



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
MESTRADO EM ODONTOLOGIA**

**LUAN ÉVERTON GALDINO BARNABÉ**

**ANÁLISE DA IMUNOEXPRESSÃO DA p16 E p53 E SUA RELAÇÃO COM  
PARÂMETROS CLINICOMORFOLÓGICOS EM CARCINOMA DE CÉLULAS  
ESCAMOSAS DE LÍNGUA ORAL EM JOVENS E IDOSOS**

**CAMPINA GRANDE – PB**

**JUNHO/2017**

**LUAN ÉVERTON GALDINO BARNABÉ**

**ANÁLISE DA IMUNOEXPRESSÃO DA p16 E p53 E SUA RELAÇÃO COM  
PARÂMETROS CLINICOMORFOLÓGICOS EM CARCINOMA DE CÉLULAS  
ESCAMOSAS DE LÍNGUA ORAL EM 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: Profª. Drª. Pollianna Muniz Alves**

**CAMPINA GRANDE – PB  
JUNHO/2017**

É expressamente proibido 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 do trabalho.

B259a Barnabé, Luan Éverton Galdino.  
Análise da imunoexpressão da p16 e p53 e sua relação com parâmetros clinicomorfológicos em carcinoma de células escamosas de língua oral em jovens e idosos [manuscrito] / Luan Everton Galdino Barnabé. - 2017.  
97 p. : il. colorido.

Digitado.

Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Estadual da Paraíba, Centro de Ciências Biológicas e da Saúde, 2018.

"Orientação : Prof. Dr. Pollianna Muniz Alves, Departamento de Odontologia - CCBS."

1. Jovem. 2. Idoso. 3. Ciclo celular. 4. Carcinoma de células escamosas oral.

21. ed. CDD 616.994 31

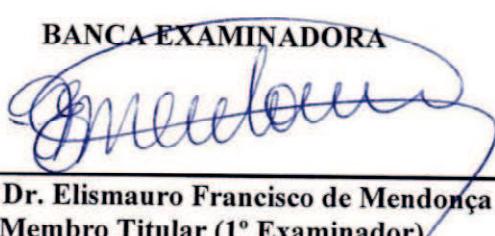
**LUAN ÉVERTON GALDINO BARNABÉ**

**ANÁLISE DA IMUNOEXPRESSÃO DA p16 E p53 E SUA RELAÇÃO COM  
PARÂMETROS CLINICOMORFOLÓGICOS EM CARCINOMA DE CÉLULAS  
ESCAMOSAS DE LÍNGUA ORAL EM 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: 12/06/2017

**BANCA EXAMINADORA**



**Prof. Dr. Elismauro Francisco de Mendonça  
Membro Titular (1º Examinador)**



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



**Prof. Drª. Pollianna Muniz Alves  
Membro Titular (Orientadora)**

## **DEDICATÓRIA**

---

*Dedico este trabalho a todos os  
índividuos acometidos pelo câncer  
de boca, na esperança de colaborar  
de alguma forma para sua  
melhoria.*

## AGRADECIMENTOS

---

A **Deus** e a **Virgem Maria** que em sua infinita bondade permitiram-me chegar até aqui.

Aos Meus pais, **Cicero Galdino de Barros** e **Imelda Barnabé de Barros**, por todos os anos de dedicação, esforço, sofrimento diários em suas longas viagens para trabalhar e carinho infinito em me ouvir e aconselhar. Fique aqui registrado o quanto eu os amo e admiro. Meus pilares na vida!

À minha irmã, **Soraia Ellen Galdino Barnabé**, pelo seu companheirismo e diversão em todos os momentos. Mesmo sendo um irmão ausente, saiba que a amo e que rezo pela sua felicidade diariamente.

À **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Pollianna Muniz Alves**, minha orientadora e mãe durante dois anos. Ao longo da minha vida fui agraciado por conviver e aprender com pessoas que admiro. Ao entrar para a Pós-Graduação deparei-me novamente com a senhora, minha professora da graduação. Entrei no mestrado com um sonho de ser professor, sonho que carregava desde criança, e graças à senhora tornei-me muito mais. Hoje mais adulto, aprendi que para ensinar é necessário uma grande alma, e que a partir dela se divide o conhecimento, e foi isso que a senhora fez por mim, partilhou e deixou em mim um pedacinho de sua alma. Esse pupilo carregará sempre respeito e admiração por essa orientadora/mãe, ou melhor, essa mãe que foi minha orientadora. MUITO OBRIGADO!

Avós paternos, **Josafá Galdino de Sousa** e **Teódula Barros de Sousa**, e maternos, **Luiz Galdino de Sousa** (em memória) e **Maria Barnabé de Sousa**, pelo carinho e amor. Meus pais de coração, obrigado por cuidarem de mim como a um filho e fortalecerem meu caráter. Todo o sofrimento que os senhores passaram para educar seus filhos e netos será sempre lembrado com orgulho por mim e por nossa família.

A **Abraão Pedro da Silva Mélo**, a quem aprendi a admirar e ter a certeza de que faz e fará parte da minha vida sempre. Não tenho como agradecer o quanto cresci e amadureci com sua ajuda e conselhos. A vida é cheia de dificuldades e desafios, mas são as flores que iluminam e motivam a caminhada. “Tu te tornas eternamente responsável por aquilo que cativas.”

A toda **minha família**, motivo do meu orgulho. Vocês são a certeza de Deus em minha vida, certeza de que fui colocado entre as melhores pessoas e são essas pessoas que digo com orgulho serem MINHA família.

Ao **Programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba** (PPGO-UEPB), pela oportunidade a qual lutei durante toda minha vida acadêmica. Através do PPGO-UEPB estou realizando o sonho de me tornar professor, por isso deixo aqui meu sentimento de gratidão a todos que fazem e fizeram parte desta casa.

Ao **Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka**, pelo exemplo de dedicação e conhecimento. O senhor é o espelho de todo aquele que almeja a ciência e o conhecimento, mas, além disso, é uma pessoa amável e gentil a qual terei sempre como modelo.

Aos maravilhosos professores do PPGO-UEPB, representado aqui pelas **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Edja Maria Melo de Brito Costa**, **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Jozinete Vieira Pereira**, **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Flávia Granville-Garcia**, **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daniela Pita de Melo**, **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Daliana Queiroga de Castro Gomes**, **Prof. Dr. Manuel Antonio Gordón-Núñez**, **Prof. Dr. Kenio Costa de Lima**, por partilharem seu conhecimento de forma amável e divertida

ao longo destes dois anos. Os senhores tornaram-se meus exemplos, e será sempre uma honra chama-los de mestres.

Aos **Professores Doutores Bárbara Vanessa Brito Monteiro e Yuri Wanderley Cavalcanti**, pelos ensinamentos e alegrias partilhadas no laboratório. Foi muito prazeroso conviver com pessoas tão divertidas e inteligentes, queria ter ficado mais tempo convivendo com os senhores. Muito obrigado por tudo!

A minha amiga/irmã e companheira de laboratório, **Luana Samara Balduino Sena**. Algumas pessoas entram na nossa vida de forma silenciosa e lá no coração criam raízes, uma dessas pessoas é você. A gente riu junto, e como rimos, choramos juntos e como choramos, mas acima de tudo nós entendemos e nos tornamos irmãos. Como eu falei você ganhou cadeira cativa e eterna no meu coração. Nunca vou poder pagar tudo o que você fez por mim, mas fica aqui meu muito obrigado e o meu “eu te amo migá sua loka”!

Ao meu grande amigo de longa data e companheiro de laboratório, **Rodolfo de Abreu Carolino**. A vida me deu a oportunidade de ser seu amigo duas vezes e em cada uma delas você conseguiu me fazer muito mais feliz. Feliz, sonhador, divertido e muito mais, quem não vai querer um amigo desses? Você sempre poderá contar comigo.

Ao meu melhor amigo, **José Klidenberg de Oliveira Júnior**, a quem devo a motivação e o incentivo de ter entrado na Pós-Graduação. Você sempre será meu exemplo de dedicação e foco, rezo para que um dia possamos voltar a trabalhar juntos novamente.

Aos meus grandes amigos de toda a vida (**Mariana Xerez, Luiz Eduardo, Vinícius Sampaio, Manoela Natacha, Gabriella Nóbrega, Marisley Layrtha, Thays Martins, Sérgia Landara, Roberta Medeiros, Maria Eugênia, Rayssa Batista e Narjara Pinheiro**). Aos “Murrinhos” que já estão comigo e partilham das minhas alegrias e tristezas ao longo desses 8 anos e assim será por toda a vida. Amo muito todos vocês.

As queridas técnicas do laboratório e grandes amigas, **Ana Luzia e Denize Núbia**. A convivência diária fez de nós grandes amigos, mas também mostrou o quanto vocês duas eram inteligentes e dedicadas. Ana seu carinho maternal é sua maior marca e Denize você faz parte dos meus melhores amigos. Aprendi com vocês que trabalho e alegria são coisas conjuntas.

Aos meus colegas de turma do mestrado (**Ana Priscila e Ana Helena, Diego Romário, Erick Tássio, Ernani Canuto, Fabiana Medeiros, Isabella Jardelino, José de Alencar, Laio Dutra, Liege Helena, Luana Samara, Niebla Melo, Rodolfo Abreu, Sheyla Dornelas e Tomás Lúcio**). A caminhada foi longa e árdua, mas agora no final nos tornamos professores juntos, ou muito mais que isso, grandes amigos. Tenham sempre a certeza que podem contar comigo a qualquer dia e hora. Obrigado por fazerem parte da minha vida.

Aos **funcionários da UEPB**, representados por **Adraine Pâmela, Dione e Joselma**. Vocês são a prova viva de pessoas que trabalham com amor, amor este que fica grudado no coração de quem tem oportunidade de conhecê-las. A todos os funcionários desta casa que me acolheu por dois anos, muito obrigado.

Aos amigos que fiz em minha vivência em Campina Grande. **Matheus** e **Marisa** (companheiros de moradia), **Tiago** e **Toni**, e tantos outros que fizeram minha estadia aqui mais feliz e divertida. Muito obrigado!

Aos demais alunos de iniciação científica, mestrado e doutorado e grandes amigos (**Diego**, **Deize**, **Ítalo**, **Marina**, **Paulianna**, **Vinícius**, **Pâmela**, **Jamesson Macedo**, **Matheus Alves**, **Matheus Perazzo**, **Hellen Bandeira**, **Lívia**, **Robeci Macedo**, **Amanda**, **Geisa**, **Betânea**, **Ingrid**, **Maraysa** e **Emanuene**). Vocês foram verdadeiras pérolas nessa caminhada que tornaram muito mais prazerosos todos os momentos em que estivemos juntos. Muito obrigado!

Aos **alunos da graduação** que foram fonte do meu aprendizado e divertimento durante o estágio docência. Muito obrigado pela confiança!

Aos **pacientes** pela confiança e determinação, verdadeiros exemplos de luta pela vida.

Ao **Prof. Dr. Elismauro Francisco de Mendonça** (PPGO-UFG), por sua disponibilidade e imensas colaborações com a realização deste trabalho, muito obrigado!

Ao **Programa Nacional de Cooperação Acadêmica** (PROCAD/Casadinho) que permitiu o engrandecimento deste trabalho, através da vinculação a Universidade Federal de Goiás – UFG.

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

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

A todos que direta ou indiretamente contribuíram para a realização deste trabalho. Muito obrigado!

## **EPÍGRAFE**

---

*“Uma criança, um professor, uma caneta e um livro podem mudar o mundo.”*

*Malala Yousafzai - Prêmio Nobel da Paz 2014*

## **RESUMO**

---

## RESUMO

**Introdução:** O carcinoma de células escamosas oral é a oitava neoplasia maligna mais prevalente na população mundial, acometendo principalmente indivíduos do sexo masculino acima da quinta década de vida, expostos a fatores de risco clássicos como o tabaco e o álcool, embora nos últimos anos tenha-se notado uma mudança nesse perfil, com o aumento da incidência desta neoplasia em pacientes jovens ( $\leq 45$  anos). Não há na literatura concordância em relação ao comportamento biológico dessa neoplasia entre as duas faixas etárias. **Objetivo:** Avaliar a imunoexpressão das proteínas p16 e p53 em Carcinoma de Células Escamosas de Língua Oral (CCELO) em jovens e idosos, relacionando-as com parâmetros clínicos e morfológicos. **Material e métodos:** A amostra foi composta por 80 casos de CCELO, organizados em dois grupos: 40 casos de indivíduos jovens ( $\leq 45$  anos) e 40 casos de indivíduos idosos ( $\geq 60$  anos). Os dados clínicos (tamanho do tumor, metástase linfonodal, metástase à distância e estadiamento clínico) foram obtidos através dos prontuários médicos. Para avaliação morfológica utilizou-se o sistema proposto por Byrne et al. (1992). Na análise imunoistoquímica foi realizada de forma quantitativa, através do índice de positividade (IP), utilizando-se os anticorpos anti-p16 e anti-p53. Para análise estatística foram utilizados os testes Qui-quadrado, exato de Fisher, correlação de Spearman e teste de Mann-Whitney ( $p < 0,05$ ).

**Resultados:** Em relação aos parâmetros clinicomorfológicos, não houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos etários estudados ( $p > 0,05$ ). Embora sem diferença significativa, os pacientes idosos foram predominantemente diagnosticados em estágios clínicos iniciais (I/II), 67,5% (27/40), e os pacientes jovens em estágios clínicos mais avançados (III/IV), 52,5% (21/40). Em ambos os grupos, o CCELO foi classificado como de alto grau de malignidade ( $p > 0,05$ ). Na análise imunoistoquímica, observou-se imunopositividade nuclear da p16 em 77,5% (31/40) dos casos de CCELO em jovens (mediana 10,80) e 95% (38/40) nos idosos (mediana 31,65) e imunopositividade nucleo/citoplasmática da p16 em 37,5% (15/40) dos casos de CCELO, tanto em jovens quanto em idosos. Houve diferença significativa da maior imunoexpressão nuclear da p16 em relação ao tamanho do tumor (T3/T4) ( $p = 0,02$ ) e estadiamento clínico III/IV ( $p = 0,02$ ) no grupo dos idosos. Observou-se correlação positiva ( $r = 0,395$ ;  $p = 0,012$ ) entre a imunoexpressão da p16 nuclear e citoplasmática no grupo dos jovens. A imunoexpressão nuclear da p53 mostrou positividade em 77,5% (31/40) dos casos de CCELO em jovens (mediana 18,75) e em 87,5% (35/40) nos idosos (mediana 19,55) ( $p > 0,05$ ). Não se observou diferença estatística na imunoexpressão da p53 em relação aos parâmetros clinicomorfológicos nos dois grupos. Não houve correlação entre a imunoexpressão da p16 e p53 em nenhum dos grupos etários ( $p > 0,05$ ). **Conclusão:** A p16 e p53 participam da patogênese do CCELO tanto nos jovens quanto nos idosos, no entanto, as mesmas não são marcadores adequados para diferenciar o comportamento biológico do CCELO entre os dois grupos etários. Pode-se também inferir que a p16 está relacionada à progressão tumoral do CCELO nos pacientes idosos.

**Palavras chave:** Carcinoma de células Escamosas Oral, Jovem, Idoso, p53, p16.

## **ABSTRACT**

---

## ABSTRACT

**Introduction:** Oral squamous cell carcinoma is the eighth most prevalent malignant neoplasm in the worldwide, affecting mainly male individuals within their sixth decade of life, exposed to main risk factors, such as tobacco and alcohol consumption, although in the last years it has been observed a change in this profile, with an increase in the incidence of this neoplasm in younger patients. There is no concordance in the literature when comparing the biological behavior of this neoplasm between young and older patients. **Objective:** To evaluate comparatively the immunoexpression of p16 and p53 in a series of Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma (OTSCC) cases in young and elderly individuals, relating to their clinical and morphological parameters. **Material and methods:** Sample was composed of 80 OTSCC cases, divided in two groups: 40 cases of OTSCC in young individuals ( $\leq 45$  years old) and 40 cases of OTSCC in elderly individuals ( $\geq 60$  years old). The clinical data (tumor size, regional node metastasis, distant metastasis and clinical stage) were obtained from the medical records. For morphological analysis, was utilized the system proposed by Bryne et al. (1992). The immunohistochemical analysis (IH) was performed through the positivity index (PI), using the antibodies anti-p16 and anti-p53. The statistical analysis used Chi-square, Fisher's exact, Mann Whitney tests and Spearman's Correlation. **Results:** In relation to the clinical-morphological parameters, there were no significance statistical differences between the age groups studied ( $p>0.05$ ). Although there were no significance differences, the elderly individuals were predominantly diagnosed in initial clinic stages (I/II), 67.5% (27/40), and the younger individuals were in more advanced clinical stages (III/IV), 52.5% (21/40). In both groups, the OTSCC was classified as high degree of malignance ( $p>0.05$ ). In the IH analysis, observed nuclear immunoexpression of p16 in 77.5% (31/40) of the cases of OTSCC in the young (median 10.80) and 95% (38/40) in the elderly (median 31.65) and a nuclear/cytoplasmic immunoexpression of p16 in 37.5% (15/40) of cases, in both age group studied. There were significant differences the nuclear immunoexpression of p16 in relation to tumor size (T3/T4) ( $p=0.02$ ) and clinical stage III/IV ( $p=0.02$ ) in the age group of elderly individuals. It was observed a positive correlation ( $r=0.395$ ;  $p=0.012$ ) between nuclear and cytoplasmic immunoexpression of p16 in the age group of young individuals. The nuclear immunoexpression of p53 showed positivity in 77.5% (31/40) of cases in the young (median 18.75) and in 87.5% (35/40) in the elderly (median 19.55) ( $p> 0.05$ ). Statistical differences immunoexpression of p53 in relation to clinical-morphological parameters were not observed in both groups. Also, there was no correlation between immunoexpression of p16 and p53 in the age groups studied ( $p>0.05$ ). **Conclusions:** The p16 and p53 participate of the pathogenesis of OTSCC in young and elderly patients, however, p16 and p53 cannot be utilized as suitable markers to differentiate biological behavior of the OTSCC between two age groups studied. We can also inferred that the p16 is related to tumour progression of OTSCC in elderly patients.

