é considerado após a soma dos escores citados por Bryne, no qual valores até 8 pontos são considerados de baixo grau e acima deste valor os tumores são considerados de alto grau de malignidade (MIRANDA, 2002; SILVEIRA *et al.*, 2010; BENEVENUTO *et al.*, 2012).

Ribeiro *et al.*, (2009) avaliaram a gradação histopatológica em 46 casos de CCEO, considerando os critérios de Bryne *et al.*, (1992). Os tumores localizados em assoalho bucal

e língua foram os mais identificados e estes foram classificados como moderadamente diferenciados em 50% dos casos, enquanto 30% foram classificados como pobremente diferenciados. Os autores destacaram uma maior prevalência de CCEO menos diferenciados, bem como uma associação entre indiferenciados e o aumento da agressividade tumoral.

A gradação histopatológica segundo o método proposto por Bryne *et al.*, (1989) foi utilizado por Alves *et al.*, (2011) também de forma adaptada, considerando apenas o grau de ceratinização e o grau de pleomorfismo celular das células tumorais. Para cada um destes critérios foi dado um valor que variou de 1 a 4 de acordo com percentual de células envolvidas pela alteração. A soma do valor recebido para cada critério determinou o grau de diferenciação do tumor, de acordo com o esquema a seguir: bem diferenciado (2 a 4), moderadamente diferenciado (5 a 6) e pouco diferenciado (7 a 8). Neste estudo, os casos de CCE localizados em língua e assoalho bucal, apresentavam gradação histopatológica variando entre moderadamente diferenciados e pobremente diferenciados. Os autores sugeriram uma menor diferenciação celular presente nos CCEO e consequente comprometimento prognóstico.

Agarwal *et al.*, (2011) avaliaram as características clínicas e histopatológicas em 153 casos de CCEO e de orofaringe, dos quais 111 casos estavam localizados em boca representando a maior fração desta amostra. Neste estudo os CCE em mucosa jugal e língua foram mais prevalentes, enquanto o CCELI esteve presente em apenas 9 casos. Os autores observaram predominantemente os tumores bem diferenciados, independente da localização primária do tumor.

A gradação histopatológica classificada em alto e baixo grau de malignidade também foi utilizada em estudo conduzido por Benevenuto *et al.*, (2012) em paciente jovens e não jovens, e neste cenário os tumores em pacientes jovens apresentavam um maior número de casos de alto grau de malignidade, enquanto nos pacientes não jovens não houve diferença

entre as lesões de alto ou baixo grau de malignidade, revelando um pior prognóstico para as lesões com alto grau de malignidade.

Os CCELI foram os mais prevalentes no estudo conduzido por *Costa et al.*, (2002), que avaliaram uma amostra de 120 casos de CCEO. Os tumores moderadamente diferenciados foram verificados em 62,5% independentemente da localização primária do tumor. Tal estudo revelou uma relação estatisticamente significativa entre a localização anatômica e gradação histopatológica, uma vez que os CCELI representavam em sua grande maioria tumores bem diferenciados.

Caly et al., (2007) estudaram 53 casos de CCELI e verificaram que 77,36% representavam tumores bem e moderadamente diferenciados. Os autores sugeriram um comportamento menos agressivo do CCELI, possivelmente devido ao diagnóstico precoce da lesão.

Cantin et al., (2008) analisaram 17 casos de CCELI quanto o índice angiogênico, gradação histopatológica (*CARDESA et al.*, 2005) e a gradação histopatológica de *front* de invasão (*BRYNE et al.*, 1992). O estudo revelou que 94,2% de todos os casos estavam classificados como bem e moderadamente diferenciados segundo a OMS, enquanto 79,2% dos casos classificados em bem e moderadamente diferenciados de acordo com *Bryne et al.*, (1992). Os autores verificaram uma associação entre a gradação histopatológica da OMS (2005) e a de *Bryne et al.*, (1992), desta forma sugeriram que ambas as gradações podem ser utilizadas sem alteração no diagnóstico.

Silveira et al., (2010) analisaram a reação imunológica focal em *front* de invasão em CCE de língua e lábio, e dentre as variáveis estudadas estava a gradação histopatológica. Dos 30 casos de CCE em língua, 43,3% foram classificados como baixo grau de malignidade, e 56,6% como alto grau de malignidade, enquanto o cenário inverso foi encontrado nas lesões em lábio, nos quais, apenas 35% representam tumores de alto grau e 65% foram classificados como baixo grau de malignidade. Diante destes dados os autores

sugeriram que os tumores de lábio possuem comportamento biológico menos agressivo, em relação aos tumores intra-orais.

Duarte, Borroto e Martínez (2011) estudaram as características clínicas e histopatológicas de 100 tumores de lábio, observando que 84% destes casos representavam CCELI. O estudo verificou tumores bem diferenciados e moderadamente diferenciados em 93% dos os casos. Como conclusão, os autores sugeriram uma menor agressividade dos tumores de lábio, uma vez que estas lesões são diagnosticadas precocemente o que favoreceria o seu prognóstico.

O valor da classificação histopatológica é controverso e somente a classificação microscópica isolada é pobremente correlacionada com os dados de sobrevida dos pacientes e com a resposta ao tratamento. A análise histopatológica de forma mais precisa passa a ser fundamental, uma vez que o comprometimento das margens cirúrgicas associa-se a um prognóstico desfavorável (PEREIRA *et al.*, 2007; SENA *et al.*, 2010).

2.4 PROGRESSÃO TUMORAL

Para Colombo e Rahal (2009) o desenvolvimento do CCE de cabeça e pescoço é um processo multifatorial que ocorre em meio de diversas mudanças genéticas, tais como a perda de heterozigotidade, inativação gênica por metilação e amplificação gênica. Dentro desta perspectiva, diferentes estudos têm revelado alterações moleculares que ocorrem neste processo de malignização, que podem envolver tanto aumento da proliferação celular, quanto a inativação de genes supressores tumorais.

Marcadores moleculares, tais como a proteína EGFr e a proteína p27 têm auxiliado no entendimento do prognóstico de tumores de cabeça e pescoço. Adicionalmente, a proteína Ki-67 também têm sido relatada como marcador de proliferação celular e de valor prognóstico tanto de lesões neoplásicas quanto não-neoplásicas (RUIZ *et al.*, 2006).

A compreensão das alterações genéticas e a expressão das proteínas envolvidas no desenvolvimento desses tumores podem revelar novos fatores prognósticos e assim ajudar a compreender o comportamento biológico da doença permitindo uma maior precisão na caracterização prognóstica de tumores, os quais podem apresentar comportamentos biológicos distintos (MONTEIRO *et al.*, 2010).

2.4.1 Proteína EGFr

O EGFr cujo gene encontra-se no braço longo do cromossomo 7, na região 7p12.3p12.1, é um receptor que integra a família Her ou ErbB que possui ainda outros receptores, como o cerbB-1; Her-2 / *c-neu* / ErbB-2; HER-3 / ErbB-3 e Her-4 / ErbB-4 (ZHU *et al.*, 2006; DINIZ-FREITAS *et al.*, 2007).

A EGFr é uma glicoproteína transmembrana de 170kDa, que está localizada na superfície celular com um domínio ligante extracelular, um domínio lipofílico

transmembrana e um domínio intracelular com atividade tirosina-quinase intrínseca (KISS, 2008).

A ativação do EGFr pode ser feita por diversos ligantes e é importante para a proliferação e diferenciação normal das células (RAUTAVA *et al.*, 2008).

Este receptor possui importante papel na proliferação celular maligna em uma série de tumores, incluindo o CCEO (GIULIANI *et al.*, 2007; LING *et al.*, 2007). A superexpressão deste receptor em CCEO tem sido relacionada com a maior agressividade das lesões e com pior prognóstico (GALIZIA *et al.*, 2007).

Grandis *et al.*, (1998) estudaram 91 casos de CCE de cabeça e pescoço, com intuito de analisar a imunoexpressão das proteínas EGFr e TGF- α , como marcadores prognósticos. O estudo demonstrou um aumento progressivo da imunoexpressão para as proteínas EGFr e TGF- α , inversamente proporcional à redução da sobrevida do paciente. Diante destes dados, os autores sugeriram que a análise da imunoexpressão das proteínas EGFr e TGF- α , pode ser útil na identificação de tumores mais agressivos e, por conseguinte, pode ser utilizada como marcador de progressão tumoral.

Ford e Grandis (2003) analisaram a expressão da proteína EGFr em CCE de laringe e associaram uma superexpressão da referida proteína a um aumento nas recidivas em linfonodos cervicais e ao aumento da resistência do tumor ao tratamento por quimioterápico e radioterápico. Os autores sugeriram que a avaliação da imunoexpressão da proteína EGFr, pode orientar na decisão quanto a forma de tratamento mais adequada para estes tumores.

Perise Júnior *et al.*, (2004) avaliaram o valor prognóstico da imunoexpressão das proteínas p53, c-erbB e EGFr em 54 casos de CCE de cabeça e pescoço, e na mucosa adjacente aos tumores. A imunomarcagem da proteína EGFr foi observada em 37,7% dos casos de CCE, enquanto na mucosa adjacente aos tumores a imunomarcagem esteve presente em 51,6% destes casos. Adicionalmente, os autores verificaram uma associação direta entre o aumento da expressão para proteína EGFr e o aumento do índice mitótico. Os autores

sugeriram uma relação entre o aumento de expressão da proteína EGFr em CCE de cabeça e pescoço e o aumento do índice mitótico, e por conseguinte com uma maior agressividade da lesão.

Barros *et al.*, (2005) estudaram o processo da progressão tumoral em 54 casos de CCEO, 25 casos de leucoplasias orais e 26 casos de hiperplasias inflamatórias orais, e para tanto utilizaram a imunomarcação das proteínas *c-erbB-2*, Bcl-2 e EGFr. A proteína EGFr apresentou marcação de leve a moderada em todos os casos analisados. Adicionalmente foi verificada uma significância estatística entre o aumento da intensidade de marcação para EGFR, e a diminuição na diferenciação celular nos CCEO. Os autores sugeriram a utilização da proteína EGFr como um marcador de progressão tumoral em CCEO.

Franzi *et al.*, (2006) investigaram a expressão das proteínas EGFr e HER-2 em 15 casos de CCE de cabeça e pescoço. Os autores verificaram o predomínio de uma expressão intensa para EGFr, destacando-se sobretudo uma maior expressividade em tumores com estadiamento clínico avançado (IV) e com pouca diferenciação celular. Os dados sugeriram que a superexpressão da proteína EGFr possui uma relação com os tumores diagnosticados tardiamente e menos diferenciados, os quais apresentam pior prognóstico para os pacientes.

Em outro estudo, Hiraishi *et al.*, (2006) observaram, através da imuno-histoquímica uma correlação estatisticamente significativa entre a expressão do EGFr e a invasão tumoral em CCEO, no qual uma maior expressão para a proteína EGFr era verificada em tumores mais invasivos e menos diferenciados.

