

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA**

WANESSA SIQUEIRA CAVALCANTE

**INVASÃO NEOPLÁSICA PERINEURAL E VASCULAR DE
CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAIS: ESTUDO
CLINICOPATOLÓGICO E IMUNOISTOQUÍMICO**

**VITÓRIA
2013**

WANESSA SIQUEIRA CAVALCANTE

**INVASÃO NEOPLÁSICA PERINEURAL E VASCULAR DE CARCINOMAS DE
CÉLULAS ESCAMOSAS ORAIS: ESTUDO CLINICOPATOLÓGICO E
IMUNOISTOQUÍMICO**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Clínica Odontológica.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Liliana Aparecida Pimenta de Barros.

Co-orientadora: Prof.^a Dr.^a Letícia Nogueira da Gama de Souza.

VITÓRIA

2013

WANESSA SIQUEIRA CAVALCANTE

**INVASÃO NEOPLÁSICA PERINEURAL E VASCULAR DE
CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAIS: ESTUDO
CLINICOPATOLÓGICO E IMUNOISTOQUÍMICO**

Dissertação apresentada ao Curso de Mestrado do Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Clínica Odontológica.

Aprovada em 24 de maio de 2013.

COMISSÃO EXAMINADORA

Prof.^a Dr.^a Lílíana Aparecida Pimenta de Barros
Universidade Federal do Espírito Santo
Orientadora

Prof.^a Dr.^a Leticia Nogueira da Gama de Souza
Universidade Federal do Espírito Santo
Co-orientadora

Prof.^a Dr.^a Sílvia Vanessa Lourenço
Universidade de São Paulo

“Não temas, porque eu sou contigo; não te assombres, porque eu sou teu Deus; eu te fortaleço, e te ajudo, e te sustento com a destra da minha justiça”.

Isaías 41:10

DEDICATÓRIA

*A Deus
A minha querida família
Ao meu amado Lucas Godoy*

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me fortalecer nas horas difíceis e permitir que eu chegasse até aqui, não esquecendo dos valores da humildade e do amor ao próximo.

A minha orientadora Profa. Dra. Liliana Aparecida Pimenta de Barros, pela orientação e oportunidade de aprendizado.

A minha co-orientadora Profa. Dra. Letícia Nogueira da Gama de Souza, pela co-orientação e pelos ensinamentos transmitidos.

A todos os professores, colegas, profissionais técnicos do Laboratório de Técnicas Imunomoleculares (LIM-06) do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo, por permitirem usar a infraestrutura e me auxiliarem em toda parte técnica de imunoistoquímica da minha pesquisa. Principalmente à Profa. Dra. Silvia Vanessa Lourenço, pela recepção carinhosa em seu laboratório, doação de anticorpos para esta pesquisa e ensinamentos que me fizeram crescer como pessoa e profissionalmente. Ao Dr. Ricardo Hsieh, pelos seus ensinamentos técnicos e teóricos, dedicação como colaborador e grande amigo. Ao Prof. Dr. Thales de Brito e a Ana Maria Gonçalves Silva, pelas elucidações nos momentos oportunos. À Fernanda de Paula pela sua grande amizade e companhia diária no laboratório.

Ao Prof. Dr. Marcos da Silva Pacheco por sua sabedoria e pelo carinhoso acolhimento na disciplina de Histologia durante meu estágio de docência REUNI.

A todos os professores, colegas das turmas 2010, 2011 e 2012, profissionais técnicos e administrativos do Mestrado em Clínica Odontológica da Universidade Federal do Espírito Santo, pelos conhecimentos transmitidos, amizades e suporte. Especialmente à Profa. Dra. Selva Gonçalves Guerra, pelo zelo, paciência e competência em conduzir o Mestrado em Clínica Odontológica. Ao Igor da Silva Erler e Regina Lucia Sales pelo suporte e disponibilidade.

A todos os professores vinculados ao Programa Nacional de Cooperação Acadêmica (PROCAD/CAPEL) entre a Universidade Federal do Espírito Santo e a Universidade de São Paulo, pela valiosa oportunidade de aprendizado e compra de anticorpos. Especialmente aos Profs. Drs. Carlos Palleschi Taborda, Mário Julio Ávila, Alfredo Feitosa, Rosana Pereira de Souza e Luciene Figueiredo.

Aos pacientes do Programa de Prevenção e Diagnóstico Precoce de Câncer de Boca do Curso de Odontologia e ao Serviço de Anatomia Patológica da Universidade Federal do Espírito Santo, pois possibilitaram a realização deste estudo.

A todos os professores, profissionais técnicos e administrativos do Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins da Universidade Federal do Espírito Santo, pelos momentos que passamos juntos.

Aos Profs. Drs. da banca de qualificação, Marcos da Silva Pacheco, Karla Loureiro Almeida-Coburn e Rosa Maria Lourenço Carlos Maia, pela disponibilidade e correções realizadas nesta dissertação, fundamentais para seu aprimoramento.

Ao Dr. Allan Kardec de Castro Filho e ao Dr. Allan Kardec de Castro Neto, patologista do Hospital Santa Rita, pelas elucidações e auxílios.

Ao Srs. Alexandro Rebouças, Fabiano José Pereira de Oliveira e Christian Acácio Spagnol, pelas contribuições na construção desta pesquisa.

Aos meus pais, Willian da Silva Cavalcante e Eliane Siqueira, pelo amor, dedicação, estímulos para o meu avançar e ensinamentos valiosos.

Aos meus irmãos, Willian da Silva Cavalcante Filho e Carla Valéria Siqueira Melo, pela amizade, cumplicidade e torcida para meu sucesso.

Ao Lucas Mendes Godoy, meu grande amor e incentivador durante todo percurso desta realização profissional, pela dedicação, incentivo constante aos meus estudos e por sua sabedoria.

Ao Dr. Marcos Antônio de Souza Godoy e Marli Vieira Mendes Godoy pelo carinho e palavras de ânimo em momentos difíceis.

A Profa. Dra. Fátima Paixão, pela dedicação, ensinamentos valiosos e por sempre ter acreditado no meu potencial.

Aos meus parentes, entes queridos, amigos e colegas, pela paciência, carinho, amizade e por todo tipo de apoio que me deram durante toda esta jornada, por sempre torcerem por mim em cada etapa profissional de minha vida.

A todos, o meu muito obrigada!

RESUMO

O Carcinoma de Células Escamosas (CCE) oral é o câncer de boca mais comum, surge principalmente nas membranas mucosas orais e orofaringe, prevalece em adultos dos 50 aos 70 anos de idade e está relacionado ao tabagismo e etilismo. Aspectos como invasões perineural e vascular do CCE oral têm sido associados a prognósticos ruins, elevadas taxas de recorrência, comportamento agressivo, metástases e baixa sobrevida. O diagnóstico é essencial para o adequado tratamento e, embora seja baseado em suas características clínicas e histopatológicas, pode ser aprimorado pela técnica de imunistoquímica. O objetivo deste estudo retrospectivo foi identificar as invasões perineural e vascular em lesões de CCEs orais diagnosticados pelo Programa de Prevenção e Diagnóstico de Câncer de Boca e Lesões de Boca do Curso de Odontologia da UFES entre 2004-2011. Foi encontrado um total de 29 pacientes com CCE oral e os dados clínico-demográficos coletados a partir dos prontuários. Para determinação da gradação tumoral e identificação dos processos invasivos utilizaram cortes processados pela técnica de Hematoxilina-Eosina (HE) e técnica imunistoquímica com os anticorpos CD31 e CD34 para identificação de vasos; e S100 e PGP9.5, para identificação de nervos. Os dados obtidos foram analisados estatisticamente pelos testes qui-quadrado, Exato de Fisher, razão da máxima verossimilhança, Kappa e não paramétrico de McNemar. Registraram 69% dos casos com gradação tumoral bem diferenciada, relacionada significativamente com infiltrado inflamatório peritumoral justaposto. Invasões vascular e perineural foram encontradas em 17,2% e 31% dos casos analisados com HE, respectivamente. Houve intensa densidade microvascular peritumoral em 82,8% dos casos, com imunomarcagem CD31. O anticorpo CD34 registrou 6,9% de casos com invasão vascular. A invasão neoplásica perineural foi detectada em 44,8% dos casos imunomarcados pela proteína S100 e em 58,6% pela proteína PGP9.5. Na análise de concordância entre as técnicas HE e imunistoquímica quanto à presença de invasão perineural, o PGP9.5 foi mais efetivo que as demais. Conclui-se que a identificação das invasões neoplásicas perineural e vascular é uma ferramenta útil para o diagnóstico e prognóstico dos pacientes com CCE oral podendo ser utilizados métodos histopatológico e imunistoquímico, sendo o último mais efetivo para esta análise.

Palavras-chave: Carcinoma de células escamosas. Invasividade neoplásica. Antígenos CD31. Antígenos CD34. Proteínas S100. PGP9.5 proteína humana.

ABSTRACT

Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the most common oral cancer and occurs mainly in oral mucous membranes and oropharynx, prevailing in adults in range from 50 to 70 years old and it is associated with smoking and alcoholism. Aspects as perineural and vascular invasions of the OSCC have been associated with bad prognosis, increased recurrence rates, aggressive behavior, metastasis and low survival. The diagnosis is crucial for proper treatment and, even though it is based on their clinical and histopathological features, it may be improved through immunohistochemistry technique. The purpose of this retrospective study was to identify perineural and vascular invasions in OSCC lesions diagnosed by the Program for Prevention and Early Diagnosis of Oral Cancer and Oral Lesions at Dental School, UFES from 2004 to 2011. Overall, the records of 29 OSSC-diagnosed patients had been found and their clinical and demographic data were collected. In order to determine tumor grading and to identify invasive process, it were performed sections processed through the hematoxiline and eosin staining technique and immunohistochemistry with CD31 and CD34 antibodies to identify vessels and S100 and PGP9.5 antibodies to identify nerves. The obtained data were statistically assessed by qui-square test, Fisher's exact test, maximum likelihood ration, Kappa test and McNemar's non-parametric test. It was found 69% of cases with well differentiated tumor grade, significantly related to juxtaposed peritumoral inflammatory infiltrated. Vascular and perineural invasions were found in 17.2% and 31% of cases analyzed through H&E staining, respectively. There was intense peritumoral microvascular density in 82.8% of cases, as immunostaining with CD31. The CD34 antibody recorded 6.9% of cases with vascular invasion. Perineural neoplastic invasion was detected in 44.8% of cases immunostained with S100 protein and in 58.6% of cases immunostained with PGP9.5 protein. On agreement analysis between H&E and immunohistochemistry techniques, as regards presence of perineural invasion, the PGP9.5 protein was more effective than the others. It was concluded that the identification of vascular and perineural neoplastic invasions is a useful tool for the diagnosis and prognosis of patients with OSCC, might be used histopathological and immunohistochemistry methods, being the latter more effective for that analysis.

Key words: Squamous cell carcinoma. Neoplastic Invasiveness. CD31 antigens. CD34 antigens. S100 proteins. PGP9.5 human protein.

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	do inglês <i>Bovine Serum Albumin</i>
CCE	Carcinoma de Células Escamosas
CCEs	Carcinomas de Células Escamosas
CD31 (PECAM-1)	do inglês <i>Platelet Endothelial Cell Adhesion Molecule</i>
CD34	do inglês <i>Cluster of Differentiation 34</i>
CTL CD8 ⁺	Linfócitos T Citotóxicos
DAB	do inglês <i>Diaminobenzidina</i>
DNA	do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i>
HE	Hematoxilina-Eosina
HPV	do inglês <i>Human Papiloma Virus</i>
HRP	do inglês <i>Horseradish Peroxidase</i>
IARC	do inglês <i>International Agency for Research on Cancer</i>
IBM	do inglês <i>International Business Machines</i>
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional de Câncer
LIM-06	Laboratório de Técnicas Imunomoleculares
LR	do inglês <i>Lymphocytic Response</i>
MS	Ministério da Saúde
NK	do inglês <i>Natural Killer</i>
NNK	do inglês <i>Nicotine-derived Nitrosamine Ketone</i>
NNN	do inglês <i>N-Nitrosornicotine</i>
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	do inglês <i>Phosphate Buffer Saline</i>
PGP9.5	do inglês <i>Protein Gene Product 9.5</i>
RR	Risco Relativo

S100	do inglês <i>S100 protein</i>
SIEX/UFES	Sistema de Informação da Extensão da Universidade Federal do Espírito Santo
SPSS	do inglês <i>Statistical Package for the Social Sciences</i>
TNM	T (tamanho do Tumor); N (Nódulo); M (Metástase)
TRIS HCL	do inglês <i>Tris-Hydrochloride Buffer</i>
UFES	Universidade Federal do Espírito Santo
UICC	União Internacional Contra o Câncer
USA	do inglês <i>United States of America</i>
WHO	do inglês <i>World Health Organization</i>
WPOI	do inglês <i>Worst Pattern of Tumor Invasion</i>

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
Ca ²⁺	íon Cálcio
>	maior
≥	maior ou igual
<	menor
≤	menor ou igual
μm	micrômetros
mm	milímetros
%	porcentagem
kDa	unidade de massa atômica ou kiloDalton

LISTA DE QUADROS

Quadro 1- Estadiamento clínico da doença (TNM).....	27
Quadro 2- Grupamento por estádios	28
Quadro 3- Critérios utilizados para diagnosticar as alterações arquiteturais e citológicas do epitélio	31
Quadro 4- Gradação histopatológica	32
Quadro 5- Sistema de gradação das margens invasivas (padrão de invasão).....	34
Quadro 6- Definição do padrão de invasão (WPOI).	35
Quadro 7- Definição do padrão de resposta linfocítica (LR).....	35
Quadro 8- Relação entre estadiamento clínico TNM e taxa de sobrevivência (5 anos) para o CCE oral.....	48
Quadro 9- Aspectos arquitetural e citológicos dos CCEs analisados	51
Quadro 10- Critérios utilizados na análise dos casos submetidos à técnica de HE ..	52
Quadro 11- Protocolo utilizado na técnica de imunohistoquímica	54

LISTA DE TABELAS

Tabela 1-	Dados clínicos obtidos através da revisão de prontuários de cada paciente diagnosticado com CCE oral	58
Tabela 2-	Dados histopatológicos obtidos através da análise histopatológica dos casos submetidos à técnica de HE.....	62
Tabela 3-	Dados da invasão perineural e vascular dos CCEs orais submetidos à técnica de HE.....	65
Tabela 4-	Crítérios avaliados CCEs orais submetidas à técnica de imunohistoquímica para CD31, CD34, S100 e PGP9.5	68
Tabela 5-	Associação entre o infiltrado inflamatório peritumoral com variáveis clinicopatológicas	71
Tabela 6-	Relação entre intensidade do infiltrado inflamatório com variáveis clinicopatológicas	72
Tabela 7-	Associação entre densidade microvascular peritumoral (CD31) com as variáveis clinicopatológicas	74
Tabela 8-	Relação da invasão neoplásica perineural (S100) com as variáveis clinicopatológicas	75
Tabela 9-	Análise de concordância entre os métodos histopatológico e imunohistoquímicos.....	76
Tabela 10-	Comparação dos percentuais de presença de invasão entre os três métodos	77

LISTA DE ESQUEMAS

Esquema 1- Etapas sequenciais envolvidas na disseminação hematogênica de um tumor.....	37
--	----

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1- Aspectos histopatológicos de CCEs orais bem diferenciados 60
- Figura 2- Gradação tumoral e padrão de distribuição do infiltrado inflamatório..... 61
- Figura 3- Invasão de CCEs orais em diferentes estruturas 64
- Figura 4- Perfil da expressão dos biomarcadores vasculares e neurais em lesões de CCEs orais 67
- Figura 5- Aspecto histopatológico e imunoistoquímico de CCE bem diferenciado .. 69

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	18
2 REVISÃO DE LITERATURA	20
2.1 CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS.....	20
2.1.1 Epidemiologia.....	20
2.1.2 Principais fatores de risco e seus mecanismos	22
2.1.3 Características clínicas e diagnóstico.....	25
2.1.4 Características histopatológicas	30
2.2 INVASÕES VASCULAR E PERINEURAL.....	38
2.3 BIOMARCADORES VASCULARES	41
2.3.1 Proteína CD31	42
2.3.2 Proteína CD34.....	43
2.4 BIOMARCADORES NEURAI.....	44
2.4.1 Proteína S100.....	44
2.4.2 Proteína PGP9.5	46
2.5 PROGNÓSTICO E FATORES PREDITIVOS DO CCE ORAL.....	47
3 OBJETIVOS	49
3.1 GERAL	49
3.2 ESPECÍFICOS	49
4 MATERIAL E MÉTODOS	50
4.1 AMOSTRA.....	50
4.2 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO.....	50
4.2.1 Análise da distribuição do infiltrado inflamatório e das taxas de invasões perineural e vascular.....	52
4.3 ETAPA IMUNOISTOQUÍMICA.....	53
4.3.1 Análises das taxas de invasão perineural e vascular das amostras submetidas à técnica imunoistoquímica	55
4.3.1.1 <i>Anti-CD31</i>	55
4.3.1.2 <i>Anti-CD34</i>	55
4.3.1.3 <i>Anti-S100 e Anti-PGP9.5</i>	55
4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS	55

5 RESULTADOS.....	57
5.1 DESCRIÇÃO DOS RESULTADOS CLÍNICOS DOS CASOS DE CCES ORAIS.....	57
5.2 DESCRIÇÃO DOS RESULTADOS HISTOPATOLÓGICOS DOS CCES ORAIS.....	59
5.3 DESCRIÇÃO DOS RESULTADOS DAS INVASÕES PERINEURAL E VASCULAR EM CCES ORAIS PROCESSADOS PELA TÉCNICA HE.....	63
5.4 DESCRIÇÃO DOS RESULTADOS DAS INVASÕES PERINEURAL E VASCULAR EM CCES ORAIS PROCESSADOS PELA TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA.....	66
5.5 ASSOCIAÇÃO DOS ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS DOS CASOS SUBMETIDOS À TÉCNICA DE HE COM AS VARIÁVEIS CLINICOPATOLÓGICAS.....	70
5.6 ASSOCIAÇÃO DOS ACHADOS IMUNOISTOQUÍMICOS COM AS VARIÁVEIS CLINICOPATOLÓGICAS.....	73
5.7 ANÁLISE DE CONCORDÂNCIA ENTRE OS MÉTODOS HISTOPATOLÓGICO E IMUNOISTOQUÍMICO.....	76
6 DISCUSSÃO.....	78
7 CONCLUSÃO.....	86
8 REFERÊNCIAS.....	87
APÊNDICES.....	93
APÊNDICE A.....	94
APÊNDICE B.....	97
APÊNDICE C.....	101
ANEXO.....	105
ANEXO A.....	106

1 INTRODUÇÃO

Considerado o décimo primeiro câncer mais comum no mundo, o câncer de boca tem sido extensamente investigado nas últimas décadas devido ao seu potencial agressivo. O mais comum é o Carcinoma de Células Escamosas (CCE), com 90% dos casos, definido como uma neoplasia epitelial invasiva com graus variados de diferenciação escamosa e propensão a metástase linfática precoce e extensa, ocorre principalmente em adultos na faixa etária dos 50 aos 70 anos e está associado ao tabagismo e etilismo (OMS, 2005; ZIGON *et al.*, 2011; GAITÁN-CAPEDA, PENICHE-BECERRA E QUEZADA-RIVRA, 2011). Este carcinoma surge principalmente nas membranas mucosas orais e orofaringe (JOHNSON, JAYASEKARA E AMARASINGHE, 2011).

No Brasil, é considerado o câncer mais comum da região da cabeça e pescoço (INCA/MS, 2001) e, segundo dados oficiais, há uma expectativa de aumento do número de diagnósticos ao longo dos próximos anos na medida em que aumentam os casos de câncer de boca (MAROCCHIO *et al.*, 2010; INCA, 2011). Infelizmente, muitos casos de CCEs orais são detectados tardiamente, quando o prognóstico é pior e as chances de cura tornam-se mais difíceis, o que tem contribuído para os altos índices de morbidade e mortalidade dessa doença (PINHEIRO, CARDOSO E PRADO, 2010; SANTOS, BATISTA E CANGUSSU, 2010).

Um dos aspectos primordiais para o diagnóstico e prognóstico dos pacientes com CCE oral é o conhecimento das características histopatológicas da lesão como a gradação do tumor, a invasão vascular, definida pela presença de ninhos de células tumorais no interior do espaço vascular, a invasão perineural, caracterizada pela presença de ninhos de células tumorais no espaço perineural, e a relação tumor/hospedeiro (BRYNE *et al.*, 1992; OMS, 1997; NIIMI *et al.*, 2001; BRANDWEIN-GENSLER *et al.*, 2005; KURTZ *et al.*, 2005; DUNN, MORGAN E TREVOR, 2009). A literatura tem relatado que a invasão linfovascular e a invasão perineural dos CCEs orais estão associadas a prognósticos ruins, bem como às elevadas taxas de recorrência, comportamento agressivo, metástases e baixa sobrevida (NIIMI *et al.*, 2001; OMS, 2005; DUNN, MORGAN E TREVOR, 2009).

O diagnóstico histopatológico de CCE oral tem sido estabelecido pela técnica de Hematoxilina-Eosina (HE), considerada o padrão ouro, devido ao seu baixo custo, fácil execução e utilidade na visualização de vários componentes dos tecidos (JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2008). Todavia, essa técnica oferece pouca informação sobre a natureza química dos componentes dos tecidos, limitação esta que tem sido superada com o uso da imunistoquímica, que auxilia na detecção de proteínas expressas em variados sítios de um tecido. Seu mecanismo básico é o reconhecimento do antígeno por um anticorpo associado a diversos tipos de processos de visualização (RAMOS-VARA, 2005).

Os biomarcadores CD31, CD34, S100 e PGP9.5 têm sido empregados nos estudos imunistoquímicos para identificar com mais precisão vasos e nervos, auxiliando no diagnóstico das invasões perineural e vascular em diferentes doenças, inclusive nos CCEs orais, resultando numa análise morfológica mais detalhada de estruturas relacionadas a sua disseminação, contribuindo para o melhor direcionamento do tratamento e estabelecimento do prognóstico para os pacientes (RALHAN *et al.*, 1999; HOANG, SINKRE E ALBORES-SAAVEDRA, 2001; SHIEH *et al.*, 2004; KURTZ *et al.*, 2005; O'DONNELL *et al.*, 2008; MASTORAKI *et al.*, 2009).

Portanto, estudos que buscam aprofundar a avaliação clínica e microscópica dos CCEs orais associados à imunistoquímica ampliam o conhecimento da patogenia dessa doença favorecendo o entendimento de sua evolução, repercutindo diretamente na qualidade do diagnóstico e na condução dos pacientes atendidos por serviços especializados na prevenção e no diagnóstico do câncer de boca.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS

A Organização Mundial de Saúde (OMS, 2005), por meio da Agência Internacional para Pesquisa sobre Câncer (IARC – *International Agency for Research on Cancer*) define o câncer bucal como aquele que atinge lábios e o interior da cavidade bucal, podendo afetar gengivas, mucosa jugal, palato, dois terços anteriores da língua e suas regiões conexas. O câncer bucal mais frequente é o CCE, definido como uma neoplasia epitelial invasiva com graus variados de diferenciação escamosa e propensão a metástase linfática precoce e extensa, ocorrendo predominantemente em adultos usuários de tabaco e álcool na faixa etária dos 50 aos 70 anos. Todavia, Johnson, Jayasekara e Amarasinghe (2011) destacaram que há uma tendência mundial dessa lesão ser diagnosticada em indivíduos mais jovens.

