



**UNIVERSIDADE ESTADUAL DA PARAÍBA
CAMPUS I – CAMPINA GRANDE
CENTRO DE CIÊNCIAS BIOLÓGICAS E DA SAÚDE
CURSO DE ODONTOLOGIA**

PAULYANNA FARIAS TRAJANO

**ANÁLISE DA IMUNOEXPRESSÃO DO BCL-2 COM PARÂMETROS CLÍNICO-
MORFOLÓGICOS NO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÍNGUA EM
PACIENTES JOVENS E IDOSOS**

CAMPINA GRANDE - PB

MAIO - 2016

PAULYANNA FARIAS TRAJANO

ANÁLISE DA IMUNOEXPRESSÃO DO BCL-2 COM PARÂMETROS CLÍNICO-MORFOLÓGICOS NO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÍNGUA EM PACIENTES JOVENS E IDOSOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Odontologia.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Pollianna Muniz Alves

CAMPINA GRANDE – PB

MAIO – 2016

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

T768a Trajano, Paulyanna Farias.

Análise da imunexpressão do Bcl-2 com parâmetros clínico-morfológicos no carcinoma de células escamosas de língua em pacientes jovens e idosos [manuscrito] / Paulyanna Farias Trajano. - 2016.

59 p. : il. color.

Digitado.

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

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

1. Neoplasia bucal. 2. Carcinoma de células escamosas. 3. Saúde bucal. 4. Imunoistoquímica. I. Título.

21. ed. CDD 616.994

PAULYANNA FARIAS TRAJANO

ANÁLISE DA IMUNOEXPRESSÃO DO BCL-2 COM PARÂMETROS CLÍNICO-MORFOLÓGICOS NO CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS DE LÍNGUA EM PACIENTES JOVENS E IDOSOS

Trabalho de Conclusão de Curso apresentado ao Departamento de Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), como requisito parcial para a obtenção do título de Bacharel em Odontologia.

Área de concentração: Diagnóstico Oral.

Aprovação em: 25/05/2016



Prof. Dra. Pollianna Muniz Alves (Orientadora)

Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka

Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)



Prof. Dr. Yuri Wanderley Cavalcanti

Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)

DEDICATÓRIA

Primeiramente, a **Deus** que é o Meu Mestre, Minha Fortaleza, Meu Refúgio, Meu Tudo, o Autor da realização deste sonho.

Aos Meus Pais, **Ana Lúcia Farias** e **Paulo Trajano**, por ser exemplo de determinação e coragem; pela minha educação, pela dedicação e atenção, pelos incentivos, esforços e renúncias que são essenciais na minha formação, e por sempre acreditar em mim.

A Minha Vozinha, **Maria de Lourdes Farias**, minha alma gêmea, por todo Amor, pelos Cuidados e pelas Orações. Te Amo muito.

...Dedico

AGRADECIMIENTOS

AGRADECIMENTOS

Agradeço **a Deus** por tudo que sou, por Ele ser minha fortaleza e sempre guiar meus passos, por todas as oportunidades e desafios que me ajuda a superar, por fazer descer sobre mim, o Espírito Santo, que me dar força e determinação, por todos os propósitos e os planos que tem na minha vida e por me presentear com uma família maravilhosa e com mais uma conquista.

Aos Meus Pais, **Paulo Trajano Rodrigues** e **Ana Lúcia Farias Nunes**, pela minha vida, pela minha educação, por todas as renúncias, por todos os esforços, pelos conselhos, pelo apoio incondicional, pela confiança, pelos cuidados, pelas orações, pela dedicação e união, por todo Amor e Carinho, e por sempre acreditarem em mim e comemorar a cada conquista. Meu Amor por vocês é infinito.

Ao Meu irmão, **Ayrton Farias Trajano**, pela sua sinceridade, pelos carinhos, pelo apoio, pela confiança, pelos momentos de descontração e acima de tudo me presentear com Amor puro e sincero, e com uma jóia rara, a princesinha de titia, **Ana Júlia Trajano Antonino**.

As Minhas Tias **Betânia**, **Adriana** e **Simony**, que muitas vezes me seguraram nos braços e me acolhem em todos os momentos. Agradeço a vocês por serem muito mais que tias, algumas vezes, mãe, consideradas irmãs e verdadeiramente minhas amigas.

Ao Meu padrinho de coração, **Alessandro Oliveira**, pelo carinho, pelos incentivos, pelos conselhos, pela confiança, e por ter sempre reservado um pouco do seu tempo para me ensinar, participando de toda a minha trajetória. Obrigada por sempre acreditar em mim, me permitir desabafar e comemorar comigo a cada conquista.

A toda **a Minha Família**, pelos incentivos, pelos esforços, pelo apoio, pela ajuda e compreensão, paciência, amor e união sempre.

A minha amiga/irmã **Sabrina Avelar e sua Família**, minha primeira dupla, por ter me adotado, ter confiado em mim, por toda a ajuda e apoio que sempre me deram, pela paciência, pelos cuidados, pela compreensão, pelos conselhos, pela amizade e a presença de todos em minha vida. Tenho um carinho enorme por vocês, meus verdadeiros anjos.

A Minha Dupla, **Danielly Guedes Lucena**, por me aguentar, por sempre me incentivar, pelo apoio, pela paciência, pelas inúmeras experiências compartilhadas, pelo companheirismo, pela confiança, pelas caronas, pelos resumos, pela consideração e por dedicar sua sincera amizade. Muito Obrigada irmã dupla.

A duas pérolas que me acompanharam durante todo o curso, duas raridades, **Larissa Chaves** e **Valkélia Onofre**, agradeço por compartilharem muitos momentos comigo, pelas aventuras, pelas inúmeras risadas, pelas confusões, pelas noites de estudo, pelas conquistas e pela nossa amizade. Tenho carinho enorme por vocês.

Ao Senhor **Ildemir**, pela colaboração em todos os momentos, por sempre compreender minha situação, por ter uma palavra de apoio e incentivo, pelas brincadeiras e por estar sempre disposto a ajudar as pessoas. Deus honrará suas caridades e solidariedade. Agradeço de coração sua amizade.

A todos os **Professores do Curso de Odontologia** pelos conhecimentos transmitidos e por suas experiências partilhadas, pelo compromisso e dedicação que foram essenciais para a minha formação profissional.

A **Prof^a. Dra. Pollianna Muniz Alves**, minha orientadora, por quem tenho imensa admiração e respeito. Primeiramente agradeço pela paciência infinita, por acreditar nos meus esforços, pela oportunidade de participar desta pesquisa, pela sua excelência em ensinar e facilitar o entendimento do mais complexo assunto e por sempre compreender minhas limitações. Obrigada por me ouvir, por cada conselho, pelas broncas e por cada desafio, tenho certeza que me edificaram bastante. Admiro sua competência, determinação, coragem, disponibilidade e até mesmo sua presença marcante nas cobranças das atividades. Para mim é uma honra ser sua orientanda.

Ao **Prof. Dr. Cassiano Francisco Weege Nonaka** pela honrosa aceitação em participar da minha banca, pelo seu exemplo como profissional, por todos os seus ensinamentos, pela sua dedicação e ativa participação nesta pesquisa. Agradeço por toda colaboração em minha formação profissional.
A ti, minha admiração.

Ao **Prof. Dr. Yuri Wanderley Cavalcanti**, por ter aceitado participar da minha banca. É com grande satisfação que agradeço por toda a disponibilidade e colaboração na construção deste trabalho.

À **Profa. Dra. Bárbara Monteiro (Babi)**, pelo apoio, pelo carinho, pela sua atenção, por todos os conhecimentos transmitidos, pelos incentivos diários e pela companhia no laboratório. A ti, minha admiração e respeito, pela sua excelência profissional, competência, determinação, caráter e pela pessoa maravilhosa que és. Sua amizade é valiosa.

A toda equipe da **LIGA INTERDISCIPLINAR DE COMBATE AO CÂNCER ORAL (LINCCO)** da UEPB, pela oportunidade de participar deste projeto excelente, por todos os conhecimentos adquiridos, pelas inúmeras experiências partilhadas, pelo companheirismo, atenção, parceria, pela disponibilidade em sempre ajudar as pessoas, pela união, pelo carinho e pela amizade de todos os colegas.

A **Dra. Márcia Dantas** e sua ASB, **Luísa**, por sempre me acolher, ensinar, e me mostrar como é a rotina clínica do cirurgião-dentista na unidade pública, agradeço a vocês a oportunidade de ter meus primeiros contatos com o atendimento em uma UBSF. E também, pela compreensão, apoio, pela paciência, por compartilhar suas experiências, pela confiança, e principalmente pela amizade e pelo carinho que depositaram em mim. Tenho um carinho enorme por vocês.

A **Dra. Andreza Lima Macedo**, pela imensa consideração que tem por mim, por me acolher, por todos os conselhos e ensinamentos, pelas oportunidades, por compartilhar sua rotina e suas experiências, por acreditar em mim e me incentivar a cada dia. Desejo que nossa amizade e parceria prevaleça sempre. A ti, minha admiração e carinho.

Aos **Meus Colegas de Turma** que acompanharam em partes minha trajetória acadêmica, tanto no campus VIII em Araruna, quanto no campus I em Campina Grande, agradeço pelo acolhimento, companheirismo, atenção e por compartilharmos diversas experiências ao longo desses anos.

Nestas turmas tive o privilégio de ser presenteada com verdadeiros amigos, os quais permanecerão sempre nas minhas orações e em meu coração.

Aos amigos da Patologia, **Milena Rayane, Arley Leitão, Geysa, Lívia, Hellen Bandeira, Luan, Jéssica Brito e Jamesson**, a vocês minha gratidão por todos os incentivos e ensinamentos, pelo apoio, por compartilharem suas experiências e compreenderem minhas limitações, pela colaboração nesta pesquisa, pela diversão dos encontros no laboratório e principalmente pela amizade que construímos, admiro a garra e a determinação de cada um.

Agradeço a toda **Equipe do Laboratório de Patologia Oral**, aos **Alunos do Mestrado** e da **Iniciação Científica**, pelo convívio, por compartilharmos experiências e aprendizado, e pelos momentos de diversão e conversas descontraídas e pela amizade construída.

Agradeço a **Denize Núbia**, técnica do laboratório, pela paciência, atenção, por sua espontaneidade, alegria e pelo excelente trabalho que realiza, sendo fundamental no desenvolvimento das pesquisas.

Aos **Funcionários e Técnicos do Departamento de Odontologia** da Universidade Estadual da Paraíba, nas pessoas de Alexandre, Valéria, Rejane, Christopher, Seu Toinho, Thiago, Dione e os demais, pela amizade, pelas brincadeiras e pelo convívio diário durante alguns anos.

Agradeço a **Universidade Estadual da Paraíba (UEPB)**, pela oportunidade de concluir este curso, pelo incentivo em projetos de pesquisa, extensão e ensino e pelos subsídios financeiros recebidos ao longo dos anos, referentes à bolsa de monitoria e as bolsas de PIBIC, cotas 2013/2014 e 2014/2015.

Ao **Hospital Napoleão Laureano**, em João Pessoa-PB, e ao **Hospital da FAP**, em Campina Grande-PB, pela disponibilidade e contribuição para o desenvolvimento da pesquisa.

Aos **Pacientes**, pela confiança, disponibilidade e por tanto contribuírem para nosso aprendizado e desenvolvimento profissional.

A todos que contribuíram direta ou indiretamente para a conclusão deste sonho.

SUMÁRIO

	Págs
1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Epidemiologia.....	18
2.2 Características Clínicas.....	18
2.3 Sistema de Gradação Histológico de Malignidade (SGHM).....	21
2.4 Apoptose.....	22
2.4.1 Bcl-2.....	22
3 OBJETIVOS	24
3.1 Objetivo Geral.....	25
3.2 Objetivos Específicos.....	25
4 METODOLOGIA	26
4.1 Considerações Éticas.....	27
4.2 Caracterização do Estudo.....	27
4.3 População e Amostra.....	27
4.3.1 Critérios de inclusão e exclusão.....	27
4.4 Estudo Clínico.....	27
4.5 Estudo Morfológico.....	28
4.6 Estudo Imunoistoquímico.....	29
4.6.1 Método Imunoistoquímico.....	29
4.6.2 Análise Imunoistoquímica.....	31
4.7 Análise Estatística.....	31
ARTIGO	33
1 INTRODUÇÃO	36
2 MATERIAIS E MÉTODOS	37
3 RESULTADOS	40
4 DISCUSSÃO	45
5 CONSIDERAÇÕES FINAIS	47
6 REFERÊNCIAS	47
7 REFERENCIAS	50
APÊNDICE A	55
ANEXO A	56
ANEXO B	58

RESUMO

Introdução: O carcinoma de células escamosas oral (CCEO) corresponde a 95% das neoplasias malignas que afetam a cavidade oral e acometendo preferencialmente indivíduos entre a quinta e sexta década de vida. No entanto, a incidência do CCEO em pacientes jovens tem aumentado nos últimos anos, e os tumores tem demonstrado comportamento biológico mais agressivo quando comparados aos casos em idosos. **Objetivos:** Avaliar a imunexpressão do Bcl-2 em casos de CCE de língua em pacientes jovens e idosos, correlacionando-a com os parâmetros clínico-patológicos. **Materiais e Métodos:** A amostra foi constituída de 55 casos de Carcinoma Células Escamosas de Língua (CCEL) diagnosticados em dois hospitais de referência em oncologia da Paraíba, entre os anos de 1999 e 2015, sendo dividida em dois grupos: jovens (≤ 45 anos de idade) (n=25) e idosos (≥ 60 anos de idade) (n=30). Os parâmetros clínicos (sexo, idade e TNM) foram obtidos através dos prontuários médicos. Na análise morfológica foram utilizados os Sistemas de Gradação Histopatológico de Malignidade (SGHM), propostos por Bryne et al., (1992) e pela OMS (CARDESA et al., 2005). Em seguida, foi realizada a técnica da imunistoquímica pelo método da imunoperoxidase com a técnica baseada em polímeros de dextrano objetivando-se avaliar quantitativamente a imunexpressão do Bcl-2, nas células neoplásicas. Para análise estatística, foram utilizados os testes de qui-quadrado e Mann-Whitney, com valor de $p < 0,05$. **Resultados:** Em relação aos parâmetros clínicos, observamos que 65,4% (n=36) dos casos acometeram preferencialmente homens, com idade superior a 60 anos (n=30; 54,5%). Quanto ao estadiamento clínico e aos SGHM, a maioria apresentava-se em estágios iniciais (I/II) (n=32; 58,1%), classificados como Moderado/ pobremente diferenciados (n=37; 67,2%) e com Alto grau de malignidade (n=40; 72,7%). No tocante a imunomarcção do Bcl-2, houve diferença estatisticamente significativa entre os casos de CCEL em jovens e idosos ($p=0,046$) com maior índice de positividade em pacientes idosos. A imunexpressão do Bcl-2 foi maior nos casos com estágios clínicos iniciais (I/II), classificados como bem diferenciados e de alto grau de malignidade. **Conclusões:** Pode-se inferir que houve maior imunexpressão do Bcl-2 em indivíduos idosos, sugerindo que o comportamento biológico mais agressivo nessa faixa etária pode estar relacionado a maior sobrevivência das células neoplásicas.

