



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
PRÓ-REITORIA DE PÓS-GRADUAÇÃO E PESQUISA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA
MESTRADO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA**

JAMESSON DE MACEDO ANDRADE

**ANÁLISE DA IMUNOEXPRESSÃO DA ATIVINA A, Ki-67 E Bcl-2 E SUA
CORRELAÇÃO COM PARÂMETROS CLÍNICO-MORFOLÓGICOS EM
CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÍNGUA EM PACIENTES
JOVENS E IDOSOS**

CAMPINA GRANDE/ PB

2016

JAMESSON DE MACEDO ANDRADE

**ANÁLISE DA IMUNOEXPRESSÃO DA ATIVINA A, Ki-67 E Bcl-2 E SUA
CORRELAÇÃO COM PARÂMETROS CLÍNICO-MORFOLÓGICOS EM
CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÍNGUA EM PACIENTES
JOVENS E IDOSOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Orientadora: Prof^ª. Dra. Pollianna Muniz Alves

CAMPINA GRANDE/ PB

2016

É expressamente proibida a comercialização deste documento, tanto na 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.

A553a Andrade, Jamesson de Macedo.

Análise da imunexpressão da ativina a, Ki-67 e Bcl-2 e sua correlação com parâmetros clínico-morfológicos em carcinomas de células escamosas de língua em pacientes jovens e idosos [manuscrito] / Jamesson de Macedo Andrade. - 2016.

86 p. : il. color.

Digitado.

Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2016.

"Orientação: Profa. Dra. Pollianna Muniz Alves, Departamento de Odontologia".

1. Carcinoma de células escamosas. 2. Células escamosas de língua. 3. Proliferação celular. 4. Ativina A. 5. Apoptose. I.

Título.

21. ed. CDD 616.992314

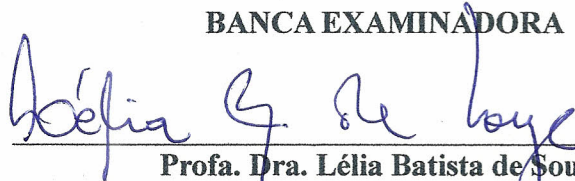
JAMESSON DE MACEDO ANDRADE

**ANÁLISE DA IMUNOEXPRESSÃO DA ATIVINA A, Ki-67 E Bcl-2 E SUA
CORRELAÇÃO COM PARÂMETROS CLÍNICO-MORFOLÓGICOS EM
CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÍNGUA ENTRE PACIENTES
JOVENS E IDOSOS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, como parte dos requisitos para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

DATA DA DEFESA: 27/07/2016

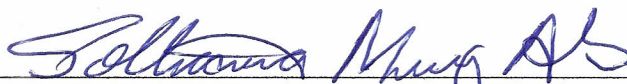
BANCA EXAMINADORA



Prof. Dra. Lélia Batista de Souza
Membro Titular (1ª Examinadora)



Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka
Membro Titular (2º Examinador)



Prof. Dra. Pollianna Muniz Alves/UEPB
Membro Titular (Orientadora)

DEDICATÓRIA

À Deus,

Aos meus pais Fernando e Eunice,

À minha noiva Luana.

AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

*À professora **Dra. Pollianna Muniz Alves**, pela maravilhosa orientação, pela oportunidade que me foi dada de poder conhecer um pouco mais da patologia, pela colaboração, disponibilidade, paciência, e pelos conhecimentos repassados durante todo o desenvolvimento desta pesquisa nesses dois anos de pós-graduação, assim como pelas correções, críticas e sugestões que sempre foram muito relevantes, e me fizeram crescer pessoal e profissionalmente, além da grande amizade formada!*

*Ao professor **Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka**, por toda ajuda, apoio, compreensão, ideias e sugestões que muito contribuíram no desenvolvimento da pesquisa e, por sempre me receber de portas abertas quando precisei.*

*Ao professor **Dr. Yuri Wanderley Cavalcanti**, pelo apoio e ensinamentos de bioestatística e por toda contribuição para o meu crescimento pessoal e acadêmico.*

*À minha noiva **Luana Samara Balduino de Sena**, sei o quanto foi difícil para você estar junto comigo nessa jornada, no entanto, você sempre me incentivou e ajudou com carinho e compreensão nos momentos mais difíceis! Te amo!*

AGRADECIMENTOS

À Deus, que sempre me deu forças para prosseguir nesta caminhada. Sem Ti Deus nada sou. Mas contigo tudo posso, pois o Senhor é quem me fortalece! Obrigado por essa conquista!

*Aos meus pais **Fernando Rafael de Andrade** e **Eunice Maria de Macêdo Andrade**, por me educarem para ser uma pessoa de bem e por serem meu porto seguro, onde sei que posso atracar a qualquer momento. Vocês são minha fortaleza, minha base e tudo o que sou devo a vocês.*

*Aos meus irmãos, **Luís André** e **Ana Cláudia** que sempre me apoiaram com palavras e incentivos ao longo desta caminhada.*

*Às técnicas do laboratório **Ana Luzia** e **Denize**, por toda ajuda, sempre muito solícitas, em todos os momentos dispostas a ajudar, muito obrigado pela disponibilidade, carinho e amizade, a gratidão é o maior princípio do reconhecimento.*

*Aos colegas de turma do mestrado, especialmente os da patologia, **Hellen**, **José Matheus**, **Lívia** vocês são especiais, obrigado por toda convivência e aprendizados juntos. Aos colegas de turma **Matheus Perazzo**, **Naiana**, **Fernanda**, **Carol**, **Jéssica**, **Katharina**, **Hianne** e **Monalisa**, pelos bons momentos vivenciados e por todo conhecimento construído juntos.*

*Aos alunos do doutorado, mestrado e iniciação científica do grupo da patologia oral **Betânia**, **Geisa**, **Fabiana**, **Marayza**, **Luan**, **Rodolfo**, **Paullyana**, **Jéssica**, **Hítalo**, **Vinícius**, **Deyze** e **Diego** por todo apoio e colaboração concedidos.*

*Aos demais **Professores do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba**, por todo conhecimento adquirido e pelas contribuições dadas.*

*Aos **funcionários e técnicos** da Universidade Estadual da Paraíba, em especial a secretária do PPGO – UEPB, **Pâmella** por sempre estar disposta a ajudar e **Dione** que representa um exemplo de esforço e dedicação.*

À Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), por proporcionar uma formação acadêmica com excelência para seus alunos.

À Profa. Dra. Lélia Batista de Souza (PPGPO-UFRN) e ao PPGO-UFG, pela concessão de alguns casos, para que assim, pudéssemos complementar a nossa amostra.

À funcionária Assunção do Hospital da FAP – Campina Grande (PB), por todo auxílio na coleta dos dados dos prontuários dos pacientes.

À Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES), pela concessão da bolsa.

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq), pelo auxílio financeiro através do Edital Universal (485788/2013-6).

A todos que diretamente ou indiretamente contribuíram para a conclusão deste trabalho!

RESUMO

RESUMO

Introdução: O carcinoma de células escamosas oral (CCEO) em indivíduos jovens tem aumentado nos últimos anos, com incidência variando de 1,4% a 13%, e a literatura tem sugerido um comportamento biológico mais agressivo que o CCEO em indivíduos idosos. A imunoe expressão da Ativina A, Ki-67 e Bcl-2 tem sido estudada em vários processos neoplásicos malignos, embora pesquisas comparando a imunoe expressão desses marcadores em CCEO, entre indivíduos jovens e idosos, ainda são escassas. **Objetivos:** avaliar a imunoe expressão da Ativina A, Ki-67 e Bcl-2, em casos de carcinomas de células escamosas de língua (CCEL) entre pacientes jovens e idosos e verificar a associação desta imunoe expressão com os parâmetros clínicos (tamanho do tumor, metástase linfonodal, metástase à distância e estágio clínico) e grau histopatológico de malignidade. **Material e métodos:** A amostra foi composta por 60 casos de CCEL, diagnosticados em dois hospitais de referência em oncologia do estado da Paraíba, Brasil. Considerou-se dois grupos: jovens (≤ 45 anos, $n=30$) e idosos (≥ 60 anos, $n=30$). Os dados clínicos foram obtidos dos prontuários médicos e na análise morfológica utilizou-se o sistema de gradação histopatológico de malignidade (SGHM), proposto por Bryne et al. (1992). A análise imunoistoquímica foi realizada de forma quali-quantitativa para o anticorpo policlonal Ativina A e de forma quantitativa para os anticorpos monoclonais Ki-67 e Bcl-2. Para as análises estatísticas foram utilizados os testes de Qui-quadrado, exato de Fisher, Mann-Whitney e correlação de Spearman ($p < 0,05$). **Resultados:** Em relação aos parâmetros clínicos e morfológicos entre os grupos, houve diferença significativa para o tamanho do tumor ($p=0,024$), em que nos pacientes idosos, o tamanho do tumor foi associado a T1-T2. Embora sem diferença significativa ($p > 0,05$), os pacientes idosos foram predominantemente diagnosticados em estágios clínicos iniciais (I/II) e os pacientes jovens em estágios clínicos mais avançados (III/IV). Em ambos os grupos, o CCEL foi classificado como de alto grau de malignidade ($p > 0,05$). A mediana da Ativina A em CCEL foi de 55 (7,5-112,5) em pacientes jovens e 65 (40,0-90,0) em pacientes idosos ($p=0,428$). Foi observada diferença significativa na imunoe expressão de Ativina A em relação ao estágio clínico (III/IV) em pacientes idosos ($p=0,04$). A mediana da imunoe expressão de Ki-67 em pacientes jovens com CCEL foi de 46,9 (29,9-56,3) e 34,8 (28,0-48,5) em pacientes idosos ($p=0,085$). Foi observada diferença significativa na imunoe expressão de Ki-67 em relação ao grau histopatológico de malignidade em ambos os grupos, onde em pacientes jovens foi associada ao um alto grau ($p=0,039$) e pacientes idosos ao baixo grau ($p=0,047$). A mediana da imunoe expressão de Bcl-2 em CCEL foi 8,85 (3,97-16,62) em pacientes jovens e 13,3 (7,47-25,55) em pacientes idosos ($p=0,049$). Não foi observada diferença significativa, na imunoe expressão de Bcl-2 em relação aos parâmetros clínicos ou morfológicos, em ambos os grupos ($p > 0,05$). Além disso, observou-se correlação positiva entre a imunoe expressão da Ativina A e Bcl-2 em pacientes idosos ($r=0,370$; $p=0,044$). **Conclusões:** Baseado nesses resultados, sugere-se que a diferença no comportamento biológico do CCEL entre jovens e idosos pode estar relacionada a patogenias distintas. Nos pacientes jovens, sugere-se que a patogenia do CCEL esteja associada a um maior índice de proliferação celular, enquanto que nos pacientes idosos, a patogenia do CCEL esteja associada a evasão da apoptose, sendo regulada pela ativina A.

Palavras-chaves: carcinoma de células escamosas, língua, proliferação celular, apoptose, ativina A.

ABSTRACT

ABSTRACT

Introduction: Oral squamous cell carcinoma (OSCC) in young individuals has increased in recent years with incidence ranged of 1.4% to 13.0% and the literature has suggested a more aggressive biological behavior that OSCC in older individuals. Immunoeexpression of Activin A, Ki-67 and Bcl-2 were studied in various malignant neoplasms, although researches comparing the immunoeexpression these markers in OSCC between young and older individuals are scarce. **Objectives:** To evaluate immunoeexpression of activin A, Ki-67 and Bcl-2 in cases of tongue squamous cell carcinoma (TSCC) between young and older patients and verify the association of this immunoeexpression with clinicopathological parameters (tumor size, node metastasis, distant metastasis and clinical stage) and histopathological grade of malignancy. **Material and methods:** The sample was composed for 60 cases of TSCC, diagnosed in two hospitals of reference in oncology in Paraíba state, Brazil. It was considered two groups: 30 cases of young (≤ 45 y) and 30 cases of older (≥ 60 y). Clinical parameters were obtained of medical records. For morphological analysis utilized the histopathological grade of malignancy, proposed by Bryne et al (1992). Immunohistochemical analysis was realized of qualitative manner for polyclonal antibody Activin A and quantitative manner for antibodies Ki-67 and Bcl-2. Statistical analysis utilized Chi-square, Fisher's exact, Mann Whitney and Spearman's Correlation ($P < 0.05$). **Results:** In regarding to clinical and morphological parameters between groups, there was significant difference to tumor size ($P = 0.024$). In older patients, tumor size was associated to T1-T2. Although without significant difference ($P > 0.05$) the older patients were predominantly diagnosed in earlier clinical stage (I/II) and young patients in later clinical stage (III/IV). In both groups, TSCC were classified as high grade of malignancy ($P > 0.05$). The median of Activin A in TSCC was 55 (range, 7.5 to 112.5) in young patients and 65 (range, 40.0 to 90.0) in older patients ($P = 0.428$). Significant difference in the immunoeexpression of Activin A was observed in relation to clinical state (III/IV) in older patients ($P = 0.04$). The median of immunoeexpression of Ki-67 in TSCC was 46.9 (range, 29.9 to 56.3) in young patients and 34.8 (28.0 to 48.5) in older patients ($P = 0.085$). Significant difference in the immunoeexpression of Ki-67 was observed in relation to histological grade of malignancy in both groups, where in young patients was associated to high grade ($P = 0.039$) and elderly patients was associated to low grade ($P = 0.047$). The median of immunoeexpression of Bcl-2 in TSCC was 8.85 (range, 3.97 to 16.62) in young patients and 13.3 (range, 7.47 to 25.55) in elderly patients ($P = 0.049$). There was no significant difference was observed in immunoeexpression of Bcl-2 in relation to clinical or morphological parameters, in either age groups ($P > 0.05$). In addition, it was observed positive correlation between immunoeexpression of Activin A and Bcl-2 in older patients ($r = 0.370$, $P = 0.044$). **Conclusions:** Based on these results, it is suggested that the difference in biological behavior of TSCC between young and old may be related to different pathogenesis. In young patients, it is suggested that the pathogenesis of TSCC is associated with increased cell proliferation, while in elderly patients, pathogenesis of TSCC is associated evasion of apoptosis, being regulated by activin A.

Key-words: squamous cell carcinoma, tongue, cell proliferation, apoptosis, activin A.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

LISTA DE QUADROS

	Página
Quadro 1. Apresentação das variáveis independentes utilizadas no estudo.....	38
Quadro 2. Apresentação das variáveis dependentes utilizadas no estudo.....	38
Quadro 3. Sistema de gradação histopatológico de malignidade no <i>front</i> de invasão, proposto por Bryne et al. (1992)	39
Quadro 4. Especificidade, clone, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos primários utilizados no estudo.....	40

LISTA DE FIGURAS

	Página
Figura 1. Esquema da via de sinalização da Ativina A (LOOMANS; ANDL, 2015)	26
Figura 2. Esquema representativo das vias da apoptose (CZABOTAR et al. 2014)	30
Figura 1. A) Fotomicrografia exibindo moderada imunopressão citoplasmática da ativina A em CCEL de paciente jovem, em esparsas células neoplásicas (400x). B) Fotomicrografia evidenciando intensa imunopressão citoplasmática da ativina A em CCEL de idoso, nos ninhos tumorais (400x). C) Fotomicrografia mostrando alto índice de positividade do Ki-67 em CCEL de paciente jovem em toda a área de <i>front</i> tumoral (200x). D) Fotomicrografia evidenciando menor índice de positividade do Ki-67 em CCEL de paciente idoso (200x). E) Fotomicrografia exibindo imunopressão do Bcl-2 em CCEL de paciente jovem, mais precisamente em células neoplásicas da periferia dos ninhos tumorais (400x). F) Fotomicrografia evidenciando alto índice de positividade do Bcl-2 em CCEL de paciente idoso (400x)	57

LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

	Página
Tabela 1. Especificidade, clone, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos primários utilizados no estudo.....	51
Tabela 2. Caracterização dos casos de CCEL em pacientes jovens e idosos, de acordo com os parâmetros clínicos: sexo, tamanho do tumor, metástase linfonodal, metástase à distância, estágio clínico e o SGHM proposto por Bryne et al. (1992)	54
Tabela 3. Associação dos casos de CCEL em pacientes jovens e idosos, de acordo com os parâmetros clínicos: sexo, tamanho do tumor, metástase linfonodal, metástase à distância, estágio clínico e o SGHM proposto por Bryne et al. (1992)	55
Tabela 4. Comparação da imunexpressão de Ativina A, Ki-67 e Bcl-2 em casos de CCEL em pacientes jovens (≤ 45 anos) e idosos (≥ 60 anos)	56
Tabela 5. Comparação da imunexpressão de Ativina A em casos de CCEL em pacientes jovens (≤ 45 anos) e idosos (≥ 60 anos) de acordo com o estágio clínico e o SGHM	58
Tabela 6. Comparação da imunexpressão de Ki-67 em casos de CCEL em pacientes jovens (≤ 45 anos) e idosos (≥ 60 anos) de acordo com o estágio clínico e o SGHM	58
Tabela 7. Comparação da imunexpressão de Bcl-2 em casos de CCEL em pacientes jovens (≤ 45 anos) e idosos (≥ 60 anos) de acordo com o estágio clínico e o SGHM	59
Tabela 8. Análise de correlação de Spearman entre as imunexpressões da Ativina A, Ki-67 e Bcl-2, de acordo com os grupos jovens e idosos	60

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACTRI:	Do inglês <i>Type I activin receptor</i> , traduzido como Receptor de ativina tipo I.
ACTRII:	Do inglês <i>Type II activin receptor</i> , traduzido como Receptor de ativina tipo II.
APAF-1	Do inglês <i>Apoptotic peptidase activating factor 1</i> , traduzido como fator de ativação de apoptose 1.
BAD:	Do inglês <i>Bcl-2-associated death promoter</i> , refere-se à proteína BAD.
BAK:	Do inglês <i>Bcl-2 homologous antagonist killer</i> , refere-se à proteína Bak.
BAX:	Do inglês <i>Bcl-2-associated X protein</i> , refere-se à proteína Bax.
Bcl-2:	Do inglês <i>B-cell CLL/ lymphoma 2</i> , refere-se à proteína Bcl-2.
BID:	Do inglês <i>BH3 interacting domain death agonist</i> , refere-se à proteína BID.
BH:	Domínios homólogos de BCL-2.
BSA:	Do inglês <i>Bovine serum albumin</i> , traduzido como Albumina sérica bovina.
CCE:	Carcinoma de células escamosas.
CCEL:	Carcinoma de células escamosas de língua.
CCEO:	Carcinoma de células escamosas oral.
CD44:	Do inglês <i>cluster of differentiation 44</i> , traduzido como grupamento de diferenciação 44.
C-ERB-B2:	Do inglês <i>human epidermal growth factor receptor 2</i> , refere-se à proteína c-ErbB-2.
CGH:	Do inglês <i>Comparative genomic hybridization</i> , traduzido como Hibridização genômica comparativa.
DAB:	Do inglês <i>3,3'-diaminobenzidine</i> , traduzido como 3,3' diaminobenzidina.
EMT:	Do inglês <i>Epithelial-mesenchymal transition</i> , traduzido como Transição epitelial-mesenquimal.
ERK:	Do inglês <i>extracellular-signal regulated kinase</i> , traduzido como quinase regulada por sinal extracelular.
HGF:	Do inglês <i>Hepatocyte growth factor</i> , traduzido como Fator de crescimento de hepatócitos.
HIV:	Do inglês <i>Human Immunodeficiency Virus</i> , traduzido como Vírus da imunodeficiência humana.