Rautava *et al.*, (2008) avaliaram a expressão do EGFr em mucosa fetal (em formação), mucosa normal de adultos e leucoplasias. O epitélio fetal apresentou imunomarcação para EGFr em todas as células epiteliais. Na mucosa oral de adulto, o epitélio mostrou intensa imunoexpressão para EGFr apenas na camada basal, enquanto no epitélio displásico associado às lesões leucoplásicas foi identificada marcação intensa até a metade das camadas epiteliais. Os dados não relacionaram a expressão da proteína EGFr

com o aumento da atividade proliferativa das células epiteliais, no entanto, os autores sugeriram que a ativação da EGFr é importante no processo de diferenciação e proliferação celular.

Bernardes *et al.*, (2010) avaliaram os níveis salivares do EGFr, Her-2 e EGF em 46 pacientes com CCEO e observaram que não houve diferença entre os grupos controle e os níveis salivares do EGFr e do Her-2 antes da remoção cirúrgica do tumor. Os autores sugeriram, portanto, que os níveis salivares do EGFr não podem ser considerados como marcadores prognósticos em CCEO.

Lee *et al.*, (2010) estudaram, através da imuno-histoquímica, a participação da proteína EGFr na via da β -catenina em 112 casos de CCEO. Os autores observaram a existência de uma forte associação entre a expressão do EGFr e o acúmulo significativo da β -catenina, e sugeriram que estes dois marcadores podem ser utilizados como marcadores de prognóstico em CCEO.

A expressão da proteína EGFr dentre outras como PCNA, p53, VEGF e D2-40, foi estudada por Sarkis *et al.*, (2010) e relacionadas à proliferação celular, à angiogênese, linfagiogênese e apoptose, em uma amostra de 40 casos de CCEO. A marcação para a proteína EGFr em CCEO ocorreu em todas as células tumorais epiteliais, enquanto na mucosa oral normal usada como controle, localizou-se apenas em camada basal. Uma marcação positiva para EGFr foi verificada em 87,5% dos casos de CCEO, e na grande maioria representaram intensa marcação da membrana citoplasmática. Os autores verificaram que a expressão da proteína EGFr aumenta proporcionalmente ao aumento do estágio clínico e da gradação histopatológica e puderam sugerir que o aumento na expressão da referida proteína possui relação com o aumento da agressividade tumoral.

A via de sinalização da EGFr e o ciclo celular, seja através da proliferação ou da regulação, têm sido avaliados de forma independente para o estudo da carcinogênese, bem como para potenciais alvos na terapia tumoral (SHINTANI *et al.*, 2004; LEE *et al.*, 2007).

Em função da associação da proteína EGFr em lesões cancerizáveis e neoplásicas, algumas drogas são propostas para o tratamento do CCEO, objetivando a diminuição da atividade proliferativa. O Gefitinib® é uma das drogas usadas no tratamento de cânceres, que possui a capacidade de bloquear a atividade tirosina quinase da EGFr, atuando sobre a subunidade ubiquitina ligase Skp2, que possui a função de degradar a proteína p27, e por conseguinte ocorre um aumento de expressão da p27 e conseqüente manutenção da célula na fase G1 do ciclo celular. Os autores sugeriram que o Gefitinib® no tratamento do CCEO, contudo ensaios adicionais são indicados (SHINTANI *et al.*, 2004).

Outro medicamento utilizado com o intuito de inibir a proliferação celular através do bloqueio da EGFR, é o ZD1839®, este fármaco induz a parada do ciclo celular entres as fases G0/G1, gerando por conseguinte um aumento considerável dos níveis das proteínas p21 e p27, que possuem atividade inibitória dentro do ciclo celular. Os autores sugeriram que a inibição da atividade da EGFr altera tanto a proliferação celular quanto a propriedade de invasão dos CCEO, contudo estudos complementares devem ser realizados para elucidar tais alterações (LEE *et al.*, 2007).

Pfister, Su, Kraus *et al.*, (2006) analisaram um total de 424 pacientes portadores de CCE de cabeça e pescoço, submetidos ao tratamento da radioterapia isolada, ou desta associada ao uso do Cetuximab, um anticorpo monoclonal que compete no domínio extracelular da ligação do EGFr. Os autores verificaram que a combinação da radioterapia associada a medicação antitumoral aumentou a média de sobrevida dos pacientes, sugerindo o Cetuximab em associação a outras formas de tratamento de tumores de cabeça e pescoço.

2.4.2 Proteína Ki-67

O antígeno Ki-67 é uma proteína nuclear com aproximadamente 395kDa, codificada por gene localizado no cromossomo 10q25. O anticorpo monoclonal Ki-67 recebeu essa

denominação porque foi primeiramente identificado na Universidade de Kiel, na Alemanha, em 1983, na 67ª placa de cultura tecidual, tratando-se de uma IgG1 de camundongo produzida contra uma porção nuclear da linhagem celular L428 da doença de Hodgkin (RABENHORST *et al.*, 1993; SCHOLZEN; GERDES, 2000; TUMULURI; THOMAS; FRASER, 2002).

Sua função é desconhecida, embora se acredite que exerça algum papel na manutenção da estrutura da cromatina, sendo considerada absolutamente necessária para a manutenção da proliferação celular (BROWN; GATTER, 2002; TUMULURI; THOMAS; FRASER, 2002). Esta proliferação celular é definida como um aumento no número de células resultante da complementação do ciclo celular (TUMULURI; THOMAS; FRASER, 2002).

Para analisar a proliferação celular, variados métodos de detecção e quantificação de células proliferativas foram desenvolvidos. O mais antigo é a tradicional contagem de mitoses ao microscópio ótico, que se constitui num método não dispendioso e possível de ser realizado em material rotineiramente processado e corado em Hematoxilina e Eosina (HE). Porém, apenas as células que estão na fase M podem ser reconhecidas, devido a sua típica aparência microscópica, ficando fora desta contagem as que estão em G1, S e G2, portanto não representando o total de células que realmente estão no ciclo celular. Tal método apresenta adicionalmente como desvantagens a grande variação entre os observadores e a variação resultante da dependência da espessura do corte (VAN DIEST; BRUGAL; BAAK, 1998).

A proteína Ki-67 é expressa em todas as fases do ciclo celular, exceto na fase G0. Sua expressão aumenta com a progressão do ciclo celular, principalmente durante a última metade da fase S, alcançando um pico em G2 e M, rapidamente degradando-se após o final da mitose (SCHOLZEN; GERDES, 2000; WU *et al.*, 2000; ZHU *et al.*, 2007).

Esposito *et al.*, (2000) buscaram verificar a relação entre a expressão imuno-histoquímica dos marcadores Ki-67, PCNA e p53 com parâmetros prognósticos clínico-patológicos de 53 casos de CCE do trato aerodigestivo superior, divididos em dois grupos. O grupo A, foi composto pelos tumores de laringe e hipofaringe, enquanto o grupo B compreendendo os tumores orais e de orofaringe. A marcação para proteína Ki-67 apresentou uma média de 58,5% no grupo A, e 35% no grupo B, destacando-se que a média total foi de 46,5%, considerando todos os casos estudados. Adicionalmente, foi observada uma significância estatística entre a marcação para proteína Ki-67, o aumento do estadiamento pTNM e da gradação histopatológica. Os autores sugeriram a possibilidade de usar a marcação pela proteína Ki-67 como fator prognóstico para os casos de CCE do trato aerodigestivo superior.

Perea, Val-Berna, Bustillo (2005) realizaram um estudo imuno-histoquímico do CCELI utilizando as proteínas p53, bcl-2, Ki-67, CD44 e c-erb-B2. A proteína Ki-67 exibiu positividade em da proteína entre 0% e 6,29%, com uma média de 1,64 e um desvio padrão de 1,34, nos casos de CCELI. Os autores não verificaram significância estatística para expressão da referida proteína e, por conseguinte, sugeriram que a mesma não possui relação com o comportamento biológico em CCELI.

Martínez *et al.*, (2005) avaliaram a imunoexpressão do marcador de proliferação celular Ki-67, e também das proteínas apoptóticas p53, bax e bcl-2, em 13 casos de queilite actínica, 7 casos de biópsias de vermelhão de lábio normal e 6 casos de mucosa oral normal que não foi exposta à radiação UV. A expressão do Ki-67 foi identificada igualmente no grupo da queilite actínica e no lábio normal, e de forma mais significativa nestes do que no grupo de mucosa normal não exposta à radiação, sugerindo que a radiação UV por si só já estimula uma maior proliferação celular.

Torres-Redon *et al.*, (2009) analisaram o padrão de expressão imuno-hisquímica das proteínas Mcm2, geminina e Ki-67 em espécimes de mucosa oral normal, displasia epitelial

oral e CCEO. Em epitélio normal, a proteína Ki-67 esteve expressa em 22,9% dos casos, no epitélio displásico em 44,5%, enquanto nos CCEO foi identificada em 59% dos casos. As relações entre as marcações das proteínas Mcm2 e Ki-67, e da geminina e Ki-67, foram estatisticamente significativas em epitélio displásico, enquanto nos CCEO não foi verificada nenhuma relação de significância. Os autores relataram um aumento progressivo na expressão das três proteínas, sugerindo a proteína Ki-67 como um marcador de proliferação celular em displasia epitelial.

Motta *et al.*, (2009) analisaram o valor prognóstico da correlação entre as proteínas Ki-67 e p53, utilizando 28 casos de CCEO. A marcação para a proteína p53 foi observada em 50% dos casos, enquanto a imunexpressão da proteína Ki-67 foi observada em 92,85% dos casos. A marcação da Ki-67 esteve presente em todos os casos classificados como baixo grau de malignidade, e em 92,3% dos casos classificados em alto grau de malignidade. Os autores sugeriram que a marcação das proteínas p53 e Ki-67 associam-se mais significativamente à menor diferenciação celular, e por conseguinte a um pior prognóstico.

Vieira *et al.*, (2009) avaliaram a imunexpressão da proteína Ki-67 em 30 casos de CCEO de diferentes graus histopatológicos. Os dados demonstraram uma correlação estatisticamente significativa entre a expressão da Ki67 com a diferenciação desta neoplasia, verificando-se que as lesões mais indiferenciadas exibiam uma expressão bem mais significativa do que as diferenciadas. Adicionalmente, os autores relataram que a expressão de Ki-67 está relacionada ao índice mitótico e, conseqüentemente, à proliferação celular e diferenciação da neoplasia.

Montebugnoli *et al.*, (2009) analisaram a expressão imuno-histoquímica da proteína Ki-67, em 47 pacientes CCEO, utilizando como controle 20 casos de mucosa oral normal. A imunomarcagem para proteína Ki-67 teve média de positividade de 18,5% para os tumores nos estádios III e IV, enquanto que esta média foi de 23,1% nos tumores pobremente diferenciados. Os autores sugeriram que a imunexpressão da proteína Ki-67 pode ser

utilizada como marcador de proliferação em CCEO e como fator prognóstico em tumores primários da cavidade oral, uma vez que ocorreu um aumento na média de marcação para a referida proteína quando diminuía a diferenciação celular.