**Key-words:** Oral squamous cell carcinoma, young, elderly, p53, p16

## **LISTA DE ILUSTRAÇÕES**

---

## LISTA DE QUADROS

	PÁGINAS
<b>Quadro 1.</b> Quadro de variáveis dependentes do estudo.....	38
<b>Quadro 2.</b> Quadro de variáveis independentes do estudo.....	39
<b>Quadro 3.</b> Sistema de graduação histológica de malignidade no fronte de invasão, proposto por Bryne et al. (1992).....	41
<b>Quadro 4.</b> Especificidade, clone, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de recuperação dos anticorpos primários utilizados no estudo.....	43

## LISTA DE FIGURAS

	PÁGINAS
<b>Figura 1</b> (A) Fotomicrografia de CCELO em jovem, de alto grau de malignidade exibindo, em destaque, células hipercromáticas e com núcleos volumosos. (HE, 100x). (B) Imunoexpressão da p16 em CCELO em jovem, evidenciando intensa marcação nuclear e citoplasmática nas células neoplásicas (ADVANCE, 100x). (C) Imunoexpressão da p53 em CCELO em jovem, exibindo intensa marcação nuclear nas células neoplásicas (ADVANCE, 100x). (D) Fotomicrografia de CCELO em idoso de alto grau de malignidade (HE, 100x). (E) Imunoexpressão da p16 em CCELO em idoso, exibindo leve marcação nuclear nas células neoplásicas da periferia do lençol tumoral (ADVANCE, 100x). (F) Imunoexpressão da p53 em CCELO em idoso, exibindo intensa marcação nuclear nas células neoplásicas da periferia do lençol tumoral (ADVANCE, 100x).....	68
<b>Figura 2</b> Percentual de imunopositividade da p16 nuclear/citoplasmática nos casos de CCELO em jovens e idosos (n=30).....	69

## **LISTA DE TABELAS**

---

## LISTA DE TABELAS

	<b>PÁGINAS</b>
<b>Tabela 1</b> Especificidade, clone, diluição, tempo de incubação e fabricante dos anticorpos.....	62
<b>Tabela 2</b> Caracterização dos casos de CCELO em pacientes jovens e idosos, de acordo com os parâmetros clínicos: sexo, tamanho do tumor, metástase linfonodal e a distância, estadiamento clínico e SGHM proposto por Bryne et al. (1992).....	63
<b>Tabela 3</b> Distribuição absoluta e relativa dos casos de CCELO de acordo com os grupos etários e os parâmetros clinicopatológicos.....	64
<b>Tabela 4</b> Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, soma dos postos, estatística U e significância estatística ( $p$ ) para os percentuais de positividade para P53 e P16 em relação aos grupos etários.....	65
<b>Tabela 5</b> Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, soma dos postos, estatística U e significância estatística ( $p$ ) para o percentual de positividade para p16 nuclear em CCELO de pacientes jovens e idosos em relação aos parâmetros clinicopatológicos.....	66
<b>Tabela 6</b> Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, soma dos postos, estatística U e significância estatística ( $p$ ) para o percentual de positividade para p53 em CCELO de pacientes jovens e idosos em relação aos parâmetros clinicopatológicos.....	67

## **LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS**

---

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

<b>SIGLAS E ABREVIATURAS</b>	<b>SIGNIFICADO</b>
<b>BSA</b>	Referente ao inglês <i>Bovine Serum Albumine</i> , traduzido como albumina sérica bovina;
<b>CCE</b>	Carcinoma de Células Escamosas;
<b>CCEO</b>	Carcinoma de Células Escamosas Oral;
<b>CCEL</b>	Carcinoma de Células Escamosas de Língua;
<b>CCELO</b>	Carcinoma de Células Escamosas de Língua Oral;
<b>CDK</b>	Referente ao inglês <i>Cyclin-dependent kinase</i> , traduzido como quinase dependente de ciclina;
<b>CKIs</b>	Referente ao inglês <i>Cyclin-dependent kinase inhibitor</i> , traduzido como inibidor de quinase dependente de ciclina;
<b>CVO</b>	Carcinoma Verrucoso Oral
<b>DAB</b>	3,3' diaminobenzidina tetrahidrocloreto;
<b>DNA</b>	Referente ao inglês <i>Deoxyribonucleic acid</i> , traduzido como ácido desoxiribonucleico;
<b>ER</b>	Referente ao inglês <i>Early Region</i> , traduzido como região precoce;
<b>FAP</b>	Fundação Assistencial da Paraíba;
<b>FIHT</b>	Referente ao inglês <i>Fragile Histidine Triad Protein</i> , traduzido como Proteína Triada de Histidina Frágil;
<b>HPV</b>	Referente ao inglês <i>Human Papiloma Virus</i> , traduzido como Papiloma Vírus Humano;
<b>LSAB</b>	Referente ao inglês <i>Labeled streptavidin-biotin</i> , traduzido como Estreptavidina marcada com biotina;
<b>LCR</b>	Referente ao inglês <i>Late Control Region</i> , traduzido como região de controle longa;
<b>LR</b>	Referente ao inglês <i>Long Region</i> , traduzido como região do lado;
<b>LPM</b>	Lesão Potencialmente Maligna;
<b>M</b>	Mitose;
<b>OMS</b>	Organização Mundial da Saúde;
<b>OTSCC</b>	Referente ao inglês <i>Oral Tongue Squamous Cell Carcinoma</i> , traduzido como Carcinoma de Células Escamosas de Língua Oral;

<b>PAH</b>	Referente ao inglês <i>Polycyclic Aromatic Hydrocarbon</i> , traduzido como hidrocarboneto policíclico aromático;
<b>PB</b>	Paraíba;
<b>PCR</b>	Referente ao inglês <i>Polymerase Chain Reaction</i> , traduzido como reação em cadeia de polimerase;
<b>pRb</b>	Proteína Retinoblastoma;
<b>PV</b>	Papiloma Vírus;
<b>SGHM</b>	Sistema de Gradação Histológica de Malignidade;
<b>SPSS</b>	Referente ao inglês <i>Statistical Package for the Social Sciences</i> , traduzido como pacote estatístico para as ciências sociais;
<b>TCLE</b>	Termo de Consentimento Livre e Esclarecido
<b>TNM</b>	T- tamanho do tumor, N- metástase regional e M- metástase à distância;
<b>UEPB</b>	Universidade Estadual da Paraíba;
<b>URR</b>	Referente ao inglês <i>Upstream Regulatory Region</i> , traduzido como região reguladora superior;
<b>IUCC</b>	União Internacional Contra o Câncer;

## **SUMÁRIO**

---

## SUMÁRIO

1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS .....	25
2 OBJETIVOS .....	34
2.1 Objetivo Geral.....	34
2.2 Objetivos Específicos .....	34
3 MATERIAL E MÉTODOS.....	36
3.1 Considerações Éticas.....	36
3.2 Caracterização do Estudo .....	36
3.3 População e amostra.....	36
3.3.1 Critérios de inclusão .....	36
3.3.2 Critérios de exclusão .....	37
3.4 Variáveis do estudo .....	37
3.5 Dados clínico patológico.....	39
3.6 Estudo imunoistoquímico.....	40
3.6.1 Método imunoistoquímico.....	40
3.6.2 Análise Quantitativa .....	43
3.7 Análise estatística .....	43
4 ARTIGO .....	46
4.1 APRESENTAÇÃO .....	46
4.2 ARTIGO A SER SUBMETIDO.....	47
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS .....	69
REFERÊNCIAS.....	71
ANEXOS .....	78

## **CONSIDERAÇÕES INICIAIS**

---

## **1 CONSIDERAÇÕES INICIAIS**

### **1.1 CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAL: CARACTERÍSTICAS GERAIS**

O Carcinoma de Células Escamosas (CCE) de Cabeça e Pescoço tem uma incidência anual de 500 mil casos em todo o mundo (KRÜGER et al., 2014; MARUR; FORASTIERE, 2016), sendo a cavidade oral o oitavo local de maior acometimento por esta neoplasia em todo o corpo (NG et al., 2017). O CCE corresponde a aproximadamente 90 a 95% de todos os casos de câncer bucal, tendo a língua como sítio anatômico de maior incidência (JO; KIM; YUN, 2016; NG et al., 2017) e o de pior prognóstico (SOUDRY et al., 2010), acometendo principalmente indivíduos do sexo masculino (HONORATO et al., 2015; FRIEMEL et al., 2016), com faixa etária acima da quinta a sétima década de vida (KAMINAGAKURA et al., 2010; KAMINAGAKURA et al., 2012; RUSHATAMUKAYANUNT et al., 2014; KNOPF et al., 2015; KAMINAGAKURA et al., 2016). Entretanto, ao longo dos anos pode-se observar um aumento na incidência do Carcinoma de Células Escamosas Oral (CCEO) entre mulheres, fato que pode estar relacionado ao aumento da exposição desse gênero a fatores de risco como tabagismo e alcoolismo, Papiloma Vírus Humano (HPV) de alto risco de malignidade, fatores genéticos e hormonais (KURIAKOSE et al, 1992; BENEVENUTO et al., 2012). Além disso, estudos recentes mostram que a incidência de CCEO em indivíduos jovens, com idade inferior a 45 anos, tem aumentado representando uma frequência de 1,4 a 13% de todos os casos de CCEO (RIBEIRO et al., 2009; SOUDRY et al., 2010; PATEL et al., 2011; TROELTZSCH et al., 2014; KOMOLMALAI et al., 2015; SUN; FANG; GUO, 2015; SANTOS et al., 2016).

O CCEO em jovens apresenta uma etiopatogenia ainda bastante discutida na literatura, uma vez que muitos dos indivíduos não estão expostos aos principais fatores de risco, que são o consumo de álcool e tabaco (HIROTA et al., 2008; ALBUQUERQUE et al., 2011; PATEL et al., 2011; SUN; FANG; GUO, 2015). Dentre os fatores etiológicos que são sugeridos para esta faixa etária estão os hereditários (HIROTA et al., 2008) e o HPV (KAMINAGAKURA et al., 2012; VAN MONSJOU et al., 2012; RUSHATAMUKAYANUNT et al., 2014; KNOPF et al., 2015).

Hirota et al. (2008), em estudo realizado no Brasil, avaliaram o fator hereditariedade entre pacientes jovens ( $\leq 40$  anos) e idosos ( $> 40$  anos) com CCEO e observaram que dos 13 pacientes jovens, 84,6% (n=11) relatavam histórico familiar de algum tipo de neoplasia

maligna, enquanto que dos 121 pacientes mais velhos, apenas 29,6% (n=108) apresentaram histórico familiar associado. Sugeriu-se, assim, uma maior participação do fator hereditariedade no desenvolvimento do CCEO em pacientes mais jovens.

De Paula et al. (2009) avaliaram 724 casos de carcinoma de cabeça e pescoço primários em jovens (105 indivíduos) e idosos (619 indivíduos), através de parâmetros epidemiológicos, clínicos e imunoistoquímica, por meio da imunoexpressão da p53. Constatou-se que os jovens apresentavam maior prevalência (56,2%) de histórico familiar de câncer, bem como uma maior imunoexpressão da p53 (80,4%) em comparação aos idosos, 34,9% e 63,6% respectivamente. Os autores sugerem que essa maior expressão da proteína p53 nos jovens pode estar ligada a alterações genéticas hereditárias. Diferentemente, Dholam et al. (2017) realizaram um estudo caso-controle com jovens acometidos por CCEO e carcinoma de orofaringe, avaliando os fatores de risco para esta população, evidenciou-se que a maior parte dos indivíduos jovens não apresentavam histórico familiar de ocorrência de neoplasia maligna.

As infecções são a causa de 15 a 20% das neoplasias malignas, seja pela ação de bactérias, a exemplo da *Helicobacter pylori*, ou de vírus como Epstein–Barr, os vírus da hepatite B e C e o HPV (SIVARS et al., 2016). O HPV é um vírus não encapsulado que infecta células epiteliais (BRAVO; FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015). Os subtipos do HPV de alto risco de malignidade, o HPV16 e o HPV18, expressam proteínas oncogênicas, E6 e E7, que agem no DNA da célula levando a uma alteração genética das proteínas p53 e retinoblastoma (pRb), respectivamente (KAMINAGAKURA et al., 2012; AMARO FILHO et al., 2013; RUSHATAMUKAYANUNT et al., 2014; BRAVO; FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015; SIVARS et al., 2016; SVAJDLER et al., 2016).

A família do papiloma vírus é constituída por mais de 200 genótipos, apresentando material genético viral disposto em dupla hélice de DNA, além de apresentar tropismo por células epiteliais (BRAVO; FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015; KHOT et al., 2016). Ao avaliar o DNA dos membros do PV três regiões podem ser identificadas: *Upstream Regulatory Region* (URR) ou *Long Control Region* (LCR) que é responsável por abrigar locais de ligação de fatores de transcrição e controlar a expressão gênica, *Early Region* (ER) responsável pela replicação viral e transformação celular e *Late Region* (LR) que codifica proteínas capsulares (BRAVO; FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015; CHAI et al., 2015). Alguns elementos são conservados por todos os membros da família do papiloma vírus, como a presença de URR ou LCR, expressão das proteínas E1 e E2 pela ER e as L1 e L2 pela LR. Estas proteínas são sintetizadas ao longo das camadas do tecido epitelial (BRAVO; FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015).

Dentro desta família, um grupo limitado (HPV16, 18, 31, 33 e 45) tem a capacidade de produzir em seu ciclo de vida proteínas oncogênicas que atuam sobre os pontos específicos do ciclo celular, desnaturando ou inativando proteínas regulatórias (CHAI et al., 2015).

Além da etiopatogenia, outra questão que ainda não está estabelecida na literatura no que diz respeito às diferenças do comportamento biológico do CCEO em relação às faixas etárias dos pacientes.

## 1.2 COMPORTAMENTO BIOLÓGICO DO CCEO EM INDIVÍDUOS JOVENS E IDOSOS

No tocante ao comportamento biológico do CCEO em pacientes jovens, alguns estudos apontam um fenótipo é mais agressivo (RIBEIRO et al., 2009; SOUDRY et al., 2010; KNOPF et al., 2015), em contrapartida em outros estudos não há diferença do comportamento biológico do CCEO em relação aos pacientes idosos (SIRIWARDENA et al., 2007; SUN; FANG; GUO, 2015). Para avaliar o comportamento biológico do CCEO entre as faixas etárias levam-se em consideração parâmetros clínicos como gênero, hábitos nocivos, tamanho do tumor, metástase linfonodal regional, metástase à distância e estadiamento clínico (SUN; FANG; GUO, 2015), parâmetros morfológicos, por meio dos Sistemas de Gradação Histopatológica de Malignidade (SGHM) (BRYNE et al., 1992; CARDESA et al., 2005), e moleculares, por meio de técnicas como a imunoistoquímica (SOUDRY et al., 2010).

Sun, Fang e Guo (2015) avaliaram, através de parâmetros clinicomorfológicos, o comportamento biológico do CCEO entre indivíduos jovens (<40 anos) e mais velhos (>40 anos). Os autores observaram que o sexo masculino foi o mais acometido, tendo a língua como principal sítio anatômico de acometimento em ambos os grupos, bem como, tumores em estágios iniciais e ausência de metástase linfonodal regional. Embora, o grupo de jovens apresentou uma menor exposição a fatores de risco, e maior número de recorrência, quando comparados aos idosos. Portanto, os autores sugeriram que não havia diferença entre os dois grupos em relação ao curso e prognóstico da doença, embora os jovens apresentem maior recorrência.

Vários fatores de prognóstico são levados em consideração para se estudar o comportamento clínico do CCEO entre as faixas etárias, dentre eles o TNM (T- tamanho do tumor, N- metástase para linfonodos regionais e M- metástase à distância). O sistema de estadiamento clínico TNM é o mais utilizado como forma de definir o tratamento mais adequado e estimar o prognóstico, embora nem sempre siga o comportamento estimado, para o CCEO (LOURENÇO et al., 2007), sendo os tumores em estágio inicial (T1/T2), ausência de

metástase linfonodal regional e a distância, representam os parâmetros clínicos mais encontrados (SUN; FANG; GUO, 2015; PEISKER et al., 2016).

Outro critério de avaliação do comportamento biológico dos tumores refere-se aos parâmetros celulares e teciduais no *front* de invasão tumoral, a exemplo do SGHM proposto por Bryne et al. (1992) que avalia o grau de ceratinização, pleomorfismo nuclear, padrão de invasão e infiltrado inflamatório. As características tumorais no fronte de invasão refletem uma maior interação tumor/hospedeiro (Bryne et al., 1998).

Mesquita et al. (2016) analisaram uma série de 32 casos de CCEO em pacientes jovens ( $\leq 45$  anos), evidenciando que a maior parte dos casos (43,8%) foram diagnosticados em estágios iniciais. Através do SGHM proposto por Bryne et al. (1992), observou-se uma maior frequência de alto grau de malignidade (65,6%), e através da OMS (2005), uma prevalência do padrão moderadamente diferenciado (50%). Portanto, os autores sugerem que a maior parte dos casos de CCEO em pacientes jovens são diagnosticados com alto grau de malignidade, estando assim o comportamento biológico mais agressivo relacionado à idade.

As características clinicomorfológicas do CCEO entre as faixas etárias vêm sendo discutida há alguns anos. Alguns aspectos ligados ao CCEO como sexo, fator etiológico, estadiamento clínico e graduação histopatológica, foram avaliados em um grupo de 37 indivíduos jovens ( $<35$  anos) e 37 idosos ( $>60$  anos), como forma de elucidar as divergências entre as faixas etárias. Constatou-se uma maior prevalência do CCEO no sexo feminino entre os pacientes jovens (1:1,2), e no sexo masculino entre os idosos (2,7:1), com diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ( $p < 0,03$ ). Quanto à etiopatogenia, os idosos apresentaram maior prevalência de exposição a fatores de risco, como tabagismo, quando comparados aos jovens ( $p < 0,01$ ). Em ambos os grupos, o estadiamento clínico mais avançado, estágios III e IV, e o grau de diferenciação tecidual, bem diferenciado, foram os mais frequentes (KURIAKOSE et al., 1992).

Soudry et al. (2010) avaliaram possíveis diferenças clinicomorfológicas do CCEO entre jovens ( $<30$  anos) e idosos ( $>30$  anos) e constataram diferença estatisticamente significativa nos pacientes mais jovens em relação a presença de metástase locoregional e morfologicamente, maior índice de invasão perineural. Os autores sugeriram, portanto, que há diferença no comportamento biológico do CCEO nos jovens e que isto poderia ser atribuído a um diagnóstico tardio.

A imunoistoquímica é um recurso adicional de avaliação do comportamento biológico do CCEO, e neste sentido muitos trabalhos vêm sendo desenvolvidos, a exemplo do estudo realizado por Benevenuto et al. (2012) que avaliaram o comportamento biológico do

carcinoma de células escamosas de língua (CCEL) em jovens ( $\leq 40$  anos) e mais velhos ( $> 50$  anos), por meio de parâmetros clínicos, morfológicos e imunoistoquímicos, pela imunoexpressão do Ki67 e do fator de Von Willebrand. Observou-se que os jovens apresentavam maior prevalência de estadiamentos clínicos avançados (III/IV), enquanto que os idosos apresentavam-se em estágios iniciais (I/II) ( $p=0,039$ ). Em relação aos parâmetros morfológicos não houve diferença estatística entre os grupos ( $p>0,05$ ), e o mesmo foi observado em relação a imunoexpressão do Ki67 e fator de *Von Willebrand* nos dois grupos etários estudados. Sugerindo-se assim que possíveis diferenças no comportamento biológico do CCEL entre jovens e idosos não estejam relacionadas a uma maior proliferação celular ou maior índice angiogênico, embora os jovens sejam diagnosticados em estadiamentos clínicos mais avançados.