HPV:	Do inglês <i>Human papillomavirus</i> , traduzido como Papiloma vírus humano.
HRP:	Do inglês <i>Horseradish peroxidase</i> , traduzido como Peroxidase do rábano.
HSV:	Do inglês <i>Herpes simplex virus</i> , traduzido como Vírus herpes simples.
INHBA:	Do inglês <i>Inhibin-beta A subunit</i> , traduzido como Subunidade beta A de Inibina.
IL-1:	Do inglês <i>Interleukin-1</i> , traduzido como Interleucina – 1.
IL-6:	Do inglês <i>Interleukin-1</i> , traduzido como Interleucina – 6.
Ki-67:	Refere-se ao antígeno celular ou anticorpo imunoistoquímico Ki-67.
LSAB:	Do inglês <i>Labeled streptavidin-biotin</i> , traduzido como Estreptavidina marcada com biotina.
LPS:	Lipopolissacarídeo.
MBs:	Miofibroblastos.
mi-RNA-143:	Refere-se a micro RNA - 143
mi-RNA-145:	Refere-se a micro RNA - 145
MMP:	Do inglês <i>Matrix metalloproteinase</i> , traduzido como Metaloproteinase de matriz.
OMS:	Organização Mundial da Saúde.
PBS:	Do inglês <i>Phosphate-buffer saline</i> , traduzido como Solução salina tamponada com fosfato.
PDGF:	Do inglês <i>Platelet-derived growth factor</i> , traduzido como Fator de crescimento derivado de plaquetas.
PTEN:	Do inglês <i>encoding phosphate and tensin homologue</i> , refere-se a proteína PTEN.
P53:	Do inglês <i>protein 53</i> , refere-se ao gene P53 ou à proteína P53.
RH:	Risco histopatológico.
RNA_m:	Ácido ribonucleico mensageiro.
RT-qPCR:	Do inglês <i>real time quantitative PCR</i> , traduzido como PCR quantitativo em tempo real.
SMAD:	Do inglês <i>small mothers against decapentaplegic</i> , refere-se a proteínas moderadoras do fator do crescimento transformante.
SGHM:	Sistema de gradação histopatológico de malignidade.
SPSS:	Do inglês <i>Statistical package for the Social Sciences</i> , traduzido como Pacote estatístico para as ciências sociais.

TNF-α:	Do inglês <i>Tumor necrosis factor alpha</i> , traduzido como Fator de necrose tumoral alfa.
TGF-β:	Do inglês <i>Transforming growth factor beta</i> , traduzido como Fator de crescimento transformante beta.
TNM:	Tumor Nódulo Metástase.
TRIS:	Tris-hidroximetil-aminometano
UEPB:	Universidade Estadual da Paraíba.
UICC:	Do inglês <i>Union for International Cancer Control</i> , traduzido como União Internacional Contra o Câncer.
α-SMA:	Do inglês <i>α-smooth muscle actin</i> , traduzido como α -actina de músculo liso.

SUMÁRIO

SUMÁRIO

	Páginas
1	CONSIDERAÇÕES INICIAIS 24
2	OBJETIVOS 35
2.1	OBJETIVO GERAL 35
2.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS 35
3	MATERIAL E MÉTODOS 37
3.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS 37
3.2	CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO 37
3.3	POPULAÇÃO 37
3.4	AMOSTRA 38
3.4.1	Critérios de inclusão 38
3.4.2	Critérios de exclusão 38
3.5	VARIÁVEIS DO ESTUDO 38
3.5.1	Variáveis independentes do estudo 39
3.5.2	Variáveis dependentes do estudo 39
3.6	ESTUDO DOS PARÂMETROS CLÍNICOS 40
3.7	ESTUDO MORFOLÓGICO 40
3.8	ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO 41
3.8.1	Método imunoistoquímico 41
3.8.2	Análise imunoistoquímica 43
3.9	ANÁLISE ESTATÍSTICA 44
4	ARTIGO 47
4.1	APRESENTAÇÃO 47
4.2	ARTIGO A SER SUBMETIDO 48
5	CONSIDERAÇÕES FINAIS 71
	REFERÊNCIAS 73
	ANEXOS 83
	APÊNDICES 86

CONSIDERAÇÕES INICIAIS

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS

O Carcinoma de Células Escamosas (CCE) é o tipo mais frequente de neoplasia maligna que afeta a cavidade oral, correspondendo a mais de 90% dos casos de câncer bucal (BEENA et al., 2011; JOHNSON et al., 2011; BRAY, 2013; FRYDRYCH et al., 2014; CHI; DAY; NEVILLE, 2015). Observa-se que está entre os 15 tipos de câncer mais frequentes em todo o mundo, onde estimou-se 325 mil novos casos para o ano de 2015 (IARC, 2014).

Sabe-se que o Carcinoma de Células Escamosas Oral (CCEO) é mais frequente em indivíduos do sexo masculino, na faixa etária entre a quinta e a sétima década de vida, cujos principais fatores de risco estão relacionados ao consumo do fumo e do álcool (GENDEN et al., 2010; SAMAN, 2012; BELCHER et al., 2014; KIMPLE et al., 2014; WATANABE, et al., 2015). No entanto, estudos epidemiológicos têm demonstrado um aumento da incidência do CCEO em pacientes jovens, na faixa etária abaixo de 45 anos, com frequência variando de 1,4 a 13% de todos os casos de CCEO (CONWAY et al., 2006; MULLER et al., 2008; RIBEIRO et al., 2009; MONSJOU et al., 2013; TROELTZSCH et al., 2014; KOMOLMALAI et al., 2015; SUN; FANG; GUO, 2015; SANTOS et al., 2016). Nesta faixa etária, o CCEO tem sido associado a outros fatores etiológicos, principalmente relacionado a herança familiar (HIROTA et al., 2008; DE PAULA et al., 2009) e papiloma vírus humano (HPV) (SIEBERS et al., 2008; MANNARINI et al., 2009; KAMINAGAKURA et al., 2012; GONZÁLEZ-RAMÍREZ et al. 2013; RUSHATAMUKAYANUNT et al., 2014; KNOPF et al., 2015).

Independente da faixa etária, o CCEO desenvolve-se, principalmente, em língua, lábio, assoalho bucal, mucosa, palato, gengiva e região retromolar (RETHMAN et al., 2010), sendo a língua a região anatômica mais acometida (PATEL et al., 2011; UDEABOR et al., 2012; SANTOS et al., 2016) e a qual exibe um pior prognóstico. No que diz respeito ao comportamento biológico do CCEO em pacientes jovens, a literatura aponta que em alguns estudos apresenta-se mais agressivo, quando comparado ao CCEO em pacientes mais velhos (VARGAS et al., 2000; SIRIWARDENA et al., 2007; VERED et al., 2010; SOUDRY et al., 2010; BENEVENUTO et al., 2012), enquanto outros estudos não observaram essa diferença (SASAKI et al., 2005, UDEABOR et al., 2012; FONSECA et al., 2014; SUN; FANG; GUO, 2015).

Com relação ao tratamento de escolha para o CCEO, a literatura aponta a cirurgia, radioterapia e quimioterapia, de forma isolada ou associada, independentemente da faixa

etária (BEENA et al., 2011). Entretanto, há relatos que os jovens tendem a receber tratamentos combinados que não dependem da fase da doença (MORRIS et al., 2010). Na literatura, não há consenso sobre o prognóstico do CCEO em jovens, embora observa-se que nos pacientes mais jovens a doença é mais agressiva, com maior incidência de recorrência local ou regional, com comprometimento de linfonodos após o tratamento, em comparação com pacientes mais velhos (UDEABOR et al., 2012).

Diversos fatores podem influenciar na agressividade dos tumores, incluindo localização anatômica, tamanho do tumor, nível de envolvimento dos tecidos circunvizinhos, presença de metástase no momento do diagnóstico e grau histológico de malignidade (SILVEIRA et al., 2007). Portanto, a padronização de dados que possibilitem a classificação dos tumores, como o sistema de estadiamento clínico TNM, pode auxiliar na predição da evolução clínica da lesão, nortear a conduta terapêutica e estimar a sobrevida do paciente (MARZOUK; SCHOFIELD, 2011).

O TNM baseia-se na extensão anatômica da doença, no intuito de fornecer informações sobre o prognóstico e auxiliar no planejamento do tratamento (CARINCI et al., 1998; SOBIN; WITTEKIND, 2002; SOBIN; GOSPODAROWICZ; WITTEKIND et al., 2009). Suas variáveis significam: T - tamanho do tumor primário, N - metástase em linfonodos regionais e M - metástases à distância; a quantificação destes parâmetros constitui o “estadiamento” o qual varia dos estágios I ao IV (ALLISON; LOCKER; FEINE, 1998; SOBIN; WITTEKIND, 2002; SOBIN; GOSPODAROWICZ; WITTEKIND et al., 2009).

Nos casos de CCEO em pacientes jovens observa-se uma maior número de casos diagnosticados nos estágios mais avançados (III e IV) (RIBEIRO et al., 2009; KAMINAGAKURA et al., 2011). Benevenuto et al. (2012) observaram que houve uma associação estatisticamente significativa do TNM em pacientes jovens quando comparado a pacientes idosos, onde 67% dos CCEO em jovens foram diagnosticados nos estágios III e IV. Essa maior proporção em jovens pode estar relacionada a um diagnóstico tardio, tal como ocorre em pacientes mais velhos, ou pode estar associada a um comportamento biológico mais agressivo relacionado à idade (SOUDRY et al., 2010).

No entanto, alguns estudos não observaram diferenças no estadiamento clínico entre pacientes jovens e mais velhos (UDEABOR et al., 2012), contudo, a existência de casos diagnosticados em estágios iniciais, tratados corretamente, e que, apesar disso, evoluíram rapidamente ao óbito, não condizendo com a indicação clínica do TNM, suscitou a instituição de outros fatores prognósticos para complementar este sistema clínico (LOURENÇO et al.,

2007; COSTA; ARAÚJO JÚNIOR; RAMOS, 2005).

Assim, os sistemas de gradação histológica de malignidade (SGHM) para os CCEO surgiram com o intuito de fornecer conhecimentos adicionais que pudessem explicar o comportamento biológico discrepante de tumores com características clínicas semelhantes (LOURENÇO et al., 2007). Atualmente encontram-se na literatura diversos sistemas de gradação histológica de malignidade para o CCEO, objetivando fornecer subsídios morfológicos para uma interpretação quanto à agressividade tumoral. Segundo Kurokawa et al. (2005), as características histológicas da neoplasia são importantes porque podem refletir a relação imunológica entre o tumor e o hospedeiro.

Bryne et al. (1992) consideraram a área do *front* de invasão para avaliar quatro parâmetros: grau de ceratinização, pleomorfismo nuclear, padrão de invasão e infiltrado inflamatório linfoplasmocitário. Para Bryne (1998), as características morfológicas na área do *front* de invasão do CCEO refletem melhor o prognóstico destes tumores, já que vários eventos moleculares importantes ocorrem nessa região, considerada como a interface do tumor-hospedeiro.

Vários estudos investigam os fatores que podem influenciar o prognóstico e a sobrevida de pacientes portadores de CCEO. Embora variáveis clínicas (sítio anatômico, tamanho do tumor primário e metástase) e morfológicas são utilizadas como indicadores do comportamento biológico e prognóstico do CCEO, estudos destinados a identificar outros indicadores do comportamento biológico desse tumor são conduzidos. Essas investigações incluem a imunoistoquímica e a biologia molecular (ALVES et al., 2011; SOBRAL et al., 2011; BUFALINO et al. 2015).

Neste contexto, a participação de determinados marcadores biológicos em CCEO em pacientes jovens, como Ki-67 (VERED et al., 2010; BENEVENUTO et al., 2012) e Bcl-2 (ATULA et al., 1996) tem sido investigada. Recentemente a expressão da Ativina A, tem sido estudada em CCEO (CHANG et al., 2010; SOBRAL et al., 2011; KELNER et al., 2015), entretanto, especificamente, em carcinoma de células escamosas de língua (CCEL) de pacientes jovens ainda não foi avaliada.

A Ativina A, um membro da superfamília do fator de crescimento transformante β (TGF β), é melhor caracterizada por sua função durante a embriogênese na diferenciação, destino e reprodução do mesoderma celular, enquanto no período pós-natal tem sua expressão reduzida (LOOMANS; ANDL, 2015). A Ativina A é codificada pelo gene *INHBA* e foi demonstrado ser um regulador essencial do desenvolvimento dos órgãos, cicatrização de

feridas e carcinogênese (RISBRIDGER et al., 2001; ANTSIFEROVA et al., 2013). Está associada a eventos importantes na progressão tumoral induzindo angiogênese, modulação das respostas imunológicas, controle do crescimento, diferenciação e morte celular (CHANG et al., 2010; SOBRAL et al., 2011; KELNER et al., 2015).

O mecanismo clássico de ação celular da ativina envolve a ligação a receptores transmembrana, que desencadeiam uma cascata de fosforilação proteica intracelular. Existem dois tipos de receptores de ativina: receptores de ativina tipo I (ActRI) e receptores de ativina tipo II (ActRII). A ligação da ativina se faz com o ActRII, que posteriormente recruta o ActRI e promove sua ativação. O ActRI ativado fosforila uma molécula de transdução da família Smad (Smad 2 ou Smad 3), que então interage com a Smad 4 e este complexo se transloca para o núcleo, onde promove expressão gênica (ATTISANO et al., 2001; ATTISANO; TUEN LEE-HOEFLICH, 2001; BERNARD et al., 2006; CHEN et al., 2006) (FIGURA 1).

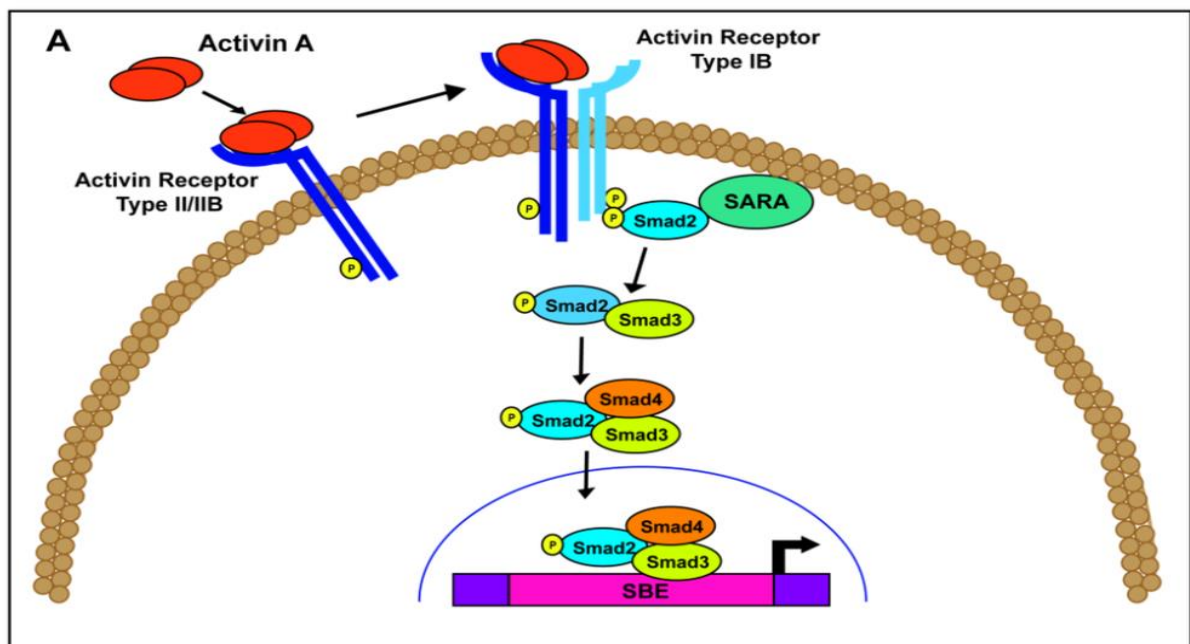


Figura 1. Esquema da via de sinalização da Ativina A (LOOMANS; ANDL, 2015).

Nos últimos anos, uma quantidade significativa de pesquisas analisaram a participação da Ativina A na carcinogênese, a qual pode exibir papéis tanto na supressão quanto na progressão tumoral (LOOMANS; ANDL, 2015). Em carcinoma de próstata (RISBRIDGER et al., 2001; KANG et al., 2009; HOF LAND et al., 2012) e de mama (KATIK et al., 2009; JUNG et al., 2014), tem-se demonstrado o seu efeito supressor tumoral, enquanto que nos

cânceres de pulmão (SEDER et al., 2009), de pâncreas (TOGASHI et al., 2015), carcinoma urotelial de bexiga (LEE et al., 2015) e cabeça e pescoço, a expressão de ativina A está correlacionada com o aumento da proliferação, invasão e pior prognóstico. No entanto, na literatura, observam-se poucos estudos sobre a ativina A na carcinogênese oral (SHIMIZU et al., 2007; YE et al., 2008; CHANG et al., 2010; SOBRAL et al., 2011; KELNER et al., 2015; BUFALINO et al., 2015).

Shimizu et al (2007) demonstraram que a alta expressão do gene *INHBA* estava associada a uma menor sobrevida do paciente e presença de metástase linfonodal regional, sugerindo, que o gene *INHBA* poderia ser utilizado como indicador de prognóstico do CCEO. Ye et al. (2008) comparam o nível de expressão de genes em amostras de 53 casos de CCEL, com 22 casos de amostras normais de e encontraram diferenças significativas na expressão do gene *INHBA*, sugerindo que este pode contribuir para a natureza agressiva desta neoplasia.