2.1.1 Epidemiologia

Johnson, Jayasekara e Amarasinghe (2011) e Zigon *et al.* (2011) relataram que essa neoplasia maligna pode ser uma lesão primária que se originou na boca, uma metástase de uma região distante ou uma extensão de uma área adjunta. Afirmaram, ainda que, mais de 90% desses cânceres orais são CCEs originados nas membranas mucosas da boca e orofaringe, principalmente em pacientes do gênero masculino.

A frequência e a prevalência do câncer bucal em relação à idade e ao gênero numa população mexicana no período entre 1989 e 2008 foram avaliadas por Gaitán-Capeda, Peniche-Becerra e Quezada-Rivra (2011), num estudo coorte, a partir de 13.235 biopsias da região de cabeça e pescoço. Foram constatados 298 casos de câncer bucal (138 em homens e 160 em mulheres). Desses casos, 167 eram de CCEs orais (75 em homens e 92 em mulheres). Observou-se uma tendência para aumento da frequência de câncer bucal, de 10 casos (4 em homens

e 6 em mulheres) em 1989 a 1990 para 37 casos (15 em homens e 22 em mulheres) no período de 2007 a 2008, o que significa um aumento de 270%, sendo significativo somente nas mulheres. A mesma tendência foi observada nos CCEs orais, variando de seis casos (2 em homens e 4 em mulheres) de 1989 a 1990 para 15 (5 homens e 10 mulheres) entre 2007 a 2008, significando um aumento de 56,9%, sendo que nas mulheres a tendência para aumento do número de casos foi significativo, representando 100%.

De acordo com o Registro Hospitalar de Câncer do Instituto Nacional de Câncer, instituição ligada ao Ministério da Saúde (INCA/MS, 2001), o câncer bucal registrou, em 1993, no Brasil, uma ocorrência de 9,2% de todos os tumores malignos, sendo considerado o câncer mais frequente da região da cabeça e pescoço, excluindo-se o câncer de pele.

Para o ano de 2008, o INCA (2007) estimou 14.160 novos casos de câncer bucal em homens e mulheres, considerando todas as faixas etárias, no Brasil, correspondendo a um risco estimado de onze novos casos a cada 100 mil homens e um risco de 3,88 novos casos a cada 100 mil mulheres. Para a região Sudeste, a estimativa foi de 15,21 novos casos para cada 100 mil homens, sendo o quinto tumor mais frequente, enquanto para as mulheres a estimativa foi de 4,64 novos casos para cada 100 mil, na mesma região, sendo o sétimo em frequência. Para o estado do Espírito Santo a estimativa foi de 330 novos casos, sendo 250 para homens (14,42/100 mil habitantes) e 80 para mulheres (4,67/100 mil habitantes).

Concernente ao ano de 2012, o INCA (2011) estimou 9.990 novos casos de câncer bucal em homens e 4.180 em mulheres, considerando todas as faixas etárias, no Brasil, correspondendo a um risco estimado de dez novos casos a cada 100 mil homens e quatro a cada 100 mil mulheres. Para a região Sudeste, a estimativa é de 15 novos casos para cada 100 mil homens, sendo o quinto tumor mais frequente, enquanto para as mulheres a estimativa é de seis novos casos para cada 100 mil, na mesma região, sendo o nono em frequência. Para o estado do Espírito Santo a estimativa foi de 380 novos casos, sendo 260 para homens (14,86/100 mil habitantes) e 120 para mulheres (6,79/100 mil habitantes).

2.1.2 Principais fatores de risco e seus mecanismos

De acordo com a OMS (WHO, 2007) e o INCA (2011), o tabagismo, o etilismo e as infecções pelo papiloma vírus humano (HPV) são os principais fatores de risco para o câncer da cavidade oral. O sinergismo entre o hábito de fumar e beber é potencializador do risco de desenvolvimento deste câncer, aumentando em 30 vezes a sua chance de instalação. O fumo é responsável por cerca de 42% dos óbitos por essa neoplasia, enquanto o etilismo pesado corresponde a aproximadamente 16% dos óbitos.

A OMS (WHO, 2007) elenca outros fatores como dieta com baixa ingestão de frutas e vegetais, sedentarismo, sobrepeso e obesidade. Menciona ainda, a exposição a carcinógenos físicos: a radiação ultravioleta e ionizante, a carcinógenos químicos como benzo(a)pireno, formaldeído e aflatoxinas (contaminantes de alimentos) e fibras como amianto, e a carcinógenos biológicos, por exemplo, infecções por vírus, bactérias e parasitas. Estima-se que até 2030 o número de mortes em decorrência do tabagismo pode dobrar nos países com renda *per capita* média e baixa, caso os padrões atuais do uso de tabaco persistam.

Um estudo longitudinal realizado por Weir e Dunn (1970), a respeito de tabagismo e mortalidade, demonstrou que das 4.706 mortes ocorridas numa população de 68.153 homens, de 35 a 64 anos de idade, 19 foram devidas ao câncer bucal. O risco relativo para morte devido ao câncer bucal foi de 2,76 para os fumantes, enquanto para os não fumantes foi 1. Esse risco aumentava à medida que aumentava o consumo de cigarro chegando até 5, 52 quando ultrapassa mais de um pacote de cigarro por dia.

Gandini *et al.* (2008), por meio de uma meta-análise sistemática de estudos que observaram a relação entre tabagismo e câncer, desde 1961 a 2003, mensuraram o risco de câncer para diversas áreas. Especificamente para o câncer bucal, constataram um risco relativo de câncer de 3,43 (IC 95%= 2,37-4,94) e para ex-fumantes (RR= 1,40; IC 95%= 0,99-2,00), os riscos relativos eram muito menores do que aqueles observados para fumantes ativos.

Num estudo caso-controle em São Paulo, Curitiba, e Goiânia, Franco *et al.* (1989) avaliaram os fatores de risco para carcinomas da língua e outras regiões da

boca numa amostra de 232 casos de carcinoma e 464 pacientes como controle. A maioria dos casos diagnosticados foi em pacientes brancos (83,2%), na faixa etária de 50 a 69 anos (60,7%). Constatou-se que o tabagismo e o consumo de álcool foram os fatores de risco mais prevalentes. Dez anos depois de abandonarem o hábito de fumar cigarros industriais, os ex-fumantes tiveram o risco de câncer bucal reduzido ao mesmo nível dos indivíduos que nunca fumaram. Em contrapartida, os ex-fumantes de cigarros enrolados manualmente também tiveram redução do risco após 10 anos da interrupção do hábito, mas o nível do risco de redução foi maior que aquele dos indivíduos que nunca fumaram.

Iamaroon *et al.* (2004) analisaram os prontuários de 587 casos de tailandeses com CCE oral e encontraram 75 (12,8%) dos afetados com menos de 45 anos de idade, tendo como principal hábito relacionado o uso frequente de tabaco por mais de 10 anos (48% dos indivíduos). Considerando a amostra total (incluindo os indivíduos com mais de 45 anos), esse modo de uso do tabaco estava associado a 56,5% dos casos de CCEs orais. Outros fatores associados foram o consumo frequente de álcool (12,8%) e o hábito de mastigar bétetele (31,3%). O estudo também revelou que a classe trabalhadora de fazendeiros foi a mais afetada tanto nos jovens (40%) quanto na amostra total (28,6%), sendo a língua o local mais afetado (60% e 42,8%, respectivamente).

De acordo com Zain (2001) e IARC (2004), o tabaco foi identificado como a causa evitável líder de morte prematura em todo o mundo. Sua fumaça contém mais de 60 produtos carcinogênicos, dentre eles, hidrocarbonetos aromáticos policíclicos, NNK e NNN. A atividade dos carcinógenos é geralmente exercida através de adutos no ácido desoxirribonucleico (DNA), causando estresse oxidativo aos tecidos, ou seja, a presença constante de moléculas reativas de oxigênio iniciam reações de radicais livres, podendo danificar proteínas, lipídios, carboidratos e o próprio DNA celular; neste último caso o mínimo dano resulta em mutações que podem ser parte da cadeia causal de transformação maligna, enquanto o dano constante no DNA pode acarretar em mais desordens do controle do ciclo celular.

A carcinogênese, definida como o processo de formação do câncer, abrange múltiplas etapas resultantes de várias mutações genéticas e fenotípicas que ocorrem durante o desenvolvimento dos tumores humanos. As características do câncer compreendem seis capacidades biológicas adquiridas, tais como, manter a

sinalização proliferativa, fugir dos supressores de crescimento, resistir a apoptose, permitir a continua replicação, induzir a angiogênese e ativar a invasão e metástase das células cancerígenas. Além disso, o tumor apresenta capacidade de escapar do reconhecimento imunológico, o que propicia sua disseminação para outras regiões do organismo (HANAHAN E WEINBERG, 2011).

Um dos fatores que potencializa o efeito lesivo do tabaco nos tecidos orais é o consumo de álcool, seja o conhecido “consumo social” ou em altas doses, aumentando as chances de se ter câncer na cavidade oral e orofaringe. O etanol e a água são os principais componentes das bebidas alcoólicas, que também contém compostos aromatizantes voláteis e não voláteis. As principais enzimas que metabolizam o álcool são a desidrogenase do álcool, responsável por oxidar o etanol em acetaldeído, e a enzima desidrogenase aldeído, que detoxifica o acetaldeído em acetato. O acetaldeído é responsável pelo efeito carcinogênico oral do etanol, devido a seus múltiplos efeitos mutagênicos no DNA. O álcool também age de duas formas para promover a oncogênese (OGDEN E WIGHT, 1998; WHO, 2007).

Segundo Howie *et al.* (2001), o etanol danifica os fosfolípidios das membranas celulares e aumenta a permeabilidade, além de ampliar a penetração de carcinógenos específicos do tabaco através da mucosa oral. Além disso, prejudica os mecanismos de reparo no DNA, e age como um solvente, permitindo aos carcinógenos do tabaco penetrarem no tecido, possivelmente catalisando sua ativação. O álcool também é altamente calorífico, reduzindo o efeito protetor de alimentos benéficos como frutas e vegetais por deprimir o apetite. O álcool é hepatotóxico, minimizando a eficácia dos sistemas enzimáticos centrais para a detoxificação de carcinógenos.

Uma meta-análise realizada por Tramacere *et al.* (2010) demonstrou as fortes relações dose-resposta do consumo de álcool para o desenvolvimento de câncer bucal. As razões de risco encontradas foram 1,29 para o consumo de 10 gramas de álcool por dia, 1,85 para o consumo de 25 gramas por dia, 3,24 para o consumo de 50 gramas por dia, 5,42 para o consumo de 75 gramas por dia, 8,61 para o consumo de 100 gramas por dia e 13,02 para o consumo de 125 gramas por dia.

Com base no mesmo mecanismo de ação do álcool, Johnson, Jayasekara e Amarasinghe (2011), destacaram que o uso de colutórios bucais que contêm álcool

vem sendo alvo de pesquisas com intuito de verificar sua possível relação com o desenvolvimento do câncer bucal, principalmente em fumantes. Os resultados contraditórios, ora demonstraram menor ou igual risco de câncer bucal entre os usuários dos colutórios comparados com os não usuários, outrora alguns estudos não demonstraram risco excessivo para câncer bucal proveniente dos enxaguatórios que contém álcool. Assim, concluíram que há uma base biológica plausível para risco associado aos enxaguatórios que contém álcool, principalmente em fumantes, e é sempre prudente lembrar que ausência de evidência não é evidência de ausência.

2.1.3 Características clínicas e diagnóstico

As características clínicas do CCEs orais apresentam-se de forma variada, incluindo a exofítica, caracterizada por formação de massa, aspecto fungiforme, papilar, ou verrucosa; endofítica, com feições invasivas crateriforme, ulcerada; a forma leucoplásica; eritroplásica e a eritroleucoplásica. Quando a lesão está em sua fase inicial, provavelmente se manifesta com aspectos clínicos semelhantes aos das lesões cancerizáveis leucoplásicas e eritroplásicas. (NEVILLE *et al.*, 2009).

O carcinoma de lábios geralmente ocorre entre os 50 e 70 anos de idade, principalmente nos homens, origina-se no vermelhão do lábio e aparece na forma de úlcera crônica que não cicatriza ou como uma lesão exofítica (REGEZI, CIUBBA E JORDAN, 2008).

Os carcinomas de língua e de assoalho bucal afetam preferencialmente homens, tabagistas e etilistas, na sexta a oitava décadas de vida, de modo assintomático, podendo ser sintomático e gerar disfagia nos estágios avançados. Podem apresentar-se como uma úlcera endurecida que não cicatriza, uma eritroplasia, uma leucoplasia ou uma eritroleucoplasia, comumente na borda lateral posterior da língua. Quando se infiltram nos tecidos moles do assoalho bucal limitam a movimentação da língua (REGEZI, CIUBBA E JORDAN, 2008).

Outros locais onde o CCE oral atinge são a mucosa jugal, a gengiva e o palato. Na mucosa jugal e na gengiva são mais comuns em homens na sétima década de vida, podendo se apresentar na forma leucoplásica ou como uma úlcera que não cicatriza, ou até mesmo como lesão exofítica. Sua massa tem base larga semelhante a uma verruga, que se desenvolve lentamente e é muito bem diferenciada. No palato, o carcinoma pode atingir o tecido mole e os tecidos contíguos das fauces representando 10% a 20% das lesões intrabuciais. É rara sua ocorrência no palato duro. Manifestam-se como placas assintomáticas vermelhas ou brancas, ou como massas ulceradas ou ceratóticas (REGEZI, CIUBBA E JORDAN, 2008).

De acordo com a União Internacional Contra o Câncer (UICC) (Ministério da Saúde, 2004) há regras para a classificação dos tumores malignos com base na extensão anatômica da doença, o chamado sistema TNM que, mediante exame físico e diagnóstico por imagem, leva em consideração três componentes: T, a extensão do tumor primário; N, a ausência ou presença e a extensão de metástase em linfonodos regionais; M, a ausência ou presença de metástase à distância. A adição de números a esses três componentes indica a extensão da doença maligna. No caso do lábio e cavidade oral a classificação é aplicável na mucosa dessas regiões, incluindo os carcinomas das glândulas salivares menores. A classificação clínica propriamente dita abrange o que se segue (Quadros 1 e 2):

Lábio, Cavidade Oral	
TX	O tumor primário não pode ser avaliado
T0	Sem evidência de tumor primário
Tis	Carcinoma <i>in situ</i>
T1	Tumor ≤ 2 cm em sua maior dimensão
T2	Tumor > 2 cm ≤ 4 cm em sua maior dimensão
T3	Tumor > 4 cm em sua maior dimensão
T4a	(Lábio) Tumor que invade estruturas adjacentes: cortical óssea, nervo alveolar inferior, assoalho da boca, ou pele da face (mento ou nariz) (Cavidade oral) Tumor que invade estruturas adjacentes: cortical óssea, músculos profundos/extrínsecos da língua (genioglosso, hioglosso, palatoglosso e estiloglosso), seios maxilares ou pele da face
T4b	(Lábio e Cavidade Oral) Tumor que invade o espaço mastigador, lâminas pterigoides ou base do crânio ou envolve a artéria carótida interna
NX	Linfonodos regionais não podem ser avaliados
N0	Ausência de metástases em linfonodos regionais
N1	Metástase em um único linfonodo homolateral, ≤ 3 cm em sua maior dimensão
N2	Metástase em um único linfonodo homolateral, > 3 cm ≤ 6 cm em sua maior dimensão, ou em linfonodos homolaterais múltiplos, nenhum deles > 6 cm em sua maior dimensão; ou em linfonodos bilaterais ou contralaterais, nenhum deles > 6 cm em sua maior dimensão
N3	Metástase em linfonodo > 6 cm em sua maior dimensão
MX	A presença de metástase à distância não pode ser avaliada
M0	Ausência de metástase à distância
M1	Metástase à distância

QUADRO 1 - ESTADIAMENTO CLÍNICO DA DOENÇA (TNM)

Fonte: Ministério da Saúde (2004)

Grupamento por estádios			
Estádio 0	Tis	N0	M0
Estádio I	T1	N0	M0
Estádio II	T2	N0	M0
Estádio III	T1, T2	N1	M0
	T3	N0, N1	M0
Estádio IVA	T1,T2,T3	N2	M0
	T4A	N0, N1, N2	M0
Estádio IVB	Qualquer T	N3	M0
	T4b	Qualquer N	M0
Estádio IVC	Qualquer T	Qualquer N	M1

QUADRO 2 - GRUPAMENTO POR ESTÁDIOS

Fonte: Ministério da Saúde (2004)

Kreppel *et al.* (2010) avaliaram o valor prognóstico da sexta edição da classificação TNM e grupamento por estádios da UICC, revisando o prontuário de 300 pacientes com CCE oral. Constatou-se uma forte associação entre o risco e a progressão do tamanho do tumor primário e metástases em linfonodo cervical. Os pacientes T3 tiveram um maior risco de desenvolvimento de metástases. O grupamento por estádios serviu como um bom preditor para a sobrevida. O estágio de doença avançada foi observado em 57,4% dos pacientes no momento do diagnóstico, sendo 49,7% no estágio IVa e 7,7% no estágio IVb. A sexta edição do UICC apresentou um aumento do risco com o aumento do estágio da doença. A análise univariada demonstrou que o estágio T, o estágio N e o grupamento por estádios são parâmetros úteis para prever a sobrevivência geral em pacientes com CCE oral.

Gervásio *et al.* (2001) avaliaram retrospectivamente 740 casos de CCEs orais numa população adulta (média de 58,6 anos) tratada de 1986 a 1996 em dois hospitais de Belo Horizonte – Minas Gerais e observaram que a língua foi o local

mais frequentemente envolvido (44% dos casos), seguida pelo soalho bucal (16%), gengiva (15%), lábio (14%), palato (9%) e orofaringe (2%). Quanto à raça, os mulatos responderam por 42,8% do câncer bucal, enquanto os negros por 33,5% e os brancos por 23,7%. Além disso, constataram que consumo simultâneo de álcool e tabaco estava associado à maioria dos casos de CCE oral (64%) enquanto o uso do tabaco sozinho estava associado a 32%. Os estádios T e N do tumor foram conhecidos em 385 casos (metade deles no estágio T4) e 362 casos (a maioria no estágio N3) respectivamente. A presença de metástase foi registrada em 190 casos.

De acordo com o INCA (2011), o câncer, por ser uma doença com localizações e aspectos clinicopatológicos múltiplos e não possuir sinais ou sintomas patognomônicos, tem o seu diagnóstico dificultado, levando o profissional a uma suposição diagnóstica através das várias etapas como exame físico, biopsia da lesão, avaliação da extensão da doença mediante o sistema de estadiamento, estudo radiológico, exames de exceção e exames pré-operatórios.

De acordo com Pinheiro, Cardoso e Prado (2010), muitos casos de CCEs orais são diagnosticados tardiamente, quando o prognóstico é pior e as chances de cura tornam-se mais difíceis. Isso tem contribuído para os altos índices de morbidade e mortalidade dessa doença. Alonge e Narendran (2003) apontaram as deficiências na formação profissional como fatores contribuintes para o diagnóstico tardio de CCE oral.

Santos, Batista e Cangussu (2010) caracterizaram o diagnóstico tardio de câncer bucal no estado de Alagoas mediante um estudo longitudinal em 74 pacientes diagnosticados com CCE oral nos anos de 2007 e 2008. A média de idade dos pacientes diagnosticados foi de 57,22 anos. A maioria dos pacientes (78,4%) apresentou tumores classificados em estádios III e IV, isto é, doença avançada, enquanto os demais pacientes (21,6%) apresentaram tumores nos estádios I e II (doença precoce).

Um estudo realizado por Marocchio *et al.* (2010) demonstrou que houve um aumento do número de casos de CCEs orais entre 1960 e 2008, na cidade de São Paulo-SP. Nos períodos de 1960 a 1980 e 1981 a 1990 foram diagnosticados ao todo 422 casos, enquanto nos períodos de 1991 a 2000 e de 2001 a 2008 foram diagnosticados 463 e 679 casos, respectivamente. Os pacientes masculinos e brancos foram os mais afetados em todos os períodos avaliados, notando-se, no

entanto, uma tendência de aumento de casos diagnosticados em mulheres a partir de 1991. No período de 2001 a 2008, houve um aumento da incidência de lesões que mediam de 1 mm a 10 mm (22,5%), comparado com os dois primeiros períodos (7,4% e 5,3%, respectivamente), e uma redução da incidência (19%) de lesões com mais de 60 mm, comparado com o terceiro período (28,9%), o que pode indicar uma tendência de diagnóstico precoce.

Segundo a OMS (2007), o diagnóstico precoce consiste na consciência, por parte do público e profissionais da saúde, dos primeiros sinais e sintomas do câncer para facilitar o diagnóstico antes que a doença se torne avançada, proporcionando uma terapia mais efetiva e simples. A importância do diagnóstico precoce está em não apenas reduzir custos de um tratamento, mas principalmente em os pacientes poderem ser curados ou terem suas vidas prolongadas significativamente.

2.1.4 Características histopatológicas

A OMS (2005), com base em características arquiteturais e citológicas epiteliais, estabeleceu critérios que facilitaram o diagnóstico de CCE oral e auxiliaram na determinação da sua gradação histopatológica (Quadro 3).

Alterações arquiteturais e citológicas	
Arquiteturais	Citológicas
Estratificação epitelial irregular	Variação anormal do tamanho nuclear (anisonucleose)
Perda de polaridade das células basais	Variação anormal do formato nuclear (pleomorfismo nuclear)
Formações em gota	Variação anormal do tamanho celular (anisocitose)
Elevado número de figuras mitóticas	Variação anormal do formato celular (pleomorfismo celular)
Mitoses superficiais anormais	Aumento da relação núcleo-citoplasma
Queratinização prematura de células individuais (disceratose)	Aumento do tamanho nuclear
Pérolas córneas	Figuras mitóticas atípicas
	Aumento do número e tamanho de nucléolos
	Hipercromatismo

QUADRO 3 - CRITÉRIOS UTILIZADOS PARA DIAGNOSTICAR AS ALTERAÇÕES ARQUITETURAS E CITOLÓGICAS DO EPITÉLIO

Fonte: OMS (2005)

De acordo com a OMS (1997), os tumores são tradicionalmente graduados em bem diferenciados, moderadamente diferenciados e pouco diferenciados, conforme as características histopatológicas apresentadas, baseadas no sistema de gradação de Broders (1921). O CCE bem diferenciado se assemelha bastante ao epitélio escamoso normal, enquanto o CCE moderadamente diferenciado contém pleomorfismo nuclear distinto e atividade mitótica, inclusive, mitoses anormais, e geralmente há menos queratinização. O CCE pouco diferenciado, por sua vez, exibe predomínio de células imaturas, com várias mitoses típicas e atípicas, e mínima queratinização (Quadro 4).