Deyhimi, Torabinia e Torabinia (2013) avaliaram possíveis diferenças do comportamento biológico do CCEO entre jovens ( $< 40$  anos) e idosos ( $> 50$  anos) por meio da imunoexpressão do Ki67. Em ambos os grupos observou-se predomínio de lesões bem diferenciadas, não havendo diferença estatística para imunoexpressão do Ki67 entre jovens e idosos ( $p>0,05$ ). Dessa forma os autores sugerem que não haja diferença no comportamento biológico do CCEO entre jovens e idosos.

Andrade et al. (2016) avaliaram o comportamento do CCELO em jovens ( $\leq 45$  anos) e idosos ( $\geq 60$  anos) através de parâmetros clinicomorfológicos e imunoexpressão dos anticorpos Ki67, Bcl-2 e Ativina A e observou que há possível diferença na patogênese do CCELO entre jovens e idosos. Sugerindo que, nos jovens pode estar relacionada a um maior índice de proliferação celular associada a um maior grau histológico de malignidade. Nos idosos, a patogênese pode estar relacionada à maior sobrevivência das células neoplásicas, através da participação da Ativina A.

### 1.3 CICLO CELULAR E SUA RELAÇÃO COM A CARCINOGENESE ORAL E A PROGRESSÃO TUMORAL

O crescimento e a proliferação celular estão ligados a uma série de mecanismo (AGUILAR; FAJAS, 2010), sendo a divisão celular organizada em uma sequência de fases: G1 (gap 1), S (síntese de DNA), G2 (gap 2), M (mitose) (SA; DAS, 2008). A passagem de cada uma dessas, bem como sua regulação depende de um grupo de proteínas que podem atuar tanto como promotoras como supressoras da divisão celular (AGUILAR; FAJAS, 2010).

Dentre estas proteínas podem ser destacadas três famílias: as Ciclinas, as Quinases Dependentes de Ciclinas (CDKs) e as Inibidoras de Quinases Dependentes de ciclinas (CKIs) (AGUILAR; FAJAS, 2010). As ciclinas ativam as CDKs, como a Ciclina D que ativa as CDK4/6 na fase G1, mas caso seja identificado algum erro neste processo as CKIs são ativadas, interrompendo o ciclo e ativando a apoptose, como a p16 que inativa o complexo Ciclina D/CDK4/6 (AGUILAR; FAJAS, 2010; PRASAD et al., 2012).

A exemplo da interação das ciclinas como as CDKs, tem-se o complexo Ciclina D/CDK4/6 que na fase G1 irá fosforilar a pRb, liberando o fator de transcrição E2F que levará a progressão do ciclo celular (AGUILAR; FAJAS, 2010). A p16 é uma inibidora de quinase dependente de ciclina (IKC), ou proteína supressora tumoral, que atua na interação do complexo Ciclina D/CDK4/6 com a pRb, impedindo a fosforilação e a liberação do E2F, dessa forma inibindo a progressão para a fase S (PRASAD et al., 2012; CHANSAENROJ et al., 2013).

A carcinogênese oral é um processo de múltiplas etapas que envolve mutações e anormalidades cromossômicas, onde a transição do epitélio de displasia oral para o câncer resulta do acúmulo de alterações genéticas e epigenéticas como mutações nos genes *P53* e *P16* (ABRAHAO et al., 2011). O gene *CDKN2A* encontra-se inativo em aproximadamente 70% dos cânceres humanos. Esse gene codifica a proteína p16<sup>INK4a</sup> que é inibidora do ciclo celular por agir na via pRb (NAKAHARA et al., 2000). Mutações na p53 são encontradas em mais de 50% dos casos de CCEO, estando relacionada a um comportamento mais agressivo do tumor e dificuldade de resposta à radioterapia (JO, KIM, YUN, 2016)

A p53 e p16 são proteínas supressoras tumorais importantes na regulação do ciclo celular (VARUN et al., 2014). Na fase de transição G1-S, a p53 atua como ponto de checagem da replicação do DNA, identificando erros ou mutações que podem ser reparados ou levar a célula a apoptose (SA; DAS, 2008; PRASAD et al., 2012). Algumas pesquisas identificam que no CCEO o gene apresenta-se mutado e a proteína superexpressa (MONSJOU et al., 2012; BRAAKHUIS et al., 2014; TAN et al., 2014; VARUN et al., 2014). Na fase G1, a proteína p16 inativa o complexo Ciclina D/CDK4/6 que é responsável pela fosforilação da pRb, interrompendo o ciclo celular (PRASAD et al., 2012; AGUILAR; FAJAS, 2010). Estudos mostram que uma alta expressão da p16 está associada à infecção por HPV de alto risco de malignidade (MONSJOU et al., 2012; KAMINAGAKURA et al., 2012; GROBE et al., 2013), sendo relacionada aos casos de CCEO em jovens (KAMINAGAKURA et al., 2012; VAN MONSJOU et al., 2012 SRITIPPHO et al., 2016). A proteína viral E6 atua sobre o gene P53 enquanto que a proteína viral E7 age no gene PRb responsável por expressar

a proteína pRb que é ponto de ligação da p16 (BRAVO; FÉLEZ-SÁNCHEZ, 2015; CHAI et al., 2015). Uma evidência da ligação do HPV a etiologia de uma neoplasia maligna seria a superexpressão da p16, embora este mecanismo ainda não seja bem esclarecido (KAMINAGAKURA et al., 2012).

Sritippho et al (2016) avaliaram a imunoexpressão da p16 e a sua correlação com a presença do HPV de alto risco de malignidade (HPV16 e 18) em 37 casos de CCEO e 4 casos de carcinoma verrucoso oral (CV) e observaram que a superexpressão da p16 esteve mais associada aos pacientes com idade inferior a 40 anos ( $p=0,009$ ). Por meio de PCR, verificou-se a presença do HPV16 em 14,7% dos casos de CCEO e 25% dos casos de CV. Dos casos que apresentaram superexpressão para a p16, verificou-se que 80% dos CCEO e 20% dos CV mostraram correlação com a presença do HPV de alto risco de malignidade. Com relação ao grau histológico, observou-se uma maior prevalência de lesões bem diferenciadas (60%) para os casos de CCEO positivos para o HPV16. Desta forma os autores sugerem que a superexpressão da proteína p16 pode ser utilizada como marcador para a presença do HPV de alto risco de malignidade em CCEO.

Varun et al. (2014) avaliaram a imunoexpressão da proteína p53 nos processos de transição de malignidade de leucoplasia (20 casos) e fibrose submucosa (20 casos) para o CCEO (20 casos), tendo a mucosa oral normal (10 casos) como grupo controle. Observaram diferença estatisticamente significativa na imunoexpressão da p53 no CCEO quando comparado a leucoplasia ( $p<0,01$ ) e a fibrose submucosa ( $p<0,01$ ). Sugeriram, portanto, que a p53 pode ser apontada como um marcador de transformação maligna para o CCEO.

Abrahão et al. (2011) avaliaram a imunoexpressão da p53 e p16 em 15 casos de lesões potencialmente malignas (LPM) e 30 casos de CCEO, tendo como controle 5 casos de hiperplasia epitelial oral, comparando-a com o grau de diferenciação tumoral. Como resultados, constataram que não havia diferença significativa na imunoexpressão das proteínas em relação ao grau de displasia epitelial ou ao grau de diferenciação dos tumores.

Mais recentemente, Solomon et al (2016) analisaram imunoexpressão das proteínas p53 e p16 relacionadas ao prognóstico do CCEO primário com estadiamento clínico avançado (III/IV). Após realização de regressão logística constatou-se que os casos que apresentavam imunoexpressão da p53 tinham 2,29 vezes mais chance de recorrência. Enquanto que a p16 não mostrou relação direta com a sobrevida livre de doença ou com os desfechos de recorrência e morte.

Portanto, diante do exposto, evidencia-se que ainda há grande controvérsia no que diz respeito a um possível comportamento biológico mais agressivo do CCELO nos pacientes

mais jovens, além da participação das proteínas p16 e p53 no processo da carcinogênese oral e comportamento biológico dos tumores. Tornando, assim, de grande valia a realização desta pesquisa com o intuito de relacionar, através da imunoexpressão da p16 e p53 em casos de CCELO em jovens e idosos, com dados clínicos e morfológicos.

## **OBJETIVOS**

---

## 2 OBJETIVOS

### 2.1 Objetivo Geral

Avaliar de forma comparativa a imunoexpressão das proteínas p16 e p53 em casos de CCELO em pacientes jovens e idosos, relacionando-as com parâmetros clínicos (tamanho do tumor, metástase linfonodal regional, metástase à distância e estadiamento clínico) e morfológicos (grau histológico).

### 2.2 Objetivos Específicos

- Avaliar os parâmetros clínicos (sexo e idade) dos pacientes com CCELO;
- Avaliar os parâmetros clínicos relativos às lesões (tamanho do tumor, metástase linfonodal regional, metástase à distância e estadiamento clínico);
- Avaliar o grau histológico de malignidade dos casos de CCELO em jovens e idosos, segundo o SGHM proposto por Bryne et al. (1992);
- Investigar a imunoexpressão da p16 e p53 nos casos de CCELO entre jovens ( $\leq 45$  anos) e idosos ( $\geq 60$  anos);
- Relacionar a imunoexpressão do p16 e p53 nos casos de CCELO em pacientes jovens e idosos com os parâmetros clínicos (tamanho do tumor, metástase linfonodal regional, metástase à distância e estadiamento clínico);
- Relacionar a imunoexpressão do p16 e p53 nos casos de CCELO em pacientes jovens e idosos com o grau histológico de malignidade (GHM, proposto por Bryne et al, 1992).
- Correlacionar a imunoexpressão das proteínas em cada grupo etário estudado;

## MATERIAL E MÉTODOS

---

### **3 MATERIAL E MÉTODOS**

#### **3.1 Considerações Éticas**

O presente projeto de pesquisa foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), obedecendo aos critérios da Resolução 466/12 do Conselho Nacional de Saúde/Ministério da Saúde, e aprovado segundo o parecer 58218016.7.0000.5187 (Anexo A).

#### **3.2 Caracterização do Estudo**

O estudo consistiu em uma pesquisa transversal, observacional, com o intuito de avaliar a imunoexpressão das proteínas p16 e p53 no CCELO em pacientes jovens e idosos e a associação com parâmetros clinicomorfológicos.

#### **3.3 População e amostra**

A população do presente estudo foi constituída por todos os casos de CCELO, diagnosticados e arquivados, nos últimos 14 anos (2002-2016), no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Napoleão Laureano/ João Pessoa – PB, no Hospital da Fundação Assistencial da Paraíba (FAP)/ Campina Grande – PB e no Hospital Araújo Jorge (HAJ)/ Goiânia- GO.

A amostra, selecionada por conveniência, do tipo não probabilística, foi constituída por 80 casos de CCELO, sendo 40 pacientes jovens, com idade  $\leq 45$  anos, diagnosticados e arquivados, nos hospitais supracitados. E 40 idosos, com idade  $\geq 60$  anos.

##### **3.3.1 Critérios de inclusão**

Foram incluídos na amostra, apenas os casos de CCELO tratados por excisão cirúrgica, que no bloco parafinado continham material suficiente para avaliação do *front* de invasão tumoral.

Além disso, as fichas clínicas dos pacientes continham informações relativas à idade, tamanho do tumor, metástase linfonodal regional, metástase à distância e ao estadiamento clínico inicial (TNM) das lesões.

### 3.3.2 Critérios de exclusão

Foram excluídos da amostra, espécimes 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 dos estudos morfológicos e imunoistoquímico.

### 3.4 Variáveis do estudo

Quadro 1. Variáveis dependentes do estudo

VARIÁVEL	DEFINIÇÃO	CATEGORIZAÇÃO	TIPO
IMUNOEXPRESSÃO DA PROTEÍNA P16	Imunomarcação citoplasmática e/ou nuclear das células neoplásicas pela p16 nos casos de CCELO em jovens e idosos.	Células positivas ao anticorpo  Células negativas ao anticorpo	Quantitativa discreta
IMUNOEXPRESSÃO DA PROTEÍNA P53	Imunomarcação nuclear pela p53 nos casos de CCELO em jovens e idosos.	Células positivas ao anticorpo  Células negativas ao anticorpo	Quantitativa discreta

Quadro 2. Variáveis independentes do estudo

VARIÁVEL	DEFINIÇÃO	CATEGORIZAÇÃO	TIPO
SEXO	Conjunto de características físicas que definem machos e fêmeas	Homem Mulher	Qualitativa nominal
FAIXA ETÁRIA	Idade em anos	Jovens $\leq$ 45 anos Idosos $\geq$ 60 anos	Qualitativa nominal
T	Tamanho do tumor	T1 T2 T3 T4 (a e b)	Qualitativa nominal
T Categorizado	Tamanho dos tumores categorizados	T1/T2 T3/T4	Qualitativa nominal
N	Metástase linfonodal regional	N0 N1 N2 (a, b e c) N3	Qualitativa nominal
N Categorizado	Metástase linfonodal regional categorizada	N0 N1-N3	Qualitativa nominal
M	Metástase à distância	M0 M1	Qualitativa nominal
ESTADIAMENTO CLÍNICO (TNM)	Classificação dos tumores por meio de critérios clínicos (Tamanho - T, metástase para linfonodos - N e metástase a distância - M)	Estágio I Estágio II Estágio III Estágio IV (A, B e C)	Qualitativa nominal
ESTADIAMENTO CLÍNICO (TNM) CATEGORIZADO	Classificação dos tumores por meio de critérios clínicos (Tamanho - T, metástase para	Estágio I/II Estágio III/IV	Qualitativa nominal

	linfonodos - N e metástase a distancia - M) categorizado		
SGHM Bryne et al (1992)	Gradação histológica dos tumores proposta por Bryne et al (1992) por meio de avaliação do <i>front</i> de invasão	Baixo grau de malignidade (escore $\leq 8$ )  Alto grau de malignidade (escore $\geq 9$ )	Qualitativa nominal

### 3.5 Dados clínico patológicos

Informações a respeito da idade, tamanho do tumor, metástase linfonodal regional, metástase à distância e estadiamento clínico (TNM) foram coletadas nos prontuários médicos dos pacientes tratados no Hospital Napoleão Laureano/ João Pessoa-PB, no Hospital da Fundação Assistencial da Paraíba (FAP)/ Campina Grande-PB e no Hospital Araújo Jorge (HAJ)/ Goiânia- GO. Para o estadiamento clínico, foram utilizados os parâmetros elencados pela União Internacional Contra o Câncer (WITTEKIND et al., 2002). Todos os dados clínicos foram anotados em ficha clínica previamente elaborada para esta pesquisa. (APÊNDICE A).

A amostra selecionada, fixada em formol a 10% e incluída em parafina, foi submetida a cortes com 5 $\mu$ m 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 (teste de kappa – calibração intra e inter-examinador) realizaram a análise da gradação histológica de malignidade, de acordo com o sistema proposto por Bryne et al. (1992) (QUADRO 3). Os dados morfológicos foram anotados em ficha previamente elaborada pelos pesquisadores (APÊNDICE B).

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

<b>Aspectos Morfológicos</b>	<b>Escores de Malignidade</b>			
	1	2	3	4
<b>Grau de Ceratinização</b>	Alto (> 50% das células)	Moderado (20-50% das células)	Baixo (>5<20% das células)	Ausente (0-5% das células)
<b>Pleomorfismo Nuclear</b>	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)
<b>Padrão de Invasão</b>	Bordas infiltrativas bem delimitadas	Cordões, bordas e/ou trabéculas sólidas infiltradas	Pequenos grupos ou cordões de células infiltrativas ( $N>15$ )	Infiltração difusa e pronunciada, em pequenos grupos celulares e/ou células individuais ( $N<15$ )
<b>Infiltrado Inflamatório</b>	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 menores ou iguais 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).

### 3.6 Estudo imunoistoquímico

#### 3.6.1 Método imunoistoquímico

A amostra foi submetida a cortes com 3 $\mu$ m de espessura, os quais foram estendidos em lâminas de vidro devidamente limpas e desengorduradas e preparadas com adesivo à base de 3aminopropyltriethoxi-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 (Spring Biosciences) utilizando os anticorpos anti-p16 e anti-p53 (QUADRO 4). O controle negativo consistiu na substituição do anticorpo primário por albumina de soro bovino (BSA) a 1% em solução tampão. O controle positivo consistiu em caso de mucosa oral normal, para a p16 e Carcinoma de Células Escamosas Oral, para a p53. A técnica utilizada seguiu o protocolo do Laboratório de Imunoistoquímica do Programa de Pós-graduação em Odontologia da UEPB, conforme descrito a seguir:

- Desparafinização: 2 banhos em xanol, à temperatura ambiente (10 minutos cada);
- Reidratação em cadeia descendente de etanóis:
  - Álcool etílico absoluto I (5 minutos);
  - Álcool etílico absoluto II (5 minutos);
  - Álcool etílico absoluto III (5 minutos);
  - Álcool etílico 95°GL (5 minutos);
  - Álcool etílico 80°GL (5 minutos);
- Remoção de pigmentos formólicos com hidróxido de amônia a 10% em etanol 95°, 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);
- Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 (5 minutos cada);
- Incubação dos cortes com anticorpo primário, em solução diluente (*Antibody diluent with background reducing components*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA);
- Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 (5 minutos cada);

- Incubação com anticorpo secundário (*Complement*, Spring Bioscience, Pleasanton, CA, USA), à temperatura ambiente (30 minutos);
- Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 (5 minutos cada);
- Incubação com anticorpo polimerizado à peroxidase (*HRP Conjugated*, Spring Bioscience, Pleasanton, CA, USA), à temperatura ambiente (30 minutos);
- Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4 (5 minutos cada);
- Revelação da reação com solução cromógena de 3,3-diaminobenzidina (*Liquid DAB+ Substrate*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA) (7 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 xanol (2 minutos cada);
- Montagem em resina *Permount®* (Fisher Scientific Inc., Fair Lawn, NJ, USA).