Chang et al. (2010) avaliaram a imunexpressão da ativina A em 92 casos de CCEO e observaram uma correlação estatisticamente significativa entre a superexpressão desta proteína, com metástases regionais, pobre diferenciação histológica, invasão perineural e menor sobrevida do paciente. Tais achados sugerem que a ativina A atua na progressão tumoral do CCEO.

Sobral et al. (2011) observaram que a síntese dos Miofibroblastos (MBs) em CCEO foi induzida em grande proporção, através da via de secreção da ativina A, pois nas linhagens celulares de CCEO contendo MBs e ativina A houve um aumento significativo da proliferação celular e volume tumoral. Sugeriram, portanto, que a ativina A é extremamente importante na proliferação dos MBs em linhagens celulares de CCEO e que, conseqüentemente, os MBs no estroma tumoral de CCEO podem estimular a proliferação e invasão, induzindo um tumor mais agressivo. Os MBs tem sido associados a diversos eventos da progressão tumoral como o crescimento, diferenciação, adesão, migração e invasão (LEWIS et al., 2004; DE WEVER et al., 2008).

Kelner et al. (2015) avaliaram a imunomarcagem da ativina A em 110 casos de CCEL e observaram que uma superexpressão desta proteína, estava associada com metástases em linfonodos regionais e menor sobrevida livre de doença. Dessa forma, sugeriram uma possível utilização da ativina A como marcador de metástases linfonodais em casos de CCEL.

Bufalino et al. (2015), em 115 casos de CCEO, observaram que a superexpressão de ativina A foi associada com metástases nos linfonodos regionais ($p=0,02$) e a uma menor sobrevida global do paciente. Evidenciaram, também, uma correlação significativa entre a alta

expressão de ativina A e o grau histopatológico dos tumores ($p=0,03$), visto que aproximadamente 60% dos tumores classificados como pouco diferenciados apresentaram altos níveis de ativina A, sugerindo que a expressão de Ativina A estava relacionada com um pior prognóstico dos pacientes. Através de estudos em linhagens celulares de CCEO tratadas com ativina A, observaram uma diminuição da quantidade de células apoptóticas de maneira dependente da concentração, indução da transição epitelial-mesenquimal (EMT), expressão reduzida de E-caderina e expressões aumentadas de N-caderina e Vimentina. Através da técnica RT-qPCR, verificaram que miR-143 e miR-145, que são reguladores do gene *INHBA*, e o aumento desses resulta em diminuição dos níveis de Ativina A. Sugeriram que a expressão desregulada de Ativina A em CCEO promove ativamente a carcinogênese, pelo controle de fenótipos importantes relacionados com a transformação maligna.

Uma importante via para que ocorra a transformação maligna e o desenvolvimento da carcinogênese oral, é o descontrole da proliferação celular. A proliferação celular é um processo biológico de importância vital para todos os organismos vivos. É definida como o aumento do número de células e está associada a uma progressão ordenada através do ciclo celular, que é governada por complexos de proteínas estimulatórias ou inibitórias exercendo funções reguladoras. Na carcinogênese, esse controle do ciclo celular está completamente comprometido por alterações cromossômicas ou citogenéticas (BANKFALVI; PIFFKO, 2000). Células neoplásicas apresentam características peculiares que permitem sua sobrevivência, como elevados níveis proliferativos responsáveis pela formação de tumor primário bem como de tumores metastáticos (FEITELSON et al., 2015).

Nesse contexto, o antígeno Ki-67 é uma proteína nuclear codificada por gene localizado no cromossomo 10q25 (SUNDOV et al., 2013), que 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). Apresenta função 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).

A imunoexpressão de Ki-67 tem sido associada a um pior prognóstico e sobrevida dos pacientes em CCEO (MOTTA et al., 2009; VERED et al., 2010). No desenvolvimento do CCEO, pode ajudar a compreender o comportamento biológico da doença, permitindo uma

maior precisão na caracterização prognóstica desses tumores (MONTEIRO et al., 2010; GONZÁLEZ-MOLES et al., 2010; DWIVEDI et al., 2013). Além do mais, pode ser usada para prever o status de crescimento e agressividade das lesões potencialmente malignas e dos CCEO, sendo demonstrado que o número de células positivas para o Ki-67, aumenta progressivamente de mucosa normal para displasia epitelial e CCEO (DWIVEDI et al., 2013).

Vered et al (2009) analisaram a imunexpressão do Ki-67, E-caderina e α -actina de músculo liso (α -SMA) em CCEL em pacientes jovens (<60 anos de idade) e observaram associação de abundantes MBs estromais com o sistema de escore de risco (pior padrão de invasão, infiltração linfocítica e invasão perineural) proposto por Brandwein-Gensler et al. (2005), sugerindo assim, um risco aumentado para a recorrência da doença. Benevenuto et al. (2012) analisaram a imunexpressão da proteína Ki-67 em CCEL em pacientes jovens (≤ 40 anos) e mais velhos (> 50 anos) e observaram que nos casos de CCEO de pacientes jovens, houve um aumento no índice de marcação do Ki-67 nos tumores em estádios clínicos avançados e com alto grau de malignidade, enquanto que nos pacientes mais velhos a marcação foi mais observada em tumores em estádios iniciais com alto grau de malignidade. No entanto, sem demonstrar diferença estatisticamente significativa para a proliferação celular. Os autores sugeriram, portanto, que a possível agressividade dos CCEL em pacientes jovens não guarda relação com a atividade proliferativa.

Outra importante via para a carcinogênese é a apoptose, que tem sido estudada em CCEO na tentativa assim, de esclarecer essa possível agressividade relacionada a idade (ATULA et al., 1996; CAMISASCA et al., 2008; GAREWAL; GAREWAL; SIRCAR, 2014; ARYA; SINGH; DANIEL, 2016). A apoptose representa um tipo especial de morte celular onde a própria célula aciona mecanismos que resultam em sua autodestruição. A inibição dessa está associada com o desenvolvimento de neoplasias malignas e autoimunidade, enquanto sua indução excessiva pode acarretar doenças regressivas e imunossupressão (WILLYE, 1991; ADAMS, 2003; CASTANIER; ARNOUIT, 2010).

A regulação da apoptose envolve vários grupos de moléculas, tais como genes da família Bcl-2, o receptor do fator de necrose tumoral (TNF), os genes supressores de tumores, oncogenes, fatores mitocondriais e uma série de caspases. Duas principais vias de apoptose têm sido reconhecidas. Uma via é mediada pela ativação de receptores de morte, como o receptor de TNF, que conduz a ativação de caspase-8 (via extrínseca). A outra via de sinalização de morte é induzida por estresse celular (via intrínseca) e envolve a mitocôndria, a qual libera fatores apoptogênicos, tais como citocromo c. O citocromo c, o trifosfato de

adenosina e o fator de ativação-1 apoptose-protease (Apaf-1) formam um complexo chamado apoptossomo, que desencadeiam a ativação de caspases efetoras e conduzem à indução de apoptose (FIGURA 2) (LORO; VINTERMYR; JOHANNESSEN, 2003; VOGLER, 2014).

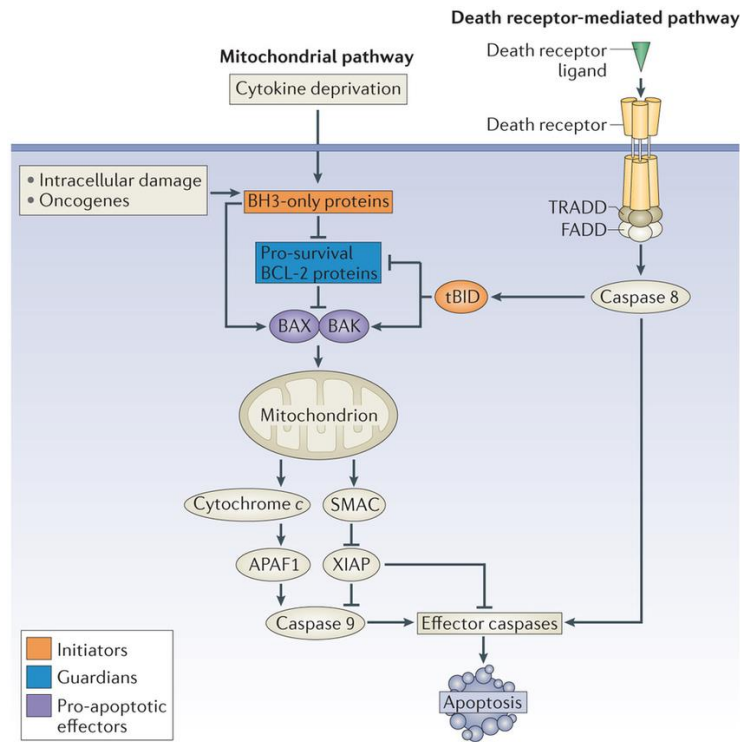


Figura 2: Esquema representativo das vias da apoptose (CZABOTAR et al., 2014).

A família Bcl-2 é constituída por dois grupos: o de proteínas antiapoptóticas e de pró-apoptóticas. Estas proteínas são localizadas na membrana mitocondrial externa, envelope nuclear e retículo endoplasmático das células (KORSMEYER, 1995). As proteínas da família Bcl-2 tem até quatro domínios de homologia (BH) de sequências altamente conservadas, Bcl-2 homólogos 1-4 (BH1-4), que medeiam as interações proteína (YIN; OLTVAI; KORSMEYER, 1994; FARROW; BROWN, 1996; ANTONSSON, 2001). As proteínas antiapoptóticas normalmente contêm todos os quatro domínios BH e também contêm um domínio C-terminal hidrofóbico, que tem-se sugerido ser importante para a localização de membranas intracelulares. Os membros pró-apoptóticos da família Bcl-2 podem ser subdivididos em dois grupos: o que apresenta vários BH (BH1-3), constituídos pelas proteínas Bax e Bak, e o que apresenta somente um BH (BH3), constituído pelas proteínas Bid e Bad (LORO; VINTERMYR; JOHANNESSEN, 2003).

A proteína Bcl-2 representa uma importante molécula com função antiapoptótica e, a desregulação dessa, pode desencadear um mecanismo de evasão da apoptose, resultando na sobrevivência de células neoplásicas, que pode permitir o acúmulo de alterações genéticas e resultar em proliferação celular desregulada (CHEN et al., 2002; THOMAS et al., 2013). Diversos estudos avaliando a expressão do Bcl-2 em CCEO têm sido realizados (ATULA et al., 1996; CAMISASCA et al., 2008; GAREWAL; GAREWAL; SIRCAR, 2014; ARYA; SINGH; DANIEL, 2016) e essa proteína tem sido associada a um pior prognóstico em pacientes com CCEO (TANO et al., 2013).

Atula et al. (1996) analisaram a imunexpressão da Bcl-2, em 34 casos de CCEL de pacientes com idade inferior a 40 anos e não encontraram diferenças estatisticamente significativas, quanto ao padrão de expressão dessa proteína em pacientes idosos. García-Montesinos-Perea, Bernal e Bustillo (2005) avaliaram a imunexpressão de c-erb-B2, p53, Bcl-2, Ki-67 e CD44 em CCE de lábio, e observaram que dentre os marcadores utilizados apenas o Bcl-2 exibiu uma baixa imunexpressão (3,8%; n=3), e essa imunexpressão não estava associada a nenhum dos parâmetros clínico-morfológicos, sugerindo que o Bcl-2 não exibia valor prognóstico para o CCE de lábio.

Através da análise da imunexpressão de PTEN e Bcl-2 em 60 casos de CCEO, Rahmani et al. (2012) observaram uma correlação estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre a alta expressão do Bcl-2 com a diminuição da expressão de PTEN. A superexpressão do Bcl-2 também estava associada aos tumores com pobre diferenciação, comprometimento linfonodal e estágios tardios. Bascones-Martínez et al. (2013) verificaram a imunexpressão de p53, caspase-3, Bcl-2 e Ki-67, em 41 casos de CCEO, bem como no epitélio não neoplásico adjacente ao tumor e, observaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre a alta expressão desses marcadores, apontando que as alterações na expressão e função das principais proteínas de regulação do ciclo celular, operam para criar um estado de hiperproliferação celular, favorecendo assim, a ocorrência de acontecimentos que melhoram a atividade proliferativa e invasiva das células neoplásicas.

Garewal et al. (2014), ao analisarem a expressão de Bcl-2 e Ki-67 em 30 casos de CCEO, observaram que a perda da diferenciação promoveu um aumento significativo para Ki-67 e uma diminuição para Bcl-2 ($p < 0,05$). Diante disso, observaram que houve uma correlação estatisticamente significativa entre Bcl-2 e Ki-67 em CCEO pouco diferenciados. Sugeriram que a apoptose possivelmente desempenha um papel importante nos primeiros estágios da carcinogênese oral.

Nesse contexto, pode-se observar escassez de estudos que demonstram a imunoexpressão da ativina A, Ki-67 e Bcl-2 em CCEL em pacientes jovens, comparando com um grupo de pacientes idosos. Portanto, torna-se de grande valia a realização desta pesquisa com o intuito de averiguar possíveis diferenças no comportamento biológico entre as faixas etárias estudadas.

OBJETIVOS

2 OBJETIVOS

2.1 OBJETIVO GERAL

O presente estudo tem como objetivo principal avaliar a imunomarcção da ativina A, do Ki-67 e Bcl-2 em uma srie de casos de CCEL em pacientes jovens e idosos, correlacionando essa imunomarcção com parâmetros clínicos (tamanho do tumor, metástase linfonodal regional, metástases a distância e estágio clínico) e com SGHM (BRYNE et al., 1992).

2.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Associar os parâmetros clínicos (tamanho do tumor, metástase linfonodal regional, metástases a distância e estágio clínico) e morfológicos (SGHM, segundo a classificação de Bryne et al.,1992) em CCEL em pacientes jovens e idosos;
- Comparar a imunoexpressão da ativina A, do Ki-67 e Bcl-2 com parâmetros clínicos (tamanho do tumor, metástase linfonodal regional, metástases a distância e estágio clínico) e morfológicos (SGHM, segundo a classificação de Bryne et al.,1992) em cada grupo estudado;
- Correlacionar as imunoexpressões da ativina A, do Ki-67 e do Bcl-2 em CCEL em pacientes jovens e idosos.

MATERIAL E MÉTODOS

3 MATERIAL E MÉTODOS

3.1 CONSIDERAÇÕES ÉTICAS

O projeto de pesquisa foi cadastrado na Base de Registros de Pesquisas envolvendo Seres Humanos (Plataforma Brasil) e foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), sob o parecer de número 634.714 (ANEXO A). Este projeto de pesquisa faz parte do Edital Universal do CNPq, referente ao número 485788/2013-6.

3.2 CARACTERIZAÇÃO DO ESTUDO

O estudo consistiu de em uma pesquisa observacional, caracterizada pelo registro e análise quantitativa do Ki-67, Bcl-2 e análise quanti-qualitativa da ativina A, por meio de imunohistoquímica, em uma série de casos de CCEL em pacientes jovens e idosos.

3.3 POPULAÇÃO

A população objeto do presente foi composta por todos os casos de CCEL, diagnosticados e arquivados, nos últimos 13 anos (2002-2015), no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Napoleão Laureano/ João Pessoa – PB e do Hospital Fundação Assistencial da Paraíba (FAP)/Campina Grande – PB, os quais são hospitais de referência em oncologia no estado da Paraíba.

3.4 AMOSTRA

A amostra do estudo foi do tipo não probabilística, por conveniência, constituída por 30 casos de CCEL em pacientes jovens (idade ≤ 45 anos), e 30 casos de CCEL em pacientes idosos (idade ≥ 60 anos), diagnosticados e arquivados nos últimos 13 anos (2002-2015), todos emblocados em parafina, obtidos dos serviços anteriormente citados.

3.4.1 Critérios de Inclusão

Foram incluídos na amostra, apenas os casos de CCEL tratados por excisão cirúrgica, que possibilitassem a avaliação do *front* de invasão tumoral. Bem como, os casos cujas fichas clínicas dos pacientes apresentassem informações relativas à idade, tamanho do tumor, presença de metástase linfonodal, metástase a distância e estadiamento clínico (TNM) das lesões.

3.4.2 Critérios de Exclusão

Foram excluídos da amostra lesões de pacientes submetidos previamente à radioterapia ou quimioterapia. Além disso, foram excluídos da pesquisa os casos que não possuíam quantidades suficientes de material biológico para realização das gradações histológicas de malignidade e do estudo imunohistoquímico.

3.5 VARIÁVEIS DO ESTUDO

3.5.1 Variáveis independentes do estudo

Quadro 1. Apresentação das variáveis independentes utilizadas no estudo.

VARIÁVEL	DEFINIÇÃO	CATEGORIA	TIPO
Faixa etária	Divisão dos grupos em Jovens e Idosos, de acordo com a idade em anos	-Jovens (≤ 45 anos) -Idosos (≥ 60 anos)	Qualitativa nominal
Tamanho do tumor	Tamanho/extensão do tumor primário	T1 T2 T3 T4a ou T4b	Qualitativa ordinal
Metástase linfonodal regional	Metástase em linfonodos regionais	N0 N1 N2 N3	Qualitativa ordinal
Metástase à distância	Presença de metástase à distância	M0 M1	Qualitativa nominal
Estadiamento clínico	Estadiamento clínico categorizado, de acordo com UICC.	- I/II -III/IV	Qualitativa nominal
Grau histopatológico de malignidade	Conjunto de características morfológicas na região de <i>front</i> , segundo o sistema proposto por Bryne et al. (1992).	-Baixo grau de malignidade -Alto grau de malignidade	Qualitativa nominal

3.7.2 Variáveis dependentes do estudo

Quadro 2. Apresentação das variáveis dependentes utilizadas no estudo.

VARIÁVEL	DEFINIÇÃO	CATEGORIA	TIPO
Ativina A	Imunomarcção para ativina A em CCEL em jovens e idosos	-Percentual da intensidade da imunoexpressão citoplasmática de células neoplásicas	Quali-quantitativa
Ki-67	Imunomarcção para Ki-67 em CCEL em jovens e idosos	-Percentual da imunoexpressão nuclear de células neoplásicas	Quantitativa
Bcl-2	Imunomarcção para Bcl-2 em CCEL em jovens e idosos	-Percentual da imunoexpressão citoplasmática de células neoplásicas	Quantitativa

3.6 ESTUDO DOS PARÂMETROS CLÍNICOS

Informações a respeito da idade, tamanho do tumor, presença de metástase linfonodal, metástase a distância e estadiamento clínico (TNM) das lesões, foram coletadas nos prontuários médicos dos pacientes tratados no Hospital Napoleão Laureano/ João Pessoa – PB e no Hospital Fundação Assistencial da Paraíba (FAP)/Campina Grande – PB. Para o estadiamento clínico foram utilizados os parâmetros elencados pela União Internacional Contra o Câncer (UICC) (SOBIN; WITTENKIND, 2002). Todos os dados clínicos foram anotados em ficha clínica previamente elaborada para esta pesquisa (APÊNDICE 1).