Grau	Características histopatológicas
1 (<i>bem diferenciado</i>)	Características histopatológicas semelhantes ao revestimento estratificado pavimentoso da mucosa oral. Numerosas pérolas córneas, importante queratinização celular com pontes intercelulares, menos de duas mitoses por campo histopatológico, observando-se em maior aumento, raras mitoses atípicas e escassas células gigantes multinucleadas, pleomorfismo celular e nuclear muito reduzidos.
2 (<i>moderadamente diferenciado</i>)	Neoplasma com características intermediárias entre o grau bem diferenciado (1) e o grau pouco diferenciado (3). Pérolas córneas escassas ou ausentes, queratinização celular e pontes intercelulares aparentes, duas a quatro mitoses por campo histopatológico, algumas mitoses atípicas, moderado pleomorfismo celular e nuclear, escassas células gigantes multinucleadas.
3 (<i>pouco diferenciado</i>)	Histologicamente e citologicamente há apenas uma mínima semelhança com o epitélio normal da mucosa oral. Raras pérolas córneas, queratinização celular quase inexistente e ausência de pontes intercelulares, mais de quatro mitoses por campo histopatológico, frequentes mitoses atípicas, pleomorfismo celular e nuclear pronunciado, frequentes células gigantes multinucleadas.

QUADRO 4- GRADAÇÃO HISTOPATOLÓGICA

Fonte: OMS (1997)

Ribeiro *et al.* (2009), utilizando o sistema de gradação, analisaram as características clínicas e histopatológicas do CCE oral em 46 pacientes brasileiros jovens (≤ 45 anos), a maioria (65%) apresentava a doença nos estágios clínicos III e IV e eram tabagistas (76%) e etilistas (70%), sendo os homens (83%) mais acometidos pela doença do que as mulheres (17%). As principais localizações anatômicas do tumor foram o assoalho bucal (30%) e a língua (28%). Com relação às características histopatológicas, verificou-se que 50% dos casos apresentavam-se moderadamente diferenciados, 30% pouco diferenciado e 9% bem diferenciados.

Posto isso, concluiu-se que o CCE oral em pacientes jovens apresenta o mesmo comportamento do CCE oral na população geral.

Arduino *et al.* (2008), em um estudo retrospectivo de 334 casos de CCEs orais da Universidade de Turin, Itália, avaliaram os fatores prognósticos com base no sistema de gradação adotado pela OMS/Broders (1921). A maioria dos pacientes (176) apresentava lesão moderadamente diferenciada e a faixa etária mais acometida foi dos 41 anos aos 60 anos (52,7%), predomínio do gênero masculino (54,5%), atingindo principalmente o bordo lateral da língua (33,3%). A taxa de sobrevivência cumulativa foi de 76,8% em 5 anos após o diagnóstico inicial e de 59% em 10 anos, sendo que os pacientes T3 e T4 tiveram prognóstico menos favorável do que aqueles com valores menores, com 65,3% de mortalidade para T3 e 73,5% para T4. Constataram assim, relação entre a gradação de malignidade da OMS/Broders, o tamanho do tumor, o envolvimento locorregional e as taxas de sobrevivência, ressaltando a utilidade da diferenciação do tumor em prever a evolução clínica e o desfecho do CCE oral.

A OMS (2005) destacou que, embora a queratinização provavelmente esteja mais presente nos carcinomas bem ou moderadamente diferenciados, não deve ser considerada um critério histopatológico importante na gradação desses tumores, haja vista que a maioria dos CCEs é moderadamente diferenciada, logo graduar pela diferenciação, tem valor prognóstico limitado, quando comparado ao padrão de invasão.

Bryne *et al.* (1992) comprovaram que o padrão de invasão tem valor prognóstico, enquanto o sistema de gradação histopatológico de Broders (1921) não tem valor prognóstico. Quanto ao fronte invasivo, o crescimento do tumor nessa área pode apresentar um padrão expansivo, um infiltrativo, ou ambos. O padrão de crescimento expansivo é caracterizado por grandes ilhas tumorais com margens expansivas bem definidas e está associado a um melhor prognóstico. O padrão de crescimento infiltrativo, por sua vez, é caracterizado por células tumorais individuais ou pequenos cordões irregulares dispersos, com margens infiltrantes pouco definidas e está associado a um prognóstico mais agressivo (Quadro 5).

Gradação das margens invasivas (padrão de invasão)				
Pontuação (Scoring)				
Característica morfológica	1	2	3	4
Grau de queratinização	Altamente queratinizado (> 50% das células)	Moderadamente queratinizado (20-50% das células)	Queratinização mínima (5-20% das células)	Sem queratinização (0-5% das células)
Pleomorfismo nuclear	Pouco pleomorfismo nuclear (> 75% das células maduras)	Moderadamente abundante pleomorfismo nuclear (50-75% das células maduras)	Abundante pleomorfismo nuclear (25-50% das células maduras)	Extremo pleomorfismo nuclear (0-25% das células maduras)
Padrão de invasão	Compressivo, bordas infiltrantes bem delineadas	Infiltrante, cordões sólidos, bandas ou fios	Pequenos grupos ou cordões de células infiltrantes (n> 15)	Marcante e disseminada dissociação em grupos pequenos e/ou em células individuais
Infiltrado linfoplasmocitário	Marcante	Moderado	Leve	Ausente

QUADRO 5- SISTEMA DE GRADAÇÃO DAS MARGENS INVASIVAS (PADRÃO DE INVASÃO)

Fonte: Bryne *et al.* (1992)

Anneroth e Hansen (1984) propuseram uma análise de biopsias representativas dos carcinomas, além de cortes seriados dos espécimes cirúrgicos, principalmente em lesões T3 e T4, de modo que fosse realizada uma avaliação das alterações morfológicas do câncer no fronte invasivo, abrangendo tanto a população celular tumoral quanto a interface entre as células tumorais e o tecido hospedeiro, cuja finalidade era não se restringir apenas à avaliação das células tumorais, como a classificação de Broders (1921), uma vez que esta teria um significado limitado. Concluíram que a falta de informações sobre o fronte invasivo e a relação tumor/hospedeiro nos laudos histopatológicos podem ser os motivos de equívocos nos diagnósticos da gradação.

Posteriormente, analisando biopsias de CCEs de glote T1 e T2 de 120 pacientes tratados com radioterapia, Bryne, Jenssen e Boyssen (1995) provaram que o sistema de gradação histopatológico no fronte invasivo profundo tem elevado valor prognóstico e influencia diretamente o plano de tratamento desses pacientes, uma vez que o prognóstico ruim do tumor foi correlacionado com a recorrência do

tumor no local submetido à radioterapia. Foi aventada a possibilidade desse valor prognóstico ser estendido para outros cânceres, devido às características do fronte invasivo.

Com base nas características histopatológicas da invasão, Brandwein-Gensler *et al.* (2005) demonstraram o valor da avaliação de risco histopatológico em espécimes de CCEs orais. Os autores associaram o conhecido *Worst Pattern of Tumor Invasion* (WPOI), graduado em cinco níveis (Quadro 6) ao padrão de resposta linfocítica limitada no tecido circunjacente, graduada em três padrões (Quadro 7).

Pior padrão de invasão tumoral	
WPOI	Característica
1	Fronte invasivo com amplas margens expansivas
2	Fronte invasivo com margens expansivas em forma de dedos; ilhas tumorais separadas
3	Ilhas invasivas (>15 células/ilha)
4	Ilhas invasivas (<15 células/ilha)
5	Satélites tumorais com distância \geq 1 milímetro do tumor

QUADRO 6- DEFINIÇÃO DO PADRÃO DE INVASÃO (WPOI)

Fonte: Brandwein-Gensler *et al.* (2005)

Padrão de resposta linfocítica	
LR	Característica
1	Margem de infiltração linfocítica contínua e densa
2	Manchas de infiltrado linfoide denso descontínuo
3	Resposta linfocítica limitada ou ausente

QUADRO 7- DEFINIÇÃO DO PADRÃO DE RESPOSTA LINFOCÍFICA (LR)

Fonte: Brandwein-Gensler *et al.* (2005)

Kumar *et al.* (2010), em sua visão geral da inflamação, definem-na como uma resposta fundamentalmente protetora do organismo destinada a livrá-lo dos agentes agressivos, bem como promover o reparo necessário para sua sobrevivência. A inflamação crônica tem sido implicada na progressão do câncer, podendo ocorrer posteriormente à inflamação aguda ou se iniciar insidiosamente, como uma resposta de baixo grau e latente, sem nenhuma manifestação de uma reação aguda.

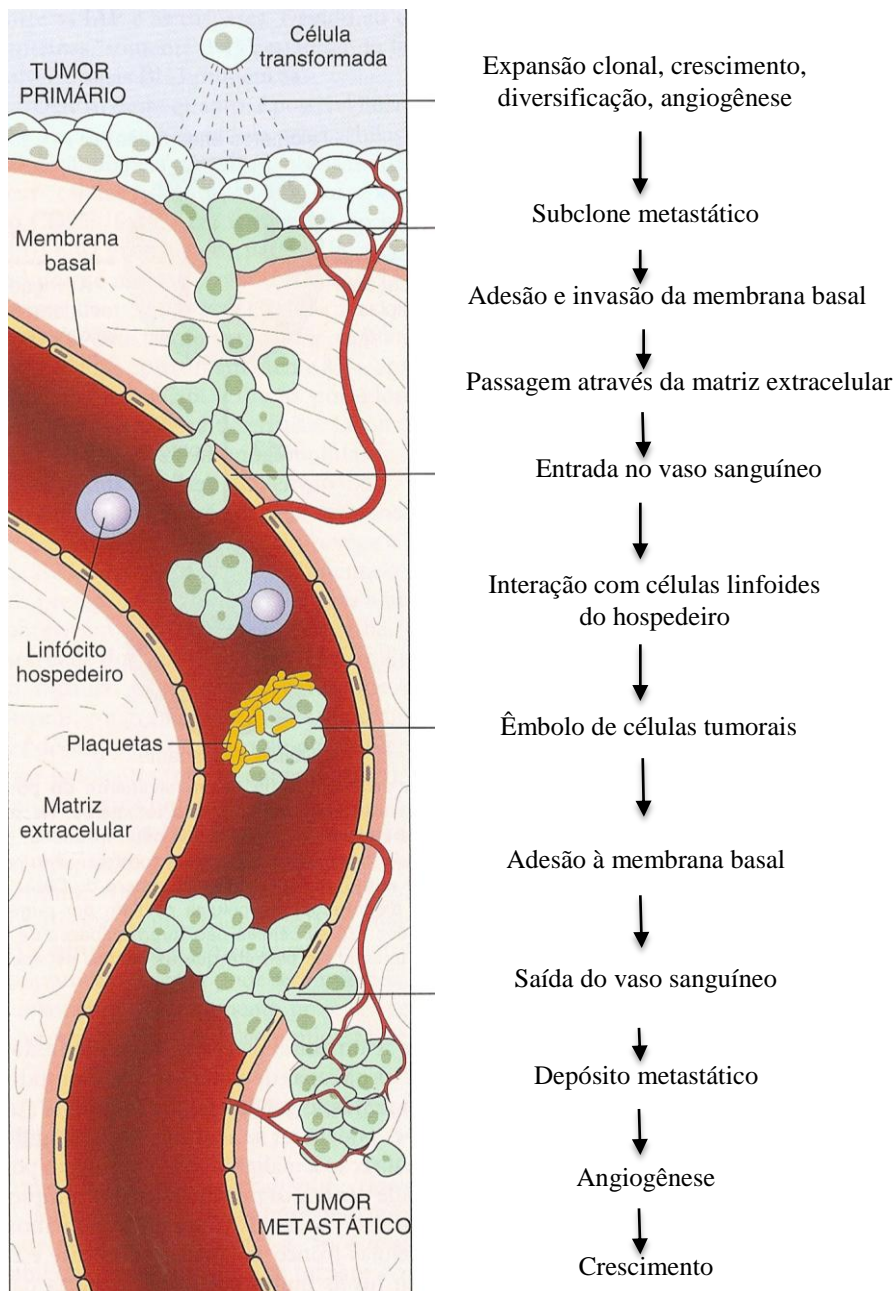
Batista *et al.* (2010) compararam o estadiamento clínico, os fatores de risco e o tempo de sobrevivência com as características microscópicas do CCE oral (n=54) e do lábio (n=37). Para ambas regiões, houve predomínio do sexo masculino. A média de idade para o CCE oral foi de 58.82 anos (T1-T2) e de 61.43 anos (T3-T4). As áreas mais afetadas foram o lábio inferior (89,19%) e a língua (41,30%). Todos os carcinomas labiais foram classificados como grau 1, segundo a classificação da OMS, enquanto a maioria dos CCEs orais foi grau 3. Além disso, um número significativo de casos com infiltrado inflamatório intenso localizou-se adjacente ao fronte tumoral nos carcinomas labiais tanto T1-T2 (75%) quanto T3-T4 (87,5%) comparado aos CCEs orais (T1-T2=21,43%; T3-T4=40,54%). Concluíram que ambos os carcinomas apresentaram características clínicas e microscópicas distintas que refletem em diferentes comportamentos biológicos e prognósticos.

Lundqvist *et al.* (2012) avaliaram a inflamação estromal em CCE da língua de 94 pacientes, levando-se em conta o pior padrão de invasão tumoral e a resposta linfocítica (sistema de Brandwein-Gensler *et al.*, 2005). Constataram que a maioria (84%) dos pacientes apresentaram pequenas ilhas tumorais invasivas cujo tamanho era inferior a 15 células por ilha (grau 4). Concluíram que os tumores de língua apresentaram um padrão de crescimento invasivo segmentado e uma resposta inflamatória intensa na interface do tumor. Além disso, os resultados indicaram que a avaliação da intensidade do infiltrado inflamatório na interface tumoral no CCE de língua pôde fornecer informação da potencial importância para a escolha do tratamento e prognóstico.

De acordo com Niimi *et al.* (2001), OMS (2005) e Dunn, Morgan e Trevor (2009) os CCEs orais, quando associados às invasões em estruturas como nervos e vasos, apresentam propensão a metástases, elevadas taxas de recorrências e comportamento agressivo, sendo fundamental o diagnóstico precoce das condições

invasivas, pois influenciarão diretamente no prognóstico e na sobrevivência dos pacientes.

A invasão de um tumor maligno primário e seu crescimento em um sítio distante ocorre a partir da degradação da membrana basal, migração das células tumorais através do tecido conjuntivo, disseminação por via vascular, colonização e crescimento do neoplasma em locais distantes, como ilustrado no Esquema 1:



Esquema 1 - Etapas sequenciais envolvidas na disseminação hematogênica de um tumor
 Fonte: Stricker e Kumar (2010)

2.2 INVASÕES VASCULAR E PERINEURAL

Assim como os tecidos normais, os tumores requerem distribuição de oxigênio e nutrientes e a remoção de resíduos que se difundem a partir de vasos sanguíneos. As células cancerosas estimulam a neovascularização, cujo papel principal é fornecer nutrientes e oxigênio ao tecido tumoral, além de estimular o seu crescimento e metástase (AHMAD E HART, 1997; STRICKER E KUMAR, 2010).

A angiogênese ou neovascularização são termos utilizados para descrever os mecanismos de formação de novos vasos sanguíneos em adultos, dentre eles: a) a ramificação e extensão de vasos preexistentes; b) o recrutamento de células progenitoras endoteliais da medula óssea (vasculogênese). Na angiogênese a partir de vasos preexistentes, ocorre a vasodilatação e aumento da permeabilidade desses vasos, degradação da matriz extracelular, migração, proliferação e maturação das células endoteliais, além de recrutamento de células periendoteliais. Na angiogênese a partir das células precursoras endoteliais (angioblastos), verificou-se que essas células podem ser recrutadas da medula óssea para os tecidos, onde darão início à angiogênese. Os angioblastos contribuem para a neovascularização de órgãos isquêmicos, feridas cutâneas e tumores (AHMAD E HART, 1997; KUMAR *et al.*, 2010).

A invasão de CCEs orais em vasos foi definida pela presença de grupos isógenos de queratinócitos (ninhos de células tumorais) no interior do espaço vascular, aderidos ao endotélio de vaso linfático ou sanguíneo (KURTZ *et al.*, 2005). Essas invasões vasculares têm sido associadas à disseminação do tumor maligno para outras regiões do organismo (OMS, 2005).

Niimi *et al.* (2001) estudaram a invasão vascular em CCEs da mucosa oral de 26 casos, diferenciando os vasos linfáticos e sanguíneos, a fim de demonstrar ninhos do carcinoma ao redor das membranas basais endoteliais e constataram que o crescimento do tumor exerce uma pressão nas paredes dos vasos. Nos vasos linfáticos, nos casos em que os ninhos do carcinoma apenas se lhes aderiram, as paredes foram empurradas para dentro e as células endoteliais foram esticadas; nos casos em que houve invasão do carcinoma, as células endoteliais foram rompidas e os ninhos ficaram diretamente expostos ao lúmen, sendo esta a principal via de

entrada. Nos vasos sanguíneos, a invasão ocorreu predominantemente por cordões de células de carcinoma que se estendiam como tentáculos na periferia, mas a invasão por células isoladas não foi encontrada em nenhuma área. Este estudo, portanto, demonstrou que a pressão mecânica tem um papel importante na invasão vascular de CCE oral humano.

Nakayama *et al.* (1999) estudaram a relação entre vasos linfáticos dentro ou ao redor de CCEs orais e encontraram uma correlação entre o modo de invasão e o diâmetro dos vasos linfáticos. Nos arredores do tumor, observaram que os vasos linfáticos possuíam maior diâmetro e esse diâmetro aumentava conforme o aumento da invasão do tumor.

A invasão neoplásica perineural, por sua vez, foi definida pelo envolvimento de ninhos de células tumorais no espaço perineural (DUNN, MORGAN E TREVOR, 2009), tendo sido associada ao aumento da recorrência local e metástases regionais (OMS, 2005).

No sistema nervoso periférico, as fibras nervosas são agrupadas em feixes que originam os nervos. Estes se apresentam com coloração esbranquiçada por causa de seu conteúdo de mielina e colágeno, sendo morfológicamente estruturado por um tecido de sustentação constituído por uma camada fibrosa mais externa de tecido conjuntivo denso (epineuro), que reveste o nervo e preenche os espaços entre os feixes de fibras nervosas, os quais são individualmente revestidos pelo perineuro, isto é, uma bainha de várias camadas de células achatadas, justapostas que servem como barreira à passagem de macromoléculas e mecanismo de defesa. Os axônios são encontrados no interior da bainha de mielina, sendo formada por células de Schwann, com sua lâmina basal e um envoltório conjuntivo constituído principalmente por fibras reticulares sintetizadas pelas células de Schwann, chamado endoneuro (MACHADO, 2000; JUNQUEIRA E CARNEIRO, 2008).

Dunn, Morgan e Trevor (2009) apresentaram um estudo sobre invasão perineural abordando seu significado, identificação e a proposta de uma definição padronizada. Quanto ao significado, afirmaram que a invasão perineural se correlaciona com elevadas taxas de recorrência, comportamento agressivo e baixa sobrevida. Nesse contexto, destacaram que um câncer que ganha capacidade de invadir o perineuro encontra um trajeto de baixa resistência relativamente protegido das defesas do hospedeiro, o que facilita a difusão do câncer ao longo do nervo,

podendo atingir diversas regiões do organismo. A invasão perineural é um processo lento, e quanto antes diagnosticada melhor será o prognóstico para o paciente. No diagnóstico histopatológico, deve se dar atenção à fibrose peritumoral, que se refere à presença de anéis concêntricos de tecido fibroso que, junto com os ninhos de células tumorais, podem imitar a invasão perineural, o que dificulta sua distinção do tecido nervoso sem a ajuda de imunomarcadores, como o S100.

O mecanismo de invasão perineural ainda não está bem compreendido, mas algumas teorias foram propostas para explicá-lo. A principal delas destaca que o espaço perineural fornece um microambiente adequado para o crescimento de células provenientes de malignidades neurotrópicas, provavelmente devido a fatores celulares e seus respectivos receptores que atraem as células cancerígenas e estimulam seu crescimento ao longo dos nervos, podendo tornar-se intimamente associadas às células de Schwann e aos axônios no endoneuro. Além disso, o considera com uma forma de difusão metastática do tumor (BINMADI E BASILE, 2011).

Fagan *et al.* (1998) estudaram retrospectivamente as características clinicopatológicas de 142 pacientes com CCE da cavidade oral e orofaringe e da hipofaringe ou laringe e detectaram a presença de invasão perineural em 52% dos casos avaliados pela técnica HE, em nervos de menos de 1 mm de diâmetro, com padrões arquiteturais sólidos ou não sólidos. Os padrões não sólidos pareceram ser mais invasivos e tenderam a acompanhar o trajeto do nervo, diferente dos padrões sólidos que fluíram ao redor do nervo. Além disso, constataram recorrência em 30% dos casos de CCE oral e orofaringe. A invasão perineural foi associada à recorrência local e mortalidade específica à doença, mas não com recorrência regional ou metástase distante.

Rahima *et al.* (2004) avaliaram a ocorrência e o significado prognóstico da invasão perineural em CCEs orais e da orofaringe. Nos 101 pacientes diagnosticados com, a invasão perineural estava presente em 25,7% dos casos. Com relação ao grau de diferenciação histopatológica, 62 (61,4%) eram moderadamente diferenciados. A invasão neoplásica em espaços linfático-vasculares foi demonstrada em 15 pacientes (14,9%). Constatou-se que a invasão perineural estava associada com a diferenciação do tumor, metástases em linfonodos e profundidade de invasão (< 4 mm). A taxa de sobrevivência em 5 anos

para pacientes com invasão perineural foi de 56,6%, enquanto para os pacientes sem invasão perineural foi de 94,6%, o que permitiu concluir que a invasão perineural é um importante indicador do desfecho dos pacientes com CCE oral e da orofaringe.

Tai *et al.* (2012) avaliaram os riscos e as implicações clínicas da invasão perineural em CCE de língua T1-2 em 190 pacientes, utilizando o método de coloração HE e constataram que a espessura de tumor superior a 5 mm, a invasão perineural positiva e a invasão linfovascular positiva, independentemente, são preditores do envolvimento de linfonodos cervicais. Todavia, somente a invasão perineural positiva foi associada a uma taxa ruim de sobrevida específica à doença (5 anos; 75,6%), enquanto a ausência de invasão perineural do tumor foi associada a uma taxa de sobrevivência específica à doença igual a 91,8%, para o mesmo período de 5 anos. Dessa forma, concluíram que a invasão perineural é uma característica crucial para o CCE de língua e deve ser preconizada em um diagnóstico patológico regular.

A identificação precisa de estruturas como vasos e nervos têm sido realizada por diversos autores (RALHAN *et al.*, 1999; HOANG, SINKRE E ALBORES-SAAVEDRA, 2001; SHIEH *et al.*, 2004; KURTZ *et al.*, 2005; O'DONNELL *et al.*, 2008) através da utilização de biomarcadores, no intuito de auxiliarem no diagnóstico das condições invasivas e no tratamento dos pacientes com CCEs orais, por meio da detecção de proteínas como, por exemplo, CD31, CD34, PGP9.5 e S100.

2.3 BIOMARCADORES VASCULARES

Algumas famílias de moléculas como CD31 e CD34, que estão presentes nas membranas das células endoteliais, são utilizadas no registro da densidade microvascular peritumoral e na invasão neoplásica vascular.