Benevenuto *et al.*, (2012) analisaram a expressão da proteína Ki-67 em CCE de língua em paciente jovens e não jovens, com intuito de verificar a atividade proliferativa destes tumores nos referidos pacientes. Os autores observaram em pacientes jovens um aumento no índice de marcação para Ki-67, tanto nos tumores em estádios clínicos avançados, quanto nos tumores com alto grau de malignidade, enquanto que nos pacientes não jovens a marcação da referida proteína, foi mais frequentemente observada em tumores em estádios iniciais, e nos tumores com alto grau de malignidade. Os dados referentes à marcação para Ki-67 não demonstraram diferença estatisticamente significativa entre as lesões em pacientes jovens e não-jovens, sendo sugerido por este estudo que a maior agressividade dos CCE de língua em pacientes jovens não guarda relação com a atividade proliferativa.

2.4.3 Proteína p27

Junto ao processo de proliferação celular ocorre também a ativação regulatória dos genes supressores tumorais, que codificam proteínas que transmitem sinais negativos regulatórios para o crescimento celular. Esses genes estão frequentemente envolvidos na regulação do ciclo celular, incluindo a sua parada e a apoptose. Uma vez ocorrendo a inativação ou falha desses genes as células escapam do controle do ciclo celular, levando à divisão celular descontrolada e contribuindo para o desenvolvimento neoplásico (CHOI; MAYERS, 2008).

As CDKIs são proteínas reguladoras negativas do ciclo celular, que atuam de forma a impedir que essas fosforilações sejam realizadas pelas CDKs. Os mamíferos apresentam

duas grandes famílias de CDKI, a INK4, formada pela p15, p16, p18 e p19 e a KIP/CIP, formada pela p21, p27 e p57 (LING *et al.*, 2007).

A proteína p27 é uma das proteínas de ação CDKI pertencente à família KIP/CIP, cujo gene se localiza no cromossomo humano 12q12.3. Esta possui importante função na inibição das CDK's que regulam o ciclo celular da fase G1 para a fase S. A p27 liga-se e inibe diretamente, e mais comumente, a ciclina D/CDK4, bem como a ciclina D/CDK6 e a ciclina E/Cdk2, resultando numa modificação conformacional que impede a síntese do DNA (RUSSO *et al.*, 1996; JORDAN *et al.*, 1998; MINETA *et al.*, 1999; LEE *et al.*, 2007; LING *et al.*, 2007; MAZON *et al.*, 2009).

Diversos estudos são conduzidos com o intuito de verificar a expressão da proteína p27 e o seu papel na carcinogênese, para confirmar a possível utilização desta como marcador de prognóstico em neoplasias malignas (JORDAN *et al.*, 1998; MINETA *et al.*, 1999; SAITO; NAKAGIMA; MOGI, 1999; KARTENER *et al.*, 2002; TSUZUKI *et al.*, 2003; OH; PENNEYS, 2004; SHINTANI *et al.*, 2004; BEN-IZHAK *et al.*, 2005; GALIZIA *et al.*, 2006; LEE *et al.*, 2007; MAZON *et al.*, 2009; QUEIROZ *et al.*, 2009; NASSIF; TAMBARA FILHO, 2010; PERISANIDIS *et al.*, 2011; RIBEIRO *et al.*, 2011).

Jordan *et al.*, (1998) avaliaram o nível de marcação da proteína p27, utilizando uma série de casos de epitélio normal, epitélio displásico e CCEO. A média de marcação em epitélio normal foi de 46,2%, enquanto que em epitélio displásico foi de 31,4% e em CCEO foi de 28,7%. Adicionalmente esta marcação também foi verificada em relação aos graus de displasia presentes no epitélio displásico, tendo média de 46,2% nas displasias leves, 33% nas moderadas e 23,4% nas displasias severas. Os autores associaram a redução progressiva da expressão da proteína p27, conforme fosse avaliada em epitélio oral normal, epitélio displásico e no CCEO, estes dados sugeriram a existência de relação da proteína p27 com a progressão tumoral.

Neste processo de proliferação celular é necessário que ocorra uma degradação da proteína p27, para que a transição celular aconteça e o estado proliferativo continue. A degradação da proteína p27 depende da sua fosforilação, pela Skp2, uma proteína F-box que reconhece especificamente p27 (CARRANO *et al.*, 1999).

Saito, Nakajima, Mogi (1999) estudaram o ciclo celular utilizando a imunexpressão das proteínas p16, p53, pRb, p27 e Ki-67 em 10 casos de epitélio oral normal, 57 lesões displásicas, 44 casos de CCEO e em 15 casos de carcinoma verrucoso. A expressão para Ki-67 esteve presente em todos os casos estudados, sendo percebida no epitélio normal uma média de marcação de 14,9%, no tecido displásico, a displasia leve mostrou uma média de 28,7%, a moderada de 30% e a severa de 52,2%, para a referida proteína, enquanto os casos de CCEO apresentaram média de 63%, e os casos de carcinoma verrucoso apresentaram média de 27,4%. Quanto à imunexpressão da p27, no epitélio normal a média de marcação observada foi de 53%, no epitélio displásico, foi identificado nas displasia leves média de 40,7%, nas moderadas de 32,1% e nas displasias severas de 28,4%, enquanto os CCEO a média de marcação foi de 24,0%, e nos carcinomas verrucosos de 52,6%. Os autores sugeriram que o aumento na expressão da proteína Ki-67, bem como a diminuição de expressão da p27 estão associadas à progressão tumoral.

Mineta *et al.*, (1999) analisaram a imunexpressão da proteína p27 em 94 casos de CCEO, quanto a sua relação com as características clínicas e histopatológicas. Foi verificada uma perda progressiva de intensidade da marcação da p27 com o avanço do estágio clínico, e com o aumento da indiferenciação celular. Estes achados sugeriram que a marcação da proteína p27 pode ser utilizada como fator prognóstico em CCEO, uma vez que a perda de expressão para mesma está associada a maior agressividade da lesão.

Okabe *et al.*, (2001) avaliaram a expressão da proteína p27 em carcinomas mucoepidermóides de glândulas salivares menores, buscando associar esta marcação com os parâmetros clínicos e histopatológico. A expressão da proteína p27 foi considerada intensa

quando observados valores para marcação acima de 20%, e fraca quando identificados valores abaixo de 20% de marcação. Os resultados mostraram uma perda de intensidade para referida proteína conforme aumentavam o estágio clínico e a indiferenciação histopatológica. Os autores sugeriram que a redução nos níveis da proteína p27 está relacionada com um pior prognóstico em carcinomas mucoepiteliais neoplasias de glândulas salivares menores.

Kartener *et al.*, (2002) sugeriram que a proteína p27 desempenha um papel importante no controle do ciclo celular e conseqüentemente na carcinogênese, sendo que a sua baixa expressão parece estar relacionada a um aumento da agressividade da lesão, bem como a um pior prognóstico.

Tsuzuki *et al.* (2003) estudaram através da imuno-histoquímica, a expressão da proteína p27 em casos de leucoplasias orais e CCEO, nos quais, foi observado uma diminuição da marcação para referida proteína nas leucoplasias, em relação aos casos de CCEO. Adicionalmente, os autores observaram um aumento na atividade apoptótica nas leucoplasias que demonstravam alta marcação para p27. Estes dados sugeriram que a p27 atua no controle da proliferação celular, e pode ser utilizada como marcador prognóstico em leucoplasias e em CCEO.

Kovesi e Szende (2006) avaliaram a expressão imuno-histoquímica da ciclina D1, p27, p63, ki-67 e p53, em uma série de leucoplasias orais. A expressão para proteína p27 foi observada em 14% dos casos de leucoplasias de aspecto homogêneo, e em 8% dos casos com aspecto nodular, enquanto que nas eritroleucoplasias foi verificada uma expressão em apenas 2% destes casos. Para os autores, as características de expressão da proteína p27 nas diferentes formas de apresentação da leucoplasia, sugerem a sua utilização como marcador de prognóstico, uma vez que sabidamente esta lesão quando apresenta como aspecto o eritroleucoplásico, demonstra maiores índices de transformação maligna.

Um estudo sobre a relação da proteína p27 e a fotocarcinogênese foi realizado por Oh e Penneys (2004) utilizando casos CCE de pele causados pela exposição à radiação solar, além de ceratoses actínicas e epitélio cutâneo. Os resultados mostraram níveis consideravelmente menores da proteína p27 em CCE de pele, quando comparados com as ceratoses actínicas, que por conseguinte também demonstraram níveis menores do que o epitélio cutâneo sem alteração. Os autores sugeriram que a proteína p27 poderia ser utilizada como indicador prognóstico no papel da fotocarcinogênese do CCE de pele.

Shintani *et al.*, (2004) verificaram a imunexpressão da proteína p27 em culturas de células epiteliais transformadas, após a administração de um inibidor tirosina-quinase (Gefinitib®) nestas células. Os autores evidenciaram um aumento na expressão da proteína p27 nas células neoplásicas, fato que pode ser explicado pela ação do Gefinitib®, que induz a uma redução da Skp2, responsável pela degradação da proteína p27, com consequente aumento da p27 e consequente parada do ciclo celular. Estes dados sugerem que a utilização de fármacos que atuam no controle da proliferação celular, através do aumento de expressão da proteína p27, pode ser realizada junto a outras formas de tratamento do CCE.

Ben-Izhak *et al.*, (2005) também avaliaram em seu estudo a interação entre a p27 e a Skp2. Os autores referiram que a inativação da p27 é de grande importância para que se complete o ciclo celular, sendo que uma das formas de inativação dessa proteína se dá pela ação da Skp2, uma subunidade da ubiquitina-ligase E3, que atua em uma das principais vias de degradação da p27. Dessa forma, o aumento da degradação da p27 pode levar a uma proliferação celular descontrolada e a um aumento da chance de transformação maligna.

Galizia *et al.*, (2006) observaram em CCE de cólon, que a positividade para a proteína EGFR e uma baixa concentração de p27 determinariam o aumento nas chances de recorrência da neoplasia após 48 meses da cirurgia de remoção da lesão.

Mazon *et al.*, (2009) estudaram a possível associação entre a expressão da p27, MDM2 e B-catepsina em casos de CCEO infectados pelo vírus HPV, lesões orais benignas

(hiperplasia e papiloma) e lesões pré-malignas (leucoplasia oral). Os resultados mostraram uma marcação celular média para proteína p27 em epitélio oral normal de 46%, nas lesões orais benignas média de 51%, enquanto nos CCEO infectados pelo HPV a média de marcação foi de 60,3%. Os autores sugeriram que a proteína p27 pode ser utilizada como marcador prognóstico em lesões neoplásicas orais.

Queiroz *et al.*, (2009) propuseram-se avaliar através da técnica da imuno-histoquímica a expressão das proteínas p27, p21WAF/Cip1 e p16NK4a em 32 casos de epitélio escamoso normal, 30 casos de papiloma escamoso e 34 de CCEO. Os resultados mostraram positividade fraca e focal para proteína p27 em 97,06% dos casos de CCEO, enquanto o grupo papiloma escamoso apresentou marcação franca e focal 33,33% da amostra desta lesão e o grupo controle, em 18,75% dos casos, destacando-se ainda que os CCE pouco diferenciados não apresentaram expressão da proteína p27. Os autores sugeriram que a marcação fraca e focal aumentada para proteína p27 em CCEO, pode estar relacionada à presença de células imaturas e indiferenciadas, podendo este fato ser relacionado como marcador para carcinogênese oral.