3.7 ESTUDO MORFOLÓGICO

A amostra selecionada, fixada em formol a 10% e incluída em parafina, foi submetida a cortes com 5µm de espessura, os quais, por sua vez, foram estendidos em lâminas de vidro e submetidos à coloração de rotina da hematoxilina e eosina. Sob microscopia de luz (Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE), dois examinadores previamente treinados realizaram a análise da gradação histológica de malignidade, de acordo com o sistema proposto por Bryne et al. (1992) (QUADRO 3)

Quadro 3. Sistema de gradação histológica de malignidade no *front* de invasão, proposto por Bryne et al. (1992).

Aspectos morfológicos	Escores de malignidade			
	1	2	3	4
Grau de Ceratinização	Alto (>50% das células)	Moderado (20-50% das células)	Baixo (>5<20% das células)	Ausente (0-5% das células)
Pleomorfismo Nuclear	Pouco (>75% de células maduras)	Moderado (50 a 75% de células maduras)	Intenso (>25<50% de células maduras)	Extremo (0 a 25% de células maduras)
Padrão de Invasão	Bordas Infiltrativas bem delimitadas	Cordões, bandas e/ ou trabéculas sólidas infiltrativas	Pequenos grupos ou cordões de células infiltrativas(n>15)	Infiltração difusa e pronunciada, em pequenos grupos celulares e/ ou células individuais (n<15)
Infiltrado Inflamatório	Intenso	Moderado	Escasso	Ausente

Os escores obtidos em cada um dos parâmetros foram somados, obtendo-se, dessa forma, o escore final de malignidade do caso, conforme Bryne et al. (1992). As lesões que apresentaram escores finais inferior ou igual a 8, foram classificadas como de baixo grau de malignidade. Por sua vez, os tumores com escore final igual ou superior a 9, foram classificados como de alto grau de malignidade (SILVEIRA et al., 2007).

3.8 ESTUDO IMUNOISTOQUÍMICO

3.8.1 Método imunoistoquímico

A amostra selecionada, fixada em formol a 10% e incluída em parafina, foi submetida a cortes com 3µm de espessura, os quais foram estendidos em lâminas de vidro preparadas com adesivo à base de 3-aminopropyltriethoxy-silano (Sigma Aldrich Chemical CO, St Louis, MO, USA). Posteriormente, o material foi submetido ao método da imunoperoxidase pela técnica baseada em polímeros de dextrano (Polymer/HRP) utilizando o anticorpo policlonal ativina A e os anticorpos monoclonais Ki-67 e Bcl-2 (QUADRO 4).

Quadro 4. Especificidade, clone, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos primários utilizados no estudo.

Especificidade	Clone	Fabricante	Diluição	Recuperação Antigênica	Incubação
Ativina A	AF-338	R&D Systems, EUA	1:30	Steamer, EDTA, pH 9,0, 90°C, 60 min	<i>Overnight</i>
Ki-67	MIB-1	Dako, EUA	1:200	Steamer, Citrato, pH 6,0, 90°C, 60 min	<i>Overnight</i>
Bcl-2	124	Dako, EUA	1:150	Steamer, EDTA, pH 9,0, 90°C, 60 min	<i>60 min</i>

Como controle positivo para os anticorpos analisados foram utilizados espécimes de tonsila. O controle negativo consistiu na substituição do anticorpo primário por albumina de soro bovino (BSA) a 1% em solução tampão. A técnica seguiu o protocolo utilizado no Laboratório de Imunoistoquímica do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UEPB, conforme descrito a seguir:

- Desparafinização: 2 banhos em xilol, à temperatura ambiente (10 minutos cada)
- Re-hidratação em cadeia descendente de etanóis:
 - Álcool etílico absoluto I (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto II (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto III (5 minutos);
 - Álcool etílico 95°GL (5 minutos);
 - Álcool etílico 80°GL (5 minutos);
- Remoção de pigmentos formólicos com hidróxido de amônia a 10% em etanol 95°, à temperatura ambiente (10 minutos);
- Lavagem em água corrente (10 minutos);
- Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- Recuperação antigênica (QUADRO 4);
- Lavagem em água corrente (10 minutos);
- Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- Duas incubações dos cortes em solução de peróxido de hidrogênio 3% 10 volumes, em proporção de 1/1, para o bloqueio da peroxidase endógena tecidual (10 minutos cada);
- Lavagem em água corrente (10 minutos);
- Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- Incubação dos cortes com os anticorpos primários, em solução diluente (*Antibody diluent with background reducing components*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA), à temperatura ambiente;
- Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4, à temperatura ambiente (5 minutos cada);
- Incubação com anticorpo secundário (*ADVANCE™ HRP Link*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA), à temperatura ambiente (30 minutos);
- Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4, à temperatura ambiente (5 minutos cada);
- Incubação com anticorpo polimerizado à peroxidase (*ADVANCE™ HRP Enzyme*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA), à temperatura ambiente (30 minutos);
- Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4, à temperatura ambiente (5 minutos cada);

- Revelação da reação com solução cromógena de 3,3-diaminobenzidina (*Liquid DAB+ Substrate*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA) (8 minutos);
- Lavagem em água corrente (10 minutos);
- Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- Contracoloração com hematoxilina de Mayer, à temperatura ambiente (5 minutos);
- Lavagem em água corrente (10 minutos);
- Desidratação em álcool absoluto:
 - Álcool etílico absoluto I (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto II (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto III (5 minutos);
- Três passagens em xilol (2 minutos cada);
- Montagem em resina Permount® (Fisher Scientific Inc., Fair Lawn, NJ, USA).

3.8.2 Análise Imunoistoquímica

Após o processamento dos cortes histológicos e tratamento imunoistoquímico, cada espécime foi analisado à microscopia de luz (Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE), por dois examinadores previamente treinados, sem que houvesse o conhecimento da faixa etária a que pertencia o caso de CCEL avaliado. Ao longo *do front* de invasão tumoral, sob aumento de 100× e de 400×, foram avaliadas as áreas de maior imunorreatividade para Ativina A, Ki-67 e Bcl-2. Foram consideradas imunopositivas para o Ki-67, as células com núcleo acastanhado e para o Bcl-2 e Ativina A, as células com o citoplasma acastanhado.

A análise da imunomarcção da ativina A foi realizada de forma quali-quantitativa, adaptando-se a metodologia utilizada por Chang et al. (2010). Ao longo *do front* de invasão tumoral, sob aumento de 100× e de 400×, foram avaliadas as áreas de maior imunorreatividade a ativina A. Em seguida, foi realizada a análise qualitativa dessa imunomarcção em células neoplásicas, levando-se em consideração um método de escore combinado de intensidade de positividade e o percentual de células imunomarcadas. As intensidades de imunomarcção foram consideradas como: 0-ausente, 1- marcação leve, 2-

marcação moderada e 3-marcação intensa. Para cada um dos escores de intensidade, o percentual de células imunomarcadas foi estimado visualmente. O escore final de cada caso foi calculado por meio da soma das porcentagens de células imunomarcadas, multiplicada pela pontuação estabelecida para cada intensidade de marcação, através da seguinte fórmula: Escore final = (%fraca x 1) + (%moderada x 2) + (%forte x 3)].

A análise da imunomarcação do Ki-67 e Bcl-2 foi realizada de forma quantitativa, baseada na metodologia utilizada no estudo de Benevenuto et al. (2012) e Rahmani et al. (2012), respectivamente. Foram consideradas imunopositivas para Ki-67 as c elulas neopl asicas com núcleo acastanhado, e para o Bcl-2, as c elulas neopl asicas com o citoplasma acastanhado, independentemente da intensidade de colora o.

Ao longo *do front de* invasão tumoral, sob aumento de 100 , foram selecionadas 10 áreas de maior imunorreatividade ao anticorpo estudado. Sob aumento de 400 , cada uma destas áreas foi fotomicrografada (ICC 50HD, Leica Microsystems Vertrieb GmbH) e as imagens obtidas foram transferidas para um computador. Com o auxílio do programa ImageJ  (*Imaging Processing and Analysis in Java*, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA), em cada um dos campos fotomicrografados, foi realizada a contagem das c elulas imunopositivas e das c elulas negativas. De posse do número de c elulas positivas neste montante de 1000 c elulas neopl asicas, foi estabelecido um  ndice de positividade (IP) para o Ki-67 e Bcl-2. Para cada lâmina foi estabelecido o valor total de c elulas imunomarcadas, multiplicando o número de c elulas imunopositivas por 100 e dividindo o resultado pelo número total de c elulas contadas, obtendo-se, assim, valores percentuais.

$$IP = \frac{n^{\circ} \text{ de c els positivas} \times 100}{1000}$$

3.9 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os resultados obtidos foram digitados em planilha eletrônica Excel (Microsoft Office 2013 ) e, posteriormente, exportados para o programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*, versão 17.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Os resultados foram apresentados como média e desvio-padrão ou mediana e intervalo de confiança, conforme

tenha tido uma distribuição normal ou não, respectivamente, verificado pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e Shapiro-Wilk. O teste do Qui-quadrado e exato de Fisher foi utilizado para averiguar prováveis associações entre os grupos estudados (jovens e idosos) em relação ao tamanho do tumor, metástase linfonodal regional, metástases a distância, estadiamento clínico categorizado (I/II e III/IV) e SGHM (Baixo grau de malignidade e Alto grau de malignidade).

O teste de Mann-Whitney foi aplicado para verificar possíveis diferenças na mediana entre os índices de positividade (IP) dos anticorpos estudados com a faixa etária dos pacientes (jovens e idosos), tamanho do tumor, metástase linfonodal regional, metástases a distância, estadiamento clínico categorizado (I/II e III/IV) e SGHM (Baixo grau de malignidade e Alto grau de malignidade). O teste de correlação de Spearman foi utilizado para verificar se existia correlação entre as imunomarcações da Ativina A, Ki-67 e Bcl-2, em cada grupo estudado. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

ARTIGO

4. ARTIGO

4.1 APRESENTAÇÃO

A presente pesquisa foi desenvolvida após apresentação e aprovação em qualificação no Programa de Pós-graduação em Odontologia da UEPB. Como resultado da mesma, um artigo será apresentado nesta dissertação “*Análise comparativa da Ativina A, Ki-67 e Bcl-2 em carcinomas de células escamosas de língua em pacientes jovens e idosos*”.

Após as devidas considerações da banca da defesa desta dissertação, o artigo será colocado nas normas e será enviado para tradução do inglês e posteriormente submetido ao periódico *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology* (ISSN: 1528-395X, Fator de Impacto: 1.262, Qualis Odontologia A2), cujas normas para submissão de trabalhos se encontram no Anexo B.

4.2 ARTIGO A SER SUBMETIDO

ANÁLISE COMPARATIVA DA ATIVINA A, KI-67 E BCL-2 EM CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÍNGUA EM PACIENTES JOVENS E IDOSOS

Jamesson de Macedo Andrade¹, Yuri Wanderley Cavalcanti², Lélia Batista de Souza³, Elismauro Francisco de Mendonça⁴, Gustavo Pina Godoy⁵, Cassiano Francisco Weege Nonaka⁶, Pollianna Muniz Alves⁶

¹ Mestrando do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, UEPB, Campina Grande, Paraíba, Brasil.

² Pós-doutorando do Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, UEPB, Campina Grande, Paraíba, Brasil.

³ Professora Doutora do Programa de Pós-graduação em Patologia Oral da Universidade Federal do Rio Grande do Norte, UFRN, Natal, Rio Grande do Norte, Brasil.

⁴ Professor Doutor do Programa de Pós-graduação em odontologia da Universidade Federal de Goiás, UFG, Goiânia, Goiás, Brasil.

⁵ Professor Doutor do Departamento de Patologia da Universidade Federal de Pernambuco, UFPE, Recife, Pernambuco, Brasil.

⁶ Professores Doutores do Programa de Pós-graduação em odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, UEPB, Campina Grande, Paraíba, Brasil.

Autor correspondente:
Pollianna Muniz Alves
Universidade Estadual da Paraíba
Departamento de odontologia
Rua das Baraúnas, 351
Bairro Universitário
Campina Grande, Paraíba
Brazil. CEP: 58429-500
Telefone: +55 83 33153471
e-mail: pmunizalves@gmail.com

Resumo

Objetivos: avaliar a imunexpressão da Ativina A, Ki-67 e Bcl-2, em casos de carcinoma de células escamosas de língua (CCEL), entre pacientes jovens e idosos e verificar a associação desta imunexpressão com os parâmetros clínicos (tamanho do tumor, metástase linfonodal, metástase à distância, estágio clínico e grau histopatológico de malignidade). **Material e métodos:** A amostra foi composta por 60 casos de CCEL e considerou-se dois grupos: 30 casos de jovens (≤ 45 anos) e 30 casos de idosos (≥ 60 anos). Os parâmetros clínicos foram obtidos dos prontuários médicos. Para análise morfológica utilizou-se grau o histopatológico de malignidade, proposto por Bryne et al. (1992). Para a análise imunoistoquímica foram utilizados os anticorpos Ativina A, Ki-67 e Bcl-2. A análise estatística utilizou os testes de Qui quadrado, exato de Fisher, Mann-Whitney e de correlação de Spearman ($p < 0,05$). **Resultados:** A mediana de Ativina A em CCEL foi de 55 (7,5-112,5) em pacientes jovens e 65 (40,0-90,0) em pacientes idosos ($p = 0,428$). Foi observada diferença significativa na imunexpressão de Ativina A em relação ao estágio clínico (III/IV) em pacientes idosos ($p =$

0,04). A mediana da imunexpressão de Ki-67 em CCEL foi de 46,9 (29,9-56,3) em pacientes jovens e 34,8 (28,0-48,5) em pacientes idosos ($p=0,085$). Foi observada diferença significativa na imunexpressão de Ki-67 em relação ao grau histológico de malignidade em ambos os grupos, onde em pacientes jovens foi associada a um alto grau ($p=0,039$) e os idosos baixo grau ($p=0,047$). A mediana da imunexpressão de Bcl-2 em CCEL foi 8,85 (3,97-16,62) em pacientes jovens e 13,3 (7,47-25,55) em pacientes idosos ($p=0,049$). Não houve diferença significativa na imunexpressão de Bcl-2, em relação aos parâmetros clínicos ou morfológicas, em ambos os grupos ($p > 0,05$). Além disso, observou-se correlação positiva entre a imunexpressão da Ativina A e Bcl-2 em pacientes idosos ($r=0,370$, $p=0,044$). **Conclusão:** Baseado nos resultados, sugere-se que a diferença no comportamento biológico do CCEL entre jovens e idosos pode estar relacionada a patogenias distintas. Nos pacientes jovens, sugere-se que a patogenia do CCEL esteja associada a um maior índice de proliferação celular, enquanto que nos pacientes idosos, a patogenia do CCEL esteja associada a evasão da apoptose, sendo regulada pela ativina A.

Palavras-chave: carcinoma de células escamosas, língua, proliferação celular, apoptose, ativina A

Introdução

O Carcinoma de Células Escamosas Oral (CCEO) é o tipo mais frequente de neoplasia maligna que afeta a cavidade bucal, correspondendo a mais de 90% dos casos de câncer de boca². Observa-se que está entre os 15 tipos de câncer mais frequentes em todo o mundo, onde estimou-se 325 mil novos casos para o ano de 2015³.

O CCEO desenvolve-se mais frequentemente na língua, em homens tabagistas e alcoolistas, na faixa etária entre a quinta e a sétima década de vida^{4,5}. A língua é o sítio anatômico mais acometido e que também exhibe o pior prognóstico^{6,7}. Estudos epidemiológicos recentes têm demonstrado um aumento da incidência do CCEO em pacientes jovens, de idade inferior a 45 anos, com frequência variando de 1,4 a 13% de todos os casos de CCEO⁷⁻⁹. A literatura é controversa no que diz respeito ao comportamento biológico do CCEO nesses indivíduos jovens, onde alguns estudos apontam que se apresentam mais agressivos que nos idosos^{10,11}, enquanto outros estudos não demonstram diferenças^{6,9,12,13}.

Diante disso, a participação de marcadores de proliferação celular como Ki-67^{10,11} e antiapoptóticos como o Bcl-2¹⁴ são investigados, com a finalidade de contribuir para uma melhor compreensão do comportamento biológico do CCEO em pacientes jovens. Recentemente a expressão da Ativina A, tem sido estudada em CCEO¹⁵⁻²⁰, contudo,

especificamente, em carcinoma de células escamosas de língua (CCEL) de pacientes jovens ainda não foi avaliada.

A ativina A está associada a eventos importantes na progressão tumoral induzindo angiogênese, modulação das respostas imunológicas, controle do crescimento, diferenciação e morte celular¹⁷⁻¹⁹. Pode exibir papéis tanto na supressão quanto na progressão tumoral²¹. Em carcinoma de próstata²² e de mama²³, tem-se demonstrado o seu efeito supressor tumoral, enquanto que nos cânceres de pulmão²⁴, de pâncreas²⁵ e cabeça e pescoço¹⁵⁻²⁰, a expressão de ativina A está correlacionada com o pior prognóstico.

O antígeno Ki-67 é um marcador de proliferação celular que é expresso 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^{26,27}. No CCEO sua imunoexpressão tem sido associada a um pior prognóstico, menor sobrevida dos pacientes^{10,28} e pode ajudar a compreender o comportamento biológico da doença, permitindo uma maior precisão na caracterização prognóstica desses tumores²⁹.

A proteína Bcl-2 representa uma importante molécula com função antiapoptótica, e a desregulação dessa, pode desencadear um mecanismo de evasão da apoptose, resultando na sobrevivência de células neoplásicas, acúmulo de alterações genéticas e proliferação celular desregulada³⁰. Em casos de CCEO a imunoexpressão de Bcl-2 tem sido associada a um aumento da capacidade invasiva, pior prognóstico, tumores com pobre diferenciação, comprometimento linfonodal e estágios tardios^{31,32}.

Portanto, esta pesquisa tem o objetivo de comparar através da análise imunoistoquímica da Ativina A, Ki-67 e Bcl-2 em CCEL em pacientes jovens (≤ 45 anos) e idosos (≥ 60 anos), se existem possíveis diferenças no comportamento biológico entre as faixas etárias estudadas.