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

Especificidade	Clone	Fabricante	Diluição	Recuperação antigênica	Incubação
p16	1661	Santa Cruz Biotechnology	1:200	Steamer, Citrato, pH 6.0, 60 min, 90°C	60 min
p53	DO-7	DAKO	1:250	Steamer, Citrato, pH 6.0, 60 min, 90°C	60 min

### 3.6.2 Análise Quantitativa

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 avaliado. Todos os dados da análise imunoistoquímica foram anotados em ficha previamente elaborada pelo pesquisador.

Para os casos de CCELO nos jovens e idosos, foram avaliadas as áreas de maior imunoexpressão no *front* de invasão tumoral. Para todas as amostras, sob aumento de 100×, foram selecionadas 07 áreas de maior imunorreatividade aos anticorpos estudados. 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), as células apresentando coloração acastanhada no citoplasma e/ou no núcleo foram consideradas como positivas para a p16 e núcleo acastanhado positivas para a p53.

Baseada na metodologia proposta e adaptada por Liu et al (2015) e Varun et al. (2014) para a imunoexpressão da p16 e p53, respectivamente, em cada um dos campos fotomicrografados, foi realizada a contagem das células imunopositivas a p16 (nuclear e citoplasmática) e p53 (nuclear). A partir disso, realizou-se o Índice de Positividade (IP) para cada proteína estudada, conforme segue a fórmula abaixo:

$$\text{IP} = \frac{\text{nº de células positivas}}{1000 \text{ células}} \times 100$$

### 3.7 Análise estatística

Os resultados obtidos foram digitados em planilha eletrônica Excel (Microsoft Office 2013®) e, posteriormente, exportados para o programa SPSS 20.0 (IBM SPSS Statistics). Os resultados foram apresentados como média e desvio-padrão ou mediana, conforme distribuição não normal, respectivamente, verificado pelo teste de Kolmogorov Smirnov. Os testes Qui-quadrado e exato de Fisher foram utilizados para averiguar prováveis associações entre os parâmetros clínicos (tamanho do tumor, metástase linfonodal regional e a distância, estadiamento clínico) e morfológicos (SGHM);

O teste de Mann-Whitney foi aplicado para verificar possíveis diferenças nas medianas dos IP em relação ao grupo de jovens e idosos, tamanho do tumor, metástase linfonodal regional e a distância, estadiamento clínico (I/II e III/IV) e SGHM (Baixo e Alto grau de malignidade). A correlação de Spearman foi utilizada para verificar se existia correlação entre as imunoexpressões das proteínas p16 (nuclear e citoplasmática) e p53 em cada grupo. Os valores de  $p < 0,05$  foram considerados.

**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 o artigo intitulado “***Imunoexpressão da p16 e p53 e sua relação com parâmetros clínico-morfológicos em carcinoma de células escamosas de língua oral em jovens e idosos***”, será apresentado como fruto desta dissertação.

Após as devidas considerações da banca da defesa desta dissertação, o artigo será colocado nas normas e enviado para a tradução do inglês e posteriormente submetido ao periódico *Journal of Oral Pathology & Medicine* (ISSN: 1600-0714, Fator de Impacto: 1.859, Qualis para Odontologia: A2), cujas normas para submissão de trabalhos encontram-se no anexo B.

## 4.2 ARTIGO A SER SUBMETIDO

**Imunoexpressão da p16 e p53 e sua relação com parâmetros clínico-morfológicos em carcinoma de células escamosas de língua oral em jovens e idosos**

**Association of the immunoexpression of p16 and p53 with clinical and morphological parameters in oral tongue squamous cell carcinoma in young and elderly**

**Running title:** p16 and p53 in oral cancer between young and older

**Keywords:** Oral squamous cell carcinoma, young, old, p16, p53

Luan Éverton Galdino Barnabé<sup>1</sup>, Aline Carvalho Batista<sup>2</sup>, Elismauro Francisco de Mendonça<sup>2</sup>, Cassiano Francisco Weege Nonaka<sup>1</sup>, Pollianna Muniz Alves<sup>1</sup>

<sup>1</sup> Department of Dentistry, School of Dentistry, State University of Paraíba, Campina Grande, Paraíba, PB, Brazil.

<sup>2</sup> Department of Oral Medicine (Oral Pathology), School of Dentistry, Federal University of Goiás, Goiânia, GO, Brazil.

### **Author's correspondence:**

Pollianna Muniz Alves

Department of Dentistry

Rua das Baraúnas, 351, Bairro Universitário, Campina Grande, Paraíba, Brazil.

CEP: 58429-500 Phone/Fax: +55 83 3315-3471

e-mail: [pmunizalves@gmail.com](mailto:pmunizalves@gmail.com)

## ABSTRACT

**Background:** The incidence of oral tongue squamous cell carcinoma (OTSSC) is rising in young patients, where the biological behavior compared to older patients is controversial in the literature. Little is known about the pathological mechanisms involved in its variance. Dysregulation of proteins of cell cycle is a crucial event to carcinogenesis. We aimed to analyze immunoexpression of p16 and p53 in OTSSC between young and older patients relating to clinical and morphological parameters.

**Methods:** Sample was composed of 80 cases of OTSSC: 40 cases in young ( $\leq 45$  yo) and 40 in older ( $\geq 60$  yo). Clinical (tumor size, regional node metastasis, distant metastasis and clinical stage) and morphological (histological grade of malignancy) parameters were evaluated. Immunohistochemical analysis was performed using anti-p16 and anti-p53 antibodies.

**Results:** Was observed nuclear immunoexpression of p16 in 77.5% (31/40) of OTSSC in young (median 10.80) and 95% (38/40) in older (median 31.65) patients and cytoplasmic immunoexpression of p16 in 37.5% (15/40) of cases, in both age groups. There were significant difference of nuclear immunoexpression of p16 in relation to tumor size ( $p=0.02$ ) and clinical stage ( $p=0.02$ ) in older. It was observed positive correlation ( $r=0.39$ ,  $p=0.01$ ) between nuclear and cytoplasmic immunoexpression of p16 in the young patients. The p53 exhibited immunoexpression in 77.5% (31/40) of cases in the young (median 18.75) and 87.5% (35/40) in the older (median 19.55) ( $p>0.05$ ). There were no association between p53 with none clinicalmorphological parameters.

**Conclusions:** p16 and p53 are not suitable markers to differentiate biological behavior of the OTSSC between young and older patients.

## Introdução

O Carcinoma de Células Escamosas Oral (CCEO) está entre as dez neoplasias malignas mais comuns<sup>1,2</sup>, acometendo principalmente indivíduos do sexo masculino<sup>3-5</sup>, na faixa etária entre a quinta e sétima décadas de vida<sup>2,3</sup>. A língua representa o sítio anatômico mais comum de acometimento por essa neoplasia<sup>2</sup>, além de estar associada a um comportamento biológico mais agressivo e um pior prognóstico<sup>5</sup>. Dentre os fatores etiológicos clássicos pra essa neoplasia destacam-se o tabagismo e alcoolismo<sup>4,6</sup>.

Nos últimos anos, observou-se um aumento na incidência global do Carcinoma de Células Escamosas de Língua (CCEL)<sup>5</sup>, associado ao aumento no número de casos de acometimento a adultos jovens ( $\leq 45$  anos)<sup>5,6</sup>. A incidência dessa neoplasia em adultos jovens representa uma frequência variada de 1,4 a 13% de todos os casos de CCEO<sup>2,4,7-10</sup>. A etiopatogenia do CCEO em jovens ainda é bastante discutida na literatura, uma vez que muitos dos pacientes não estão expostos aos fatores de risco clássicos<sup>4,8,11-13</sup>. Dentre os fatores etiológicos que são sugeridos para esta faixa etária estão fatores hereditários<sup>12,13</sup> e a participação do HPV<sup>1,14,15</sup>.

Outro ponto de divergência na literatura é quanto ao comportamento biológico do CCEO em jovens, estando os jovens, por vezes, relacionados a um comportamento biológico mais agressivo<sup>7,11</sup> e em outros estudos não demonstrando diferença em relação ao grupo de idosos<sup>3,4,16</sup>. Como tentativa de elucidação do comportamento biológico do CCEO nos jovens, estudos moleculares envolvendo os mecanismos de regulação e progressão desta neoplasia vem sendo realizados<sup>3,16</sup>.

As proteínas do ciclo celular desempenham um papel fundamental na regulação das neoplasias malignas, estando ligados a uma série de erros nos pontos de checagem, e no reconhecimento e correção de mutações. Pode-se ressaltar que o gene P53 está mutado em 35 a 67% dos casos de CCEO<sup>17</sup>. A p16 é um inibidor da divisão celular, produto do gene CDKN2, localizado no cromossomo 9p21. A inativação desse lócus é um evento precoce na carcinogênese oral relacionada à perda da senescência e imortalização celular<sup>18</sup>. A inativação da p16 e a mutação da p53 são eventos primordiais para oncogênese, além de influenciar no prognóstico dos tumores<sup>19,20</sup>.

Pesquisas demostram superexpressão da p16 e p53 em CCEO<sup>21,22</sup>, onde na maioria dos casos está relacionada a um pior prognóstico. No entanto, até o presente momento, nenhum estudo foi encontrado na literatura, avaliando a imunoexpressão da p16 e p53 em diferentes

grupos etários de pacientes com CCELO. Desta forma, o objetivo deste trabalho é avaliar, comparativamente, a imunoexpressão das proteínas p16 e p53 em uma série de casos de CCELO em pacientes jovens ( $\leq 45$  anos) e idosos ( $\geq 60$  anos), relacionando-as a parâmetros clínico-morfológicos, a fim de compreender possíveis diferenças no comportamento biológico dos tumores em ambos os grupos.

## **Materiais e Métodos**

### **Desenho do estudo**

Por meio de uma amostra de conveniência, foram selecionados 80 casos de CCELO, tratados por excisão cirúrgica e diagnosticados no período entre 2002 e 2016, de três hospitais de referência em oncologia. A idade do paciente ao diagnóstico do CCELO determinou sua alocação nos grupos de estudo. A amostra foi dividida em dois grupos: 40 casos de CCELO em pacientes jovens ( $\leq 45$  anos) e 40 casos em pacientes idosos ( $\geq 60$  anos), dos quais foram avaliados parâmetros clínicos, morfológico e imunoistoquímicos. Foram excluídos da pesquisa os casos que não continham as informações clínicas necessárias nos prontuários médicos ou blocos parafinados que não apresentavam material suficiente para análise, ou que o paciente tenha sido submetido previamente a radio ou quimioterapia. O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética da Universidade Estadual da Paraíba (Nº do protocolo 58218016.7.0000.5187).

### **Estudo Clínico e Morfológico**

A análise clínica foi realizada por meio dos dados presentes nos prontuários médicos: sexo, tamanho do tumor, metástase linfonodal e à distância, estadiamento clínico TNM. No estudo morfológico, os blocos parafinados foram submetidos a cortes histológicos de 5- $\mu\text{m}$  de espessura e levados à coloração de rotina com hematoxilina-eosina. A análise dos tecidos se deu segundo o sistema de graduação histológica de malignidade (SGHM) proposto por Bryne et al.<sup>23</sup>, através da adaptação da metodologia de Silveira et al.<sup>24</sup>, classificando os casos com escores  $\leq 8$  como baixo grau de malignidade e os casos com escore  $\geq 9$  como de alto grau de malignidade.

### **Estudo imunoistoquímico**

Para o estudo imunoistoquímico, os blocos parafinados foram submetidos a cortes histológicos de 3- $\mu\text{m}$  espessura e em seguida estendidos em lâminas de vidro silanizadas (Sigma Chemical Co., St Louis, MO, EUA). Em seguida submetido à imunoistoquímica pelo método da imunoperoxidase baseada em polímeros de dextrano, seguindo as etapas: desparafinização, reidratação, remoção de pigmentos formólicos com hidróxido de amônia a 10% em etanol 95°, à temperatura ambiente, recuperação antigênica, bloqueio da peroxidase endógena por meio duas passagens em peróxido de hidrogênio a 3% 10 volumes. O material foi imerso em Tween 20 a 1% em tampão de Tris-HCl, pH 7,4, durante 5 min cada, e em seguida, realizou-se incubação com os anticorpos monoclonais anti-p16 e anti-p53, de acordo com as especificações mostradas na Tabela 1. O controle negativo consistiu na substituição do anticorpo primário por albumina de soro bovino (BSA) a 1% em solução tampão. O controle positivo consistiu em caso de mucosa oral normal, para p16 e para a p53 foi o CCE de língua com elevada expressão.

A reação foi desenvolvida com peroxidase e utilizando 3'3-diaminobenzidina LSAB II® Kit (Liquid DAB + substrate, Dako, Carpinteira, CA, USA). As lâminas foram contra coradas com hematoxilina de Mayer e cobertas com Permount.

### **Análise imunoistoquímica**

Para analise imunoistoquímica, todas as lâminas foram avaliadas sob microscopia óptica de luz, e as áreas de maior imunopositividade no *front* de invasão tumoral foram fotomicrografadas com ampliação de x400. Em seguida, 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 células neoplásicas para realização do índice de positividade (total de células neoplásicas imunopositivas, divididos por mil e multiplicado por cem), utilizando a metodologia proposta por Liu et al.<sup>25</sup> e Varun et al.<sup>26</sup> para a imunoexpressão da p16 e p53, respectivamente. As células apresentando coloração acastanhada no citoplasma e/ou no núcleo foram consideradas como positivas para a p16 e núcleo acastanhado positivas para a p53.

### **Análise estatística**

Os resultados obtidos foram submetidos à análise estatística, utilizando o programa SPSS (Statistical Package for the Social Sciences, versão 17.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Os testes Qui-quadrado e exato de Fisher foram utilizados para averiguar possíveis associações entre a imunoexpressão das proteínas p16 (citoplasmática e nuclear) e p53 (nuclear) com os parâmetros clínico-morfológicos (tamanho do tumor, metástase linfonodal regional, metástase à distância, estadiamento clínico e SGHM). A imunoexpressão das proteínas entre os grupos foi avaliada através dos testes de Mann-Whitney e da Correlação de *Spearman*. Para todos os testes, os valores de  $p < 0,05$  foram considerados significativos.

## Resultados

A análise dos 80 casos de CCELO demonstrou uma maior prevalência de indivíduos do sexo masculino, tanto no grupo de jovens ( $\leq 45$  anos) (67,5%; n=27) quanto nos idosos ( $\geq 60$  anos) (55,0%; n=22), sendo a idade média entre os jovens  $38,18 \pm 6,27$  e de  $71,43 \pm 7,78$  entre os idosos (Tabela 2).

Na avaliação dos critérios clínicos, os jovens apresentaram uma maior prevalência de tumores T4 (22,5%; 9/40), enquanto nos idosos houve maior número de tumores T2 (50,0%; 20/40). Em relação à metástase linfonodal regional e metástase à distância, observou-se N0 e M0 na maior parte dos casos, tanto no grupo dos jovens (N0: 57,5%, 23/40; M0: 97,5%, 39/40), quanto nos idosos (N0: 75,0%, 30/40; M0: 92,5%, 37/40). Quanto ao estadiamento clínico TNM, observou-se maior frequência no estágio IV (32,5%; 13/40) nos pacientes jovens, enquanto que no grupo de idosos no estágio II (37,5%; 15/40). Na análise morfológica, observou-se maior quantidade de casos classificados como de alto grau de malignidade em ambos os grupos (jovens, 80,0%, 32/40; idosos, 87,5%, 35/40) (Tabela 2) (Figura 1A e 1D).

Considerando a associação entre parâmetros clínicos e morfológico do CCELO entre pacientes jovens e idosos, não foi observada significância estatística para nenhum dos parâmetros analisados ( $p > 0,05$ ), embora pôde se constatar que nos jovens houve uma maior frequência de casos em estágios mais iniciais (I/II) no grupo dos idosos (67,5%, 27/40) enquanto nos jovens, em estágios mais avançados (III/IV) (52,5%, 21/40) (Tabela 3).

Em relação à imunoexpressão das proteínas, a p16 demonstrou positividade nuclear em 77,5% (31/40) dos casos de CCELO em jovens (mediana 10,80) e 95% (38/40) dos casos em idosos (mediana 31,65), não apresentando diferença estatística entre os grupos ( $p = 0,115$ ) (Tabela 4). Em relação à imunoexpressão citoplasmática da p16, considerando toda a amostra

avaliada ( $n=80$ ) não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os grupos ( $p>0,05$ ) (Tabela 4). No entanto, pode se evidenciar que aqueles casos que exibiram positividade citoplasmática da p16 também exibiam positividade nuclear. Sendo assim, essa imunoexpressão nuclear/citoplasmática da p16 esteve presente em 37,5% ( $n=15$ ) dos casos, tanto no grupo dos jovens (mediana 10,0) quanto dos idosos (mediana 0,70), exibindo, dessa forma, diferença estatisticamente significativa entre os grupos etários ( $p=0,036$ ) (Figura 2). Quanto a p53, observou-se imunopositividade em 77,5% (31/40) dos casos de CCELO em jovens (mediana 18,75) e em 87,5% (35/40) nos idosos (mediana 19,55), e sem diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos ( $p=0,896$ ) (Tabela 4).

No que diz respeito à imunoexpressão nuclear da p16 em relação aos parâmetros clínico-morfológicos nos dois grupos etários estudados, evidenciou-se associação estatisticamente significativa com o tamanho do tumor ( $p=0,028$ ) e estadiamento clínico ( $p=0,023$ ) no grupo dos idosos, exibindo maior imunoexpressão nos casos de tamanho de tumor T3/T4 e estadiamentos clínicos mais avançados (III/IV) (Tabela 5) (Figura 1B e 1E). Associando-se a imunoexpressão citoplasmática da p16 com os parâmetros clínico-morfológicos, em toda a amostra estudada ( $n=80$ ) não foi observada significância estatística ( $p>0,05$ ), em nenhum dos grupos etários.

Relacionando a imunoexpressão da p53 com os parâmetros clínicos e morfológico, não houve significância estatística em nenhum dos grupos etários estudados ( $p>0,05$ ), embora nos grupo dos jovens pode se observar maiores medianas em tumores de tamanhos menores, sem metástase regional, em estágios clínicos iniciais (I/II), bem como em casos de baixo grau de malignidade, diferentemente do grupo dos idosos, onde as maiores medianas de imunopositividade da p53 foram observadas em tumores com metástases regional, em estágios mais avançados (III/IV) e de alto grau de malignidade (Tabela 6) (Figura 1C e 1F).

O teste de correlação de Spearman ( $r$ ) demonstrou fraca correlação positiva estatisticamente significativa entre as imunoexpressões nucleares e citoplasmáticas da p16 ( $r=0,395$ ;  $p=0,012$ ) nos casos de CCELO em indivíduos jovens. Para o grupo dos idosos, nenhuma correlação estatisticamente significativa foi observada entre as expressões das proteínas p16 e p53 ( $p>0,05$ ).