Palavras-chave: Carcinoma de células escamosas, indivíduos jovens, estadiamento clínico, apoptose, imunistoquímica.

ABSTRACT

Background: Oral squamous cell carcinoma (OSCC) corresponds to 95% of malignant neoplasms that affects the oral cavity, involving individuals between the fifth and sixth decade of life. However, the incidence of OSCC in younger patients has increased in recent years, demonstrating more aggressive biological behavior when compared to the elderly. **Objectives:** This study evaluated the immunoexpression of Bcl-2 in cases of OSCC of tongue (TSCC) in younger and elderly patients, correlating with clinical and morphological parameters. **Materials and methods:** Sample consisted of 55 cases of TSCC diagnosed in the two referral hospitals in oncology, between 1999 and 2015 years, being divided into two groups: young (≤ 45 years old) and elderly (≥ 60 years old). Clinical parameters (gender, age and TNM) were obtained from medical records. For morphological analysis were used two Gradation Systems Histopathological of Malignancy (GSHM), proposed by Bryne et al. (1992) and WHO (CARDESA et al. 2005). Immunohistochemistry was performed by immunoperoxidase method with dextran polymer-based technique to quantitatively assess the immunoexpression of Bcl-2 in neoplastic cells. Statistical analysis was performed using the Qui-square and Mann-Whitney test, $p < 0.05$. **Results:** In relation to clinical parameters, it was observed that 65.4% of cases ($n=36$) was men and older than 60 years. Clinical staging and GSHM, 58.1% ($n=32$) presented an early stage (I/II), classified as Moderate/poorly differentiated ($n= 37$; 67.2%) and grade high of malignancy ($n=40$; 72.7%). Regarding immunostaining of Bcl-2, there was a statistically significant difference between the cases of TSCC in young and elderly ($p=0.046$). Although without statistically significant association, immunoexpression of Bcl-2 was higher in patients with clinical stage I / II, classified as well differentiated and grade high malignancy. **Conclusions:** Based on greater immunoexpression of Bcl-2 in elderly individuals, we suggest that more aggressive biological behavior in this age group may be related to increased survival of neoplastic cells.

Key-words: squamous cell carcinoma, imunohistochemical, young individuals.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BAX – referente ao inglês *Bcl-2 associated protein X*, traduzido como Bcl-2 associado à proteína X

BCL-2 – referente ao inglês *B cell Lymphoma protein 2*, traduzido como proteína de linfoma de células B-2

CCE – Carcinoma de Células Escamosas

CCEO – Carcinoma de Células Escamosas Oral

CCEL – Carcinoma de Células Escamosas de Língua

FAP – Fundação Assistencial da Paraíba

HE – Hematoxilina e Eosina

HIV – referente ao inglês *Human Immunodeficiency Virus*, traduzido como Vírus da Imunodeficiência Humana

HSV – referente ao inglês *herpes simplex virus*, traduzido como vírus herpes simples

HNL – Hospital Napoleão Laureano

HPV – referente ao inglês *Human Papiloma Virus*, traduzido como Papilomavírus Humano

INCA – Instituto Nacional do Câncer

OMS – Organização Mundial de Saúde

PB – Paraíba

PCR – referente ao inglês *Polymerase Chain Reaction*, traduzido como Reação em cadeia da polimerase

PH - Potencial Hidrogeniônico

SGHM – Sistema de Gradação Histopatológica de Malignidade

SPSS – *Statistical Package for Social Sciences*

TNM – Sistema de Estadiamento Clínico

T – Tamanho/extensão do tumor

N – Metástase linfonodal regional

M – Metástase à distância

UEPB – Universidade Estadual da Paraíba

UICC - Union for International Cancer Control

LISTA DE QUADROS, TABELAS E FIGURAS

QUADRO 1.	Sistema de Gradação Histológica de Malignidade no <i>front</i> de invasão, proposto por Bryne et al., (1992).....	28
QUADRO 2.	Sistema de gradação histopatológica de malignidade proposto pela OMS (CARDESA et al., 2005).....	29
QUADRO 3.	Especificidade, clone, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação do anticorpo primário utilizado no estudo.....	31
TABELA 1.	Distribuições das frequências absotutas e relativas encontradas quanto ao Sexo, Idade, Estadiamento clínico e SGHM. (Campina Grande, Paraíba, Brasil, 2016).....	40
TABELA 2.	Associação absoluta e relativa entre os parâmetros clínico-morfológicos nos casos de CCEL em paciente jovens e idosos (Campina Grande, Paraíba, Brasil, 2016).	41
TABELA 3.	Comparação da imunexpressão do Bcl-2 em CCEL em jovens e idosos, estadiamento clínico e os SGHM (OMS, 2005 e Bryne et al., 1992) (Campina Grande, Paraíba, Brasil, 2016).....	42
FUGURA 1.	Fotomicrografia representando análise morfológica dos casos de CCEL. A) Fotomicrografia de CCEL Bem Diferenciado em paciente jovem (HE,400X); B) Fotomicrografia de CCEL Pobremente Diferenciado em paciente idoso (HE, 400X); C) Fotomicrografia de CCEL de Baixo Grau de Malignidade em paciente jovem (HE, 40X); D) Fotomicrografia de CCEL de Alto Grau de Malignidade em paciente idoso (HE, 400X).....	43
FIGURA 2.	Imunomarcção para anticorpo Bcl-2. A) Fotomicrografia exibindo intensa imunomarcção citoplasmática do Bcl-2 em ninho de células neoplásicas em paciente idoso (400x); B) Fotomicrografia exibindo escassa imunomarcção citoplasmática do Bcl-2 em ninho de células neoplásicas em paciente jovem (400x).....	44

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O Carcinoma de Células Escamosas Oral (CCEO) é considerado um dos seis tipos mais frequentes de câncer em seres humanos com uma incidência anual de 300.000 casos em todo mundo (WANG et al. 2013). Este tipo de câncer corresponde a 90% das neoplasias que ocorrem no trato aerodigestivo superior (cavidade oral, orofaringe, hipofaringe, laringe e esôfago) (MONSJOU et al. 2013). Esta neoplasia representa uma condição maligna dos tecidos que revestem a cavidade oral e pode surgir em regiões anatômicas como lábio, língua, mucosa jugal, palato, gengiva, assoalho bucal e região retromolar, com capacidade de difusão local, regional e a distância (RETHMAN et al. 2010). Achados na literatura mostram que a língua, a gengiva e o assoalho são os locais mais envolvidos pelo CCE, sendo os localizados na língua e assoalho bucal considerados de pior prognóstico quando comparados às outras localizações (CONCEIÇÃO et al. 2010; SANTOS et al. 2016).

A maioria dos relatos confirma a ocorrência mais frequente em indivíduos do sexo masculino, entre a quinta e a sétima décadas de vida. No entanto, existe uma incidência crescente, especialmente entre indivíduos com menos de 45 anos de idade, sugerindo alguns fatores comportamentais e ambientais não tradicionais a sua epidemiologia (KNOPT et al. 2015). Sugere-se que o desenvolvimento do CCEO em pacientes jovens seja caracterizado por um comportamento biológico mais agressivo o que pode traduzir em um comportamento clínico diferente quando comparado a pacientes mais velhos (MONSJOU et al. 2013).

Na literatura, não há consenso sobre o prognóstico do CCEO em jovens, embora haja uma afirmação geral de que os pacientes mais jovens têm uma doença mais agressiva com maior taxa de recorrência local ou regional com comprometimento de linfonodos após o tratamento em comparação com pacientes mais velhos (UDEABOR et al. 2012; KNOPT et al. 2015). Para indicar o tratamento mais adequado e o possível prognóstico para os casos de CCEO, deve-se avaliar os parâmetros clínicos, como faixa etária, sexo, raça, localização anatômica e TNM; bem como os aspectos morfológicos, baseados nos Sistemas de Gradação Histológica de Malignidade(SGHM). Entre os parâmetros analisados, o TNM é o Sistema de stadiamento clínico mais utilizado para determinar o comportamento individual de cada tumor, avaliando o seu tamanho e a sua disseminação metastática no momento do diagnóstico (SOBIN, 2009).

Para suplementar o sistema clínico, os SGHM surgiram com o intuito de fornecer conhecimentos adicionais que pudessem explicar o comportamento biológico discrepante de

tumores com características clínicas semelhantes (LOURENÇO et al. 2007). Entre eles, os mais utilizados são os SGHM propostos por Bryne et al. (1992) e OMS (CARDESA et al. 2005). No sistema proposto por Bryne et al. (1992), a região de *front* de invasão tumoral é considerada a área mais significativa para classificação do tumor, caracterizando-o como de baixo ou de alto grau de malignidade. Já a classificação histopatológica de malignidade proposta pela OMS, considera a arquitetura morfológica tecidual e diferenciação celular como parâmetros característicos que demonstram o grau de diferenciação do tumor em relação ao tecido normal (CARDESA et al. 2005).

Embora variáveis clínicas e morfológicas sejam utilizadas como indicadores do comportamento biológico e prognóstico do CCEO em pacientes jovens, estudos destinados a identificar outros indicadores do comportamento biológico desse tumor são conduzidos, tal como a imunistoquímica, através do estudo das vias de proliferação celular e apoptose (ALVES et al. 2011).

Entre os mecanismos moleculares envolvidos na carcinogênese, defeitos na regulação da morte celular programada podem contribuir para a patogênese e progressão do câncer (NOGUTI, 2015). Existem duas vias clássicas para a apoptose: extrínseca e intrínseca. A via intrínseca ou mitocondrial é ativada em resposta a alterações intracelulares. A via extrínseca é acionada pelo acoplamento de ligantes aos receptores de morte, que se localizam na membrana celular. Ambas as vias convergem para ativar um ou mais membros pró-apoptóticos (ex. Bax) que inibem a ação das proteínas anti-apoptóticas (Bcl-2), ativando as caspases e resultando na morte celular (ADAMS, 2003; CASTANIER, ARNOUIT, 2010). Alguns estudos avaliando a expressão do Bcl-2 em CCEO têm sido realizados. No entanto, pesquisas a respeito da imunexpressão do Bcl-2 em casos de CCEO em paciente jovens ainda são escassas, ressaltando, assim, a importância da realização desta pesquisa.

REVISÃO DE LITERATURA

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Epidemiologia

O Câncer é considerado um problema mundial de saúde pública atingindo países desenvolvidos e em desenvolvimento, representando mais de 10 milhões de novos casos e mais de 6 milhões de mortes a cada ano em todo o mundo (MARTINS FILHO et al. 2014).

A incidência de câncer mundial cresceu 20% na última década. Segundo o Instituto Nacional do Câncer - INCA (2015), a estimativa para o biênio de 2016/2017, registrará aproximadamente 596 mil casos de câncer no Brasil, que distribuídos de acordo com o sexo, são esperados 295.200 casos registrados em homens e 300.800 em mulheres no país. Para Região Nordeste estima-se 52.680 casos de câncer em homens e 54.500 acometendo as mulheres.

Para o Brasil, o número de novos casos de câncer na cavidade oral é estimado em 11.140 casos em homens e de 4.350 em mulheres. Sem considerar os tumores de pele não melanoma, o câncer bucal em homens é o quarto mais frequente na região Sudeste, ocupa a quinta posição nas regiões Nordeste e Centro-Oeste, e nas regiões Sul e Norte, ocupando a sexta e a sétima posição, respectivamente. Para as mulheres, o mesmo corresponde ao nono mais frequente na região Nordeste, ocupando a décima posição na região Sudeste, a décima-segunda nas regiões Norte e Centro-Oeste, e na região Sul ocupa a décima-quinta posição (INCA, 2015).

2.2 Característica Clínicas

Considerado um dos seis tipos mais comuns de câncer em seres humanos, o Carcinoma de Células Escamosas (CCE), também denominado de Carcinoma Epidermóide, Carcinoma Escamocelular ou Carcinoma Espinocelular, é uma neoplasia maligna que se origina no epitélio de revestimento e é considerada a mais frequente na região de cabeça e pescoço, correspondendo a 90% das neoplasias que acometem o trato aerodigestivo superior (cavidade oral, orofaringe, hipofaringe, laringe e esôfago) (MONSJOU et al. 2013; VASCONCELOS et al. 2014; RIVERA et al. 2014). Segundo o INCA (2015), na cavidade oral a língua é um dos locais mais acometidos pelas neoplasias malignas e o diagnóstico destas patologias ocorre muitas vezes em fase tardia, podendo, em alguns casos, estar relacionado à falha do exame prévio completo das estruturas bucais.

A maioria dos relatos confirma a ocorrência mais frequente em indivíduos do sexo masculino, de cor branca e na faixa etária entre a quinta e a sétima décadas de vida. No entanto,

estudos epidemiológicos demonstram aumento da incidência do CCEO em pacientes jovens, abaixo de 45 anos de idade, em todo o mundo (MONSJOU et al. 2013; SANTOS et al. 2015). Apesar de haver uma maior predileção pelo sexo masculino, independente da idade, esse padrão pode ser diferente em pacientes jovens, onde pode ser observada maior prevalência no sexo feminino. A maior incidência em mulheres jovens pode estar associada a fatores etiológicos como susceptibilidade genética, infecção viral, modulações hormonais e imunológicas, entre outras doenças sistêmicas (SOUDRY et al. 2010; FALAKI et al. 2011).

O Câncer oral é caracterizado como uma doença crônica, multifatorial, resultante da interação entre diversos fatores de risco, tais como: tabaco, álcool, radiação solar, dieta, infecções da cavidade oral e deficiência imunológica (OLIVEIRA et al. 2013). Há evidências que o uso do tabaco isoladamente ou concomitante ao consumo de álcool aumentam o risco de desenvolvimento desta neoplasia, devido ao efeito acumulativo dessas substâncias serem prejudiciais ao organismo, estando relacionados a mais de 80% dos casos (RIBEIRO et al. 2009; MONSJOU et al. 2013; SANTOS et al. 2015). No entanto, cerca de 20% dos casos ocorrem em pacientes sem a presença desses fatores de riscos tradicionais, sendo assim tem-se observado relatos de CCEO em indivíduos não fumantes e não alcoolistas, podendo estar associado a outros fatores etiológicos que acometem a população mais jovem (VARGAS-FERREIRA et al. 2012; JONES, 2014). O CCE da cavidade oral e orofaringe em jovens tem sido associado à história familiar de exposição ao papiloma vírus humano (HPV), o vírus herpes simplex (HSV), ao vírus da imunodeficiência humana (HIV) e algumas outras doenças infecciosas virais, apesar do seu papel ainda não ser bem estabelecido (DE PAULA et al., 2009; UDEABOR et al., 2012).