Material e Métodos

Desenho do estudo

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), sob o parecer de número 634.714. Foram selecionados 60 casos de CCEL, diagnosticados em dois hospitais de referência em oncologia em um estado brasileiro. A amostra foi dividida em dois grupos: 30 casos de CCEL diagnosticados em pacientes jovens

(≤ 45 anos) e 30 casos de CCEL diagnosticados em pacientes idosos (≥ 60 anos). Foram excluídos da amostra, lesões de pacientes submetidos previamente à radioterapia ou quimioterapia, casos que não possuíam quantidades suficientes de material biológico para realização da gradação histológica de malignidade e do estudo imunoistoquímico.

Estudo clínico - morfológico

Informações a respeito da idade, tamanho do tumor, presença de metástase linfonodal regional, metástase à distância e estadiamento clínico (TNM) foram coletadas nos prontuários médicos. Para o estudo morfológico, dois examinadores previamente treinados realizaram a análise da gradação histológica de malignidade, de acordo com o sistema proposto por Bryne et al³³, em que são atribuídos escores de 1 a 4 aos parâmetros: grau de ceratinização, pleomorfismo nuclear, padrão de invasão e infiltrado inflamatório. Os escores obtidos em cada um dos parâmetros foram somados, obtendo-se, dessa forma, o escore final de malignidade do caso. As lesões que apresentaram escores finais abaixo ou igual a 8, foram classificadas como de baixo grau de malignidade e os tumores com escore final igual ou superior a 9, foram classificados como de alto grau de malignidade de acordo com o método adaptado por Silveira et al³⁴.

Método imunoistoquímico

Para o estudo imunoistoquímico, a amostra selecionada, fixada em formol a 10% e incluída em parafina, foi submetida a cortes com 3 μ m de espessura. Em seguida, as amostras teciduais foram desparafinizadas e imersas em peróxido de hidrogênio à 3% para bloqueio da peroxidase endógena. As secções de tecido foram lavadas duas vezes em solução Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4, à temperatura ambiente. Posteriormente, o material foi submetido ao método da imunoperoxidase pela técnica baseada em polímeros de dextrano (Polymer/HRP), utilizando o anticorpo policlonal Ativina A e os anticorpos monoclonais primários Ki-67 e Bcl-2 (TABELA 1).

Em seguida, as amostras teciduais foram incubadas numa câmara úmida com os anticorpos primários. Depois foram lavadas duas vezes em Tween 20 a 1% em TRIS-HCl, pH 7,4, e tratadas com complexo de HRP (AdvanceTM, Dako, Carpinteria, CA, USA), à temperatura ambiente para ligar os anticorpos primários. A revelação da reação foi realizada

com solução cromógena de 3,3-diaminobenzidina (Liquid DAB+ Substrate, Dako, Carpinteria, CA, USA), resultando em um produto de reação castanho. Finalmente, as secções de tecido foram contracoradas com hematoxilina de Mayer e montadas em lâminas de vidro. Como controle positivo para os anticorpos analisados foram utilizados espécimes de tonsila. O controle negativo consistiu na substituição do anticorpo primário por albumina de soro bovino (BSA) a 1% em solução tampão.

Análise imunoistoquímica

As amostras teciduais foram examinadas, sem conhecimento prévio das características clínicas, por dois observadores previamente treinados, à microscopia de luz (Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE). Ao longo *do front* de invasão tumoral, sob aumento de 100× e de 400×, foram avaliadas as áreas de maior imunorreatividade para Ativina A, Ki-67 e Bcl-2. Foram consideradas imunopositivas para o Ki-67, as células com núcleo acastanhado e para o Bcl-2 e Ativina A, as células com o citoplasma acastanhado.

A análise da imunomarcção da ativina A, foi realizada de forma quali-quantitativa, adaptando-se a metodologia utilizada por Chang et al¹⁷. Foi realizada a análise qualitativa dessa imunomarcção em células neoplásicas, levando-se em consideração um método de escore combinado de intensidade de positividade e o percentual de células imunomarcadas. As intensidades de imunomarcção foram consideradas como: 0-ausente, 1-marcação leve, 2-marcação moderada e 3-marcação intensa. Para cada um dos escores de intensidade, o percentual de células imunomarcadas foi estimada visualmente. O escore final (EF) de cada caso foi calculado por meio da soma das porcentagens de células imunomarcadas, multiplicada pela pontuação estabelecida para cada intensidade de marcação, através da seguinte fórmula: $EF = [(\% \text{fraca} \times 1) + (\% \text{moderada} \times 2) + (\% \text{forte} \times 3)]$.

A análise da imunomarcção do Ki-67 e Bcl-2 foi realizada de forma quantitativa, baseada na metodologia utilizada no estudo de Benevenuto et al¹¹ e Rahmani et al³¹, respectivamente. A proliferação celular e a atividade antiapoptótica foram avaliadas através do estabelecimento do índice de positividade (IP) do Ki-67 e do Bcl-2. As amostras teciduais foram examinadas, em um aumento de 100x para identificar áreas com maior número de células imunomarcadas. Usando aumento de 400x, cada uma destas áreas foi fotomicrografada (ICC 50HD, Leica Microsystems Vertrieb GmbH) e as imagens obtidas foram transferidas para um computador. Com o auxílio do programa ImageJ[®] (Imaging

Processing and Analysis in Java, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA), 1000 células neoplásicas foram contadas e o IP foi expresso como a percentagem de células imunomarcadas em relação ao número total de células contadas.

Análise estatística

Os resultados obtidos foram submetidos a análise estatística, utilizando o programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, versão 17.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA). O teste do Qui quadrado e exato de Fisher foram utilizados para averiguar prováveis associações entre os grupos estudados (jovens e idosos) em relação ao tamanho do tumor, metástase linfonodal regional, metástases a distância, estágio clínico (I/II e III/IV) e SGHM (Baixo e Alto). As imunoexpressões da Ativina A, Ki-67 e Bcl-2 entre os grupos, foram avaliadas através dos testes de Mann-Whitney e de Correlação de Spearman. Para todos os testes, os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

Resultados

Dos 60 casos de CCEL avaliados a média de idade para o grupo de pacientes jovens com CCEL (≤ 45 anos) foi de $38,13 \pm 6,16$, enquanto que para o grupo de pacientes idosos com CCEL (≥ 60 anos) foi de $70,87 \pm 6,99$. Para ambos os grupos, o sexo masculino foi o mais acometido (jovens, 73,3%, $n=22$; idosos, 56,7%, $n=17$). De acordo com a classificação TNM, nos jovens foram encontradas maiores frequências de tumores em T1 (33,3%, $n=10$), ao passo que nos idosos, os tamanhos dos tumores mais frequentes foram encontrados em T2 (60%, $n=18$) (TABELA 2).

Nos dois grupos, a maior parte da amostra não teve metástase linfonodal (jovens, 56,7%, $n=17$; idosos, 73,3%, $n=22$) e nem metástase à distância (jovens, 96,7%, $n=29$; idosos, 90,0%, $n=27$). Com relação ao estágio clínico do tumor, no grupo de pacientes jovens, os tumores apresentaram-se mais frequentes nos estágios IV (40,0%, $n=12$), enquanto que para o grupo de pacientes idosos, a maior frequência observada foi no estágio II (43,3%, $n=13$). De acordo com o sistema de gradação histopatológica de malignidade (SGHM), segundo a classificação de Bryne et al³³, para ambos os grupos, as maiores frequências observadas foram dos tumores classificados como de alto grau de malignidade (jovens, 66,7%, $n=20$; idosos,

76,7%, n=23) (Tabela 2).

Com relação a associação dos parâmetros clínicos e morfológicos em CCEL entre jovens e idosos, observou-se associação estatisticamente significativa para o tamanho do tumor ($P=0,024$), em que o grupo dos pacientes idosos foi associado ao tamanho de tumores menores (T1-T2). (Tabela 3). Com relação ao SGHM, não houve associação estatisticamente significativa entre os grupos ($P=0,390$), sendo a maior parte dos tumores classificados como de alto grau de malignidade (TABELA 3).

Em relação a imunopressão dos anticorpos estudados verificou-se que 88,3% (n=53) apresentaram positividade para ativina A, todos os casos (100%, n=60) foram positivos para Ki-67 e 96,7% (n=58) dos casos foram positivos para o Bcl-2. Para a Ativina A, observou-se uma imunomarcção citoplasmática nas células epiteliais dos ninhos tumorais, bem como nas células inflamatórias e nos fibroblastos (Figuras 1A e 1B). Para o Ki-67, a imunomarcção nuclear ocorreu nos ninhos tumorais, tanto nas áreas centrais como na periferia (Figuras 1C e 1D). No Bcl-2 a imunomarcção citoplasmática esteve predominantemente localizada nas células da periferia dos ninhos tumorais (Figuras 1E e 1F).

A comparação da imunopressão da Ativina A e do Ki-67 entre os grupos não apresentou diferenças estatisticamente significativas ($P>0,05$), embora exibiram maiores imunomarcções nos CCEL em jovens que nos idosos (55,0 e 46,9, respectivamente) (Figuras 1A, 1B, 1C e 1D). Entretanto, a comparação da imunopressão do Bcl-2 entre os grupos, revelou diferenças estatisticamente significativas ($P=0,049$), em que os pacientes idosos apresentaram uma maior imunopressão, com IP de 13,3 (7,47-25,35), enquanto que os pacientes jovens exibiram IP de 8,85 (3,97-16,62) (TABELA 4) (FIGURAS 1E e 1F).

No que diz respeito a comparação da imunopressão da Ativina A em relação aos parâmetros clínicos, houve uma maior imunopressão de Ativina A nos estágios clínicos III/IV nos dois grupos estudados (TABELA 5). Entretanto, diferenças estatisticamente significativas foram observadas para o grupo dos pacientes idosos ($P=0,040$) (Tabela 5). Em relação ao SGHM, a comparação entre a imunopressão da Ativina A para os dois grupos, foi maior nos tumores classificados como de baixo grau de malignidade, sem diferenças estatisticamente significativas ($P>0,05$) (TABELA 5).

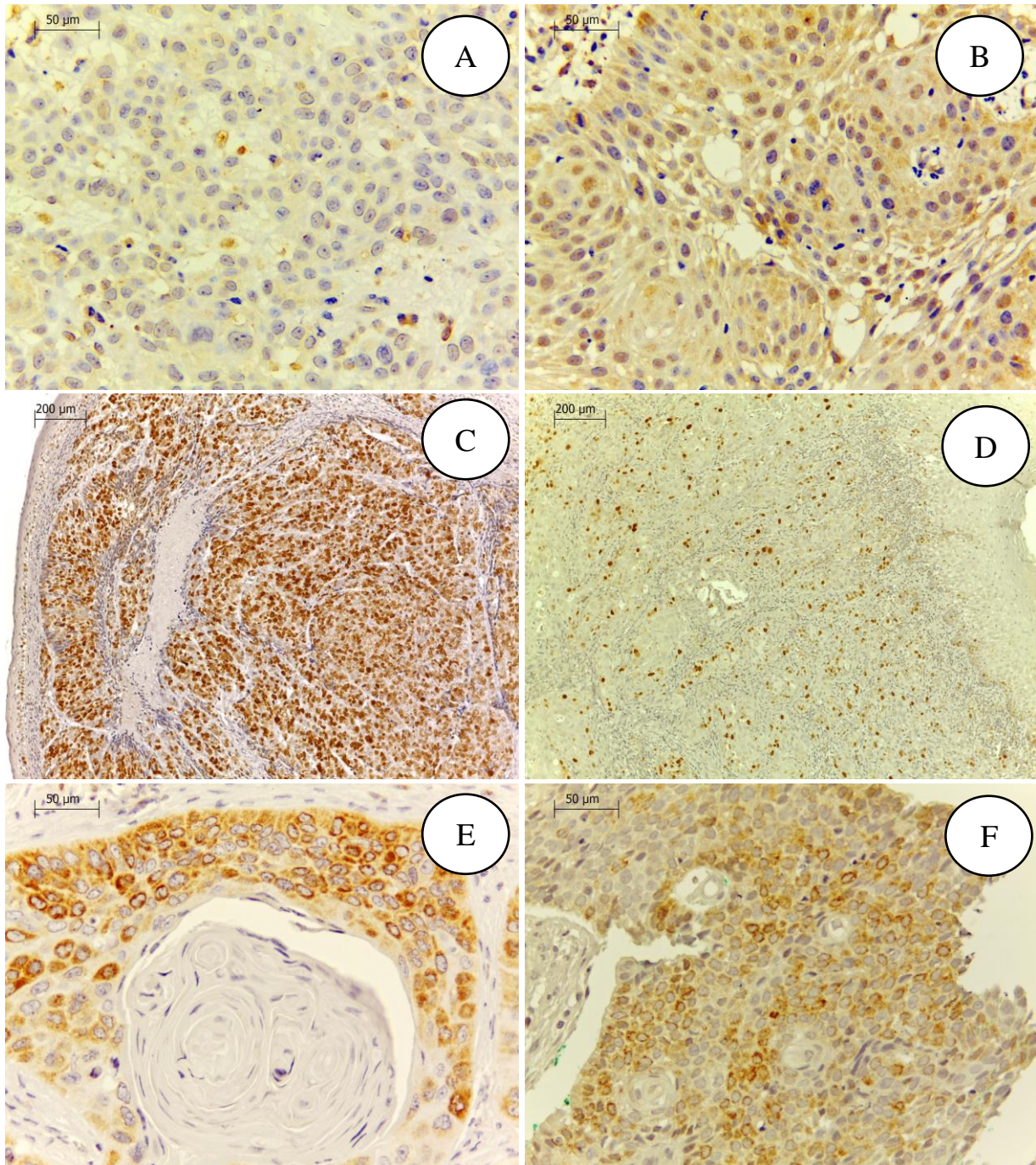


Figura 1. A) Fotomicrografia exibindo moderada imunexpressão citoplasmática da ativina A em CCEL de paciente jovem, em esparsas células neoplásicas (400x). B) Fotomicrografia evidenciando intensa imunexpressão citoplasmática da ativina A em CCEL de idoso, nos ninhos tumorais (400x). C) Fotomicrografia mostrando alto índice de positividade do Ki-67 em CCEL de paciente jovem em toda a área de *front* tumoral (100x). D) Fotomicrografia evidenciando menor índice de positividade do Ki-67 em CCEL de paciente idoso (100x). E) Fotomicrografia exibindo imunexpressão do Bcl-2 em CCEL de paciente jovem, mais precisamente em células neoplásicas da periferia dos ninhos tumorais (400x). F) Fotomicrografia evidenciando alto índice de positividade do Bcl-2 em CCEL de paciente idoso (400x).

No que diz respeito a comparação da imunoposição do Ki-67 com os parâmetros clínicos, pode se observar que não houve diferenças estatisticamente significativas ($p>0,05$), apresentando maior índice de positividade nos estágios clínicos mais avançados (III/IV), nos dois grupos estudados (TABELA 6).

Com relação a avaliação do SGHM, observou-se diferenças estatisticamente significativas da imunomarcção do Ki-67 nos grupos estudados ($P<0,05$), onde, no grupo dos jovens, houve uma maior imunoposição de Ki-67 em tumores classificados como de alto grau de malignidade, ao passo que nos idosos houve uma maior imunoposição do Ki-67 nos tumores classificados como de baixo grau malignidade (Tabela 6).

A comparação da imunoposição do Bcl-2 com o estágio clínico não exibiu diferenças estatisticamente significativas ($P>0,05$). Nos dois grupos estudados houve maior imunoposição do Bcl-2 nos estágios clínicos avançados III/IV [jovens, 8,85 (4,70-16,62); idosos, 13,30 (6,90-58,07)]. A correlação da imunoposição do Bcl-2 com o SGHM também não mostrou diferenças estatisticamente significativas ($P>0,05$), embora nos casos de CCEL em jovens houve maior imunoposição do Bcl-2 nos tumores classificados como de alto grau de malignidade e no grupo dos idosos nos tumores classificados como de baixo grau de malignidade (TABELA 7).

Através do teste de correlação de Spearman, verificou-se que no grupo dos pacientes jovens não houve correlação entre os marcadores analisados, ao passo que no grupo dos pacientes idosos, a imunoposição da Ativina A, apresentou uma correlação positiva ($r=0,370$) com a imunoposição de Bcl-2 ($P=0,044$) (TABELA 8).

Discussão

O CCEO é uma neoplasia maligna que afeta principalmente homens, tabagistas e alcoolistas, entre a quinta e a sexta década de vida. Porém, tem-se observado um aumento da prevalência desta neoplasia, em indivíduos com idade abaixo de 45 anos, conforme os estudos de Santos et al⁷, Ribeiro et al⁸ e Sun, Fang e Guo⁹. Santos et al⁷ observaram que dos 2311 casos de CCEO, 3,3% ($n=76$) corresponderam a pacientes abaixo de 45 anos, sendo 81,2% ($n=62$) acometendo os homens. No presente estudo, observamos que independente da faixa etária os homens foram os mais acometidos, semelhantemente aos estudos de Iamaroon et al³⁵, Sasaki et al¹² e Sun, Fang e Guo⁹. Embora alguns estudos como o de Morris et al³⁶ e Fonseca et al¹³, relataram que o CCEO em pacientes jovens acomete mais as mulheres.

Benevenuto et al¹¹ comentam que essa maior proporção de CCEO em indivíduos jovens pode estar relacionada a outros fatores de risco, além do consumo de tabaco e álcool, principalmente, quando se desenvolvem em mulheres.

Acredita-se que o CCEL em pacientes jovens pode apresentar padrões distintos, onde uma parte exibe curso clínico bastante agressivo com alto índice de mortalidade em curto intervalo de tempo e outra parte exibe curso clínico indolente com sobrevida livre de doença por longo período de vida³⁷. Quanto aos parâmetros clínicos, foi observada diferença estatisticamente significativa apenas para o tamanho do tumor, em que o CCEL no grupo dos idosos foi associada a tamanhos de tumores menores (T1-T2). Diferentemente deste estudo, Shakeel et al³⁸ observaram que nos 29 casos de CCEL em indivíduos jovens (<35 anos de idade), 75,8% (n=22) foram diagnosticados em tamanhos de tumores menores (T1-T2), assim como Sazaki et al¹², que observaram que pacientes mais velhos (> 40 anos de idade) apresentaram um maior número de tumores com tamanhos classificados como T4. Sugere-se que os dados conflitantes podem ser explicados devido à falta de padronização entre as faixas etárias estudadas.