2.3.1 Proteína CD31

Newman *et al.* (1990), realizaram um estudo para identificar glicoproteínas de superfície que poderiam participar na função da plaqueta e da célula endotelial. Utilizando anticorpo policlonal, identificaram a molécula de adesão da célula endotelial e plaqueta – 1 (PECAM-1), com peso molecular de 130 kDa. Essa proteína está presente nas células endoteliais e plaquetas, tendo sido identificada como uma molécula de junção celular endotelial, também conhecida como CD31 (ALBELDA *et al.*, 1991; DELISSER, NEWMAN E ALBELDA, 1994; JACKSON, 2003; PRIVRATSKY *et al.*, 2011).

O gene para essa proteína está localizado no braço longo do cromossomo 17, região esta onde também estão localizadas outras moléculas de adesão expressas nas plaquetas e células endoteliais. A molécula CD31 é encontrada no endotélio contínuo de todos os tipos de vasos, incluindo artérias, arteríolas, vênulas, veias e capilares não senoidais, o que a torna um útil marcador imunoistoquímico dos vasos sanguíneos, além de também ser expressa em leucócitos (monócitos, neutrófilos e subgrupos peculiares de linfócito T, especialmente, as células TCD8⁺), mediando a agregação entre as células sanguíneas circulantes e dessas ao endotélio vascular (ALBELDA *et al.*, 1991; DELISSER, NEWMAN E ALBELDA, 1994; NEWMAN, 1997; JACKSON, 2003). Também foram sugeridos papéis fisiológicos da proteína CD31 no processo inflamatório e na angiogênese (DELISSER, NEWMAN E ALBELDA, 1994; DELISSER *et al.*, 1997; JACKSON, 2003).

Utilizando anticorpos policlonais e monoclonais para identificação da CD31, Tang *et al.* (1993) demonstraram o envolvimento na mediação da adesão da célula tumoral ao endotélio vascular, uma das etapas mais importantes que acarreta na preferência de metástase por um órgão.

Shieh *et al.* (2004), em seu estudo sobre o papel dos mecanismos angiogênicos e não-angiogênicos no CCE oral, avaliaram a densidade microvascular e invasão tumoral intravascular utilizando a marcação imunoistoquímica com as proteínas CD31 e CD34 em 112 espécimes. Concernente aos dados obtidos com o CD31 detectou-se densidade microvascular peritumoral em todas as amostras, com valores variando de 11 a 30 (média de 20,4) microvasos por campo observado em

aumento de 400X. Com relação à invasão tumoral intravascular, o CD31 evidenciou menos vasos invadidos pelo tumor do que o CD34.

Longatto Filho *et al.* (2007) ao avaliarem 24 casos de CCE de cabeça e pescoço, considerando a densidade vascular sanguínea peritumoral e intratumoral imunomarcadas pelo CD31, constataram valores médios de 9,3 vasos por 10 áreas e 7,2 vasos por 10 áreas, respectivamente. Não houve correlação da densidade vascular sanguínea com os dados clinicopatológicos, dentre eles, idade, gênero, tabagismo, etilismo, região bucal, diferenciação histopatológica, infiltração perineural, estadiamento clínico, metástase e recorrência local.

2.3.2 Proteína CD34

A família da proteína CD34 foi descoberta numa tentativa de desenvolver anticorpos que reconhecessem especificamente pequenos subgrupos de células da medula humana, sendo que o primeiro anticorpo CD34 desenvolvido foi o MY10 por Civin *et al.* (1984), cuja estrutura molecular apresentou um peso de aproximadamente 110 kDa. Tindle *et al.* (1985) desenvolveram o segundo anticorpo monoclonal da família CD34, o B1-3C5, que apresentava as mesmas estruturas e peso molecular do MY10. Até meados de 2001, Lanza, Healy e Sutherland (2001) destacaram que 32 anticorpos monoclonais CD34 tinham sido desenvolvidos, todos apresentando características em comum, como estrutura monomérica e peso molecular.

A CD34 é uma glicofosfoproteína de superfície que se expressa em células progenitoras e células-tronco hematopoiéticas e em células endoteliais de capilares sanguíneos (CIVIN *et al.*, 1984; TINDLE *et al.*, 1985; FURNESS E MCNAGNY, 2006). Embora vários papéis tenham sido atribuídos a esta proteína, suas funções ainda não foram determinadas definitivamente. Dentre as funções descritas na literatura incluem o aumento da proliferação e bloqueio da diferenciação das células-tronco e a promoção da adesão de linfócitos ao endotélio vascular especializado nos tecidos linfoides (NIELSEN E MCNAGNY, 2008).

Nagatsuka *et al.* (2005) avaliaram a relação entre os padrões de imunomarcagem do CD34 e a metástase dos CCEs orais em linfonodos, numa

amostra de 40 casos. Foram identificados 18 casos com metástase em linfonodos. Constataram muitos microvasos com forte atividade de remodelação como também células endoteliais não diferenciadas e células endoteliais imaturas nas áreas de ninho de queratinócitos e na área marginal de infiltração do câncer; o que parece ter relação com metástase. A metástase em linfonodo foi mais frequente (63%) nos casos em que o padrão de invasão era do tipo penetrante, isto é, microvasos invadindo estroma do tumor. Concluiu-se que este padrão de invasão microvascular penetrante se correlaciona com metástase, sugerindo que a metástase está intimamente associada à distribuição de vasos sanguíneos nas regiões de ninho e marginal do câncer, junto com a imaturidade das células endoteliais.

O'Donnell *et al.* (2008) verificaram que o método imunistoquímico com tripla marcação utilizando o CD34, a citoqueratina e a podoplanina, em um único corte histopatológico, foi mais sensível em detectar eventos invasivos (invasões neoplásicas linfática e de vaso sanguíneo) (102 eventos; 79 em vasos linfáticos e 23 em vasos sanguíneos) do que a técnica de coloração com HE (13 eventos). Esse método permite estudar mais detalhadamente o processo de invasão vascular, proporcionando assim entender melhor o fenótipo dos vasos que estão sendo invadidos pelo tumor. Portanto, a tripla marcação pode ajudar a entender a correlação entre linfoangiogênese e metástase, esclarecendo se o vaso recém-formado é mais fácil de invadir o estroma do tumor ou se o tumor também estimula a angiogênese.

2.4 BIOMARCADORES NEURAIIS

Proteínas como PGP9.5 e S100 são utilizadas na identificação de estruturas nervosas, o que facilita o registro da invasão neoplásica perineural.

2.4.1 Proteína S100

A família da proteína S100 foi caracterizada por Kligman e Hilt (1988) como um grupo de proteínas ácidas, de baixo peso molecular bastante enriquecidas no tecido nervoso, além de possuir duas regiões ligantes ao íons Ca^{2+} que, quando

ativadas, produzem mudanças na conformação e na própria ligação proteica. A proteína S100 foi isolada pela primeira vez de uma fração subcelular de cérebro bovino, o que levou os pesquisadores a pensarem que era específica para o sistema nervoso, mas posteriormente constatou-se sua presença em tecidos musculares, glândulas, tecido epitelial e outros (ZIMMER *et al.*, 1995; SCHÄFER E HEIZMANN, 1996).

Algumas funções da proteína S100 foram propostas, particularmente, a tradução do sinal do Ca^{2+} produzindo uma variedade de efeitos biológicos intra e extracelulares. Tais efeitos se relacionam a progressão do ciclo celular, diferenciação celular, interações entre citoesqueleto e membrana, contração muscular e atividade enzimática. Várias desordens, inclusive as doenças neoplásicas estão relacionadas aos níveis elevados dos íons cálcio (ZIMMER *et al.*, 1995; SCHÄFER E HEIZMANN, 1996; DONATO, 2001; SALAMA *et al.*, 2008).

Até o ano de 2004, já tinham sido identificados 20 membros da família S100, com base na homologia da sequência de aminoácidos e propriedades estruturais similares (MORIYAMA-KITA *et al.*, 2004).

Sapkota *et al.* (2008), mediante o método semiquantitativo da reação da cadeia da polimerase por transcrição reversa em 27 casos de CCEs orais, estudaram o perfil da expressão dos membros da família do gene S100 nessa doença. A tecnologia de hibridização genética empregada revelou que quatro membros desta família (S100A4, S100A6, S100A8 e S100A14) podem estar envolvidos no desenvolvimento desse tipo de carcinoma, com suas expressões reguladas para baixo (*down-regulation*). Concluiu-se que seriam necessários mais estudos para compreender melhor os papéis funcionais desses genes no desenvolvimento do CCE oral.

Kurtz *et al.* (2005), realizaram um estudo de revisão de lâminas de 40 casos diagnosticados com CCEs da cavidade oral, a fim de verificar se a incidência de invasão perineural aumentaria com o uso da técnica imunoistoquímica com o anticorpo S100. A média de idade de pacientes diagnosticados foi de 58 anos. Originalmente, a invasão perineural foi identificada em 30% (12 casos) dos tumores; todavia, após a revisão das lâminas em HE o número de casos com invasão perineural aumentou para 62% (25 casos) e para 82% (33 casos) quando foi empregado o marcador S100. Comparando as lâminas originais com as lâminas

coradas pelo S100, não houve casos falsos-positivos, porém foram detectados 21 casos falso-negativos. Sendo assim, evidenciou-se que o método de processamento HE mostrou-se significativamente inferior para a detecção de invasão perineural do que método imunohistoquímico.

2.4.2 Proteína PGP9.5

Jackson e Thompson (1981), utilizando eletroforese de alta resolução denominada ISODALT, detectaram pela primeira vez quatro importantes proteínas específicas ao cérebro humano, não descritas anteriormente, destacando-se a PGP9.5, que possui peso molecular de 27 kDa. Esta proteína citoplasmática é específica para nervos e está amplamente distribuída nos cérebros de vertebrados e em células do sistema neuroendócrino difuso humano (THOMPSON *et al.*, 1983; DAY E THOMPSON, 1987; DAY, HINKS E THOMPSON, 1990).

As técnicas imunohistoquímicas que utilizam anticorpo policlonal para a imunolocalização da PGP9.5 são capazes de demonstrar fibras nervosas periféricas de todos tamanhos com impressionante clareza (WILSON *et al.*, 1988), sendo possível obter informações sobre as terminações nervosas da mucosa oral humana de diferentes regiões intraorais, como, vestibular, labial, gengiva, palatina, da língua, exceto da região sublingual (HILLIGES *et al.*, 1994; HILLIGES *et al.*, 1996). Desta forma, o PGP9.5 foi considerado o melhor biomarcador para nervos, podendo demonstrar os nervos e seus processos em todos os níveis do sistema nervoso (WILSON *et al.*, 1988).

Habash, Hantash e Yunis (2012), utilizando o marcador PGP9.5, avaliaram o padrão de inervação de CCE oral de 30 pacientes com intuito de encontrar uma explicação para a ausência de sintomas de dor desses cânceres. Destes, em apenas dois (6,6%) foram detectadas fibras nervosas marcadas pelo PGP9.5 dentro do próprio tecido tumoral, supondo que não há padrão de inervação aparente dentro do tecido do CCE oral. Todavia, o PGP9.5 marcou fibras nervosas nos tecidos adjacentes ao carcinoma em 12 (40%) dos 30 casos avaliados. Presumiu-se que as fibras nervosas nos tecidos vizinhos são nervos preexistentes.

Ralhan *et al.* (1999) investigaram a relação entre a expressão das proteínas PGP e p53 em pacientes tabagistas com lesões orais malignas, desordens da mucosa oral com potencial de malignização e o impacto desta coexpressão na evolução clínica da doença. Vinte e uma (87,5%) das 24 lesões pré-malignas que expressaram a proteína p53 também expressaram a PGP, enquanto dos 75 CCEs orais, 65 casos (87%) também apresentaram a expressão da PGP, indicando uma correlação significativa da coexpressão dessas proteínas nos CCEs orais e nas lesões pré-malignas. Não foi encontrada nenhuma correlação significativa da coexpressão das proteínas PGP e p53 com o estágio do tumor ou gradação histopatológica, embora a coexpressão dessas proteínas tenha sido indicativo de prognóstico ruim.

Hoang, Sinkre e Albores-Saavedra (2001), ao compararem a expressão do marcador neural PGP9.5 com aquela da proteína S100 em 16 casos de tumores malignos da bainha de nervo periférico por meio de imunoistoquímica, constataram que a maioria dos casos (95%) demonstrou positividade da expressão da PGP9.5, embora não seja um marcador específico para esses tumores, enquanto a proteína S100 teve menos sensibilidade (38%). Tais resultados levaram os autores a concluir que a PGP9.5 é um auxiliar diagnóstico útil para confirmar a origem neural de um sarcoma de célula espinhosa, quando não há expressão da proteína S100.

2.5 PROGNÓSTICO E FATORES PREDITIVOS DO CCE ORAL

De acordo com a OMS (2005), os fatores preditivos para o CCE oral são clínicos e histopatológicos. Entre os clínicos está o estadiamento clínico, o maior preditor de sobrevivência, a localização do tumor, a idade e a comorbidade. Quanto aos fatores preditivos histopatológicos, os principais são as margens de ressecção, a proliferação, a invasão linfovascular e perineural e a disseminação extracapsular de linfonodo. Com relação à invasão linfovascular e perineural, a penetração das células tumorais nos vasos linfáticos e/ou sanguíneos está associada ao aumento da propensão à metástase de linfonodo e/ou metástase distante, tendendo a ocorrer nos CCEs agressivos, o que está relacionado à recorrência e baixa sobrevida. Da

mesma forma, a invasão perineural está associada ao aumento da recorrência local, metástases regionais e uma diminuição da sobrevida.

O prognóstico para sobrevivência do câncer bucal depende do estágio do tumor, assim, na medida em que progride o estágio, observa-se uma diminuição da taxa de sobrevivência de 5 anos (Quadro 8). Sabe-se que alguns pacientes morrem da doença 10 anos após o tratamento inicial, todavia a maioria das mortes ocorre dentro de 5 anos (NEVILLE *et al.*, 2009).

Estádio	Classificação TNM	Taxa de sobrevivência de 5 anos	
		Cavidade Oral	Lábio
I	T1N0M0	68%	83%
II	T2N0M0	53%	73%
III	T3N0M0, ou T1, T2, ou T3N1M0	41%	62%
IV (IVA, IVB e IVC)	T4aN0 ou N1M0 ou T1, T2, T3 ou T4aN2M0, Qualquer TN3M0 ou T4b, qualquer NM0, Qualquer lesão M1	27%	47%

QUADRO 8- RELAÇÃO ENTRE ESTADIAMENTO CLÍNICO TNM E TAXA DE SOBREVIVÊNCIA (5 ANOS) PARA O CCE ORAL

Fonte: Neville *et al.* (2009)

3 OBJETIVOS

3.1 GERAL

Analisar as taxas de invasões perineural e vascular em lesões de CCE oral de pacientes do Programa de Prevenção e Diagnóstico de Câncer de Boca e Lesões de Boca do Curso de Odontologia da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), diagnosticados entre os anos de 2004 a 2011.

3.2 ESPECÍFICOS

- A) Avaliar e descrever os aspectos histopatológicos dos CCEs orais, levando em consideração o grau de diferenciação das lesões;
- B) Identificar e quantificar as taxas de invasões perineural e vascular dos CCEs orais, por meio da técnica de coloração HE;
- C) Analisar semi-quantitativamente a densidade microvascular dos CCEs orais, por meio de técnica imunoistoquímica com o anticorpo CD31;
- D) Identificar e quantificar as taxas de invasão vascular dos CCEs orais por meio de imunomarcção para a molécula CD34;
- E) Identificar e quantificar as taxas de invasão perineural dos CCEs orais por meio de imunomarcção para as moléculas S100 e PGP9.5;
- F) Realizar análise comparativa entre as frequências das taxas de invasões vascular e perineurais encontradas por meio das técnicas de HE e imunoistoquímica;
- G) Associar os achados histopatológicos e imunoistoquímicos com os aspectos clínicos.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Espírito Santo sob número de protocolo 138/10 (ANEXO A).

4.1 AMOSTRA

Foi realizada uma pesquisa dos casos diagnosticados como CCEs orais invasivos pertencentes ao Serviço de Anatomia Patológica Bucal da Universidade Federal do Espírito Santo provenientes de biópsias de pacientes referenciados ao Programa de Prevenção e Diagnóstico Precoce de Câncer de Boca/SIEX/UFES do Curso de Odontologia da Universidade Federal do Espírito Santo, arquivados em blocos parafinados, devidamente codificados conforme o registro do referido serviço.

Dados clinicopatológicos dos pacientes como idade, gênero, raça, localização da lesão, tabagismo, etilismo e estadiamento clínico da doença (TNM) foram coletados a partir dos prontuários, sendo este último registrado a partir de 2010. Os dados informados foram transferidos para o instrumento de coleta de dados (APÊNDICE A).

4.2 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO

Cortes histológicos de 4µm de espessura dos CCEs orais foram realizados e submetidos à técnica de coloração HE para o estudo morfológico dos padrões arquiteturais e citológicos.

Os critérios utilizados para determinação da gradação histopatológica foram os preconizados pela OMS (2005) (Quadro 9).

Critérios utilizados na análise morfológica dos CCEs orais invasivos	
Arquitetural	Citológicos
Pérolas córneas	Queratinização prematura de células individuais (disqueratose)
	Variação anormal do tamanho nuclear (anisonucleose)
	Variação anormal do formato nuclear (pleomorfismo nuclear)
	Variação anormal do tamanho celular (anisocitose)
	Variação anormal do formato celular (pleomorfismo celular)
	Aumento da relação núcleo-citoplasma
	Elevado número de figuras mitóticas
	Figuras mitóticas atípicas
	Aumento do número e tamanho de nucléolos
	Hipercromatismo

QUADRO 9- ASPECTOS ARQUITETURAL E CITOLÓGICOS DOS CCEs ANALISADOS

Fonte: OMS modificado (2005)

As análises morfológicas foram realizadas por três pesquisadores simultaneamente em microscópio óptico de luz (Nikon Eclipse E200 Múltipla Observação - Lote: 851979). As informações provenientes das análises de cada caso foram transferidas para o instrumento de coleta de dados (APÊNDICE A).

4.2.1 Análise da distribuição do infiltrado inflamatório e das taxas de invasões perineural e vascular

As lâminas histológicas em HE dos referidos casos estudados foram utilizadas na avaliação quanto à distribuição e intensidade do infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo, e, para identificação das invasões vascular e perineural.

Os critérios microscópicos utilizados na identificação da invasão vascular foram os descritos por Kurtz *et al.* (2005), definida pela presença de ninhos de células tumorais no interior do espaço vascular, seja espaço linfático ou vaso sanguíneo, aderido ao endotélio vascular, mantendo ou não a integridade arquitetural dos vasos invadidos.

A análise perineural foi definida com a presença e o envolvimento de grupos isógenos de queratinócitos, ou seja, ninhos de células tumorais no espaço perineural (DUNN, MORGAN E TREVOR, 2009). O espaço perineural é aquele compreendido pelo tecido conjuntivo que circunda o nervo (RAHIMA *et al.*, 2004), com englobamento completo ou parcial do nervo identificado (KURTZ *et al.*, 2005).

A distribuição do infiltrado inflamatório foi definida como difusa e/ou justaposta ao CCE e sua intensidade foi categorizada em leve, moderada e intensa.

No Quadro 10 seguem os critérios utilizados nas análises das invasões e nas análises do infiltrado inflamatório peritumoral.

INFILTRADO INFLAMATÓRIO PERITUMORAL		INTENSIDADE DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO			INVASÃO NEOPLÁSICA DE VASOS (HE)		ARRANJO DA CÉLULA NEOPLÁSICA VASCULAR (HE)		MORFOLOGIA DO VASO (HE)		INVASÃO NEOPLÁSICA PERINEURAL (HE)		ARRANJO DA CÉLULA NEOPLÁSICA PERINEURAL (HE)		MORFOLOGIA DO NERVO (HE)	
J	D	L	M	I	P	ND	N	ISOL	PD	INT	P	ND	N	ISOL	PD	INT

QUADRO 10- CRITÉRIOS UTILIZADOS NA ANÁLISE DOS CASOS SUBMETIDOS À TÉCNICA DE HE

Legenda: J: justaposto; D: difuso; L: leve; M: moderado; I: intenso; P: presente; ND: não detectado; N: ninho; ISOL: isolada; PD: parcialmente destruído; INT: íntegro

As imagens foram capturadas utilizando-se microscópio óptico convencional (Axiophot/Zeiss-West Germany - Lote No:F.F.M. 91.000/0501) acoplado com câmera digital (AxioCamMRc/ Zeiss – Lote No: 2 04 07 0902) e programa AxioVision Rel. 4.8.

4.3 ETAPA IMUNOISTOQUÍMICA

Novos cortes de 4µm de espessura dos CCEs orais selecionados foram submetidos à técnica imunoistoquímica para detecção das seguintes proteínas: S100, PGP9.5, CD31 e CD34.

As reações imunoistoquímicas foram realizadas por meio da técnica da imunoperoxidase, cujo protocolo é descrito a seguir:

Os cortes de 4µm foram desparafinados em dois banhos de xilol: o primeiro a 60°C durante 30 minutos e o segundo a temperatura ambiente por 20 minutos. A seguir os cortes foram reidratados em cadeia descendente de etanol (100%, 95%, 85% respectivamente) e imersos em solução de hidróxido de amônia a 10% durante 10 minutos para a remoção dos pigmentos formólicos.

Na recuperação antigênica foram utilizados diferentes métodos de acordo com a descrição do Quadro 11.

Após lavagens de 5 minutos em água corrente e destilada, os cortes foram imersos em solução de peróxido de hidrogênio 10 volumes por 10 minutos e aplicado o Hydrogen Peroxide Block (Spring Bioscience, Pleasanton, CA) por 25 minutos, a fim de bloquear a peroxidase endógena. Para bloqueio de proteínas inespecíficas foi utilizado o Protein Block (Spring Bioscience, Pleasanton, CA) por 20 minutos.

Em seguida, os cortes foram incubados com anticorpo primário diluído em solução de 1% de BSA (Sigma) em PBS pH 7,4. Informações sobre soros primários e etapas específicas do protocolo estão descritas no Quadro 11. O período de incubação dos anticorpos primários foi 12 horas, em temperatura de 4°C.

Anticorpo primário	Procedência e clone	Título	Recuperação antigênica
S100	Dako Z 0311	1:10.000	Tampão citrato pH 6,0/ <i>Steamer</i>
CD31/ PECAM-1	Dako M0823	1:2000	Tris-EDTA pH 9,0/ <i>Steamer</i>
CD34	Novocastra QBEnd/10	1:500	Enzima tripsina/ Temperatura ambiente
PGP9.5	Abcam ab15503	1:2500	Tampão citrato pH 6,0/ <i>Steamer</i>

QUADRO 11- PROTOCOLO UTILIZADO NA TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA

Os procedimentos posteriores foram sempre precedidos de duas lavagens em solução TRIS HCL pH 7,4, 5 minutos cada.

Após a incubação com o anticorpo primário, os espécimes foram incubados com os dois reagentes Complement e HRP Conjugate (Spring Bioscience, Pleasanton, CA) por 15 minutos cada reagente.

Para a reação de revelação, os espécimes foram incubados com a solução reveladora DAB Substrate System – DAB Chromogen (Spring Bioscience, Pleasanton, CA), por 3 a 5 minutos, que evidencia a reação por meio de coloração acastanhada.

Em seguida, os cortes foram lavados em água corrente e destilada e contracolorados com hematoxilina de Carazzi por 4 minutos.

