

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS  
UNIFAL-MG**

**EDUARDO PEREIRA GUIMARÃES**

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA CICLINA D1 E DO Ki-67 NO  
CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÍNGUA**

ALFENAS-MG

2014

**EDUARDO PEREIRA GUIMARÃES**

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA CICLINA D1 E DO Ki-67 NO  
CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÍNGUA**

Dissertação apresentada como parte dos requisitos para a obtenção do título de Mestre do Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas da Universidade Federal de Alfenas (UNIFAL-MG).  
Orientador: Prof. Dr. Alessandro Antônio Costa Pereira

ALFENAS-MG

2014

Guimarães, Eduardo Pereira.

Análise da expressão imunoistoquímica da cdcina D1 e do Ki-67 no carcinoma de células escamosas de língua / Eduardo Pereira Guimarães – Alfenas, 2014.

84 f. -

Orientador: Alessandro Antônio Costa Pereira.

Dissertação (Mestrado em Ciências Odontológicas) - Universidade Federal de Alfenas, Alfenas, MG, 2014.

Bibliografia.

1. Imuno-Histoquímica. 2. Carcinoma de células escamosas.
3. Marcadores biológicos. I. Pereira, Alessandro Antônio Costa.
- II. Título.

CDD: 617.607


**EDUARDO PEREIRA GUIMARÃES**

**“ANÁLISE DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA CICLINA D1 E DO Ki-67  
NO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÍNGUA”**

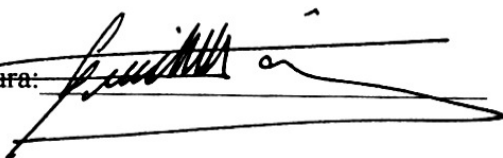
A Banca Examinadora, abaixo assinada, aprova a  
Dissertação apresentada como parte dos  
requisitos para a obtenção do título de Mestre em  
Ciências Odontológicas pela Universidade  
Federal de Alfenas. Área de concentração:  
Odontologia.

Aprovado em: 28 / 4 / 2014


Prof. Dr. Alessandro Antônio Costa Pereira  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG  
– UNIFAL-MG

Assinatura: 

Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira  
Instituição: Universidade de São Paulo – USP-  
Bauru

Assinatura: 

Prof. Dr. João Adolfo Costa Hanemann  
Instituição: Universidade Federal de Alfenas-MG  
– UNIFAL-MG

Assinatura: 

Dedico este trabalho a Deus e à minha família, em especial à Fabiana pelo apoio incondicional, amor, cumplicidade e entendimento nos momentos em que o tempo faltava e as obrigações deveriam ser cumpridas. Ao Davi, minha fonte de força e motivação, amor de filho que muda totalmente a nossa concepção da vida.

## AGRADECIMENTOS

Primeiramente, meus agradecimentos se voltam a Deus que nos permite seguir em frente com força e fé, caminhando sempre no sentido da verdade, honestidade e no trabalho. Aos meus pais queridos exemplos de pessoas que sempre, incondicionalmente, me apoiaram em todas as decisões da minha vida e me orientaram na educação, simplicidade e dignidade. Aos meus irmãos, amigos e familiares, sempre presentes durante toda a minha caminhada.

Agradeço ao Professor Dr. Alessandro Antônio Costa Pereira por sua orientação e mais do que isso pela amizade e por ter me aberto as portas de seu laboratório, de sua rotina e do seu conhecimento para me ajudar.

Ao Professor Dr. João Adolfo Costa Hanemann a quem devo muito nessa caminhada, pela sua dedicação e profissionalismo, pelo seu árduo e brilhante trabalho frente à Unifal e Clínica de Estomatologia que deve ser um exemplo a ser seguido. Obrigado pela nossa parceria em tantas experiências cirúrgicas e teóricas e por ter aprendido muito com você.

À Instituição Unifal-MG juntamente com seus funcionários, professores e equipe por me fazer orgulhar de ter feito parte desta comunidade acadêmica de tanto renome.

À bibliotecária Fátima dos Reis Goiatá, pela ajuda na formatação deste trabalho.

À Martha Priscila Azevedo, secretária do Programa de Pós-Graduação, pela sua prestatividade e cuidado.

Ao Professor Dr. Felipe Fornias Sperandio pelo envolvimento no artigo científico e por nos fornecer dicas muito valiosas desde o período de qualificação deste trabalho.

À Pró-Reitoria de Pesquisa e Pós-graduação, na figura do seu pró-reitor, Prof. Dr. Antônio Carlos Doriguetto.

À Faculdade de Odontologia, na figura do seu diretor, Prof. Dr. Mânio de Carvalho Tibúrcio.

À Instituição Unifenas - Campus Varginha em nome do Coordenador de Odontologia, Prof. Luis Antônio Sartori, pelo exemplo de dedicação, motivação e entusiasmo diário, além do seu apoio em toda esta jornada para ampliação do conhecimento. A todos os colegas de trabalho na Unifenas Varginha, em especial à

Professora Patrícia Peres Lucif Pereira, Professor Fernando José Almeida, Professor Sebastião Daniel Figueiredo, Professora Rísia, Professor Rivaldo e Professora Érika Pasqua por acompanharem tão próximos nesta trajetória. Aos meus queridos alunos da Unifenas - Campus Varginha, fonte de motivação para a minha carreira acadêmica, que em todo momento estamos trocando experiências e, na verdade, aprendendo ao mesmo tempo que tentamos ensinar.

Ao Hospital Bom Pastor, ao Instituto de Prevenção e Diagnóstico J. Janini e ao Laboratório de Patologia Anatomédica, por me oferecerem meios por onde todo o trabalho se desenvolvesse.

Ao Hospital Bom Pastor e seu corpo profissional capaz, que me fez ver de perto a realidade da Oncologia, suas limitações, realizações e lutas, me permitindo lidar com esta rotina diária e a todos os momentos que me foi permitido ausentar de atividades para cumprir e aproveitar o Mestrado.

Às professoras de estatística Patrícia Siqueira e Ines Nishimoto pela ajuda e apoio.

Aos amigos do Mestrado, em especial à Fernanda Pedreira e Paola Singi pelo nosso companheirismo, união e apoio diário nas horas felizes e difíceis e por ter certeza que foram criadas amizades para a vida inteira. À amiga Marina Lara de Carli sempre presente, prestativa e disposta a ajudar: obrigado pelas dicas, parcerias em artigos, amizade e convivência diária. Vocês foram fundamentais!

A todos os meus amigos de Odontologia de Diamantina que seguimos firmes na amizade, companheirismo e irmandade há mais de doze anos. Em especial aos amigos Bruno Correia Jham e Luis Felipe Canuto pelo apoio e motivação para seguir pela vida acadêmica.

Aos pacientes de todas estas instituições que com sua simplicidade e humildade se entregam de corpo e alma ao nosso conhecimento e experiências, cooperando e nos ajudando na tentativa de aprimorar a pesquisa, a saúde e a qualidade de vida de todos nós.

Por fim, a todas as pessoas que direta ou indiretamente me fizeram acreditar que este sonho se transformasse em realidade. Obrigado pelo apoio e ajuda!

“Todo mundo ama um dia, todo mundo chora. Um dia a gente chega e no outro vai embora.

Cada um de nós compõe a sua própria história, cada ser em si carrega o dom de ser capaz, e ser feliz...”

ALMIR SATER

## RESUMO

O câncer de boca representa uma importante condição de saúde uma vez que apresenta um índice de mortalidade de 3% a 10% em todo o mundo e a maioria dos casos diagnosticados se apresentam em estádios avançados. O diagnóstico tardio do câncer de boca é um dos principais fatores que comprometem o prognóstico e a sobrevida do paciente. Muitos avanços ocorreram no campo da oncologia e mesmo assim os carcinomas de cabeça e pescoço continuam com altas taxas de morbidade e mortalidade. A ciclina D1 e o Ki-67 são marcadores biológicos que se destacam nas pesquisas atuais provavelmente relacionadas com a progressão tumoral. Dentro dos objetivos propostos, este estudo visou avaliar a expressão destes marcadores pela técnica de imunistoquímica e correlacioná-las com os dados clínicos e morfológicos nos carcinomas de células escamosas da língua. Dos 30 pacientes estudados, 9 (30%) foram a óbito pela doença, 7 (23,3%) se encontram vivos com doença em atividade e 14 (46,7%) se encontram vivos sem atividade da doença. Dentre as análises estatísticas, observou-se que quanto maior o T, maiores são as chances de recidivas e menor a probabilidade de sobrevida livre de doença. O estadiamento T também mostrou possível associação com a ciclina D1 e Ki-67. Quanto maior a contagem dos marcadores pior foi a sobrevida global e a sobrevida livre de doença e a sobrevida global está inversamente relacionada ao estadiamento T e N. Enfatiza-se, portanto, a importância do estadiamento TNM para o seguimento dos carcinomas de células escamosas de língua e chama-se atenção para a relação positiva da expressão destes marcadores com a pior sobrevida destes pacientes.

Palavras-chave: Imunistoquímica. Carcinoma de células escamosas. Prognóstico. Marcadores biológicos. Ciclina D1. Ki-67.

## ABSTRACT

Oral cancer is a major health condition since has a mortality rate of 3 % to 10 % worldwide, with most cases diagnosed in advanced stages are presented. Late diagnosis of oral cancer is one of the main factors that impact the prognosis and patient survival. Many advances have occurred in the field of oncology and still carcinomas of the head and neck continue with high rates of morbidity and mortality. The cyclin D1 and Ki-67 are biological markers that stand out in the current research probably related to tumor progression. Among the proposed objectives, this study aimed to evaluate the expression of these markers by immunohistochemistry and correlate them with clinical and morphological data in squamous cell carcinomas of the tongue. In 30 patients, 9 (30 %) died from the disease, 7 (23.3 %) are alive with active disease and 14 (46.7 %) were alive without disease activity . Among the statistical analysis, was observed that the higher the T, the greater the chances of recurrence and lower the probability of disease-free survival. The T stage also showed possible association with the cyclin D1 and Ki -67. The higher the count of markers was worse overall survival and disease-free survival and overall survival is inversely related to T and N staging. Emphasize, therefore, the importance of TNM staging for the monitoring of squamous cell carcinomas of the tongue and attention to the positive relationship between the expression of these markers with worse patient survival.

Keywords: Immunohistochemistry. Squamous cell carcinoma. Prognosis. Biological markers. Cyclin D1. Ki-67.

## LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1 -	Programa AxioVision em execução na captura dos cortes.....	<b>36</b>
Figura 2 -	Expressão imunoistoquímica do anticorpo Ki-67 em carcinoma de células escamosas de língua.....	<b>46</b>
Figura 3 -	Expressão imunoistoquímica do anticorpo Ki-67 em carcinoma de células escamosas de língua.....	<b>47</b>
Figura 4 -	Expressão imunoistoquímica do anticorpo ciclina D1 em carcinoma de células escamosas de língua.....	<b>48</b>
Figura 5 -	Expressão imunoistoquímica do anticorpo ciclina D1 em carcinoma de células escamosas de língua.....	<b>49</b>
Gráfico 1 -	Probabilidade de sobrevida global relacionada ao estágio T.....	<b>59</b>
Gráfico 2 -	Probabilidade de sobrevida global relacionada ao estágio T agrupado.....	<b>59</b>
Gráfico 3 -	Probabilidade de sobrevida global relacionada à expressão de Ki-67.....	<b>60</b>
Gráfico 4 -	Probabilidade de sobrevida livre de doença relacionada ao estágio T.....	<b>64</b>
Gráfico 5 -	Probabilidade de sobrevida livre de doença relacionada ao estágio T agrupado.....	<b>64</b>
Gráfico 6 -	Probabilidade de sobrevida livre de doença relacionada à expressão de Ciclina D1.....	<b>65</b>

## LISTA DE TABELAS

Tabela 1 -	Classificação do tumor primário e o acometimento dos linfonodos no estadiamento TNM.....	19
Tabela 2 -	Classificação da metástase à distância no estadiamento TNM...	20
Tabela 3 -	Agrupamento das diferentes possibilidades do TNM em estádios.....	22
Tabela 4 -	Características epidemiológicas e clínicas dos 30 pacientes.....	39
Tabela 5 -	Características clínicas, tratamento e de estadiamento dos 30 pacientes.....	41
Tabela 6 -	Distribuição da casuística de acordo com dados de seguimento e recidivas.....	43
Tabela 7 -	Distribuição da casuística de acordo com variáveis histopatológicas.....	45
Tabela 8 -	Distribuição da casuística de acordo com os marcadores ciclina D1 e Ki-67.....	50
Tabela 9 -	Distribuição das variáveis de acordo com estadiamento T.....	51
Tabela 10 -	Distribuição das variáveis de acordo com estadiamento T agrupado.....	53
Tabela 11 -	Distribuição das variáveis de acordo com estadiamento N agrupado.....	54
Tabela 12 -	Distribuição das variáveis de acordo com grau de diferenciação	55
Tabela 13 -	Distribuição das variáveis de acordo com comprometimento de linfonodos.....	55
Tabela 14 -	Probabilidade de sobrevida global 6-meses e 1-ano.....	56
Tabela 15 -	Probabilidade de sobrevida global 6-meses e 1-ano.....	57
Tabela 16 -	Probabilidade de sobrevida livre de recidivas 6-meses e 1-ano	61
Tabela 17 -	Probabilidade de sobrevida livre de recidivas 6-meses e 1-ano	62
Tabela 18 -	Distribuição da casuística de acordo com Ki-67 (ponto de corte na mediana).....	66
Tabela 19 -	Distribuição da casuística de acordo com ciclina D1 (ponto de corte no terceiro quartil).....	67
Tabela 20 -	Distribuição da casuística de acordo com ciclina D1 (ponto de corte na mediana).....	68

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

EGFR -	Receptor do fator de crescimento epidérmico
HPV -	Vírus do papiloma humano
TNM -	Tumor, nódulos linfáticos e metástases.
cTNM -	Tumor, nódulos linfáticos e metástases. Classificação com base nos aspectos clínicos.
pTNM -	Tumor, nódulos linfáticos e metástases. Classificação com base nos aspectos anatomopatológicos.
DNA -	Ácido desoxiribonucleico
Cdk -	Quinase ciclina-dependente
pRb -	Proteína do retinoblastoma
FISH -	Hibridização por fluorescência in situ
U.I.C.C -	União Internacional para o Controle do Câncer
PBS -	Tampão Fosfato-salino

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO.....</b>	<b>13</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DE LITERATURA.....</b>	<b>16</b>
2.1	EPIDEMIOLOGIA E FATORES DE RISCO.....	16
2.2	O ESTADIAMENTO TNM.....	18
2.3	MICROSCOPIA E IMUNOISTOQUÍMICA.....	22
2.4	O CICLO CELULAR E A CARCINOGENESE.....	24
2.5	MARCADORES CELULARES KI-67 E CICLINA D1.....	27
<b>3</b>	<b>PROPOSIÇÃO.....</b>	<b>31</b>
<b>4</b>	<b>MATERIAL E MÉTODOS.....</b>	<b>32</b>
4.1	QUESTÕES ÉTICAS.....	32
4.2	CASUÍSTICA E SELEÇÃO DA AMOSTRA.....	32
4.3	ANÁLISE DAS CÉLULAS IMUNOMARCADAS.....	35
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	37
<b>5</b>	<b>RESULTADOS.....</b>	<b>38</b>
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO.....</b>	<b>69</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÕES.....</b>	<b>74</b>
	<b>REFERÊNCIAS.....</b>	<b>75</b>
	<b>ANEXOS.....</b>	<b>80</b>

## 1 INTRODUÇÃO

O câncer é o maior problema de saúde pública nos Estados Unidos e em algumas partes do mundo. Nos Estados Unidos uma a cada quatro mortes ocorrem em decorrência do câncer. Estimativas de novos casos para 2013 chegam a mais de 1,5 milhão de pessoas com as mortes chegando a quase 600.000. No ano de 2009 o câncer foi a segunda principal causa de morte entre todas as idades e em ambos os gêneros, além disso, foi a principal causa de morte entre as idades de 40 a 79 anos com grande número de indivíduos acometidos entre 60 e 79 anos (SIEGEL; NAISHADHAM; JEMAL, 2013).

As estatísticas do câncer bucal para o Brasil em 2012 foram de 9.990 homens acometidos e de 4.180 mulheres com taxa bruta de 10,41 e 4,18 respectivamente para cada 100.000 habitantes. Para o estado de Minas Gerais foram registrados 970 novos casos em homens e 430 novos casos em mulheres, com taxas brutas de 9,6 e 4,14 respectivamente para cada 100.000 habitantes. No ano de 2000, na cidade de Belo Horizonte, ocorreram 104 novos casos em homens e 50 novos casos em mulheres, sendo que em 2012 a estimativa foi de 150 novos casos em homens e 60 novos casos em mulheres (BRASIL, 2012).

O câncer de boca representa uma importante condição de saúde uma vez que apresenta um índice de mortalidade de 3% a 10% em todo o mundo sendo que a maioria dos casos diagnosticados se apresenta em estágios avançados. O diagnóstico tardio do câncer de boca é um dos principais fatores que compromete o prognóstico e a sobrevida do paciente. Quase 50% dos casos diagnosticados entre 2002 e 2008 nos Estados Unidos da América apresentavam comprometimento regional e não somente uma lesão localizada (BITTAR et al., 2010; SIEGEL; NAISHADHAM; JEMAL, 2013).

Para o câncer bucal, a média mundial de sobrevida em 5 anos é de 46% e o diagnóstico precoce e a prevenção através do controle dos fatores de risco são importantes indicadores para uma melhoria na qualidade de vida da população. Taxas de incidência e mortalidades podem ser reduzidas em todo o mundo com políticas de prevenção, promoção e educação em saúde, enfatizando o diagnóstico precoce e o tratamento (BITTAR et al., 2010; RAZMPA; MEMARI; NAGHIBZADEH, 2011).

Amorim Filho et al. (2003) e Fardin et al. (2004) ressaltam uma maior associação entre o tabagismo e o câncer de língua quando comparado a outros locais na boca. Além disso, há uma associação importante entre o estágio avançado III e IV com um longo tempo de uso do tabaco e das bebidas alcoólicas, quando o consumo do tabaco supera o do álcool.

Mesmo em pacientes mais jovens, com menos de 40 anos de idade, o local de maior incidência do câncer de boca é a língua. O estágio da doença é associado significativamente com o prognóstico em pacientes jovens e mais idosos. A forte influência do estágio clínico para o melhor prognóstico enfatiza a importância do diagnóstico precoce e tratamento conservador do câncer bucal (SASAKI et al., 2005).

Há importantes avanços referentes à oncologia e mesmo assim os carcinomas de cabeça e pescoço continuam com altas taxas de morbidade e mortalidade. Pesquisas da história natural da doença, particularmente as lesões potencialmente malignas ajudam a desenvolver programas de rastreamento para as desordens individuais. O desenvolvimento de marcadores tumorais com alta sensibilidade e especificidade auxiliam na detecção de pacientes e lesões de risco (MASSANO et al., 2006; WARNAKULASURIYA, 2009).

Dentre as alterações genéticas frequentemente observadas no câncer de língua destacam-se a superexpressão da ciclina D1, a inativação do p53, a superexpressão do EGFR e a amplificação de c-myc (GOESSEL et al., 2005). A expressão elevada do Ki-67 está correlacionada com recidivas loco-regionais, tornando-o um marcador potencial na importância do tratamento destas lesões, podendo ser abordado mais agressivamente diante destas informações (WANGSA et al., 2008). Entretanto, não se sabe ao certo como ocorre a interação destas alterações genéticas durante a transição do epitélio normal ao epitélio com características de malignidade. A habilidade para desvendar este processo será uma grande ferramenta de aprimoramento para entendimento do processo da carcinogênese (GOESSEL et al., 2005).