Neste estudo, não foram encontradas diferenças estatisticamente significativas entre os grupos estudados em relação a metástase em linfonodos regionais, metástase à distância e estadiamento clínico. Os resultados encontrados mostram que a maior parte dos casos de CCEL tanto em jovens quanto em idosos, não exibiram metástase linfonodal nem metástase à distância. Esses achados corroboram os resultados encontrados por Kaminagakura et al³⁹, que analisaram 125 casos de CCEO em pacientes jovens (<41 anos) e 250 casos de CCEO em pacientes mais velhos (≥ 50 anos). Em relação ao estágio clínico, os resultados apresentados neste estudo são semelhantes aos encontrados por Shakeel et al³⁸ e Benevenuto et al¹¹, onde a maior parte dos casos de CCEL em jovens foram diagnosticados em estágios clínicos avançados (III/IV). Diferentemente dos resultados aqui encontrados, Mesquita et al⁴⁰ observaram maior frequência de casos de CCEL em jovens em estágios clínicos iniciais (I/II). Estes resultados destacam a ausência de consenso na literatura em relação ao curso clínico e prognóstico do CCEL em jovens.

A avaliação morfológica do CCEO é diferente em várias áreas do tumor, nesse contexto acredita-se que as células presentes no *front* tumoral, têm características moleculares diferentes quando comparadas com as áreas superficiais e, para Bryne et al³³, o *front* tumoral representa a região mais importante do tumor para a determinação do prognóstico dos pacientes. Os resultados encontrados nesta pesquisa, demonstraram não haver diferenças

estatisticamente significativas, entre o CCEL em pacientes jovens e idosos, quando associado ao SGHM proposto por Bryne et al³³, porém houve uma maior frequência em ambos os grupos, de tumores classificados como de alto grau de malignidade, semelhantemente, aos resultados encontrado por Benevenuto et al¹¹ e Mesquita et al⁴⁰. Estes resultados podem estar associados a um pior prognóstico do CCEL, sem, no entanto, inferir associação com comportamento biológico mais agressivo nos diferentes grupos etários.

No que diz respeito a proliferação celular neoplásica do CCEO, alguns estudos¹⁶⁻²⁰ têm demonstrado a participação da Ativina A nesse processo. A ativina A representa um membro da superfamília de proteínas do TGF- β e a sua superexpressão pode desempenhar duas funções, ora como oncogene ora como supressor tumoral, dependendo do tipo de neoplasia^{15,21}. No entanto, até o presente momento (Acesso ao pubmed na data de 03 novembro de 2016), nenhum estudo foi encontrado na literatura avaliando a imunexpressão da ativina A em CCEL em pacientes jovens. Os resultados aqui encontrados, demonstraram não haver diferenças estatisticamente significativas na imunexpressão da ativina A entre os grupos etários estudados, embora nos CCEL dos pacientes idosos, houve uma maior imunexpressão dessa proteína, comparado aos casos de CCEL em pacientes jovens. Chang et al¹⁷ e Kelner et al¹⁹ também encontraram alta imunexpressão da ativina A em CCEO, embora sem levar em consideração a faixa etária dos pacientes.

A comparação da imunexpressão da ativina A com os estágios clínicos e SGHM, mostrou-se estatisticamente significativa com estágios clínicos avançados (III/IV) no grupo dos pacientes idosos. Sugerindo, assim, um possível papel distinto da ativina A na patogenia do CCEL entre jovens e idosos. A literatura aponta que a superexpressão da ativina A em CCEO está associada a metástases linfonodais, pior prognóstico e menor sobrevida dos pacientes^{17,19,20}. Embora sem diferença estatisticamente significativa, a maior imunexpressão da ativina A esteve relacionada aos tumores classificados como baixo grau de malignidade, nos dois grupos etários, diferindo dos resultados encontrados por Bufalino et al²⁰, os quais observaram maior imunexpressão da ativina A em CCEO pobremente diferenciados. Em adição, Sobral et al¹⁸ revelou que a superexpressão da ativina A regula a ação dos miofibroblastos na invasão tumoral do CCEO. Os miofibroblastos são células de fenótipo híbrido, com características de fibroblastos e células musculares lisas, e a presença abundante de miofibroblastos em CCEO pode estar relacionada a um pior prognóstico dos pacientes⁴¹.

Um descontrole da proliferação celular é fundamental para o desenvolvimento das neoplasias malignas e marcadores de proliferação que possam ajudar a compreensão do

comportamento biológico do CCEO em paciente jovens tem sido investigados. Benevenuto et al¹¹, assim como Deyhimi, Torabinia e Torabinia⁴² não observaram diferença na imunexpressão de Ki-67 em casos de CCEO em jovens e idosos, semelhantes aos resultados encontrados no presente estudo.

Com relação aos parâmetros clínicos, para ambos os grupos, os estágios clínicos mais avançados (III/IV) apresentaram uma maior imunexpressão de Ki-67, sem no entanto, apresentar diferenças estatisticamente significativas. Porém, diferenças significativas foram observadas com relação ao SGHM, em que nos pacientes jovens, os tumores classificados como de alto grau de malignidade, exibiram maiores taxas proliferativas. Ao passo que o CCEL em pacientes idosos, apresentou uma maior imunexpressão do Ki-67 em tumores de baixo grau. Diante disso, sugere-se que a proliferação celular em CCEL em pacientes jovens guarda relação com tumores indiferenciados, ao passo que nos idosos a imunexpressão de Ki-67, é maior em tumores bem diferenciados.

Por outro lado, uma falha na apoptose é responsável para a manutenção da sobrevivência de células neoplásicas. A superexpressão do Bcl-2 está relacionada a um pior prognóstico em diversas neoplasias malignas^{43,44}. Neste estudo observamos que a comparação da imunexpressão do Bcl-2 entre os grupos, revelou diferenças estatisticamente significativas ($P=0,049$), em que os casos de CCEL em idosos apresentaram uma maior imunexpressão que nos pacientes jovens. Sugerindo, assim, que nos idosos há uma maior sobrevivência das células neoplásicas. Resultados semelhantes foram observados por Atula et al¹⁴, que dos 34 casos de CCEO em pacientes jovens (<40 anos), aproximadamente 70% apresentaram imunexpressão fraca para Bcl-2.

Rahmani et al³¹ avaliaram 60 casos de CCEO, destes, 31 casos apresentaram positividade para Bcl-2, sendo 47% (n=8) pacientes com idade inferior ou igual 50 anos, e 69,9% (n=23) dos casos, pacientes com idade superior a 50 anos. Entretanto, não observaram diferenças estatisticamente significativas ($p>0,05$), com relação a imunopositividade do Bcl-2 entre os grupos. Observaram ainda, uma imunexpressão significativamente maior de Bcl-2, em tumores em estágios mais avançados e com alto grau de malignidade. Neste estudo, apesar de a comparação da imunexpressão do Bcl-2 em CCEL, com relação aos estágios clínicos e morfológicos não apresentarem diferenças significativas, observamos que tanto nos pacientes jovens como nos idosos houve uma maior imunexpressão do Bcl-2 nos estágios avançados (III/IV). E com relação ao SGHM no grupo dos jovens os tumores classificados como de alto grau de malignidade apresentaram uma maior imunexpressão de Bcl-2, enquanto que no

grupo dos idosos houve uma imunomarcção semelhante entre os tumores classificados como de baixo e alto grau de malignidade.

Garewal, Garewal e Sircar⁴⁵ ao analisarem a expressão de Bcl-2 e Ki-67 em 30 casos de CCEO encontraram, no padrão bem a moderadamente diferenciados, um aumento significativo para Ki-67 e uma diminuição para Bcl-2 ($p < 0,05$). Diante disso, observaram que houve uma correlação negativa estatisticamente significativa entre Bcl-2 e Ki-67 em CCEO tanto em carcinomas bem diferenciados como nos moderadamente e pobremente diferenciados. Sugerindo que a apoptose possivelmente desempenha um papel importante nos primeiros estágios da carcinogênese. Neste estudo, a imunoexpressão do Bcl-2 apresentou correlação positiva com a imunoexpressão da ativina A, nos casos de CCEL em pacientes idosos.

A literatura aponta que a ativina A, como membro da família do TGF- β , dependendo do contexto, pode atuar e cooperar com outras citocinas na regulação da apoptose⁴⁶, de maneira que como apresentado no estudo de Oshima et al⁴⁷, a Ativina A, pode atuar regulando a superexpressão de Bcl-2 e reduzindo a ativação das caspases e, conseqüentemente, a apoptose. Por outro lado, Wang et al⁴⁸ observaram que a Ativina A, induziu a apoptose em linhagens de células A549 (células epiteliais basais de adenocarcinoma humano) e foi acompanhada pelo aumento da regulação de Bax, Bad e Bcl-Xs e sub-regulação de Bcl-2. Além disso, o tratamento com Ativina A aumentou a expressão dos seus receptores tipo II, ativação de ERK e caspase 3 em células A549. Os autores sugeriram que a indução da apoptose pela Ativina A, envolve múltiplas vias celulares/moleculares e que esta participa na regulação de proteínas pró e antiapoptóticas da família Bcl-2 e caspase 3, induzindo o processo apoptótico em células A549.

Baseado nos resultados encontrados, sugere-se que a diferença no comportamento biológico entre o CCEL em pacientes jovens e idosos está relacionada a patogenias distintas. Nos pacientes jovens, sugere-se que a patogenia do CCEL esteja associada a um maior índice de proliferação celular, enquanto que nos pacientes idosos, a patogenia do CCEL esteja associada a evasão da apoptose, sendo regulada pela ativina A.

Referências

1. Frydrych AM, Slack-Smith LM, Parsons R, Threlfall T. Oral cavity squamous cell carcinoma - characteristics and survival in aboriginal and non-aboriginal Western australians. *Open Dent J*. 2014. 29;8:168-74. doi: 10.2174/1874210601408010168.
2. Chi AC, Day TA, Neville BW. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma--an update. *CA Cancer J Clin*. 2015 Sep-Oct;65(5):401-21. doi: 10.3322/caac.21293
3. International Agency for Research on Cancer. World cancer report 2014. Lyon, France: IARC; 2014.
4. Kimple AJ, Welch CM, Zevallos JP, Patel SN. Oral cavity squamous cell carcinoma--an overview. *Oral Health Dent Manag*. 2014 Sep;13(3):877-82.
5. Watanabe N, Ohkubo T, Shimizu M, Tanaka T. Preneoplasia and carcinogenesis of the oral cavity. *Oncol Discov*. 2015; 3(1):1-12.
6. Udeabor SE, Rana M, Wegener G, Gellrich NC, Eckardt AM. Squamous cell carcinoma of the oral cavity and the oropharynx in patients less than 40 years of age: a 20-year analysis. *Head Neck Oncol*. 2012 May 30;4:28. doi: 10.1186/1758-3284-4-28.
7. Santos HB, dos Santos TK, Paz AR, Cavalcanti YW, Nonaka CF, Godoy GP, et al. Clinical findings and risk factors to oral squamous cell carcinoma in young patients: A 12-year retrospective analysis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2016 Mar 1;21(2):e151-6.
8. Ribeiro AC, Silva AR, Simonato LE, Salzedas LM, Sundefeld ML, Soubhia AM. Clinical and histopathological analysis of oral squamous cell carcinoma in young people: a descriptive study in Brazilians. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2009 Mar;47(2):95-8. doi:10.1016/j.bjoms.2008.05.004.
9. Sun Q, Fang Q, Guo S. A comparison of oral squamous cell carcinoma between young and old patients in a single medical center in China. *Int J Clin Exp Med*. 2015 Aug 15;8(8):12418-23.
10. Vered M, Dayan D, Dobriyan A, Yahalom R, Shalmon B, Barshack I, et al. Oral tongue squamous cell carcinoma: recurrent disease is associated with histopathologic risk score and young age. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2010 Jul;136(7):1039-48. doi: 10.1007/s00432-009-0749-3.
11. Benevenuto TG, Nonaka CF, Pinto LP, de Souza LB. Immunohistochemical comparative analysis of cell proliferation and angiogenic index in squamous cell carcinomas of the tongue between young and older patients. *Appl Immunohistochem Mol Morphol*. 2012 May;20(3):291-7. doi: 10.1097/PAI.0b013e31823277f6.
12. Sasaki T, Moles DR, Imai Y, Speight PM. Clinico-pathological features of squamous cell carcinoma of the oral cavity in patients <40 years of age. *J Oral Pathol Med*. 2005 Mar;34(3):129-33.

13. Fonseca FP, Coletta RD, Azevedo MB, Prado Ribeiro AC, Pires Soubhia AM, Miyahara GI, et al. Stromal myofibroblasts in squamous cell carcinoma of the tongue in young patients - a multicenter collaborative study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2014 Oct;118(4):483-9. doi: 10.1016/j.oooo.2014.07.012.
14. Atula S, Grénman R, Laippala P, Syrjänen S. Cancer of the tongue in patients younger than 40 years. A distinct entity. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1996 Dec;122(12):1313-9.
15. Shimizu S, Seki N, Sugimoto T, Horiguchi S, Tanzawa H, Hanazawa T, et al. Identification of molecular targets in head and neck squamous cell carcinomas based on genome-wide gene expression profiling. *Oncol Rep*. 2007 Dec;18(6):1489-97.
16. Ye H, Yu T, Temam S, Ziober BL, Wang J, Schwartz JL, et al. Transcriptomic dissection of tongue squamous cell carcinoma. *BMC Genomics*. 2008 Feb 6;9:69. doi: 10.1186/1471-2164-9-69.
17. Chang KP, Kao HK, Liang Y, Cheng MH, Chang YL, Liu SC, et al. Overexpression of activin A in oral squamous cell carcinoma: association with poor prognosis and tumor progression. *Ann Surg Oncol*. 2010 Jul;17(7):1945-56. doi: 10.1245/s10434-010-0926-2.
18. Sobral LM, Bufalino A, Lopes MA, Graner E, Salo T, Coletta RD. Myofibroblasts in the stroma of oral cancer promote tumorigenesis via secretion of activin A. *Oral Oncol*. 2011 Sep;47(9):840-6. doi: 10.1016/j.oraloncology.2011.06.011.
19. Kelner N, Rodrigues PC, Bufalino A, Fonseca FP, Santos-Silva AR, Miguel MC, et al. Activin A immunoexpression as predictor of occult lymph node metastasis and overall survival in oral tongue squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2015 Apr;37(4):479-86. doi: 10.1002/hed.23627.
20. Bufalino A, Cervigne NK, de Oliveira CE, Fonseca FP, Rodrigues PC, Macedo CC, et al. Low miR-143/miR-145 Cluster Levels Induce Activin A Overexpression in Oral Squamous Cell Carcinomas, Which Contributes to Poor Prognosis. *PLoS One*. 2015 Aug 28;10(8):e0136599. doi: 10.1371/journal.pone.0136599.
21. Loomans HA, Andl CD. Intertwining of Activin A and TGF β Signaling: Dual Roles in Cancer Progression and Cancer Cell Invasion. *Cancers (Basel)*. 2014 Dec 30;7(1):70-91. doi: 10.3390/cancers7010070.
22. Hofland J, van Weerden WM, Steenbergen J, Dits NF, Jenster G, de Jong FH. Activin A stimulates AKR1C3 expression and growth in human prostate cancer. *Endocrinology*. 2012 Dec;153(12):5726-34. doi: 10.1210/en.2011-2065.
23. Jung JW, Shim SY, Lee DK, Kwiatkowski W, Choe S. An Activin A/BMP2 chimera, AB215, blocks estrogen signaling via induction of ID proteins in breast cancer cells. *BMC Cancer*. 2014 Jul 29;14:549. doi: 10.1186/1471-2407-14-549.
24. Seder CW, Hartojo W, Lin L, Silvers AL, Wang Z, Thomas DG, et al. Upregulated INHBA

expression may promote cell proliferation and is associated with poor survival in lung adenocarcinoma. *Neoplasia*. 2009 Apr;11(4):388-96.

25. Togashi Y, Kogita A, Sakamoto H, Hayashi H, Terashima M, de Velasco MA, et al. Activin signal promotes cancer progression and is involved in cachexia in a subset of pancreatic cancer. *Cancer Lett*. 2015 Jan 28;356(2 Pt B):819-27. doi: 10.1016/j.canlet.2014.10.037.

26. Zhu CQ, Shih W, Ling CH, Tsao MS. Immunohistochemical markers of prognosis in non-small cell lung cancer: a review and proposal for a multiphase approach to marker evaluation. *J Clin Pathol*. 2006 Aug;59(8):790-800.

27. Sundov D, Caric A, Mrklic I, Gugic D, Capkun V, Hofman ID, et al. P53, MAPK, topoisomerase II alpha and Ki67 immunohistochemical expression and KRAS/BRAF mutation in ovarian serous carcinomas. *Diagn Pathol*. 2013 Feb 6;8:21. doi: 10.1186/1746-1596-8-21.

28. Motta Rda R, Zettler CG, Cambuzzi E, Jotz GP, Berni RB. Ki-67 and p53 correlation prognostic value in squamous cell carcinomas of the oral cavity and tongue. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2009 Jul-Aug;75(4):544-9.

29. Dwivedi N, Chandra S, Kashyap B, Raj V, Agarwal A. Suprabasal expression of Ki-67 as a marker for the severity of oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *Contemp Clin Dent*. 2013 Jan;4(1):7-12. doi: 10.4103/0976-237X.111586.

30. Thomas S, Quinn BA, Das SK, Dash R, Emdad L, Dasgupta S, et al. Targeting the Bcl-2 family for cancer therapy. *Expert Opin Ther Targets*. 2013 Jan;17(1):61-75. doi: 10.1517/14728222.2013.733001.

31. Rahmani A, Alzohairy M, Babiker AY, Rizvi MA, Elkarimahmad HG. Clinicopathological significance of PTEN and bcl2 expressions in oral squamous cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol*. 2012;5(9):965-71.

32. Bascones-Martínez A, Rodríguez-Gutierrez C, Rodríguez-Gómez E, Gil-Montoya JA, Gómez-Font R, González-Moles MÁ. Evaluation of p53, caspase-3, Bcl-2, and Ki-67 markers in oral squamous cell carcinoma and premalignant epithelium in a sample from Alava Province (Spain). *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2013 Nov 1;18(6):e846-50.

33. Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Kjaerheim A. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. *J Pathol*. 1992 Apr;166(4):375-81.