Apesar da cavidade oral possibilitar visualização direta de alterações suspeitas, o diagnóstico de lesões intraorais ainda é realizado tardiamente. No que se refere ao câncer oral, o tempo decorrido entre a percepção dos sintomas, diagnóstico e o tratamento correto interfere não só no prognóstico, como também na qualidade de vida dos pacientes (SCOTT, MCGURK, GRUNFELD, 2008). O diagnóstico precoce realizado pelo cirurgião-dentista contribui para um melhor pronóstico, e conseqüentemente prolonga o índice de sobrevida dos pacientes. O tratamento desta enfermidade inclui cirurgia, radioterapia e quimioterapia, isoladas ou associadas, a depender do estágio ou risco em que o paciente portador do CCE encontra-se (BEENA et al. 2011). Os tipos de tratamentos instituídos são semelhantes para pacientes jovens e idosos, no entanto, há relatos que os jovens tendem a receber tratamentos combinados independentemente da fase da doença (MORRIS et al. 2010). Embora na literatura, a ocorrência do CCEO em pacientes jovem tenha aumentado nos últimos anos, sendo relevantes por apresentar doença mais agressiva,

com comprometimento linfonodal no momento do diagnóstico e taxa de recorrência local ou regional considerável após a terapia, ainda existem controvérsias sobre o prognóstico destes pacientes (UDEABOR et al. 2012; KNOPF et al. 2015).

Analisando parâmetros clínicos (idade, sexo, raça, hábitos nocivos, localização e TNM) e morfológicos (SGHM) dos casos de CCEO, pode-se desta forma instituir o tratamento mais adequado e sugerir o possível prognóstico para tumor. A agressividade desses tumores está relacionada a diferentes fatores que incluem o tamanho da lesão, o grau histológico de malignidade, o nível de envolvimento dos tecidos circunvizinhos, presença de metástase no momento do diagnóstico e localização anatômica (SILVEIRA et al. 2007). Logo, a padronização de dados que possibilitem a classificação dos tumores de uma determinada localização anatômica, como a cavidade oral, e norteiem a conduta terapêutica para as diferentes apresentações do câncer em geral, é de grande valia para a seleção e avaliação do tratamento, bem como para a determinação do prognóstico dos tumores.

Para complementar a caracterização clínica do tumor, a União Internacional Contra o Câncer (UICC) desenvolveu o sistema de estadiamento denominado de sistema TNM de classificação dos tumores malignos, sendo o mais utilizado para o CCEO com o intuito de prever o prognóstico e propor uma terapia mais adequada para esses casos. Este descreve a gravidade do câncer com base no tamanho ou extensão do tumor original (primário) e caracteriza se o tumor se espalhou ou não pelo corpo. Sendo assim, o TNM é o sistema responsável pelo estadiamento clínico do câncer classificando-o de acordo com três parâmetros: tamanho do tumor (T), presença de metástases em linfonodos regionais (N), presença ou ausência de metástases à distância (M) (LINDENBLATT et al. 2012). Após quantificação desses parâmetros prognósticos, os tumores são classificados em estágios que variam de I a IV, logo os classificados em estágio I e II correspondem aos casos de melhor prognóstico quando comparados aos em estágios III e IV (VASCONCELOS et al. 2014).

Rahmani et al. (2012) observaram que a maioria dos pacientes de sua amostra (n = 52, 86,6%), com média de idade de 58 anos, foram diagnosticados em estágios avançados (III / IV), com apenas oito pacientes em estágios iniciais (I / II). Benevenuto et al. (2012) observaram que houve uma correlação estatisticamente significativa do TNM em pacientes jovens quando comparado a pacientes idosos, onde 67% dos CCEO em jovens foram diagnosticados nos estágios III e IV. Essa maior proporção de casos em estágios mais avançados em jovens pode estar relacionada a um diagnóstico tardio, tal como o que ocorre em pacientes mais velhos ou pode estar associado a um comportamento biológico mais agressivo relacionado à idade (SOUDRY et al.

2010). No entanto, alguns estudos não observaram diferenças no estadiamento clínico entre pacientes jovens e àqueles acima de 45 anos de idade (UDEABOR et al. 2012).

2.3 Sistema de Gradação Histológica de Malignidade (SGHM)

Para suplementar o sistema clínico, os SGHM surgiram com o intuito de fornecer conhecimentos adicionais que pudessem explicar o comportamento biológico discrepante de tumores com características clínicas semelhantes (LOURENÇO et al. 2007). Atualmente para a caracterização dos tumores, os SGHM propostos pela OMS (CARDESA et al. 2005) e por Bryne et al. (1992) são bastante utilizados.

A classificação histopatológica de malignidade proposta pela OMS baseia-se o grau de diferenciação celular e permite o agrupamento dessa neoplasia maligna em três categorias: Bem diferenciados, Moderadamente e Pobrememente diferenciados (CARDESA et al. 2005). Tumores classificados como bem diferenciados são denominados quando sua arquitetura tecidual apresenta-se semelhante a um padrão normal de epitélio escamoso. Aqueles que se mostram pouco diferenciados, caracterizaram-se pelo predomínio de células imaturas, numerosas mitoses típicas e atípicas, bem como mínima ceratinização, são classificados como pobremente diferenciados. Os CCEO classificados como moderadamente diferenciados apresentaram um padrão intermediário entre as demais classificações, correspondendo a certo grau de pleomorfismo nuclear, atividade mitótica e pouca ceratinização (LOURENÇO et al. 2007). Na avaliação histopatológica, a maioria dos estudos relata que os CCEL apresentam-se bem ou moderadamente diferenciado tanto em jovens como em pacientes mais velhos (ALSHARIF et al. 2009; MORRIS et al. 2010; VERED et al. 2010). Kaminagakura et al. (2011) relataram que os tumores em indivíduos jovens tendem a ser mais anaplásicos e infiltrativos, caracterizando tumor pobremente diferenciado. No entanto, em outro estudo, (KAMINAGAKURA et al. 2016) avaliaram 41 pacientes (≤ 40 anos de idade) com CCEO e a maioria dos casos foram classificados com bem diferenciados (63,4%).

O Sistema proposto por Bryne et al. (1992) estabelece sua classificação de acordo com a região mais invasiva do tumor, denominada de *front* de invasão tumoral. Neste sistema sugeriu-se que as células presentes na área do *front*, exibiam diferentes características moleculares quando comparadas com as áreas superficiais do tumor, que deve ser considerada a mais importante para determinação do prognóstico. A classificação proposta por Bryne et al. (1992) é determinada por quatro parâmetros: grau de ceratinização, pleomorfismo nuclear, padrão de invasão e infiltrado inflamatório linfoplasmocitário. Os escores obtidos em cada um dos parâmetros devem ser somados, obtendo-se, dessa forma, o escore final de malignidade do caso. As lesões que

apresentam escores finais entre 4 e 8, são classificadas como de baixo grau de malignidade. Por sua vez, os tumores com escore final igual ou superior a 9, são classificados como de alto grau de malignidade (SILVEIRA et al. 2007).

Alguns estudos sugerem que a gradação histopatológica detalhada da peça cirúrgica aliada ao sistema TNM sejam os melhores critérios para o manejo pós-operatório e também para predição do prognóstico de pacientes com CCEO (WOOLGAR, 2006; WOOLGAR; TRIANTAFYLLOU, 2009; DISSANAYAKA et al. 2012). No entanto, estudos destinados a identificar outros indicadores do comportamento biológico desse tumor são conduzidos, tal como a imunohistoquímica, através do estudo de proliferação celular e apoptose (ALVES et al. 2011).

2.4 Apoptose

A apoptose corresponde ao processo biológico de morte celular programada que contribui para a eliminação de células desnecessárias e indesejáveis para manter o equilíbrio entre a sobrevivência e morte celular (KIM et al. 2013). Esta é mediada pela ativação de caspases e conduzida por duas vias principais, a via extrínseca que envolve receptores de morte e a via intrínseca envolvendo as mitocôndrias. Ambas as vias convergem para ativar um ou mais membros pró-apoptóticos (ex. Bax) que inibem a ação das proteínas anti-apoptóticas (bcl-2), ativando as caspases e resultando na morte celular (WILLYE, 1991; ADAMS, 2003; CASTANIER, ARNOUIT, 2010). As interações específicas entre diferentes proteínas da família Bcl-2 demonstram se a via de morte celular intrínseca é ativada.

2.4.1 Bcl-2

Como um tipo clássico de oncogene, reconhecido como *gene linfoma de células B 2* (Bcl-2) foi encontrado desempenhando um papel regulador crucial numa variedade de apoptose de células malignas tumorais e metástases à distância, em vários tipos de câncer (YAO et al. 2015). O Bcl-2 e seus familiares constituem uma família dinâmica de moléculas pro-apoptóticas, incluindo o Bax, Bak, Bid, Bik, e anti-apoptóticas, incluindo Bcl-2, Bcl-xL, Mcl-1, A1, envolvidas no desenvolvimento do câncer, progressão e resistência ao tratamento (NARANJO GOMES et al. 2014).

O Bcl-2 atua como um marcador na transformação neoplásica, permitindo analisar a redução nos níveis de apoptose e a consequente progressão tumoral individual, com o intuito de predizer o possível prognóstico do tumor (GAREWAL, GAREWAL, SIRCAR, 2014). Sendo assim, diversos estudos a respeito da expressão desta proteína vêm sendo realizados em CCEO.

De Vicente et al. (2006) avaliaram uma série de casos do CCEL em que houve associação estatisticamente significativa entre a imunexpressão do Bcl-2 e o estadiamento clínico e sobrevivência dos pacientes. Camisasca et al. (2009) analisaram os níveis de expressão de três proteínas envolvidas na apoptose (Bcl-2, Bcl-X e Bax) e a sua relação com características clínico-patológicas e sobrevivência em casos de CCEO. Dos 53 casos da amostra a imunexpressão para Bcl-2 foi detectada em 47 casos (86,8%), embora, não houve correlação com a idade, sexo, TNM ou classificação histopatológica, esta imunexpressão foi significativamente correlacionada com melhor índice de sobrevivência. Sugeriu-se nesse estudo que a expressão do Bcl-2 é um importante marcador de prognóstico do CCEO.

Rahmani et al. (2012) observaram que a superexpressão do Bcl-2 foi correlacionada à pobre diferenciação tumoral, ao comprometimento dos linfonodos e aos estágios clínicos mais avançados do tumor, sugerindo assim que a via supressão apoptótica é um evento molecular importante na patogênese e carcinogênese do CCEO.

Knopf et al. (2015) em uma amostra de 276 pacientes (66 com idade ≤ 45 anos e 210 com idades > 45 anos) com CCEL, realizaram uma avaliação detalhada do perfil oncogene e supressor do tumor comparando as principais características morfológicas do tumor em pacientes (jovens e idosos). Utilizando-se do método da Reação em Cadeia da Polimerase (PCR), demonstraram maior expressão do Bcl-2 em CCEL em pacientes idosos, sugerindo comportamento tumoral mais agressivo, uma vez que os níveis de morte celular neoplásica são reduzidos durante a progressão tumoral.

Portanto, diante do que foi discutido, pode se observar uma escassez de estudos em relação à imunexpressão do Bcl-2 em casos de CCEL especificamente em indivíduos jovens.

OBJETIVOS

3 OBJETIVOS

3.1 Objetivos Gerais

Avaliar, por meio da imunohistoquímica, a presença da proteína Bcl-2 em uma série de casos de CCEL em pacientes jovens e idosos, relacionando a imunomarcação com parâmetros clínicos e com os SGHM dos tumores.

3.2 Objetivos Específicos

- Estabelecer associações entre os casos de CCEL em pacientes jovens e idosos de acordo com parâmetros clínicos (sexo, TNM e estadiamento clínico) e morfológicos (SGHM).
- Avaliar a imunexpressão do Bcl-2 em CCEL de pacientes jovens e idosos;
- Comparação da imunexpressão do Bcl-2 com parâmetros clínicos (sexo e estadiamento clínico) e com os SGHM (BRYNE et al. 1992; CARDESA et al. 2005).

METODOLOGIA

4 METODOLOGIA

4.1 Considerações éticas

O projeto foi submetido à apreciação do Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), seguindo os preceitos estabelecidos pela Resolução 466/12 da OMS e registrado na Base de Registros de Pesquisas envolvendo Seres Humanos (Plataforma Brasil). Seu protocolo foi aprovado conforme parecer de nº 634.714 (ANEXO A).

4.2 Caracterização do estudo

O estudo desenvolvido consistiu em uma pesquisa retrospectiva, com corte transversal, caracterizada pela observação, registro e análise quantitativa do Bcl-2, por meio de imunohistoquímica, em uma série de casos de CCEL em pacientes jovens e idosos.

4.3 População e amostra

A população objeto do presente estudo foi constituída por todos os casos de CCEO, diagnosticados e arquivados, nos últimos 16 anos (1999 a 2015), no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Napoleão Laureano/ João Pessoa – PB e do Hospital da FAP/ Campina Grande – PB, que são os dois hospitais de referência em Oncologia no estado da Paraíba. A amostra foi constituída por 55 casos de CCEL, sendo 25 casos em pacientes jovens (idade inferior ou igual a 45 anos) e 30 casos em idosos (idade superior ou igual a 60 anos).

4.3.1 Critérios de inclusão e exclusão

Foram incluídos na amostra, apenas os casos de CCEL tratados por excisão cirúrgica, e que no bloco parafinado continham material suficiente que possibilitasse a avaliação do *front* de invasão tumoral e cujas fichas clínicas dos pacientes possuíam informações relativas ao sexo, à faixa etária e ao estadiamento clínico (TNM) das lesões.

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

4.4 Estudo clínico

Informações a respeito do sexo, faixa etária, presença de metástase linfonodal regional e estadiamento clínico (TNM) foram coletadas nos prontuários médicos dos pacientes tratados no Hospital Napoleão Laureano/ João Pessoa – PB e no Hospital da FAP/ Campina Grande/PB. Para

o estadiamento clínico foram utilizados os parâmetros elencados pela União Internacional Contra o Câncer (UICC). Todos os dados clínicos foram anotados e registrados em fichas clínicas previamente elaboradas pelos pesquisadores (APÊNDICE A).

4.5 Estudo morfológico

A amostra selecionada, fixada em formol a 10% e incluída em parafina, foi submetida a cortes com 5µm de espessura, os quais, por sua vez, foram estendidos em lâminas de vidro e submetidos à coloração de rotina da hematoxilina e eosina. Sob microscopia de luz (Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE), dois examinadores previamente treinados realizaram a análise da gradação histológica de malignidade, de acordo com o sistema proposto por Bryne et al., (1992) (Quadro 1) e com o sistema proposto pela OMS (CARDESA et al. 2005) (Quadro 2).