A ciclina D1 desempenha um papel crítico na transição entre as fases G1 e S do ciclo celular e, numa cascata de eventos, induz a transcrição de genes alvo. A superexpressão da proteína e amplificação do gene da ciclina D1 foram relatados em vários tumores humanos, incluindo carcinomas de células escamosas de cabeça

e pescoço. A expressão aumentada dessa proteína é sinal de iminente transformação maligna (MOTOKURA; ARNOLD, 1993; KOVESI; SZENDE, 2006).

Torna-se, portanto, motivante procurar fatores relacionados ao prognóstico e mais estudos sobre marcadores biológicos e suas aplicações práticas poderão trazer melhorias no prognóstico e no sucesso terapêutico, diminuindo as taxas de morbidade e mortalidade do câncer.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 EPIDEMIOLOGIA E FATORES DE RISCO

O câncer de boca pode ser entendido como um conjunto de neoplasias que envolvem os lábios e a boca, sendo encontrado principalmente na língua, assoalho de boca, palato, gengiva e rebordo alveolar (BRASIL, 2012).

Na boca e na faringe ocorrem cerca de 210.000 novos casos de câncer no mundo, por ano. Estimou-se para o ano de 2013, nos Estados Unidos da América, 41.380 novos casos, em uma proporção de quase 3:1 entre homens e mulheres (LAM; LOGAN; LUKE, 2006; BRASIL, 2012; SIEGEL; NAISHADHAM; JEMAL, 2013). Agrawal; Rajderkar (2012) encontraram, no câncer de boca, 78,13% de homens sendo uma taxa de proporção homens/mulheres de 3,57:1.

A língua é o local de maior incidência do câncer de boca, envolvendo mais que 40% dos casos, com uma taxa global de 0,41% de todas as neoplasias malignas, sendo classificado como carcinoma de células escamosas na grande maioria dos casos. Muitos estudos demonstram a maioria dos cânceres bucais acometendo a língua e a grande incidência dos cânceres acomete homens com mais de 50 anos de idade. A estimativa de 2013 para neoplasias de língua nos Estados Unidos da América foi de 13.500 casos num total de 41.380 cânceres de boca e faringe (COSTA; ARAÚJO JÚNIOR; RAMOS, 2005; SASAKI et al., 2005; LAM; LOGAN; LUKE, 2006; SILVEIRA et al., 2008; RAZMPA; MEMARI; NAGHIBZADEH, 2011; AGRAWAL; RAJDERKAR, 2012; SIEGEL; NAISHADHAM; JEMAL, 2013).

Sobre os fatores de risco para o câncer bucal pode-se destacar o tabaco, em todas as suas formas, e o etilismo, além do hábito de mascar betel e o baixo consumo de frutas e vegetais. São citados como fatores de risco fortemente sugestivos a radiação solar e outras formas de radiação; como possíveis fatores de risco, alguns vírus e a deficiência imunológica e como fatores de risco especulativos os enxaguantes bucais, o consumo de mate, a doença periodontal e a transmissão familiar (BLOT et al., 1988; PETERSEN, 2003; GILLISON, 2007; PETERSEN, 2009;

PETTI, 2009; WARNAKULASURIYA, 2009; AGRAWAL; RAJDERKAR, 2012; BRASIL, 2012; TOBACCO, 2012).

Em todo o mundo 25% das lesões de câncer bucal são atribuídas ao tabaco, 7 a 19% ao álcool, 10 a 15% às deficiências nutricionais e mais de 50% ao hábito de mascar betel, sendo a carcinogenicidade dose-dependente e ampliada por múltiplas exposições (PETTI, 2009).

No estudo de Blot et al. (1988) foram comparados os pacientes com câncer bucal e de faringe com um grupo controle e o índice de tabagistas e etilistas entre os indivíduos que desenvolveram câncer de boca e faringe foi significativamente maior. Dentre os pacientes com câncer, 93% dos homens e 83% das mulheres eram tabagistas, enquanto que as porcentagens eram significativamente menores no grupo controle (78% dos homens e 53% das mulheres). Entre os pacientes tabagistas, quase todos (95% homens, 91% mulheres), também eram etilistas. Quase todos os casos de câncer (94% homens, 82% mulheres) ocorreram em etilistas, com porcentagens significativamente mais baixas no grupo controle (83% homens e 60% mulheres). Entre os pacientes que consumiram bebidas alcoólicas, quase todos (95% homens e 94% mulheres) também eram tabagistas. Este estudo coloca o tabagismo e o etilismo como principais fatores de risco do câncer de boca e faringe. Os riscos em indivíduos tabagistas e etilistas podem aumentar em 35 vezes, de acordo com a quantidade utilizada e a concomitância de uso.

Embora a maioria dos cânceres de boca resulte de um efeito combinado de tabaco e álcool, existe uma forte relação entre dose e utilização, comprovando que ambos os produtos, mesmo isolados, podem induzir ao câncer (BLOT et al., 1988). Para Petersen (2009) o risco associado ao consumo de álcool e tabaco tem sido estimado em 80% para os homens e 61% para as mulheres, com uma taxa geral de 74%.

A literatura confere importante destaque aos fatores de risco como tabaco e álcool, no entanto existem aproximadamente 20% de casos de câncer de boca sem etiologia conhecida, destacando-se o aumento de casos em pacientes mais jovens, sem história de tabagismo ou etilismo, o que pode indicar exposição a outros agentes carcinogênicos e uma incidência heterogênea em diferentes regiões geográficas. Outro ponto importante é o papel potencial da relação do HPV (vírus papiloma humano) na etiologia dessas lesões devido a mudanças no comportamento sexual (GILLISON, 2007; VARGAS-FERREIRA et al., 2012).

As medidas para prevenir o câncer de boca e faringe devem ser voltadas para a redução no consumo de tabaco e álcool (BLOT et al., 1988; PETERSEN, 2003; WARNAKULASURIYA, 2009; RAZMPA; MEMARI; NAGHIBZADEH, 2011; TOBACCO, 2012), no entanto, do ponto de vista de saúde pública, a erradicação deste comportamento é um processo bastante difícil, principalmente com indivíduos que não conseguem parar devido ao vício ou ao prazer destes comportamentos (PETTI, 2009).

## 2.2 O ESTADIAMENTO TNM

Existe um sistema para classificação das lesões malignas bastante utilizado e padronizado mundialmente, denominado TNM (tumor, nódulos linfáticos e metástases). Este sistema é utilizado para descrever a extensão anatômica da neoplasia e tem por base a avaliação de três componentes: T - a extensão do tumor primário; N - a ausência ou presença e a extensão de metástase em linfonodos regionais; M - a ausência ou presença de metástase à distância. A adição de números a estes três componentes indica a extensão da doença maligna (TABELAS 01 E 02) (BRASIL, 2004).

Tabela 1- Classificação do tumor primário e o acometimento dos linfonodos no estadiamento TNM.

<b>Estádio</b>	<b>Características</b>	<b>Estádio</b>	<b>Características</b>
<b>T</b>		<b>N</b>	
TX	O tumor primário não pode ser avaliado	NX	Os linfonodos regionais não podem ser avaliados
T0	Não há evidência de tumor primário	N0	Ausência de metástase em linfonodos regionais
Tis	Carcinoma in situ		
T1	Tumor com 2 cm ou menos em sua maior extensão	N1	Metástase em um único linfonodo homolateral, com 3 cm ou menos em sua maior extensão
T2	Tumor com mais de 2cm e até 4cm em sua maior extensão	N2	Metástase em um único linfonodo homolateral, com mais de 3 cm e até 6 cm em sua maior extensão, ou em linfonodos homolaterais múltiplos, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior extensão; ou em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior extensão
T3	Tumor com mais de 4 cm em sua maior extensão	N2a	Metástase em um único linfonodo homolateral, com mais de 3 cm e até 6 cm em sua maior extensão

Tabela 1- Classificação do tumor primário e o acometimento dos linfonodos no estadiamento TNM.  
(continuação)

<b>Estádio T</b>	<b>Características</b>	<b>Estádio N</b>	<b>Características</b>
T4a (Lábio)	Tumor que invade estruturas adjacentes: cortical óssea, nervo alveolar inferior, assoalho da boca, ou pele da face	N2b	Metástase em linfonodos homolaterais múltiplos, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior extensão
T4a (Cavidade oral)	Invade estruturas adjacentes: cortical óssea, músculos profundos/extrínsecos da língua (genioglosso, hioglosso, palatoglosso e estiloglosso), seios maxilares ou pele da face	N2c	Metástase em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles com mais de 6 cm em sua maior extensão
T4b (Lábio e cavidade oral)	Invade o espaço mastigador, lâminas pterigoides, base do crânio ou carótida interna	N3	Metástase em linfonodo com mais de 6 cm em sua maior extensão

FONTE: Adaptado de BRASIL, 2004.

Tabela 2- Classificação da metástase à distância no estadiamento TNM.

<b>Estádio M</b>	<b>Características</b>
MX	A presença de metástase à distância não pode ser avaliada
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Metástase à distância

FONTE: BRASIL, 2004.

Este sistema foi proposto entre os anos de 1943 e 1952 por Piere Denoix e está em constante aprimoramento (BRASIL, 2004). O propósito do sistema TNM é de facilitar o planejamento do tratamento, prognóstico, avaliação uniforme e comparação dos resultados de tratamento, facilitando a troca de informações entre os centros de tratamento e contribuindo para a continuidade da pesquisa sobre o câncer (BRASIL, 2004; VAN DER SCHROEFF; BAATENBURG DE JONG, 2009).

O principal propósito a ser conseguido pela concordância internacional na classificação dos casos de câncer pela extensão da doença é fornecer um método que permita comparações entre experiências clínicas sem ambiguidade. Para desenvolver e sustentar um sistema de classificação aceitável para todos os usuários há a necessidade de uma proximidade entre todos os comitês nacionais e internacionais. Somente dessa forma todos os oncologistas estarão aptos a usar uma linguagem comum na comparação de seu material clínico e na avaliação dos resultados do tratamento (BRASIL, 2004).

Dois classificações são descritas para cada localização anatômica, a saber: a) A classificação clínica (classificação clínica pré-tratamento), designada TNM (ou cTNM), tem por base as evidências obtidas antes do tratamento. Tais evidências surgem do exame físico, diagnóstico por imagem, endoscopia, biópsia, exploração cirúrgica e outros exames relevantes; b) A classificação patológica (classificação histopatológica pós-cirúrgica), designada pTNM, tem por base as evidências conseguidas antes do tratamento, complementadas ou modificada pela evidência adicional conseguida através da cirurgia e do exame histopatológico. A avaliação histopatológica do tumor primário (pT) exige a ressecção do tumor primário ou biópsia adequada para avaliar a maior categoria pT. A avaliação histopatológica dos linfonodos regionais (pN) exige a remoção representativa de nódulos para comprovar a ausência de metástase em linfonodos regionais (pN0) e suficiente para avaliar a maior categoria pN. A investigação histopatológica de metástase à distância (pM) exige o exame microscópico (BRASIL, 2004).

Para simplificar estas 32 possibilidades na combinação de T, N e M pode-se reduzir a classificação em 4 estádios (TABELA 03) para refletir e diferenciar mais homogeneamente entre os estádios (VAN DER SCHROEFF; BAATENBURG DE JONG, 2009).

Tabela 3 – Agrupamento das diferentes possibilidades do TNM em estádios.

<b>Estádio</b>	<b>T</b>	<b>N e M</b>
Estádio 0	Tis	N0M0
Estádio I	T1	N0M0
Estádio II	T2	N0M0
Estádio III	T1, T2	N1M0
	T3	N0, N1 M0
Estádio IVA	T1, T2, T3	N2M0
	T4A	N0, N1, N2 M0
Estádio IVB	Qualquer T	N3M0
	T4b	Qualquer N M0
Estádio IVC	Qualquer T	Qualquer N M1

FONTE: BRASIL, 2004.

O sistema TNM é a maior contribuição para os cuidados com a doença e a pesquisa, entretanto existem algumas limitações importantes porque é baseado isoladamente na morfologia tumoral e não considera fatores relacionados ao paciente para o prognóstico tais como idade, gênero e comorbidades nem fatores como marcadores biológicos e moleculares. Uma outra limitação importante do sistema refere-se a localização tumoral e não difere este fator na classificação do estadiamento. Assim, o sistema TNM não é satisfatoriamente completo para suprir os prognósticos individualizados. Com isso, os autores recomendam enfaticamente que uma nova melhoria seja feita no sistema TNM que pudesse incluir os fatores relevantes citados bem como parâmetros de biologia molecular (VAN DER SCHROEFF; BAATENBURG DE JONG, 2009).

### 2.3 MICROSCOPIA E IMUNOISTOQUÍMICA

Rapidis et al. (2009), em trabalho de revisão, concluíram que a técnica de imunistoquímica e a identificação de alterações genéticas levam a uma importância significativa do prognóstico, além de adicionar um prognóstico mais preciso pré e pós-operatório. Muitas pesquisas atuais visam estabelecer critérios que determinem o comportamento biológico dessas neoplasias. O estudo do comportamento biológico de uma neoplasia é muito importante na avaliação do seu prognóstico (SCHLUTER et al., 1993; GUERRA, 2002; THOMSON et al., 2008; HUMAYUN;

PRASAD, 2011; KUMAR; KANE; RATHOD, 2012).

A despeito dos progressos alcançados no diagnóstico e na terapêutica do câncer, a elaboração adequada do prognóstico para os carcinomas de células escamosas de boca e lesões cancerizáveis ainda apresentam grandes dificuldades, sendo importante ressaltar que uma mudança significativa no tempo e qualidade da sobrevida dos pacientes portadores de câncer de boca só ocorrerá com o desenvolvimento de novas abordagens terapêuticas e que estão relacionadas com a padronização de procedimentos técnicos através da utilização dos marcadores tumorais (BARROS; MAGALHÃES; SCHMIT, 2005).

O critério microscópico tem sido usado como indicador do prognóstico, no entanto com algumas desvantagens: grau de diferenciação pode variar em diferentes locais na mesma lesão; o fragmento de biópsia pode ser insuficiente; e a subjetividade do observador. Guerra (2002) e Massano et al. (2006) fizeram uma revisão da literatura com buscas no PubMed/ Medline e sites das revistas científicas especializadas buscando alcançar textos concisos e informativos para os fatores envolvidos com o câncer tanto os mais bem estabelecidos como os mais recentes, formulando questões relacionadas ao paciente, lesão e fatores relacionados ao tratamento. Estes autores concluíram que, atualmente, os fatores mais importantes para o prognóstico são: estadiamento, acometimento extracapsular, espessura do tumor e margem de ressecção livre.

A análise do front de invasão tumoral é de grande relevância por indicar interações do tumor com o hospedeiro e, também, por indicar a agressividade e o prognóstico. Deve-se também dar importância a alguns fatores tais como a distinção biológica de cada paciente e a distinção biológica da malignidade que faz com que existam comportamentos diferentes da doença frente ao hospedeiro e do hospedeiro frente à doença (MASSANO et al., 2006).

Rapidis et al. (2009), em artigo de revisão, consideram que nos últimos 30 anos se viu um grande aumento no conhecimento da carcinogênese do câncer bucal bem como os avanços tecnológicos no diagnóstico dessa doença. Avanços no tratamento incluíram o esclarecimento de muitos fatores etiopatogênicos, a valorização da ciência básica, os avanços no diagnóstico histopatológico e imaginológico.

A condução do tratamento com radioterapia, quimioterapia e cirurgia em procedimentos combinados que visam preservação de estruturas nobres, menor

prejuízo aos tecidos adjacentes e ainda a reabilitação e reconstruções cirúrgicas e protéticas, vem diminuindo as sequelas e efeitos colaterais do tratamento. Mesmo com todo este progresso, a sobrevida da doença aumentou pouco embora a qualidade de vida tenha melhorado significativamente (RAPIDIS et al., 2009).

A progressão do tumor é um processo de múltiplas etapas e multifatorial onde os tumores em estágio avançado (T4) e com linfonodos clinicamente positivos tornam o prognóstico desfavorável, enfatizando a necessidade de melhorar o controle do câncer e adquirir mais conhecimentos a respeito da evolução da doença (BRASILEIRO FILHO, 2004; MASSANO et al., 2006; SIEGEL; NAISHADHAM; JEMAL, 2013).

## 2.4 O CICLO CELULAR E A CARCINOGENÊSE

A carcinogênese envolve um processo de múltiplas etapas. As neoplasias possuem várias características como crescimento excessivo, invasividade local e capacidade de formar metástases. Muitas neoplasias adquirem um potencial maligno maior durante o passar do tempo, não simplesmente representando um aumento do tumor mas sim uma progressão tumoral com capacidade de invasão, velocidade de crescimento, capacidade metastática entre outros. Com esta transformação e conseqüentemente progressão tumoral, a massa tumoral torna-se enriquecida por variantes que tem maior potencial de driblar as defesas do hospedeiro e são portanto mais agressivas. Acredita-se que cada gene da neoplasia possua uma função específica e a sua desregulação contribui para a progressão tumoral (BRASILEIRO FILHO, 2004; KUMAR et al., 2008).

Existem alterações fundamentais na fisiologia celular que em conjunto podem apresentar papel importante nas neoplasias malignas: 1- auto-suficiência de fatores de crescimento; 2- insensibilidade aos sinais inibidores de crescimento; 3- evasão da apoptose; 4- potencial replicativo ilimitado; 5- desenvolvimento e manutenção de angiogênese; 6- capacidade para invadir e metastatizar; 7- instabilidade genômica resultando em defeitos no reparo do DNA (HANAHAN; WEINBERG, 2000; BRASILEIRO FILHO, 2004; KUMAR et al., 2008; HANAHAN; WEINBERG, 2011). Os cânceres podem se tornar autônomos se os genes que conduzem o ciclo celular se tornarem desregulados por mutações ou amplificação (RUBIN, 2006).

O ciclo celular consiste em uma série complexa de eventos altamente regulados que culminam com a duplicação do DNA e divisão celular. No entanto, uma vez iniciado, o fenômeno não progride automaticamente. Existem pontos estratégicos ou de restrição, nos quais há uma parada (checkpoints), podendo ocorrer ativação ou bloqueio do ciclo (HANAHAN; WEINBERG, 2000). Assim, no ciclo celular as células se encontram em duas fases: 1- mitose: as células dividem seu material nuclear e fazem a citocinese; 2- interfase: período entre duas divisões celulares (HANAHAN; WEINBERG, 2000; RUBIN, 2006).

As fases constituintes do ciclo celular são M, G<sub>0</sub>, G<sub>1</sub>, S e G<sub>2</sub>. Nos mamíferos o principal ponto de regulação está na fase G<sub>1</sub> no primeiro ponto de restrição, que uma vez ultrapassado permite à célula prosseguir nas fases S e G<sub>2</sub>. Dependendo da sua intensidade, lesões do DNA podem parar o ciclo celular em G<sub>1</sub> ou induzir apoptose. Há um mecanismo sensor complexo que ativa a expressão da proteína p53 a qual estimula genes para a síntese de outras proteínas que param o ciclo em G<sub>1</sub>, S ou G<sub>2</sub> ou induzem apoptose (HANAHAN; WEINBERG, 2000; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

A progressão do ciclo celular depende de mecanismos reguladores que envolvem pontos de controle e asseguram que a célula não progride até mitose se a fase S não estiver completa e se qualquer dano de DNA não tiver sido reparado. Os bloqueios na progressão do ciclo celular em G<sub>1</sub> e G<sub>2</sub> frequentemente provocam apoptose como uma via de correção. Esse fenômeno contribui para a indução de morte de célula tumoral em resposta a diferentes agentes quimioterapêuticos (RUBIN, 2006).

A regulação do ciclo celular é feita sobretudo pelas Cdk (cyclin dependent kinases: Quinases dependentes de ciclinas) e pelas ciclinas que se ligam às Cdk e controlam a taxa de fosforilação das proteínas responsáveis pelos inúmeros fenômenos que ocorrem na divisão celular (HANAHAN; WEINBERG, 2000). O complexo ciclina-cdk fosforila as proteínas alvo que conduzem a célula através do ciclo. As mutações desregulam a atividade das ciclinas e CDKs favorecendo a proliferação celular. A amplificação do gene da cdk4 é encontrada em melanomas e alguns sarcomas. Os genes da ciclina D estão superexpressados em muitas neoplasias como a mama, esôfago, fígado e linfomas (BRASILEIRO FILHO, 2004; KUMAR et al., 2008).