Posteriormente, os cortes foram desidratados em cadeia ascendente de etanóis, diafanizados em três banhos de xilol, e montados em resina ERV-MOUNT (EasyPath) para o exame ao microscópio de luz.

A hiperplasia fibrosa inflamatória foi utilizada como controle das reações de imunistoquímica, sendo considerado controle negativo quando a incubação de espécimes foi realizada com tampão sem o anticorpo primário e controle positivo quando era utilizado o anticorpo primário na incubação.

4.3.1 Análises das taxas de invasão perineural e vascular das amostras submetidas à técnica imunoistoquímica

4.3.1.1 Anti-CD31

Foi realizada análise semi-quantitativa da densidade microvascular peritumoral através da imunomarcação do CD31, tendo sido considerada intensa quando constatada a presença de mais de 10 microvasos por campo examinado, no aumento de 400X e moderada com até 10 microvasos.

4.3.1.2 Anti-CD34

Para a análise da imunomarcação com CD34 foram avaliados a presença de invasão neoplásica de vasos sanguíneos; o arranjo das células neoplásicas em ninho ou isolada comprometendo a estrutura vascular e a integridade da morfologia vascular.

4.3.1.3 Anti-S100 e anti-PGP9.5

Para análise da imunomarcação dos anticorpos S100 e PGP9.5 foram avaliadas a presença de invasão neoplásica perineural; o arranjo das células neoplásicas em ninho ou isoladas comprometendo a estrutura nervosa e a integridade da morfologia do nervo.

A etapa experimental e análises deste estudo foram realizadas no Laboratório de Técnicas Imunomoleculares (LIM-06) do Instituto de Medicina Tropical de São Paulo – Universidade de São Paulo.

4.4 ANÁLISES ESTATÍSTICAS

Todos os resultados obtidos através das análises das amostras coradas em HE e submetidas à técnica de imunoistoquímica foram testados estatisticamente. O pacote estatístico utilizado foi IBM SPSS *Statistics*, versão 20.0 (IBM).

O teste do qui-quadrado foi utilizado para avaliar a relação entre os achados histopatológicos (invasões neoplásicas vascular e perineural, distribuição do infiltrado inflamatório peritumoral e intensidade do infiltrado inflamatório) dos casos submetidos à técnica HE e as variáveis clínico-histopatológicas (gênero, faixa etária, raça/cor, tabagismo, etilismo, grupamento por estádios, tamanho do tumor e gradação histopatológica). O nível de significância foi estabelecido em p -valor $< 0,050$. Quando os resultados individuais do cruzamento de uma variável com outra foi inferior a cinco, foram aplicados o teste Exato de Fisher ou a razão da máxima verossimilhança, caso a variável admitisse mais de duas categorias.

Os mesmos testes estatísticos foram utilizados para a análise da associação dos achados imunoistoquímicos [densidade microvascular peritumoral (CD31), invasão neoplásica de vasos (CD34), invasão neoplásica perineural (S100; PGP9.5)] com as variáveis clínico-histopatológicas mencionadas anteriormente.

Posteriormente, fez-se uma análise de concordância entre a técnica histopatológica HE, considerada o padrão ouro, e os métodos imunoistoquímicos (S100, PGP9.5), utilizando o coeficiente Kappa e os parâmetros sensibilidade e especificidade. No presente estudo, a sensibilidade se traduz na probabilidade de um método identificar corretamente a presença de invasão neoplásica perineural, enquanto a especificidade significa a probabilidade de um método ser negativo para as invasões neoplásicas perineurais realmente não detectadas.

Para a comparação dos percentuais de presença de invasão neoplásica perineural entre os métodos HE, S100 e PGP9.5 foi usado o teste não paramétrico de McNemar.

5 RESULTADOS

5.1 DESCRIÇÃO DOS RESULTADOS CLÍNICOS DOS CASOS DE CCEs ORAIS

Foram identificados um total de 29 casos de CCEs orais provenientes do Serviço de Anatomia Patológica Bucal da UFES, sendo todos incluídos no presente estudo.

Quanto aos dados clínicos dos pacientes portadores dos CCEs orais estudados, mais da metade deles se encontravam entre a 4^a e 6^a décadas de vida (55,2%), houve predomínio das raças/cores branca (41,4%) e parda (41,4%) e o gênero masculino foi o mais acometido (82,8%). O sítio anatômico mais frequente foi o assoalho bucal (24,1%), seguido da língua (20,7%) e associação de dois sítios diferentes (20,7%). O tabagismo foi registrado na maioria dos casos (82,8%) e o etilismo, em aproximadamente, metade deles (48,3%). Apesar do estadiamento clínico TNM não ter sido descrito em metade dos casos, onde esta informação estava presente houve predominância do estágio IV (31%), prevalecendo T4N0M0 (Tabela 1 e APÊNDICE B).

TABELA 1- DADOS CLÍNICOS OBTIDOS ATRAVÉS DA REVISÃO DE PRONTUÁRIOS DE CADA PACIENTE DIAGNOSTICADO COM CCE ORAL

	Variáveis	Valores		
		(n)	(%)	
INFORMAÇÕES CLÍNICAS	Idade (anos)	0-20	0	0,0%
		21-40	1	3,4%
		41-60	16	55,2%
		61-80	11	37,9%
		>80	1	3,4%
	Sexo	Masculino	24	82,8%
		Feminino	5	17,2%
	Raça/Cor	Branca	12	41,4%
		Negra	4	13,8%
		Parda	12	41,4%
		Amarela	0	0,0%
		Índigena	0	0,0%
		Não Informado	1	3,4%
	Localização das lesões	Assoalho bucal	7	24,1%
		Língua	6	20,7%
		Lábio	1	3,4%
		Palato duro	1	3,4%
		Palato mole	2	6,9%
		Gengiva	0	0,0%
		Mucosa jugal	1	3,4%
		Rebordo alveolar	5	17,2%
		Trígono retromolar	0	0,0%
		Associação de dois sítios	6	20,7%
Tabagismo	Sim	24	82,8%	
	Não	5	17,2%	
Etilismo	Sim	14	48,3%	
	Não	15	51,7%	
Estadiamento clínico (T)	0	0	0,0%	
	1	4	13,8%	
	2	2	6,9%	
	3	0	0,0%	
	4	8	27,6%	
	Não informado	15	51,7%	
Estadiamento clínico (N)	0	7	24,1%	
	1	6	20,7%	
	2	1	3,4%	
	3	0	0,0%	
	4	0	0,0%	
	Não informado	15	51,7%	
Estadiamento clínico (M)	0	14	48,3%	
	1	0	0,0%	
	2	0	0,0%	
	Não informado	15	51,7%	
Grupamento por estádios	I	3	10,4%	
	II	1	3,4%	
	III	1	3,4%	
	IV	9	31,0%	
	NI	15	51,8%	
Total		29	100,0%	

5.2 DESCRIÇÃO DOS RESULTADOS HISTOPATOLÓGICOS DOS CCEs ORAIS

A análise histopatológica para a classificação dos CCEs orais mostrou, na maioria dos casos, gradação bem diferenciada (69%), com aspectos celulares e arquiteturais típicos dessa doença. O padrão de distribuição do infiltrado inflamatório peritumoral mais predominante foi o difuso (58,6%) e sua intensidade moderada (58,6%) (Tabela 2 e APÊNDICE B).

Aspectos derivados da análise histopatológica dos espécimes de CCEs orais estão ilustrados nas Figuras 1 e 2 com tecido corado pela técnica HE.

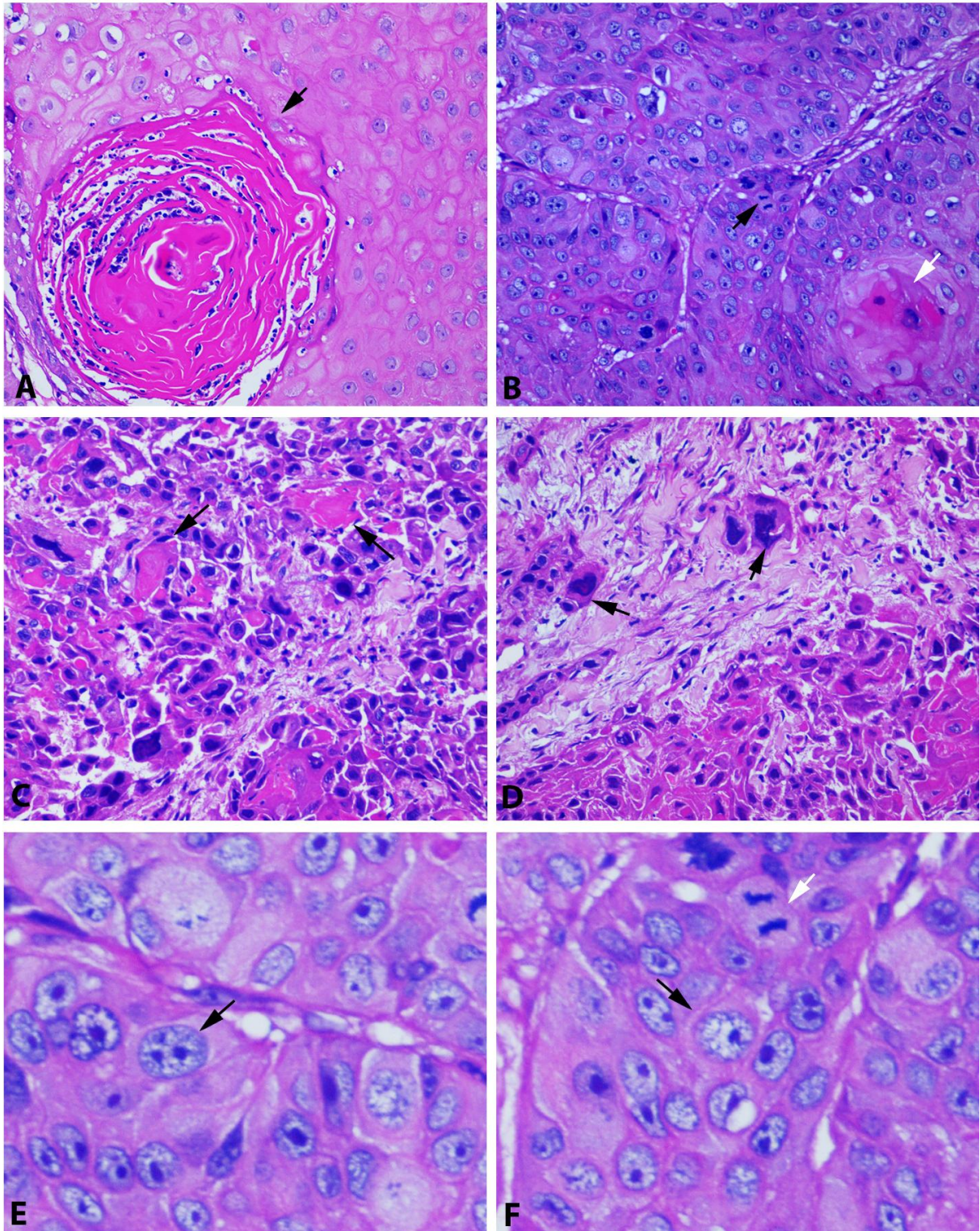


Figura 1 - Aspectos histopatológicos de CCEs orais bem diferenciados

Legenda: **A:** Pérola córnea (seta). (HE, aumento original 400X); **B:** Mitoses típicas (seta negra) e disceratoses (seta branca). (HE, aumento original 400X); **C:** Disceratoses (seta). (HE, aumento original 400X); **D:** Núcleos pleomórficos – mitoses atípicas (seta). (HE, aumento original 400X); **E:** Aumento do número de nucléolos. (HE, aumento original 400X); **F:** Aumento da relação núcleo-citoplasma (seta negra) e mitose típica (seta branca). (HE, aumento original 400X)

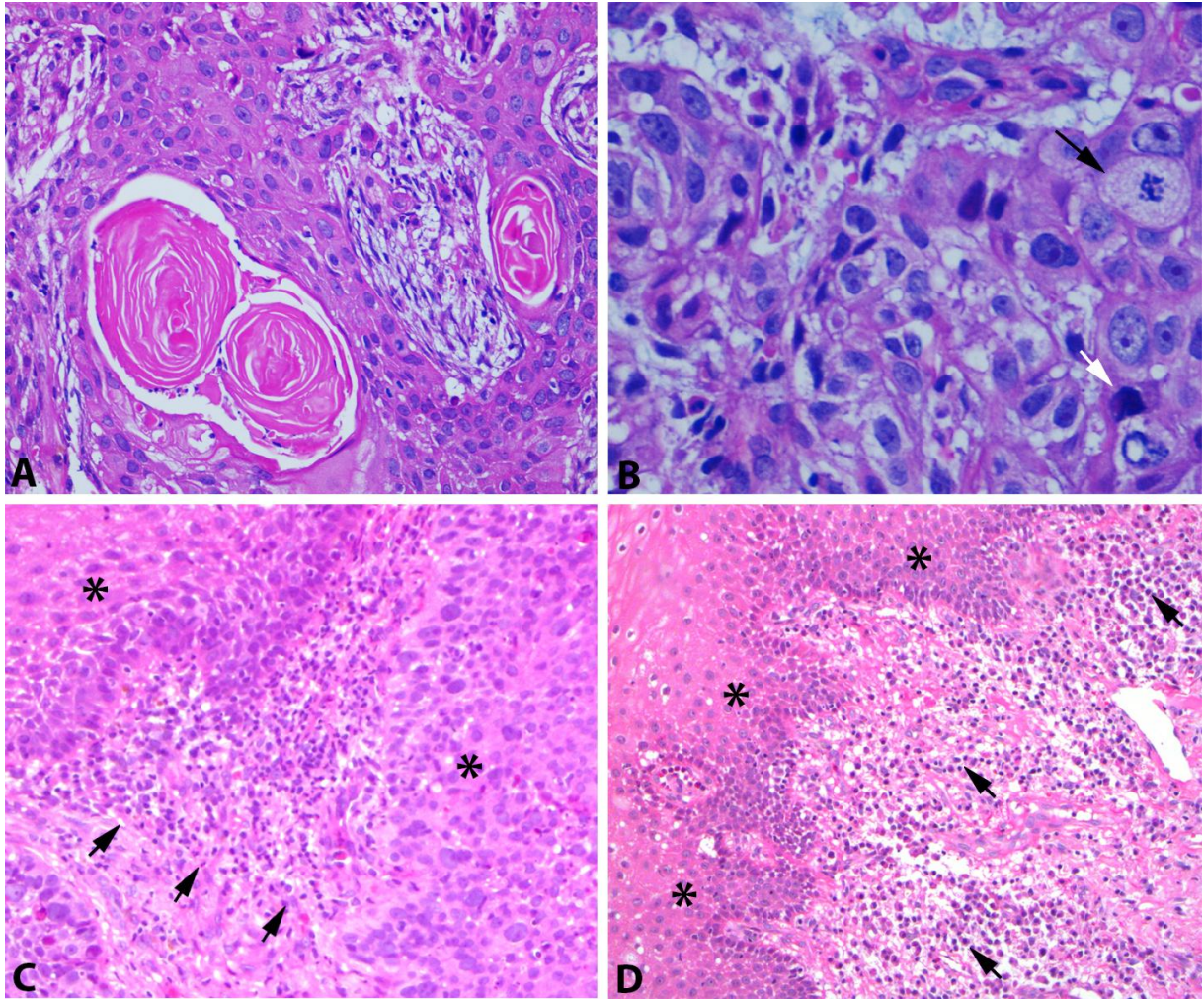


Figura 2 - Gradação tumoral e padrão de distribuição do infiltrado inflamatório

Legenda: **A:** CCE oral bem diferenciado com pérolas córneas. (HE, aumento original 400X); **B:** CCE oral moderadamente diferenciado com presença de pleomorfismo celular (seta negra) e nuclear – mitose bizarra (seta branca). (HE, aumento original 400X); **C:** CCE oral bem diferenciado. Infiltrado inflamatório justaposto (seta) ao tecido tumoral (asterisco). (HE, aumento original 400X); **D:** CCE oral moderadamente diferenciado. Distribuição difusa do infiltrado inflamatório moderado no tecido conjuntivo. (HE, aumento original 200X)

TABELA 2 - DADOS HISTOPATOLÓGICOS OBTIDOS ATRAVÉS DA ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA DOS CASOS SUBMETIDOS À TÉCNICA DE HE

	Variáveis	Valores		
		(n)	(%)	
ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA (HE)	Ceratinização prematura de células individuais (disceratose)	Presente	22	75,9%
		Não detectado	7	24,1%
	Pérolas córneas	Presente	20	69,0%
		Não detectado	9	31,0%
	Hipercromatismo	Presente	29	100,0%
		Não detectado	0	0,0%
	Aumento do número de figuras mitóticas	Presente	26	89,7%
		Não detectado	3	10,3%
	Células com mitoses atípicas	Presente	26	89,7%
		Não detectado	3	10,3%
	Variação do tamanho do núcleo (anisonucleose)	Presente	29	100,0%
		Não detectado	0	0,0%
	Variação da forma do núcleo (pleomorfismo nuclear)	Presente	29	100,0%
		Não detectado	0	0,0%
	Variação anormal do tamanho da célula (anisocitose)	Presente	29	100,0%
		Não detectado	0	0,0%
	Variação anormal da forma da célula (pleomorfismo celular)	Presente	29	100,0%
		Não detectado	0	0,0%
	Aumento da relação núcleo-citoplasma	Presente	29	100,0%
		Não detectado	0	0,0%
	Aumento do número e tamanho dos nucléolos	Presente	29	100,0%
		Não detectado	0	0,0%
	Gradação histopatológica	Bem diferenciado	20	69,0%
		Moderadamente diferenciado	9	31,0%
		Pouco diferenciado	0	0,0%
	Infiltrado inflamatório peritumoral	Difuso	17	58,6%
		Justaposto	12	41,4%
	Intensidade do infiltrado inflamatório	Leve	3	10,3%
		Moderado	17	58,6%
Intenso		9	31,1%	
Total		29	100,0%	

5.3 DESCRIÇÃO DOS RESULTADOS DAS INVASÕES PERINEURAL E VASCULAR EM CCES ORAIS PROCESSADOS PELA TÉCNICA HE

Nos casos submetidos à técnica de HE foi possível observar a presença de invasão neoplásica de vasos por queratinócitos, arranjados em forma de ninho, sem comprometimento da morfologia vascular em 17,2%. A invasão neoplásica por ninhos de queratinócitos ao redor de nervos estava presente em 31% dos casos, sendo que a morfologia dos nervos avaliados estava totalmente preservada (Tabela 3 e APÊNDICE B).

Aspectos histopatológicos das invasões dos CCEs orais estão ilustrados na Figura 3 com tecido corado pela técnica HE.

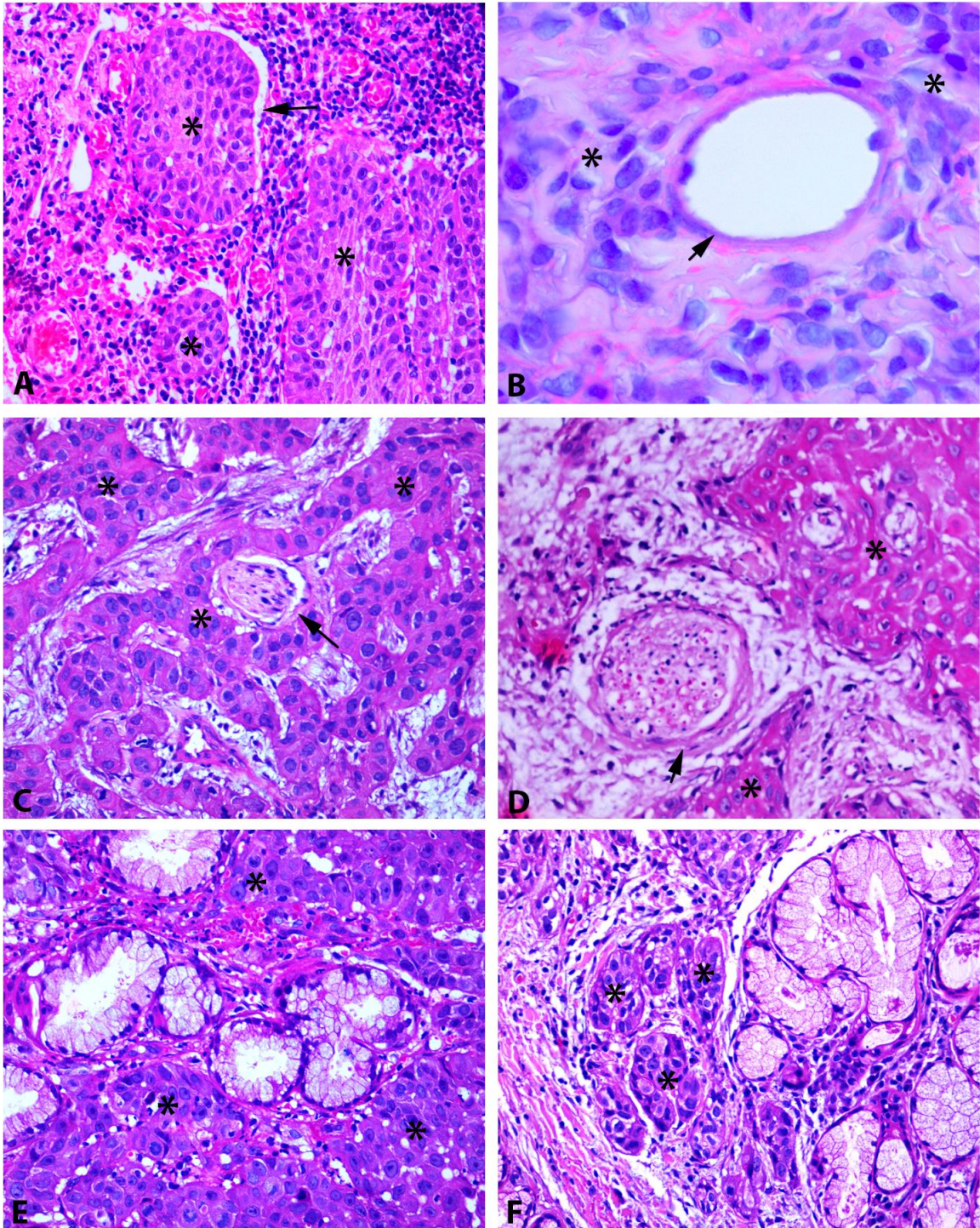


Figura 3- Invasão de CCEs orais em diferentes estruturas

Legenda: **A:** CCE oral bem diferenciado. Êmbolo neoplásico em vaso linfático (seta) e ninhos de queratinócitos (asterisco). (HE, aumento original 400X); **B:** Presença de queratinócitos (asterisco) ao redor do vaso sanguíneo íntegro (seta negra) (HE, aumento original 1000X); **C:** CCE oral bem diferenciado. Infiltração neoplásica (asterisco) em nervo (seta). (HE, aumento original 400X); **D:** CCE oral bem diferenciado. Infiltração perineural: ninhos de queratinócitos (asterisco) ao redor de feixe nervoso (seta). (HE, aumento original 400X); **E:** CCE oral bem diferenciado. Invasão neoplásica (asterisco) nas glândulas salivares mucosas. (HE, aumento original 400X); **F:** CCE oral moderadamente diferenciado. Infiltração neoplásica (asterisco) em glândula salivar. (HE, aumento original 400X)

TABELA 3 - DADOS DA INVASÃO PERINEURAL E VASCULAR DOS CCEs ORAIS SUBMETIDOS À TÉCNICA DE HE

		Variáveis	Valores	
			(n)	(%)
ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA (HE)	Invasão neoplásica de vasos	Presente	5	17,2%
		Não detectado	24	82,8%
	Arranjo da célula neoplásica vascular	Isolada	0	0,0%
		Ninho	5	17,2%
		Não Avaliado*	24	82,8%
	Morfologia do vaso	Íntegro	5	17,2%
		Parcialmente destruído	0	0,0%
		Não Avaliado*	24	82,8%
	Invasão neoplásica perineural	Presente	9	31,0%
		Não Detectado	20	69,0%
	Arranjo da célula neoplásica perineural	Isolada	0	0,0%
		Ninho	9	31,0%
		Não Avaliado*	20	69,0%
	Morfologia do nervo	Íntegro	9	31,0%
Parcialmente destruído		0	0,0%	
Não Avaliado*		20	69,0%	
		Total	29	100,0%

*Casos em que as invasões neoplásicas não foram detectadas

5.4 DESCRIÇÃO DOS RESULTADOS DAS INVASÕES PERINEURAL E VASCULAR EM CCEs ORAIS PROCESSADOS PELA TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA

A análise da expressão proteica do CD31 mostrou intensa densidade microvascular peritumoral em 82,8% dos casos de CCE oral (Tabela 4 e APÊNDICE B). Foi detectada invasão neoplásica de vasos sanguíneos em 6,9% dos casos imunomarcados pelo CD34 (Tabela 4 e APÊNDICE B).