Quadro 1. Sistema de gradação histológica de malignidade no *front* de invasão, proposto por Bryne et al. (1992).

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

Os escores obtidos em cada um dos parâmetros foram somados, obtendo-se, dessa forma, o escore final de malignidade do caso, conforme Bryne et al. (1992). As lesões que apresentaram escores finais entre 4 e 8, foram classificadas como de baixo grau de malignidade. Por sua vez, os tumores com escore final igual ou superior a 9, foram classificados como de alto grau de malignidade (SILVEIRA et al. 2007).

Quadro 2. Sistema de gradação histopatológica de malignidade proposto pela OMS (CARDESA et al., 2005).

CLASSIFICAÇÃO	CARACTERÍSTICAS
---------------	-----------------

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

No sistema de gradação histológica de malignidade proposto pela OMS (CARDESA et al. 2005) foi analisada toda a extensão do tumor e o grau de diferenciação celular, classificando os tumores em 3 tipos: bem diferenciados, moderadamente e pobrememente diferenciados, conforme mostra o quadro 2 acima.

Destaca-se que, para os dois sistemas de gradação histológica de malignidade as análises foram realizadas sem que os examinadores tivessem conhecimento dos dados clínicos relacionados ao caso. Os casos cujas gradações histológicas de malignidade, determinadas pelos examinadores, foram discordantes, foram resolvidos por consenso.

4.6 Estudo imunoistoquímico

4.6.1 Método imunoistoquímico

A amostra selecionada, fixada em formol a 10% e incluída em parafina, foi submetida a cortes com 3µm de espessura, os quais foram estendidos em lâminas de vidro devidamente limpas e desengorduradas e preparadas com adesivo à base de 3-aminopropyltriethoxy-silano (Sigma Aldrich CO, St Louis, MO, USA). Posteriormente, o material foi submetido ao método da imunoperoxidase pela técnica baseada em polímeros de dextrano (Polymer/HRP, ADVANCE, DAKO Carpinteria, CA, USA) utilizando o anticorpo monoclonal primário anti-Bcl-2 (QUADRO 3).

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

- Desparafinização: 2 banhos em xilol, à temperatura ambiente (10 minutos cada);
- Re-hidratação em cadeia descendente de etanóis:
 - Álcool etílico absoluto I (5 minutos);

- Álcool etílico absoluto II (5 minutos);
- Álcool etílico absoluto III (5 minutos);
- Álcool etílico 95°GL (5 minutos);
- Álcool etílico 80°GL (5 minutos);
- Remoção de pigmentos formólicos com hidróxido de amônia a 10% em etanol 95°, à temperatura ambiente (10 minutos);
- Lavagem em água corrente (10 minutos);
- Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- Recuperação antigênica (QUADRO 3);
- Lavagem em água corrente (10 minutos);
- Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- Duas incubações dos cortes em solução de peróxido de hidrogênio 3% 10 volumes, em proporção de 1/1, para o bloqueio da peroxidase endógena tecidual (10 minutos cada);
- Lavagem em água corrente (10 minutos);
- Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- Incubação dos cortes com o anticorpo primário, em solução diluente (*Antibody diluent with background reducing components*, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA), à temperatura ambiente;
- Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4, à temperatura ambiente (5 minutos cada);
- Incubação com complexo de polímeros de dextrano (Polymer/HRP, ADVANCE, DAKO Carpinteria, CA, USA), à temperatura ambiente (30 minutos);
- Duas passagens em solução de Tween 20 a 1% em TRIS-HCl pH 7,4, à temperatura ambiente (5 minutos cada);
- Revelação da reação com solução cromógena de 3,3-diaminobenzidina (Liquid DAB+ Substrate, Dako North America Inc., Carpinteria, CA, USA) (1 minuto);
- Lavagem em água corrente (10 minutos);
- Passagens rápidas em água destilada (2 trocas);
- Contracoloração com hematoxilina de Mayer, à temperatura ambiente (5 minutos);
- Lavagem em água corrente (10 minutos);
- Desidratação em cadeia ascendente de etanóis:
 - Álcool etílico absoluto I (5 minutos);
 - Álcool etílico absoluto II (5 minutos);

- Álcool etílico absoluto III (5 minutos);
- Três passagens em xilol (2 minutos cada);
- Montagem em resina Permount® (Fisher Scientific Inc., Fair Lawn, NJ, USA).

Quadro 3. Especificidade, clone, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação do anticorpo primário utilizado no estudo.

Especificidade	Clone	Fabricante	Diluição	Recuperação Antigênica	Incubação
Bcl-2	124	Dako	1:150	TRIS-EDTA, pH 9,0 Steamer, 96°C, 30 min	60 min

4.6.2 Análise Imunoistoquímica

A análise da imunomarcção do anti-Bcl-2 foi realizada por dois patologistas, de forma quantitativa, adaptando-se a metodologia utilizada no estudo de Brant et al., (2012). Foram consideradas positivas as células com citoplasma acastanhado, independentemente da intensidade de coloração. Primeiramente, no *front* de invasão tumoral, sob aumento de 100×, foram selecionadas 10 áreas de maior imunorreatividade ao anticorpo estudado. Sob aumento de 400×, cada uma destas áreas foi fotomicrografada (ICC 50HD, Leica Microsystems Vertrieb GmbH) e as imagens obtidas foram transferidas para um computador. Com o auxílio do programa *ImageJ*® (*Imaging Processing and Analysis in Java*, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA), em cada um dos campos fotomicrografados, foi realizada a contagem das células positivas e negativas, e em seguida dividida quantidade de células imunopositivas por 1000 e em seguida multiplicado este valor por 100, estabelecendo assim o índice de positividade para cada caso.

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

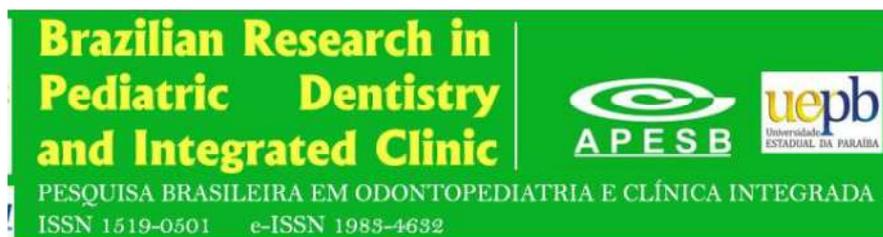
4.7 Análise estatística

Os resultados obtidos foram digitados em planilha eletrônica Excel (Microsoft Office 2007®) e, posteriormente, exportados para o programa *Statistical Package for the Social Sciences* (Versão 17.0; SPSS Inc., Chicago, IL, USA). Os resultados foram apresentados como mediana conforme a distribuição não-normal, verificado pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov*.

O teste Qui-quadrado foi utilizado para verificar possíveis associações entre os grupos estudados (jovens e idosos) e os parâmetros clinico-morfológico.

Os testes *Mann-Whitney* foram aplicados para verificar possíveis diferenças estatísticas entre os índices de positividade dos grupos estudados (jovens e idosos) em relação ao anticorpo estudado e aos parâmetros clínico-morfológicos, tais como: à metástase linfonodal ou à distância, estadiamento clínico categorizado (I/II e III/IV) e SGHM. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

ARTIGO



Análise da imunexpressão do bcl-2 com parâmetros clínico-morfológicos no carcinoma de células escamosas de língua em pacientes jovens e idosos

Analysis of immunexpression of Bcl-2 with clinical and morphological parameters in squamous cell carcinoma of tongue in younger and older individuals

TRAJANO, Paulyanna Farias¹; BRITO, Jéssica Souza¹; ANDRADE, Jamesson Macedo²; CAVALCANTI, Yuri Wanderley³; NONAKA, Cassiano Francisco Weege³; ALVES, Pollianna Muniz³

1. Aluno de iniciação científica curso de Odontologia, Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campus I, Campina Grande, Paraíba, Brasil.
2. Mestrando do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campus I, Campina Grande, Paraíba, Brasil.
3. Professor do Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), Campus I, Campina Grande, Paraíba, Brasil.

Autor correspondente:

Pollianna Muniz Alves

Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Universidade Estadual da Paraíba, Campus I
Rua das Baraúnas, 351 – Bairro Universitário, Campina Grande, Paraíba, Brasil

CEP: 58429-500

Tel: (83) 33153471

Email: pmunizalves@gmail.com

RESUMO

Objetivos: Avaliar a imunexpressão do Bcl-2 em casos de Carcinoma de Células Escamosas de língua (CCEL) em pacientes jovens e idosos, correlacionando-a com os parâmetros clínico-morfológicos. **Materiais e métodos:** A amostra foi constituída de 55 casos de CCEL diagnosticados nos dois hospitais de referência em oncologia da Paraíba, entre os anos de 1999 e 2015, sendo dividida em grupos: jovens (≤ 45 anos de idade) e idosos (≥ 60 anos de idade). Os parâmetros clínicos (sexo, idade e TNM) foram obtidos dos prontuários médicos. Na análise morfológica foram utilizados dois Sistemas de Gradação Histopatológico de Malignidade (SGHM), propostos por Bryne et al (1992) e OMS (2005). Através da imunoistoquímica, avaliou-se quantitativamente a imunexpressão do Bcl-2 nas células neoplásicas. Para análise estatística foi utilizado os testes Qui-quadrado e Mann-Whitney, com valor de $p < 0,05$. **Resultados:** Em relação aos parâmetros clínicos, observou-se que 65,4% dos casos ($n=36$) acometeu homens e 54,5% ($n=30$) com idade > 60 anos. Quanto ao estadiamento clínico e aos SGHM, 58,1% ($n=32$) apresentava-se em estágios iniciais (I/II), classificados como Moderado/ pobremente diferenciados ($n=37$; 67,2%) e com Alto grau de malignidade ($n=40$; 72,7%). Quanto imunomarcção do Bcl-2 houve diferença estatisticamente significativa entre os casos de CCEL em jovens e idosos ($p=0,046$). A imunexpressão do Bcl-2 foi maior nos casos com estágio clínico I/II, classificados como bem diferenciados e de alto grau de malignidade. **Conclusões:** Pode-se inferir que a maior imunexpressão do Bcl-2 nos idosos, sugeriu comportamento biológico mais agressivo nesta faixa etária, podendo estar relacionado a uma maior sobrevivência das células neoplásicas.

Palavras-chave: Carcinoma de células escamosas, imunoistoquímica, indivíduos jovens.

ABSTRACT

Background: Oral squamous cell carcinoma (OSCC) corresponds to 95% of malignant neoplasms that affects the oral cavity, involving individuals between the fifth and sixth decade of life. However, the incidence of OSCC in younger patients has increased in recent years, demonstrated more aggressive biological behavior when compared in the elderly. **Objectives:** This study evaluated the immunoeexpression of Bcl-2 in cases of OSCC of tongue (TSCC) in younger and elderly patients, correlating with clinical and morphological parameters. **Materials and methods:** Sample was constituted for 55 cases of TSCC diagnosed in the two referral hospitals in oncology, between 1999 and 2015 years, being divided into two groups: young (≤ 45 years old) and elderly (≥ 60 years old). Clinical parameters (gender, age and TNM) were obtained from medical records. For morphological analysis were used two Gradation Systems Histopathological of Malignancy (GSHM), proposed by Bryne et al. (1992) and WHO (2005). Immunohistochemistry was performed to assess quantitatively the immunoeexpression of Bcl-2 in neoplastic cells. Statistical analysis was performed using the Mann-Whitney test, $p < 0.05$. **Results:** In relation to clinical parameters, it was observed that 65.4% of cases ($n=36$) was men and older than 60 years. Clinical staging and GSHM, 58.1% ($n=32$) presented an early stage (I/II), classified as Moderate/poorly differentiated ($n= 37$; 67.2%) and grade high of malignancy ($n=40$; 72.7%). Regarding immunostaining of Bcl-2, there was a statistically significant difference between the cases of TSCC in young and elderly ($p=0.046$). Although without statistically significant association, immunoeexpression of Bcl-2 was higher in patients with clinical stage I / II, classified as well differentiated and grade high malignancy. **Conclusions:** Based on greater immunoeexpression of Bcl-2 in elderly individuals, we suggests that more aggressive biological behavior in this age group may be related to increased survival of neoplastic cells.

Key-words: squamous cell carcinoma, imunohistochemical, young individuals.

1 INTRODUÇÃO

O Carcinoma de Células Escamos Oral (CCEO) representa 95% de todas as neoplasias malignas que acometem a cavidade oral. Usualmente esta neoplasia atinge preferencialmente indivíduos do sexo masculino, entre a quinta e sétima década de vida, no entanto observou-se um aumento da incidência do CCEO em indivíduos jovens, corresponde de 4% a 13% de todos os casos, o qual sugere um padrão diferenciado quanto à etiopatogênese, ao comportamento biológico e ao prognóstico quando comparado ao câncer em pacientes idosos (1). Achados na literatura tem demonstrado que a língua, seguida da gengiva, assoalho e mucosa jugal são os locais mais acometidos pelo CCE em pacientes jovens (2-4). Em alguns estudos a língua é o sitio mais acometido por este tipo de neoplasia independente da idade dos pacientes (5-7).

A etiologia do CCEO é multifatorial, resultante da interação entre diversos fatores de risco, tais como: tabaco, álcool, radiação solar, dieta, infecções da cavidade oral e deficiência

imunológica (8). Estudos relacionados têm demonstrado que os fatores de risco mais influentes correspondem ao consumo de tabaco isoladamente ou concomitante ao uso de álcool, sugerindo que quanto maior o consumo, pior a condição prognóstica para o câncer oral (9). No entanto, Sun et al (6) observaram em seu estudo que o grupo mais jovem tinha uma percentagem mais elevada de indivíduos não fumantes do que no grupo de indivíduos mais velhos. Outros estudos demonstraram que o CCEO em pacientes jovens pode estar associado a outros fatores de risco, tais com a exposição ao vírus do papiloma humano ou a outras infecções virais (10,11).

Sun et al (6) sugeriram que os pacientes jovens com CCEL tendiam a um pior prognóstico do que pacientes com o tumor em outros locais, e que o curso clínico e o prognóstico foram semelhantes entre os dois grupos estudados (jovens e idosos), porém os jovens são mais propensos a ter recorrência. Com isso, pode-se perceber que o comportamento biológico do CCEO em jovens ainda é controverso, sendo assim, novos estudos estão sendo realizados, utilizando-se da imunistoquímica, com o intuito de identificar outros indicadores do comportamento biológico que sugiram um melhor prognóstico para estes pacientes.

Entre os mecanismos moleculares envolvidos na carcinogênese, defeitos na regulação da morte celular programada podem contribuir para a patogênese e progressão tumoral. Membros da família Bcl-2 são proteínas reguladoras de apoptose, que se dividem em proteínas anti-apoptose (Bcl-2, Bcl-X) e proteínas pro-apoptóticas (por exemplo, Bax e Bak), e o equilíbrio entre elas determina o destino da célula (12). Na literatura, estudos comparando comportamento biológico tumoral em pacientes jovens e idosos ainda são escassos. Sendo assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar por meio da imunistoquímica, a imunexpressão do Bcl-2 em uma série de casos de CCEL em pacientes jovens e idosos, relacionando a imunomarcção com parâmetros clínico-morfológicos.