Ribeiro *et al.*, (2011) investigaram a expressão imuno-histoquímica da proteína EGFr em leucoplasias orais com intuito de determinar a relação desta proteína com características clínicas e histopatológicas da lesão, e adicionalmente verificaram a proliferação celular utilizando as proteínas Ki-67 e p27. A amostra foi composta por 48 leucoplasias e 10 espécimes de epitélio normal, e os resultados mostraram uma associação entre a proteína EGFr e a proteína p27, na qual o aumento na expressão da proteína EGFr coincidia com a diminuição de expressão da proteína p27. Os autores sugeriram que as proteínas EGFr e p27 podem representar um mecanismo importante na progressão das atipias celulares do epitélio normal para lesões pré-maligna e carcinomas, no entanto os autores ressaltam a importância de mais investigações.

Parisanidi *et al.*, (2011) avaliaram a expressão das proteínas p21, p27, p53, ciclina D1 e Ki-67 em CCEO e de orofaringe, com intuito de prever a resposta terapêutica e sobrevida em pacientes tratados com quimio-radioterapia pré-operatória. Os resultados deste estudo demonstraram uma alta expressão para proteína p27 em 43% dos casos, no entanto não foi observada nenhuma relação de significância entre a expressão da proteína p27 e os fatores prognósticos estudados, dentre eles o estágio clínico e a gradação histopatológica. Os autores sugeriram que a proteína p27 parece não exercer influência no prognóstico dos pacientes com CCEO e de orofaringe.

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo teve como objetivo avaliar através da técnica da imuno-histoquímica a expressão das proteínas EGFr, p27 e Ki-67 em uma série de casos de CCELI, e compará-las com as expressões apresentadas pelo epitélio de revestimento da mucosa labial morfológicamente normal, com o intuito de verificar a possível utilização destes marcadores como indicadores de progressão tumoral.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Classificar o epitélio adjacente à lesão quanto aos graus de displasia epitelial de acordo com as atipias celulares que foram identificadas.
- Identificar a gradação histopatológica de malignidade dos CCELI na região de *front* de invasão tumoral e comparar com a gradação histopatológica em toda extensão tumoral.
- Correlacionar a expressão imuno-histoquímica das proteínas EGFr, p27 e Ki-67 com os dados clínicos dos pacientes, quais sejam: faixa etária, raça, exposição à radiação ultravioleta, estadiamento clínico (TNM) da lesão, e também como as gradações histopatológicas de malignidade.
- Verificar a expressão imuno-histoquímica das proteínas EGFr, p27 e Ki-67 no epitélio de revestimento da mucosa labial do grupo controle.
- Comparar a expressão imuno-histoquímica das proteínas EGFr, p27 e Ki-67 nas áreas de *front* de invasão, cório tumoral e epitélio adjacente à lesão.

4. METODOLOGIA

4.1 IMPLICAÇÕES ÉTICAS

Esta pesquisa foi submetida ao Comitê de Ética em Pesquisa da UEPB e aprovada com parecer número 0360.0.133.000-11(ANEXO I) respeitando a resolução 196/96 do Ministério da Saúde.

4.2 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

A presente pesquisa constituiu-se de um estudo de caráter observacional, com corte temporal transversal, com dados secundários retrospectivos, e de uma análise descritiva da observação e registro da expressão imuno-histoquímica das proteínas EGFr, p27 e Ki-67 em uma série de casos de CCELI e no grupo comparativo composto por epitélio oral normal.

4.3 LOCAL DO ESTUDO

O presente estudo utilizou uma série de casos de CCELI oriundos do Hospital Napoleão Laureano, João Pessoa – PB, que se destaca por ser o maior centro de referência para atendimento aos pacientes com câncer no estado da Paraíba. Adicionalmente, a avaliação histopatológica foi realizada no Laboratório de Anatomo-Patologia do Departamento de Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campina Grande – PB, e o estudo imuno-histoquímico foi realizado no Laboratório de Imuno-histoquímica da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte – MG.

4.4 POPULAÇÃO DE ESTUDO

Para o presente estudo todos os casos de CCELI, diagnosticados e registrados no serviço de Patologia Cirúrgica do Hospital Napoleão Laureano, João Pessoa – PB, no período compreendido entre janeiro de 2000 a dezembro de 2010, que atenderam aos critérios de inclusão e exclusão foram incluídos na população alvo do estudo.

Para o grupo comparativo foram considerados todos os casos de fenômeno extravasamento de muco (Mucocele), diagnosticados e registrados no Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), Belo Horizonte – MG, que atenderam aos critérios de inclusão e exclusão foram incluídos na população do grupo comparativo alvo do estudo.

4.4.1 Critérios de Inclusão

Foram incluídos no estudo os casos de CCELI resultantes de tratamento cirúrgico para a referida lesão, cujos prontuários dos pacientes continham todos os dados necessários para a realização do estudo clínico. Adicionalmente, os casos selecionados deveriam possuir bloco de parafina correspondente com qualidade e quantidade de material para realização do estudo histopatológico e imuno-histoquímico.

Quanto ao grupo comparativo os casos selecionados deveriam possuir bloco de parafina correspondente com qualidade e quantidade de epitélio normal, no tocante às possíveis alterações morfológicas referentes à atipia celular suficiente para realização do estudo histopatológico e imuno-histoquímico.

4.4.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos do estudo, os casos cujos prontuários estavam incompletos para o estudo clínico, bem como aqueles que não foram provenientes de biópsia excisional e/ou não possuíam quantidade de material suficiente para avaliação das diferentes áreas da lesão, o que não possibilitaria a realização do estudo histopatológico e imuno-histoquímico. Adicionalmente, também foram excluídos os casos dos pacientes que receberam tratamento como quimioterapia ou radioterapia previamente à realização do tratamento cirúrgico.

Quanto o grupo comparativo foram excluídos os casos do grupo comparativo que não possuíam quantidade de material suficiente para realização do estudo imuno-histoquímico.

4.5 AMOSTRA

O cálculo para o tamanho da amostra baseou-se no método proposto por Lwanga e Lemeshow (1991), sugerido para comparação de duas proporções. Para tanto, utilizou-se os dados referentes à menor diferença encontrada na marcação entre o CCEO e a mucosa oral normal. Foi utilizado como base os dados publicados referentes à proteína Ki-67, considerando a média dos estudos de Saito, Nakajima e Mogi (1999) e Torres-Redon *et al.*, (2009) que analisaram a expressão da referida proteína em CCEO e em mucosa oral normal. Os achados destes estudos revelaram média de positividade da Ki-67 em CCEO de 61,01% e em mucosa oral normal de 18,92%.

Ao ser utilizada como base os valores da expressão em cada um dos grupos, além de um nível de confiança de 5%, com poder do teste de 95%, sendo este bicaudal, o tamanho da amostra calculado para cada grupo foi de 32 espécimes.

4.6 VARIÁVEIS ESTUDADAS

As variáveis estudadas na presente pesquisa foram categorizadas de acordo com o quadro listado abaixo:

Variáveis	Descrição	Tipo
Sexo	Masculino; Feminino	Independente
Idade	-	Independente
Raça/Cor	Branco; Amarelo; Pardo; Indígena; Negra	Independente
Ocupação	-	Independente
Exposição a radiação ultravioleta/solar	Sim; Não	Independente
Estadiamento Clínico (TNM)	Estadio I; Estadio II; Estadio III; Estadio IV	Independente
Atipia celular	Ausência de atipia; Presença de atipia	Independente
Grau de displasia (OMS, 2005)	Displasia leve; Displasia moderada; Displasia severa	Independente
Gradação histológica (OMS, 2005)	Bem diferenciado; moderadamente diferenciado; pobremente diferenciado	Independente
Gradação histológica (Bryne, 1998, adaptada por Silveira <i>et al.</i> , 2010)	Baixo grau de malignidade; Alto grau de malignidade	Independente
Imunoexpressão EGFr	0 – sem marcação ou marcação inferior a 10% 1 – marcação fraca, homogênea ou não, mas superior a 10% 2 – marcação moderada, homogênea ou não, superior a 10% 3 – marcação intensa, homogênea ou não, superior a 10%	Dependente
Imunoexpressão Ki-67	Índice de Marcação	Dependente
Imunoexpressão p27	Índice de Marcação	Dependente

Quadro 2 – Variáveis do estudo.

4.7 ESTUDO CLÍNICO

Inicialmente foi procedida a codificação numérica do instrumento de pesquisa, com registro dos números originais tanto do prontuário quanto da peça parafinada, tal qual foram codificadas no serviço de origem. Desta forma, foi possível manter em sigilo a identificação

do paciente, e caso fosse necessária uma nova busca de informações, essa poderia ser direcionada individualmente para a peça ou prontuário em questão. Dos prontuários analisados, foram obtidas informações em relação ao sexo, idade, raça, ocupação, exposição à radiação UV/solar dos pacientes, bem como o estadiamento clínico das lesões. Estas informações foram registradas em uma ficha específica criada para realização do presente estudo (APÊNDICE A).

A faixa etária foi definida em dois grupos, compreendendo o primeiro deles os pacientes até 60 anos e o segundo os pacientes que apresentavam 61 anos ou mais, tomando como base a distribuição dos dados coletados.

No tocante à etnia, os grupos foram identificados de acordo com a classificação do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), em brancos, pardos, negros, amarelos e indígenas e, subsequentemente agrupados em brancos e não-brancos. A ocupação seguiu a distribuição entre as atividades relacionadas à agricultura e aquelas que não apresentavam esta relação, tomando-se como base os dados de Gervásio *et al.*, (2001) e Brener *et al.*, (2007). Quanto ao critério de exposição a radiação UV foram considerados os indivíduos que estavam expostos diretamente ao sol de acordo com a sua ocupação e outro grupo com indivíduos que estavam expostos indiretamente ao sol utilizando o mesmo critério.

O processo de estadiamento dos pacientes foi baseado nos dados registrados em prontuários e categorizados de acordo com a classificação TNM (SOBIN, WINTTEKIND, 2002). Os grupos foram divididos em estágio I-II para ausência de metástases (N0), e estágio III-IV para presença de metástases (N>0).

4.8 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO

Todos os espécimes de CCELI previamente fixados em formol a 10% e posteriormente processados e emblocados em parafina, referentes aos casos selecionados para este estudo, foram submetidos a cortes com 5µm de espessura, os quais foram estendidos em lâminas de vidro e submetidos à coloração de rotina da Hematoxilina e Eosina (HE). Sob microscopia de luz (*Leica DM500, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, DE*), os espécimes de CCELI foram examinados nos aumentos de 100x e 400x.

Foi procedida uma análise quanto à presença ou ausência de displasia epitelial, no epitélio adjacente a lesão, e esta quando presente foi classificada quanto ao grau de displasia epitelial baseado nas alterações citológicas e arquiteturais, conforme descrito pela OMS (GALE *et al.*, 2005) e apresentado no Quadro 3. Considerando o grau de atipia citológica e a extensão das alterações arquiteturais nos estratos epiteliais, as displasias epiteliais foram classificadas em leve, moderada e severa (WARNAKULASURIYA *et al.*, 2008) (QUADRO 4).