A invasão neoplásica perineural por ninhos de queratinócitos estava presente em 44,8% dos casos imunomarcados pela proteína S100 e em 58,6% dos imunomarcados pela proteína PGP9.5 (Tabela 4 e APÊNDICE B).

Alguns aspectos imunoistoquímicos dos CCEs orais analisados estão ilustrados na Figura 4 com tecidos imunomarcados pelas proteínas estudadas. Aspectos histopatológicos das invasões de um caso de CCE oral bem diferenciado estão ilustrados na Figura 5 com tecido submetido à técnica de HE e imunoistoquímica.

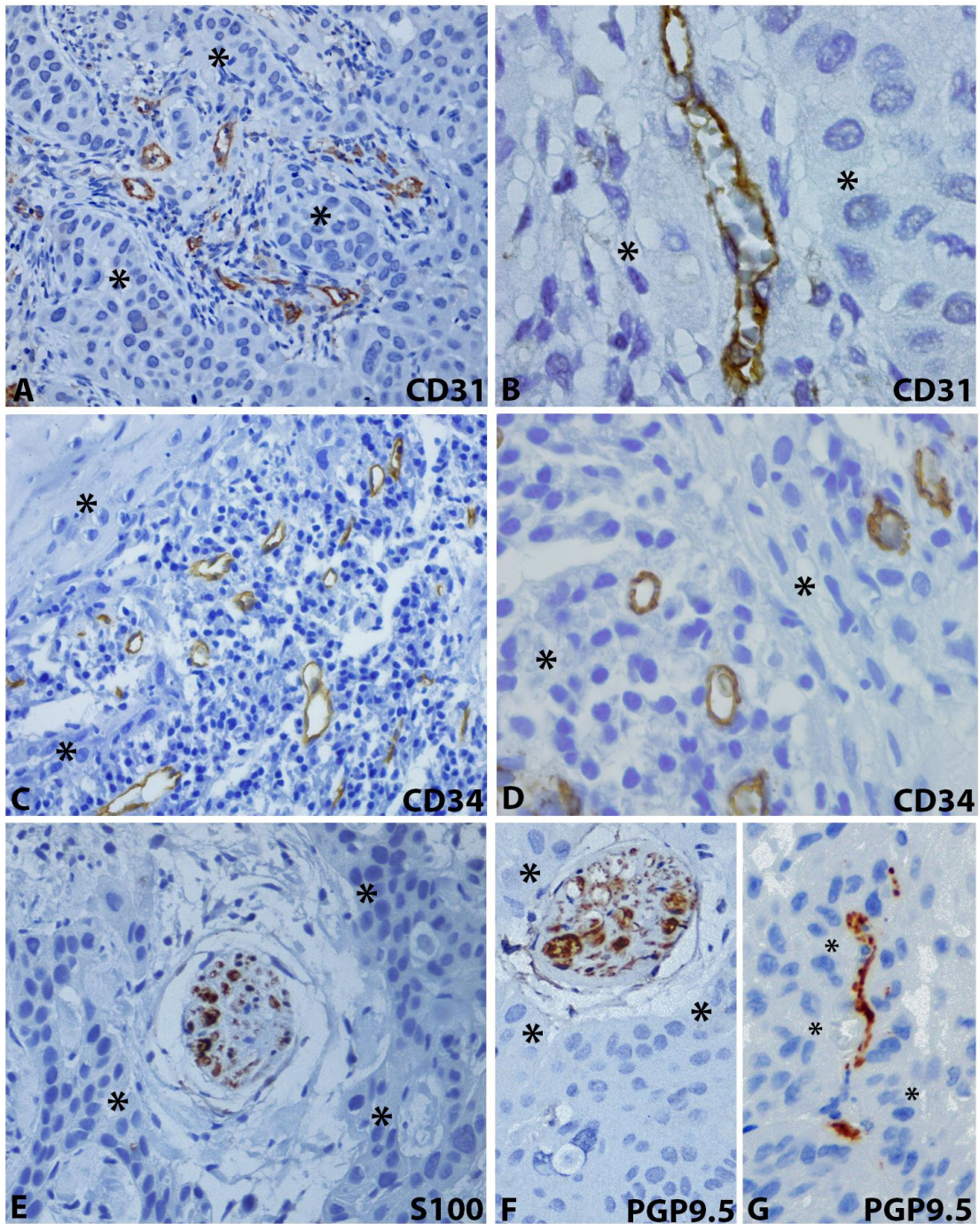


Figura 4- Perfil da expressão dos biomarcadores vasculares e neurais em lesões de CCEs orais

Legenda: **A:** CCE oral bem diferenciado. Microvasos CD31 positivos entremeados por ninhos tumorais (asterisco). (Aumento original 400X); **B:** CCE oral bem diferenciado. Microvaso CD31 positivo entre células tumorais (asterisco) (Aumento original 1000X); **C:** CCE oral bem diferenciado. Vasos CD34 positivos ao redor de ninhos tumorais (asterisco) (Aumento original 400X); **D:** CCE oral bem diferenciado. Vasos CD34 positivos intratumorais (asterisco). (Aumento original 1000X); **E e F:** CCE oral bem diferenciado. Feixes nervosos marcados pelas proteínas S100 e PGP9.5 respectivamente. Infiltração neoplásica (asterisco). (Aumento original 400X); **G:** CCE oral bem diferenciado. Infiltração perineural (asterisco): fibra nervosa marcada pela proteína PGP9.5. (Aumento original 400X)

TABELA 4 - CRITÉRIOS AVALIADOS CCEs ORAIS SUBMETIDAS À TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA PARA CD31, CD34, S100 E PGP9.5

Biomarcadores	Critérios Avaliados	Variáveis	Valores	
			(n)	(%)
CD31	Densidade microvascular peritumoral	Moderada	5	17,2%
		Intensa	24	82,8%
CD34	Invasão neoplásica de vasos sanguíneos	Presente	2	6,9%
		Não detectado	27	93,1%
	Arranjo da célula neoplásica vascular	Isolada	1	3,4%
		Ninho	1	3,4%
		Não Avaliado	27	93,1%
	Morfologia do vaso	Íntegro	1	3,4%
Parcialmente destruído		1	3,4%	
S100	Invasão neoplásica perineural	Presente	13	44,8%
		Não detectado	16	55,2%
	Arranjo da célula neoplásica perineural	Isolada	0	0,0%
		Ninho	13	44,8%
		Não Avaliado	16	55,2%
	Morfologia do nervo	Íntegro	13	44,8%
Parcialmente destruído		0	0,0%	
PGP9.5	Invasão neoplásica perineural	Presente	17	58,6%
		Não detectado	12	41,4%
	Arranjo da célula neoplásica perineural	Isolada	0	0,0%
		Ninho	17	58,6%
		Não Avaliado	12	41,4%
	Morfologia do nervo	Íntegro	17	58,6%
Parcialmente destruído		0	0,0%	
		Não Avaliado	12	41,4%
Total			29	100,0%

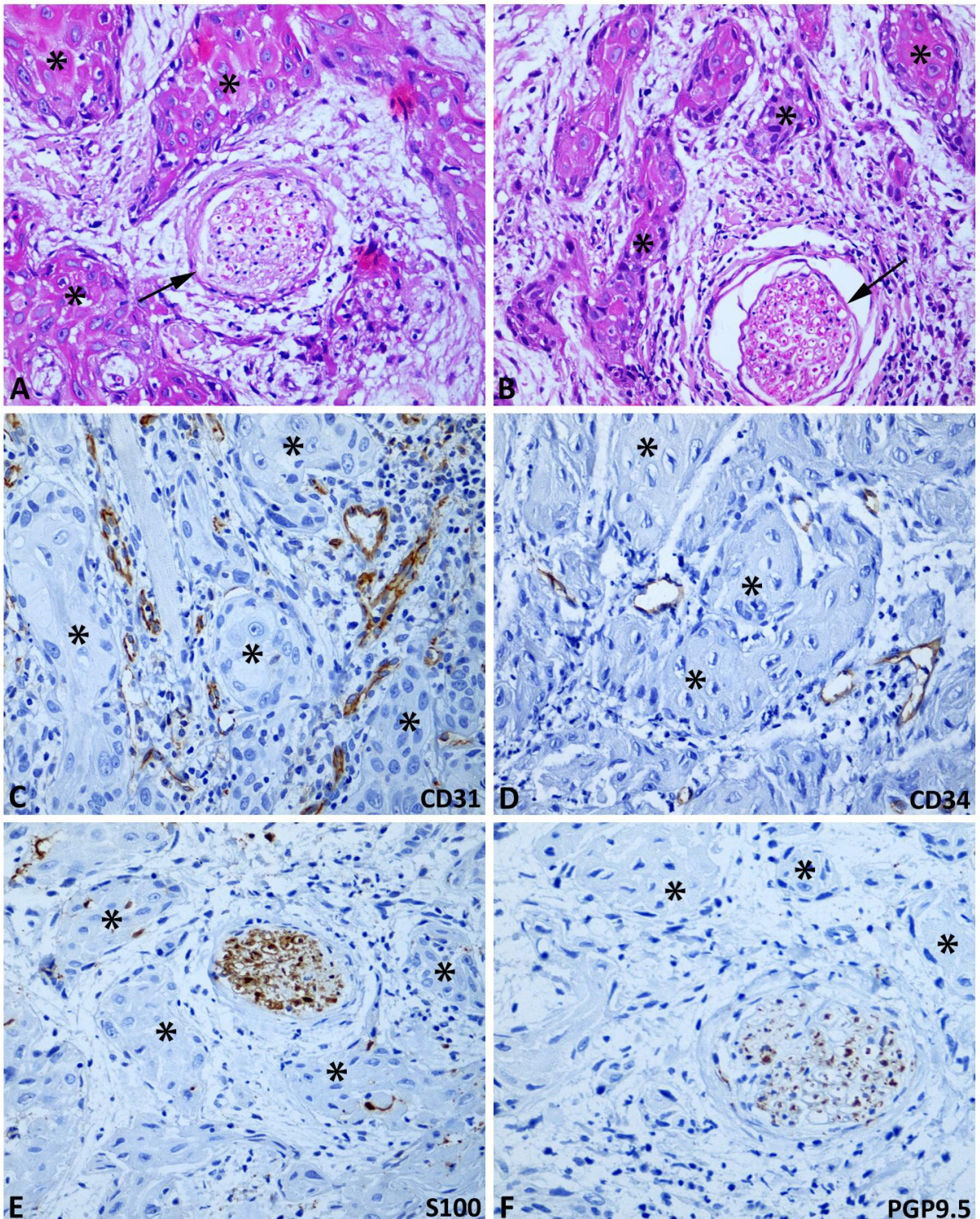


Figura 5- Aspecto histopatológico e imunoistoquímico de CCE bem diferenciado

Legenda: A e B: Infiltração neoplásica (asterisco) em nervo (seta). (HE, aumento original 400X); C: Densidade microvascular peritumoral (asterisco): positividade para CD31. (Aumento original 400X); D: Vasos intratumorais (asterisco) positivos para CD34. (Aumento original 400X); E e F: Infiltração perineural (asterisco): feixes nervosos positivos para S100 e PGP9.5 respectivamente. (Aumento original 400X)

5.5 ASSOCIAÇÃO DOS ACHADOS HISTOPATOLÓGICOS DOS CASOS SUBMETIDOS À TÉCNICA DE HE COM AS VARIÁVEIS CLINICOPATOLÓGICAS

De acordo com as análises estatísticas realizadas com os testes qui-quadrado, teste Exato de Fisher e a razão da máxima verossimilhança, observou-se que não houve relação estatisticamente significativa ($p > 0,05$) das variáveis invasões neoplásicas perineural e vascular dos casos submetidos à técnica HE com as variáveis clínicas (gênero, faixa etária, raça/cor, tabagismo, etilismo, grupamento por estádios, tamanho do tumor) e a gradação histopatológica (bem diferenciado e moderadamente diferenciado) (APÊNDICE B).

A análise estatística da associação entre o infiltrado inflamatório peritumoral com as variáveis clínicas (gênero, faixa etária, raça/cor, tabagismo, etilismo, grupamento por estádios, tamanho do tumor) e a gradação histopatológica (bem diferenciado e moderadamente diferenciado) revelou uma relação estatisticamente significativa ($p = 0,039$; teste Exato de Fisher) entre infiltrado inflamatório peritumoral justaposto e CCE bem diferenciado (Tabela 5).

Foi registrada uma significância estatística entre os resultados do infiltrado inflamatório intenso e a raça/cor branca ($p=0,033$; razão da máxima verossimilhança) (Tabela 6).

TABELA 5 - ASSOCIAÇÃO ENTRE O INFILTRADO INFLAMATÓRIO PERITUMORAL COM VARIÁVEIS CLINICOPATOLÓGICAS

Variáveis	Infiltrato Inflamatório Peritumoral		p-valor
	Justaposto	Difuso	
Gênero			
Masculino	10 (83,3%)	13 (81,2%)	1,000*
Feminino	2 (16,7%)	3 (18,8%)	
Faixa etária			
< 40 anos	1 (8,3%)	0 (0,0%)	0,429*
≥ 40 anos	11 (91,7%)	6 (100,0%)	
Raça / Cor			
Branca	7 (63,6%)	4 (25,0%)	0,061*
Negra / Parda	4 (36,4%)	12 (75,0%)	
Tabagismo			
Sim	11 (91,7%)	12 (75,0%)	0,355*
Não	1 (8,3%)	4 (25,0%)	
Etilismo			
Sim	8 (66,7%)	6 (37,5%)	0,252*
Não	4 (33,3%)	10 (62,5%)	
Grupamento por estádios			
I	0 (0,0%)	3 (25,0%)	
II	0 (0,0%)	1 (8,3%)	-
III	0 (0,0%)	1 (8,3%)	
IV	1 (100,0%)	7 (58,3%)	
Tamanho do tumor			
≤ 4 cm	0 (0,0%)	4 (33,3%)	1,000*
> 4 cm	1 (100,0%)	8 (66,7%)	
Gradação histopatológica			
Bem diferenciado	11 (91,7%)	8 (50,0%)	0,039*
Moderadamente diferenciado	1 (8,3%)	8 (50,0%)	
Total	100,0%	100,0%	-

* Teste exato de Fisher

** Razão da máxima verossimilhança

TABELA 6 - RELAÇÃO ENTRE INTENSIDADE DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO COM VARIÁVEIS CLINICOPATOLÓGICAS

Variáveis	Intensidade do Infiltrado Inflamatório			p-valor
	Leve	Moderado	Intenso	
Gênero				
Masculino	3 (75,0%)	12 (75,0%)	9 (100,0%)	0,124**
Feminino	1 (25,0%)	4 (25,0%)	0 (0,0%)	
Faixa etária				
< 40 anos	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (11,1%)	-
≥ 40 anos	4 (100,0%)	16 (100,0%)	8 (88,9%)	
Raça / Cor				
Branca	1 (25,0%)	4 (26,7%)	7 (77,8%)	0,033**
Negra / Parda	3 (75,0%)	11 (73,3%)	2 (22,2%)	
Tabagismo				
Sim	2 (50,0%)	13 (81,2%)	9 (100,0%)	0,059**
Não	2 (50,0%)	3 (18,8%)	0 (0,0%)	
Etilismo				
Sim	2 (50,0%)	6 (37,5%)	6 (66,7%)	0,369**
Não	2 (50,0%)	10 (62,5%)	3 (33,3%)	
Grupamento por estádios				
I	0 (0,0%)	2 (28,6%)	1 (16,7%)	-
II	0 (0,0%)	0 (0,0%)	1 (16,7%)	
III	0 (0,0%)	1 (14,3%)	0 (0,0%)	
IV	1 (100,0%)	4 (57,1%)	4 (66,7%)	
Tamanho do tumor				
≤ 4 cm	0 (0,0%)	2 (28,6%)	2 (33,3%)	0,692**
> 4 cm	1 (100,0%)	5 (71,4%)	4 (66,7%)	
Gradação histopatológica				
Bem diferenciado	4 (100,0%)	9 (56,2%)	7 (77,8%)	0,108**
Moderadamente diferenciado	0 (0,0%)	7 (43,8%)	2 (22,2%)	
Total	100,0%	100,0%	100,0%	-

* Teste exato de Fisher

** Razão da máxima verossimilhança

5.6 ASSOCIAÇÃO DOS ACHADOS IMUNOISTOQUÍMICOS COM AS VARIÁVEIS CLINICOPATOLÓGICAS

Os dados da densidade microvascular peritumoral obtidos com o marcador CD31 foram relacionados com as variáveis clinicopatológicas e analisados estatisticamente. A análise estatística revelou uma relação estatisticamente significativa entre a densidade microvascular peritumoral intensa e o etilismo ($p=0,042$; teste Exato de Fisher) (Tabela 7).

No que diz respeito à relação entre a invasão neoplásica de vasos e as variáveis clinicopatológicas avaliadas no presente estudo, utilizando o marcador CD34, a análise estatística demonstrou que não houve resultados estatisticamente significativos ($p > 0,05$), não permitindo afirmar que há relação entre as variáveis (APÊNDICE C).

A análise estatística da associação da invasão neoplásica perineural com as variáveis clinicopatológicas revelou uma relação estatisticamente significativa ($p=0,020$; teste Exato de Fisher) entre a presença de invasão neoplásica perineural e CCE bem diferenciado, quando se empregou o marcador S100 (Tabela 8). Entretanto, quando foi utilizado o anticorpo PGP9.5, a análise estatística não encontrou resultados significativos, não podendo afirmar que há relação entre as variáveis (APÊNDICE C).

TABELA 7 - ASSOCIAÇÃO ENTRE DENSIDADE MICROVASCULAR PERITUMORAL (CD31) COM AS VARIÁVEIS CLINICOPATOLÓGICAS

Variáveis	Densidade Microvascular Peritumoral		p-valor
	Moderado	Intenso	
Gênero			
Masculino	3 (60,0%)	21 (87,5%)	0,195*
Feminino	2 (40,0%)	3 (12,5%)	
Faixa etária			
< 40 anos	0 (0,0%)	1 (4,2%)	1,000*
≥ 40 anos	5 (100,0%)	23 (95,8%)	
Raça / Cor			
Branca	1 (25,0%)	11 (45,8%)	0,613*
Negra / Parda	3 (75,0%)	13 (54,2%)	
Tabagismo			
Sim	3 (60,0%)	21 (87,5%)	0,195*
Não	2 (40,0%)	3 (12,5%)	
Etilismo			
Sim	0 (0,0%)	14 (58,3%)	0,042*
Não	5 (100,0%)	10 (41,7%)	
Grupamento por estádios			
I	1 (50,0%)	2 (16,7%)	
II	0 (0,0%)	1 (8,3%)	-
III	0 (0,0%)	1 (8,3%)	
IV	1 (50,0%)	8 (66,7%)	
Tamanho do tumor			
≤ 4 cm	1 (50,0%)	3 (25,0%)	0,505*
> 4 cm	1 (50,0%)	9 (75,0%)	
Gradação histopatológica			
Bem diferenciado	3 (60,0%)	17 (70,8%)	0,633*
Moderadamente diferenciado	2 (40,0%)	7 (29,2%)	
Total	100,0%	100,0%	-

* Teste exato de Fisher

** Razão da máxima verossimilhança

TABELA 8 - RELAÇÃO DA INVASÃO NEOPLÁSICA PERINEURAL (S100) COM AS VARIÁVEIS CLINICOPATOLÓGICAS

Variáveis	Invasão Neoplásica Perineural (S100)		p-valor
	Presente	Não detectado	
Gênero			
Masculino	10 (76,9%)	14 (87,5%)	0,632*
Feminino	3 (23,1%)	2 (12,5%)	
Faixa etária			
< 40 anos	0 (0,0%)	1 (6,2%)	1,000*
≥ 40 anos	13 (100,0%)	15 (93,8%)	
Raça / Cor			
Branca	5 (38,5%)	7 (46,7%)	0,718*
Negra / Parda	8 (61,5%)	8 (53,3%)	
Tabagismo			
Sim	11 (84,6%)	13 (81,2%)	1,000*
Não	2 (15,4%)	3 (18,8%)	
Etilismo			
Sim	7 (53,8%)	7 (43,8%)	0,588
Não	6 (46,2%)	9 (56,2%)	
Grupamento por estádios			
I	0 (0,0%)	3 (30,0%)	
II	0 (0,0%)	1 (10,0%)	-
III	0 (0,0%)	1 (10,0%)	
IV	4 (100,0%)	5 (50,0%)	
Tamanho do tumor			
≤ 4 cm	0 (0,0%)	4 (40,0%)	0,251*
> 4 cm	4 (100,0%)	6 (60,0%)	
Gradação histopatológica			
Bem diferenciado	12 (92,3%)	8 (50,0%)	0,020*
Moderadamente diferenciado	1 (7,7%)	8 (50,0%)	
Total	100,0%	100,0%	-

* Teste exato de Fisher

** Razão da máxima verossimilhança

5.7 ANÁLISE DE CONCORDÂNCIA ENTRE OS MÉTODOS HISTOPATOLÓGICO E IMUNOISTOQUÍMICO

A análise de concordância foi realizada apenas entre os métodos que avaliaram os mesmos parâmetros. Desta forma, a sensibilidade dos métodos imunistoquímicos S100 e PGP9.5 para identificar a invasão neoplásica perineural comparados com a técnica HE (padrão-ouro) foram altas (100% para ambos), o que significa afirmar que ambos os métodos identificaram de forma semelhante ao método HE a presença de invasão perineural. A especificidade foi alta (80%) para o S100 e moderada (60%) para o PGP9.5, ou seja, o número de casos não detectados pelo PGP9.5 foi menor que o número de casos não detectados pelo S100 e HE, respectivamente (Tabela 9).