2 MATERIAIS E MÉTODOS

A pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Estadual da Paraíba (UEPB), conforme parecer de nº 634.714 (ANEXO A). O presente estudo consistiu em uma pesquisa retrospectiva, com coorte transversal, caracterizada pela observação, registro, análise de parâmetros clínicos e morfológicos e análise quantitativa do Bcl-2, por meio de imunistoquímica, em uma série de casos de CCEO em pacientes jovens e idosos.

A amostra foi constituída por 55 casos de CCEL, sendo 25 casos em pacientes jovens (idade inferior ou igual à 45 anos) e 30 casos em idosos (idade superior ou igual à 60 anos) diagnosticados em dois hospitais de referência em Oncologia da Paraíba, Hospital Napoleão Laureano/ João Pessoa – PB e Hospital da FAP/ Campina Grande – PB, nos últimos 16 anos (1999 a 2015) .

Foram incluídos na amostra, apenas os casos de CCEL tratados por excisão cirúrgica, e que no bloco parafinado continham material suficiente que possibilitasse a avaliação do *front* de invasão tumoral e cujas fichas clínicas dos pacientes possuíam informações relativas à faixa etária, sexo e estadiamento clínico (TNM) das lesões. Essas informações foram coletadas nos prontuários médicos de cada paciente. Foram excluídos da amostra, os casos em que o paciente recebeu tratamento prévio de radioterapia e/ou quimioterapia e os blocos parafinados que apresentavam quantidade insuficiente de material biológico para realização das análises morfológicas e imunoistoquímica.

a. Análise Morfológica

Os casos selecionados, fixados em formol a 10% e incluídos em parafina, submetidos a cortes com 5µm de espessura, estendidos em lâminas de vidro e submetidos à coloração de rotina da hematoxilina e eosina. Sob microscopia de luz (Leica DM 500, Leica Microsystems Vertrieb GmbH, Wetzlar, DE), dois examinadores previamente treinados realizaram a análise da gradação histológica de malignidade, de acordo com o sistema proposto por Bryne et al(13) no qual considera-se as características da região do front de invasão tumoral, determinando quatros parâmetros para a classificação: grau de ceratinização, pleomorfismo nuclear, padrão de invasão e infiltrado inflamatório linfoplasmocitário; cada parâmetro possui um escore, que varia de 1 a 4, a soma final destes escores determina o grau de malignidade do tumor. Sendo assim, lesões que apresentam escore final entre 4 e 8 são classificados como de baixo grau de malignidade, por vez, as que apresentam escore final igual ou superior a 9, são classificados como de alto grau de malignidade(14). Já de acordo com o sistema proposto pela OMS (15), o tumor é classificado como sendo bem diferenciado (arquitetura tecidual semelhante a um padrão normal de epitélio escamoso), moderadamente (padrão intermediário entre as demais classificações, correspondendo a certo grau de pleomorfismo nuclear, atividade mitótica e pouca ceratinização) e pobremente diferenciado (predomínio de células imaturas, numerosas mitoses típicas e atípicas, bem como mínima ceratinização, com características notavelmente distintas do epitélio normal).

b. Análise Imunoistoquímica

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

A análise da imunomarcção do anti-bcl-2 foi realizada por dois patologistas, de forma quantitativa, adaptando-se a metodologia utilizada no estudo de Brant et al (16). Foram consideradas com imunoexpressão as células que apresentaram citoplasma acastanhado, independentemente da intensidade de coloração. Primeiramente, ao longo do *front* de invasão tumoral, sob aumento de 100×, foram selecionadas 10 áreas de maior imunorreatividade ao anticorpo estudado. Sob aumento de 400X, cada uma destas áreas foi fotomicrografada (ICC 50HD, Leica Microsystems Vertrieb GmbH) e as imagens obtidas foram transferidas para um computador. Com o auxílio do programa *ImageJ*® (*Imaging Processing and Analysis in Java*, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA), em cada um dos campos fotomicrografados, foi realizada a contagem das células positivas e negativas, e em seguida dividida quantidade de células imunopositivas por 1000 e em seguida multiplicando este valor por 100, estabelecendo assim o índice de positividade (IP) para cada caso.

c. Análise estatística

Após a contagem das células imunomarcadas, os resultados obtidos foram digitados em planilha eletrônica Excel (Microsoft Office 2007®) e, posteriormente, exportados para o programa *SPSS* (Statistical Package for the Social Sciences), versão 17.0; Os resultados foram apresentados como mediana conforme a distribuição não normal, verificado pelos testes de *Kolmogorov-Smirnov*. O teste de Qui-quadrado foi utilizado para verificar possíveis associações entre os grupos estudados. Os testes *Mann-Whitney* foram utilizados para averiguar prováveis diferenças estatísticas entre os grupos estudados (jovens e idosos). Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos.

3 RESULTADOS

Dos casos avaliados, 76% (n=19) dos pacientes jovens e 56,7% (n=17) dos idosos, correspondem ao sexo masculino. Com relação ao estadiamento clínico, constatou-se que 40% (n=10) dos casos diagnosticados em pacientes jovens encontraram-se em estágio clínico IV, e 43,3% (n=13) dos casos em idoso estavam em estágio clínico II. Através do SGHM, pela OMS (15), observou-se maior frequência de CCEL com padrão de moderadamente diferenciado, independente da faixa etária dos pacientes, (n=14; 56 %) em jovens e (n=15; 50%) em idosos. Na análise do *front* de invasão tumoral, proposto por Bryne et al(13) 40 casos (72,7%) foram classificados como de alto grau de malignidade, correspondendo a 68% (n=17) dos casos de pacientes jovens e 76,7% (23) dos idosos (Tabela 1).

Tabela 1. Distribuições quanto ao Sexo, Estadiamento clínico e SGHM em casos de CCEL em pacientes jovens e idosos (Campina Grande, Paraíba, Brasil, 2016).

PARÂMETROS	JOVENS (≤45 ANOS)	IDOSOS (≥60 ANOS)
SEXO		
Masculino	19 (76%)	17 (56,7%)
Feminino	6 (24%)	13 (43,3%)
ESTADIAMENTO		
I	9 (36,0%)	7 (23,3%)
II	3 (12,0%)	13 (43,3%)
III	3 (12,0%)	6 (20,0%)
IV	10 (40,0%)	4 (13,3%)
OMS		
Bem	8 (32,0%)	10 (33,3%)
Moderadamente	14 (56,0%)	15 (50,0%)
Pobremente	3 (12,0%)	5 (16,7%)
BRYNE		
Baixo Grau	8 (32,0%)	7 (23,3%)
Alto Grau	17 (68,0%)	23 (76,7%)

Associando os parâmetros clínicos e morfológicos com os grupos estudados pode se observar que não houve associação estatisticamente significativa ($p>0,05$) quanto ao sexo, estadiamento clínico e os SGHM, onde tanto os casos de CCEL em jovens como em idosos foram mais frequentes em homens, diagnosticados em estágios iniciais (I/II) e classificados como moderadamente/pobremente diferenciado e de alto grau de malignidade (Tabela 2).

Tabela 2. Associação entre a idade e os parâmetros clínico-morfológicos nos casos de CCEL em paciente jovens e idosos (Campina Grande, Paraíba, Brasil, 2016).

GRUPOS			
PARÂMETROS	JOVENS (≤ 45 ANOS)	IDOSOS (≥ 60 ANOS)	<i>p</i>
SEXO			
Masculino	19 (76%)	17 (56,7%)	0,133
Feminino	6 (24%)	13 (43,3%)	
ESTADIAMENTO CLÍNICO			
I/II	12 (48%)	20 (66,7%)	0,162
III/IV	13 (52%)	10 (33,3%)	
OMS categorizado			
Bem diferenciado	8 (32%)	10 (33,3%)	0,916
Mod./Pob. Diferenciado	17 (68%)	20 (66,7%)	
BRYNE			
Baixo Grau	8 (32%)	7 (23,3)	0,472
Alto Grau	17 (68%)	23 (76,7)	

Teste Qui-quadrado (χ^2) Valor de $p < 0,05$

No que diz respeito à imunomarcção do Bcl-2, pode se observar que houve uma diferença estatisticamente significativa entre os grupos estudados (jovens e idosos) ($p=0,046$) com um maior índice de positividade nos casos de CCEL dos indivíduos idosos (Figs. 2A e 2B). Nos casos de CCEL em indivíduos jovens, a imunomarcção citoplasmática do Bcl-2 ocorreu em esparsas células neoplásicas dos ninhos tumorais (Fig 2C e 2D).

Correlacionando a imunoexpressão do Bcl2 com os parâmetros clínico-morfológicos (Estadimento clínico e os SGHM), não houve correlação estatisticamente significativa entre estes parâmetros ($p > 0,05$). No entanto, houve uma maior imunoexpressão do Bcl2 nos casos que apresentaram estágios clínicos iniciais (I/II). Quanto aos SGHM proposto pela OMS (15), o maior índice de positividade do Bcl-2 foi observado nos casos classificados como bem diferenciados, e para o sistema proposto por Bryne et al (13) a maior imunomarcção foi nos casos classificados como de Alto grau de malignidade. (Tabela 3).

Tabela 3. Comparação da imunoexpressão de Bcl-2 em CCEL em jovens e idosos, estadiamento clínico e os SGHM (OMS (15) e Bryne et al (13)) (Campina Grande-PB, Brasil, 2016).

Variável	Grupos	N	Mediana	Q ₂₅ -Q ₇₅	Média dos	Soma dos	U	P
----------	--------	---	---------	----------------------------------	-----------	----------	---	---

		(Bcl-2)			Ranks	Ranks		
Idade	Jovens	25	8,30	2,05- 16,95	23,28	582,00	257,0	0,046*
	Idosos	30	13,30	7,47-25,55	31,93	958,00		
Estadiamento	I/II	32	11,40	6,02-22,72	28,52	912,50	351,5	0,778
	III/IV	23	10,30	4,90-17,60	27,28	627,50		
OMS	Bem	18	12,45	3,97-26,4	28,22	508,00	329,0	0,943
	Mod/Pob	37	11,10	5,75-17,2	27,89	1032,00		
Bryne	Baixo Grau	15	7,50	3,00-24,1	26,20	393,00	273,0	0,610
	Alto Grau	40	11,35	6,15-17,65	28,68	1147,00		

Teste Mann-Whitney Valor de $p < 0,05$

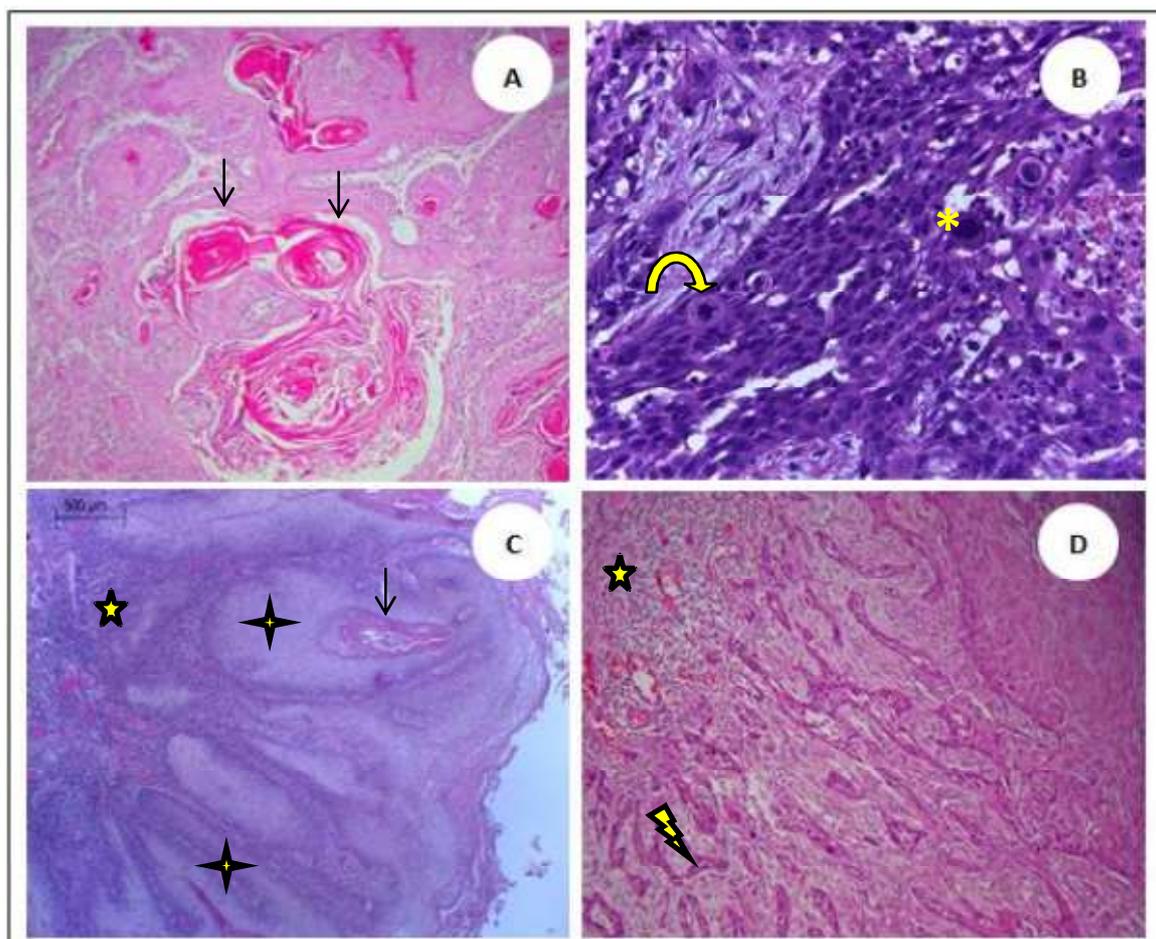


Figura 1. Fotomicrografia representando análise morfológica dos casos de CCEL. **A)** Fotomicrografia de CCEL Bem Diferenciado em paciente jovem, exibindo numerosas pérolas de ceratina (↓) (HE,100X); **B)** Fotomicrografia de CCEL Pobrementemente Diferenciado em paciente idoso, maior aumento, evidenciando, numerosas células com intenso pleomorfismo e hipercromatismo nuclear (*), bem como presença de mitoses atípicas (↷) (HE, 400X); **C)** Fotomicrografia de CCEL de Baixo Grau de Malignidade em paciente jovem, com padrão de invasão em forma cordões (★), intenso infiltrado inflamatório (★) e presença de pérola de ceratina (↓) (HE, 40X); **D)** Fotomicrografia de CCEL de Alto Grau de Malignidade em paciente idoso, apresentando padrão de invasão correspondente a pequenas ilhas de células tumorais (⚡), bem como células dissociadas e leve infiltrado inflamatório (HE, 100x).