As ciclinas são assim chamadas pela sua natureza cíclica, ou seja, são

produzidas e degradadas rapidamente durante o ciclo celular, de forma cíclica, nas diferentes etapas deste ciclo e recebem nomes diferentes de acordo com algumas propriedades funcionais e momentos em que atuam (BRASILEIRO FILHO, 2004; KUMAR et al., 2008).

A progressão ordenada das células através das diversas fases do ciclo celular é orquestrada pelas ciclinas e pelas quinases ciclina-dependentes (CDKs) e seus inibidores. As ciclinas são sintetizadas durante fases específicas do ciclo celular, e sua função é ativar as CDKs. No término dessa tarefa, os níveis de ciclina caem rapidamente. Mais de 15 ciclinas foram identificadas; as ciclinas D, E, A e B aparecem sequencialmente durante o ciclo celular e se ligam a uma ou mais CDKs. A ciclina D é a primeira a aumentar no ciclo celular, sendo um fator chave na progressão do ciclo. Existem três formas de ciclina D: D1, D2 e D3 (KUMAR et al., 2008). A ciclina D1 se expressa em células epiteliais na transição entre as fases G1 e S do ciclo celular. Por meio de imunistoquímica, sua expressão é localizada na camada parabasal. Em certos tipos celulares, a ciclina D1 induz a apoptose. A expressão aumentada dessa proteína é sinal de iminente transformação maligna (KOVESI; SZENDE, 2006).

A homeostase tecidual e a quiescência celular são mantidas dentro de um tecido normal através do funcionamento de múltiplos sinais antiproliferativos. As células podem ser forçadas a sair do ciclo de proliferação ativa para um estado de repouso a partir do qual eles podem ressurgir em alguma ocasião futura, quando sinais extracelulares permitam. Ou então, as células podem abandonar definitivamente o seu potencial proliferativo por ser induzido a entrar em estado pós-mitótico. Para que as células cancerosas evoluam elas devem driblar estes sinais antiproliferativos. Grande parte deste funcionamento está devidamente relacionado ao ciclo celular mais especificamente aos componentes que regulam a passagem da célula através da fase G1 do ciclo de crescimento. Em nível molecular, a grande maioria dos sinais antiproliferativos são canalizados através da proteína retinoblastoma (pRb) (HANAHAN; WEINBERG, 2000; HANAHAN; WEINBERG, 2011).

O rompimento da via de pRb ativa a liberação de E2F e, assim, permite a proliferação das células, tornando as células insensíveis a fatores anticrescimento que normalmente operam ao longo desta via para bloquear o avanço através da fase G1 do ciclo celular (HANAHAN; WEINBERG, 2000).

O ciclo celular progride através de quatro fases sequenciais e a passagem através do ciclo celular é rigorosamente controlada por CDK. Cada ciclina apresenta um padrão característico de expressão e de degradação, o que contribui para a coordenação dos eventos da mitose. A ciclina D1 desempenha um papel crítico na transição de G1 para a fase S do ciclo celular. Complexos de ciclina D1 e CDK 4 ou 6 fosforilam a pRb, liberando fatores de transcrição E2F e conseqüentemente, induz a transcrição de genes alvo. A superexpressão da proteína e amplificação do gene da ciclina D1 foram relatados em vários tumores humanos, incluindo carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço (MOTOKURA; ARNOLD, 1993).

## 2.5 MARCADORES CELULARES KI-67 E CICLINA D1

Ki-67 é uma proteína nuclear não-histona humana presente na região pericromossomal e associada ao controle do ciclo celular. A expressão dessa proteína está associada a proliferação celular e é amplamente utilizada como marcador de proliferação, para mensurar a fração de crescimento de células em tumores humanos (SCHLUTER et al., 1993). A meia-vida estimada de Ki-67 é de 60 a 90 minutos, começando a ser expresso na fase S, aumentando progressivamente entre S e G2, e alcança um platô na mitose. Após a divisão celular, as células retornam à fase G1 com um estoque de Ki-67, cujo nível diminui rapidamente nessa fase (HUMAYUN; PRASAD, 2011).

Em um trabalho sobre lesões cancerizáveis, os pacientes foram analisados quanto aos fatores de risco, submetidos à excisão a laser das lesões e acompanhados durante 5 anos. Neste período, observações quanto à recorrência da lesão ou surgimento de lesões em locais distintos eram analisadas, assim como observações na coloração de hematoxilina-eosina, classificando o tipo de displasia. Por meio da técnica de imunistoquímica, as amostras eram analisadas em microscópio acoplado a computador e os índices da expressão de ciclina A, B1 e Ki-67 eram calculadas por meio da contagem do número de células positivas entre 1000 células. Leucoplasias com índice de proliferação celular mais alto demonstram maior incidência de recidiva da lesão, diferença estatisticamente significativa comparada à lesões com índices menores que o valor médio. Dessa forma, a expressão de Ki-67 pode ter um papel essencial como ferramenta clinicamente útil de previsão do comportamento biológico da lesão (THOMSON et al., 2008).

Humayun e Prasad (2011) analisaram a sobre-expressão de marcadores em lesões cancerizáveis. As amostras foram coletadas de 14 casos (4 carcinomas, 4 leucoplasias, 4 com fibrose submucosa e 2 com mucosa oral normal serviram como caso controle). Dados demográficos foram registrados para todos os pacientes e incluíram idade, sexo e história pessoal sobre fatores de risco. Todos os 14 pacientes foram submetidos a biópsia incisional e as amostras de tecidos moles foram fixados em formalina a 10%. Para todos os casos, o diagnóstico clínico foi confirmado histologicamente após coloração de hematoxilina e eosina dos espécimes. Os mesmos foram histologicamente classificados e submetidos a técnica de imunistoquímica para Ki-67 e p53 e foram analisadas qualitativamente e quantitativamente quanto a marcação. Todos os dados foram analisados estatisticamente. Em leucoplasias, Ki-67 demonstrou marcação positiva na camada de células basais, com intensidade variando de discreta a intensa. O índice de proliferação celular médio foi de 35%.

No trabalho de Kumar, Kane e Rathod (2012) os espécimes removidos cirurgicamente de 55 pacientes com leucoplasia oral e dez amostras de epitélio oral normal foram avaliados. As amostras foram submetidas ao processo histológico de rotina seguido por coloração em hematoxilina e eosina. Posteriormente, foram classificadas histologicamente com base nos critérios da Organização Mundial de Saúde e submetidas a análise quantitativa da expressão dos marcadores p53, Ki-67 e c-erbB2 por técnica de imunistoquímica. A marcação foi restrita à camada basal em leucoplasias sem displasia, com um aumento na positividade suprabasal à medida que o grau de displasia aumenta e um aumento estatisticamente significativo no índice de proliferação celular foi observado com o aumento do grau de displasia.

Martinez et al. (2005) não encontraram diferenças estatisticamente significantes na marcação pelo Ki-67 entre queilite actínica e lábio normal embora mostrem uma marcação positiva nas células epiteliais basais, nas camadas parabasais, a marcação foi encontrada esporadicamente.

Para os tumores de cabeça e pescoço, várias investigações mostram uma correlação entre um alto índice de marcação de Ki-67 e sobrevida, tempo de recidiva ou metástase ganglionar. No estudo de Sittel et al. (1999) os tumores com maior número de células em proliferação, conseqüentemente com maior índice de marcação pelo Ki-67, respondem melhor à radioterapia e, portanto, tem menor índice de recidiva.

Wangsa et al. (2008) avaliaram a instabilidade genômica e a atividade proliferativa de carcinomas de células escamosas de língua, através de análise imunohistoquímica da expressão do Ki-67 e identificaram alta atividade proliferativa relacionada com elevado risco de recorrência loco-regional. Concluíram, portanto, que o Ki-67 pode ser considerado um marcador útil na recorrência em pacientes enquadrados no estágio I.

Em relação às lesões cancerizáveis bucais, a expressão de ciclina D1 ocorreu mais frequentemente em leucoplasias com displasia comparadas às lesões sem displasia (VIEIRA et al., 2012). Além disso, a expressão aumenta paralelamente ao grau de displasia encontrado (KOVESI; SZENDE, 2006).

Turatti et al. (2005) selecionaram espécimes de 41 casos diagnosticados como leucoplasia classificados com displasia leve, moderada e grave, 24 casos de carcinomas de células escamosas orais, 15 casos de mucosa oral normal todos provenientes da língua. A displasia foi classificada em graus de acordo com a OMS, a expressão de c-Jun, c-Fos e ciclina D1 foram avaliadas por meio de técnica de imunohistoquímica, ocorrendo expressão aumentada para c-Jun a medida que aumentava o grau de displasia, com a maior expressão encontrada nos carcinomas de células escamosas. A expressão de c-Fos foi alta nas displasias moderadas e severas e nos carcinomas. A expressão da ciclina D1, observada na maioria dos carcinomas de células escamosas, mostrou correlação estatística entre as 03 proteínas e o grau de alteração do epitélio.

Em um estudo com 698 casos de carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço e 777 controles (indivíduos da mesma região estudada e com idade e gênero correspondentes), a expressão da ciclina D1 foi avaliada por técnica de imunohistoquímica. Os autores identificaram que tumores com superexpressão da ciclina D1 tiveram um pobre prognóstico de sobrevida e isso foi mais bem observado em tumores estágio 3 e 4 quando comparados aos estádios 1 e 2. Neste trabalho a ciclina D1 também foi relacionada com pobres prognósticos independentemente de associação com outros fatores de risco (MARSIT et al., 2008).

Fujii et al. (2001) estudaram 23 pacientes com carcinoma de língua por hibridização fluorescente in situ (FISH), utilizando um espécime incorporado em parafina. Todos os pacientes receberam a ressecção completa do sítio primário, com ou sem esvaziamento cervical. A amplificação do clone da ciclina D1 foi positiva em 13 (56,5%) dos 23 casos. A taxa de 5 anos de sobrevida livre de doença foi de

23,1% para amplificação positiva do clone da ciclina D1 e 80,0% para amplificação negativa do clone da ciclina D1. Concluíram, portanto, que a amplificação do clone da ciclina D1 é um fator chave de predição para a agressividade dos tumores de língua.

Guerra (2002) relata que ocorre maior instabilidade gênica nos carcinomas T2, T3 e T4 havendo maior proliferação celular com risco aumentado de invasibilidade local. A ciclina D1 exerce papel importante na proliferação celular, regulando a passagem da fase G1 para a fase S sendo mais expressada em situações de amplificação gênica. Não é um marcador absoluto de prognóstico, mas juntamente com outros oncogenes pode contribuir no processo de progressão tumoral.

Segundo Swaminathan et al. (2012), a Ciclina D1 é mais expressa em carcinomas de células escamosas bucais e existe uma correlação positiva entre a expressão da p53 mutante e aumento da expressão da ciclina D1 nestes casos. No estudo de Guerra (2002), nos carcinomas classificados como T1 houve uma marcação menor da ciclina D1 quando comparados aos T2, T3 e T4, entretanto não houve diferença estatística significativa. No carcinoma de lábio inferior houve uma marcação mais baixa da ciclina D1 quando comparados aos carcinomas de língua com importância estatística.

A Ciclina D1 pode estar envolvida na maior agressividade dos carcinomas, porém, há necessidade de mais estudos para indicá-la como marcador de prognóstico para câncer de boca (GUERRA, 2002). Existem uma infinidade de fatores envolvidos no prognóstico, não podendo considerar apenas um único marcador.

O incentivo à busca por marcadores celulares relacionados com alterações na progressão de tumores propiciará melhor compreensão da biologia molecular e consequentemente melhores resultados no que tange o tratamento e prognóstico. Mais estudos e conhecimentos sobre os marcadores e a sua aplicação prática na terapêutica e prognóstico destas lesões são necessários com intuito de diminuir as taxas de morbidade e mortalidade.

### **3 PROPOSIÇÃO**

Constituiu-se proposição deste estudo avaliar a expressão dos marcadores biológicos Ciclina D1 e Ki-67 pela técnica de imunohistoquímica em carcinomas de células escamosas de língua e correlacioná-la com os dados clínicos e morfológicos destes carcinomas, além de avaliar o estágio T em relação à recidiva, sobrevida livre de doença e sobrevida global.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

### 4.1 QUESTÕES ÉTICAS

O presente estudo foi desenvolvido após apreciação e aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa envolvendo seres humanos da UNIFAL-MG sob número de parecer 358.828 e mediante aprovação da comissão científica do Hospital Bom Pastor da cidade de Varginha, MG (Anexos II e III).

### 4.2 CASUÍSTICA E SELEÇÃO DA AMOSTRA

Foram incluídos neste estudo 30 pacientes diagnosticados com carcinoma de células escamosas na língua atendidos no Centro de Oncologia Dr. Alfredo Peixoto Cavalcanti, do Hospital Bom Pastor na cidade de Varginha, Minas Gerais entre 2006 e 2013. Todos os prontuários dos 30 pacientes foram obtidos e revistos quanto a identificação, gênero, idade, cidade de origem e estadiamento da lesão. Somente foram utilizados os prontuários que estavam com os dados completos e preenchidos corretamente. Os dados referentes ao estadiamento clínico foram classificados pelo serviço Médico e Odontológico do referido hospital de acordo com os parâmetros estabelecidos pela União Internacional para o Controle do Câncer (U.I.C.C.).

O formulário com as anotações das características dos pacientes, das lesões e do tratamento se encontra em anexo, ressaltando os dados de identificação e epidemiologia, características da lesão tais como tipo da lesão, local da língua acometido, estágio T e N, tipo de cirurgia realizada. Características do tratamento foram descritas tais como a ocorrência de cirurgia e qual tipo, se houve tratamento quimioterápico e radioterápico, da evolução da doença, ressaltando a recidiva quando houve e a situação atual do paciente (óbito, vivo com carcinoma, vivo sem atividade da doença e o intervalo de tempo corrido desde o diagnóstico até o presente dado). Os aspectos histopatológicos em hematoxilina e eosina também foram descritos com as características de grau de diferenciação, invasão perineural e angiolinfática, margens comprometidas e espessura da lesão em milímetros e

também os achados imunoistoquímicos com metodologia descrita a seguir (ANEXO I).

Destes pacientes foram obtidos os blocos de parafina no Instituto de Prevenção e Diagnóstico J. Janini de Varginha, Estado de Minas Gerais. Com as amostras das lesões, realizou-se a análise microscópica dos espécimes obtidos em cortes microscópicos de 3µm de espessura e foram corados pela técnica de Hematoxilina e Eosina (HE) seguindo-se os procedimentos histotécnicos de rotina do Laboratório de Anatomia Patológica ANATOMED de Bauru, Estado de São Paulo.

A análise microscópica dos tumores primários foi realizada por 02 examinadores (EPG, AACP), utilizando-se um microscópio óptico binocular (AxioLab Al Plus- Carl Zeiss, Jena, Alemanha) e complementada com o laudo das peças realizado pelo Instituto de Prevenção e Diagnóstico J. Janini.

Os cortes microscópicos corados com Hematoxilina e Eosina foram utilizados para classificar o grau de diferenciação do tumor através do sistema de gradação histológica proposto por Bryne (1998) e, nos casos em que a biópsia excisional foi realizada, determinar características como espessura em milímetros, invasão perineural e angiolinfática, comprometimento linfonodal e de margens.

Foram excluídos da amostra os pacientes com dados clínicos, contidos nos prontuários, incompletos, e cujos espécimes da lesão estivessem com quantidade insuficiente ou inadequada de material, tanto para análise morfológica como para o estudo imunoistoquímico. Apenas 1 caso foi excluído da análise imunoistoquímica devido a inviabilidade do material para realização da técnica.

As reações imunoistoquímicas foram direcionadas para a investigação da expressão de ciclina D1 e Ki-67 e foram realizadas nos blocos de parafina obtidos no Instituto de Prevenção e Diagnóstico J. Janini, da cidade de Varginha, Estado de Minas Gerais, contendo fragmentos da biópsia incisional ou excisional dos carcinomas de células escamosas primários de língua, dos pacientes selecionados neste estudo.

A expressão da ciclina D1 e do Ki-67 foi verificada pela técnica imunoistoquímica, utilizando-se o método da Streptoavidina-Biotina, seguindo os protocolos de reações utilizados no Laboratório de Patologia ANATOMED em Bauru-SP, como descrita a seguir:

Os cortes microscópicos de 3 µm de espessura das lesões de carcinoma de células escamosas primários de língua foram obtidos a partir de blocos de parafina,

colocados em lâminas de vidro do tipo silanizadas (25 x 75 x 1 mm, Superfrost Plus Easypath) e fixadas em estufa a 65° por 24 horas;

Em seguida realizou-se a desparafinização através da imersão por três vezes em temperatura ambiente por 10 minutos cada e, em seguida, foram submetidas a quatro imersões em álcool absoluto por 30 segundos cada; e na sequência procedeu-se a lavagem das lâminas em água corrente e destilada;

A recuperação antigênica foi realizada por meio da incubação dos espécimes tumorais em solução de tampão, e colocados numa panela de pressão (Pascal S2800, Dako) preenchida com 450 ml de água destilada. A seguir, a temperatura da panela foi regulada e as lâminas foram fervidas;

As lâminas foram retiradas da panela e aguardou-se seu resfriamento por 40 minutos; em seguida realizou-se a lavagem das lâminas em água destilada por 2 vezes;

Realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena mediante a incubação dos cortes teciduais em solução de 3% de peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) durante 15 minutos. Em seguida, procedeu-se a lavagem das lâminas em água corrente e destilada;

Através da utilização de uma bandeja de coloração em câmara úmida (EasyPath<sup>®</sup>, Erviegas), as lâminas foram dispostas lado a lado e, com o auxílio de um sugador, retirou-se o excesso de água dos cortes;

Procedeu-se a lavagem das lâminas em solução salina tamponada com fostatos (PBS= Phosphate Buffered Saline) a 10 mM e pH 7,2;

Para a ciclina D1 foi utilizado o Clone SP4 (Monoclonal de rato, Marca: SPRING, Lote: 100419) aquecidos a 118°C em panela de pressão por 2 minutos com diluição do anticorpo em 1:400 e tempo de incubação “overnight”. Para o Ki-67 foi utilizado o Clone MIB-1 (Monoclonal de rato, Marca: DAKO, Lote: 56534) aquecidos a 121°C em panela de pressão por 1 minuto com diluição do anticorpo em 1:300 e tempo de incubação “overnight”;

Após incubação, as lâminas foram mantidas em temperatura ambiente por 10 minutos;

Foi realizada lavagem das lâminas em tampão PBS, pH 7,4 com 2 trocas;

Os cortes contendo os fragmentos teciduais foram lavados em água corrente e destilada e em seguida desidratados em concentrações graduais de álcool (80%, 95% e absoluto) mergulhados em solução de xilol, e montados com a utilização de

resina sintética (Entellan Neu, Merck) e lamínulas para a observação em microscopia de luz.

Controles positivos e negativos foram utilizados para cada anticorpo. Para ambos utilizou-se como controle positivo, fragmento de tecido normal de amígdala e, como controle negativo, um corte representativo deste tecido com omissão do anticorpo primário.

#### 4.3 ANÁLISE DAS CÉLULAS IMUNOMARCADAS

Foram consideradas positivas todas as células que exibiram coloração acastanhada tanto no citoplasma, como na superfície celular, independente da intensidade de marcação. A análise microscópica e a avaliação imunoistoquímica foi feita utilizando-se um microscópio óptico binocular (AxioLab Al Plus- Carl Zeiss, Jena, Alemanha) contendo uma lente objetiva AxioCam MRc de 40X/0,65, resultando num aumento final de 400X. A avaliação foi realizada por áreas tumorais, com a captura de imagens através do Programa AxioVision 4 Module Interactive Measurement, Versão de software AxioVision Rel 4.8.2 (Carl Zeiss Light Microscopy) em 10 campos aleatórios para cada marcador (ODAJIMA et al., 2005).