Arquiteturais	Citológicos
Estratificação epitelial irregular	Varição anormal no tamanho nuclear (anisonucleose)
Perda da polaridade das células basais	Varição anormal na forma nuclear (pleomorfismo nuclear)
Projeções epiteliais em forma de gota	Varição anormal no tamanho celular (anisocitose)
Aumento do número de figuras de mitose	Varição anormal na forma celular (pleomorfismo celular)
Mitoses superficiais anormais	Aumento da relação núcleo-citoplasma
Ceratinização prematura em células individuais (disqueratose)	Aumento do tamanho nuclear
Pérolas de ceratina no interior das cristas epiteliais	Figuras de mitose atípicas
	Aumento no tamanho e número dos nucléolos
	Hipercromasia

Quadro 3. Critérios utilizados para o diagnóstico de displasia epitelial de acordo com OMS (GALE *et al.*, 2005).

Grau de displasia epitelial	Características
Displasia leve	Alterações arquiteturais limitadas ao terço inferior do epitélio ou estendendo-se ao terço médio, com mínima atipia citológica.
Displasia moderada	Alterações arquiteturais envolvendo o terço médio do epitélio, com moderada atipia citológica.
Displasia severa	Alterações arquiteturais envolvendo mais de 2/3 do epitélio, com atipias citológicas; ou Alterações arquiteturais envolvendo o terço médio do epitélio, com marcante atipia citológica.
Observação: alterações arquiteturais que se estendem ao terço médio do epitélio e são acompanhadas de mínima atipia citológica ainda caracterizam displasia leve. De forma similar, alterações arquiteturais que não envolvem mais de 2/3 do epitélio, mas são acompanhadas de marcante atipia citológica, caracterizam displasia severa.	

Quadro 4. Classificação e características dos graus de displasia epitelial, de acordo com Warnakulasuriya *et al.*, (2008).

A análise da gradação histopatológica de malignidade no *front* de invasão tumoral, utilizou o sistema proposto por Bryne (1998) (QUADRO 5). Para a gradação histopatológica de malignidade proposta por Bryne (1998), os escores obtidos em cada um dos parâmetros foram somados, obtendo-se um escore final de malignidade do caso. Quando as lesões apresentavam escores finais entre 4 e 8 foram classificadas como de baixo grau de malignidade, enquanto que tumores com escore final igual ou superior a 9 foram classificados como de alto grau de malignidade (SILVEIRA *et al.*, 2010).

Estas lesões ainda foram submetidas à avaliação da gradação histopatológica de malignidade considerando toda a extensão do tumor, de acordo com o sistema proposto pela OMS (CARDESA *et al.*, 2005) (QUADRO 6). O grau de diferenciação celular em toda a extensão do tumor foi avaliado de acordo com o sistema anteriormente citado e os casos foram classificados como: bem diferenciados, moderadamente diferenciados e pobremente diferenciados.

Os dados obtidos com as análises das gradações histopatológicas de malignidade foram anotados em fichas apropriadas (APÊNDICE A).

Aspectos Morfológicos	Escore de Malignidade			
	1	2	3	4
Grau de Ceratinização	Altamente ceratinizado (mais de 50% das células)	Moderadamente ceratinizado (20 a 50% das células)	Mínima ceratinização (5 a 20% das células)	Nenhuma ceratinização (0 a 5% das células)
Pleomorfismo Nuclear	Pouco pleomorfismo nuclear (mais de 75% das células maduras)	Moderado pleomorfismo nuclear (50 a 75% das células maduras)	Abundante pleomorfismo (25 a 50% das células maduras)	Pleomorfismo nuclear extremo (0 a 25% das células maduras)
Padrão de Invasão	Bordas infiltrativas bem delimitadas	Cordões, bandas e/ ou trabéculas sólidas infiltrativas	Pequenos grupos ou cordões de células infiltrativas (N>15)	Dissociação celular difusa e pronunciada, em pequenos grupos e/ou células individuais (N<15)
Infiltrado Inflamatório	Intenso	Moderado	Escasso	Ausente

Quadro 5. Sistema de gradação histopatológica de malignidade no *front* de invasão proposto por Bryne (1998).

Grau histopatológico de malignidade	Características
Bem diferenciado	Arquitetura tecidual semelhante ao padrão normal do epitélio escamoso
Moderadamente diferenciado	Certo grau de pleomorfismo nuclear e atividade mitótica Pouca ceratinização
Pobrememente diferenciado	Predomínio de células imaturas Numerosas mitoses típicas e atípicas Mínima ceratinização

Quadro 6. Sistema de gradação histopatológica de malignidade proposto pela OMS (CARDESA *et al.*, 2005).

4.9 ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO

4.9.1 Método imuno-histoquímico

O método da imuno-histoquímica foi realizado no Laboratório de Imuno-histoquímica da Faculdade de Odontologia (UFMG), Belo Horizonte – MG.

Todos os espécimes de CCELI e mucocelos previamente fixados em formol a 10% e posteriormente processados e emblocados em parafina, referentes aos casos selecionados para este estudo, foram submetidos a cortes histológicos de 3µm de espessura, e estendidos em lâminas de vidro, devidamente limpas, desengorduradas e geleificadas conforme protocolo do mesmo laboratório. Posteriormente, o material foi submetido à técnica da streptoavidina-biotina, seguindo os passos laboratoriais descritos abaixo, utilizando os anticorpos primários anti-EGFr, anti-p27 e anti-Ki-67.

- Xilol I overnight à temperatura ambiente
- Xilol II por 15 minutos à temperatura ambiente
- Etanol absoluto I por 5 minutos
- Etanol absoluto II por 5 minutos
- Etanol absoluto II por 5 minutos
- Etanol 95° por 5 minutos
- Etanol 80° por 5 minutos
- Passar em 5 banhos de água destilada
- Incubação em Solução de Hidróxido de Amônio 10% + Etanol 95% por 10 minutos
- Passar em 5 banhos de água destilada
- Recuperação antigênica (Quadro 7)
- Passar em 5 banhos de água destilada
- Bloqueio da Biotina/Avidina

- Biotina: Solução de ovo por 10 minutos;
 - Passar em 5 banhos de água destilada;
 - Avidina: Solução de leite por 15 minutos;
 - Passar em 5 banhos de água destilada.
- Bloqueio da peroxidase endógena
- EGFr: Passar em 2 banhos de 15 minutos cada, com peróxido de Hidrogênio H₂O₂ 10volumes
 - Ki-67: Passar em 2 banhos de 15 minutos cada, com peróxido de Hidrogênio H₂O₂ 10volumes + Metanol (1:1)
- p27: Passar em 2 banhos de 5 minutos cada, com peróxido de Hidrogênio H₂O₂ 10volumes + Metanol (1:1)
- Passar em 5 banhos de água destilada
- Incubar em tampão de TRIS- Hcl 20mM, pH7.4, temperatura ambiente, com 3 banhos de 5 minutos cada
- Incubação dos cortes com os anticorpos primários
- Ant-EGFr: 1:100, temperatura ambiente, 1 hora
 - Anti-Ki67: 1:100, temperatura ambiente, 1 hora
 - Anti-p27: 1:50, temperatura ambiente, 1 hora
- Desincubar em tampão de TRIS-Hcl 20mM, pH 7.4, temperatura ambiente, com 3 banhos de 5 minutos cada
- Incubação no biotilado *Link* universal (*Sistema LSAB+System-HRP, Dako, Carpinteria, CA*) Temperatura ambiente, 30 minutos
- Desincubar em tampão de TRIS-Hcl 20mM, pH 7,4, temperatura ambiente, com 3 banhos de 5 minutos cada
- Incubação no complexo streptoavidina-HRP (*Sistema LSAB+System-HRP, Dako, Carpinteria, CA*) Temperatura ambiente, 30 minutos
- Desincubar em tampão de TRIS-Hcl 20mM, pH 7,4, temperatura ambiente, com 3 banhos de 5 minutos cada
- Solução Reveladora (*Diaminobenzidina, Liquid DAB + substrate, Chromogen System, DAKO – USA*)
- Passar em 1 banho de tampão de TRIS-Hcl 20mM, pH 7,4, temperatura ambiente
- Passar em 5 banhos de água destilada

- Contracoloração com Hematoxilina de *Mayer*
Banho de 30 segundos

- Passar em 5 banhos de água destilada

-Incubar nos seguintes banhos (desidratação – diafanização)

- Etanol 70° , por 2 minutos
- Etanol 90° , por 2 minutos
- Etanol Absoluto I, por 2 minutos
- Etanol Absoluto II, por 5 minutos
- Etanol Absoluto III, por 10 minutos
- Xilol I, por 5 minutos
- Xilol II, por 10 minutos

- Montagem da Lâmina

Anticorpo	Anti-Ki67	Anti-EGFr	Anti-p27
Clone	MIB-1	31G7	SX53G8
Fonte	Dako	Zymed	Dako
Diluição	1:100	1:100	1:50
Recuperação Antigênica	Ácido Cítrico pH 6.0 Banho Maria 96°/30min	Pepsina pH 1.8 Estufa 25°/13min	Tris/EDTA pH 8.0 Banho Maria 96°/30min
Sistema de detecção	LSAB	LSAB	LSAB
Incubação	60 minutos TA	60 minutos TA	60 minutos TA

Quadro 7 – Especificidade para os anticorpos utilizados na avaliação imuno-histoquímica.

Como grupo comparativo foram utilizados espécimes com diagnóstico histopatológico de fenômeno de extravassamento de muco (Mucocele). Os respectivos blocos parafinados encontravam-se em arquivo no Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia (UFMG), Belo Horizonte – MG.

Como controle positivo foram utilizados tecidos provenientes de tonsilas, os quais também encontravam-se em arquivo no laboratório anteriormente referido, enquanto que, para o controle negativo não foi realizada a incubação com o anticorpo primário.

4.9.2 Análise das células imunomarcadas

A análise foi realizada no tecido epitelial não neoplásico para o grupo comparativo, bem como no epitélio adjacente ao tumor, no cório e *front* de invasão para o grupo caso (CCELI), por um único observador sob microscopia de luz (*Leica DM500, Leica Microsystems GmbH, Wetzlar, DE*) em aumento de 100x, foi selecionada a área de maior imunorreatividade das células epiteliais aos anticorpos anti-EGFr, anti-Ki-67 e anti-p27. Nesta área, sob aumento de 400x foram fotomicrografados os campos histológicos com auxílio de câmera digital com adaptação para fotomicrografia (*Sony DSC-W230, Sistema de digitalização de imagem, Yamamoto Electric Corporation, CHINA*) e as imagens obtidas foram transferidas para um computador tipo *Notebook HP®* com tela *Led LCD* de 14.1 polegadas.