## **Discussão**

Nos últimos anos pode se observar que a incidência de CCEO em indivíduos mais jovens tem aumentado consideravelmente, e que a maior parte desses indivíduos não estão

expostos aos principais fatores de risco como fumo e álcool<sup>2,4,9,10,27</sup>. Neste grupo etário, outros fatores de risco são sugeridos como HPV, hereditariedade e alterações hormonais, principalmente, quando em mulheres jovens<sup>12,13,28,29</sup>. E segundo Patel et al.<sup>8</sup>, Honorato et al.<sup>28</sup> e Ng et al.<sup>5</sup> a quantidade de casos de CCEO em mulheres jovens é bastante expressiva. Embora em nosso estudo, pode se observar que os homens foram os mais acometidos nos dois grupos etários.

Diante destas características peculiares do CCEO encontradas nos pacientes jovens acredita-se que pode existir um comportamento biológico mais agressivo quando comparado aos pacientes idosos<sup>7,11,15,27</sup>. Embora alguns outros estudos não evidenciem esta diferença nos grupos etários com CCEO<sup>4,18</sup>. Em nosso estudo também não foi observada diferença significativa no tocante aos parâmetros clínicos e morfológicos do CCEO entre jovens e idosos, embora grande parte dos casos de CCEO nos jovens tenham sido diagnosticados com tamanhos de tumores maiores (T3/T4) e em estadiamentos clínicos mais avançados (III/IV) do que nos idosos. Sugere-se, portanto, que nos pacientes jovens o diagnóstico do CCEO seja mais tardio ou até mesmo exibam um comportamento mais agressivo.

Diferentemente do nosso estudo, Soudry et al.<sup>7</sup>, Benevenuto et al.<sup>3</sup> e Hilly et al.<sup>30</sup> encontraram associação estatisticamente significativa do CCEO nos pacientes mais jovens com estadiamento clínico mais avançado (III/IV). Observa-se, assim, índices maiores de envolvimento linfonodal regional e maiores índices de recorrência nesses pacientes jovens, e consequentemente, um pior prognóstico<sup>30</sup>.

No que diz respeito ao grau histológico de malignidade, encontramos uma distribuição semelhante de tumores classificados como de baixo e alto grau de malignidade nos dois grupos etários, semelhantemente aos resultados encontrados em estudos anteriores<sup>3,7,30</sup>. Embora, De Moraes et al.<sup>31</sup> em uma revisão sistemática sobre fatores de prognóstico do CCEO em pacientes jovens relatam que, grande parte dos estudos encontrados na literatura, mostram maior frequência de CCEO em pacientes jovens classificados como bem diferenciados a moderadamente diferenciados, tendo em vista que o sistema de graduação histológica mais utilizado é o da Organização Mundial da Saúde (2005). Portanto, observa-se que, isoladamente, a graduação histológica de malignidade parece não exercer muita influência no comportamento biológico distinto entre pacientes jovens e idosos.

Estudos moleculares também têm sido utilizados com o intuito de determinar se o CCEO nos pacientes jovens é uma entidade distinta de quando presente nos pacientes idosos<sup>32-34</sup>. Wang et al.<sup>32</sup> observaram diferença significativa da incidência de instabilidade de microssatélites em CCE de cabeça e pescoço em pacientes jovens, comparada aos idosos.

Santos-Silva et al.<sup>38</sup> detectaram altas incidências de anormalidades na ploidia do DNA de CCELO em pacientes jovens sugerindo, assim, acentuada instabilidade genômica e indicando diferenças genéticas do CCELO entre jovens e idosos. Adduri et al.<sup>34</sup> observaram correlação significativa da imunoexpressão da p53 com perda de heterozigidez do *FIHT* em CCELO em pacientes jovens ( $\leq 45$  anos de idade), e concluíram que a patogenia do CCELO em jovens exibe características distintas e sugere também possível utilização do p53 como marcador de prognóstico nesses casos.

Em contrapartida, Siriwardena et al.<sup>35</sup> não encontraram diferença estatística na imunoexpressão da p53 em CCELO entre jovens ( $< 40$  anos de idade) e idosos ( $> 50$  anos de idade). Resultados semelhantes foram encontrados em nosso estudo, onde a imunoexpressão do p53 exibiu medianas similares nos casos de CCELO tanto nos jovens quanto nos idosos. Dos oitenta casos de CCELO avaliados em nosso estudo, trinta e um casos (77,5%) em jovens e trinta e cinco casos (87,5%) nos idosos foram imunopositivos para a p53. Diversos estudos mostram uma alta expressão da p53 em aproximadamente 90% de todos os casos de CCELO<sup>20,34,35</sup>, e usualmente, resultantes de mutações aleatórias, ocasionadas por alterações em um aminoácido e provável alteração da estabilidade da proteína<sup>36</sup>.

A desregulação das proteínas do ciclo celular é bastante evidente em casos de CCELO, e dessa forma podem contribuir para um melhor entendimento do comportamento biológico destas neoplasias<sup>17,18,20</sup>. Neste contexto podemos citar as Inibidoras de Quinase dependentes de Ciclina (CdKI), tal como a p16<sup>18,22</sup>, que é uma proteína supressora tumoral, produto do gene CDKN2 e está localizada no cromossomo 9p21<sup>18</sup>. Em nosso estudo, considerando a amostra total, não observamos diferença significativa da imunoexpressão nuclear da p16 nos casos de CCELO entre jovens (77,5%; 31/40 casos) e idosos (95%; 38/40 casos). Similarmente, Kaminanagura et al.<sup>14</sup> também não observaram diferença significativa na imunoexpressão da p16 em casos de CCEO entre jovens ( $\leq 40$  anos de idade) e idosos ( $\geq 50$  anos de idade), embora acrescentaram que havia correlação da imunoexpressão da p16 com o HPV (subtipo 16), no grupo dos pacientes jovens. Sugerindo, assim, que o HPV poderia ser um fator de risco para o CCEO em jovens. Em nosso estudo, considerando os quinze casos (37,5%) de cada grupo etário que exibiram imunopositividade nuclear/citoplasmática para a p16, constatou-se uma significância estatística, sendo nos jovens encontrada essa maior imupositividade, e observamos também uma correlação positiva da imunoexpressão nuclear e citoplasmática da p16 no grupo dos pacientes jovens. Inferimos então que, nesses casos, estudos mais específicos, como a hibridização *in situ*, poderiam avaliar a real participação do HPV no CCELO desses pacientes jovens.

De acordo com Larsen et al.<sup>37</sup>, quantitativamente, a imunomarcação da p16 é melhor para predizer a presença do HPV quando o *cut-off* é  $\geq 70\%$  de marcação nuclear e citoplasmática das células neoplásicas. Embora, Singh et al.<sup>38</sup> enfatiza que a expressão do p16 para avaliação de positividade para HPV em CCEO não seja um marcador confiável. Portanto, sugere-se que estes diferentes resultados encontrados na literatura podem ser devidos as variadas metodologias empregadas, bem como a caracterização da amostra populacional.

Com intuito de avaliar a utilização dessas proteínas como marcadores de prognóstico em CCEO, estudos são realizados associando a imunoexpressão com outros fatores de prognóstico como sexo dos pacientes, hábitos nocivos, estadiamento clínico, tipo de tratamento e sobrevida<sup>1,30,38,39</sup>. Em nossos resultados não encontramos significância estatística da associação da imunopositividade da p53 com nenhum parâmetro clínico-morfológico em nenhum dos dois grupos etários estudados, onde podemos inferir que a p53 não poderia ser utilizada como marcador de prognóstico nem para jovens nem para idosos com CCELO. No entanto, observamos significância estatística da imunoexpressão nuclear da p16 com tamanhos de tumores maiores (T3/T4) e estágios clínicos mais avançados (III/IV) apenas no grupo dos idosos. Baseado nisto, sugerimos então que a p16 desempenha seu papel em estágios mais tardios da carcinogênese do CCELO nos idosos e que poderia ser utilizada como marcador de prognóstico para esses pacientes.

Diferentemente, Rushatamukayanunt et al.<sup>1</sup> avaliaram a imunoexpressão da p16 e p53 em casos de CCEO em jovens ( $\leq 40$  anos) e idosos ( $> 40$  anos) e encontraram diferenças estatísticas da imunomarcação da p53 entre os grupos etários estudados, associação da imunoexpressão combinada da p16 e p53 com a graduação histológica dos tumores, na amostra total, bem como ausência da relação com o HPV. Os autores concluíram, portanto, que o HPV não seria um fator de risco para o CCEO em pacientes jovens e que a p16 não seria um marcador apropriado para infecção pelo HPV em CCEO. McDowell et al.<sup>39</sup> acrescenta que a imunoexpressão da p16 também não está relacionada com HPV nem com o prognóstico em casos de CCE de cabeça e pescoço.

Além dos CCEO, essa correlação da imunoexpressão da p53 e da p16 também é observada em diversas patologias, como desordens potencialmente malignas<sup>21</sup>, câncer de colón de útero<sup>17,40</sup> e melanomas orais<sup>21</sup>, estando, na maioria desses estudos, associada a piores prognósticos. No entanto, essa correlação da p53 e p16 em CCELO levando em consideração a faixa etária dos pacientes ainda é escassa na literatura.

E como mostrou nossos resultados, podemos concluir que a p16 e a p53 agem de forma independente na patogênese do CCELO tanto nos jovens quanto nos idosos, não podendo ser utilizadas como marcadores adequados para diferenciar o comportamento biológico do CCELO entre as faixas etárias estudadas. Acrescentando também que a p16 desempenha seu papel na patogênese do CCELO em idosos nos estágios clínicos mais tardios (III/IV) da doença, influenciando, assim, em um pior prognóstico do CCELO em pacientes idosos.

## **Referências**

1. Rushatamukayanunt P, Morita K, Matsukawa S, Harada H, Shimamoto H, Tomioka H, et al. Lack of association between high-risk human papillomaviruses and oral squamous cell carcinoma in young Japanese patients. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2014; 15(10): 4135-41.
2. Komolmalai N, Chuachamsai S, Tantiwipawin S, Dejsuvan S, Buhngamongkol P, Wongvised C, et al. Ten-year analysis of oral cancer focusing on young people in northern Thailand. *J Oral Sci.* 2015; 57(4): 327-34.
3. 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; 20(3): 291-7.
4. 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; 8(8): 12418-23.
5. Ng JH, Iyer NG, Tan MH, Edgren G. Changing epidemiology of oral squamous cell carcinoma of the tongue: A global study. *Head Neck.* 2017; 39(2): 297-304.
6. LeHew CW, Weatherspoon DJ, Peterson CE, Goben A, Reitmajer K, Srourssi H, et al. The Health System and Policy Implications of Changing Epidemiology for Oral Cavity and Oropharyngeal Cancers in the United States From 1995 to 2016. *Epidemiol Rev.* 2017; 39(1): 132-147.
7. Soudry E, Preis M, Hod R, Hamzany Y, Hadar T, Bahar G, et al. Squamous cell carcinoma of the oral tongue in patients younger than 30 years: clinicopathologic features and outcome. *Clin Otolaryngol.* 2010; 35(4): 307-12.
8. Patel SC, Carpenter WR, Tyree S, Couch ME, Weissler M, Hackman T, et al. Increasing incidence of oral tongue squamous cell carcinoma in young white women, age 18 to 44 years. *J Clin Oncol.* 2011; 29(11): 1488-94.
9. Troeltzsch M, Knösel T, Eichinger C, Probst F, Troeltzsch M, Woodlock T, et al. Clinicopathologic features of oral squamous cell carcinoma: do they vary in different age groups? *J Oral Maxillofac Surg.* 2014; 72(7): 1291-300.

10. 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; 21(2): e151-6.
11. Siriwardena BS, Tilakaratne A, Amaratunga EA, Tilakaratne WM. Demographic, aetiological and survival differences of oral squamous cell carcinoma in the young and the old in Sri Lanka. *Oral Oncol.* 2006; 42(8): 831-6.
12. Hirota SK, Braga FP, Penha SS, Sugaya NN, Migliari DA. Risk factors for oral squamous cell carcinoma in young and older Brazilian patients: a comparative analysis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2008; 13(4): E227-31.
13. De Paula AM, Souza LR, Farias LC, Corrêa GT, Fraga CA, Eleutério NB, 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.* 2009; 45(9): 777-82.
14. Kaminagakura E, Villa LL, Andreoli MA, Sobrinho JS, Vartanian JG, Soares FA, et al. High-risk human papillomavirus in oral squamous cell carcinoma of young patients. *Int J Cancer.* 2012; 130(8): 1726-32.
15. Knopf A, Lempart J, Bas M, Slotta-Huspenina J, Mansour N, Fritzsche MK. Oncogenes and tumor suppressor genes in squamous cell carcinoma of the tongue in young patients. *Oncotarget.* 2015; 6(5): 3443-51.
16. 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; 10(4): 514-7.
17. Amaro-Filho SM, Golub JE, Nuovo GJ, Cunha CB, Levi JE, Villa LL, et al. A comparative analysis of clinical and molecular factors with the stage of cervical cancer in a Brazilian cohort. *PLoS One.* 2013; 8(3): e57810.
18. Cuevas Gonzalez JC, Gaitan Cepeda LA, Borges Yanez SA, Cornejo AD, Mori Estevez AD, Huerta ER. p53 and p16 in oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma: A study of 208 cases. *Indian J Pathol Microbiol.* 2016; 59(2): 153-8.
19. Prasad ML, Patel SG, Shah JP, Hoshaw-Woodard S, Busam KJ. Prognostic significance of regulators of cell cycle and apoptosis, p16(INK4a), p53, and bcl-2 in primary mucosal melanomas of the head and neck. *Head Neck Pathol.* 2012; 6(2): 184-90.
20. Solomon MC, Vidyasagar MS, Fernandes D, Guddattu V, Mathew M, Shergill AK, Cornelio S, Chandrashekhar C. The prognostic implication of the expression of EGFR, p53, cyclin D1, Bcl-2 and p16 in primary locally advanced oral squamous cell carcinoma cases: a tissue microarray study. *Med Oncol.* 2016; 33(12): 138.
21. Abrahao AC, Bonelli BV, Nunes FD, Dias EP, Cabral MG. Immunohistochemical expression of p53, p16 and hTERT in oral squamous cell carcinoma and potentially malignant disorders. *Braz Oral Res.* 2011; 25(1): 34-41.

22. Heaton CM, Durr ML, Tetsu O, van Zante A, Wang SJ. TP53 and CDKN2a mutations in never-smoker oral tongue squamous cell carcinoma. *Laryngoscope*. 2014; 124(7): E267-73.
23. 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; 166(4): 375-81.
24. 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; 15(4): 376-83.
25. Liu SZ, Zandberg DP, Schumaker LM, Papadimitriou JC, Cullen KJ. Correlation of p16 expression and HPV type with survival in oropharyngeal squamous cell cancer. *Oral Oncol*. 2015; 51(9): 862-9.
26. Varun BR, Ranganathan K, Rao UK, Joshua E. Immunohistochemical detection of p53 and p63 in oral squamous cell carcinoma, oral leukoplakia, and oral submucous fibrosis. *J Investig Clin Dent*. 2014; 5(3): 214-9.
27. 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; 47(2): 95-8.
28. Honorato J, Rebelo MS, Dias FL, Camisasca DR, Faria PA, Azevedo e Silva G, et al. Gender differences in prognostic factors for oral cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2015; 44(10): 1205-11.
29. Dholam KP, Chouksey GC. Squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx in patients aged 18-45 years: A case-control study to evaluate the risk factors with emphasis on stress, diet, oral hygiene, and family history. *Indian J Cancer*. 2016; 53(2): 244-251.
30. Hilly O, Shkeddy Y, Hod R, Soudry E, Mizrahi A, Hamzany Y, et al. Carcinoma of the oral tongue in patients younger than 30 years: comparison with patients older than 60 years. *Oral Oncol*. 2013; 49(10): 987-90.
31. De Moraes EF, Mafra RP, Gonzaga AK, de Souza DL, Pinto LP, da Silveira ÉJ. Prognostic Factors of Oral Squamous Cell Carcinoma in Young Patients: A Systematic Review. *J Oral Maxillofac Surg*. 2016. pii: S0278-2391(16) 31286-1.
32. Wang Y, Irish J, MacMillan C, Brown D, Xuan Y, Boyington C, Gullane P, Kamel-Reid S. High frequency of microsatellite instability in young patients with head-and-neck squamous-cell carcinoma: lack of involvement of the mismatch repair genes hMLH1 AND hMSH2. *Int J Cancer*. 2001; 93(3): 353-60.
33. Santos-Silva AR, Ribeiro AC, Soubhia AM, Miyahara GI, Carlos R, Speight PM, et al. High incidences of DNA ploidy abnormalities in tongue squamous cell carcinoma of young patients: an international collaborative study. *Histopathology*. 2011; 58(7): 1127-35.

34. Adduri R Sr, Kotapalli V, Gupta NA, Gowrishankar S, Srinivasulu M, Ali MM, et al. P53 nuclear stabilization is associated with FHIT loss and younger age of onset in squamous cell carcinoma of oral tongue. *BMC Clin Pathol.* 2014; 14:37. doi: 10.1186/1472-6890-14-37.
35. Siriwardena BS, Tilakaratne A, Amarasinghe EA, Udagama MN, Ogawa I, Kudo Y, 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.* 2007; 36(6): 357-62.
36. Khan H, Gupta S, Husain N, Misra S, Mps N, Jamal N, Ghatak A. Correlation between expressions of Cyclin-D1, EGFR and p53 with chemoradiation response in patients of locally advanced oral squamous cell carcinoma. *BBA Clin.* 2014;3:11-7.
37. Grønhøj Larsen C, Gyldenløve M, Jensen DH, Therkildsen MH, Kiss K, Norrild B, Konge L, von Buchwald C. Correlation between human papillomavirus and p16 overexpression in oropharyngeal tumours: a systematic review. *Br J Cancer.* 2014; 110(6): 1587-94.
38. Singh V, Husain N, Akhtar N, Khan MY, Sonkar AA, Kumar V. p16 and p53 in HPV-positive versus HPV-negative oral squamous cell carcinoma: do pathways differ? *J Oral Pathol Med.* 2017. doi: 10.1111/jop.12562.
39. McDowell LJ, Young RJ, Johnston ML, Tan TJ, Kleid S, Liu CS, et al. p16-positive lymph node metastases from cutaneous head and neck squamous cell carcinoma: No association with high-risk human papillomavirus or prognosis and implications for the workup of the unknown primary. *Cancer.* 2016; 122(8): 1201-8.
40. Chansaenroj J, Theamboonlers A, Junyangdikul P, Swangvaree S, Karalak A, Chinchai T, et al. Polymorphisms in TP53 (rs1042522), p16 (rs11515 and rs3088440) and NQO1 (rs1800566) genes in Thai cervical cancer patients with HPV 16 infection. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013; 14(1): 341-6.