Para cada corte foram contadas as células expressadas com cada marcador nos 10 campos capturados através do Programa AxioVision 4 Module Interactive Measurement, Versão de software AxioVision Rel 4.8.2 (Carl Zeiss Light Microscopy) (Figura 1). Através da soma da contagem dos 10 campos foi obtida uma média para cada caso.

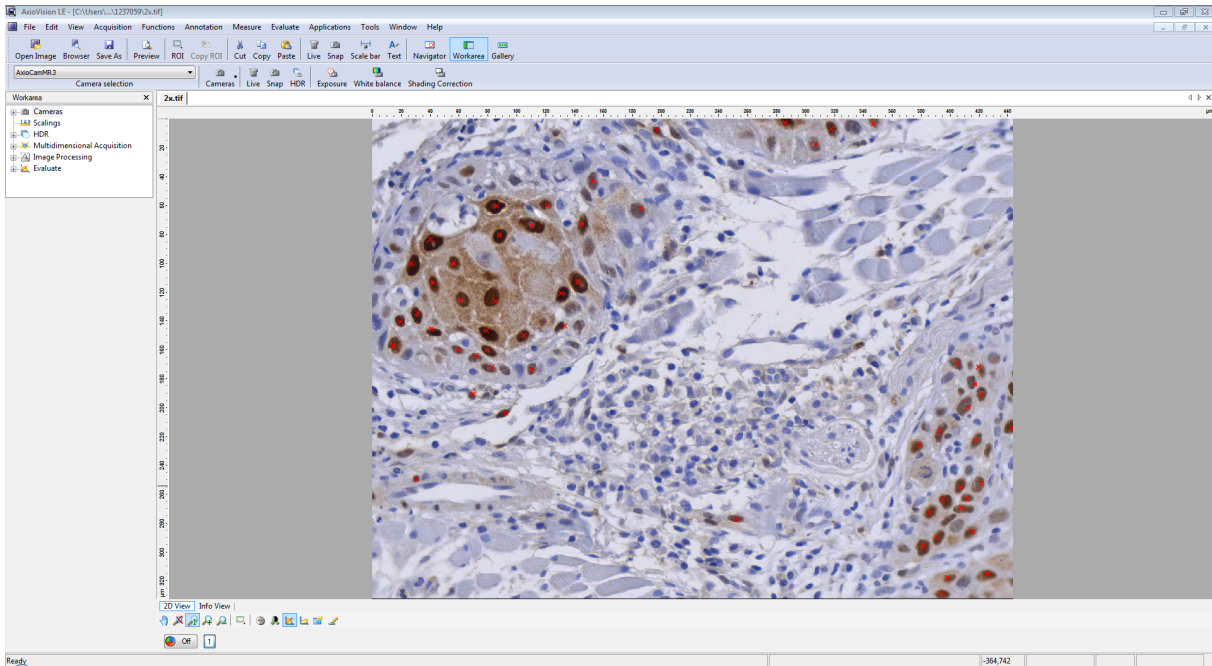


Figura 1- Programa AxioVision em execução na captura dos cortes.

Fonte: Do autor.

#### 4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Após a realização de toda a metodologia anteriormente descrita, os resultados obtidos foram submetidos a testes estatísticos adequados, com o intuito de correlacionar os dados clínicos, como estadiamento clínico, evolução com a gradação histológica de malignidade e a expressão dos marcadores celulares. Para as demais variáveis clínicas, como gênero, idade e raça, foram realizadas análises descritivas.

A distribuição de frequências foi utilizada para descrever as variáveis categóricas e as medidas de tendência central e de variabilidade para as numéricas. Devido a pequena casuística, 30 casos, para analisar ciclina D1 utilizamos ponto de corte no terceiro quartil e Ki-67 consideramos a mediana.

Para verificar associação entre variáveis categóricas em tabelas de contingência, o teste de frequências do qui-quadrado foi utilizado e, quando pelo menos uma frequência esperada foi menor do que 5 em tabelas 2x2 o teste exato de Fisher foi adotado. Aplicou-se o método de Kaplan-Meier na estimativa das probabilidades de sobrevida global e livre de doença (recidiva) e, para verificar as diferenças entre as curvas de sobrevida, utilizou-se o teste de logrank. Considerou-se o nível de significância de 5% para todos os testes.

O tempo de seguimento considerado foi a data do tratamento ou tratamento realizado até data do óbito ou última data com informação do paciente quando vivo. Para os marcadores Ki-67 e Ciclina D1 foram utilizados pontos de corte para verificar associações e nas probabilidades de sobrevida. O programa estatístico para computadores STATA versão 7.0 foi utilizado para realizar todas as análises e cálculos estatísticos.

## 5 RESULTADOS

Dentre os casos de carcinoma de células escamosas de língua estudados, observamos uma predominância do gênero masculino perfazendo um total de 21 casos (70%) contra 09 casos (30%) do gênero feminino. A proporção de acometimento entre homens e mulheres se estabeleceu em 2,33 homens para cada mulher.

A média de idade dos pacientes acometidos foi de 54,63 anos variando entre 32 e 76 anos. A cor branca prevaleceu em 60% dos casos, com 16,7% de pacientes melanodermas e 23,3% de pacientes feodermas. Para os hábitos elucidados obtivemos os resultados de 76,7% de pacientes tabagistas e 70% de etilistas. Dentre os tabagistas, 70% dos pacientes fumavam de 5 a 20 cigarros ao dia (Tabela 04)

A grande maioria dos pacientes não soube relatar o tempo de evolução da lesão (83,3%) e dentre os que relataram o tempo de evolução a média foi de 06 meses. Quanto ao tipo de lesão, 53,3% (16) dos pacientes foram acometidos por lesões de margens de língua, seguidos de 30% (09) em base de língua e 3,3% com lesão de ventre de língua (01), 3,3% em corpo e base de língua (01), 3,3% em base e margens de língua (01), 3,3% em margem e ventre de língua (01) (Tabela 4).

Tabela 4 – Características epidemiológicas e clínicas dos 30 pacientes.

Variável	Categoria / Medidas	Freq. (%) / Medidas
Idade (anos)	Variação	32 – 76
	Mediana	54,5
	Média (Desvio Padrão)	54,6 (11,0)
Gênero	Masculino	21 (70,0)
	Feminino	9 (30,0)
Raça	Leucoderma	18 (60,0)
	Melanoderma	5 (16,7)
	Feodema	7 (23,3)
Tabagismo	Não	5 (16,7)
	Sim	23 (76,7)
	Sem informação	2 (6,7)
Etilismo	Não	5 (16,7)
	Sim	21 (70,0)
	Sem informação	4 (13,3)
Local do tumor	Corpo da língua	1 (3,3)
	Base de língua	9 (30,0)
	Margens de língua	16 (53,3)
	Ventre da língua	1 (3,3)
	Corpo + base de língua	1 (3,3)
	Base + margem de língua	1 (3,3)
	Margem + ventre língua	1 (3,3)
Tempo de história	N	6
	Variação	3 – 12
	Mediana	6
	Média (desvio padrão)	6,2 (3,1)

Fonte: Do autor.

Dentre os tipos de lesões encontradas, 23 foram úlcero-infiltrativas (76,6%), 5 foram úlcero-vegetantes (16,7%) e 2 lesões cujas formas não foram descritas no prontuário (6,7%) (Tabela 5)

Com relação ao estadiamento, os pacientes foram distribuídos no estágio T com 8 pacientes estadiados em T1 (26,6%), 11 em T2 (36,6%), 4 em T3 (13,3%) e 7 em T4 (23,3%). Já no estágio N, os pacientes foram distribuídos 16 em N0 (53,3%), 4 N1 (13,3%), 1 N2a (3,3%), 5 N2b (16,7%), 3 N2c (10%) e 1 pacientes N3 (3,3%), totalizando então 16 pacientes N0 (53,3%) e 14 pacientes N “positivos” (46,7%) (Tabela 5).

Com relação à terapêutica instituída, 23 pacientes passaram por procedimento cirúrgico e 7 pacientes não foram submetidos a procedimentos cirúrgicos (23,3%). Dentre os operados, 15 foram submetidos a cirurgia com esvaziamento cervical ipsilateral (50%), 7 foram submetidos a procedimento cirúrgico sem esvaziamento cervical (23,3%) e 1 paciente foi submetido a procedimento cirúrgico com esvaziamento cervical contralateral (3,3%). Daqueles pacientes que não foram submetidos a procedimentos cirúrgicos, 6 (85,7%) foram considerados irressecáveis e 1 paciente (14,3%) se recusou ao procedimento cirúrgico proposto. Quinze pacientes realizaram radioterapia e quimioterapia concomitantemente (50%), 12 pacientes (40%) realizaram radioterapia exclusiva e 03 pacientes não fizeram radioterapia nem quimioterapia (10%). Dentre os pacientes sem tratamento, um deles foi por opção terapêutica, outro se recusou em se tratar e o terceiro, foi a óbito antes de iniciar o tratamento proposto (Tabela 5).

Tabela 5 – Características clínicas, tratamento e de estadiamento dos 30 pacientes.

Variável	Categoria	Freq. (%)
Tipo de lesão	Úlcero vegetante	5 (16,7)
	Úlcero-infiltrativa	23 (76,7)
	Outras	2 (6,7)
Estádio T	T1	8 (26,7)
	T2	11 (36,7)
	T3	4 (13,3)
	T4	7 (23,3)
Estádio T	T1 + T2	19 (63,3)
	T3 + T4	11 (36,7)
Estádio N	N0	16 (53,3)
	N+	14 (46,7)
Tipo de Cirurgia	Sem esvaziamento cervical	7 (23,3)
	Com esvaziamento cervical ipsilateral	15 (50,0)
	Com esvaziamento cervical contralateral	1 (3,3)
	Sem cirurgia	7 (23,3)
Tratamento	RXT exclusiva	12 (40,0)
	RXT + QT	15 (50,0)
	Sem RXT e sem QT	3 (10,0)

---

Fonte: Do autor.

Após os tratamentos propostos, 18 pacientes se encontram sem recidivas (60%) e 12 pacientes tiveram recidivas (40%). Dos 6 pacientes considerados irressuscitáveis, 05 (83,3%) se encontram com a doença em atividade.

No momento atual foram observados 9 óbitos (30%), 14 vivos sem atividade da doença (46,7%) e 7 vivos com doença em atividade (23,3 %). Nos pacientes recidivados, o intervalo médio de tempo para que ela acontecesse foi de 11,8 meses, variando entre 1,2 e 21,7 meses após o diagnóstico inicial (Tabela 6).

Dentre os óbitos, o intervalo médio de tempo para a ocorrência foi de 13,22 meses, variando de 02 a 24 meses após o diagnóstico inicial da doença. Para os pacientes vivos, o intervalo médio de acompanhamento foi de 24,14 meses, variando entre 05 e 81 meses. Dentre os pacientes vivos e sem recidiva, o intervalo médio de acompanhamento foi de 27,14 meses variando entre 05 e 81 meses desde o diagnóstico inicial da doença (Tabela 6).

Tabela 6- Distribuição da casuística de acordo com dados de seguimento e recidivas.

Variável	Categoria	Freq. (%) / Medidas
Situação do paciente ao final do estudo	Vivo sem doença	14 (46,7)
	Vivo com doença	7 (23,3)
	Óbito pela doença	9 (30,0)
Tempo de seguimento (meses)	N	30
	Variação	1,8 – 81,0
	Mediana	17,0
	Média (desvio padrão)	20,5 (17,5)
Local da Recidiva	Sem recidiva	18 (60,0)
	Local	5 (16,7)
	Pescoço ipsi	4 (13,3)
	Pescoço contra	1 (3,3)
	Local + Pescoço ipsi	2 (6,7)
Recidiva	Não	18 (60,0)
	Sim	12 (40,0)
Tempo até ocorrência de recidivas (meses)	N	12
	Variação	1,2 – 21,7
	Mediana	11,6
	Média (desvio padrão)	11,8 (6,2)

Fonte: Do autor.

De acordo com o grau de diferenciação, 11 casos foram classificados como bem diferenciados (36,6%); 13 foram classificados como moderadamente diferenciados (43,3%) e 6 como pobremente diferenciados (20%) (Tabela 7).

Onze pacientes apresentaram invasão perineural (36,6%) e 9 não apresentaram (30%). Os demais pacientes da amostra não puderam ser avaliados por esta característica. Quinze pacientes apresentaram invasão angiolinfática (50%) e 6 não apresentaram (20%). Os demais pacientes da amostra não puderam ser avaliados por esta característica (Tabela 7).

Quanto às metástases linfonodais, dos 16 pacientes submetidos a esvaziamento cervical, 8 apresentaram comprometimento (26,7%) e 8 (26,7%) não apresentaram comprometimento linfonodal. Em relação às margens da lesão, dos pacientes operados 09 apresentaram margens livres (30%) e 09 (30%) apresentaram margens comprometidas pelo processo neoplásico. Os demais pacientes da amostra não puderam ser avaliados por esta característica (Tabela 7).

Tabela 7- Distribuição da casuística de acordo com variáveis histopatológicas.

Variável	Categoria / Medidas	Freq. (%) / Medidas
Grau de diferenciação	Bem diferenciado	11 (36,7)
	Moderadamente diferenciado	13 (43,3)
	Pobrememente diferenciado	6 (20,0)
Invasão perineural	Ausente	9 (30,0)
	Presente	11 (36,7)
	Não elucidado	10 (33,3)
Invasão linfática	Ausente	6 (20,0)
	Presente	15 (50,0)
	Não elucidado	9 (30,0)
Linfonodos	Não	8 (26,7)
	Sim	8 (26,7)
	Sem esvaziamento ou sem cirurgia	14 (46,7)
Margens	Livres	9 (30,0)
	Comprometidas	9 (30,0)
	Não elucidado	12 (40,0)

Fonte: Do autor.

A contagem das células marcadas de acordo com a expressão da ciclina D1 variou de 0 a 136 células marcadas por campo, obtendo-se uma média de 31,7 e mediana de 19,5 células marcadas. Para Ki-67 a contagem variou entre 0 e 214,4, obtendo-se a média 44,4 e a mediana 28,4 (Figuras 2, 3, 4 e 5). Os pontos de cortes para tais marcadores foram 39,5 para a ciclina D1, considerando o terceiro quartil e 28 para o Ki-67, considerando a mediana (Tabela 8).

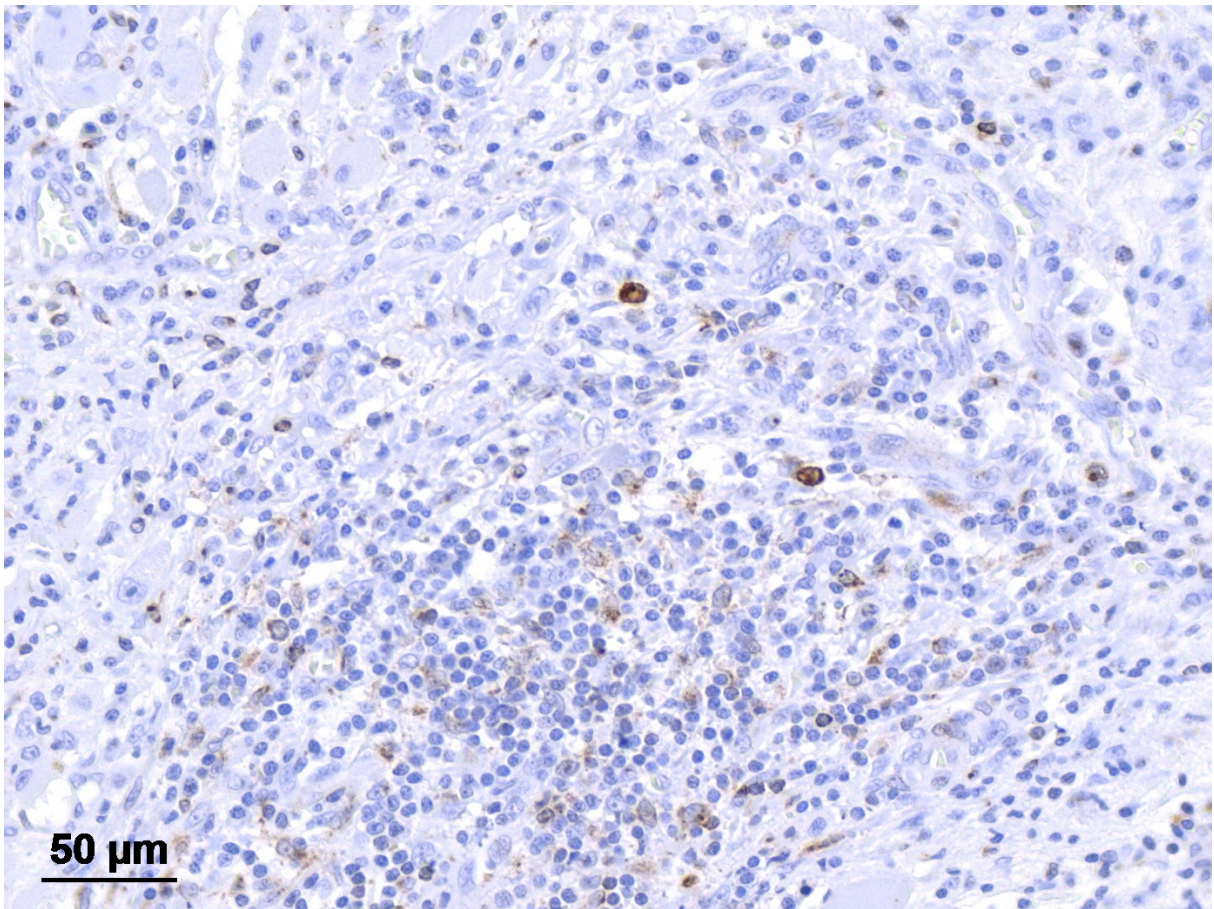


Figura 2- Expressão imunoistoquímica do anticorpo Ki-67 em carcinoma de células escamosas de língua. Aumento de 400x.

Fonte: Do autor.

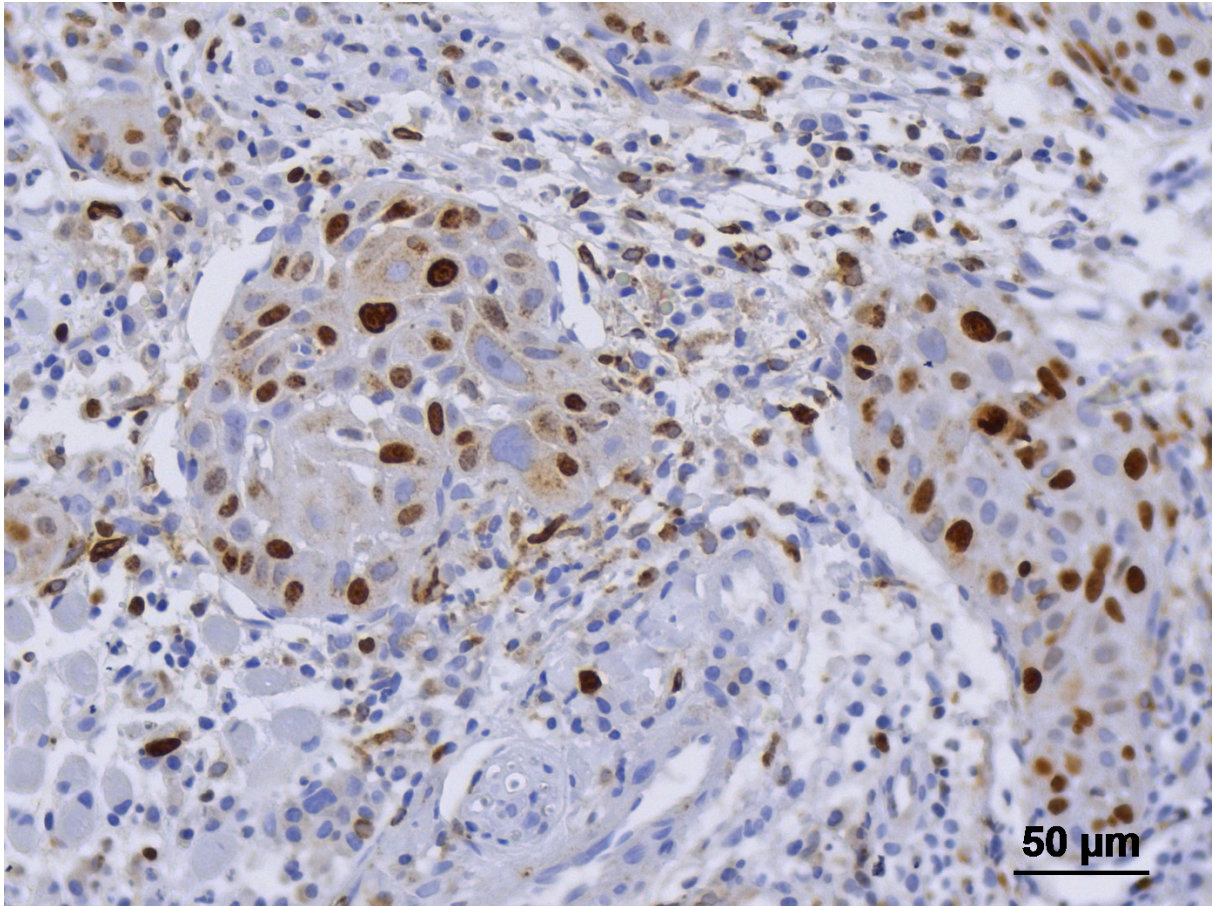


Figura 3- Expressão imunoistoquímica do anticorpo Ki-67 em carcinoma de células escamosas de língua. Aumento de 400x.  
Fonte: Do autor.