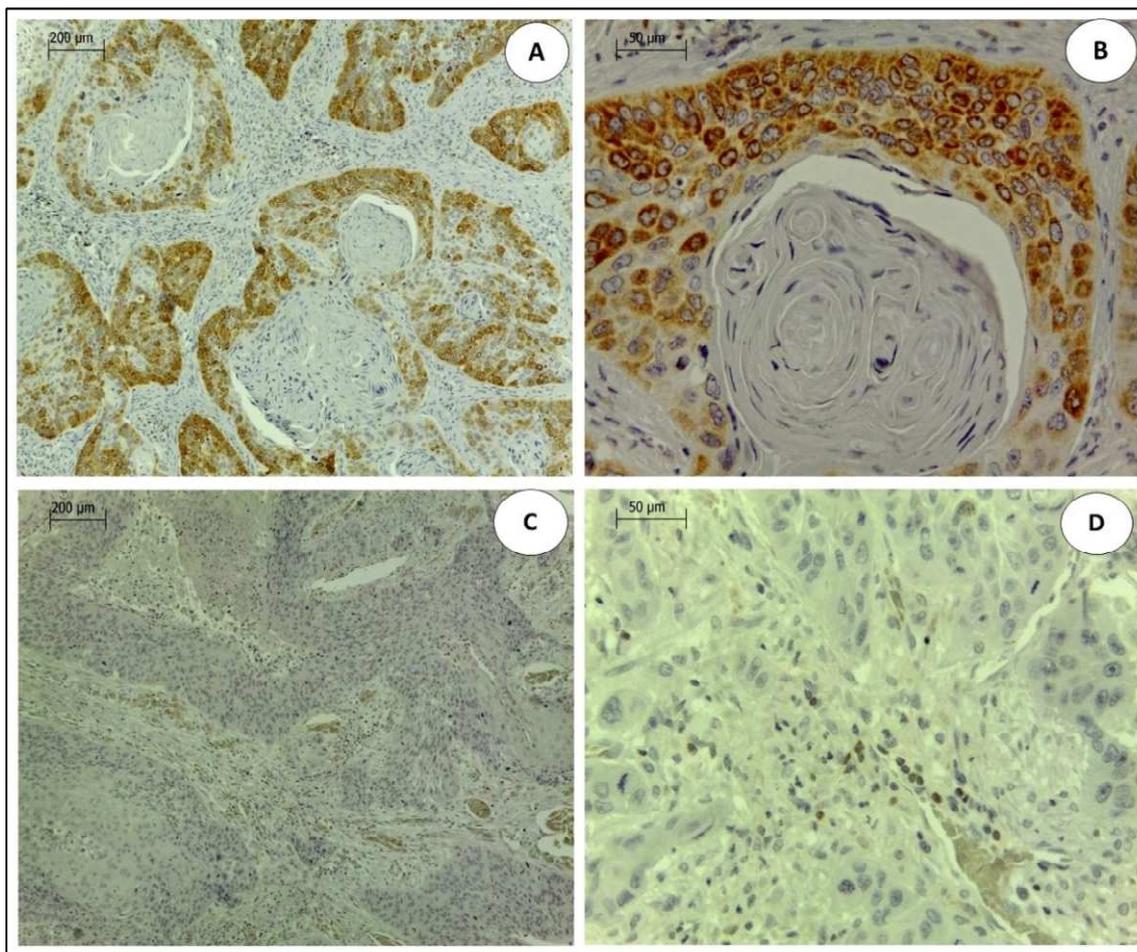


Figura 2. Imunomarcção para anticorpo Bcl-2. A e B) Fotomicrografias evidenciando alto índice de positividade citoplasmática do Bcl-2, com coloração acanhada principalmente no citoplasma das células da periferia dos ninhos tumorais de CCEL em indivíduo idoso. (Advance HRP, 100X e 400X, respectivamente). C e D) Fotomicrografias mostrando menor índice de positividade citoplasmática do Bcl-2 em células neoplásicas de CCEL em indivíduo jovem (Advance HRP, 100X e 400X, respectivamente).

4 DISCUSSÃO

Estudos recentes têm demonstrado que a incidência de CCEO em indivíduos jovens tem aumentado consideravelmente nas últimas décadas (1,3-4,7). Santos et al (7) realizaram um levantamento retrospectivo do período de 15 anos, em um estado brasileiro e observaram que em sua população de 2311 casos registrados de CCEO, 76 (3,3%) corresponderam a pacientes jovens (≤ 45 anos de idade). Embora essa frequência varie de 1,4 a 13% de todos os casos de CCEO(7,19-23).

Alguns estudos demonstraram que o CCEL que acomete estes indivíduos jovens, apresenta um fenótipo mais agressivo, com um alto índice de metástase linfonodal no momento do diagnóstico. No entanto, ainda existem controvérsias sobre o prognóstico desses pacientes (6,21). Os mecanismos moleculares subjacentes ao comportamento agressivo do tumor ainda permanecem obscuros quando comparados à incidência em pacientes jovens e idosos.

Em nosso estudo pode se observar que a maioria dos casos de CCEL acometeram homens, independente do grupo estudado (jovens e idosos), semelhantemente aos estudos de Sun et al (6). Pesquisas direcionadas a pacientes jovens também confirmaram a predominância de CCEO em indivíduos do sexo masculino (2,10,21). No entanto, Pires et al (22) afirmaram que as mudanças nas atividades sociais e de estilo de vida das mulheres na atualidade estão tornando-a mais expostas a agentes carcinogênicos, o que sugere um aumento da incidência de câncer nessas pacientes. Sendo assim, em outros estudos esse padrão de predominância pode ser diferente para pacientes jovens, no qual se observa uma maior prevalência do sexo feminino (17, 23).

No tocante ao estadiamento clínico, nossa pesquisa demonstrou que a maioria dos casos de CCEL encontrava-se em estágios clínicos I e II, embora nos indivíduos jovens, houve uma leve predominância nos estágios avançados III/IV (52%), semelhantemente aos estudos de Benevenuto et al(24), Mesquita et al (3), Soudry et al (17) e Knopf et al (1) que observaram que em pacientes jovens, o CCEO apresentou-se em estágios clínicos mais avançados (III/IV). Sugerindo, portanto, não haver diferença quanto aos achados clínicos do CCEO em pacientes mais velhos.

Em relação aos parâmetros histopatológicos, nossos resultados corroboram com os achados de estudos anteriores, onde o maior número de casos de CCEL, independente dos grupos etários, é classificado como moderadamente a pobremente diferenciados, bem como sendo de alto grau de malignidade (24-25). No entanto, Sun et al (6) observaram que os casos de CCEO em jovens foram classificados em sua maioria como pobremente diferenciados, diferentemente dos casos de CCEO em idosos, sugerindo, portanto, haver diferença entre jovens e idosos, quanto ao comportamento biológico.

No que diz respeito à imunexpressão do Bcl-2, pode se observar que houve um maior índice de positividade nos pacientes idosos, com diferença estatisticamente significativa, em relação aos jovens. Corroborando, assim, os estudos de Knopf et al(1), utilizando o método de PCR, demonstraram menor índice de imunomarcção do Bcl-2 em pacientes ≤ 45 anos. Diferentemente, Zhang et al (26) observaram maior imunexpressão do Bcl-2 em casos de CCEL em indivíduos com idade ≤ 60 anos, sugerindo, assim, um comportamento biológico tumoral mais agressivo nos pacientes jovens em relação aos idosos. Chowdry et al (27) observaram que a alta imunexpressão do Bcl-2, em casos de carcinoma de células pequenas do pulmão em jovens, estava relacionada a uma pior sobrevida e ao pior prognóstico desses pacientes.

Diferentemente dos nossos achados, em que observamos maior imunomarcção do Bcl-2 em casos de CCEL classificados em estágios clínicos iniciais (I/II), alguns estudos demonstraram maior imunexpressão desta proteína em casos de CCEO em estágios clínicos avançados (III/IV), sugerindo que tumores com alta imunexpressão do Bcl-2 estão correlacionados com pobre prognóstico (28). Zhang et al (26), corroboram com nossos resultados, em que os casos de CCEL classificados em estágios clínicos iniciais são os que demonstraram maior imunexpressão do Bcl-2.

Neste estudo podemos observar que não houve associação estatisticamente significativa entre imunexpressão do Bcl-2 e os SGHM, no entanto, ressaltamos que os casos classificados com bem diferenciados e de alto grau de malignidade apresentaram os maiores índices de positividade para esta proteína. Corroborando nosso estudo, Zhang et al (26) e Garewal et al (29) observaram que a expressão do Bcl-2 é predominante nos casos de CCEO bem diferenciados, sugerindo que a apoptose provavelmente desempenha um papel importante nas fases iniciais da carcinogênese.

Rahmani et al (28), Janeja et al (30) e Knopf et al (1) observaram uma alta imunexpressão do Bcl-2 em casos de CCEO classificados com pobremente e moderadamente diferenciados, respectivamente. Diferindo dos resultados encontrados em nossa pesquisa onde a imunexpressão do Bcl-2 foi maior nos casos bem diferenciados, embora sem associação estatisticamente significativa. No que diz respeito ao SGHM proposto por Bryne et al(13), nossos resultados corroboram os achados de Rahmani et al (28) onde a maior imunomarcção do Bcl-2 foi observada nos casos de CCEO classificados como de alto grau de malignidade.

5 CONSIDERAÇÕES FINAIS

Diante dos parâmetros clínico-morfológicos encontrados em nosso estudo, podemos observar que não houve diferença no que diz respeito ao perfil clínico e diferenciação celular entre as faixas etárias estudadas. No entanto, no que diz respeito a maior imunexpressão do Bcl-2 que foi observada em CCEL em indivíduos idosos, pode-se inferir que nesta faixa etária esta neoplasia exibe um comportamento biológico mais agressivo, podendo estar relacionada a uma maior sobrevivência das células neoplásicas.

6 REFERÊNCIAS

1. Knopf A, Lempart J, Bas M, Slotta-Huspenina J, Mansour N, Fritsche MK. Oncogenes and tumor suppressor genes in squamous cell carcinoma of the tongue in young patients. *Oncotarget*. 2015; 6(5): 3443–3451.
2. Fan Y, Zheng L, Mao MH, Huang M-W, Liu S-M, Zhang J. et al. Survival analysis of oral squamous cell carcinoma in a subgroup of young patients. *Asian Pac J Cancer Prev*, 2014; 15(20):8887-8891.
3. Mesquita JA, Cavalcanti AL, Nonaka CFW, Godoy GP, Alves PM. Clinical and histopathological evidence of oral squamous cell carcinoma in young patients: systematized review. *J Bras Patol Med Lab*. 2014; 50(1):67-74.
4. Blanchard P, el Khoury C, Temam S, Casiraghi O, Mirghani H, Lévy A. et al. Oral cavity cancers among young people: Clinical results and prognostic analysis. *Cancer Radiother*. 2016; 20(2):91-7.
5. Alves PM, Godoy GP, Gomes DQ, Medeiros AMC, de Souza LBS, da Silveira EJD. et al. Significance of galectins-1, -3, -4 and -7 in the progression of squamous cell carcinoma of the tongue. *Pathology – Research and Practice*. 2011; 207:236–40.
6. Sun Q, Fang Q, Guo S. A comparison of oral squamous cell carcinoma between young and old patients in a single medical center in China. *Int J Clin Exp Med*. 2015; 8(8):12418-23.
7. Santos HBP, Santos TKG, Paz AR, Cavalcanti YW, Nonaka CFW, Godoy GP. et al. Clinical findings and risk factors to oral squamous cell carcinoma in young patients: A 12-year retrospective analysis. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2016; 21(2):151-6.
8. Oliveira JMB, Pinto LO, Lima NGM, Almeida GCM. Câncer de boca: avaliação do conhecimento de acadêmicos de Odontologia e Enfermagem quanto aos fatores de risco e procedimentos de diagnóstico. *Rev Bras Cancerol*. 2013; 59(2):211-8.
9. Santos RA, Portugal FB, Felix JD, Santos PMO, Siqueira MM. Avaliação epidemiológica de pacientes com câncer no trato aerodigestivo superior: relevância dos fatores de risco álcool e tabaco. *Rev Bras Cancerol*. 2012; 58(1):21-9.
10. Udeabor SE, Rana M, Wegener G, Gellrich N-C, Eckardt AM. Squamous cell carcinoma of the oral cavity and the oropharynx in patients less than 40 years of age: a 20-year analysis. *Head & Neck Oncology*. 2012; 4(48):2-7.

11. Thomas L, Moore EJ, Mcgree ME, Olsen KD, kasperbauer JL, Erickson LA, et al. Prognostic features, human papillomavirus status, and epidermal growth factor receptor expression in oral squamous cell carcinoma in young adults. *Am J Otolaryngol.* 2012; 33(6):650-6.
12. Camisasca DR, Honorato J, Bernardo V, da Silva LE, da Fonseca EC, de Faria PA, et al. Expression of Bcl-2 family proteins and associated clinicopathologic factors predict survival outcome in patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2009; 45(3):225-33
13. Bryne M, Koppang HS, Lilleng, R.; Kjaerheim, A. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. *J Pathol*, 1992; 166(4):375-81.
14. Silveira EJ, Godoy GP, Lins RD, Arruda Mde L, Ramos CC, Freitas Rde A et al. Correlation of clinical, histological, and cytokeratin profiles of the squamous cell carcinoma of the oral tongue with prognosis. *Int J Surg Pathol.* 2007; 15(4):376-83.
15. Cardesa A, et al. Squamous cell carcinoma. *In: BARNES, L. et al. World Health Organization classification of tumor: pathology and genetics of head and neck tumors.* Lyon: IARC Press.2005;118-121.
16. Brant JCM. **Papel da Apoptose no Infiltrado Inflamatório do Líquen Plano Bucal.**[Tese] Universidade Federal de Minas Gerais, Pós-graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2012. 59f.
17. Soudry E, Preis M, Hod R, Hamzany Y, Hadar T, Bahar G, et al. Squamous cell carcinoma of the oral tongue in patients younger than 30 years: clinicopathologic features and outcome. *Clin Otolaryngol.* 2010; 35(4):307-12.
18. Patel SC, Carpenter WR, Tyree S, Couch ME, Weissler M, Hackman T, et al. Increasing incidence of oral tongue squamous cell carcinoma in young white women, age 18 to 44 years. *J Clin Oncol.* 2011; 10;29(11):1488-94.
19. Troeltzch M, Knösel T, Eichinger C, Probst F, Troeltzsch M, Woodlock T, et al. Clinicopathologic features of oral squamous cell carcinoma: do they vary in different age groups? *J Oral Maxillofac Surg.* 2014; 72:1291-300.
20. Komolmalai N, Chuachamsai S, Tantiwipawin S, Dejsuvan S, Buhngamongkol P, Wongvised C. et al. Ten-year analysis of oral câncer focusing on young people in northern Thailand. *J Oral Sci*, 2015; 57(4), p. 327-34.
21. Shakeel Uz Zaman, Adeel M, Suhail A. Squamous cell carcinoma of oral tongue in young patients - A 10 years tertiary care experience. *J Pak Med Assoc.* 2016; 66(2):155-8.
22. Pires FR, Ramos AB, Oliveira JB, Tavares AS, Luz PS, Santos TC. Oral squamous cell carcinoma: clinicopathological features from 346 cases from a single Oral Pathology service during an 8-year period. *J Appl Oral Sci.* 2013; 21(5):460-7.
23. Kaminagakura E, da Cunha IW, Soares FA, Nishimoto IN, Kowalski LP. CCND1 amplification and protein overexpression in oral squamous cell carcinoma of young patients. *Head Neck.* 2011; 33(10):1413-9.
24. Benevenuto TG, Nonaka CFW, Pinto LP, de Souza, L. B. Immunohistochemical comparative analysis of cell proliferation and angiogenic index in squamous cell carcinomas of the tongue between young and older patients. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2012; 20(3):291-7.