**Tabela 1.** Especificidade, clone, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação dos anticorpos

Especificidade	Clone	Fabricante	Diluição	Recuperação antigênica	Incubação (min)
Anti- p16	1661	Santa Cruz Biotechnology	1:200	Citrato, pH 6,0, 90°C, 60'	60
Anti- p53	DO-7	DAKO	1:250	Citrato, pH 6,0, 90°C, 60'	60

**Tabela 2.** Caracterização dos casos de CCELO em pacientes jovens e idosos, de acordo com os parâmetros clínicos: sexo, tamanho do tumor, metástase linfonodal e a distância, estadiamento clínico e SGHM proposto por Bryne et al.<sup>26</sup>

Parâmetros Clinicopatológicos	Grupos etários	
	Jovens n (%)	Idosos n (%)
<b>Sexo</b>		
Masculino	27 (67,5)	22 (55,0)
Feminino	13 (32,5)	18 (45,0)
<b>Idade (média e desvio padrão)</b>	38,18 ± 6,27	71,43 ± 7,78
<b>Tamanho do tumor</b>		
T1	14 (35,0)	12 (30,0)
T2	10 (25,0)	20 (50,0)
T3	7 (17,5)	7 (17,5)
T4	9 (22,5)	1 (2,5)
<b>Metástase linfonodal regional</b>		
N0	23 (57,5)	30 (75,0)
N1	9 (22,5)	6 (15,0)
N2	4 (10,0)	4 (10,0)
N3	4 (10,0)	0 (0,0)
<b>Metástase</b>		
M0	39 (97,5)	37 (92,5)
M1	1 (2,5)	3 (7,5)
<b>Estadiamento clínico</b>		
Estágio I	11 (27,5)	12 (30,0)
Estágio II	8 (20,0)	15 (37,5)
Estágio III	8 (20,0)	8 (20,0)
Estágio IV	13 (32,5)	5 (12,5)
<b>Grau histopatológico de malignidade</b>		
Baixo grau	8 (20,0)	5 (12,5)
Alto grau	32 (80,0)	35 (87,5)

**Tabela 3.** Distribuição absoluta e relativa dos casos de CCELO de acordo com os grupos etários e os parâmetros clinicopatológicos

<b>Parâmetros clinicopatológicos</b>	<b>Grupos etários</b>		<b>P</b>
	<b>Jovens</b> <b>n (%)</b>	<b>Idosos</b> <b>n (%)</b>	
<b>Sexo</b>			
Masculino	27 (67,5)	22 (55,0)	0,251*
Feminino	13 (32,5)	18 (45,0)	
<b>Tamanho do tumor</b>			
T1/ T2	24 (60,0)	32 (80,0)	0,051*
T3/ T4	16 (40,0)	8 (20,0)	
<b>Metástase regional</b>			
N0	23 (57,5)	30 (75,0)	0,098*
N1 – N3	17 (42,5)	10 (25,0)	
<b>Metástase à distância</b>			
M0	39 (97,5)	37 (92,5)	0,615**
M1	1 (2,5)	3 (7,5)	
<b>Estadiamento clínico</b>			
Estágio I/ II	19 (47,5)	27 (67,5)	0,070*
Estágio III/ IV	21 (52,5)	13 (32,5)	
<b>Grau histopatológico de malignidade</b>			
Baixo grau	8 (20,0)	5 (12,5)	0,363*
Alto grau	32 (80,0)	35 (87,5)	

\*Teste do Qui-quadrado

\*\*Teste exato de *Fisher*

**Tabela 4.** Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, soma dos postos, estatística U e significância estatística ( $p$ ) para os percentuais de positividade para P53 e P16 em relação aos grupos etários

Anticorpos/ Grupos	N	Mediana	Q <sub>25</sub> -Q <sub>75</sub>	Média dos postos	Soma dos postos	U	P
<b>P53</b>							
Indivíduos jovens	40	18,75	0,70 – 53,30	40,84	1633,50	786,50	0,896
Indivíduos idosos	40	19,55	1,05 – 45,60	40,16	1606,50		
<b>P16 (citoplasma)</b>							
Indivíduos jovens	40	0,00	0,00 – 1,40	41,76	1670,50	749,50	0,576
Indivíduos idosos	40	0,00	0,00 – 0,57	39,24	1569,50		
<b>P16 (núcleo)</b>							
Indivíduos jovens	40	10,80	0,42 – 38,17	36,41	1456,50	636,50	0,115
Indivíduos idosos	40	31,65	2,77 – 55,07	44,59	1783,50		

Teste de Mann-Whirney

**Tabela 5.** Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, soma dos postos, estatística U e significância estatística (*p*) para o percentual de positividade para p16 nuclear em CCELO de pacientes jovens e idosos em relação aos parâmetros clinicopatológicos

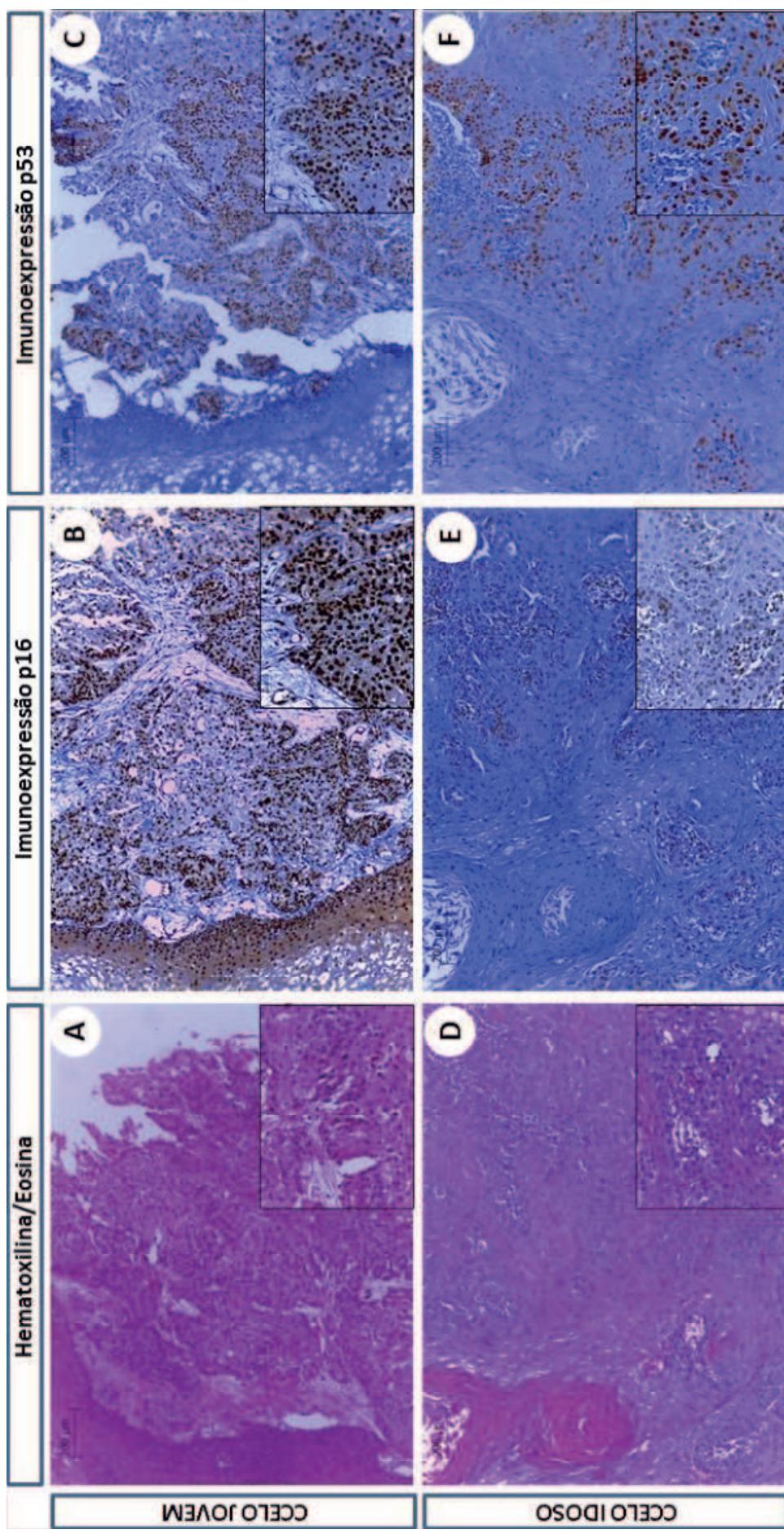
Grupos/ Parâmetros	N	Mediana	Q <sub>25</sub> -Q <sub>75</sub>	Média dos postos	Soma dos postos	U	P
<b>Indivíduos jovens</b>							
<i>Tamanho do tumor</i>							
T1/ T2	24	8,10	0,75 – 34,07	18,50	444,00	144,00	0,183
T3/ T4	16	30,15	0,00 – 73,62	23,50	376,00		
<i>Metástase regional</i>							
N0	23	11,30	1,50 – 36,20	20,52	472,00	195,00	0,989
N1 – N3	17	6,90	0,00 – 64,25	20,47	348,00		
<i>Estágio clínico</i>							
Estágio I/ II	19	10,30	1,50 – 35,90	19,68	374,00	184,00	0,673
Estágio III/ IV	21	11,60	0,00 – 64,25	21,24	446,00		
<i>Grau histopatológico</i>							
Baixo grau	8	25,10	4,15 – 35,75	21,50	172,00	120,00	0,786
Alto grau	32	8,10	0,42 – 39,42	20,25	648,00		
<b>Indivíduos idosos</b>							
<i>Tamanho do tumor</i>							
T1/ T2	32	19,10	1,52 – 48,07	18,47	591,00	63,00	<b>0,028</b>
T3/ T4	8	55,80	35,10 – 67,25	28,63	229,00		
<i>Metástase regional</i>							
N0	30	24,20	1,45 – 55,45	18,87	566,00	101,00	0,126
N1 – N3	10	46,00	16,87 – 57,12	25,40	254,00		
<i>Estágio clínico</i>							
Estágio I/ II	27	12,00	1,30 – 48,50	17,59	475,00	97,00	<b>0,023</b>
Estágio III/ IV	13	46,80	27,05 – 60,00	26,54	345,00		
<i>Grau histopatológico</i>							
Baixo grau	5	31,60	1,30 – 50,90	18,20	91,00	76,00	0,638
Alto grau	35	31,70	3,30 – 56,80	20,83	729,00		

Teste de Mann-Whitney

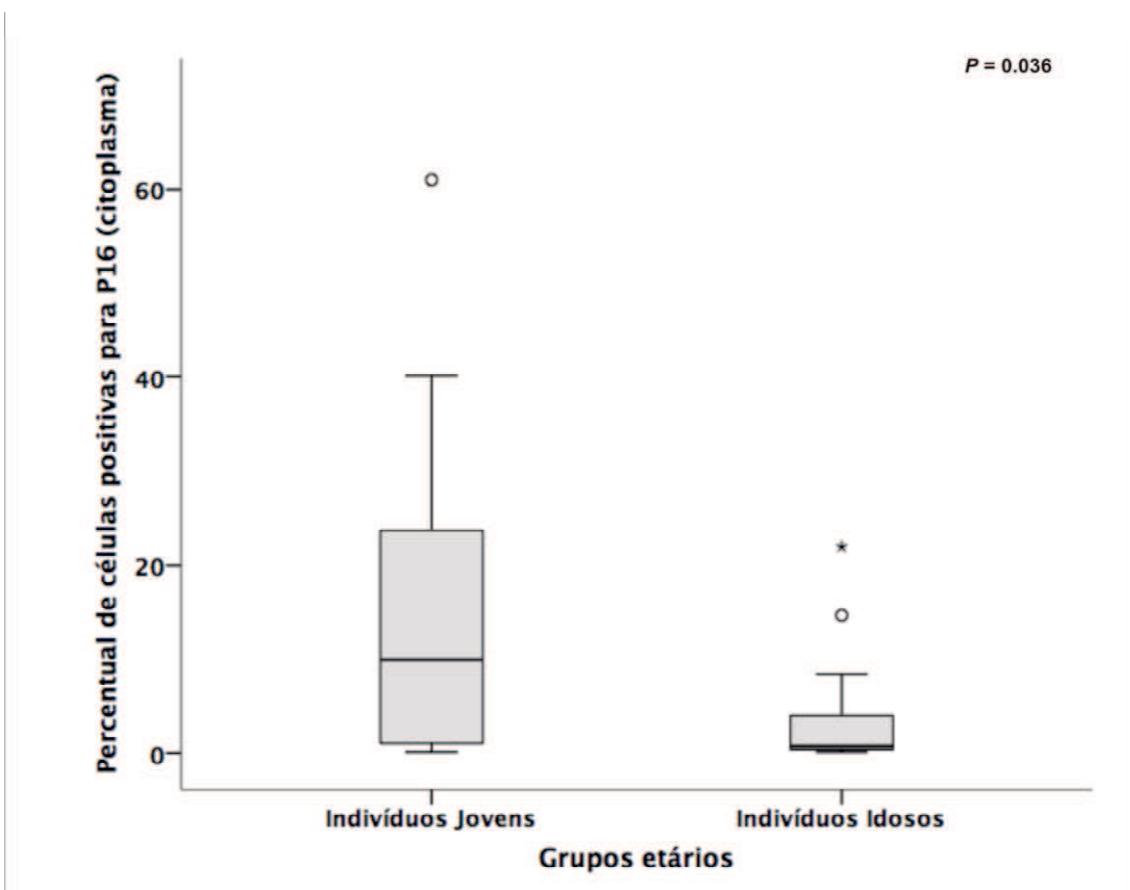
**Tabela 6.** Tamanho da amostra, mediana, quartis 25 e 75, média dos postos, soma dos postos, estatística U e significância estatística (*p*) para o percentual de positividade para p53 em CCELO de pacientes jovens e idosos em relação aos parâmetros clinicopatológicos

Grupos/ Parâmetros	N	Mediana	Q <sub>25</sub> -Q <sub>75</sub>	Média dos postos	Soma dos postos	U	P
<b>Indivíduos jovens</b>							
<i>Tamanho do tumor</i>							
T1/ T2	24	23,15	0,77 – 51,62	20,19	484,50	184,50	0,835
T3/ T4	16	18,75	0,00 – 59,92	20,97	335,50		
<i>Metástase regional</i>							
N0	23	37,30	1,00 – 53,60	22,15	509,50	157,50	0,296
N1 – N3	17	7,40	0,00 – 54,15	18,26	310,50		
<i>Estágio clínico</i>							
Estágio I/ II	19	37,30	1,00 – 52,40	21,71	412,50	176,50	0,531
Estágio III/ IV	21	10,20	0,00 – 57,70	19,40	407,50		
<i>Grau histopatológico</i>							
Baixo grau	8	29,35	0,00 – 56,92	19,75	158,00	122,00	0,838
Alto grau	32	13,15	0,77 – 53,30	20,69	662,00		
<b>Indivíduos idosos</b>							
<i>Tamanho do tumor</i>							
T1/ T2	32	19,55	1,05 – 42,67	20,30	649,50	121,50	0,826
T3/ T4	8	17,10	1,15 – 56,02	21,31	170,50		
<i>Metástase regional</i>							
N0	30	15,65	0,95 – 36,75	19,08	572,50	107,50	0,184
N1 – N3	10	45,60	1,85 – 82,85	24,75	247,50		
<i>Estágio clínico</i>							
Estágio I/ II	27	16,70	1,00 – 37,80	19,54	527,50	149,50	0,452
Estágio III/ IV	13	28,80	1,50 – 69,40	22,50	292,50		
<i>Grau histopatológico</i>							
Baixo grau	5	4,80	0,60 – 88,25	21,40	107,00	83,00	0,854
Alto grau	35	22,40	1,00 – 43,50	20,37	713,00		

Teste de Mann-Whitney



**Fig 1.** (A) Fotomicrografia de CCELO em jovem, de alto grau de malignidade exibindo, em destaque, células hiperchromáticas e com núcleos volumosos (HE, 100x). (B) Imunoexpressão da p16 em CCELO em jovem, evidenciando intensa marcação nuclear e citoplasmática nas células neoplásicas (ADVANCE, 100x). (C) Imunoexpressão da p53 em CCELO em jovem, exibindo intensa marcação nuclear nas células neoplásicas (ADVANCE, 100x). (D) Fotomicrografia de CCELO em idoso de alto grau de malignidade (ADVANCE, 100x). (E) Imunoexpressão da p16 em CCELO em idoso, exibindo leve marcação nuclear (ADVANCE, 100x). (F) Imunoexpressão da p53 em CCELO em idoso, exibindo intensa marcação nuclear nas células neoplásicas da periferia do lencol tumoral (ADVANCE, 100x).



**Fig 2.** Percentual de imunopositividade da p16 citoplasmática nos casos de CCELO em jovens e idosos (n=30).

\*\* Teste de Mann Whitney

### Conflito de Interesse

Os autores declaram não haver nenhum tipo de conflito de interesse

## **CONSIDERAÇÕES FINAIS**

---

## 5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

- O perfil clínico e morfológico do CCELO entre jovens e idosos não mostrou diferença estatisticamente significativa, embora o estadiamento clínico nos jovens seja mais avançado quando comparado aos idosos, embora tenha sido adotada uma amostra de conveniência. Sugere-se um diagnóstico mais tardio das lesões ou um comportamento mais agressivo nessa faixa etária;
- As proteínas p16 e p53 participam da patogênese do CCELO tanto nos jovens quanto nos idosos, no entanto, a possível diferença no comportamento biológico do CCELO entre estas faixas etárias não está ligado a estas proteínas;
- A imunoexpressão nuclear da p16 nos casos de CCELO em idosos esteve relacionada a tumores de maior tamanho e estadiamentos clínicos mais avançados, sugerindo-se, assim, uma maior participação desta proteína na progressão destas neoplasias em estágios mais tardios da carcinogênese nos idosos;
- Não há correlação da imunoexpressão entre as proteínas p16 e p53 no CCELO nos grupos etários estudados, portanto, sugere-se que estas proteínas agem de maneira independente no desenvolvimento do CCELO tanto nos jovens quanto nos idosos;
- No grupo dos indivíduos jovens, a correlação da imunoexpressão da p16 nuclear e citoplasmática pode sugerir uma possível participação do HPV neste grupo etário;

## REFERÊNCIAS

---

## REFERÊNCIAS

- ABRAHAO, A.C. et al. Immunohistochemical expression of p53, p16 and hTERT in oral squamous cell carcinoma and potentially malignant disorders. **Braz Oral Res**, v. 25, n.1, p. 34-41, 2011.
- ADDURI, R. SR. et al. P53 nuclear stabilization is associated with FHIT loss and younger age of onset in squamous cell carcinoma of oral tongue. **BMC Clin Pathol**, v.14, p. 37, 2014. doi: 10.1186/1472-6890-14-37.
- AGUILAR, V.; FAJAS, L. Cycling through metabolism. **EMBO Mol Med**, v. 2, n. 9, p. 338-48, 2010.
- ALBUQUERQUE, R. et al. Oral tongue squamous cell carcinoma (OTSCC): alcohol and tobacco consumption versus non-consumption. A study in a Portuguese population. **Braz Dent J**, v. 22, n. 6, p.517-21, 2011.
- AMARO-FILHO, S.M. et al. A comparative analysis of clinical and molecular factors with the stage of cervical cancer in a Brazilian cohort. **PLoS One**, v. 8, n. 3, p. 1-10, 2013.
- ANDRADE, J. de M. **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**. 2016. 86f. Dissertação (Programa de Pós-Graduação em Odontologia - PPGO) - Universidade Estadual da Paraíba, Campina Grande, 2016.
- 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.
- BRAAKHUIS, B.J. et al. TP53 mutation and human papilloma virus status of oral squamous cell carcinomas in young adult patients. **Oral Dis**, v. 20, n. 6, p. 602-8, 2014.
- BRAVO, I.G.; FÉLEZ-SÁNCHEZ, M. Papillomaviruses: Viral evolution, cancer and evolutionary medicine. **Evol Med Public Health**, n. 1, p. 32-51, 2015.
- 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.