34. Silveira EJ, Godoy GP, Lins RD, Arruda Mde L, Ramos CC, Freitas Rde A, et al. Correlation of clinical, histological, and cytokeratin profiles of squamous cell carcinoma of the oral tongue with prognosis. *Int J Surg Pathol*. 2007 Oct;15(4):376-83.

35. Iamaroon A, Pattanaporn K, Pongsiriwet S, Wanachantararak S, Prapayasadok S, Jittidecharaks S, et al. Analysis of 587 cases of oral squamous cell carcinoma in northern Thailand with a focus on young people. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2004 Jan;33(1):84-8.

36. Morris LG, Patel SG, Shah JP, Ganly I. Squamous cell carcinoma of the oral tongue in the pediatric age group: a matched-pair analysis of survival. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2010 Jul;136(7):697-701. doi: 10.1001/archoto.2010.94.
37. Popovtzer A, Shpitzer T, Bahar G, et al. Squamous cell carcinoma of the oral tongue in young patients. *Laryngoscope.* 2004;114: 915–917.
38. Shakeel Uz Zaman, Adeel M, Suhail A. Squamous cell carcinoma of oral tongue in young patients - A 10 years tertiary care experience. *J Pak Med Assoc.* 2016 Feb;66(2):155-8.
39. Kaminagakura E, Vartanian JG, da Silva SD, dos Santos CR, Kowalski LP. Case-control study on prognostic factors in oral squamous cell carcinoma in young patients. *Head Neck.* 2010 Nov; 32(11):1460-6. doi: 10.1002/hed.21347.
40. Mesquita JA, Queiroz LM, Silveira ÉJ, Gordon-Nunez MA, Godoy GP, Nonaka CF, Alves PM. Association of immunoexpression of the galectins-3 and -7 with histopathological and clinical parameters in oral squamous cell carcinoma in young patients. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2016 Jan;273(1):237-43. doi: 10.1007/s00405-014-3439-y.
41. Lúcio PS, Cavalcanti AL, Alves PM, Godoy GP, Nonaka CF. Myofibroblasts and their relationship with oral squamous cell carcinoma. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2013 Jan-Feb;79(1):112-8.
42. Deyhimi P, Torabinia N, Torabinia A. A comparative study of histological grade and expression of Ki67 protein in oral squamous cell carcinoma in young and old patients. *Dent Res J (Isfahan).* 2013 Jul;10(4):514-7.
43. Lin Y, Fukuchi J, Hiipakka RA, Kokontis JM, Xiang J. Up-regulation of Bcl-2 is required for the progression of prostate cancer cells from an androgen-dependent to an androgen-independent growth stage. *Cell Res.* 2007 Jun;17(6):531-6.
44. Silvestrini R, Veneroni S, Daidone MG, Benini E, Boracchi P, Mezzetti M, et al. The Bcl-2 protein: a prognostic indicator strongly related to p53 protein in lymph node-negative breast cancer patients. *J Natl Cancer Inst.* 1994 Apr 6;86(7):499-504.
45. Garewal J, Garewal R, Sircar K. Expression of Bcl-2 and MIB-1 Markers in Oral Squamous Cell Carcinoma (OSCC)- A Comparative Study. *J Clin Diagn Res.* 2014 Jul;8(7):QC01-4. doi: 10.7860/JCDR/2014/6474.4562.
46. Schulz R, Vogel T, Dressel R, Krieglstein K. TGF-beta superfamily members, ActivinA and TGF-beta1, induce apoptosis in oligodendrocytes by different pathways. *Cell Tissue Res.* 2008 Dec;334(3):327-38. doi: 10.1007/s00441-008-0714-5.
47. Oshima Y, Ouchi N, Shimano M, Pimentel DR, Papanicolaou KN, Panse KD, Tsuchida K, Lara-Pezzi E, Lee SJ, Walsh K. Activin A and follistatin-like 3 determine the susceptibility of heart to ischemic injury. *Circulation.* 2009 Oct 20;120(16):1606-15. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.109.872200.
48. Wang B, Feng Y, Song X, Liu Q, Ning Y, Ou X, et al. Involvement of ERK, Bcl-2 family

and caspase 3 in recombinant human Activin A-induced apoptosis in A549. *Toxicology*. 2009 Apr 28;258(2-3):176-83. doi: 10.1016/j.tox.2009.01.023.

Tabela 1. Especificidade, clone, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos primários utilizados no estudo.

Especificidade	Clone	Fabricante	Diluição	Recuperação Antigênica	Incubação
Ativina A	AF-338	R&D Systems, EUA	1:30	Steamer, EDTA, pH 9,0, 90°C, 60 min	<i>Overnight</i>
Ki-67	MIB-1	Dako, Carpinteria, CA, USA	1:200	Steamer, Citrato, pH 6,0, 90°C, 60 min	<i>Overnight</i>
Bcl-2	124	Dako, Carpinteria, CA, USA	1:150	Steamer, EDTA, pH 9,0, 90°C, 60 min	<i>60 min</i>

Tabela 2. Caracterização dos casos de CCEL em pacientes jovens e idosos, de acordo com os parâmetros clínicos: sexo, tamanho do tumor, metástase linfonodal, metástase à distância, estágio clínico e o SGHM proposto por Bryne et al³³.

Parâmetros	Grupos	
	Jovens (≤45 anos)	Idosos (≥60 anos)
Sexo		
Masculino	22 (73,3%)	17 (56,7%)
Feminino	8 (26,7%)	13 (43,3%)
Tamanho do tumor		
T1	10 (33,3%)	7 (23,3%)
T2	7 (23,3%)	18 (60,1%)
T3	5 (16,7%)	4 (13,3%)
T4	8 (26,7%)	1 (3,3%)
Metástase linfonodal		
N0	17 (56,7%)	22 (73,3%)
N1	5 (16,7%)	5 (16,7%)
N2	5 (16,7%)	3 (10,0%)
N3	3 (10,0%)	0 (0,0%)
Metástase à distância		
M0	29 (96,7%)	27 (90,0%)
M1	1 (3,3%)	3 (10,0%)
Estágio clínico		
I	9 (30,0%)	7 (23,3%)
II	5 (16,7%)	13 (43,3%)
III	4 (13,3%)	6 (20,0%)
IV	12 (40,0%)	4 (13,3%)
SGHM		
Baixo	10 (33,3%)	7 (23,3%)
Alto	20 (66,7%)	23 (76,7%)
Total	30 (100%)	30 (100%)

Tabela 3. Associação dos casos de CCEL em pacientes jovens e idosos, de acordo com os parâmetros clínicos: sexo, tamanho do tumor, metástase linfonodal, metástase à distância, estágio clínico e o SGHM proposto por Bryne et al³³.

Parâmetros	Grupos		P
	Jovens (≤45 anos)	Idosos (≥60 anos)	
Sexo			
Masculino	22 (73,3%)	17 (56,7%)	0,176 ^a
Feminino	8 (26,7%)	13 (43,3%)	
Tamanho do tumor			
T1-T2	17 (56,7%)	25 (83,3%)	0,024^a
T3-T4	13 (43,3%)	5 (16,7%)	
Metástase linfonodal			
N0	17 (56,7%)	22 (73,3%)	0,176 ^a
N1-N3	13 (43,3%)	8 (26,7%)	
Metástase à distância			
M0	29 (96,7%)	27 (90,0%)	0,612 ^b
M1	1 (3,3%)	3 (10,0%)	
Estágio clínico			
I/II	14 (46,7%)	20 (66,7%)	0,118 ^a
III/IV	16 (53,3%)	10 (33,3%)	
SGHM			
Baixo Grau	10 (33,3%)	7 (23,3%)	0,390 ^a
Alto Grau	20 (66,7%)	23 (76,7%)	
Total	30 (100%)	30 (100%)	

a – Teste Qui quadrado

b – Teste exato de Fisher

Tabela 4: Comparação da imunexpressão de Ativina A, Ki-67 e Bcl-2 em casos de CCEL em pacientes jovens (≤45 anos) e idosos (≥60 anos).

Variável	Grupos	N	Mediana	Q25-Q75	Média dos Ranks	Soma dos Ranks	U	P
Ativina A	Jovens	30	55,0	7,50-112,5	28,72	861,5	396,5	0,428
	Idosos	30	65,0	40,00-90,00	32,28	968,5		
Ki-67	Jovens	30	46,9	29,90-56,35	34,38	1031,5	308,5	0,085
	Idosos	30	34,8	28,00-48,50	26,62	798,5		
Bcl-2	Jovens	30	8,85	3,97-16,62	26,07	782,0	317,0	0,049
	Idosos	30	13,3	7,47-25,55	34,93	1048,0		

Teste de Mann-Whitney

Tabela 5: Comparação da imunexpressão de Ativina A em casos de CCEL em pacientes jovens (≤ 45 anos) e idosos (≥ 60 anos) de acordo com o estágio clínico e o SGHM.

Variável/Parâmetro	Grupos	n	Mediana	Q25-Q75	Média dos Ranks	Soma dos Ranks	U	P
Jovens								
Estágio Clínico	Estágio I/II	12	45,0	0,00-97,50	14,14	170,0	92,00	0,495
	Estágio III/IV	18	60,0	10,00-120,0	16,39	295,0		
SGHM	Baixo	10	75,0	17,50-165,0	18,45	184,5	70,50	0,191
	Alto	20	45,0	0,00-97,50	14,03	280,5		
Idosos								
Estágio Clínico	Estágio I/II	20	50,0	32,50-70,00	13,18	263,5	53,50	0,040
	Estágio III/IV	10	85,0	60,00-97,50	20,15	201,5		
SGHM	Baixo	7	80,0	50,00-160,0	19,29	135,0	54,00	0,192
	Alto	23	60,0	40,00-80,00	14,35	333,0		

Teste de Mann-Whitney

Tabela 6: Comparação da imunexpressão de Ki-67 em casos de CCEL em pacientes jovens (≤ 45 anos) e idosos (≥ 60 anos) de acordo com o estágio clínico e o SGHM.

Variável/Parâmetro	Grupos	n	Mediana	Q25-Q75	Média dos Ranks	Soma dos Ranks	U	P
Jovens								
Estágio Clínico	Estágio I/II	12	38,0	26,67-51,32	12,83	154,0	76,00	0,176
	Estágio III/IV	18	51,0	34,65-63,80	17,28	311,0		
SGHM	Baixo	10	39,1	20,40-49,60	10,80	108,0	53,00	0,039
	Alto	20	52,8	34,55-61,92	17,85	357,0		
Idosos								
Estágio Clínico	Estágio I/II	20	34,8	23,52-47,17	14,80	296,0	86,00	0,538
	Estágio III/IV	10	35,4	28,00-58,10	16,90	169,0		
SGHM	Baixo	7	51,6	32,00-58,80	21,29	149,0	40,00	0,047
	Alto	23	34,4	24,20-41,50	13,74	316,0		

Teste de Mann-Whitney

Tabela 7: Comparação da imunexpressão de Bcl-2 em casos de CCEL em pacientes jovens (≤ 45 anos) e idosos (≥ 60 anos) de acordo com o estágio clínico e o SGHM.

Variável/Parâmetro	Grupos	n	Mediana	Q25-Q75	Média dos Ranks	Soma dos Ranks	U	P
Jovens								
Estágio Clínico	Estágio I/II	12	7,55	0,95-29,02	14,38	172,5	94,50	0,568
	Estágio III/IV	18	8,85	4,70-16,62	16,25	292,5		
SGHM	Baixo	10	4,35	1,05-21,52	12,90	129,0	74,00	0,253
	Alto	20	9,10	5,20-16,27	16,80	336,0		
Idosos								
Estágio Clínico	Estágio I/II	20	13,10	8,30-22,72	15,40	308,0	98,00	0,930
	Estágio III/IV	10	13,30	6,90-58,07	15,70	157,0		
SGHM	Baixo	7	13,90	7,40-24,10	15,71	110,0	79,00	0,941
	Alto	23	13,10	10,30-29,90	15,43	355,0		

Teste de Mann-Whitney

Tabela 8. Análise de correlação de Spearman entre as imunexpressões da Ativina A, Ki-67 e Bcl-2, de acordo com os grupos jovens e idosos.

Variável/Imunexpressão	N	R	P
Jovens			
Ativina A x Ki-67	30	-0,014	0,941
Ativina A x Bcl-2	30	-0,162	0,392
Ki-67 x Bcl-2	30	0,319	0,086
Idosos			
Ativina A x Ki-67	30	0,185	0,327
Ativina A x Bcl-2	30	0,370	0,044
Ki-67 x Bcl-2	30	-0,047	0,805

CONSIDERAÇÕES FINAIS

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- De acordo com os parâmetros clínicos, pode se inferir que os CCEL em idosos foram diagnosticados em estágios mais iniciais do seu desenvolvimento, enquanto que os CCEL nos jovens foram diagnosticados mais tardiamente. Fato este que poderia estar relacionado a maior agressividade dos CCEL em pacientes jovens;
- A associação da maior imunoexpressão da ativina A em estágios clínicos mais avançados em CCEL de pacientes idosos, pode sugerir que a ativina A apresenta participação na progressão tumoral;
- Considerando-se a correlação entre os marcadores nos dois grupos etários, sugere-se que a ativina A pode estar regulando a ação do Bcl-2, exercendo, um papel antiapoptótico nos casos de CCEL nos pacientes idosos. Favorecendo, assim, a uma maior sobrevivência de células neoplásicas em pacientes idosos;
- Através da comparação da imunoexpressão dos marcadores estudados, pode-se sugerir uma patogenia distinta do CCEL em pacientes jovens quando comparado aos idosos, com relação a Ativina A e Bcl-2.

REFERÊNCIAS

REFERÊNCIAS

ALLISON, P. J.; LOCKER, D.; FEINE, J. S. The role of diagnostic delays in the prognosis of oral cancer: a review of the literature. **Oral Oncol.**, v. 34, p. 161-170, 1998.

ALVES, P. M. et al. Significance of galectins-1, -3, -4 and -7 in the progression of squamous cell carcinoma of the tongue. **Pathol. Res. Pract.**, v. 207, p. 236–240, 2011.

ANTONSSON, B. C. Bax and other pro-apoptotic Bcl-2 family ‘killer-proteins’ and their victim the mitochondrion. **Cell Tissue Res.**, v. 306, p. 347–61, 2001.

ANTSIFEROVA, M. et al. Mast cells are dispensable for normal and activin-promoted wound healing and skin carcinogenesis. **J. Immunol.**, v. 191, p. 6147-6155, 2013.

ARYA V; SINGH S; DANIEL M. J. Clinicopathological correlation of Bcl-2 oncoprotein expression in oral precancer and cancer. **J. Oral Biol. Craniofac. Res.**, v. 6, n. 1, p. 18-23, 2016.

ATTISANO, L. et al. The transcriptional role of Smads and FAST (FoxH1) in TGFbeta and activin signalling. **Mol. Cell Endocrinol.**, v. 180, n. 1, p. 3-11, 2001.

ATTISANO, L.; TUEN LEE-HOEFELICH, S. The Smads. **Genome Biol.**, v. 2, n. 8, 2001.

ATULA, S. et al. Cancer of the tongue in patients younger than 40 years: a distinct entity. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, v. 122, p. 1313-1319, 1996.

BANKFALVI, A.; PIFFKO, J. Prognostic and predictive factors in oral cancer: the role of invasive tumour front. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 29, p. 291-298, 2000.

BEENA, V. T. et al. Oral cancer in young non-habitual females: a report of four cases and review of the literature. **Aust. Dent. J.**, v. 56, n. 3, p. 322-327, 2011.

BELCHER, R. et al. Current treatment of head and neck squamous cell cancer. **J. Surg. Oncol.**, v. 110, n. 5, p. 551-574, 2014.

BENEVENUTO, T. G. et al. Immunohistochemical comparative analysis of cell proliferation

and angiogenic index in squamous cell carcinomas of the tongue between young and older patients. **Appl. Immunohistochem. Mol. Morphol.**, v. 20, n. 3, p. 291-297, 2012.

BRANDWEIN-GENSLER, M. et al. Oral squamous cell carcinoma. Histologic risk assessment, but not margin status, is strongly predictive of local disease-free and overall survival. **Am. J. Surg. Pathol.**, v. 29, p. 167–178, 2005.

BRAY, F. et al. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. **Int. J. Cancer**, v. 132, n. 5, p. 1133-1145, 2013.

BROWN, D. C.; GATTER, K. C. Ki67 protein: the immaculate deception. **Histopathology**, v. 40, n. 1, p. 2-11, 2002.

BRYNE, M. et al. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. **J. Pathol.**, v. 166, n. 4, p. 375-81, 1992.

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

BUFALINO A, et al. Low mir-143/mir-145 cluster levels induce activin a overexpression in oral squamous cell carcinomas, which contributes to poor prognosis. **PLoS One**, v. 10, n. 8, 2015.

CAMISASCA, D. R. et al. Expression of Bcl-2 family proteins and associated clinicopathologic factors predict survival outcome in patients with oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol.**, v. 45, n. 3, p. 225-233, 2009.

CARINCI, F. et al. A compararison between TNM and TANIS stage grouping for predicting prognosis of oral and oropharyngeal cancer. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 56, p. 832-836, 1998.

CHANG, K. P. et al. Overexpression of Activin A in oral squamous cell carcinoma: association with poor prognosis and tumor progression. **Ann. Surg. Oncol.**, v. 17, p. 1945–1956, 2010.

CHEN, Y. G. et al. Activin signaling and its role in regulation of cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis. **Exp. Biol. Med.**, v. 231, n. 5, p. 534-44, 2006.

CHEN, Y. G et al. Regulation of cell proliferation, apoptosis, and carcinogenesis by Activin. **Exp. Biol. Med.**, v. 227, p. 75-87, 2002.

CHI, A. C.; DAY, T. A.; NEVILLE, B. W. Oral cavity and oropharyngeal squamous cell carcinoma--an update. **CA Cancer J. Clin.**, v. 65, n. 5, p. 401-421, 2015.

CONWAY, D. I. et al. Incidence of oral and oropharyngeal cancer in United Kingdom (1990-1999) – recent trends and regional variation. **Oral Oncol.**, n. 42, p. 586–592, 2006.

COSTA, A. L. L. et al. Correlação entre a classificação TNM, gradação histológica e localização anatômica em carcinoma epidermoide oral. **Pesq. Odontol. Bras.**, v. 16, p. 216-220, 2005.

CZABOTAR, P. E. Control of apoptosis by the BCL-2 protein family: implications for physiology and therapy. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.**, v. 15, n. 1, p. 49-63, 2014.

DE PAULA, A. M. et al. Analysis of 724 cases of primary head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) with a focus on young patients and p53 immunolocalization. **Oral Oncol.**, v. 45, n. 9, p. 777-782, 2009.