Para a avaliação da imunexpressão da proteína EGFr, foi realizada uma análise semi-qualitativa, sugerida por Diniz-Freitas *et al.*, (2007) (Quadro 8), na qual considera-se a intensidade e quantidade da marcação em membrana citoplasmática, classificando esta imunomarcação em ausente, fraca, moderada e intensa.

ESCORE	DEFINIÇÃO
0	<i>Marcação ausente ou marcação inferior a 10%</i>
1	<i>Marcação fraca, homogênea ou não, mas superior a 10%</i>
2	<i>Marcação moderada, homogênea ou não, superior a 10%</i>
3	<i>Marcação intensa, homogênea ou não, superior a 10%</i>

Quadro 8 – Classificação da marcação em membrana citoplasmática para proteína EGFr (DINIZ-FREITAS *et al.*, 2007).

Nas marcações qualitativas utilizou-se o mesmo critério de Ribeiro *et al.*, (2011), que subdividiu as marcações para EGFr em alto índice, quando apresentavam marcação moderada e intensa, e em baixo índice quando tinham ausência de marcação ou marcação fraca.

Para análise da imunexpressão das proteínas Ki-67 e p27 foram consideradas positivas todas as células que exibiram marcação nuclear, independente da intensidade desta marcação. Através do auxílio do programa *Imaging Processing and Analysis in Java* (*ImageJ*® - *National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA*), foram consideradas e contadas as células que exibiam imunomarcação nuclear, bem como as células negativas, em quantos campos fossem necessários para alcançar o máximo de 500 células entre positivas e negativas. Inicialmente foram contadas todas as células positivas, e posteriormente todas as células que não apresentaram marcação e considerando a fórmula abaixo, foi alcançado o Índice de Marcação (IM) para cada lesão (ROCHA, SOUZA, PINTO, 2007).

$$\text{IM} = \frac{\text{No de células marcadas}}{\text{No total de células}} \times 100$$

No total de células

À partir dos valores oriundos da contagem de células imunomarcadas para Ki-67 e p27, os casos foram posteriormente divididos em dois grupos, o primeiro denominado de alto índice de marcação e o segundo de baixo índice de marcação. O critério usado para classificação das marcações quantitativas foi a divisão à partir da mediana, no qual, os casos acima desta foram considerados de alto índice enquanto os que apresentavam valores abaixo da referida mediana corresponderam ao baixo índice de marcação (MINETA *et al.*, 1999).

4.10 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Uma vez realizadas as análises das informações clínicas e os estudos histopatológico e imunohistoquímico, os resultados obtidos foram organizados em um banco de dados informatizado com o auxílio do programa *Statistical Package for the Social Sciences* (versão 17.0, SPSS Inc., Chicago, IL, USA), a fim de facilitar o tratamento estatístico dos dados.

O teste não-paramétrico do X^2 (Qui-quadrado de *Pearson*) ou *Exato de Fisher* quando aplicável, foi utilizado para verificar a existência de associação entre as variáveis clínicas e histopatológicas em sua relação com a imunoexpressão dos marcadores imunohistoquímicos dicotomizados, que foram especificados em alto e baixo índice de marcação.

Para verificar a distribuição dos dados referentes a marcação para as proteínas Ki-67 e p27 foi utilizado o teste de *Kolmogorov-Smirnov*.

Para análise dos índices para as proteínas Ki-67 e p27 entre as diferentes áreas tumorais, foi utilizado o teste de *Kruskal-Wallis*, enquanto a marcação destas mesmas proteínas em relação ao grupo comparativo (epitélio normal) foi verificada através do teste de *Mann-Whitney*. Adicionalmente, para imunoexpressão da EGFr relacionada ao grupo comparativo, foi utilizado o teste de associação *Exato de Fisher*, e a marcação da referida proteína em cada área tumoral também foi analisada juntamente com a marcação das proteínas Ki-67 e p27 e avaliadas pelo teste de *Mann-Whitney*.

Para todos os testes foi considerado um nível de confiança de 95% ($p < 0,05$).

5. RESULTADOS

5.1 RESULTADOS CLÍNICOS

Ao serem observados os 32 casos de CCELI avaliados no presente estudo, o sexo masculino acometeu 23 destes (71,9%), enquanto o sexo feminino correspondeu a 9 casos (28,1%). Tomando como base esses dados, a relação homem:mulher representou 2,5:1 (TABELA 1).

Quanto à faixa etária, observou-se uma idade mínima de 31 anos e máxima de 84 anos, com uma média de idade de 63 anos. A maior prevalência foi de indivíduos com 61 anos ou mais de idade, com um total de 19 casos (59,3%), seguida pelos indivíduos com até 60 anos com 13 casos (40,7%) (TABELA 1).

Quanto à raça, a maioria era composta por indivíduos brancos com 22 casos (68,8%), enquanto os não brancos corresponderam aos casos (31,2%) restantes. Dentre os pacientes não brancos, 8 casos (25%) eram de indivíduos pardos e 2 casos (6,2%) eram pacientes amarelos (TABELA 1).

A atividade ocupacional ou ocupação cotidiana dos pacientes estudados apontou aquelas relacionadas com a agricultura, tais como agricultores e diaristas rurais, como as mais prevalentes, correspondendo a 25 casos (78,1%), enquanto as demais ocupações não relacionadas à agricultura, como motoristas, domésticas e feirantes, corresponderam juntas a 7 casos (21,9%).

Todos os indivíduos da amostra ora analisada apresentaram exposição à radiação UV (radiação solar). A exposição direta correspondeu a 26 casos (81,2%), enquanto 6 casos (18,8%) apresentaram exposição indireta à radiação solar durante suas atividades diárias (Tabela 1).

Analisando o estadiamento clínico (TNM) da presente pesquisa, verificou-se que 28 casos (87,5%) apresentavam-se nos estádios iniciais I e II, onde especificamente 12 destes casos (37,5%) estavam no estágio I enquanto 16 casos (50,0%) corresponderam ao estágio II. Foi observado que apenas 4 casos (12,5%) apresentavam-se nos estádios avançados III e IV, onde 2 destes (6,2%) encontravam-se estágio III e outros 2 (6,2%) apresentavam-se no estágio IV (TABELA 1).

Tabela 1. Caracterização da amostra segundo os dados clínicos analisados: sexo, faixa etária, raça, ocupação e estadiamento clínico (TNM). Campina Grande, Paraíba (2012).

Característica	n	%
Sexo		
Masculino	23	71,9
Feminino	9	28,1
<i>Total</i>	32	100,0
Faixa Etária		
≤ 60 anos	13	40,7
≥ 61 anos	19	59,3
<i>Total</i>	32	100,0
Raça		
Branco	22	68,8
Não Branco	10	31,2
<i>Total</i>	32	100,0
Ocupação		
Relacionada à agricultura	25	78,1
Não relacionada à agricultura	7	21,9
<i>Total</i>	32	100,0
Exposição a radiação solar (UV)		
Direta	26	81,2
Indireta	6	18,8
<i>Total</i>	32	100,0
Estadiamento Clínico		
Estádios I e II	28	87,5
Estádios III e IV	4	12,5
<i>Total</i>	32	100,0

5.2 RESULTADOS HISTOPATOLÓGICOS

A presença de atipia celular foi verificada em todos os casos analisados. Quanto à sua classificação em graus de displasia epitelial, o qual foi aplicado apenas ao epitélio adjacente, foi encontrada uma prevalência de displasia leve em 18 casos (56,3%), seguido da displasia moderada em 11 casos (34,4%) e da displasia severa em 3 casos (9,3%) (TABELA 2) (FIGURA 1- A, B e C).

Quanto à gradação histopatológica, os achados foram avaliados de acordo com os parâmetros estabelecidos por Bryne (1998) e adaptados por Silveira *et al.*, (2010) para *front* de invasão, os quais foram estabelecidos em alto e baixo grau de malignidade. Foi visto que 19 casos (59,4%) apresentaram baixo grau de malignidade e 13 casos (40,6%) apresentaram alto grau de malignidade (TABELA 2) (FIGURAS 2 e 3).

No tocante à gradação histopatológica, que considera toda a extensão do tumor foram encontrados 16 casos classificados como bem diferenciados (FIGURA 4), representando a maior parcela da amostra, seguido pelos moderadamente diferenciados com 11 casos (34,4%) e em menor quantidade os pobremente diferenciados, correspondendo a 5 casos (15,6%) (TABELA 2).

Não foi observada associação entre a gradação de *front* com o grau de displasia epitelial em epitélio adjacente ($p=0,112$) e nem com o estadiamento clínico ($p=0,100$). Uma associação significativa foi observada entre a gradação histopatológica segundo a OMS (CARDESA *et al.*, 2005), que avalia toda a extensão do tumor, e a gradação histopatológica de *front* de invasão ($p=0,004$), segundo Silveira *et al.*, (2010), nas quais tumores bem diferenciados foram classificados como baixo grau de malignidade, enquanto que os tumores moderadamente diferenciados e pobremente diferenciados foram classificados como de alto grau de malignidade (TABELA 3).

Tabela 2. Caracterização da amostra segundo o estudo histopatológico: presença de displasia, grau de displasia (Epitélio Adjacente) (WARNAKALASURYIA *et al.*, 2008), gradação histopatológica segundo Bryne (1998) e gradação histopatológica (CARDESA *et al.*, 2005). Campina Grande, Paraíba (2012).

CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS		
	n	%
Grau de Displasia		
Displasia Leve	18	56,3
Displasia Moderada	11	34,4
Displasia Severa	3	9,3
<i>Total</i>	32	100,0
Gradação Histopatológica (BRYNE, 1998)		
Baixo Grau de Malignidade	19	59,4
Alto Grau de Malignidade	13	40,6
<i>Total</i>	32	100,0
Gradação Histopatológica (CARDESA <i>et al.</i>, 2005)		
Bem Diferenciado	16	50,0
Moderadamente Diferenciado	11	34,4
Pobrememente Diferenciado	5	15,6
<i>Total</i>	32	100,0

Tabela 3. Análise de associação entre a gradação histopatológica segundo Bryne (1998) e displasia epitelial em epitélio adjacente ao tumor e gradação histopatológica (CARDESA *et al.*, 2005). Campina Grande, Paraíba (2012).