CARDESA, A. et al. Squamous cell carcinoma. In: BARNES, L. et al. World Health Organization classification of tumours: pathology and genetics of head and neck tumours. Lyon: IARC Press, p. 118-121, 2005.

CHAI, R.C. et al. Current trends in the etiology and diagnosis of HPV-related head and neck cancers. **Cancer Med**, v. 4, n. 4, p. 596-607, 2015.

CHANSAENROJ, J. et al. Polymorphisms in TP53 (rs1042522), p16 (rs11515 and rs3088440) and NQO1 (rs1800566) genes in Thai cervical cancer patients with HPV16 infection. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 14, n. 1, p. 341-6, 2013.

CUERVAZ GONZALEZ, J.C.C. et al. p53 and p16 in oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma: A study of 208 cases. **Indian J Pathol Microbiol**, v. 59, n.2, p.153-8, 2016.

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: 777-82. 2009 Sep;

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)**, v. 10, n. 4, p.:514-7, 2013.

DHOLAM, K.P.; CHOUKSEY, G.C. Squamous cell carcinoma of the oral cavity and oropharynx in patients aged 18-45 years: A case-control study to evaluate the risk factors with emphasis on stress, diet, oral hygiene, and family history. **Indian J Cancer**, v. 53, n. 2, p. 244-251, 2016.

FRIEMEL, J. et al. Pretreatment oral hygiene habits and survival of head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) patients. **BMC Oral Health**, v. 11, p. 1-9, 2016.

HILLY, O. et al. Carcinoma of the oral tongue in patients younger than 30 years: comparison with patients older than 60 years. **Oral Oncol**, v.49, n.10, p. 987-90, 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.

HONORATO, J. et al. Gender differences in prognostic factors for oral cancer. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 44, n. 10, p.1205-11, 2015.

JO, D.W.; KIM, Y.K.; YUN, P.Y. The influence of p53 mutation status on the anti-cancer effect of cisplatin in oral squamous cell carcinoma cell lines. **J Korean Assoc Oral Maxillofac Surg**, n. 42, v. 6, p.:337-344, 2016.

KAMINAGAKURA, E. et al. Case-control study on prognostic factors in oral squamous cell carcinoma in young patients. **Head Neck**, n. 32, v. 11, p.: 1460-6, 2010.

KAMINAGAKURA, E. et al. High-risk human papillomavirus in oral squamous cell carcinoma of young patients. **Int J Cancer**, v. 130, n. 8, p. 1726-32, 2012.

KAMINAGAKURA, E. et al. Protein expression of CYP1A1, CYP1B1, ALDH1A1, and ALDH2 in Young patients with oral squamous cell carcinoma. **Int J Oral Maxillofac Surg**, n.16, p. 1-7, 2016.

KREIMER, A.R. et al. Human papillomavirus types in head and neck squamous cell carcinomas worldwide: a systematic review. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 14, n. 2, p. 467-75, 2005.

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. 3443-51, 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. 327-34, 2015.

KRÜGER, M. et al. The prevalence of human papilloma virus (HPV) infections in oral squamous cell carcinomas: a retrospective analysis of 88 patients and literature overview. **J Craniomaxillofac Surg**, v. 42, n. 7, p. 1506-14, 2014.

KURIAKOSE, M. et al. Comparison of oral squamous cell carcinoma in younger and older patients in India. **Eur J Cancer B Oral Oncol**, n. 28B, v. 2, p.:113-20, 1992.

LEHEW, C.W. et al. The Health System and Policy Implications of Changing Epidemiology for Oral Cavity and Oropharyngeal Cancers in the United States From 1995 to 2016. **Epidemiol Rev**, v. 39, n. 1, p. 132-147, 2017.

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.

MARUR, S.; FORASTIERE, A.A. Head and neck squamous cell carcinoma: update on epidemiology, diagnosis, and treatment. **Mayo Clin Proc**, v. 91, n. 3, p. 386-96, 2016.

MESQUITA, J.A. et al. 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**, v. 273, n. 1, p. 237-43, 2016.

NAKAHARA, Y. et al. Alterations of Rb, p16(INK4A) and cyclin D1 in the tumorigenesis of oral squamous cell carcinomas. **Cancer Lett**, v 160, n. 1, p. 3-8, 2000.

NG, J.H. et al. Changing epidemiology of oral squamous cell carcinoma of the tongue: A global study. **Head Neck**, n. 39, v. 2, p.:297-304, 2017.

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. 1488-94, 2011.

PEISKER, A. et al. Evaluation of a post-treatment follow-up program in patients with oral squamous cell carcinoma. **Clin Oral Investig**, 2016.

PRASAD, M.L. et al. Prognostic significance of regulators of cell cycle and apoptosis, p16(INK4a), p53, and bcl-2 in primary mucosal melanomas of the head and neck. **Head Neck Pathol**, v. 6, n. 2, p.184-90, 2012.

RAI, H.C.; AHMED, J. Clinicopathological correlation study of oral squamous cell carcinoma in a local indian population. **Asian Pac J Cancer Prev**, v. 17, n. 3, p. 1251-4, 2016.

RIBEIRO, A.C. 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, n. 2, p. 95-8, 2009.

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. 4135-41, 2014.

SA, G.; DAS, T. Anti cancer effects of curcumin: cycle of life and death. **Cell Div**, v. 3, n. 14, p. 1-14, 2008.

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. 151-6, 2016.

SANTOS-SILVA, A.R. et al. High incidences of DNA ploidy abnormalities in tongue squamous cell carcinoma of young patients: an international collaborative study. **Histopathology**, v.58, n.7, p. 1127-35, 2011.

SILVEIRA, E.J. et al. Correlation of clinical, histological, and cytokeratin profiles of squamous cell carcinoma of the oral tongue with prognosis. **Int J Surg Pathol**, v.15, n. 4, p. 376-83, 2007.

SIRIWARDENA, B.S. et al. Demographic, aetiological and survival differences of oral squamous cell carcinoma in the young and the old in Sri Lanka. **Oral Oncol**, v. 42, n. 8, p. 831-6, 2006.

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.

SIVARS, L. et al. Human Papillomavirus as a Diagnostic and Prognostic Tool in Cancer of Unknown Primary in the Head and Neck Region. **Anticancer Res**, v. 36, n. 2, p.487-93, 2016.

SOARES, R.C. et al. Detection of HPV DNA and immunohistochemical expression of cell cycle proteins in oral carcinoma in a population of Brazilian patients. **J Appl Oral Sci**, v. 16, n. 5, p. 340-4, 2008.

SOLOMON, M.C. et al. The prognostic implication of the expression of EGFR, p53, cyclin D1, Bcl-2 and p16 in primary locally advanced oral squamous cell carcinoma cases: a tissue microarray study. **Med Oncol**, n. 33, v. 12, p.:138, 2016.

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, n. 4, p. 307-12, 2010.

SRITIPPHO, T. et al. p16 - a Possible Surrogate Marker for High-Risk Human Papillomaviruses in Oral Cancer? **Asian Pac J Cancer Prev**, n. 17, v. 8, p.:4049-57, 2016.

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. 12418-23, 2015;

ŠVAJDLER, M. JR. et al. Human papillomavirus infection and p16 expression in extragenital/extratongual bowen disease in immunocompromised patients. **Am J Dermopathol**, 2016.

TAN, D.S. et al. Tongue carcinoma infrequently harbor common actionable genetic alterations. **BMC Cancer**, 14:679. 2014

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.1291-300, 2014.

VAN MONSJOU, H.S. et al. Human papillomavirus status in young patients with head and neck squamous cell carcinoma. **Int J Cancer**, v. 130, n. 8, p. 1806-12, 2012.

VARUN, B.R. et al. Immunohistochemical detection of p53 and p63 in oral squamous cell carcinoma, oral leukoplakia, and oral submucous fibrosis. **J Investig Clin Dent**, v. 5, n. 3, p. 214-9, 2014.

WITTEKIND, C. et al. TNM residual tumor classification revisited. **Cancer**, v. 94, n. 9, p.2511-6, 2002.

WONG, H.H.; LEMOINE, N.R.; WANG, Y. Oncolytic viruses for cancer therapy: overcoming the obstacles. **Viruses**, v. 2, n. 1, p. 78-106, 2010.

## ANEXOS

---

## ANEXOS

**Anexo A** – Parecer de aprovação do estudo pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Estadual da Paraíba.



### PARECER DO RELATOR: 08

Número do parecer: 58218016.7.0000.5187

Data da relatoria: 25 de agosto de 2016

**Apresentação do Projeto:** O Projeto é intitulado "ANÁLISE DA IMUNOEXPRESSÃO DA p53 E p16 E SUA CORRELAÇÃO COM PARÂMETROS CLÍNICO-MORFOLOGICOS EM CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÍNGUA ORAL EM JOVENS E IDOSOS." O Projeto é para fins de elaboração do Trabalho de Conclusão de Curso de Pós-Graduação em Odontologia/UEPB.

**Objetivo da Pesquisa:** Avaliar de forma comparativa a imunoexpressão das proteínas p16 e p53 em casos de CCELOem jovens e idosos, correlacionando-ascomparâmetros clínicos (tamanho do tumor, metástase linfonodal, metástase à distância e estadiamento clínico) e morfológicos (SGHM).

**Avaliação dos Riscos e Benefícios:** Considerando a justificativa e os aportes teóricos e metodologia apresentados no presente projeto, e ainda considerando a relevância do estudo as quais são explícitas suas possíveis contribuições, percebe-se que a mesma não trará riscos aos participantes da pesquisa.

**Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:** Trata-se de um estudo transversal, observacional, de registro e análise quantitativa da imunoexpressão das proteínas p16 e p53 em uma série de casos de CCELO em pacientes jovens e idosos. A população objeto do presente estudo será constituída por todos os casos de CCELO, diagnosticados e arquivados, nos últimos 14 anos (2002-2016), no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Napoleão Laureano/ João Pessoa – PB, no Hospital da Fundação Assistencial da Paraíba (FAP)/ Campina Grande – PB.

**Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:** Foram acostados ao projeto de Pesquisa os seguintes documentos: Folha de Rosto; declaração de Concordância com projeto de Pesquisa; termo de Compromisso do pesquisador responsável em cumprir os termos da resolução/433/12/CNS/MS; Termo de Autorização Institucional da FAP; Termo de Autorização Institucional do Hospital Napoleão Laureano; Termo de Compromisso para Coleta de Dados em Arquivos; Termo de Consentimento Livre e Esclarecido; Instrumentos de Coleta de Dados. Estando todos os documentos em conformidade com as exigências protocolares para submissão do protocolo de pesquisa.

**Recomendações:** Sem recomendações.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:** O projeto encontra-se completo. Diante do exposto, somos pela aprovação do referido estudo.

**Situação do parecer: Aprovado**

**Anexo B – Normas da revista.**

## **Author Guidelines**

**Content of Author Guidelines:** 1. General, 2. Ethical Guidelines, 3. Manuscript Submission Procedure, 4. Manuscript Types Accepted, 5. Manuscript Format and Structure, 6. After Acceptance

**Useful Websites:** Submission Site, Articles published in Journal of Oral Pathology & Medicine, Author Services, Wiley Blackwell Publishing's Ethical Guidelines, Guidelines for Figures

The journal to which you are submitting your manuscript employs a plagiarism detection system. By submitting your manuscript to this journal you accept that your manuscript may be screened for plagiarism against previously published works.

### **1. GENERAL**

Journal of Oral Pathology & Medicine publishes manuscripts of high scientific quality representing original clinical, diagnostic or experimental work in oral pathology and oral medicine. Papers advancing the science or practice of these disciplines will be welcomed, especially those which bring new knowledge and observations from the application of techniques within the spheres of light and electron microscopy, tissue and organ culture, immunology, histochemistry, immunocytochemistry and molecular biology. Review papers on topical and relevant subjects will receive a high priority and articles requiring rapid publication because of their significance and timeliness will be included as brief reports not exceeding three printed pages. All submitted manuscripts falling within the overall scope of the Journal will be assessed by suitably qualified reviewers, but manuscripts in an incorrect format will be returned to the author without review.

Please read the instructions below carefully for details on the submission of manuscripts, the journal's requirements and standards as well as information concerning the procedure after a manuscript has been accepted for publication in Journal of Oral Pathology & Medicine. Authors are encouraged to visit Wiley Blackwell Publishing Author Services for further information on the preparation and submission of articles and figures.

## **Note to NIH Grantees**

Pursuant to NIH mandate, Wiley Blackwell will post the accepted version of contributions authored by NIH grant-holders to PubMed Central upon acceptance. This accepted version will be made publicly available 12 months after publication. For further information, see [www.wiley.com/go/nihmandate](http://www.wiley.com/go/nihmandate).

## **2. ETHICAL GUIDELINES**

Journal of Oral Pathology & Medicine adheres to the below ethical guidelines for publication and research.

### **2.1. Authorship and Acknowledgements**

Authors submitting a paper do so on the understanding that the work has not been published before, is not being considered for publication elsewhere and has been read and approved by all authors.

Journal of Oral Pathology & Medicine adheres to the definition of authorship set up by The International Committee of Medical Journal Editors (ICMJE). According to the ICMJE authorship criteria should be based on substantial contributions to conception and design of, or acquisition of data or analysis and interpretation of data, and drafting the article or revising it critically for important intellectual content.

It is a requirement that all authors have been accredited as appropriate upon submission of the manuscript. Contributors who do not qualify as authors should be mentioned under Acknowledgements.

**Acknowledgements:** Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited. Acknowledge only persons who have made substantive contributions to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from everyone acknowledged by name because readers may infer their endorsement of the data and conclusions.

### **2.2. Ethical Approvals**

Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association Declaration of Helsinki (version, 2002 [www.wma.net/e/policy/b3.htm](http://www.wma.net/e/policy/b3.htm)) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. Editors reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used.

When experimental animals are used the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the Guidelines laid down by the National Institute of Health (NIH) in the USA regarding the care and use of animals for experimental procedures or with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in accordance with local laws and regulations.

Images of, or Information about, Identifiable Individuals: It is the author's responsibility to obtain consent from patients and other individuals for use of information, images, audio files, interview transcripts, and video clips from which they may be identified. To ensure we have the rights we require please provide a signed consent form in all instances. Consent Form Template.

- If the person is a minor, consent must be obtained from the child's parents or guardians.
- If the person is dead, we consider it essential and ethical that you obtain consent for use from the next of kin. If this is impractical you need to balance the need to use the photo against the risk of causing offence. In all cases ensure you obscure the identity of the deceased.
- If using older material, or for material obtained in the field, for which signed release forms are, for practical purposes, unobtainable, you will need to confirm in writing that the material in question was obtained with the person's understanding that it might be published.

## **2.3 Clinical Trials**

Clinical trials should be reported using the CONSORT guidelines available at [www.consort-statement.org](http://www.consort-statement.org). A CONSORT checklist should also be included in the submission material.

Journal of Oral Pathology & Medicine encourages authors submitting manuscripts reporting from a clinical trial to register the trials in any of the following free, public clinical trials registries: [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), <http://clinicaltrials-dev.ifpma.org/>, <http://isrctn.org/>. The clinical trial registration number and name of the trial register will then be published with the paper.

#### **2.4 Conflict of Interest**

All sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript must be fully acknowledged, and any potential grant holders should be listed. Please see Conflicts of Interest for generally accepted definitions on conflict of interest? Please enclose this information under the heading 'Conflict of Interest Statement'.

#### **2.5 Appeal of Decision**

Authors who wish to appeal the decision on their submitted paper may do so by emailing the editor with a detailed explanation for why they find reasons to appeal the decision.

#### **2.6 Permissions**

If all or parts of previously published illustrations are used, permission must be obtained from the copyright holder concerned. It is the author's responsibility to obtain these in writing and provide copies to the Publishers.

#### **2.7 Copyright Assignment**

If your paper is accepted, the author identified as the formal corresponding author for the paper will receive an email prompting them to login into Author Services; where via the Wiley Author Licensing Service (WALS) they will be able to complete the license agreement on behalf of all authors on the paper.

#### **For authors signing the copyright transfer agreement**

**If the OnlineOpen option is not selected the corresponding author will be presented with the copyright transfer agreement (CTA) to sign. The terms and conditions of the CTA can be previewed in the samples associated with the Copyright FAQs below:**

**CTA Terms and Conditions [http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs\\_copyright.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp)**

### **For authors choosing OnlineOpen**

If the OnlineOpen option is selected the corresponding author will have a choice of the following Creative Commons License Open Access Agreements (OAA):

Creative Commons Attribution License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial License OAA

Creative Commons Attribution Non-Commercial -NoDerivs License OAA

To preview the terms and conditions of these open access agreements please visit the Copyright FAQs hosted on Wiley Author Services [http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs\\_copyright.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/faqs_copyright.asp) and visit <http://www.wileyopenaccess.com/details/content/12f25db4c87/Copyright--License.html>.

If you select the OnlineOpen option and your research is funded by The Wellcome Trust and members of the Research Councils UK (RCUK) you will be given the opportunity to publish your article under a CC-BY license supporting you in complying with Wellcome Trust and Research Councils UK requirements. For more information on this policy and the Journal's compliant self-archiving policy please visit: <http://www.wiley.com/go/funderstatement>.