DE WEVER, O. et al. Stromal myofibroblasts are drivers of invasive cancer growth. **Int. J. Cancer**, v. 123, n. 10, p. 2229-2238, 2008.

DWIVEDI, N. et al. Suprabasal expression of Ki-67 as a marker for the severity of oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma. **Contemp. Clin. Dent.**, v. 4, n. 1, p. 7-12, 2013.

FARROW, S. N.; BROWN, R. New members of the Bcl-2 family and their protein partners. **Curr. Opin. General Dev.**, v. 6, p. 45–49, 1996.

FEITELSON, M. A. et al. Sustained proliferation in cancer: mechanisms and novel therapeutic targets. **Semin. Cancer Biol.**, v. 16, 2015.

FONSECA, F. P. et al. Stromal myofibroblasts in squamous cell carcinoma of the tongue in young patients - a multicenter collaborative study. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol.**, v. 118, n. 4, p. 483-489, 2014.

FRYDRYCH, A. M. et al. Oral cavity squamous cell carcinoma - characteristics and survival

in Aboriginal and Non-Aboriginal Western Australians. **Open Dent. J.**, v. 8, p. 168-174, 2014.

GARCÍA-MONTESINOS-PEREA, B.; VAL-BERNAL, J. F.; SAIZ-BUSTILLO, R. Epidermoid carcinoma of the lip: an immunohistochemical study. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal.**, v. 10, n. 5, p. 454-461, 2005.

GAREWAL, J.; GAREWAL, R.; SIRCAR, K. Expression of Bcl-2 and MIB-1 markers in oral squamous cell carcinoma (OSCC)- a comparative study. **J. Clin. Diagn. Res.**, v. 8, n. 7, p. QC01-4, 2014.

GENDEN, E. M. et al. Contemporary management of cancer of the oral cavity. **Eur. Arch. Otorhinolaryngol.**, v. 267, n. 7, p. 1001-1017, 2010.

GONZÁLEZ-MOLES, M. A. et al. Ki-67 expression in non-tumour epithelium adjacent to oral cancer as risk marker for multiple oral tumours. **Oral Dis.**, v. 16, n. 1, p. 68-75, 2010.

GONZÁLEZ-RAMÍREZ, I. et al. Association between age and high-risk human papilloma virus in Mexican oral cancer patients. **Oral Dis.**, v. 19, n. 8, p. 796-804, 2013.

HIROTA, S. K. et al. Risk factors for oral squamous cell carcinoma in young and older Brazilian patients: A comparative analysis. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal**, v. 13, n. 4, p. 227-31, 2008.

HOFLAND, J. et al. Activin A stimulates AKR1C3 expression and growth in human prostate cancer. **Endocrinology.**, v. 153, n. 12, p. 5726-5734, 2012.

IARC. International Agency for Research on Cancer. **World cancer report 2014**. Lyon, France: IARC; 2014.

JOHNSON, N. W.; JAYASEKARA, P.; AMARASINGHE, A. A. Squamous cell carcinoma and precursor lesions of the oral cavity: epidemiology and aetiology. **Periodontology 2000**, v. 57, n. 1, p. 19-37, 2011.

JUNG, J. W. et al. An Activin A/BMP2 chimera, AB215, blocks estrogen signaling via induction of ID proteins in breast cancer cells. **BMC Cancer**, v. 14, p. 549, 2014.

KAMINAGAKURA, E. et al. CCND1 amplification and protein overexpression in oral squamous cell carcinoma of young patients. **Head Neck**, v. 33, n.10, p.1413- 1419, 2011.

KAMINAGAKURA, E. et al. High-risk human papillomavirus in oral squamous cell carcinoma of young patients. **Int. J. Cancer**, v. 130, n. 8, p. 1726-1732, 2012.

KANG, H. Y. et al. Activin A enhances prostate cancer cell migration through activation of androgen receptor and is overexpressed in metastatic prostate cancer. **J. Bone Miner Res.**, v. 24, p. 1180–1193, 2009.

KATIK, I. et al. Activin inhibits telomerase activity in cancer. **Biochem. Biophys. Res. Commun.**, v. 389, n. 4, p. 668-672, 2009.

KELNER, N. et al. Activin A immunoexpression as predictor of occult lymph node metastasis and overall survival in oral tongue squamous cell carcinoma. **Head Neck.**, v. 37, n. 4, p. 479-486, 2015.

KIMPLE, A. J. et al. Oral cavity squamous cell carcinoma--an overview. **Oral Health Dent. Manag.**, v. 13, n. 3, p. 877-882, 2014.

KNOPF, A. et al. Oncogenes and tumor suppressor genes in squamous cell carcinoma of the tongue in young patients. **Oncotarget.**, v. 6, n. 5, p. 3443-3451, 2015.

KOMOLMALAI, N. et al. Ten-year analysis of oral cancer focusing on young people in northern Thailand. **J. Oral Sci.**, v. 57, n. 4, p. 327-334, 2015.

KORSMEYER, S. J. Regulators of cell death. **Trends Genet.**, v. 11, n. 3, p. 101-105, 1995.

KUROKAWA, H. et al. The relationship of the histologic grade at the deep invasive front and the expression of Ki-67 antigen and p53 protein in oral squamous cell carcinoma. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 34, p. 602-607, 2005.

LEE, H. Y. et al. INHBA overexpression indicates poor prognosis in urothelial carcinoma of urinary bladder and upper tract. **J. Surg. Oncol.**, v. 111, n. 4, p. 414-422, 2015.

LEWIS, M. P. et al. Tumour-derived TGF- β 1 modulates myofibroblast differentiation and promotes HGF/SFdependent invasion of squamous carcinoma cells. **Br. J. Cancer**, v. 90, n. 4, p. 822-32, 2004.

LOOMANS, H. A.; ANDL, C. D. Intertwining of activin a and $\text{tgf}\beta$ signaling: dual roles in

cancer progression and cancer cell invasion. **Cancers**, v. 7, p. 70-91, 2015.

LORO, L. L.; VINTERMYR, O. K.; JOHANNESSEN, A. C. Cell death regulation in oral squamous cell carcinoma: methodological considerations and clinical significance. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 32, n. 3, p. 125-38, 2003.

LOURENÇO, S. Q. C. et al. Histological classifications of oral squamous cell carcinoma: a review of the proposed systems. **Rev. Bras. Cancer.**, v. 53, n. 3, p. 325-333, 2007.

MANNARINI, L. et al. Human Papilloma Virus (HPV) in head and neck region: review of literature. **Acta Otorhinol. Ital.**, v. 29, p. 119-126, 2009.

MARZOUK, O.; SCHOFIELD, J. Review of histopathological and molecular prognostic features in colorectal cancer. **Cancers (Basel)**, v. 3, n. 2, p. 2767-2810, 2011.

MONSJOU, H. S. V. et al. Oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma in young patients: The Netherlands Cancer Institute experience. **Head Neck**, v. 35, p. 94-102, 2013.

MONTEIRO, L. S. et al. EGFR and Ki-67 expression in oral squamous cell carcinoma using tissue microarray technology. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 39, n. 7, p. 571-578, 2010.

MORRIS, L. G. T. et al. Squamous cell carcinoma of the oral tongue in the pediatric age group: a matched-pair analysis of survival. **Arch. Otolaryngol. Head Neck Surg.**, v. 136, n. 7, p. 697-701, 2010.

MOTTA, R. D. R. et al. Ki-67 and p53 correlation prognostic value in squamous cell carcinomas of the oral cavity and tongue. **Braz. J. Otorhinolaryngol.**, v. 75, n. 4, p. 544-549, 2009.

MULLER, S. et al. Changing trends in oral squamous cell carcinoma with particular reference to young patients: 1971-2006. The Emory University experience. **Head Neck Pathol.**, v. 2, p. 60-66, 2008.

PATEL, S. C. et al. Increasing incidence of oral tongue squamous cell carcinoma in young white women, age 18 to 44 years. **J. Clin. Oncol.**, v. 29, n. 11, p. 1488-1494, 2011.

RAHMANI, A. et al. Clinicopathological significance of PTEN and bcl2 expressions in oral squamous cell carcinoma. **Int. J. Clin. Exp. Pathol.**, v. 5, n. 9, p. 965-971, 2012.

RETHMAN, M. P. et al. Evidence-based clinical recommendations regarding screening for oral squamous cell carcinomas. **J. Am. Dent. Assoc.**, v. 141, n. 5, p. 509-520, 2010.

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

RISBRIDGER, G. P. et al. The contribution of inhibins and activins to malignant prostate disease. **Mol. Cell Endocrinol.**, v. 180, p. 149–153, 2001.

RUSHATAMUKAYANUNT, P. et al. Lack of association between high-risk human papillomaviruses and oral squamous cell carcinoma in young Japanese patients. **Asian. Pac. J. Cancer Prev.**, v. 15, n. 10, p. 4135-4141, 2014.

SAMAN, D. M. A review of the epidemiology of oral and pharyngeal carcinoma: update. **Head Neck Oncol.**, v. 13, n. 4, 2012.

SANTOS, H. B. et al. Clinical findings and risk factors to oral squamous cell carcinoma in Young patients: A 12-year retrospective analysis. **Med. Oral Patol. Oral Cir. Bucal**, v. 21, n. 2, p. 151-156, 2016.

SASAKI, T. et al. Clinic-pathological features of squamous cell carcinoma of the oral cavity in patients <40 years of age. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 34, p. 129–133, 2005.

SCHOLZEN, T.; GERDES, J. The Ki – 67 protein: From the know and the unknow. **J. Cell Physiol.**, v. 182, n. 3, p. 311-322, 2000.

SEDER, C. W. et al. Upregulated INHBA expression may promote cell proliferation and is associated with poor survival in lung adenocarcinoma. **Neoplasia**, v. 11, n. 4, p. 388–396, 2009.

SHIMIZU, S. et al. Identification of molecular targets in head and neck squamous cell carcinomas based on genome-wide gene expression profiling. **Oncol. Rep.**, v. 18, n. 6, p. 1489-1497, 2007.

SIEBERS, T. J. et al. No high-risk HPV detected in SCC of the oral tongue in the absolute absence of tobacco and alcohol--a case study of seven patients. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 12, n. 4, p. 185-188, 2008.

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

SIRIWARDENA, B. S. et al. Analysis of histopathological and immunohistochemical differences of oral squamous cell carcinoma in young and old patients in Sri Lanka. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 36, n. 6, p. 357-62, 2007.

SOBIN, L. H.; WITTEKIND, C. **TNM classification of malignant tumors**. International Union against Cancer. 6th ed., New York : Wiley-Liss, 2002. 239p.

SOBIN, L. H.; GOSPODAROWICZ, M. K.; WITTEKIND, C. **TNM classification of malignant tumours**. International Union against Cancer. 7th ed. 2009. Chichester, West Sussex, UK ; Hoboken, NJ : Wiley-Blackwell, 2010. 301p.

SOBRAL, L. M. et al. Myofibroblasts in the stroma of oral cancer promote tumorigenesis via secretion of activin A. **Oral Oncol.**, v. 7, n. 9, p. 840-846, 2011.

SOUDRY, E. et al. Squamous cell carcinoma of the oral tongue in patients younger than 30 years: clinicopathologic features and outcome. **Clin. Otolaryngol.**, v. 35, p. 307-12, 2010.

SUN, Q.; FANG, Q.; GUO, S. A comparison of oral squamous cell carcinoma between young and old patients in a single medical center in China. **Int. J. Clin. Exp. Med.**, v. 8, n. 8, p. 12418-12423, 2015.

SUNDOV, D. et al. P53, MAPK, topoisomerase II alpha and Ki67 immunohistochemical expression and KRAS/BRAF mutation in ovarian serous carcinomas. **Diagn. Pathol.**, v. 8, n. 21, p. 1-9, 2013.

TANO, T. et al. Prognostic impact of expression of Bcl-2 and Bax genes in circulating immune cells derived from patients with head and neck carcinoma. **Neoplasia**, v. 15, n. 3, p. 305-314, 2013.

THOMAS, S. et al. Targeting the Bcl-2 family for cancer therapy. **Expert. Opin. Ther. Targers**, v. 17, n. 1, p. 61-75, 2013.

TOGASHI, Y. et al. Activin signal promotes cancer progression and is involved in cachexia in a subset of pancreatic cancer. **Cancer Lett.**, v. 356, n. 2, p. 819-827, 2015.

TROELTZSCH, M. et al. Clinicopathologic features of oral squamous cell carcinoma: do they vary in different age groups? **J. Oral Maxillofac. Surg.**, v. 72, n. 7, p. 1291-1300, 2014.

TUMULURI, V.; THOMAS, G. A.; FRASER, I. S. Analysis of the Ki-67 antigen at the invasive tumour front of human oral squamous cell carcinoma. **J. Oral Pathol. Med.**, v. 31, n. 10, p. 598-604, 2002.

UDEABOR, S. E. et al. Squamous cell carcinoma of the oral cavity and the oropharynx in patients less than 40 years of age: a 20 -year analysis. **Head Neck Oncol.**, v. 4, n. 48, p. 2-7, 2012.

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

VERED, M. et al. Oral tongue squamous cell carcinoma: recurrent disease is associated with histopathologic risk score and young age. **J. Cancer Res. Clin. Oncol.**, v. 136, n. 7, p. 1039-1048, 2010.

WATANABE, N. et al. Preneoplasia and carcinogenesis of the oral cavity. **Oncol. Discov.**, v. 3, n. 1, 2015.

WU, Y. et al. The proteasome controls the expression of a proliferation-associated nuclear antigen Ki-67. **J. Cell Biochem.**, v. 76, n. 4, p. 596-604, 2000.

YE, H. et al. Transcriptomic dissection of tongue squamous cell carcinoma. **BMC Genomics**, v. 9, n. 69, 2008.

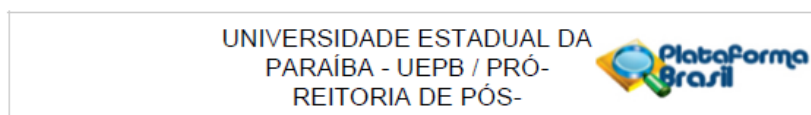
YIN, X. M.; OLTVAI, Z. N.; KORSMEYER, S. J. BH1 and 2 domains of Bcl-2 are required for inhibition of apoptosis and heterodimerization with bax. **Nature**, v. 369, p. 321-323, 1994.

ZHU, C. Q. et al. Immunohistochemical markers of prognosis in non-small lung cancer: a review and proposal for a multiphase approach to marker evaluation. **J. Clin. Pathol.**, v. 59, n. 8, p. 790-800, 2006.

ANEXOS

ANEXOS

ANEXO A – Parecer de aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual da Paraíba.



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

Título da Pesquisa: EXPRESSÃO DA ATIVINA A, MARCADORES DE PROLIFERAÇÃO CELULAR E APOPTOSE EM CÂNCER ORAL EM PACIENTES JOVENS E IDOSOS

Pesquisador: RAYANNE IZABELMACIEL DE SOUSA

Área Temática:

Versão:

CAAE: 30272714.7.0000.5187

Instituição Proponente: Universidade Estadual da Paraíba - UEPB / Pró-Reitoria de Pós-Graduação e

Patrocinador Principal: Universidade Estadual da Paraíba - UEPB / Pró-Reitoria de Pós-Graduação e
Pesqui

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 634.714

Data da Relatoria: 10/09/2014

Número 466 do ano de 2012, do Conselho Nacional de Saúde, do Ministério da Saúde.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

Este Colegiado acata o parecer do relator. Assim sendo, o projeto encontra-se aprovado. Salvo melhor juízo.

ANEXO B – Normas da revista Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology



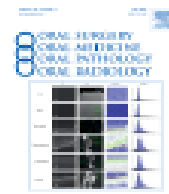
ORAL SURGERY, ORAL MEDICINE, ORAL PATHOLOGY AND ORAL RADIOLOGY

The Official Publication for the American College of Oral and Maxillofacial Surgery, American Academy of Oral and Maxillofacial Radiology, American Academy of Oral Medicine, and the American Academy of Oral and Maxillofacial Pathology

AUTHOR INFORMATION PACK

TABLE OF CONTENTS

•	Description	p.1
•	Impact Factor	p.1
•	Editorial Board	p.1
•	Guide for Authors	p.4



ISSN: 2212-4403

DESCRIPTION

Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology is required reading for anyone in the fields of oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology or advanced general practice dentistry. It is the only major dental journal that provides a practical and complete overview of the medical and surgical techniques of dental practice in four areas. Topics covered include such current issues as dental implants, treatment of HIV-infected patients, and evaluation and treatment of TMJ disorders. The official publication for four societies, the *Journal* is recommended for initial purchase in the Brandon Hill study, Selected List of Books and Journals for the Small Medical Library.

The *Journal* is ranked 43rd of 87 journals by impact factor in the Dentistry, Oral Surgery and Medicine category on the 2014 Journal Citation Reports®, published by Thomson Reuters.

IMPACT FACTOR

2015: 1.262 © Thomson Reuters Journal Citation Reports 2016

EDITORIAL BOARD

EDITOR IN CHIEF

Mark W. Lingen, Chicago, IL

Oral and Maxillofacial Surgery

R. Bryan Bell

Editorial board:

Leon Asaai

Slim Bouchoucha

Thomas B. Dodson

Bruce N. Epker

Rui Fernandes

Kim E. Goldman

Cesar A. Guerrero

Charles D. Hasse

Reha Kianisci

Peter Larsen

APÊNDICES

APÊNDICES- Ficha clínica utilizada para coleta dos dados nos prontuários dos pacientes:

FICHA CLÍNICA

DADOS DO PACIENTE

CONTROLE DE IDENTIFICAÇÃO

Nº FICHA: _____ Nº PRONTUÁRIO: _____ Nº PEÇA: _____

CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS

1. Sexo () Masculino () Feminino
2. Idade ____ anos
3. Raça: () Branco () Amarelo () Pardo () Indígena () Preto
(IBGE, 2010)
4. Ocupação/profissão: _____
5. () Tabagismo () Alcoolismo () Tabagismo e alcoolismo () Não relatado

DADOS DA LESÃO

1. Localização:
2. TNM:
3. Estadiamento da lesão:
0 () Estágio 0
1 () Estágio I
2 () Estágio II
3 () Estágio III
4 () Estágio IV () Estágio IVA () Estágio IVB () Estágio IVC
4. Metástase: () Sim () Não
5. Diagnóstico:
6. Tipo de biópsia: () Incisional () Excisional () Outros procedimentos cirúrgicos