	Gradação Histológica em Front de invasão (BRYNE, 1998)				<i>p</i>
	Alto Grau		Baixo Grau		
	n	%	n	%	
Grau de Displasia					
Leve	10	55,6	8	44,4	
Moderada-Severa	3	21,4	11	78,6	
					0,112
Estádio Clínico					
Estadio I e II	11	39,3	17	60,7	
Estadio III e IV	2	50,0	2	50,0	
					1,000
Gradação Histológica (CARDESA <i>et al.</i>, 2005)					
Bem Diferenciado	2	12,5	14	87,4	
Moderadamente-Pobrememente Diferenciado	11	68,7	5	31,3	
					0,004

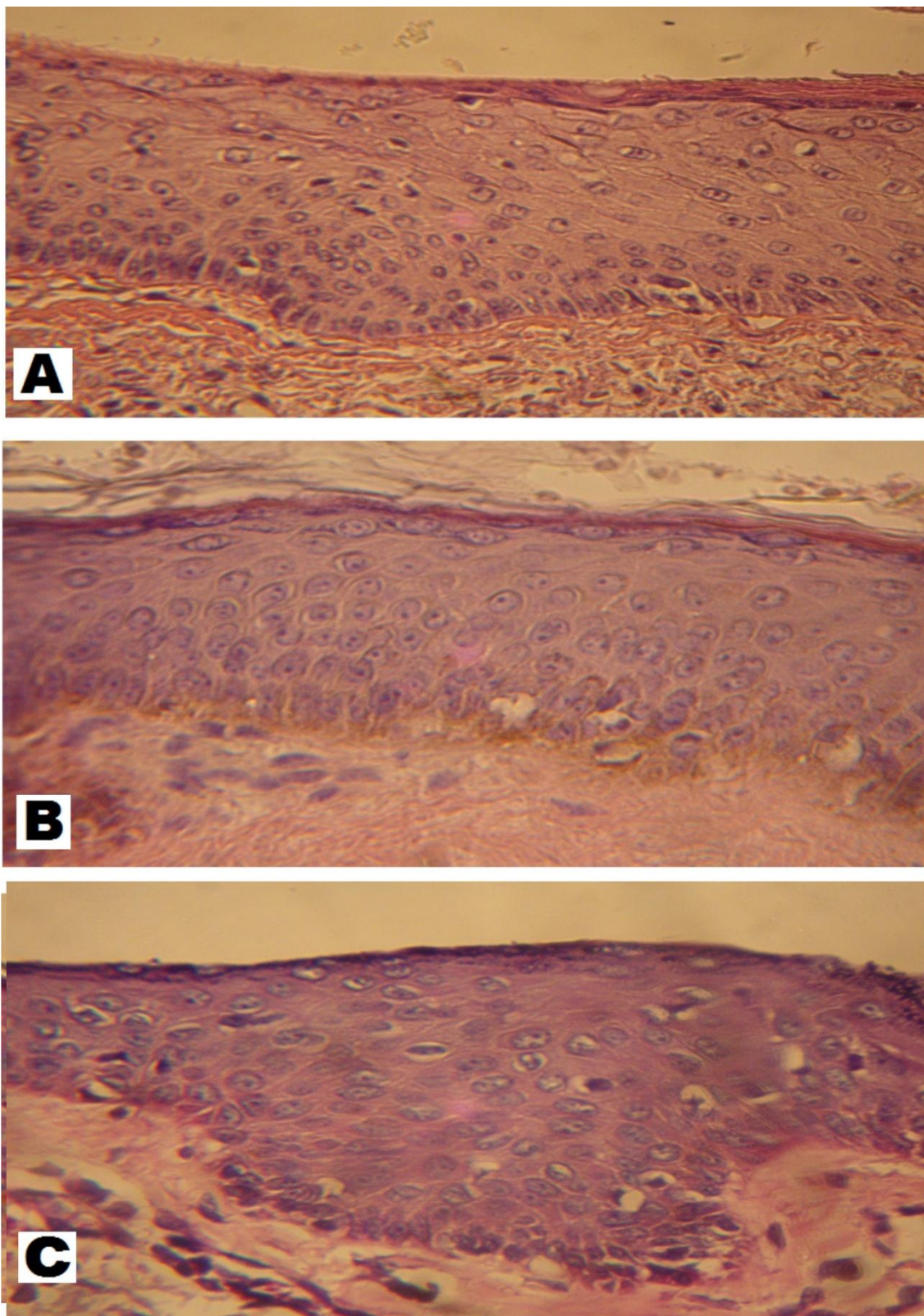


Figura 1. Espécime de CCELI evidenciando o epitélio adjacente ao tumor (HE, 400x).
A- Displasia epitelial leve. B- Displasia epitelial moderada. C- Displasia epitelial severa.

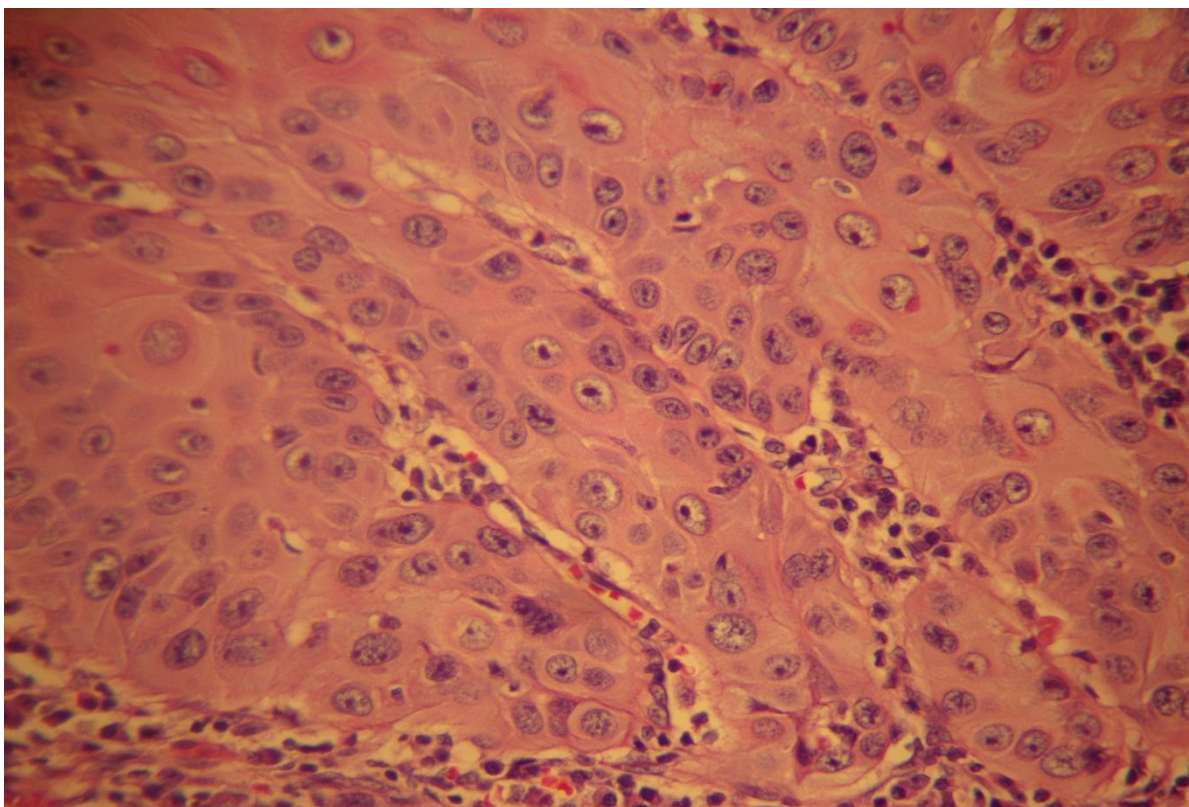


Figura 2. Espécime de CCELI de baixo grau de malignidade (BRYNE, 1998) exibindo abundante ceratinização, pleomorfismo celular moderada, padrão de invasão em cordões delimitados e intenso infiltrado inflamatório (HE, 400x).

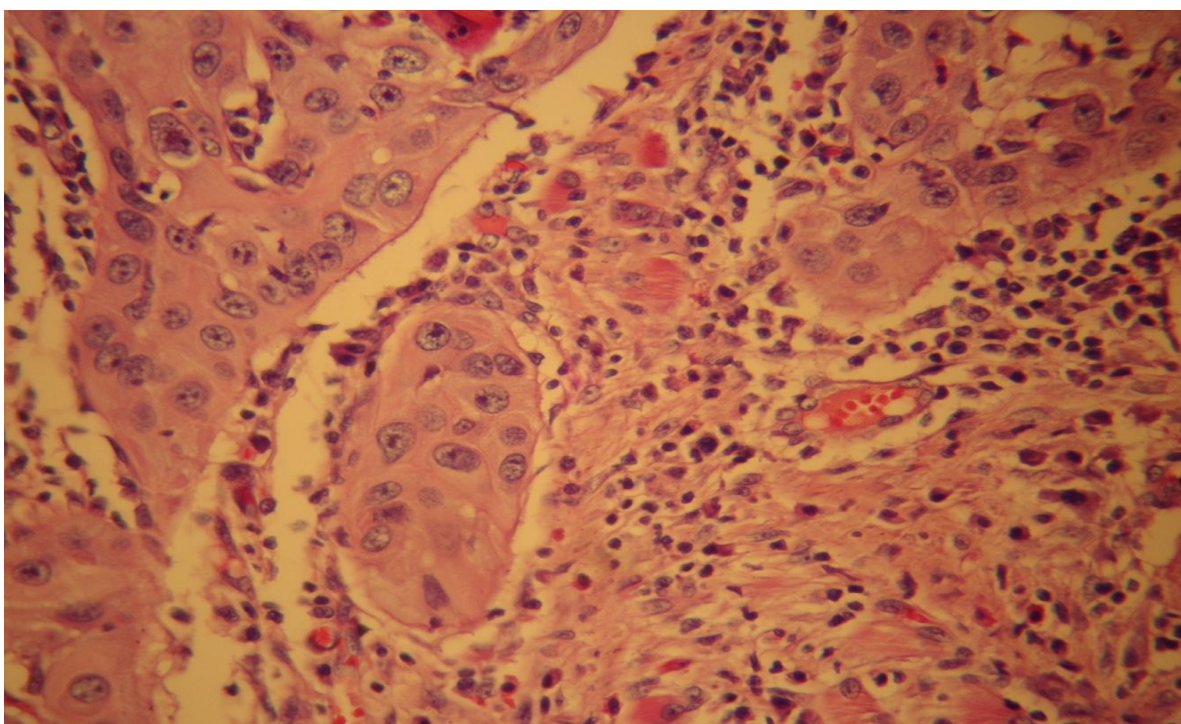


Figura 3. Espécime de CCELI de baixo grau de malignidade (BRYNE, 1998) exibindo ausência de ceratinização, pleomorfismo celular acentuado, padrão de invasão em pequenos ninhos e discreto infiltrado inflamatório moderado (HE, 400x).