### **2.8 OnlineOpen**

Journal of Oral Pathology & Medicine offers authors the opportunity to publish their paper OnlineOpen. OnlineOpen is available to authors of primary research articles who wish to make their article available to non-subscribers on publication, or whose funding agency requires grantees to archive the final version of their article. With OnlineOpen, the author, the author's funding agency, or the author's institution pays a fee to ensure that the article is made

available to non-subscribers upon publication via Wiley Online Library, as well as deposited in the funding agency's preferred archive. For the full list of terms and conditions, see <http://olabout.wiley.com/WileyCDA/Section/id-406241.html>. Any authors wishing to send their paper OnlineOpen will be required to complete the payment form available from our website at: [https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen\\_order.asp](https://authorservices.wiley.com/bauthor/onlineopen_order.asp). Prior to acceptance there is no requirement to inform an Editorial Office that you intend to publish your paper OnlineOpen if you do not wish to. All OnlineOpen articles are treated in the same way as any other article. They go through the journal's standard peer-review process and will be accepted or rejected based on their own merit.

### **3. MANUSCRIPT SUBMISSION PROCEDURE**

Manuscripts should be submitted electronically via the online submission site <http://mc.manuscriptcentral.com/jopm>. The use of an online submission and peer review site enables immediate distribution of manuscripts and consequentially speeds up the review process. It also allows authors to track the status of their own manuscripts. Complete instructions for submitting a paper is available online and below. For further instructions, please contact Editorial Assistant Gill Smith at [JOPM.office@editorialoffice.co.uk](mailto:JOPM.office@editorialoffice.co.uk)

#### **3.1. Getting Started**

- Launch your web browser (supported browsers include Internet Explorer 5.5 or higher, Safari 1.2.4, or Firefox 1.0.4 or higher) and go to the journal's online Submission Site: <http://mc.manuscriptcentral.com/jopm>.
- Log-in or, if you are a new user, click on 'register here'.
- If you are registering as new user.
  - After clicking on 'register here', enter your name and e-mail information and click 'Next'. Your e-mail information is very important.
  - Enter your institution and address information as appropriate, and then click 'Next.'
  - Enter a user ID and password of your choice (we recommend using your e-mail address as your user ID), and then select your areas of expertise. Click 'Finish'.
- If you are registered as user, but have forgotten your log in details, enter your e-mail address under 'Password Help'. The system will send you an automatic user ID and a new temporary password.
- Log-in and select 'Author Centre'.

### **3.2. Submitting Your Manuscript**

- After you have logged into your 'Author Centre', submit your manuscript by clicking the submission link under 'Author Resources'.
- Enter data and answer questions as appropriate. You may copy and paste directly from your manuscript and you may upload your pre-prepared covering letter.
- Click the 'Next' button on each screen to save your work and advance to the next screen.
- You are required to upload your files.
- Click on the 'Browse' button and locate the file on your computer.
- Select the designation of each file in the drop down next to the Browse button.
- When you have selected all files you wish to upload, click the 'Upload Files' button.
- Review your submission (in HTML and PDF format) before completing your submission by sending it to the Journal. Click the 'Submit' button when you are finished reviewing.

### **3.3. Manuscript Files Accepted**

Manuscripts should be uploaded as Word (.) or Rich Text Format (.rft) files (not write-protected) plus separate figure files. GIF, JPEG, PICT or Bitmap files are acceptable for submission, but only high-resolution TIF or EPS files are suitable for printing. The files will be automatically converted to HTML and PDF on upload and will be used for the review process. The text file must contain the entire manuscript including title page, abstract, text, references, acknowledgements and conflict of interest statement, tables, and figure legends, but no embedded figures. In the text, please reference figures as for instance 'Figure 1', 'Figure 2' etc to match the tag name you choose for the individual figure files uploaded. Manuscripts should be formatted as described in the Author Guidelines below.

### **3.4. Blinded Review**

All manuscripts submitted to Journal of Oral Pathology & Medicine will be reviewed by two experts in the field. Journal of Oral Pathology & Medicine uses single blinded review. The names of the reviewers will thus not be disclosed to the author submitting a paper.

### **3.5. Suspension of Submission Mid-way in the Submission Process**

You may suspend a submission at any phase before clicking the 'Submit' button and save it to submit later. The manuscript can then be located under 'Unsubmitted Manuscripts' and you can click on 'Continue Submission' to continue your submission when you choose to.

### **3.6. E-mail Confirmation of Submission**

After submission you will receive an e-mail to confirm receipt of your manuscript. If you do not receive the confirmation e-mail after 24 hours, please check your e-mail address carefully in the system. If the e-mail address is correct please contact your IT department. The error may be caused by some sort of spam filtering on your e-mail server. Also, the e-mails should be received if the IT department adds our e-mail server ([uranus.scholarone.com](mailto:uranus.scholarone.com)) to their whitelist.

### **3.7. Manuscript Status**

You can access ScholarOne Manuscripts (formerly known as Manuscript Central) any time to check your 'Author Centre' for the status of your manuscript. The Journal will inform you by e-mail once a decision has been made.

### **3.8. Submission of Revised Manuscripts**

To submit a revised manuscripts please locate your manuscript under 'Manuscripts with Decisions' and click on 'Submit a Revision'. Please remember to delete any old files uploaded when you upload your revised manuscript.

## **4. MANUSCRIPT TYPES ACCEPTED**

Original Research Articles: of high scientific quality representing original clinical, diagnostic or experimental work in oral pathology and oral medicine. Papers advancing the science or practice of these disciplines will be welcomed, especially those which bring new knowledge and observations from the application of techniques within the spheres of light and electron microscopy, tissue and organ culture, immunology, histochemistry, immunocytochemistry and molecular biology.

3.000 words maximum, 6 figures and/or tables, and no more than 30 references

**Review Papers:** Journal of Oral Pathology & Medicine commissions review papers and also welcomes uninvited reviews. Reviews should be submitted via the online submission site: <http://mc.manuscriptcentral.com/jopm> and are subject to peer-review.

3.000 words maximum, 6 figures and/or tables, and no more than 50 references

**Case Reports:** Please note that Journal of Oral Pathology & Medicine no longer accepts submissions of case reports.

**Brief Reports:** Original research material requiring rapid publication because of their significance and timeliness will be included as Brief Reports. 1.000 words maximum.

**Letters to the Editor:** Letters, if of broad interest, are encouraged. Letters should not be confused with Brief Reports. Letters may deal with material in papers published in Journal of Oral Pathology & Medicine or they may raise new issues, but should have important implications.

750 words maximum. One figure or table, 5 references.

## **5. MANUSCRIPT FORMAT AND STRUCTURE**

### **5.1. Page Charge**

Articles exceeding 6 published pages are subject to a charge of USD 163 per additional page. One published page amounts approximately to 5,500 characters.

### **5.2. Format**

**Language:** The language of publication is English. Authors for whom English is a second language may choose to have their manuscript professionally edited before submission to improve the English. A list of independent suppliers of editing services can be found at [http://authorservices.wiley.com/bauthor/english\\_language.asp](http://authorservices.wiley.com/bauthor/english_language.asp). All services are paid for and arranged by the author, and use of one of these services does not guarantee acceptance or preference for publication.

**Abbreviations, Symbols and Nomenclature:** Use only standard abbreviations (Vancouver System). All units will be metric. Use no roman numerals in the text. In decimals, a decimal point, and not a comma, will be used. Avoid abbreviations in the title. The full term for which an abbreviation stands should precede its first use in the text unless it is a standard unit of measurement. Useful is Baren DN, ed. Units, symbols, and abbreviations. A guide for biological and medical editors and authors. 4. ed. London: Royal Society of Medicine.

**Font:** When preparing your file, please use only standard fonts such as Times, Times New Roman or Arial for text, and Symbol font for Greek letters, to avoid inadvertent character substitutions. In particular, please do not use Japanese or other Asian fonts. Do not use automated or manual hyphenation.

### **5.3. Structure**

All papers submitted to Journal of Oral Pathology & Medicine should include: title page, abstract, main text, references and tables, figures, figure legends and conflict of interest statement where appropriate. Manuscripts must conform to the journal style. Manuscripts not complying with the journal format will be returned to the author(s).

**Title Page:** Should be part of the manuscript document uploaded for review and include: The title of the article, a running title of no more than 50 letters and spaces, 2-5 keywords, complete names and institution for each author, corresponding author's name, address, email address and fax number.

**Abstract:** is limited to 250 words in length and should contain no abbreviations. The abstract should be included in the manuscript document uploaded for review as well as inserted separately where specified in the submission process. The abstract should convey the essential purpose and message of the paper in an abbreviated form. For original articles the abstract should be structured with the following headings in accordance with Index Medicus (Medical Subject Headings): background, methods, results and conclusions. For other article types, please choose headings appropriate for the article.

**Main Text of Original Articles:** should be divided into introduction, material and methods, results and discussion.

**Introduction:** should clearly state the purpose of the article. Give only strictly pertinent references. Exhaustive literature reviews are inappropriate.

**Materials and Methods:** must contain sufficient detail such that, in combination with the references cited, all clinical trials and experiments reported can be fully reproduced. As a condition of publication, authors are required to make materials and methods used freely available to academic researchers for their own use. This may for example include antibodies etc. Other supporting data sets must be made available on the publication date from the authors directly.

**(i) Clinical trials:** Clinical trials should be reported using the CONSORT guidelines available at [www.consort-statement.org](http://www.consort-statement.org). A CONSORT checklist should also be included in the submission material.

Journal of Oral Pathology & Medicine encourages authors submitting manuscripts reporting from a clinical trial to register the trials in any of the following free, public clinical trials registries: [www.clinicaltrials.gov](http://www.clinicaltrials.gov), <http://clinicaltrials-dev.ifpma.org/>, <http://isrctn.org/>. The clinical trial registration number and name of the trial register will then be published with the paper. .

**(ii) Experimental subjects:** Experimentation involving human subjects will only be published if such research has been conducted in full accordance with ethical principles, including the World Medical Association Declaration of Helsinki (version, 2002 [www.wma.net/e/policy/b3.htm](http://www.wma.net/e/policy/b3.htm)) and the additional requirements, if any, of the country where the research has been carried out. Manuscripts must be accompanied by a statement that the experiments were undertaken with the understanding and written consent of each subject and according to the above mentioned principles. A statement regarding the fact that the study has been independently reviewed and approved by an ethical board should also be included. Editors reserve the right to reject papers if there are doubts as to whether appropriate procedures have been used.

When experimental animals are used the methods section must clearly indicate that adequate measures were taken to minimize pain or discomfort. Experiments should be carried out in accordance with the Guidelines laid down by the National Institute of Health (NIH) in the USA regarding the care and use of animals for experimental procedures or with the European Communities Council Directive of 24 November 1986 (86/609/EEC) and in accordance with local laws and regulations.

**(iii) Suppliers:** Suppliers of materials should be named and their location (town, state/county, country) included.

**Results:** Present your results in logical sequence in the text, tables, and illustrations. Do not repeat in the text all the data in the tables, illustrations, or both: emphasize or summarize only important observations.

**Discussion:** Emphasize the new and important aspects of the study and conclusions that follow from them. Do not repeat in detail data given in the Results section. Include in the Discussion the implications of the findings and their limitations and relate the observations to other relevant studies.

**Main Text of Review Articles** comprise an introduction and a running text structured in a suitable way according to the subject treated. A final section with conclusions may be added.

**Acknowledgements:** Under acknowledgements please specify contributors to the article other than the authors accredited. Acknowledge only persons who have made substantive contributions to the study. Authors are responsible for obtaining written permission from everyone acknowledged by name because readers may infer their endorsement of the data and conclusions. See also above under Ethical Guidelines.

**Conflict of Interest Statement:** All sources of institutional, private and corporate financial support for the work within the manuscript must be fully acknowledged, and any potential grant holders should be listed. Please see Conflicts of Interest for generally accepted definitions on conflict of interest? See also above under Ethical Guidelines.

#### 5.4. References

References should be kept to the pertinent minimum and numbered consecutively in the order in which they appear in the text. Reference numbers are cited in superscript. References cited only in the tables or figure legends should be numbered in accordance with a sequence established by the first identification of that figure or table in the text. Use the style of the examples below, which are based AMA style. Try to avoid using abstracts as references. Include manuscripts accepted, but not published; designate the abbreviated title of the journal followed by (in press). Information from manuscripts not yet accepted, should be cited in the text as personal communication. The references must be verified by the author(s) against the original documents. Titles should be abbreviated in accordance with the style, used in AMA 10th edition and follow below points:

- If there are more than 6 author names in a reference then first three author names are retained with 'et al.' and et al. is in roman.

- Article title in roman and sentence case.
- Journal title in italics and abbreviated with period at the end of the title only and not for all abbreviated terms.
- Semicolon used between year of publication and volume number.
- Colon used between volume number and page range.
- Full page range is used.
- End period at the end of a reference
- Place of publication is given first and then publisher name is given.
- Colon used between publisher location and publisher name.
- Year of publication is given after publisher name with semicolon separator.
- Chapter title given in roman and sentence case
- Book title given in italics and title case
- Query is raised for page range if it is not given
- Accessed date is must for websites

We recommend the use of a tool such as Reference Manager for reference management and formatting. Reference Manager reference styles can be searched for here: [www.refman.com/support/rmstyles.asp](http://www.refman.com/support/rmstyles.asp)

All references should be numbered consecutively in order of appearance and should be as complete as possible. In text citations should cite references in consecutive order using Arabic superscript numerals. Sample references follow

Journal article: 1. King VM, Armstrong DM, Apps R, Trott JR. Numerical aspects of pontine, lateral reticular, and inferior olivary projections to two paravermal cortical zones of the cat cerebellum. *J Comp Neurol* 1998;390:537-551.

Book: 2. Voet D, Voet JG. Biochemistry. New York: John Wiley & Sons; 1990. 1223 p.

Please note that journal title abbreviations should conform to the practices of Chemical Abstracts.

For more information about AMA reference style - AMA Manual of Style

## **5.5. Tables, Figures and Figure Legends**

**Tables:** should be numbered consecutively with Arabic numerals. Type each table on a separate sheet, with titles making them self-explanatory. Due regard should be given to the proportions of the printed page. Tables with greater than 6 columns will be counted as multiple tables.

**Figures:** All figures should clarify the text and their number be kept to a minimum. Text on figures should be in CAPITALS. Line drawings should be professionally drawn; half-tones should exhibit high contrast. Multi-paneled figures will be counted as multiple figures. Figures can contain multiple images as long as these are grouped together on one page per figure with one legend for each figure.

Due to space constraints within the Journal, no more than 6 figures and/or tables will be allowed

All figures and artwork must be provided in electronic format. Figure legends should be a separate section of the manuscript, and should begin with a brief title for the whole figure and continue with a short description of each panel and the symbols used: they should not contain any details of methods.

Submit your figures as EPS, TIFF or PDF files. Use 300 dpi resolution for photographic images and 600 dpi resolution for line art. Full details of the submission of artwork are available at <http://authorservices.wiley.com/bauthor/illustration.asp>.

## **6. AFTER ACCEPTANCE**

### **6.1 Proofs**

Proofs will be sent via e-mail as an Acrobat PDF (portable document format) file. The e-mail server must be able to accept attachments up to 4 MB in size. Acrobat Reader will be required in order to read this file.

### **6.2 Supporting Information**

If you have previously provided Supporting Information with your article, please note it will not be edited or altered from its original format during the Production process. Although a

proof of your Supporting Information is not available, it will appear online when your article is published.

### **6.3 Early View**

Journal of Oral Pathology & Medicine is covered by Wiley Blackwell Publishing's Early View service. Early View articles are complete full-text articles published online in advance of their publication in a printed issue. Early View articles are complete and final. They have been fully reviewed, revised and edited for publication, and the authors' final corrections have been incorporated. Because they are in final form, no changes can be made after online publication. Early View articles are given a Digital Object Identifier (DOI), which allows the article to be cited and tracked before it is allocated to an issue. After print publication, the DOI remains valid and can continue to be used to cite and access the article.

### **6.4 Offprints**

The corresponding author will receive a free PDF offprint that can be downloaded via Author Services. Please sign up for the service if you would like to access your free article PDF offprint and enjoy the many other benefits the service offers. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor> for more information.

### **6.5 Author Services**

Online production tracking through Wiley Blackwell's Author Services Author Services enables authors to track their article – once it has been accepted – through the production process to publication online and in print. Authors can check the status of their articles online and choose to receive automated e-mails at key stages of production. The author will receive an e-mail with a unique link that enables them to register and have their article automatically added to the system. Please ensure that a complete e-mail address is provided when submitting the manuscript. Visit <http://authorservices.wiley.com/bauthor> for more details on online production tracking and for a wealth of resources including FAQs and tips on article preparation, submission and more.

## **APÊNDICES**

---

## APÊNDICE A

### **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 X;
- 1.( ) Estágio I;
- 2.( ) Estágio II;
- 3.( ) Estágio III;
- 4.( ) Estágio IV;

4. Metástase à distância: ( ) Sim ( ) Não

5. Diagnóstico: \_\_\_\_\_

## APÊNDICE B

### **FICHA DE ANÁLISE MORFOLÓGICA**

- SGHM proposto por Bryne et al., (1992); Silveira et al., (2007)

Lâmina HE: \_\_\_\_\_

#### **1. Grau de ceratinização**

- 1 ( ) Altamente ceratinizada (mais de 50% das células)
- 2 ( ) Moderada ceratinizada (20 a 50% das células)
- 3 ( ) Mínima ceratinização (5 a 20% das células)
- 4 ( ) Nenhuma ceratinização (0 a 5% das células)

#### **2. Pleomorfismo nuclear**

- 1 ( ) Pouco pleomorfismo nuclear (Mais de 75% das células maduras)
- 2 ( ) Moderado pleomorfismo nuclear (50% a 75% das células maduras)
- 3 ( ) Abundante pleomorfismo nuclear (25% a 50% das células maduras)
- 4 ( ) Extremo pleomorfismo nuclear (0 a 25% das células maduras)

#### **3. Padrão de invasão**

- 1 ( ) Bordas infiltrativas bem delimitadas
- 2 ( ) Cordões, bandas e/ou trabéculas solidas infiltrativas
- 3 ( ) Pequenos grupos ou cordões de células infiltrativas ( $n > 15$ )
- 4 ( ) Dissociação células difusa e profunda em pequenos grupos e/ou células individuais ( $n < 15$ )

#### **4. Infiltrado Inflamatório**

- 1 ( ) Infiltrado intenso
- 2 ( ) Infiltrado moderado
- 3 ( ) Infiltrado escasso
- 4 ( ) Infiltrado ausente

( ) Baixo grau de malignidade [escore  $\leq 8$ ]

( ) Alto grau [escore  $\geq 9$ ]