A concordância do S100 com o método HE foi forte (Kappa = 0,713), enquanto a do PGP9.5 com o método HE foi moderada (Kappa = 0,482). Significa dizer que o S100 obteve mais respostas compatíveis com a técnica de HE, enquanto o PGP9.5 resultou em menos respostas compatíveis com a referida técnica (Tabela 9).

TABELA 9 - ANÁLISE DE CONCORDÂNCIA ENTRE OS MÉTODOS HISTOPATOLÓGICO E IMUNOISTOQUÍMICOS

Invasão neoplásica perineural	Invasão Neoplásica Perineural (HE)			Sensibilidade	Especificidade	Kappa
	Presente	Não detectado	Total			
S100						
Presente	9	4	13	100,00%	80,00%	0,713*
Não detectado	0	16	16			
PGP9.5						
Presente	9	8	17	100,00%	60,00%	0,482*
Não detectado	0	12	12			
Total	9	20	29	-		-

* Estatisticamente significativa

Por fim, foi realizado o teste de McNemar entre os três métodos aplicados na pesquisa com intuito de comparar os percentuais de presença de invasão neoplásica perineural dos casos estudados, mostrando que o PGP9.5 identificou mais casos (58,6%) do que o método HE (31%) e o S100 (44,8%), sendo a diferença entre o PGP9.5 e o método HE a única estatisticamente significativa. O percentual de detectados pela técnica de HE não diferiu significativamente daquele do S100 (Tabela 10).

TABELA 10 - COMPARAÇÃO DOS PERCENTUAIS DE PRESENÇA DE INVASÃO ENTRE OS TRÊS MÉTODOS

Categorias	HE	S100	PGP9.5
Presente	9 (31,0%) _A	13 (44,8%) _{A,B}	17 (58,6%) _B
Não detectado	20 (69,0%)	16 (55,2%)	12 (41,4%)
Total	29 (100,0%)	29 (100,0%)	29 (100,0%)

* Percentuais seguidos de letras distintas diferem significativamente através do teste de McNemar, ao nível de significância de 5%

6 DISCUSSÃO

As análises realizadas proporcionaram informações sobre processos invasivos em lesões de CCEs orais de pacientes atendidos pelo Programa de Prevenção e Diagnóstico de Câncer de Boca e Lesões de Boca do Curso de Odontologia da UFES. Um dos aspectos primordiais para o prognóstico dos pacientes com CCE oral é a identificação de invasões neoplásicas perineural e vascular, pois estão associadas a prognósticos ruins, bem como às elevadas taxas de recorrência, comportamento agressivo, metástases e baixa sobrevida (NIIMI *et al.*, 2001; OMS, 2005; DUNN, MORGAN E TREVOR, 2009).

O prognóstico deve basear-se nos achados microscópicos relacionados as características clínicas do paciente envolvido. O perfil clínico da amostra dos CCEs orais invasivos analisados apresentou na sua maioria diagnósticos em indivíduos do gênero masculino, entre as 4ª e 6ª décadas de vida e tendo como principal sítio o assoalho bucal. Com relação à gradação tumoral, a maior parte da amostra foi classificada como bem diferenciada (grau 1). As taxas de invasões vascular e perineural resultantes das análises dos espécimes submetidos às técnicas de HE e imunohistoquímica demonstraram que a técnica imunohistoquímica foi mais eficiente na detecção de invasão perineural, o que é fator relevante para o prognóstico dos pacientes com CCEs orais.

Clinicamente, a maioria dos casos diagnosticados foi na faixa etária de 41 a 60 anos, de acordo com o perfil descrito na literatura (FRANCO *et al.*, 1989; GERVÁSIO *et al.*, 2001; KURTZ *et al.*, 2005; BATISTA *et al.*, 2010; SANTOS, BATISTA E CANGUSSU, 2010; KREPPEL *et al.*, 2010; JOHNSON, JAYASEKARA E AMARASINGHE, 2011). Assim como em outros estudos (ARDUINO *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2009; BATISTA *et al.*, 2010; MAROCCHIO *et al.*, 2010; ZIGON *et al.*, 2011; JOHNSON, JAYASEKARA E AMARASINGHE, 2011) houve o predomínio de casos diagnosticados no gênero masculino (82,8%). Todavia, dados recentes têm demonstrado uma prevalência de CCE oral em mulheres (GAITÁN-CAPEDA, PENICHE-BECERRA E QUEZADA-RIVRA, 2011) e uma tendência de aumento de casos diagnosticados neste gênero (MAROCCHIO *et al.*, 2010). Atribui-se a esse fato, a mudança de hábitos das mulheres, que passaram a consumir mais álcool e

fumar com mais frequência (MAROCCHIO *et al.*, 2010; GAITÁN-CAPEDA, PENICHE-BECERRA E QUEZADA-RIVRA, 2011).

Com relação à raça e cor, foi constatada prevalência de indivíduos brancos (41,4%) e pardos (41,4%), tais quais os achados de Franco *et al.* (1989) e Marocchio *et al.* (2010). Outros estudos já relataram um predomínio de mulatos e negros (GERVÁSIO *et al.*, 2001; JOHNSON, JAYASEKARA E AMARASINGHE, 2011). As variações da distribuição do câncer relativas à raça e cor podem ser devido a práticas culturais e sociais, bem como à influência de fatores genéticos, dieta e acesso aos serviços de saúde. A forte relação entre raça/cor e CCE ocorre no lábio inferior, com uma maior incidência em indivíduos da cor branca quando expostos ao sol (JOHNSON, JAYASEKARA E AMARASINGHE, 2011). Entretanto, na amostra analisada apenas um caso de carcinoma do lábio inferior foi encontrado, o qual ocorreu em um indivíduo branco. Além disso, constatou-se uma relação significativa entre a cor branca e infiltrado inflamatório intenso ($p = 0,033$). Embora o papel do infiltrado inflamatório peritumoral seja limitar a progressão do tumor, acredita-se estar relacionado com a metástase (BATISTA *et al.*, 2010).

Aproximadamente 24% dos casos diagnosticados com CCE oral localizaram-se no assoalho bucal, semelhante ao estudo de Ribeiro *et al.* (2009), diferindo da maioria dos relatos descritos na literatura, que apresentam a língua como o sítio mais acometido por essa doença (GERVÁSIO *et al.*, 2001; IAMAROON *et al.*, 2004; ARDUINO *et al.*, 2008; BATISTA *et al.*, 2010; JOHNSON, JAYASEKARA E AMARASINGHE, 2011). No presente estudo, a língua foi o segundo local mais comum (20,7%) juntamente com a associação de dois sítios (20,7%). Outros locais comuns são lábio inferior (OMS, 2005; BATISTA *et al.*, 2010), gengivas, mucosa jugal e palato duro (OMS, 2005).

Em concordância com diversos estudos sobre câncer de boca (WEIR E DUNN, 1970; FRANCO *et al.*, 1989; ZAIN, 2001; IAMAROON *et al.*, 2004; GANDINI *et al.*, 2008; INCA, 2011), os resultados do presente trabalho revelaram uma elevada frequência (82,8%) de pacientes tabagistas diagnosticados com CCE oral, o que contrasta com índice de 32% obtido por Gervásio *et al.* (2001). Com relação ao etilismo, aproximadamente metade (48,3%) dos casos de CCEs orais estava associado ao consumo de bebidas alcoólicas. A literatura destaca que tanto o tabaco quanto o álcool aumentam o risco do paciente desenvolver câncer de boca

(FRANCO *et al.*, 1989; OMS, 2007; GANDINI *et al.*, 2008; TRAMACERE *et al.*, 2010; INCA, 2011) e esse risco eleva-se ainda mais quando ambos os fatores estão associados (OGDEN E WIGHT, 1998; HOWIE *et al.*, 2001; GERVÁSIO *et al.*, 2001; OMS, 2007), haja vista que o álcool aumenta a permeabilidade da membrana celular da mucosa oral, o que facilita a penetração de carcinógenos do tabaco (HOWIE *et al.*, 2001).

Outra informação relevante diz respeito ao estadiamento clínico (TNM). Foi observado predomínio do estágio IV (9 pacientes) do total de casos em que este parâmetro clínico foi informado (14 pacientes). A importância deste parâmetro reside em sua utilidade para prever a sobrevivência geral em pacientes com CCEs orais (KREPPEL *et al.*, 2010), haja vista que, na ocasião do diagnóstico, pode ser um reflexo não somente da taxa de crescimento e extensão da neoplasia, mas também do tipo de tumor e da relação tumor-hospedeiro (MINISTÉRIO DA SAÚDE, 2004). Convém relatar que devido à natureza retrospectiva deste estudo, alguns prontuários não informavam o estágio TNM, pois esta análise foi incluída nas avaliações clínicas do Programa de Prevenção e Diagnóstico de Câncer de Boca e Lesões de Boca do Curso de Odontologia da UFES a partir do ano de 2010. Entretanto, se considerarmos apenas os casos identificados, o percentual de estágio IV foi 64,3%, enquanto a literatura descreveu valores de 57,4% (KREPPEL *et al.*, 2010) e 44% (SANTOS, BATISTA E CANGUSSU, 2010).

Tendo como referência a classificação da gradação histopatológica para os tumores adotada pela OMS (2005), foi encontrado um total de 69% dos casos de CCE oral classificados como bem diferenciados, o que corrobora com os resultados apresentados por Iamaroon *et al.* (2004). Todavia, outras amostras (RAHIMA *et al.*, 2004; KURTZ *et al.*, 2005; ARDUINO *et al.*, 2008; RIBEIRO *et al.*, 2009) exibiram o predomínio da categoria moderadamente diferenciado. Essa discrepância pode ser atribuída à subjetividade da análise das alterações arquiteturais e citológicas entre os avaliadores, embora tenham adotado os mesmos critérios para avaliação conforme descritos pela OMS. Além disso, é importante ressaltar que o perfil da amostra pode variar entre os estudos e contribuir para essa diferença.

Na distribuição do infiltrado inflamatório foi observado com mais frequência o do tipo difuso com intensidade moderada. No entanto, o infiltrado inflamatório peritumoral justaposto teve uma relação significativa com o CCE bem diferenciado

($p = 0,039$). Não foi possível realizar uma comparação direta dessas características do infiltrado inflamatório com aquelas descritas em outros trabalhos, pois havia uma heterogeneidade dos critérios adotados para avaliar o infiltrado inflamatório (BATISTA *et al.*, 2010; LUNDQVIST *et al.*, 2012). No entanto, compreender aspectos do infiltrado inflamatório é importante como ferramenta adicional no entendimento da progressão tumoral. Deve-se ressaltar que a inflamação crônica já foi relacionada com a angiogênese e tentativas de reparo tecidual (KUMAR *et al.*, 2010).

A resposta imunológica do organismo humano frente à agressão das células tumorais abrange a expressão de linfócitos T citotóxicos (CTL CD8+), células *natural killers* (NK) e macrófagos, células essas que são ativadas principalmente por mediadores da inflamação, como as interleucinas IL-2 e IL-15, que são responsáveis por ativar as células NK, formando assim a primeira linha de defesa contra as células tumorais. As células NK e os linfócitos T liberam outro mediador inflamatório, o interferon- γ , que ativa os macrófagos, os quais juntos com as células T e NK podem colaborar na reatividade antitumoral (KUMAR *et al.*, 2010).

O uso da técnica histológica de HE permitiu identificar 17,2% de invasão neoplásica vascular por ninhos de queratinócitos, seja no espaço linfático ou vaso sanguíneo, formando um trombo no interior desses vasos. Esse resultado está próximo daquele de Tai *et al.* (2012) que encontraram 21,6% de invasão vascular utilizando a mesma técnica. Contudo, Kurtz *et al.* (2005) apresentaram valores superiores aos já mencionados, tendo sido inicialmente identificado 30% de invasão vascular nos casos já diagnosticados com CCEs orais, número esse que aumentou para 35% após a revisão das lâminas coradas em HE. A invasão linfovascular está relacionada com a disseminação da lesão, sendo importante quando associada ao estadiamento do tumor (NAKAYAMA *et al.*, 1999; NIIMI *et al.*, 2001; RAHIMA *et al.*, 2004; OMS, 2005).

Além do conhecimento das características morfológicas da lesão e a gradação do tumor, a presença de invasões linfovascular e perineural e a relação tumor/hospedeiro são fatores relevantes para o diagnóstico e prognóstico dos pacientes com CCE oral (BRYNE *et al.*, 1992; OMS, 1997; NIIMI *et al.*, 2001; BRANDWEIN-GENSLER *et al.*, 2005; DUNN, MORGAN E TREVOR, 2009).

Com a mesma técnica de identificação histológica, constatou-se a presença de invasão perineural por ninhos de queratinócitos em 31% dos casos, o que está em concordância com Tai *et al.* (2012) que encontraram 31,1%, mas diferente do que foi relatado em outros trabalhos, 52% (FAGAN *et al.*, 1998) e 62% (KURTZ *et al.*, 2005).

As prováveis explicações para esses diferentes resultados podem estar relacionadas ao tamanho da amostra, que foi muito heterogênea entre os estudos, variando de 29, no presente estudo, a 190 pacientes (FAGAN *et al.*, 1998; RAHIMA *et al.*, 2004; KURTZ *et al.*, 2005; TAI *et al.*, 2012), bem como o nível de profundidade dos cortes histológicos para análise, de modo que os planos teciduais mais profundos tendem a apresentar nervos com maior espessura e vasos mais calibrosos do que os do plano superficial, dificultando assim a identificação das estruturas anatômicas pela técnica HE. Os planos teciduais superficiais e profundos contribuem mais ou menos com a identificação das estruturas e está diretamente dependente da técnica utilizada para remoção cirúrgica do espécime e a localização do CCE.

Segundo Anneroth e Hansen (1984), é fundamental que sejam realizadas biópsias representativas da lesão, além de cortes seriados do espécime cirúrgico, em neoplasias com estadiamento T3 ou T4 predominantes, de modo que seja realizada a avaliação das alterações morfológicas do câncer na parte profunda da lesão (parte invasiva). Outra possível explicação diz respeito às dimensões das amostras avaliadas, pois quanto menores a profundidade e a largura, mais limitada é a análise do padrão de invasão do CCE oral. No presente estudo, não foi encontrada uma relação significativa ($p > 0,05$) das invasões neoplásicas perineural e vascular dos casos submetidos à técnica HE com as variáveis clinicopatológicas.

Uma alternativa às limitações de identificação de vasos e nervos pela técnica HE é o uso de biomarcadores, por exemplo, CD31, CD34, S100 e PGP9.5, os quais têm sido empregados nos estudos de invasão perineural e vascular dos CCEs orais, a fim de auxiliar na escolha do tratamento e no prognóstico para os pacientes (HOANG, SINKRE E ALBORES-SAAVEDRA, 2001; SHIEH *et al.*, 2004; KURTZ *et al.*, 2005; O'DONNELL *et al.*, 2008).

A partir da análise da expressão proteica do CD31, constatou-se intensa densidade (> 10 vasos por campo examinado em aumento de 400X) microvascular peritumoral nos casos de CCE oral com associação ao etilismo ($p = 0,042$). Outro estudo também relatou intensa densidade microvascular peritumoral, variando de 11 a 33 microvasos por campo examinado em aumento de 400X, com média de 20,4 microvasos encontrados (SHIEH *et al.*, 2004). Convém relatar que a proteína CD31 tem um papel importante no processo inflamatório e na angiogênese (DELISSER, NEWMAN E ALBELDA, 1994; JACKSON, 2003), que por sua vez é responsável pela nutrição das células tumorais, contribuindo assim para a progressão do tumor (AHMAD E HART, 1997), cujo crescimento também estimula a formação de novos microvasos (STRICKER E KUMAR, 2010). A limitação da análise da imunomarcação pelo CD31 se deve à evidenciação de muitos microvasos e linfócitos T, por dificultar a contagem exata entre as estruturas imunomarcadas, principalmente pela amostra ter aproximadamente 90% de infiltrado inflamatório moderado a intenso.

Quando foi empregado o biomarcador CD34 para identificação de vasos sanguíneos, foi detectada a presença de 6,9% de invasão neoplásica dentro desses vasos, o que contrasta com outros estudos que encontraram percentual de 29,16% (O'DONNELL *et al.*, 2008) e 36,6% (SHIEH *et al.*, 2004). Tais diferenças podem ser atribuídas à técnica de imunomarcação empregada, que no presente estudo caracterizou-se pela marcação única com CD34, enquanto os demais estudos utilizaram dupla marcação com CD34 e citoqueratina (SHIEH *et al.*, 2004) e tripla marcação com citoqueratina, CD34 e podoplanina (O'DONNELL *et al.*, 2008). Além disso, os diferentes tamanhos de amostra entre os estudos podem ter contribuído para os diferentes percentuais notados. A dupla ou tripla marcação dos vasos e queratinócitos poderiam trazer resultados mais relevantes na amostra estudada, haja vista que as células neoplásicas arrançadas em ninho ou isoladas seriam marcadas, facilitando a quantificação dos queratinócitos dentro ou próximo dos vasos. Novos resultados poderiam ser encontrados com uma marcação com citoqueratina na amostra estudada.

O anticorpo S100 é um dos imunomarcadores mais utilizados para a identificação de estruturas em cuja composição está a proteína S100, como ocorre em células nervosas, epiteliais ou gliais, glândulas e melanócitos (ZIMMER *et al.*, 1995; SCHÄFER E HEIZMANN, 1996). O uso desse anticorpo serviu para auxiliar a

identificação de invasão perineural, tendo sido encontrada em 44,8% dos casos avaliados, o que contrasta com os resultados de Kurtz *et al.* (2005), que encontraram 82% de casos de CCE oral com invasão perineural após reavaliação das amostras. Essa discrepância nos resultados pode ser devido aos diferentes perfis de padrão de invasão tumoral entre as amostras avaliadas. A análise do padrão de invasão do tumor foi preconizada por Bryne *et al.*, em 1992, e adotada pela OMS (2005), no entanto, ela não foi avaliada em ambos os estudos. Assim, sugere-se que no futuro seja incluída a análise do padrão de invasão tumoral em CCEs orais, com intuito de permitir associações entre o padrão de invasão do tumor (fronte invasivo) e as invasões perineural e vascular.

Um biomarcador mais sensível para identificar nervos do que o S100 é o PGP9.5, que demonstra as estruturas nervosas em todos os níveis do sistema nervoso (WILSON *et al.*, 1988). Além disso, marca fibras nervosas isoladas, em feixes nervosos, ao redor de vasos sanguíneos, e inervando músculos e glândulas (HILLIGES *et al.*, 1994). O PGP9.5 identifica terminações nervosas organizadas em diversas regiões da boca (HILLIGES *et al.*, 1996).

Quando este biomarcador foi utilizado, a invasão neoplásica perineural estava presente em 58,6% dos casos, número superior àquele detectado pelo S100 (44,8%). Essa superioridade na identificação de nervos está em concordância com os resultados de Hoang, Sinkre e Albores-Saavedra (2001), que demonstraram 95% de positividade da expressão do PGP9.5 em tumores malignos da bainha de nervo periférico, enquanto a expressão da proteína S100 foi menor (38%). Outro estudo demonstrou que 87% dos casos de CCEs orais expressaram a proteína PGP9.5 (RALHAN *et al.*, 1999). Em contrapartida, Habash, Hantash e Yunis (2012) relataram que em apenas 6,6% dos casos foram detectadas fibras nervosas marcadas pelo PGP9.5 dentro do próprio tecido tumoral, o que levou os autores a suporem que não há padrão de inervação aparente dentro do tecido do CCE oral. Quanto a essa análise, foram marcadas fibras nervosas nos tecidos adjacentes ao CCE em 40% dos casos avaliados quando foi utilizado o PGP9.5.

Além das análises acima apresentadas, foi realizada uma comparação dos métodos de marcação imunohistoquímica com a técnica de HE, tendo esta sido considerada o padrão ouro. Notou-se que os dados obtidos a partir da utilização da

molécula S100 foram mais compatíveis com aqueles obtidos a partir da técnica de HE. Em contrapartida, o mesmo não foi observado com a imunomarcção de PGP9.5, resultando em respostas menos compatíveis entre as duas técnicas.

Entretanto, quando a presença de invasão neoplásica perineural foi comparada entre os três métodos, o PGP9.5 identificou mais casos do que o método HE e o S100, detectando aproximadamente o dobro de invasões neoplásicas perineural que a técnica utilizada rotineiramente nos serviços anatomopatológicos. O PGP9.5 foi capaz de marcar fibras nervosas da cavidade oral de todos os tamanhos com impressionante clareza, demonstrando que este anticorpo é o melhor marcador para nervos quando comparado ao S100, corroborando com os resultados de Wilson *et al.* (1988), Hilliges *et al.* (1996) e Hoang, Sinkre e Albores-Saavedra (2001).

O registro da presença de invasões perineural e vascular durante a análise microscópica de CCEs orais pode ser realizado por meio do método convencional da técnica de HE, porém imunomarcadores para estruturas vasculares e neurais ampliam esta avaliação e auxiliam no prognóstico, devendo ser preconizados no diagnóstico patológico regular por serem mais efetivos.

7 CONCLUSÃO

A partir da análise microscópica da invasão neoplásica perineural e vascular dos CCEs orais de pacientes do Programa de Prevenção e Diagnóstico de Câncer de Boca e Lesões de Boca do Curso de Odontologia da UFES, pôde-se concluir que:

- A) Com relação ao grau de diferenciação das lesões, a maioria dos casos apresentou gradação bem diferenciada e houve relação significativa com infiltrado inflamatório peritumoral justaposto;
- B) Pela técnica de HE foi possível identificar a invasão neoplásica perineural e vascular;
- C) A análise semi-quantitativa da expressão proteica do CD31 mostrou intensa densidade microvascular peritumoral na maioria dos casos de CCEs orais, confirmando a presença de angiogênese tumoral;
- D) A análise da imunomarcagem com CD34 mostrou baixa disseminação dos CCEs orais por vasos sanguíneos. Sugere-se uma investigação mais detalhada dessas invasões com os anticorpos D240 e citoqueratina.
- E) Quanto à concordância entre os métodos HE, S100 e PGP9.5 na identificação da presença de invasão neoplásica perineural, o PGP9.5 mostrou-se mais efetivo quando comparado com as demais técnicas executadas;
- F) Considerando a técnica de HE, não houve relação entre invasões neoplásicas perineural e vascular e as variáveis clinicopatológicas;
- G) Considerando a técnica imunoistoquímica, a densidade microvascular peritumoral intensa foi relacionada ao etilismo. Utilizando o marcador S100 verificou-se a associação entre invasão neoplásica perineural e CCE bem diferenciado. Porém, com o PGP9.5 não houve nenhuma relação entre invasão neoplásica perineural com as variáveis clinicopatológicas.