25. Vasconcelos MG, Mafra RP, Vasconcelos RG, de Medeiros AMC, Queiroz LMG. Squamous cell carcinoma of the tongue: clinical and morphological analysis of 57 cases and correlation with prognosis. *J. Bras. Patol. Med. Lab. Rio de Janeiro.* 2014; 50(5).
26. Zhang B, Liu M, Tang H-K, Ma HB, Wang C, Chen X, et al. The expression and significance of MRP I, LRP, TOPOII β , and BCL2 in tongue squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2012; 41:141-148.
27. Chowdry RP, Sica GL, Kim S, Chen Z, Goodman A, Alexis D, et al. Phosphorylated Bcl-2 and Mcl-1 as prognostic markers in small cell lung cancer. *Oncotarget.* 2016.
28. Rahmani A, Alzohairy M, Babiker AY, Rizvi MA, Elkarimahmad HG. Clinicopathological significance of PTEN and bcl2 expressions in oral squamous cell carcinoma. *Int J Clin Exp Pathol.* 2012;5(9):965-71.
29. Garewal J, Garewal R, Sircar K. Expression of Bcl-2 and MIB-1 Markers in oral squamous cell carcinoma (OSCC)- a comparative study. *J Clin Diagn Res.* 2014; 8(7): QC01-QC04.
30. Juneja S, Chaitanya NB, Agarwal M. Immunohistochemical expression of Bcl-2 in oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *Indian J. Cancer.* 2015; 52(4): 505-10.

7 REFERÊNCIAS

- ADAMS, J. M. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. **Genes Dev**, v. 17, p. 2481-95, 2003.
- ALSHARIF, M.J. et al. Gingival squamous cell carcinoma in young patients: report of a case and review of the literature. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 107, n.5, p.696-700, 2009.
- ALVES, C.C.M. et al. Oral squamous cell carcinoma: relation between histopathologic graduation and clinical features of the neoplasia. **Pesq Bras Odontoped Clin Integr**. João Pessoa. v.11, n.4, p.485-89, dez 2011.
- ALVES, P.M. et al. Significance of galectins-1, -3, -4 and -7 in the progression of squamous cell carcinoma of the tongue. **Pathology – Research and Practice**, v.207, p. 236–40, 2011.
- ARYA, V.; SINGH, S.; DANIEL, M.J. Clinicopathological correlation of Bcl-2 oncoprotein expression in oral precancer and cancer. **J Oral Biol Craniofac Res**. v.6, n.1, p.18-23, Jan-Apr 2016.
- BEENA, V.T et al. Oral cancer in young non-habitual females: a report of four cases and review of the literature. **Aust Dent J**, v.56, p. 322-7, 2011.
- BENEVENUTO, T.G. et al. Immunohistochemical comparative analysis of cell proliferation and angiogenic index in squamous cell carcinomas of the tongue between young and older patients. **Appl Immunohistochem Mol Morphol**, v. 20, n.3, p. 291-7, 2012.
- BLANCHARD, P. et al. Oral cavity cancers among young people: Clinical results and prognostic analysis. **Cancer Radiother**. 8 Mar 2016.
- BRANT, J.C.M. **Papel da apoptose no infiltrado inflamatório do líquen plano bucal**. Tese [Universidade Federal de Minas Gerais], Pós-graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia, Belo Horizonte, Minas Gerais, 2012. 59f.
- BRYNE, M. et al. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. **J Pathol**, v. 166, n.4, p.375-81, 1992.
- CAMISASCA, D. R. et al. Expression of Bcl-2 family proteins and associated clinicopathologic factors predict survival outcome in patients with oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol**. v.45, n.3, p. 225-33, Mar 2009.
- CARDESA, A et al. Squamous cell carcinoma. *In*: BARNES, L. et al. World Health Organization classification of tumor: pathology and genetics of head and neck tumors. **Lyon: IARC Press**, p. 118-121, 2005.
- CASTANIER C, ARNOUIT P. Mitochondrial dynamics during apoptosis. **Med Sci**, v. 26, p. 830-835, 2010.

- CHOWDRY, R.P. et al. Phosphorylated Bcl-2 and Mcl-1 as prognostic markers in small cell lung cancer. **Oncotarget**. Feb. 2016.
- CONCEIÇÃO, L.D. et al. Retrospective study in tongue biopsies – epidemiologic aspect. **RFO**, v. 15, n. 1, p. 11-19, janeiro/abril, 2010.
- DE PAULA, A.M. et al. Analysis of 724 cases of primary head and neck squamous cell carcinoma (HNSCC) with a focus on young patients and p53 immunolocalization. **Oral Oncology**, v. 45, n.9, p. 777-82, 2009.
- DISSANAYAKA, W.L. et al. Clinical and histopathologic parameters in survival of oral squamous cell carcinoma. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**. v.113, p. 518–25, 2012.
- FALAKI, F. et al. Clinical and histopathological analysis of oral squamous cell carcinoma of young patients in Mashhad, Iran: A retrospective study and review of literatures. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v.16, n.4, p.473-7, 2011.
- FAN, Y. et al. Survival analysis of oral squamous cell carcinoma in a subgroup of young patients. **Asian Pac J Cancer Prev**. v.15, n.20, p.8887-8891, 2014.
- GAREWAL, J.; GAREWAL, R.; SIRCAR, K. Expression of Bcl-2 and MIB-1 markers in oral squamous cell carcinoma (OSCC) - a comparative study. *J Clin Diagn Res*. v. 8, n.7, Jul 2014.
- HARRIS, S.L. et al. Association of p16INK4a overexpression with improved outcomes in young patients with squamous cell cancers of the oral tongue. **Head Neck**, v.33, n.11, p.1622-7, 2011.
- INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER JOSÉ ALENCAR DA SILVA - INCA. **Incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2015.
- JONES, T.M. Tumour-infiltrating lymphocytes in the risk stratification of squamous cell carcinoma of the head and neck. **British Journal of Cancer**. v. 110, n. 2, p. 269-270, 2014.
- JUNEJA, S.; CHAITANYA, N. B.; AGARWAL, M. Immunohistochemical expression of Bcl-2 in oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma. **Indian J. Cancer**. V.52, n.4, p. 505-10. oct/dec 2015.
- KAMINAGAKURA, E. et al. CCND1 amplification and protein overexpression in oral squamous cell carcinoma of young patients. **Head Neck**, v. 33, n.10, p.1413- 9, 2011.
- KAMINAGAKURA, E. et al. Protein expression of CYP1A1, CYP1B1, ALDH1A1, and ALDH2 in young patients with oral squamous cell carcinoma. **Int J Oral Maxillofac Surg**. Mar 2016.
- KIM, K.R. et al. The inhibitory effect of buddlejasaponin IV on the growth of YD-10B human oral squamous cell carcinoma cells. **J Cancer Prev**. v.18, p.330–336, 2013.
- KNOPF, A. et al. Oncogenes and tumor suppressor genes in squamous cell carcinoma of the tongue in young patients. **Oncotarget**. v.6, n.5, p.3443–3451, feb 2015.

- KOMOLMALAI, N.; CHUACHAMSAI, S.; TANTIWIPIWIN, S.; DEJSUVAN, S.; BUHNGAMONGKOL, P.; WONGVISED, C. et al. Ten-year analysis of oral cancer focusing on young people in northern Thailand. **J Oral Sci**, v. 57, n. 4, p. 327-34, 2015.
- LINDENBLATT, R. C. R. et al. Oral squamous cell carcinoma grading systems – analysis of the best survival predictor. **J Oral Pathol Med**, v. 41, n. 1, p. 34-39, 2012.
- LOURENÇO, S. Q. C. et al. Histological classifications of oral squamous cell carcinoma: a review of the proposed systems. **Rev Bras de Cancer**, v. 53, n. 3, p. 325-33, 2007.
- MARTINS FILHO, P. R. S. et al. Oral cancer in Brazil: a secular history of Public Health Policies. RGO, **Rev. Gaúch. Odontol**. Campinas. vol.62 no.2. abril / junho 2014.
- MESQUITA, J.A. et al. Clinical and histopathological evidence of oral squamous cell carcinoma in young patients: systematized review. **J Bras Patol Med Lab**, v. 50, n. 1, p. 67-74, fevereiro 2014.
- MONSJOU, H.S.V. et al. Oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma in young patients: The Netherlands Cancer Institute experience. **Head Neck**, v.35, p.94-102, 2013.
- MORRIS, L.G.T. et al. Squamous cell carcinoma of the oral tongue in the pediatric age group: a matched-pair analysis of survival. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 136, n.7, p.697-701, 2010.
- NARANJO GOMEZ, J. M. et al. Alterations in the expression of p53, KLF4, and p21 in neuroendocrine lung tumors. **Arch Pathol Lab Med**. v.138, p.936-942, 2014.
- NOGUTI, J. et al. The influence of sleep restriction on expression of apoptosis regulatory proteins p53, Bcl-2 and Bax following rat tongue carcinogenesis induced by 4-nitroquinoline I-oxide. **J Oral Pathol Med**. v.44, p.222-228, 2015.
- OLIVEIRA, J. M. B. et al. Câncer de boca: avaliação do conhecimento de acadêmicos de Odontologia e Enfermagem quanto aos fatores de risco e procedimentos de diagnóstico. **Rev Bras Cancerol**. v. 59, n.2, p.211-8, 2013.
- PATEL, S.C.; CARPENTER, W.R.; TYREE, S.; *et al*. Increasing incidence of oral tongue squamous cell carcinoma in young white women, age 18 to 44 years. **J Clin Oncol**. v. 29, p.1488–1494, 2011.
- PIRES, F. R. et al. Oral squamous cell carcinoma: clinicopathological features from 346 cases from a single Oral Pathology service during an 8-year period. **J. Appl. Sci Oral**. v.21, n.5, Bauru setembro / outubro 2013.
- RAHMANI, A. et al. Clinicopathological significance of PTEN and bcl2 expressions in oral squamous cell carcinoma. **Int J Clin Pathol**. v.5, n.9, p.965-971, 2012.
- RAHMANI, A. et al. Expressional evaluation of vascular endothelial growth factor (VEGF) protein in urinary bladder carcinoma patients exposed to cigarette smoke. **Int J Clin Exp Pathol**. v.5, n.3, p. 195-202, 2012.

- RETHMAN, M. P. et al. Carcinomas regarding screening for oral squamous cell evidence-based clinical recommendations. **JADA**, v. 141, n. 5, p. 509-20, 2010.
- RIBEIRO, A.C.P. et al. Clinical and histopathological analysis of oral squamous cell carcinoma in young people: A descriptive study in Brazilians. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v.47, p.95-8, 2009.
- RIVERA, C. et al. Clinicopathological and immunohistochemical evaluation of oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma in Chilean population. **Int J Clin Exp Pathol**. v. 17, n. 9, p.5968-5977.2014.
- SALEM, A. Dismissing links between HPV and aggressive tongue cancer in young patients. **Ann Oncol**. v.21, p.13–17, 2010.
- SANTOS, L. P. S. et al. Características de casos de câncer bucal no estado da bahia, 1999-2012: um estudo de base hospitalar. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v. 61, n.1, p. 7-14, 2015.
- SANTOS, R.A. et al. Avaliação epidemiológica de pacientes com câncer no trato aerodigestivo superior: relevância dos fatores de risco álcool e tabaco. **Rev bras cancerol**. v.58, n.1, p.21-9, 2012.
- SANTOS, H. B. P. et al. Clinical findings and risk factors to oral squamous cell carcinoma in young patients: A 12-year retrospective analysis. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**. v.21, n.2, p.151-6, 1 mar 2016.
- SCOTT, S. E.; MCGURK, M.; GRUNFELD, E. A. Patient delay for potentially malignant oral symptoms. **Eur J Oral Sci**. v.116, n.2, p.141-47, 2008.
- SHAKEEL UZ, Z.; ADEEL, M.; SUHAIL, A. Squamous cell carcinoma of oral tongue in young patients - A 10 years tertiary care experience. **J Pak Med Assoc**. v.66, n.2, p.155-8, Feb 2016.
- SILVEIRA, E. J. D. et al. Correlation of clinical, histological, and cytokeratin profiles of the squamous cell carcinoma of the oral tongue with prognosis. **Int J Surg Pathol**. v. 15, p. 376-83, 2007.
- SOBIN, L. Gospodarowicz M, Wittekind C: TNM classification of malignant tumors. **International Union Against Cancer (UICC)**. Dec 2009; Disponível em: <<http://www.uicc.org/resources/tnm>> Acesso em 23 de março de 2016.
- SOUDRY, E. et al. Squamous cell carcinoma of the oral tongue in patients younger than 30 years: clinicopathologic features and outcome. **Clin Otolaryngol**, v.35, p.307-12, 2010.
- SUN, Q.; FANG, Q.; GUO, S. A comparison of oral squamous cell carcinoma between young and old patients in a single medical center in China. **Int J Clin Exp Med**. v.8, n.8, p.12418-23, 15 Aug 2015.