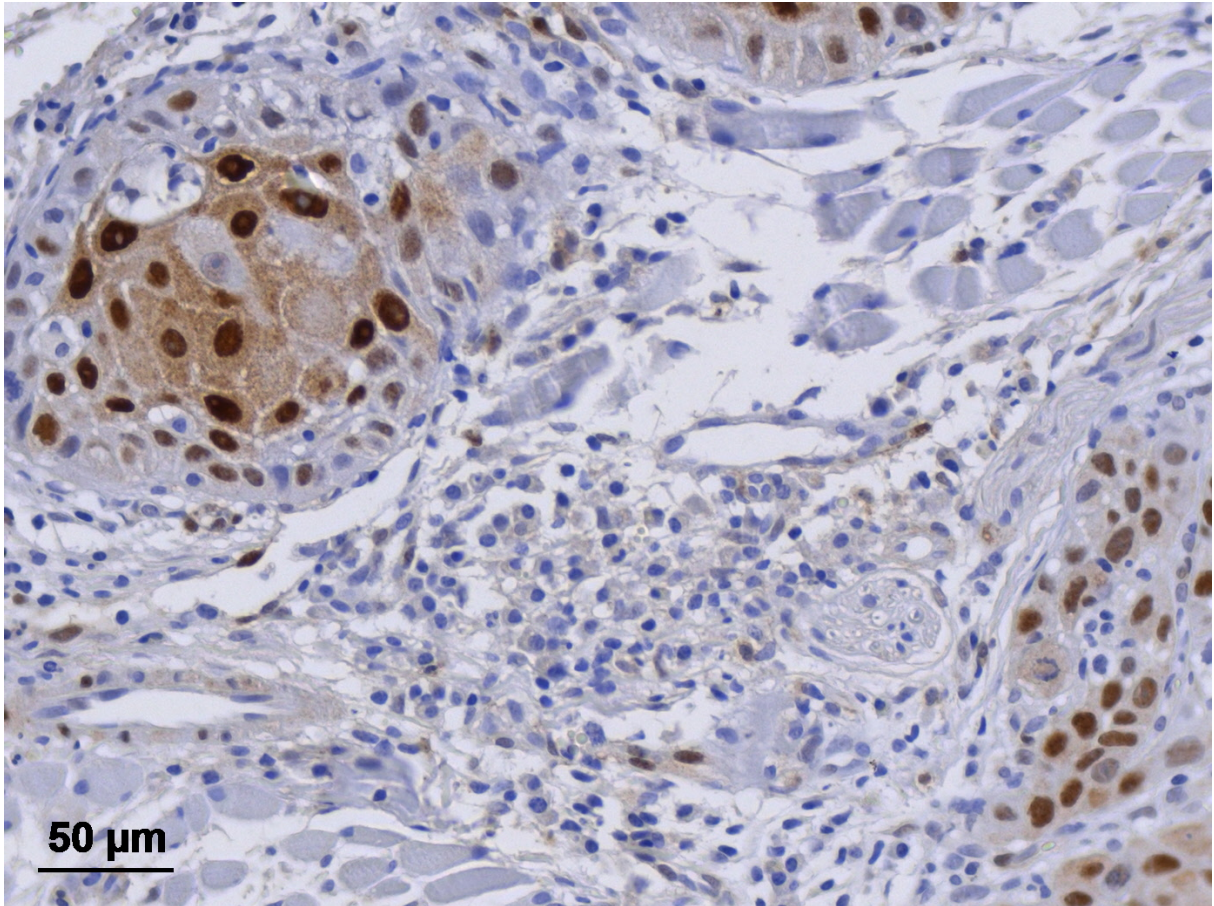


Figura 4- Expressão imunoistoquímica do anticorpo ciclina D1 em carcinoma de células escamosas de língua. Aumento de 400x.

Fonte: Do autor.

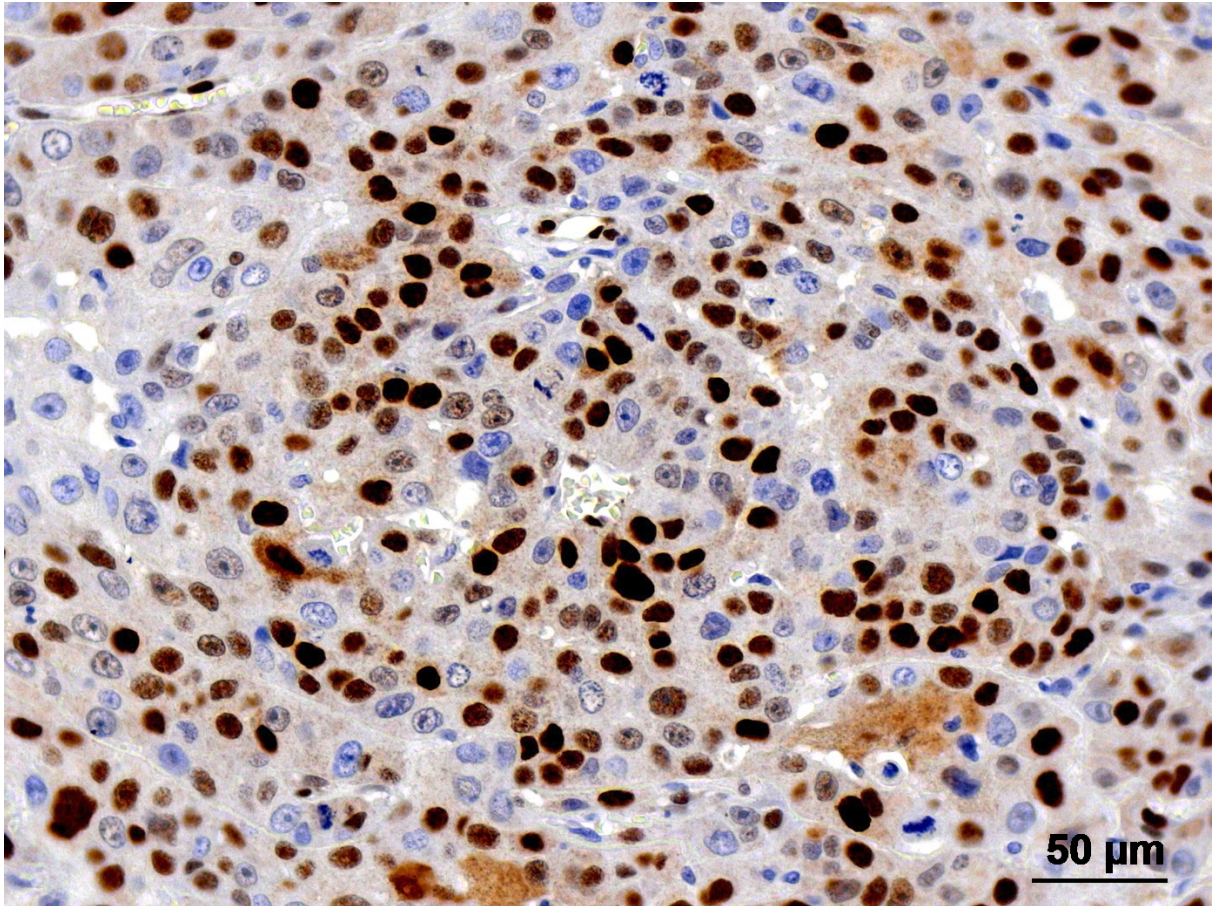


Figura 5- Expressão imunoistoquímica do anticorpo ciclina D1 em carcinoma de células escamosas de língua. Aumento de 400x.

Fonte: Do autor.

Tabela 8- Distribuição da casuística de acordo com os marcadores ciclina D1 e Ki-67.

Variável	Categoria / Medidas	Freq. (%) / Medidas
Ciclina D1 (média)	N	29
	Variação	0 – 136
	Mediana	19,5
	Média (desvio padrão)	31,7 (34,8)
Ciclina D1 (ponto corte terceiro quartil)	≤ 39,5	21 (72,4)
	> 39,5	8 (27,6)
Ki-67 (média)	N	29
	Variação	0 – 214,4
	Mediana	28,4
	Média (desvio padrão)	44,4 (51,3)
Ki-67 (ponto corte na mediana)	≤ 28	14 (48,3)
	> 28	15 (51,7)

Fonte: Do autor.

Foram realizadas análises estatísticas para verificar associação entre duas variáveis sendo então analisadas o Estádio T e o Estádio T agrupado com situação atual do paciente, com grau de diferenciação, com recidiva, com invasão perineural e invasão angiolinfática. Observou-se o grau de diferenciação bem diferenciado em 3 pacientes T1 e em 3 pacientes T4 enquanto que o grau de diferenciação pobremente diferenciado foi constatado em 3 pacientes T1 e em nenhum paciente T4. Dos pacientes vivos sem doença, 6 estão estadiados em T1 e 7 em T2. Em contrapartida, 1 paciente T3 encontra-se vivo sem atividade da doença. Dentre os pacientes que evoluíram para o óbito com a doença, 2 estão estadiados em T3, 4 em T4 enquanto que nenhum paciente estadiado em T1 evoluiu ao óbito. Com relação às recidivas, 6 pacientes T1 e 9 pacientes T2 se encontram sem recidivas enquanto 1 paciente T3 e 7 pacientes T4 apresentaram recidivas (Tabelas 9).

Tabela 9. Distribuição das variáveis de acordo com estadiamento T.

Variável	Categoria	T1	T2	T3	T4	p-valor
		N	N	N	N	
Grau de diferenciação	Bem	3	5	0	3	NA
	Moderadamente	2	5	2	4	
	Pobrememente	3	1	2	0	
Situação do paciente ao final do estudo	Vivo sem doença	6	7	1	0	NA
	Vivo com doença	2	1	1	3	
	Óbito pela doença	0	3	2	4	
Recidiva	Ausente	6	9	3	0	NA
	Presente	2	2	1	7	
Invasão perineural	Ausente	3	6	0	0	NA
	Presente	4	3	1	3	
Invasão linfática	Ausente	3	3	0	0	NA
	Presente	4	7	1	3	

NA= não avaliável estatisticamente.

Fonte: Do autor.

Quanto ao grau de diferenciação, 8 pacientes (72,7%) com lesões classificadas como bem diferenciadas estão no grupo T1 + T2 enquanto 3 pacientes (27,3%) estão agrupados em T3 + T4. Naquelas lesões classificadas como pobremente diferenciadas, tem-se 4 pacientes (66,7%) no grupo T1 + T2 e 2 pacientes (33,3%) no grupo T3 + T4. O grupamento T1 + T2 destacou-se também em apresentar 13 pacientes (92,9%) vivos sem atividade da doença contra 1 paciente (7,1%) do grupo T3 + T4 na mesma situação e 3 pacientes (33,3%) que foram a óbito pela doença contra 6 (66,7%) do grupo T3 + T4. Quanto às recidivas, 15 pacientes (83,3%) T1 + T2 e 3 pacientes (16,7%) T3 + T4 se encontram livres de recidiva enquanto 4 (33,3%) T1 + T2 e 8 pacientes (66,7%) T3 + T4 apresentaram recidivas. Todos os pacientes com ausência de invasão perineural e linfática pertencem ao grupo T1 + T2 (Tabela 10).

Tabela 10. Distribuição das variáveis de acordo com estadiamento T agrupado.

Variável	Categoria	T1 + T2 N (%)	T3 + T4 N (%)	p-valor
Grau de diferenciação	Bem	8 (72,7)	3 (27,3)	NA
	Moderadamente	7 (53,8)	6 (46,2)	
	Pobrememente	4 (66,7)	2 (33,3)	
Situação do paciente ao final do estudo	Vivo sem doença	13 (92,9)	1 (7,1)	NA
	Vivo com doença	3 (42,9)	4 (57,1)	
	Óbito pela doença	3 (33,3)	6 (66,7)	
Recidiva	Ausente	15 (83,3)	3 (16,7)	<u>0,009</u>
	Presente	4 (33,3)	8 (66,7)	
Invasão perineural	Ausente	9 (100,0)	0 (0,0)	0,094
	Presente	7 (63,6)	4 (36,4)	
Invasão linfática	Ausente	6 (100,0)	0 (0,0)	0,281
	Presente	11 (73,3)	4 (26,7)	

NA= não avaliável estatisticamente.

p-valor obtido pelo teste exato de Fisher.

Fonte: Do autor.

O Estádio N foi avaliado com as mesmas variáveis e, quanto ao grau de diferenciação, 7 pacientes (63,6%) classificados como bem diferenciados tinham ausência de comprometimento linfonodal ao mesmo tempo que 4 (36,4%) bem diferenciados tinham comprometimento linfonodal. Dos pacientes vivos sem atividade da doença, 10 (71,4%) tinham ausência de comprometimento linfonodal enquanto 4 (28,6%) tinham comprometimento linfonodal. Daqueles que foram a óbito pela doença, 2 (22,2%) eram N0 enquanto 7 (77,8%) eram N+. Quanto à invasão angiolinfática e perineural, 12 pacientes que apresentaram ausência de invasão eram N0 contra 14 N+ que apresentaram invasão (Tabela 11).

Tabela 11. Distribuição das variáveis de acordo com estadiamento N agrupado.

Variável	Categoria	N0 N (%)	N+ N (%)	p-valor
Grau de diferenciação	Bem	7 (63,6)	4 (36,4)	NA
	Moderadamente	5 (38,5)	8 (61,5)	
	Pobrememente	4 (66,7)	2 (33,3)	
Situação do paciente ao final do estudo	Vivo sem doença	10 (71,4)	4 (28,6)	NA
	Vivo com doença	4 (57,1)	3 (42,9)	
	Óbito pela doença	2 (22,2)	7 (77,8)	
Recidiva	Ausente	10 (55,6)	8 (44,4)	0,765
	Presente	6 (50,0)	6 (50,0)	
Invasão perineural	Ausente	7 (77,8)	2 (22,2)	0,197*
	Presente	5 (45,4)	6 (54,6)	
Invasão linfática	Ausente	5 (83,3)	1 (16,7)	0,281*
	Presente	7 (46,7)	8 (53,3)	

NA= não avaliável estatisticamente.

p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado.

\*p-valor obtido pelo teste exato de Fisher.

Fonte: Do autor.

O Grau de diferenciação foi avaliado com a invasão perineural, invasão angiolinfática e metástases linfonodais com distribuições bastante equilibradas entre os grupos, sem nenhuma avaliação estatística significativa (Tabela 12).

Tabela 12. Distribuição das variáveis de acordo com grau de diferenciação.

Variável	Categoria	Bem	Moderado	Pobre	p-valor
		N (%)	N (%)	N (%)	
Invasão linfática	Ausente	1 (16,7)	3 (50,0)	2 (33,3)	NA
	Presente	8 (53,3)	5 (33,3)	2 (13,3)	
Invasão perineural	Ausente	4 (44,4)	3 (33,3)	2 (22,2)	NA
	Presente	5 (45,4)	4 (36,4)	2 (18,2)	
Linfonodo	Ausente	6 (75,0)	1(12,5)	1(12,5)	NA
	Presente	3 (37,5)	4 (50,0)	1(12,5)	

NA= não avaliável estatisticamente

Fonte: Do autor.

As metástases linfonodais foram avaliadas com a invasão perineural e invasão angiolinfática sendo que 4 pacientes que não tinham metástases linfonodais também não apresentavam invasão perineural nem invasão linfática. Ao mesmo tempo, 12 pacientes que apresentavam comprometimento linfonodal também apresentavam invasão angiolinfática e perineural (Tabela 13).

Tabela 13. Distribuição das variáveis de acordo com comprometimento de linfonodos.

Variável	Categoria	Ausente	Presente	p-valor
		N (%)	N (%)	
Invasão perineural	Ausente	3 (60,0)	2 (40,0)	0,999
	Presente	5 (50,0)	5 (50,0)	
Invasão linfática	Ausente	1 (50,0)	1 (50,0)	0,999
	Presente	7 (50,0)	7 (50,0)	

p-valor obtido pelo teste exato de Fisher.

Fonte: Do autor.

Foram realizadas análises de sobrevida global em 6 meses e 1 ano de acordo com faixa etária, gênero, raça, tabagismo e etilismo sem observar diferença significativa estatisticamente (Tabela 14).

Tabela 14. Probabilidade de sobrevida global 6-meses e 1-ano.

Variável	Categoria	Probabilidade de Sobrevida Global (%)		p-valor
		6-meses	1-ano	
Sobrevida	Global	89,7	82,0	
Faixa etária (anos)	≤ 54	86,7	86,7	0,927
	> 54	92,9	76,7	
Gênero	Masculino	85,0	79,1	0,160
	Feminino	88,9	88,9	
Raça	Branca	100,0	87,1	0,190
	Não branca	75,0	75,0	
Tabagismo	Não	80,0	80,0	0,887
	Sim	90,9	90,9	
Etilismo	Não	100,0	100,0	0,175
	Sim	90,0	84,2	

p-valor obtido pelo teste de logrank.

Fonte: Do autor.

Na tabela 15 evidencia-se a probabilidade de sobrevida global com as variáveis tipo de lesão, estágio T e estágio T agrupado, estágio N, tipo de cirurgia, tratamento, grau de diferenciação, invasão perineural, invasão angiolinfática, comprometimento de linfonodos, comprometimento de margens e pontos de corte da ciclina D1 e do Ki-67. As variáveis estadiamento T, estadiamento N e Ki-67 com ponto de corte na mediana mostram diferença estatística significativa nas curvas de sobrevida, observando que quanto maior o estágio T, pior foi a probabilidade de sobrevida global, o mesmo acontecendo com o estágio N, onde o N+ apresenta pior sobrevida global. Em relação à expressão de marcação do Ki-67, quanto maior a marcação, pior também foi a sobrevida global. Os gráficos com as curvas de sobrevida com significado estatístico são apresentados a seguir (Gráfico 1, 2 e 3).

Tabela 15. Probabilidade de sobrevida global 6-meses e 1-ano.

Variável	Categoria	Probabilidade de Sobrevida Global (%)		p-valor
		6-meses	1-ano	
Tipo de lesão	Úlcero vegetante	100,0	100,0	0,183
	Úlcero-infiltrativa	87,0	77,8	
Estádio T	T1	100,0	100,0	<u>0,006</u>
	T2	90,5	80,4	
	T3	71,4	23,8	
	T4	85,7	85,7	
Estádio T	T1 + T2	94,6	88,9	<u>0,003</u>
	T3 + T4	81,0	69,4	
Estádio N	N0	100,0	86,2	<u>0,020</u>
	N+	77,8	77,8	
Tipo de Cirurgia	Sem esvaziamento cervical	85,7	85,7	0,492
	Com esvaziamento cervical ipsilateral ou contralateral	87,1	80,1	

Tabela 15. Probabilidade de sobrevida global 6-meses e 1-ano.