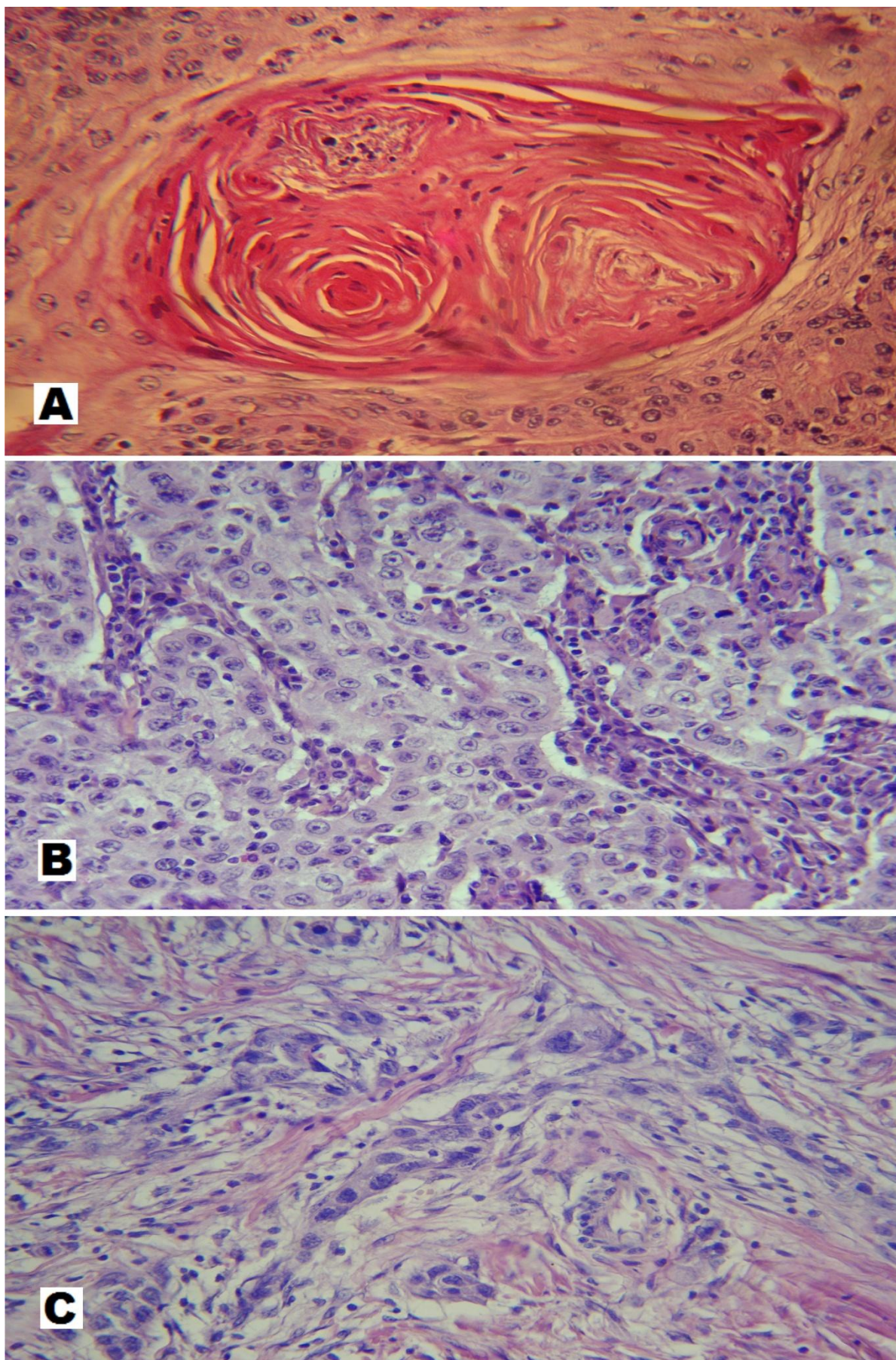


Figura 4. Espécime de CCELI bem diferenciado (A), moderadamente diferenciado (B) e pobremente diferenciado (C) (CARDESA *et al.*, 2005) (HE, 400x).

5.3 RESULTADOS IMUNO-HISTOQUÍMICOS

5.3.1 Grupo comparativo

A expressão imuno-histoquímica para a proteína Ki-67 esteve presente em todos os casos analisados de epitélio normal do grupo comparativo, nos quais, foram observadas marcações nas células da camada basal, esta imunoexpressão variou entre 5,8% e 47,2% do total de células contadas, apresentando uma média de 29,0% (GRÁFICO 1, FIGURA 6 - A).

A proteína p27 teve sua imunoexpressão presente em todos os casos estudados, com localização principalmente camada supra basal do epitélio normal do grupo comparativo, e variou entre 1% e 65,2% do total de células contadas, com uma média de 29,2% (GRÁFICO 1, FIGURA 7 - A).

Quando a marcação da proteína EGFr no grupo formado pelo epitélio normal, observou-se uma expressão com predomínio em membrana citoplasmática e com marcação intensa em 14 casos (43,9%), seguido de uma marcação fraca em 10 casos (31,1%) e moderada em 8 casos (25%), ressaltando-se o fato que neste tecido não houve ausência de marcação (GRÁFICO 2, FIGURA 8 - A).

5.3.2 Epitélio adjacente ao tumor

No epitélio adjacente dos CCELI a expressão da proteína Ki-67 foi observada nas células da camada basal, supra basal e, embora em menores proporções, também nas células da camada superficial do epitélio adjacente, que variou entre 1% e 70%, obtendo média de 26,5% (GRÁFICO 1, FIGURA 6 - B).

A imunoexpressão da proteína p27 foi verificada no epitélio adjacente aos CCELI em todos os casos analisados, com maior prevalência nas células das camadas mais

superficial, com expressão variando entre 2,4% e 40,4%, com uma média de 19,9% (GRÁFICO 1, FIGURA 7 - B).

Quanto ao epitélio adjacente dos CCELI a imunomarcação da proteína EGFr deu-se principalmente membrana citoplasmática apresentando uma coloração acastanhada que variou em quantidade e intensidade, com o predomínio de intensa marcação, a qual foi identificada em 14 casos (43,9%), seguida de uma marcação fraca em 9 casos (28,1%) e moderada em 8 casos (25%). Foi possível identificar ainda que nesta área adjacente ao tumor houve ausência de marcação em 1 caso (3,1%) (GRÁFICO 2, FIGURA 8 - B).

5.3.3 Cório tumoral e *front* de invasão tumoral

A expressão imuno-histoquímica para a proteína Ki-67 foi verificada nos ninhos e lençóis de células neoplásicas, principalmente naqueles em processos mitóticos no CCELI.

No cório tumoral expressão para Ki-67 variou de 1% e 83,6% das células contadas, apresentando média de 36,7%, enquanto em *front* de invasão tumoral variou entre 1% e 71,4%, sendo verificada uma média de 31,4% (GRÁFICO 1, FIGURA 6 – C e D).

A imunoexpressão da proteína p27 foi observada na periferia de ninhos e lençóis de células tumorais, com uma variação de 2,4% a 63,6% e média de 10,6% em cório tumoral, e no *front* de invasão foi identificado de ausência de marcação até 61,8%, com média de 6,4% (GRÁFICO 1, FIGURA 7 – C e D).

No cório tumoral e em *front* de invasão tumoral a imunoexpressão da proteína EGFr pôde ser verificada em todos os casos com prevalência nos ninhos e cordões de células neoplásicas, principalmente na região central dos tumores. Os achados em cório tumoral revelaram intensa marcação em 14 casos (43,9%), seguida de uma marcação moderada em 10 casos (31,1%) e fraca em 7 casos (21,8%), destacando-se ainda que nesta área do tumor também houve ausência de marcação em 1 caso (3,1%). No *front* de invasão a marcação

intensa foi verificada em 15 casos (46,9%), com marcação moderada identificada em 10 casos (31,1%), fraca em 6 casos (18,8%) e ausência de marcação em 1 caso (3,1%) (GRÁFICO 2, FIGURA 8 – C e D).

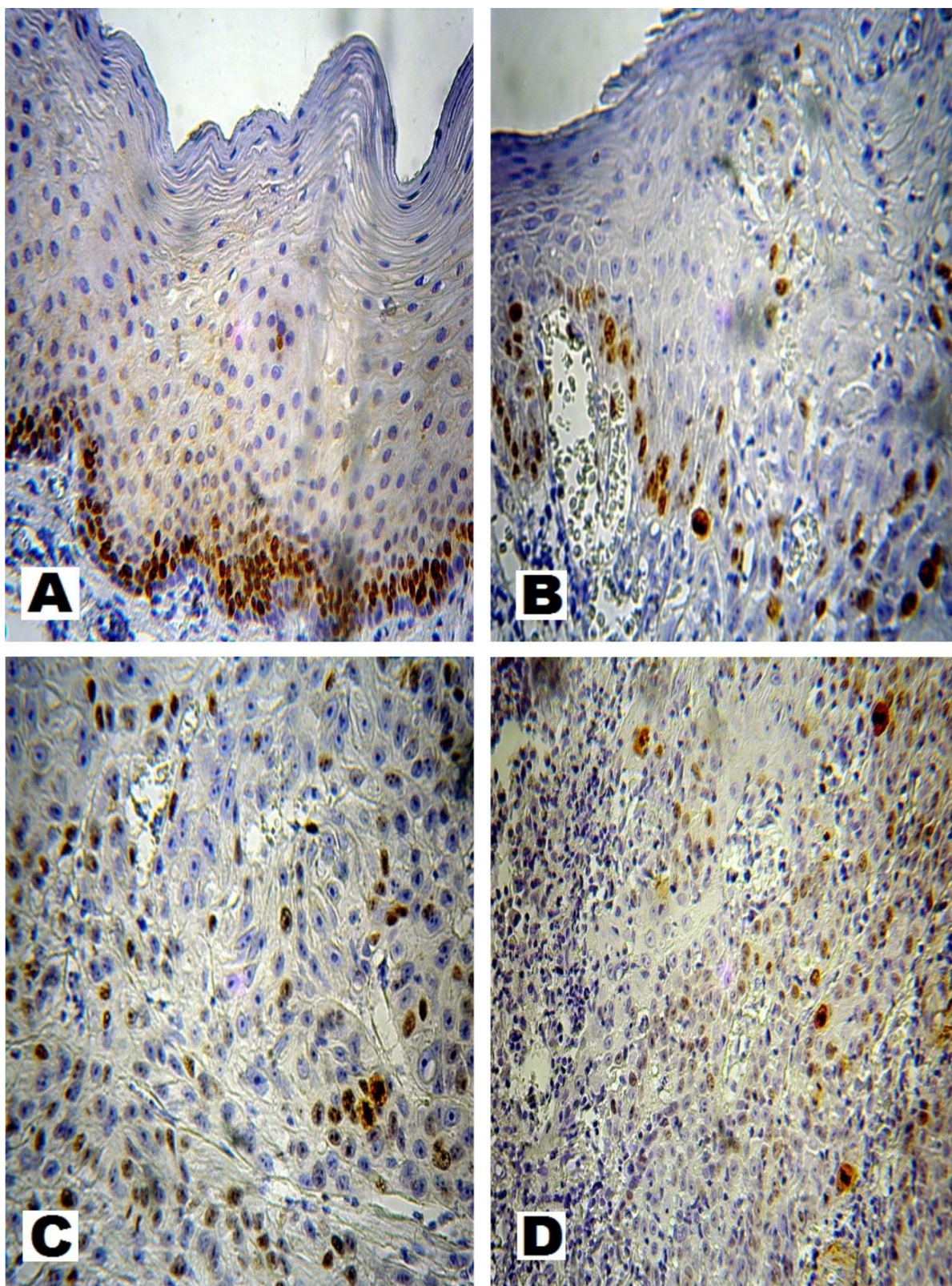


Figura 5. Expressão nuclear para proteína Ki-67 (Microscopia óptica com aumento de 400x– Técnica imunohistoquímica, método estreptoavidina-biotina). A- Tecido epitelial normal. B- Epitélio adjacente a neoplasia. C – Região de cório tumoral. D – Região de *front* de invasão tumoral.