- THOMAS, L. et al. Prognostic features, human papillomavirus status, and epidermal growth factor receptor expression in oral squamous cell carcinoma in young adults. **Am J Otolaryngol.** v.33, p.650–656, 2012.
- TROELTZSCH, M. et al. Clinicopathologic features of oral squamous cell carcinoma: do they vary in different age groups? **J Oral Maxillofac Surg**, v. 72, n. 7, p.1291-300, 2014.
- UDEABOR, S. E. et al. Squamous cell carcinoma of the oral cavity and the oropharynx in patients less than 40 years of age: a 20-year analysis. **Head & Neck Oncology**, v.4,n.48, p.2-7,2012.
- 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, 2012.
- VASCONCELOS, M. G. et al. Squamous cell carcinoma of the tongue: clinical and morphological analysis of 57 cases and correlation with prognosis. **J. Bras. Patol. Med. Lab.** v.50, n.5, Rio de Janeiro Sept./Oct. 2014.
- VERED, M. et al. Oral tongue squamous cell carcinoma: recurrent disease is associated with histopathologic risk score and young age. **J Cancer Res ClinOncol**, v.136, n.7, p.1039-48, 2010.
- WANG, Q. et al. Investigation and identification of potential biomarkers in human saliva for the early diagnosis of oral squamous cell carcinoma. **Clin Chim Acta.** v.427C, p.79-85, 2013.
- WYLLIE, A. H.; KERR, J. F. R.; CURRIE, A. R. Cell death: the significance of apoptosis. **Intern Rev Cytol**, v. 68, p. 251-305, 1991.
- WOOLGAR, J.A. Histopathological prognosticators in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Oral Oncol.** v. 42, p. 229–39, 2006.
- WOOLGAR, J. A.; TRIANTAFYLLOU, A. Pitfalls and procedures in the histopathological diagnosis of oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma and a review of the role of pathology in prognosis. **Oral Oncol.** v.45, n.4-5, p.361-85, Apr-May 2009.
- YANG, J. et al. Effect of curcumin on Bcl-2 and Bax expression in nude mice prostate cancer. **Int J Clin Exp Pathol.** v.8, n.8, p.9272-9278, 2015.
- YAO, K. et al. Effect of TIEG1 on apoptosis and expression of Bcl-2/Bax and Pten in leukemic cell lines. **Genet Mol Res.**v.14, n.1, p.1968-1974, 20 de março 2015.
- ZHANG, B. et al. The expression and significance of MRP I, LRP, TOPOII β , and BCL2 in tongue squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med.** v.41, p.141-148, 2012.

APÊNDICE A

FICHA INDIVIDUAL

IDENTIFICAÇÃO

Nº do prontuário: _____ Ano: _____ Nº da biópsia: _____

DADOS CLÍNICOS

Sexo: _____ Idade: _____ Raça: _____

Localização anatômica: _____ Estadiamento clínico: _____

Tratamento: _____ Presença de metástase: _____

ANÁLISE HISTOPATOLOGICA

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

Lâmina HE: _____

1. Grau de ceratinização

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

2. Pleomorfismo nuclear

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

3. Padrão de invasão

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

4. Infiltrado Inflamatório

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

() Baixo grau de malignidade [escore ≤ 8]

() Alto grau [Total acima de 9]

- **SGHM proposto pela OMS (CARDESA et al, 2005)**

Lâmina HE: _____

- () Bem diferenciado
- () Moderadamente diferenciado
- () Pobrememente diferenciado

ANEXO

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA
PARAÍBA - UEPB / PRÓ-
REITORIA DE PÓS-



PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP

DADOS DO PROJETO DE PESQUISA

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

Pesquisador: A

Área Temática:

Versão:

CAAE: 30272714.7.0000.5187

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

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

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 634.714

Data da Relatoria: 10/09/2014

Apresentação do Projeto:

O projeto é intitulado EXPRESSÃO DA ATIVINA A, MARCADORES DE PROLIFERAÇÃO CELULAR E APOPTOSE EM CÂNCER ORAL EM PACIENTES JOVENS E IDOSOS. O estudo a ser desenvolvido consistirá em uma pesquisa retrospectiva, caracterizada pela observação, registro e análise qualitativa da ativina A e quantitativa do Ki -67, bcl-2, Bax e caspase-3, por meio de imunohistoquímica, em uma série de casos de carcinomas de células escamosas oral em pacientes jovens e idosos. A população objeto do presente estudo será constituída por todos os casos de carcinomas de células escamosas oral, diagnosticados e arquivados, nos últimos 10 anos, no Serviço de Anatomia Patológica do Hospital Napoleão Laureano/ João Pessoa – PB.

Objetivo da Pesquisa:

O presente estudo objetiva avaliar, por meio de imunohistoquímica, a imunexpressão da ativina A, Ki-67, bcl-2, Bax e caspase-3 em uma série de casos de CCEO em pacientes jovens e idosos, relacionando-a com parâmetros clínicos (faixa etária, localização anatômica da lesão, metástase em linfonodos regionais, estadiamento clínico TNM, recidiva local e desfecho) e com os sistemas de gradação histológica de malignidade dos tumores (Bryne, 1998; OMS, 2005, Brandwein-Gensler et al., 2005). Através dessa imunomarcção será avaliado um possível fenótipo imunossupressor desses genes e proteínas nos CCEO em pacientes jovens, comparando com o

Endereço: Av. das Barúas, 251- Campus Universitário
Bairro: Bodocongó CEP: 58.109-753
UF: PB Município: CAMPINA GRANDE
Telefone: (83)3315-3373 Fax: (83)3315-3373 E-mail: cep@uepb.edu.br

UNIVERSIDADE ESTADUAL DA
PARAÍBA - UEPB / PRÓ-
REITORIA DE PÓS-



Continuação do Parecer: 634.714

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

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

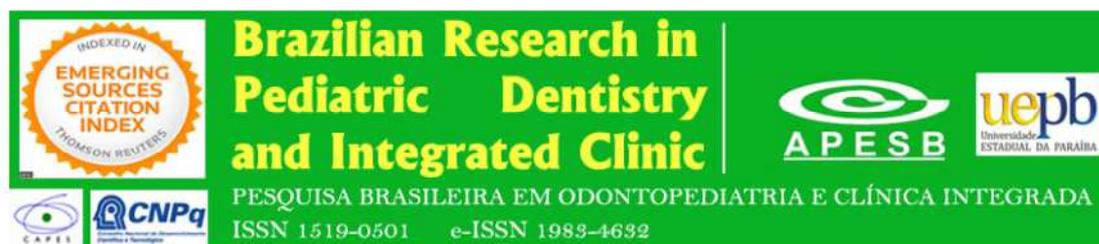
Este Colegiado acata o parecer do relator. Assim sendo, o projeto encontra-se aprovado. Salvo melhor juízo.

CAMPINA GRANDE, 05 de Maio de 2014

Assinador por:
Doralúcia Pedrosa de Araújo
(Coordenador)

Endereço: Av. das Baratas, 351- Campus Universitário
Bairro: Bodocongó CEP: 58.109-753
UF: PB Município: CAMPINA GRANDE
Telefone: (83)3315-3373 Fax: (83)3315-3373 E-mail: cep@uepb.edu.br

ANEXO B



Brazilian Research in Pediatric Dentistry and Integrated Clinic

PESQUISA BRASILEIRA EM ODONTOPEDIATRIA E CLÍNICA INTEGRADA

ISSN 1519-0501 e-ISSN 1983-4632

<p>HOME ABOUT LOGIN REGISTER SEARCH CURRENT ARCHIVES ANNOUNCEMENTS AD HOC REVIEWERS</p>	<p>OPEN JOURNAL SYSTEMS</p>
<p>Home > About the Journal > Submissions</p>	<p>Journal Help</p>
<p>Submissions</p> <ul style="list-style-type: none"> Online Submissions Author Guidelines Copyright Notice Privacy Statement <p>Online Submissions</p> <p>Already have a Username/Password for Brazilian Research in Pediatric Dentistry and Integrated Clinic? GO TO LOGIN</p> <p>Need a Username/Password? GO TO REGISTRATION</p> <p>Registration and login are required to submit items online and to check the status of current submissions.</p>	<p>USER</p> <p>Username: <input type="text"/></p> <p>Password: <input type="password"/></p> <p><input type="checkbox"/> Remember me</p> <p><input type="button" value="Login"/></p> <p>JOURNAL CONTENT</p> <p>Search: <input type="text"/></p> <p>Search Scope: All</p> <p><input type="button" value="Search"/></p> <p>Browse</p> <ul style="list-style-type: none"> By Issue By Author By Title Other Journals
<p>Author Guidelines</p> <p>Manuscripts should be submitted by one of the authors of the manuscript through the online system. Only online submissions are accepted to facilitate rapid publication. Submissions by anyone other than one of the authors will not be accepted. The submitting author takes responsibility for the paper during submission and peer review. INSTRUCTIONS The manuscript should be written in Portuguese or English (USA) language, in a clear concise and objective form. The text should be provided as a Word for Windows file (.doc), using a size 12 Times New Roman font, A4 page size, single-spacing and margins of 2.5 cm. The length of the manuscript is limited to 15 pages, including references, tables, and figures. 1) Title page: Title, Author(s) and Author for correspondence. 2) Abstract: A maximum of 280 words, in English and Portuguese. The abstract should be structured with the following divisions: Objective, Methods, Results, and Conclusion. 3) Key words: A maximum of five key words, preferably from the list of Medical Subject Headings of the U.S. National Library of Medicine. 4) Introduction: State the purpose and summarize the rationale for the study or observation. The objective(s) and/or hypothesis of the study should be stated in the last paragraph. Avoid presentation of an extensive review of the field. 5) Material and Methods: Describe your selection of the observational or experimental participants (patients or laboratory animals, including controls) clearly, including eligibility and exclusion criteria and a description of the source population. Identify the methods, apparatus (give the manufacturer's name and address in parentheses), and procedures in sufficient detail to allow other workers to reproduce the results. Authors should have considered the ethical aspects of their research and should ensure that the project was approved by an appropriate ethical committee, which should be stated. Type of statistical analysis must be described clearly and carefully. 6) Results: Present your results in a logical sequence in the text, tables, and illustrations, giving the main or most important findings first. 7) Discussion: This is</p>	<p>FONT SIZE</p> <p><input type="button" value="A-"/> <input type="button" value="A"/> <input type="button" value="A+"/></p> <p>INFORMATION</p> <ul style="list-style-type: none"> For Readers For Authors For Librarians
<p>size 12 Times New Roman font, A4 page size, single-spacing and margins of 2.5 cm. The length of the manuscript is limited to 15 pages, including references, tables, and figures. 1) Title page: Title, Author(s) and Author for correspondence. 2) Abstract: A maximum of 280 words, in English and Portuguese. The abstract should be structured with the following divisions: Objective, Methods, Results, and Conclusion. 3) Key words: A maximum of five key words, preferably from the list of Medical Subject Headings of the U.S. National Library of Medicine. 4) Introduction: State the purpose and summarize the rationale for the study or observation. The objective(s) and/or hypothesis of the study should be stated in the last paragraph. Avoid presentation of an extensive review of the field. 5) Material and Methods: Describe your selection of the observational or experimental participants (patients or laboratory animals, including controls) clearly, including eligibility and exclusion criteria and a description of the source population. Identify the methods, apparatus (give the manufacturer's name and address in parentheses), and procedures in sufficient detail to allow other workers to reproduce the results. Authors should have considered the ethical aspects of their research and should ensure that the project was approved by an appropriate ethical committee, which should be stated. Type of statistical analysis must be described clearly and carefully. 6) Results: Present your results in a logical sequence in the text, tables, and illustrations, giving the main or most important findings first. 7) Discussion: This is the only proper section for subjective comments and reference to previous literature. Inferences, deductions, and conclusions should be limited to the findings of the study (conservative generalization). 8) Conclusion: This should clearly explain the main conclusions of the work highlighting its importance and relevance. 9) References: Authors are responsible for ensuring that the information in each reference is complete and accurate. A maximum of 30 references should be numbered consecutively in the order in which they appear in the text (Vancouver System). All references must be numbered consecutively and citations of references in text should be identified using numbers in square brackets (e.g., "as discussed by some authors [2]"; "as discussed elsewhere [1,5,12]"). All references should be cited within the text; otherwise, these references will be automatically removed. Non-referenced material and, if possible, non-English publications should be avoided. Congress abstracts, unaccepted papers, unpublished observations, and personal communications may not be placed in the reference list. If seven or more authors, list up to six followed by "et al." Journal and book references should be set out as in the following examples: 1. Ramalli Jr. EL, Ho W, Alves M, Rocha EM. Progress in animal experimentation ethics: a case study from a Brazilian medical school and from the international medical literature. Acta Cir Bras 2012; 27(9):659-63. 2. Paiva JG, Antoniazzi JH. Endodontia: bases para a prática clínica. 2.ed. São Paulo: Artes Medicas; 1988. 3. Basbaum AI, Jessel TM. The perception of pain. In: Kandel ER, Schwartz JH, Jessel TM. Principles of neural science. New York: McGraw Hill; 2000. p. 472-91. 4. Ministry of Health, Department of Planning, Annual Statistical Report. Abu Dhabi: Ministry of Health, 2001. Tables: should be numbered consecutively with Arabic numerals and should have an explanatory title. Each table should be typed on a separate page with regard to the proportion of the printed column/page and contain only horizontal lines. Figures and illustrations: Each figure should have a legend.</p>	<p><input type="button" value="A-"/> <input type="button" value="A"/> <input type="button" value="A+"/></p> <p>INFORMATION</p> <ul style="list-style-type: none"> For Readers For Authors For Librarians
<p>Submission Preparation Checklist</p> <p>As part of the submission process, authors are required to check off their submission's compliance with all of the following items, and submissions may be returned to authors that do not adhere to these guidelines.</p> <ol style="list-style-type: none"> The submission has not been previously published, nor is it before another journal for consideration (or an explanation has been provided in Comments to the Editor). The submission file is in OpenOffice, Microsoft Word, RTF, or WordPerfect document file format. Where available, URLs for the references have been provided. The text is single-spaced; uses a 12-point font; employs italics, rather than underlining (except with URL addresses); and all illustrations, figures, and tables are placed within the text at the appropriate points, rather than at the end. The text adheres to the stylistic and bibliographic requirements outlined in the Author Guidelines, which is found in About the Journal. If submitting to a peer-reviewed section of the journal, the instructions in Ensuring a Blind Review have been followed. Page charges are required for publication in this Journal. Therefore, I agree with payment R\$ 250.00. Page charge forms will be sent automatically on acceptance of a manuscript for publication in this Journal. Prompt submission of these forms will expedite the publication of your paper; we cannot publish until completed and signed page charge forms are received from every institution contributing to the page charges. 	
<p>Copyright Notice</p> <p>Papers must be submitted on the understanding that they have not been published elsewhere and are not currently under consideration by another journal. The submitting author is responsible for ensuring that the article's publication has been approved by all the other coauthors. Authorship credit should be based only on substantial contributions to each of the three components mentioned below: 1) Concept and design of study or acquisition of data or analysis and interpretation of data; 2) Drafting the article or revising it critically for important intellectual content; and 3) Final approval of the version to be published.</p>	
<p>Privacy Statement</p> <p>The names and email addresses entered in this journal site will be used exclusively for the stated purposes of this journal and will not be made available for any other purpose or to any other party.</p>	
<p>PBOCI is a member of CrossRef and all the content of its journals are linked by DOIs through CrossRef.</p>	