(continuação)

Variável	Categoria	Probabilidade de Sobrevida Global (%)		p-valor
		6-meses	1-ano	
Tratamento	RXT exclusiva	66,7	66,7	0,142
	RXT + QT	100,0	90,5	
	Sem RXT e sem QT	86,2	78,4	
Grau de diferenciação	Bem diferenciado	90,9	81,8	0,241
	Moderadamente diferenciado	84,0	75,2	
	Pobrememente diferenciado	100,0	100,0	
Invasão perineural	Ausente	88,9	77,8	0,313
	Presente	80,9	80,9	
Invasão linfática	Ausente	83,3	83,3	0,372
	Presente	86,2	78,7	
Linfonodos	Não	100,0	85,7	0,122
	Sim	75,0	75,0	
Margens	Livres	88,2	88,2	0,283
	Comprometidas	88,9	76,2	
Ciclina D1	≤ 39,5	85,4	80,0	0,926
	> 39,5	100,0	84,6	
Ki-67	≤ 28	92,6	84,2	<u>0,016</u>
	> 28	86,2	69,8	

Fonte: Do autor.

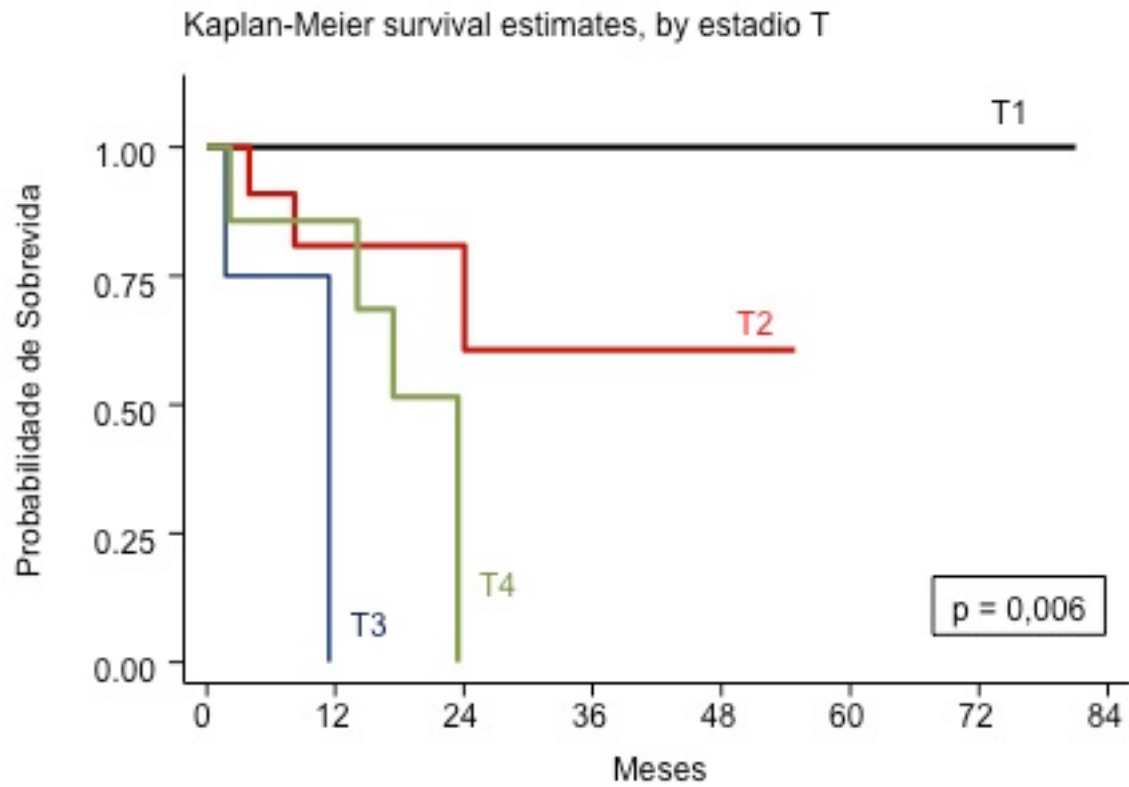


Gráfico 1- Probabilidade de sobrevida global relacionada ao estágio T.

Fonte: Do autor.

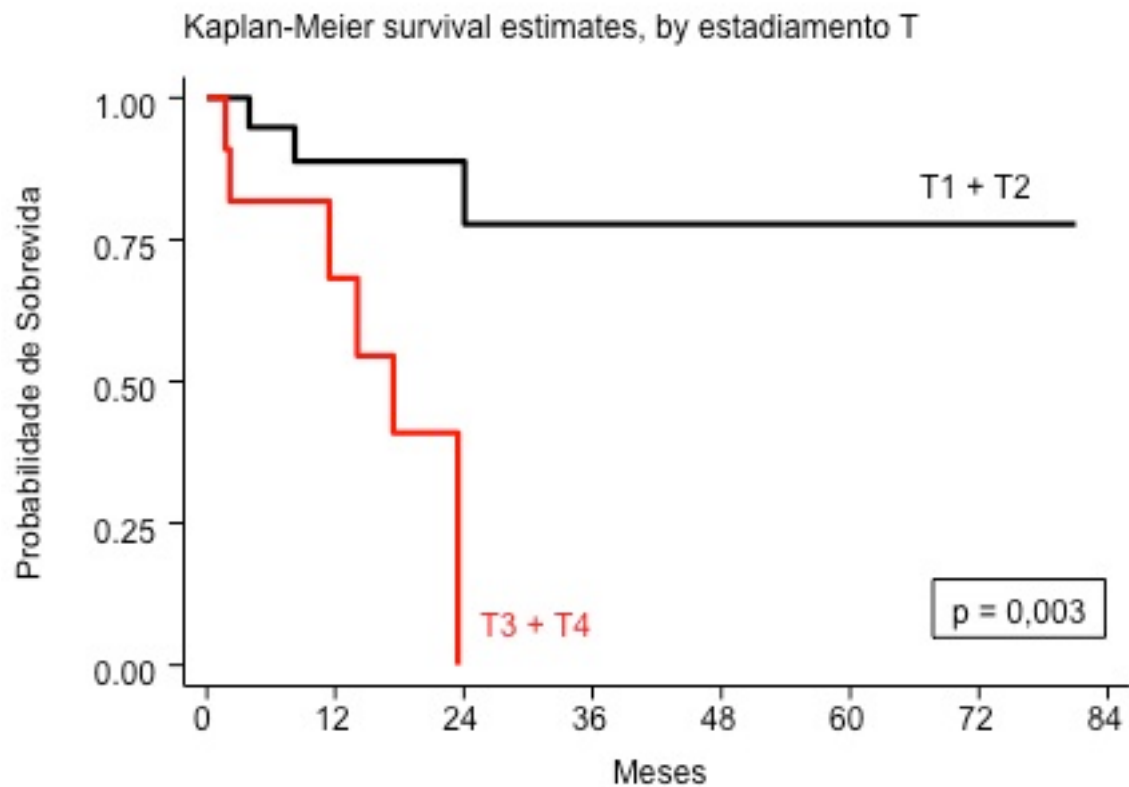


Gráfico 2- Probabilidade de sobrevida global relacionada ao estágio T agrupado.

Fonte: Do autor.

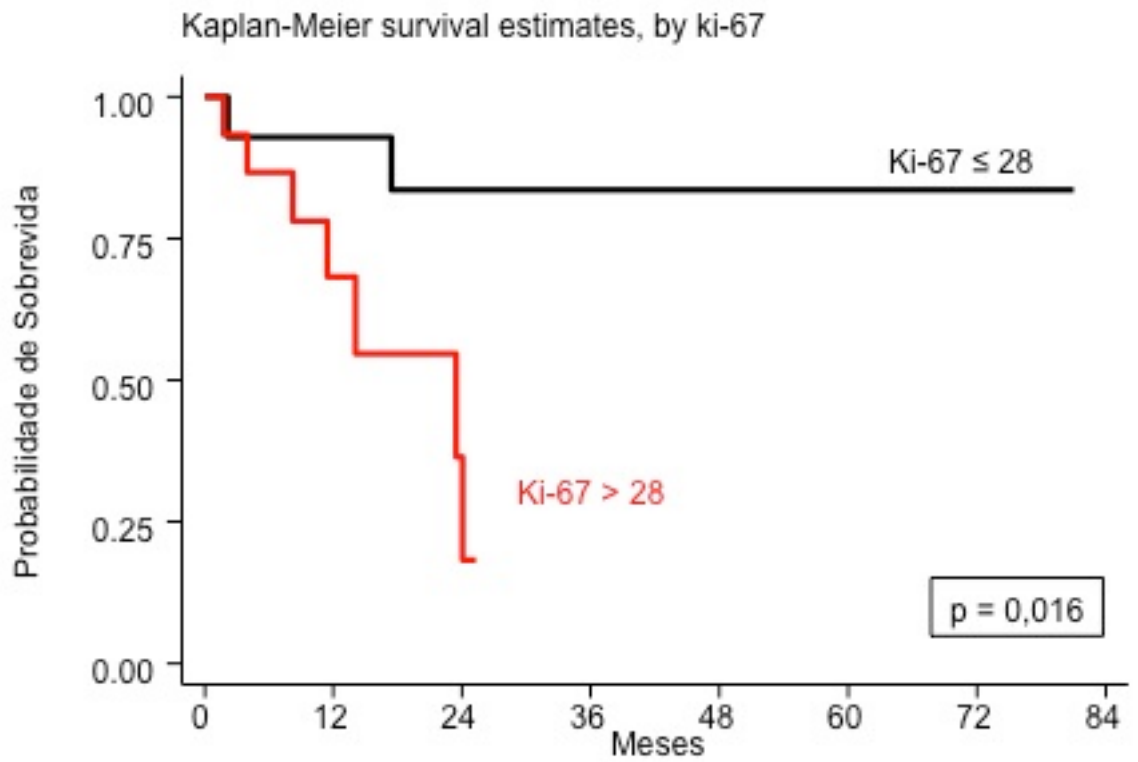


Gráfico 3- Probabilidade de sobrevida global relacionada à expressão de Ki-67.

Fonte: Do autor.

As análises de sobrevida livre de doença foram realizadas e elucidadas nas tabelas 16 e 17 utilizando as mesmas variáveis analisadas na sobrevida global. As variáveis estadiamento T, estadiamento T agrupado e ciclina D1 com ponto de corte no terceiro quartil mostram diferença estatística significativa sendo que quanto maior o estágio T, pior foi a sobrevida livre de doença, e a expressão de marcação da ciclina D1 mostrou que quanto maior a marcação, pior também foi a sobrevida livre de doença. Os demais resultados não mostraram significância estatística. As curvas de sobrevida com significado estatístico são apresentadas nas figuras a seguir (Gráficos 4, 5 e 6).

Tabela 16. Probabilidade de sobrevida livre de recidivas 6-meses e 1-ano.

Variável	Categoria	Probabilidade de Sobrevida Livre de Doença (%)		p-valor
		6-meses	1-ano	
Sobrevida	Livre de Doença	92,9	76,7	
Faixa etária (anos)	≤ 54	100,0	84,0	0,893
	> 54	85,7	69,4	
Gênero	Masculino	94,7	75,8	0,137
	Feminino	88,9	77,8	
Raça	Branca	94,1	74,6	0,847
	Não branca	90,9	80,2	
Tabagismo	Não	60,0	60,0	0,387
	Sim	95,4	84,7	
Etilismo	Não	80,0	57,1	0,714
	Sim	94,9	77,1	

p-valor obtido pelo teste de logrank.

Fonte: Do autor.

Tabela 17. Probabilidade de sobrevida livre de recidivas 6-meses e 1-ano.

Variável	Categoria	Probabilidade de Sobrevida Livre de Doença (%)		p-valor
		6-meses	1-ano	
Tipo de lesão	Úlcero vegetante	100,0	100,0	0,860
	Úlcero-infiltrativa	90,9	71,2	
Estádio T	T1	100,0	100,0	<u>0,021</u>
	T2	90,0	78,7	
	T3	100,0	33,3	
	T4	85,7	57,1	
Estádio T	T1 + T2	94,4	88,3	<u>0,002</u>
	T3 + T4	90,0	54,0	
Estádio N	N0	93,5	79,7	0,554
	N+	92,0	72,6	
Tipo de Cirurgia	Sem esvaziamento cervical	100,0	81,8	0,868
	Com esvaziamento cervical ipsilateral ou contralateral	86,7	86,7	
Tratamento	RXT exclusiva	100,0	100,0	0,120
	RXT + QT	91,3	81,7	
	Sem RXT e sem QT	92,9	68,6	
Grau de diferenciação	Bem diferenciado	81,8	72,7	0,737
	Moderadamente diferenciado	100,0	80,0	
	Pobremente diferenciado	100,0	75,0	
Invasão perineural	Ausente	88,2	75,6	0,756
	Presente	90,0	90,0	
Invasão linfática	Ausente	100,0	80,0	0,964
	Presente	85,7	85,7	

Tabela 17. Probabilidade de sobrevida livre de recidivas 6-meses e 1-ano.

(continuação)

Variável	Categoria	Probabilidade de Sobrevida Livre de Doença (%)		p-valor
		6-meses	1-ano	
Linfonodos	Não	86,7	70,9	0,821
	Sim	86,7	86,7	
Margens	Livres	100,0	84,6	0,377
	Comprometidas	88,9	77,8	
Ciclina D1	≤ 39,5	89,7	78,2	<u>0,020</u>
	> 39,5	100,0	69,2	
Ki-67	≤ 28	92,6	84,9	0,288
	> 28	92,6	64,8	

---

 Fonte: Do autor.

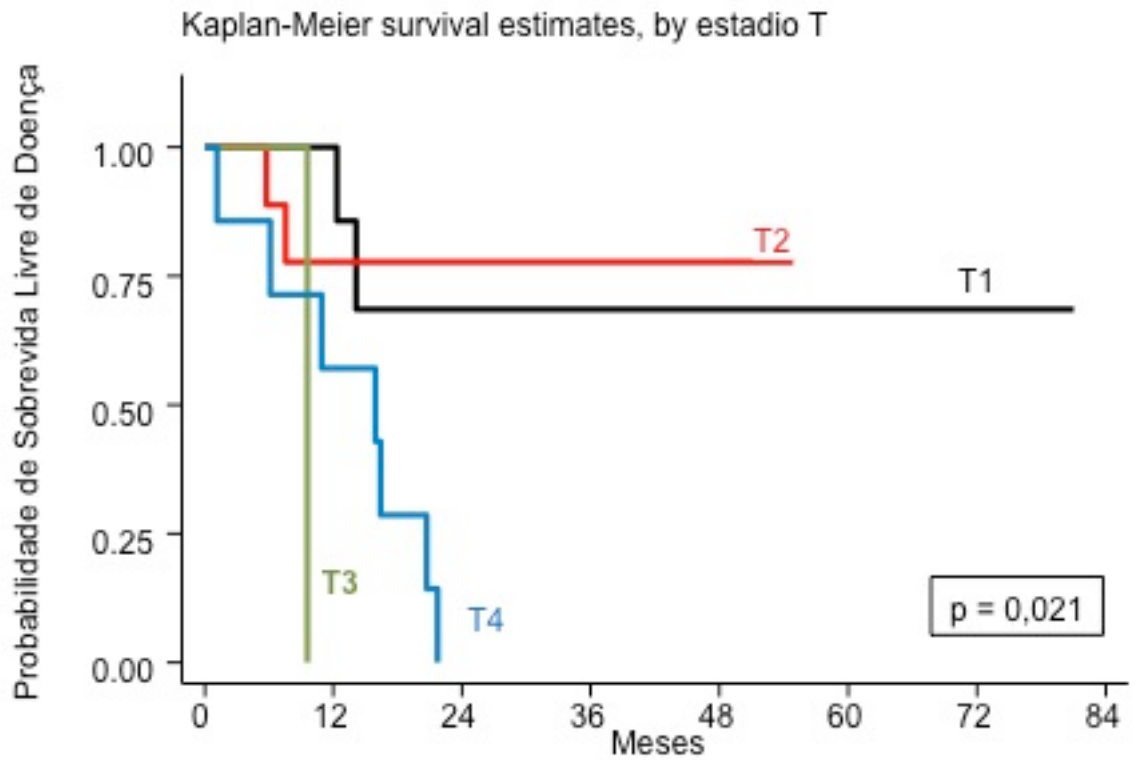


Gráfico 4- Probabilidade de sobrevida livre de doença relacionada ao estágio T.  
Fonte: Do autor.

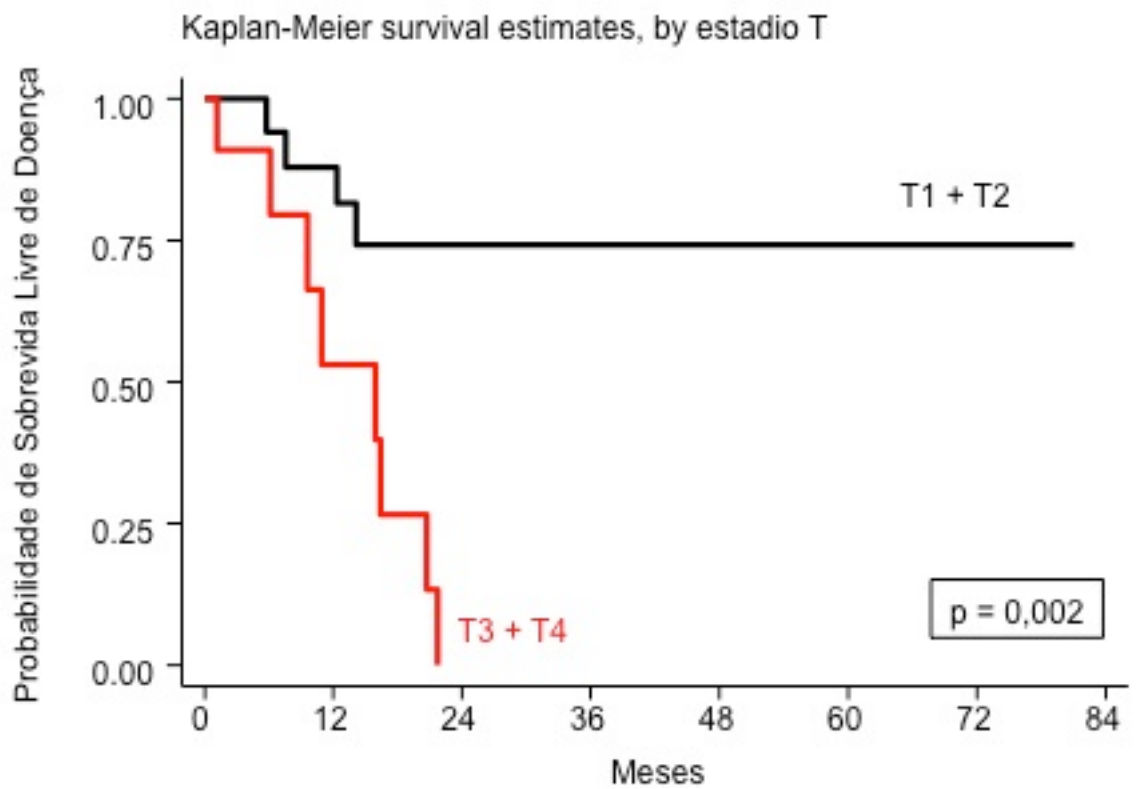


Gráfico 5- Probabilidade de sobrevida livre de doença relacionada ao estágio T agrupado.  
Fonte: Do autor.

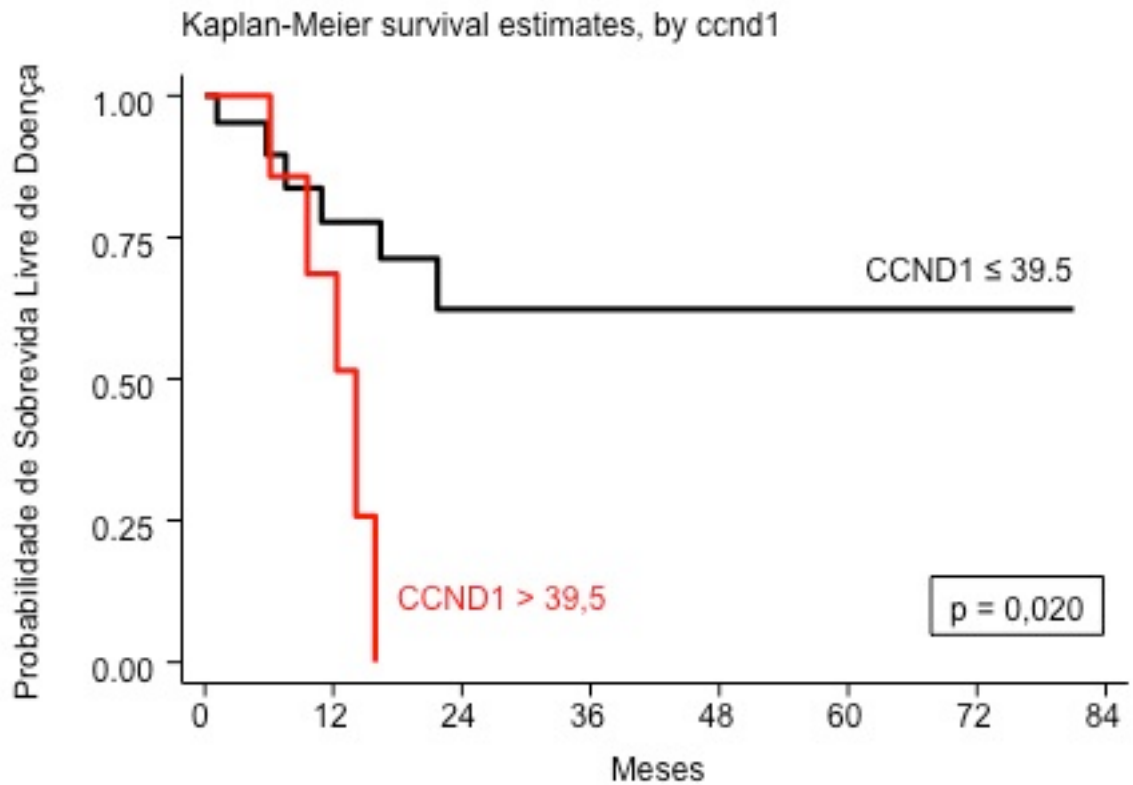


Gráfico 6- Probabilidade de sobrevida livre de doença relacionada à expressão de ciclina D1.

Fonte: Do autor.

A distribuição da casuística também foi analisada frente as mesmas variáveis de acordo com Ki-67. Os pacientes que apresentaram marcação do Ki-67 abaixo do seu ponto de corte eram em sua maioria (63,2%) estadiados em T1+T2 enquanto que a grande maioria (80%) dos pacientes T3 + T4 tinham marcação acima do ponto de corte do Ki-67. 10 pacientes (66,7%) que apresentavam marcação abaixo do ponto de corte do Ki-67 foram classificados em N0, enquanto que 10 (71,4%) N+ apresentaram marcação acima do ponto de corte do Ki-67. 12 pacientes (57,1%) apresentaram marcação abaixo do ponto de corte para os 2 marcadores enquanto 6 pacientes (75%) apresentaram marcação acima do ponto de corte para os 2 marcadores (Tabela 18).

Tabela 18. Distribuição da casuística de acordo com Ki-67 (ponto de corte na mediana).

Variável	Categoria	Ki-67		p-valor
		≤ 28 N (%)	> 28 N (%)	
Tipo de lesão	Úlcero vegetante	2 (40,0)	3 (60,0)	0,999
	Úlcero-infiltrativa	11 (50,0)	11 (50,0)	
Estádio T	T1 + T2	12 (63,2)	7 (36,8)	<u>0,050</u>
	T3 + T4	2 (20,0)	8 (80,0)	
Estádio N	N0	10 (66,7)	5 (33,3)	0,066
	N+	4 (28,6)	10 (71,4)	
Grau de diferenciação	Bem diferenciado	6 (60,0)	4 (40,0)	NA
	Moderadamente diferenciado	5 (38,5)	8 (61,5)	
	Pobremente diferenciado	3 (50,0)	3 (50,0)	
Invasão perineural	Ausente	6 (66,7)	3 (33,3)	0,999
	Presente	7 (70,0)	3 (30,0)	
Invasão linfática	Ausente	5 (83,3)	1 (16,7)	0,613
	Presente	9 (64,3)	5 (35,7)	
Linfonodos	Não	6 (85,7)	1 (14,3)	0,282
	Sim	4 (50,0)	4 (50,0)	
Margens	Livres	6 (75,0)	2 (25,0)	0,999
	Comprometidas	6 (66,7)	3 (33,3)	
Ciclina D1	≤ 39,5	12 (57,1)	9 (42,9)	0,215
	> 39,5	2 (25,0)	6 (75,0)	

p-valor obtido pelo teste exato de Fisher.

Fonte: Do autor.

A distribuição da casuística de acordo com a ciclina D1 mostrou 16 pacientes (84,2%) agrupados em T1 +T2 que apresentaram marcação abaixo do ponto de corte da ciclina D1. Quanto ao estágio N, 10 pacientes (66,7%) classificados em N0 apresentaram marcação da ciclina D1 abaixo do ponto de corte. 8 (80%) pacientes com grau de diferenciação bem diferenciados apresentaram marcação da ciclina D1 abaixo do ponto de corte enquanto 2 (20%) se apresentaram acima do ponto de corte (Tabela 19).

Tabela 19. Distribuição da casuística de acordo com ciclina D1 (ponto de corte no terceiro quartil).

Variável	Categoria	CCND1		p-valor
		≤ 39,5 N (%)	> 39,5 N (%)	
Tipo de lesão	Úlcero vegetante	2 (40,0)	3 (60,0)	0,091
	Úlcero-infiltrativa	18 (81,8)	4 (18,2)	
Estádio T	T1 + T2	16 (84,2)	3 (15,8)	0,083
	T3 + T4	5 (50,0)	5 (50,0)	
Estádio N	N0	10 (66,7)	5 (33,3)	0,682
	N+	11 (78,6)	3 (21,4)	
Grau de diferenciação	Bem diferenciado	8 (80,0)	2 (20,0)	NA
	Moderadamente diferenciado	10 (76,9)	3 (23,1)	
	Pobrememente diferenciado	3 (50,0)	3 (50,0)	
Invasão perineural	Ausente	8 (88,9)	1 (11,1)	0,999
	Presente	9 (90,0)	1 (10,0)	
Invasão linfática	Ausente	5 (83,3)	1 (16,7)	0,521
	Presente	13 (92,9)	1 (7,1)	

Tabela 19. Distribuição da casuística de acordo com ciclina D1 (ponto de corte no terceiro quartil).  
(continuação)

Variável	Categoria	CCND1		p-valor
		≤ 39,5 N (%)	> 39,5 N (%)	
Linfonodos	Não	6 (85,7)	1 (14,3)	NA
	Sim	8 (100,0)	0 (0,0)	
Margens	Livres	7 (87,5)	1 (12,5)	0,999
	Comprometidas	8 (88,9)	1 (11,1)	

p-valor obtido pelo teste exato de Fisher.

Fonte: Do autor.

Doze pacientes (63,2%) agrupados em T1 + T2 tiveram marcação abaixo do ponto de corte para a ciclina D1 quando se considerou a mediana. Sete pacientes (36,8%) agrupados em T1 + T2 tiveram marcação acima do ponto de corte. Daqueles pacientes agrupados em T3 + T4, 2 (20%) apresentaram marcação abaixo do ponto de corte, enquanto 8 (80%) apresentaram marcação acima do ponto de corte (Tabela 20).

Tabela 20. Distribuição da casuística de acordo com ciclina D1 (ponto de corte na mediana).

Variável	Categoria	CCND1		p-valor
		≤ 19 N (%)	> 19 N (%)	
Estádio T	T1 + T2	12 (63,2)	7 (36,8)	<u>0,027</u>
	T3 + T4	2 (20,0)	8 (80,0)	

p-valor obtido pelo teste de frequências do qui-quadrado.

Fonte: Do autor.

## 6 DISCUSSÃO

No câncer de boca, muito se sabe sobre os fatores de risco, dados epidemiológicos e da importância do diagnóstico precoce para se alcançar um melhor prognóstico da doença. Embora haja bastante conhecimento sobre a carcinogênese, muito se trabalha para desvendar todos os seus caminhos na tentativa de elucidar o desenvolvimento da doença oncológica, visando, portanto, sua prevenção e tratamento. Destaca-se atualmente a importância dos marcadores biológicos que podem estar intimamente relacionados com os processos de progressão tumoral e que podem complementar a classificação TNM uma vez que esta apresenta algumas limitações importantes.

Inicialmente, podemos destacar os dados epidemiológicos relacionados ao câncer de boca sendo que existe uma taxa de proporção de homens/mulheres variando de 3,5 a 3:1 com uma tendência atual de diminuição desta proporção como visto em muitos estudos (CARLOS DE VICENTE et al., 2002; LAM; LOGAN; LUKE, 2006; AGRAWAL; RAJDERKAR, 2012; BRASIL, 2012; SIEGEL; NAISHADHAM; JEMAL, 2013). Os dados encontrados em nosso estudo vem ao encontro destes, representando 70% de pacientes do gênero masculino e uma proporção de 2,33 homens para cada mulher.

Em nossa análise, dentre os pacientes acometidos com carcinoma de células escamosas de língua, a média de idade encontrada foi de 54,63 anos, variando entre 32 e 76 anos, se assemelhando a muitos estudos os quais demonstram que na maioria dos cânceres bucais acometendo a língua, a grande incidência é em homens com mais de 50 anos de idade (CARLOS DE VICENTE et al., 2002; COSTA; ARAÚJO JÚNIOR; RAMOS, 2005; SASAKI et al., 2005; LAM; LOGAN; LUKE, 2006; SILVEIRA et al., 2008; RAZMPA; MEMARI; NAGHIBZADEH, 2011; AGRAWAL; RAJDERKAR, 2012; SIEGEL; NAISHADHAM; JEMAL, 2013).

Hábitos como o tabagismo e o etilismo foram encontrados, em nosso estudo, em 76,7% e 70% respectivamente confirmando muitos estudos que comprovam tais hábitos como fortes fatores de risco para o desenvolvimento da doença (BLOT et al., 1988; PETERSEN, 2003; GILLISON, 2007; PETERSEN, 2009; PETTI, 2009; WARNAKULASURIYA, 2009; AGRAWAL; RAJDERKAR, 2012; BRASIL, 2012; TOBACCO, 2012).

Embora o padrão clássico do carcinoma de células escamosas seja enquadrado em homens, tabagistas e etilistas, acima dos 50 anos de idade, a literatura contemporânea salienta que aproximadamente 20% de casos de câncer de boca não tem etiologia conhecida, destacando-se o aumento de casos em pacientes mais jovens, sem história de tabagismo ou etilismo, o que pode indicar exposição a outros agentes carcinogênicos tais como o importante papel do HPV (vírus papiloma humano) na etiologia dessas lesões devido a mudanças no comportamento sexual (GILLISON, 2007; VARGAS-FERREIRA et al., 2012).

Em nosso estudo comprovamos uma distribuição bastante equilibrada entre o estadiamento T e N. Quando optamos por analisar variáveis com o T agrupado, o grupamento T3 + T4 destacou resultado estatístico significativo quando associado com a variável recidiva. Cabe ressaltar também que, embora não houvesse resultado estatístico significativo, todos os casos sem invasão perineural e angiolinfática eram T1 + T2. Embora não avaliável estatisticamente, de acordo com a situação do paciente, 6 dos pacientes que se encontram vivos sem doença se enquadram em T1, 7 em T2, sendo que nenhum paciente no estágio T1 foi a óbito, contra nenhum paciente T4 vivo sem doença e 6 pacientes T3 + T4 que foram a óbito.

As probabilidades de sobrevida global foram analisadas no período de 6 meses a 1 ano e houve significância estatística quando o estágio T foi analisado isoladamente ou agrupado, assim como na análise do estágio N, observando que estágios avançados têm menor sobrevida. Muitos estudos comprovam que um estágio avançado como T4 e linfonodos positivos tornam o prognóstico desfavorável (CARLOS DE VICENTE et al., 2002; BRASILEIRO FILHO, 2004; MASSANO et al., 2006; DAS et al., 2011; SIEGEL; NAISHADHAM; JEMAL, 2013).

Em muitos estudos como os de Thomson et al. (2008), Humayun e Prasad (2011) e Kumar, Kane e Rathod (2012), a expressão aumentada do Ki-67 foi relacionada com alto índice de proliferação celular ou aumento do grau de displasia embora o trabalho de Martinez et al. (2005) não trouxesse diferença estatisticamente significativa na expressão do Ki-67 em queilites actínicas e lábio normal. Em contrapartida, Sittel et al. (1999) e Freudlsperger et al. (2012) citam que tumores com alta proliferação tem maior índice de marcação de Ki-67 e respondem melhor à radioterapia, com menor índice de recidivas. Já Wangsa et al. (2008)

relacionaram a alta expressão de Ki-67 com alta atividade proliferativa e aumento do risco de recorrência loco-regional.

Em nosso estudo, com relação aos marcadores, a contagem da expressão de Ki-67 com valores maiores que 28 encontrou menor sobrevida global do que a contagem da expressão de Ki-67 com valores menores que 28 ( $p < 0,05$ ). O estágio T mostrou associação importante com Ki-67, onde 80% dos casos T3 + T4 tiveram a contagem da expressão de Ki-67 maior que 28 ( $p = 0,05$ ). Demais variáveis do nosso estudo não mostraram diferenças entre as curvas.

Para sobrevida livre de doença (recidivas) notamos diferença nas probabilidades somente para estágio T e ciclina D1. Observa-se que estadiamento avançado mostra mais recidivas ou seja tem menor sobrevida livre de doença, assim como mostram outros estudos (MASSANO et al., 2006; MARSIT et al., 2008; DAS et al., 2011; SIEGEL; NAISHADHAM; JEMAL, 2013).

Em nosso estudo, para a ciclina D1 os valores maiores que 39,5 mostram pior sobrevida ( $p < 0,05$ ). Quando utilizamos ponto de corte da ciclina D1 na mediana somente o estadiamento T mostra diferença significativa, mas não se observa associação significativa com demais variáveis.

Turatti et al. (2005) relatam alta expressão da ciclina D1 nos carcinomas relacionados a maior grau de alteração do epitélio. Em lesões cancerizáveis, Kovesi e Szende (2006) e Vieira et al. (2012) relacionaram um aumento na expressão de Ciclina D1 em lesões com displasia quando comparado às lesões sem displasia e quanto maior o grau de displasia, maior foi a expressão da Ciclina D1 encontrada. Tal como Marsit et al. (2008) que encontraram relação da ciclina D1 com pobres prognósticos especialmente em tumores T3 e T4 quando comparados com T1 e T2 e Fujii et al. (2001) que consideraram a expressão da ciclina D1 como um fator chave na agressividade dos tumores de língua, o nosso estudo revelou que a expressão para a ciclina D1 com valores maiores que 39,5 mostraram pior sobrevida e quando o ponto de corte da ciclina D1 foi realizado na mediana o estadiamento T também teve resultado significativo estatisticamente com pacientes T1 e T2 com menor expressão da ciclina D1 e conseqüentemente com melhor sobrevida livre de doença.

Carlos de Vicente et al. (2002) obtiveram uma correlação positiva entre Ki-67 e ciclina D1 e Swaminathan et al. (2012) relatam que além da ciclina D1 ser mais expressa em carcinoma de células escamosas, existe uma correlação positiva entre

a expressão do p53 mutante com o aumento da expressão da ciclina D1. A correlação positiva entre a ciclina D1 e o Ki-67 não foi possível estatisticamente em nosso estudo.

Embora a análise de sobrevida global e sobrevida livre de doença tenha sido realizada com significados estatísticos importantes, é preciso ter cautela em sua interpretação uma vez que foi observado um mínimo de acompanhamento de 6 meses, sendo que normalmente os estudos realizados com sobrevida sejam de 5 anos (LAM; LOGAN; LUKE, 2006; HARRIS et al., 2011; GANLY; PATEL; SHAH, 2012; LIN et al., 2012; WANG et al., 2012).

Sabe-se da limitação e da diferença do estudo de peças cirúrgicas e biópsias incisionais, no entanto, a opção na manutenção das biópsias incisionais, neste estudo, seguiu o objetivo de confrontar o comportamento de pacientes com lesões avançadas frente aqueles com possibilidades cirúrgicas e, com relação à expressão dos marcadores. Todos os pacientes com biópsias incisionais tiveram marcação positiva para Ki-67 maior que 28 e 71,4% das biópsias incisionais com marcação positiva para ciclina D1 estavam acima do seu ponto de corte (39,5).

Mineta et al. (2000) associaram a superexpressão da ciclina D1 em carcinomas bucais com menor sobrevida e pior prognóstico, relacionando este marcador com maior acometimento linfonodal e não diferenciaram peças cirúrgicas de biópsias incisionais, em seu estudo. Carlos de Vicente et al. (2002) encontraram correlação positiva entre a expressão de ciclina D1 e Ki-67 nos carcinomas bucais e relataram que estes marcadores podem indicar estágios avançados da doença, no entanto, em seu estudo, analisaram somente peças cirúrgicas. No estudo de Kuo et al. (1999) a superexpressão da ciclina D1 foi demonstrada nos carcinomas bucais indicando que a mesma pode representar um importante fator na carcinogênese e um pior prognóstico e sobrevida, sem diferenciar peças cirúrgicas de biópsias incisionais. Alguns estudos como o de Lingen et al. (2000) que analisaram a expressão de p53 em lesões de carcinoma de língua, não relataram a natureza das amostras. No estudo de Saawarn et al. (2012) sobre a análise de ciclina D1 em carcinomas bucais e sua expressão aumentada de acordo com a diferenciação histológica dos casos, as amostras analisadas foram em fragmentos de biópsia incisional. Diante destes trabalhos, parece não haver uma uniformização na literatura sobre utilização de peças cirúrgicas ou biópsias incisionais na caracterização dos estudos ou no confronto dos resultados.

O estudo de Carlos de Vicente et al. (2002) também correlaciona além da superexpressão da ciclina D1 com o tamanho do tumor, o comprometimento linfonodal. Já o Ki-67, no estudo deste autor, foi relacionado também com o grau de diferenciação histológica das peças o que não foi encontrado estatisticamente em nosso estudo.

Mais estudos são necessários para testar estas hipóteses ou estudos que envolvam um período de tempo maior de acompanhamento e/ou um número maior de pacientes envolvidos para se obter resultados estatísticos mais significativos.

## 7 CONCLUSÕES

Diante da casuística apresentada e dos dados analisados podemos verificar que:

- Quando o estadiamento T foi analisado houve correlação importante com o índice de recidiva, indicando que quando maior o T, maior a chance de recidivas.
- O estadiamento T avançado, assim como o estágio N positivo apresentaram menor sobrevida global.
- O estadiamento T avançado tem menor sobrevida livre de doença.
- O estadiamento T mostra possível associação com Ki-67 e Ciclina D1.
- A contagem da expressão de Ki-67 com valores maiores que 28 encontrou menor sobrevida global do que a contagem da expressão de Ki-67 com valores menores que 28.
- A contagem da expressão de Ciclina D1 com valores maiores que 39,5 apresentou maior probabilidade de terem recidivas e pior sobrevida livre de doença.
- Não houve correlação positiva entre Ciclina D1 e Ki-67.

## REFERÊNCIAS

- AGRAWAL, K.; RAJDERKAR, S. Clinico-epidemiological profile of oral cancer: A hospital based study. **J Community Health**, v. 24, n. 2, p. 80-85, 2012.
- AMORIM FILHO, F. S. et al. Estudo de variáveis demográficas, ocupacionais e co-carcinogênicas no carcinoma espinocelular da base de língua nas mulheres. **Rev Bras Otorrinol**, v. 69, p. 472-478, 2003.
- BARROS, R. M. G.; MAGALHÃES, A. V.; SCHMIT, F. C. Oral cancer: immunohistochemical expression of c-erbB-2, bcl-2 and egfr – study with leukoplakia and inflammatory hyperplasia. **Rev Odont Cienc**, v. 20, n. 50, out/dez. 2005.
- BITTAR, T. O. et al. Epidemiological features of oral cancer: a world public health matter. **Rfo upf**, v. 15, p. 87-93, 2010.
- BLOT, W. J. et al. Smoking and drinking in relation to oral and pharyngeal cancer. **Cancer Res**, v. 48, n. 11, p. 3282-7, jun., 1988.
- BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Atenção à saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. **TNM: classificação de tumores malignos**. Rio de Janeiro, 2004. Disponível em: < [www1.inca.gov.br/tratamento/tnm/tnm2.pdf](http://www1.inca.gov.br/tratamento/tnm/tnm2.pdf) >. Acesso em: jun. 2013.
- \_\_\_\_\_. MINISTÉRIO DA SAÚDE. Secretaria de Atenção à saúde. Instituto Nacional do Câncer José Alencar Gomes da Silva. **Estimativa 2012. Incidência de Câncer no Brasil**. 2012. Disponível em: < <http://www.inca.gov.br/estimativa/2012/> >. Acesso em: jun. 2013.
- BRASILEIRO FILHO, G. **Patologia geral**. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
- BRYNE, M. Is the invasive front of an oral carcinoma the most important area for prognostication? **Oral Dis**, v. 4, n. 2, p. 70-7, jun. 1998.
- CARLOS DE VICENTE, J. et al. Expression of cyclin D1 and Ki-67 in squamous cell carcinoma of the oral cavity: clinicopathological and prognostic significance. **Oral oncology**, v. 38, n. 3, p. 301-308, 2002.
- COSTA, A. D. L. L.; ARAÚJO JÚNIOR, R. F. D.; RAMOS, C. C. F. Correlação entre a classificação clínica TNM e as características histológicas de malignidade do carcinoma epidermóide oral. **Rev Brasi Otorrinol**, v. 71, p. 181-187, 2005.
- DAS, S. N. et al. Correlation of cyclin D1 expression with aggressive DNA pattern in patients with tobacco-related intraoral squamous cell carcinoma. **Indian J Med Res**, v. 133, p. 381-6, apr. 2011.

FARDIN, M. et al. Fatores de risco no prognóstico do câncer da boca. **Rev Bras Cir Cab Pesc.**, v. 33, p. 27-33, 2004.

FREUDLSPERGER, C. et al. Ki-67 expression predicts radiosensitivity in oral squamous cell carcinoma. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 41, n. 8, p. 965-9, aug. 2012.

FUJII, M. et al. Cyclin D1 amplification correlates with early recurrence of squamous cell carcinoma of the tongue. **Cancer Lett**, v. 172, n. 2, p. 187-92, oct. 30. 2001.

GANLY, I.; PATEL, S.; SHAH, J. Early stage squamous cell cancer of the oral tongue--clinicopathologic features affecting outcome. **Cancer**, v. 118, n. 1, p. 101-11, Jan 1. 2012.

GILLISON, M. L. Current topics in the epidemiology of oral cavity and oropharyngeal cancers. **Head & Neck**, v. 29, n. 8, p. 779-792, 2007.

GOESSEL, G. et al. Creating oral squamous cancer cells: a cellular model of oral-esophageal carcinogenesis. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v. 102, n. 43, p. 15599-604, oct. 25. 2005.

GUERRA, E. N. D. S. **Expressão imuno-histoquímica da ciclina d1 e do p16 em carcinoma epidermóide de boca: correlação clínico-patológica.** 2002. 86f. Dissertação (PhD) . Universidade de São Paulo, São Paulo. 2002.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. The hallmarks of cancer. **Cell**, v. 100, n. 1, p. 57-70, jan 7. 2000.

\_\_\_\_\_. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646-74, mar 4. 2011.

HARRIS, S. L. et al. Association of p16(INK4a) overexpression with improved outcomes in young patients with squamous cell cancers of the oral tongue. **Head Neck**, v. 33, n. 11, p. 1622-7, nov. 2011.

HUMAYUN, S.; PRASAD, V. R. Expression of p53 protein and ki-67 antigen in oral premalignant lesions and oral squamous cell carcinomas: An immunohistochemical study. **Natl J Maxillofac Surg**, v. 2, n. 1, p. 38-46, jan. 2011.

KOVESI, G.; SZENDE, B. Prognostic value of cyclin D1, p27, and p63 in oral leukoplakia. **J Oral Pathol Med**, v. 35, n. 5, p. 274-7, may. 2006.

KUMAR, P.; KANE, S.; RATHOD, G. P. Coexpression of p53 and Ki 67 and lack of c-erbB2 expression in oral leukoplakias in India. **Braz Oral Res**, v. 26, n. 3, p. 228-34, may-jun. 2012.

KUMAR, V. et al. **Robbins patologia básica.** 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008.

KUO, M. Y. et al. Expression of cyclin D1 is correlated with poor prognosis in patients with areca quid chewing-related oral squamous cell carcinomas in Taiwan. **J Oral Pathol Med**, v. 28, n. 4, p. 165-9, apr. 1999.

LAM, L.; LOGAN, R. M.; LUKE, C. Epidemiological analysis of tongue cancer in South Australia for the 24-year period, 1977-2001. **Aust Dent J**, v. 51, n. 1, p. 16-22, mar. 2006.

LIN, Y. T. et al. Clinical significance of erythropoietin receptor expression in oral squamous cell carcinoma. **BMC Cancer**, v. 12, p. 194, 2012.

LINGEN, M. W. et al. Overexpression of p53 in squamous cell carcinoma of the tongue in young patients with no known risk factors is not associated with mutations in exons 5-9. **Head Neck**, v. 22, n. 4, p. 328-35, jul. 2000.

MARSIT, C. J. et al. A Genotype-Phenotype Examination of Cyclin D1 on Risk and Outcome of Squamous Cell Carcinoma of the Head and Neck. **Clin Cancer Res**, v. 14, n. 8, p. 2371-2377, apr., 2008.

MARTINEZ, A. et al. Expression of apoptotic and cell proliferation regulatory proteins in actinic cheilitis. **J Oral Pathol Med**, v. 34, n. 5, p. 257-62, may. 2005.

MASSANO, J. et al. Oral squamous cell carcinoma: review of prognostic and predictive factors. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 102, n. 1, p. 67-76, jul. 2006.

MINETA, H. et al. Cyclin D1 overexpression correlates with poor prognosis in patients with tongue squamous cell carcinoma. **Oral Oncol**, v. 36, n. 2, p. 194-8, mar. 2000.

MOTOKURA, T.; ARNOLD, A. Cyclins and oncogenesis. **Biochim Biophys Acta**, v. 1155, n. 1, p. 63-78, may. 25. 1993.

ODAJIMA, T. et al. Abnormal beta-catenin expression in oral cancer with no gene mutation: correlation with expression of cyclin D1 and epidermal growth factor receptor, Ki-67 labeling index, and clinicopathological features. **Hum Pathol**, v. 36, n. 3, p. 234-41, mar. 2005.

PETERSEN, P. E. Tobacco and oral health--the role of the world health organization. **Oral Health Prev Dent**, v. 1, n. 4, p. 309-15, 2003.

\_\_\_\_\_. Oral cancer prevention and control--the approach of the World Health Organization. **Oral Oncol**, v. 45, n. 4-5, p. 454-60, apr-may. 2009.

PETTI, S. Lifestyle risk factors for oral cancer. **Oral Oncol**, v. 45, n. 4-5, p. 340-50, apr-may. 2009.

RAPIDIS, A. D. et al. Major advances in the knowledge and understanding of the epidemiology, aetiopathogenesis, diagnosis, management and prognosis of oral cancer. **Oral Oncol**, v. 45, n. 4-5, p. 299-300, apr-may. 2009.

RAZMPA, E.; MEMARI, F.; NAGHIBZADEH, B. Epidemiologic and Clinicopathologic Characteristics of Tongue Cancer in Iranian Patients. **Acta Med Iran**, v. 49, n. 1, p. 44-48, 2011.

RUBIN, E. **Patologia: bases clínico patológicas em medicina**. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2006.

SAAWARN, S. et al. Cyclin d1 expression and its correlation with histopathological differentiation in oral squamous cell carcinoma. **ScientificWorldJournal**, v. 2012, p. 978327, 2012

SASAKI, T. et al. Clinico-pathological features of squamous cell carcinoma of the oral cavity in patients <40 years of age. **J Oral Pathol Med**, v. 34, n. 3, p. 129-33, mar. 2005.

SCHLUTER, C. et al. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. **J Cell Biol**, v. 123, n. 3, p. 513-22, nov. 1993.

SIEGEL, R.; NAISHADHAM, D.; JEMAL, A. Cancer statistics, 2013. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 63, n. 1, p. 11-30, 2013.

SILVEIRA, E. D. D. S. et al. Expressão da proteína nm23 em carcinoma de células escamosas de língua metastático e não-metastático. **Rev Bras Otorrinol**, v. 74, n. 3, p. 356–359, 2008.

SITTEL, C. et al. Prognostic significance of Ki-67 (MIB1), PCNA and p53 in cancer of the oropharynx and oral cavity. **Oral Oncol**, v. 35, n. 6, p. 583-9, nov. 1999.

STATACorp. Stata Corporation. **Intercooled Stata 7.0**. Texas: College Station, USA. 2001.

SWAMINATHAN, U. et al. Expression of p53 and Cyclin D1 in oral squamous cell carcinoma and normal mucosa: An Immunohistochemical study. **J Oral Maxillofac Pathol**, v. 16, n. 2, p. 172-7, may 2012.

THOMSON, P. J. et al. Predicting recurrence after oral precancer treatment: use of cell cycle analysis. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v. 46, n. 5, p. 370-5, jul. 2008.

TOBACCO. Tobacco and Oral Health. **Ash research report**, United Kingdom, 2012. Disponível em: < [http://www.ash.org.uk/files/documents/ASH\\_598.pdf](http://www.ash.org.uk/files/documents/ASH_598.pdf) >. Acesso em: 20 jul. 2013.

TURATTI, E. et al. Assessment of c-Jun, c-Fos and cyclin D1 in premalignant and malignant oral lesions. **J Oral Sci**, v. 47, n. 2, p. 71-6, jun. 2005.

VAN DER SCHROEFF, M. P.; BAATENBURG DE JONG, R. J. Staging and prognosis in head and neck cancer. **Oral Oncol**, v. 45, n. 4-5, p. 356-60, apr.-may, 2009.

VARGAS-FERREIRA, F. et al. Etiologic factors associated with oral squamous cell carcinoma in non-smokers and non-alcoholic drinkers: a brief approach. **Braz Dent J**, v. 23, n. 5, p. 586-90, sep.-oct. 2012.

VIEIRA, R. A. M. A. R. et al. Actinic cheilitis and squamous cell carcinoma of the lip: clinical, histopathological and immunogenetic aspects. **An Bras Dermatol**, v. 87, p. 105-114, 2012.

WANG, C. et al. Deregulation of Snai2 is associated with metastasis and poor prognosis in tongue squamous cell carcinoma. **Int J Cancer**, v. 130, n. 10, p. 2249-58, may, 2012.

WANGSA, D. et al. Ki-67 expression predicts locoregional recurrence in stage I oral tongue carcinoma. **Br J Cancer**, v. 99, n. 7, p. 1121-8, oct, 2008.

WARNAKULASURIYA, S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. **Oral Oncol**, v. 45, n. 4-5, p. 309-16, apr.-may, 2009.

## ANEXOS

### ANEXO I

#### FORMULÁRIO PARA A COLETA DE DADOS

**Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas / Unifal- MG**

*Departamento de Estomatologia- Área de Patologia*

**Hospital Bom Pastor – Varginha MG**

#### **“ANÁLISE DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DA CICLINA D1 E DO Ki-67 NO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÍNGUA”**

*Eduardo Pereira Guimarães*

*Prof. Dr. Alessandro Antônio Costa Pereira*

#### **I. Identificação e dados demográficos:**

1. Número no estudo: \_\_\_\_\_
2. RGH: \_\_\_\_\_
3. Idade: \_\_\_\_\_anos
4. Gênero:  1-masculino  2-feminino
5. Raça:  1-branca  2-amarela  3-negra  4-outra \_\_\_\_\_
6. Residência:

#### **II. História clínica:**

7. Tempo de história: \_\_\_\_\_ meses (999 se desconhecido)
8. Tabagismo:  0-não  1- +  2- ++  3- +++  4- ++++  9-desc.
9. Etilismo:  0-não  1- +  2- ++  3- +++  4- ++++  9-desc.

#### **III. Loco-regional:**

10. Local de tumor:  1-ápice da língua  2-corpo de língua  3-ápice e corpo de língua  4-base lingual  5-bordo lingual
11. Tipo de lesão:  1-úlcerovogetante  2-úlceroinfiltrativa  3-outra \_\_\_\_\_
12. Estádio T:  1-T1  2-T2  3-T3  4-T4  9-Tx
13. Estádio N:  0-N0  1-N1  2-N2a  3-N2b  4-N2c  5-N3  9-Nx

#### **IV. Cirurgia:**

14. Data da cirurgia: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_
15. Cirurgia tumor primário:  1- cirurgia sem esvaziamento cervical  2- cirurgia com esvaziamento cervical ipsilateral  3- cirurgia com esvaziamento cervical contralateral (simultâneo)

**V. Radioterapia pós-operatória:**16.  0- não  1- sim**VI Quimioterapia pós-operatória**17.  0- não  1- sim**VI. Anatomopatológico da peça da cirurgia inicial:**

18. Número do AP: \_\_\_\_\_

19. Histologia do t. primário:  1-CEC/BD  2-CEC/MD  3-CEC/PD20. Disposição em paliçada:  0-ausente  1-presente21. Pontes intercelulares:  0-ausente  1-presente22. Figuras de mitoses:  0-ausente  1-presente23. IM ao anticorpo ciclina D1: \_\_\_\_\_/mm<sup>2</sup>24. IM ao anticorpo Ki-67: \_\_\_\_\_/mm<sup>2</sup>25. Ca Espinocelular - Pérolas córneas:  0-ausente  1-presente26. Ca Espinocelular - Disqueratose:  0-ausente  1-presente27. Ca Espinocelular - Pontes intercelulares:  0-ausente  1-presente28. Ca Espinocelular - Figuras de Mitoses:  0-ausente  1-presente29. Ca Espinocelular - Hiper Cromatismo:  0-leve  1-moderado  2-intenso30. Ca Espinocelular - Pleomorfismo:  0 leve  1-moderado  2-intenso31. Embolização vascular:  0-não  1-linfática  2-sangüínea  3-ambas  9-ign.32. Infiltração perineural:  0-não  1-presente  9-ignorado33. Infiltração muscular:  0-não  1-presente  9-ignorado34. Margens:  0-livres  1-presente  2-comprometidas  9-ign.35. Linfonodos comprometidos (patológico):  0-não  1-presente  9-ignorado**VII. Evolução:**

36. Data da primeira recidiva: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

37. Locais de recidiva:  0-não teve  1-local  2-pescoço ipsi  3-pescoço contra  4-pulmão  
 5-osso  6-fígado  7-outra à distância \_\_\_\_\_  8-teve recidiva, local  
ignorado  9-ignorado (perdido de vista assintomático < 5 anos)

38. Data da última informação objetiva de seguimento: \_\_\_/\_\_\_/\_\_\_

39. Situação na última informação de seguimento:  1-vivo 000  2-vivo com CA  3-MOCI  4-MOCA

## ANEXO II

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
ALFENAS



### PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

#### DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

**Título da Pesquisa:** ANÁLISE DA EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA E DO VALOR PROGNÓSTICO DA CICLINA D1 E DO KI 67 NO CÂNCER DE LÍNGUA

**Pesquisador:** Alessandro Antonio Costa Pereira

**Área Temática:**

**Versão:** 3

**CAAE:** 15691313.9.0000.5142

**Instituição Proponente:** UNIVERSIDADE FEDERAL DE ALFENAS - UNIFAL-MG

**Patrocinador Principal:** Financiamento Próprio

#### DADOS DO PARECER

**Número do Parecer:** 358.828

**Data da Relatoria:** 05/09/2013

#### Apresentação do Projeto:

O projeto é destinado a dissertação de mestrado e propõe avaliar a expressão dos marcadores biológicos Ciclina D1 e o Ki 67 pela técnica de imunistoquímica e correlacioná-las com o sistema TNM, através da consulta aos prontuários dos respectivos pacientes, para determinação do prognóstico de carcinoma de língua.

#### Objetivo da Pesquisa:

Constitui-se proposição deste estudo avaliar a expressão dos marcadores biológicos Ciclina D1 e o Ki 67 pela técnica de imunistoquímica e correlacioná-las com o sistema TNM, na determinação do prognóstico dos carcinomas de língua.

#### Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os benefícios superam os riscos.

#### Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é exequível dentro do proposto, e relevante, por se tratar de acréscimo de informação sobre importante agravo de saúde pública.

#### Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Não há.

**Endereço:** Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700  
**Bairro:** centro **CEP:** 37.130-000  
**UF:** MG **Município:** ALFENAS  
**Telefone:** (35)3299-1318 **Fax:** (35)3299-1318 **E-mail:** comite.etica@unifal-mg.edu.br

UNIVERSIDADE FEDERAL DE  
ALFENAS



Continuação do Parecer: 358.828

**Recomendações:**

Não há.

**Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:**

Sem pendências.

**Situação do Parecer:**

Aprovado

**Necessita Apreciação da CONEP:**

Não

**Considerações Finais a critério do CEP:**

O CEP acata o parecer do relator.

ALFENAS, 13 de Agosto de 2013

---

**Assinador por:**  
**Maria Betânia Tinti de Andrade**  
**(Coordenador)**

**Endereço:** Rua Gabriel Monteiro da Silva, 700  
**Bairro:** centro **CEP:** 37.130-000  
**UF:** MG **Município:** ALFENAS  
**Telefone:** (35)3299-1318 **Fax:** (35)3299-1318 **E-mail:** comite.etica@unifal-mg.edu.br

**ANEXO III****FUNDAÇÃO HOSPITALAR DO MUNICÍPIO DE VARGINHA  
HOSPITAL BOM PASTOR****RELATÓRIO/ DECLARAÇÃO**

O Cirurgião Dentista, Dr. Eduardo Pereira Guimarães, especializado em cirurgia buco maxilar, solicitou ao Hospital Bom Pastor, acesso ao arquivo hospitalar com finalidade de estudo dos registros e anotações referentes a propedêutica, exames complementares e tratamentos realizados em pacientes com câncer bucal.

O solicitante relatou necessitar do mencionado acesso para subsidiar estudo acadêmico em sua área de atuação profissional, informando que não usará nenhuma informação de identificação pessoal e/ou postal de pacientes, constantes no objeto do presente relatório.

Instado à manifestação a respeito, na condição de integrante da Comissão de Ética do Hospital Bom Pastor, assim faço.

Considerando a relevância de permanentes estudos para melhorias de tratamentos de saúde humana, a meu ver, **NÃO HÁ OBJEÇÃO AO PRETENDIDO ACESSO DO SOLICITANTE, PARA USO CONFORME RETRO INFORMADO.**

Varginha, MG 18/04/2013

  
**PRESIDENTE DA COMISSÃO DE ÉTICA  
FHOMUV - Hospital bom Pastor**

**José Maria Megda**  
MÉDICO - CRM-MG 8778