8 REFERÊNCIAS

- AHMAD, A.; HART, I. R. Mechanisms of metastasis. **Crit Rev Oncol Hematol**, v. 26, n. 3, p. 163-173, 1997.
- ALBELDA, S. M. *et al.* Molecular and cellular properties of PECAM-1 (endoCAM/CD31): a novel vascular cell-cell adhesion molecule. **J Cell Biol**, v. 114, n. 5, p. 1059-1068, 1991.
- ALEMANHA. World Health Organization. **Histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa**. Appl Wemding, 1997. 87 p.
- ALONGE, O. K.; NARENDRAN, S. Opinions about oral cancer prevention and early detection among dentists practising along the Texas-Mexico border. **Oral Dis**, v. 9, n. 1, p. 41-45, 2003.
- ANNEROOTH, G.; HANSEN, L. S. A methodologic study of histologic classification and grading of malignancy in oral squamous cell carcinoma. **Scand J Dent Res**, v. 92, n. 5, p. 448-468, 1984.
- ARDUINO, P. G. *et al.* Clinical and histopathologic independent prognostic factors in oral squamous cell carcinoma: a retrospective study of 334 cases. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 66, n. 8, p. 1570-1579, 2008.
- BATISTA, A. C. *et al.* Distinctive clinical and microscopic features of squamous cell carcinoma of oral cavity and lip. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 109, n. 3, p. 74-79, 2010.
- BINMADI, N. O.; BASILE, J. R. Perineural invasion in oral squamous cell carcinoma: a discussion of significance and review of the literature. **Oral Oncol**, v. 47, n. 11, p. 1005-1010, 2011.
- BRANDWEIN-GENSLER, M. *et al.* Oral squamous cell carcinoma: histologic risk assessment, but not margin status, is strongly predictive of local disease-free and overall survival. **Am J Surg Pathol**, v. 29, n. 2, p. 167-178, 2005.
- BRASIL. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva: Ministério da Saúde. **A situação do tabagismo no Brasil: dados dos inquéritos do sistema internacional de vigilância do tabagismo da Organização Mundial da Saúde realizados no Brasil entre 2002 e 2009**. Rio de Janeiro, 2011. 76 p.
- BRASIL. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva: Ministério da Saúde. **Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2011. 118 p.
- BRASIL. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva. Ministério da Saúde. Carcinoma epidermóide da cabeça e pescoço. **Revista brasileira de cancerologia**, v. 47, n. 4, p. 361-376, 2001.
- BRASIL. Instituto Nacional de Câncer José Alencar Gomes da Silva: Ministério da Saúde. **Estimativa 2008: incidência de câncer no Brasil**. Rio de Janeiro, 2007. 94 p.

BRASIL. MINISTÉRIO DA SAÚDE. **TNM: classificação de tumores malignos**. Rio de Janeiro, 2004, 254 p.

BRODERS, A. C. Squamous-cell epithelioma of the skin: a study of 256 cases. **Ann Surg**, v. 73, n. 2, p. 141-160, 1921.

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. 375-381, 1992.

BRYNE, M.; JENSSEN, N.; BOYSEN, M. Histological grading in the deep invasive front of T1 and T2 glottic squamous cell carcinomas has high prognostic value. **Virchows Arch**, v. 427, n. 3, p. 277-281, 1995.

CIVIN C. I. *et al.* Antigenic analysis of hematopoiesis. III. A hematopoietic progenitor cell surface antigen defined by a monoclonal antibody raised against KG-1a cells. **J Immunol**, v. 133, n. 1, p. 157-165, 1984.

DAY, I. N.; HINKS, L. J.; THOMPSON, R. J. The structure of the human gene encoding protein gene product 9.5 (PGP9.5), a neuron-specific ubiquitin C-terminal hydrolase. **Biochem J**, v. 268, n. 2, p. 521-524, 1990.

DAY, I. N.; THOMPSON, R. J. Molecular cloning of cDNA coding for human PGP 9.5 protein. A novel cytoplasmic marker for neurones and neuroendocrine cells. **FEBS Lett**, v. 210, n. 2, p. 157-160, 1987.

DELISSER, H. M. *et al.* Involvement of endothelial PECAM-1/CD31 in angiogenesis. **Am J Pathol**, v. 151, n. 3, p. 671-677, 1997.

DELISSER, H. M.; NEWMAN, P. J.; ALBELDA, S. M. Molecular and functional aspects of PECAM-1/CD31. **Immunol Today**, v. 15, n. 10, p. 490-495, 1994.

DONATO, R. S100: a multigenic family of calcium-modulated proteins of the EF-hand type with intracellular and extracellular functional roles. **Int J Biochem Cell Biol**, v. 33, n. 7, p. 637-668, 2001.

DUNN, M.; MORGAN, M. B.; BEER, T. W. Perineural invasion: identification, significance, and a standardized definition. **Dermatol Surg**, v. 35, n. 2, p. 214-221, 2009.

FAGAN, J. J. *et al.* Perineural invasion in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Arch Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 124, n. 6, p. 637-640, 1998.

FRANÇA. International Agency for Research on Cancer. **IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risks to humans**. Lyon, 2004. 1473 p.

FRANÇA. World Health Organization. Classification of tumors. **Pathology and genetics of head and neck tumors**. Lyon, 2005. 430 p.

FRANCO, E. L. *et al.* Risk factors for oral cancer in Brazil: a case-control study. **Int J Cancer**, v. 43, n. 6, p. 992-1000, 1989.

FURNESS, S. G.; MCNAGNY, K. Beyond mere markers: functions for CD34 family of sialomucins in hematopoiesis. **Immunol Res**, v. 34, n. 1, p. 13-32, 2006.

GAITAN-CEPEDA, L. A.; PENICHE-BECERRA, A. G.; QUEZADA-RIVERA, D. Trends in frequency and prevalence of oral cancer and oral squamous cell carcinoma in Mexicans. A 20 years retrospective study. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 16, n. 1, p. 1-5, 2011.

GANDINI, S. *et al.* Tobacco smoking and cancer: a meta-analysis. **Int J Cancer**, v. 122, n. 1, p. 155-164, 2008.

GERVASIO, O. L. *et al.* Oral squamous cell carcinoma: a retrospective study of 740 cases in a Brazilian population. **Braz Dent J**, v. 12, n. 1, p. 57-61, 2001.

HABASH, F. S.; HANTASH, R. O.; YUNIS, M. A. Assessment of the innervation pattern of oral squamous cell carcinoma using neural protein gene product (9.5): an immunocytochemical study. **J Oral Maxillofac Pathol**, v. 16, n. 1, p. 16-21, 2012.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, United States, v. 144, n. 5, p. 646-674, 2011.

HILLIGES, M. *et al.* Immunohistochemical studies of neurochemical markers in normal human buccal mucosa. **Histochemistry**, v. 101, n. 4, p. 235-244, 1994.

HILLIGES, M. *et al.* Protein gene product 9.5: immunoreactive nerves and cells in human oral mucosa. **Anat Rec**, v. 245, n. 4, p. 621-632, 1996.

HOANG, M. P.; SINKRE, P.; ALBORES-SAAVEDRA, J. Expression of protein gene product 9.5 in epithelioid and conventional malignant peripheral nerve sheath tumors. **Arch Pathol Lab Med**, v. 125, n. 10, p. 1321-1325, 2001.

HOWIE, N. M. *et al.* Short-term exposure to alcohol increases the permeability of human oral mucosa. **Oral Dis**, v. 7, n. 6, p. 349-354, 2001.

IAMAROON, A. *et al.* Analysis of 587 cases of oral squamous cell carcinoma in northern Thailand with a focus on young people. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 33, n. 1, p. 84-88, 2004.

JACKSON, D. E. The unfolding tale of PECAM-1. **FEBS Lett**, v. 540, n. 1-3, p. 7-14, 2003.

JACKSON, P.; THOMPSON, R. J. The demonstration of new human brain-specific proteins by high-resolution two-dimensional polyacrylamide gel electrophoresis. **J Neurol Sci**, v. 49, n. 3, p. 429-438, 1981.

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

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Histologia e seus métodos de estudo. In: _____. **Histologia básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 1-21.

JUNQUEIRA, L. C.; CARNEIRO, J. Tecido nervoso. In: _____. **Histologia básica**. 11. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p. 153-181.

KLIGMAN, D.; HILT, D. C. The S100 protein family. **Trends Biochem Sci**, v. 13, n. 11, p. 437-443, 1988.

KREPPEL, M. *et al.* Prognostic value of the sixth edition of the UICC's TNM classification and stage grouping for oral cancer. **J Surg Oncol**, v. 102, n. 5, p. 443-449, 2010.

KUMAR, V. *et al.* Inflamação aguda e crônica. In: _____. **Robbins & Cotran patologia: bases patológicas das doenças**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. p. 43-77.

KURTZ, K. A. *et al.* Perineural and vascular invasion in oral cavity squamous carcinoma: increased incidence on re-review of slides and by using immunohistochemical enhancement. **Arch Pathol Lab Med**, v. 129, n. 3, p. 354-359, 2005.

LANZA, F.; HEALY, L.; SUTHERLAND, D. R. Structural and functional features of the CD34 antigen: an update. **J Biol Regul Homeost Agents**, v. 15, n. 1, p. 1-13, 2001.

LONGATTO FILHO, A. *et al.* How useful is the assessment of lymphatic vascular density in oral carcinoma prognosis? **World J Surg Oncol**, v. 5, p. 140, 2007.

LUNDQVIST, L. *et al.* The importance of stromal inflammation in squamous cell carcinoma of the tongue. **J Oral Pathol Med**, v. 41, n. 5, p. 379-383, 2012.

MACHADO, C. R. S. Tecido nervoso. In: MACHADO, A. B. M. **Neuroanatomia funcional**. 2. ed. São Paulo: Atheneu, 2000. p. 17-33.

MAROCCHIO, L. S. *et al.* Oral squamous cell carcinoma: an analysis of 1,564 cases showing advances in early detection. **J Oral Sci**, v. 52, n. 2, p. 267-273, 2010.

MASTORAKI, A. *et al.* PGP 9.5 and cyclin D1 coexpression in cutaneous squamous cell carcinomas. **Int J Surg Pathol**, v. 17, n. 6, p. 413-420, 2009.

MORIYAMA-KITA, M. *et al.* Correlation of S100A4 expression with invasion and metastasis in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol**, v. 40, n. 5, p. 496-500, 2004.

NAGATSUKA, H. *et al.* Various immunostaining patterns of CD31, CD34 and endoglin and their relationship with lymph node metastasis in oral squamous cell carcinomas. **J Oral Pathol Med**, v. 34, n. 2, p. 70-76, 2005.

NAKAYAMA, A. *et al.* Relation between lymphatic vessel diameter and clinicopathologic parameters in squamous cell carcinomas of the oral region. **Cancer**, v. 86, n. 2, p. 200-206, 1999.

NEVILLE, B. W. *et al.* Patologia Epitelial. In: _____. **Patologia Oral & Maxilofacial**. 3. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. p. 363-435.

NEWMAN, P. J. *et al.* PECAM-1 (CD31) cloning and relation to adhesion molecules of the immunoglobulin gene superfamily. **Science**, v. 247, n. 4947, p. 1219-1222, 1990.

- NEWMAN, P. J. The biology of PECAM-1. **J Clin Invest**, v. 100, n. 11 Suppl, p. S25-29, 1997.
- NIELSEN, J. S.; MCNAGNY, K. M. Novel functions of the CD34 family. **J Cell Sci**, v. 121, n. Pt 22, p. 3683-3692, 15 2008.
- NIIMI, K. *et al.* Vascular invasion in squamous cell carcinomas of human oral mucosa. **Oral Oncol**, v. 37, n. 4, p. 357-364, 2001.
- O'DONNELL, R. K. *et al.* Immunohistochemical method identifies lymphovascular invasion in a majority of oral squamous cell carcinomas and discriminates between blood and lymphatic vessel invasion. **J Histochem Cytochem**, v. 56, n. 9, p. 803-810, 2008.
- OGDEN, G. R.; WIGHT, A. J. Aetiology of oral cancer: alcohol. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v. 36, n. 4, p. 247-251, 1998.
- PINHEIRO, S. M. S.; CARDOSO, J. P.; PRADO, F. O. Conhecimentos e diagnóstico em câncer bucal entre profissionais de odontologia de Jequié, Bahia. **Rev Bras Cancerol**, v. 56, n. 2, p. 195-205, 2010.
- PRIVRATSKY, J. R. *et al.* Relative contribution of PECAM-1 adhesion and signaling to the maintenance of vascular integrity. **J Cell Sci**, v. 124, n. Pt 9, p. 1477-1485, 2011.
- RAHIMA, B. *et al.* Prognostic significance of perineural invasion in oral and oropharyngeal carcinoma. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 97, n. 4, p. 423-431, 2004.
- RALHAN, R. *et al.* P-glycoprotein is positively correlated with p53 in human oral pre-malignant and malignant lesions and is associated with poor prognosis. **Int J Cancer**, v. 84, n. 1, p. 80-85, 1999.
- RAMOS-VARA, J. A. Technical aspects of immunohistochemistry. **Vet Pathol**, v. 42, n. 4, p. 405-426, 2005.
- REGEZI, J. A.; SCIUBBA, J. J.; JORDAN, R. C. K. Condições ulcerais. In: _____. **Patologia bucal correlações clinicopatológicas**. 5. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2008. p. 21-71.
- RIBEIRO, A. C. *et al.* Clinical and histopathological analysis of oral squamous cell carcinoma in young people: a descriptive study in Brazilians. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v. 47, n. 2, p. 95-98, 2009.
- SALAMA, I. *et al.* A review of the S100 proteins in cancer. **Eur J Surg Oncol**, v. 34, n. 4, p. 357-364, 2008.
- SANTOS, L. C.; BATISTA ODE, M.; CANGUSSU, M. C. Characterization of oral cancer diagnostic delay in the state of Alagoas. **Braz J Otorhinolaryngol**, v. 76, n. 4, p. 416-422, 2010.
- SAPKOTA, D. *et al.* Expression profile of the S100 gene family members in oral squamous cell carcinomas. **J Oral Pathol Med**, v. 37, n. 10, p. 607-615, 2008.

SCHAFER, B. W.; HEIZMANN, C. W. The S100 family of EF-hand calcium-binding proteins: functions and pathology. **Trends Biochem Sci**, v. 21, n. 4, p. 134-140, 1996.

SHIEH, Y. S. *et al.* Role of angiogenic and non-angiogenic mechanisms in oral squamous cell carcinoma: correlation with histologic differentiation and tumor progression. **J Oral Pathol Med**, v. 33, n. 10, p. 601-606, 2004.

STRICKER, T. P.; KUMAR, V. Neoplasia. In: KUMAR, V. *et al.* **Robbins & Cotran patologia: bases patológicas das doenças**. 8. ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2010. p.259-330.

SUÍÇA. World Health Organization. **Cancer control knowledge into action: WHO guide for effective programmes**. Prevention. Genebra, 2007. 48 p.

SUÍÇA. World Health Organization. **Cancer control knowledge into action: WHO guide for effective programmes**. Early detection. Genebra, 2007. 42 p.

TAI, S. K. *et al.* Risks and clinical implications of perineural invasion in T1-2 oral tongue squamous cell carcinoma. **Head Neck**, v. 34, n. 7, p. 994-1001, 2012.

TANG, D. G. *et al.* Identification of PECAM-1 in solid tumor cells and its potential involvement in tumor cell adhesion to endothelium. **J Biol Chem**, v. 268, n. 30, p. 22883-22894, 1993.

THOMPSON, R. J. *et al.* PGP 9.5: a new marker for vertebrate neurons and neuroendocrine cells. **Brain Res**, v. 278, n. 1-2, p. 224-228, 1983.

TINDLE, R. W. *et al.* A novel monoclonal antibody BI-3C5 recognises myeloblasts and non-B non-T lymphoblasts in acute leukaemias and CGL blast crises, and reacts with immature cells in normal bone marrow. **Leuk Res**, v. 9, n. 1, p. 1-9, 1985.

TRAMACERE, I. *et al.* A meta-analysis of alcohol drinking and oral and pharyngeal cancers. Part 1: overall results and dose-risk relation. **Oral Oncol**, v. 46, n. 7, p. 497-503, 2010.

WEIR, J. M.; DUNN, J. E. Smoking and mortality: a prospective study. **Cancer**, v. 25, n. 1, p. 105-112, 1970.

WILSON, P. O. *et al.* The immunolocalization of protein gene product 9.5 using rabbit polyclonal and mouse monoclonal antibodies. **Br J Exp Pathol**, v. 69, n. 1, p. 91-104, 1988.

ZAIN, R. B. Cultural and dietary risk factors of oral cancer and precancer: a brief overview. **Oral Oncol**, v. 37, n. 3, p. 205-210, 2001.

ZIGON, G. *et al.* Prognoses for head and neck cancers in Europe diagnosed in 1995-1999: a population-based study. **Ann Oncol**, v. 22, n. 1, p. 165-174, 2011.

ZIMMER, D. B. *et al.* The S100 protein family: history, function, and expression. **Brain Res Bull**, v. 37, n. 4, p. 417-429, 1995.

APÊNDICES

APÊNDICE A – Instrumentos de coleta de dados

I) Nome

II) Número identificação

III) Ano de diagnóstico

- | | |
|---------|---------|
| 1. 2004 | 5. 2008 |
| 2. 2005 | 6. 2009 |
| 3. 2006 | 7. 2010 |
| 4. 2007 | 8. 2011 |

IV) Raça/Cor

1. Branca
2. Negra
3. Parda
4. Amarela
5. Índigena

V) Idade: _____ (Anos)

- | | |
|----------------|--------------|
| 6. 1. 1 – 10 | 6. 51 - 60 |
| 7. 2. 11 – 20 | 7. 61 - 70 |
| 8. 3. 21 - 30 | 8. 71 - 80 |
| 9. 4. 31 – 40 | 9. 81 - 90 |
| 10. 5. 41 – 50 | 10. 91 - 100 |

VI) Sexo

1. Feminino
2. Masculino

VII) Tabagismo

1. Sim
2. Não

VIII) Etilismo

1. Sim
2. Não

IX) Localização da lesão

1. Soalho
2. Língua
3. Lábio
4. Palato duro
5. Palato mole
6. Gengiva
7. Mucosa jugal
8. Rebordo alveolar
9. Trígono retromolar

X) Estadiamento clínico (T)

1. Não pode ser avaliado

2. ≤ 2 cm
3. $2 < t \leq 4$ cm
4. > 4 cm
5. > 4 cm e outras regiões acometidas

XI) Estadiamento clínico (N)

0. Não pode ser avaliado
1. Ausência de metástases regionais
2. Metástase em linfonodo ipsilateral único, ≤ 3 cm
3. Metástase em linfonodos, $3 < n \leq 6$ cm
4. Metástase em linfonodos, > 6 cm

XII) Estadiamento clínico (M)

0. Não pode ser avaliado
1. Ausente (metástase à distância)
2. Presente (metástase à distância)

XIII) Ceratinização prematura de células individuais (disceratose)

1. Presente
2. Não detectado

XIV) Pérolas córneas

1. Presente
2. Não detectado

XV) Hiper Cromatismo

1. Presente
2. Não detectado

XVI) Aumento do número de figuras mitóticas

1. Presente
2. Não detectado

XVII) Células com mitoses atípicas

1. Presente
2. Não detectado

XVIII) Mitoses superficiais anormais

1. Presente
2. Não detectado

XIX) Variação anormal do tamanho do núcleo (anisonucleose)

1. Presente
2. Não detectado

XX) Variação anormal da forma do núcleo (pleomorfismo nuclear)

1. Presente
2. Não detectado

XXI) Variação anormal do tamanho da célula (anisocitose)

1. Presente
2. Não detectado

XXII) Variação anormal da forma da célula (pleomorfismo celular)

1. Presente
2. Não detectado

XXIII) Aumento da relação núcleo-citoplasma

1. Presente
2. Não detectado

XXIV) Aumento do número e tamanho dos nucléolo

1. Presente
2. Não detectado

XXV) CD 31 – Densidade microvascular

1. Moderado
2. Intenso

XXVI) CD 34 – Invasão neoplásica de vasos sanguíneos

1. Presente
2. Não detectado

XXVII) CD 34- Arranjo da célula neoplásica vascular

1. Isolada
2. Ninho

XXVIII) CD 34- Morfologia do vaso sanguíneo

1. Íntegro
2. Parcialmente destruído

XXIX) S100 - Invasão neoplásica perineural

1. Presente
2. Não detectado

XXX) S 100 - Arranjo da célula neoplásica perineural

1. Isolada
2. Ninho

XXXI) S100 - Morfologia do nervo

1. Íntegro
2. Parcialmente destruído

XXXII) PGP9.5 - Invasão neoplásica perineural

1. Presente
2. Não detectado

XXXIII) PGP9.5 - Arranjo da célula neoplásica perineural

1. Isolada
2. Ninho

XXXIV) PGP9.5 - Morfologia do nervo

1. Íntegro
2. Parcialmente destruído

APÊNDICE B – Dados clínicos, histopatológicos (HE) e imunoistoquímicos obtidos das análises de pacientes com CCE oral

CASO	GÊNERO	IDADE	RAÇA/COR	LOCALIZAÇÃO DO TUMOR	TABAGISMO	ETILISMO	ESTADIAMENTO CLÍNICO
1	M	53	PARDA	REBORDO ALVEOLAR	SIM	SIM	NI
2	M	65	BRANCA	LÍNGUA	SIM	NÃO	NI
3	M	42	BRANCA	LÍNGUA	SIM	SIM	NI
4	F	87	BRANCA	REBORDO ALVEOLAR	NÃO	NÃO	NI
5	M	56	NEGRA	ASSOALHO BUCAL	SIM	SIM	NI
6	F	44	NEGRA	PALATO DURO	SIM	SIM	NI
7	M	55	BRANCA	GENGIVA E LÍNGUA	SIM	SIM	NI
8	M	68	PARDA	REBORDO ALVEOLAR	SIM	SIM	NI
9	M	73	PARDA	LÍNGUA	SIM	NAO	NI
10	M	36	BRANCA	ASSOALHO BUCAL	SIM	NÃO	NI
11	M	69	NEGRA	ASSOALHO BUCAL	SIM	NÃO	NI
12	M	65	BRANCA	REBORDO ALVEOLAR	SIM	SIM	NI
13	F	74	PARDA	LÍNGUA	SIM	NÃO	NI
14	M	47	PARDA	ASSOALHO BUCAL	SIM	NÃO	NI
15	M	49	PARDA	PALATO MOLE	SIM	SIM	T4N0M0
16	M	52	NI	REBORDO ALVEOLAR	SIM	NÃO	NI
17	M	78	PARDA	MUCOSA JUGAL	NÃO	NÃO	T2N2M0
18	M	56	PARDA	ASSOALHO BUCAL	NÃO	NÃO	T4N1M0
19	F	60	BRANCA	LÍNGUA	NÃO	NÃO	T1N0M0
20	M	74	BRANCA	PALATO MOLE E REBORDO ALVEOLAR	SIM	SIM	T4N1M0
21	M	44	NEGRA	LÍNGUA	SIM	NÃO	T4N1M0
22	M	48	PARDA	PALATO DURO E REBORDO ALVEOLAR	NÃO	NÃO	T4N0M0
23	M	53	BRANCA	REBORDO ALVEOLAR E TRÍGONO RETROMOLAR	SIM	NÃO	T4N1M0
24	M	47	BRANCA	ASSOALHO BUCAL E REBORDO ALVEOLAR	SIM	SIM	T4N0M0
25	M	49	BRANCA	LÁBIO	SIM	SIM	T1N0M0
26	M	68	BRANCA	ASSOALHO BUCAL	SIM	NÃO	T4N1M0
27	M	65	PARDA	LÍNGUA E ASSOALHO BUCAL	SIM	SIM	T2N0M0
28	M	47	PARDA	ASSOALHO BUCAL	SIM	SIM	T1N1M0
29	F	65	PARDA	PALATO MOLE	SIM	SIM	T1N0M0

QUADRO 1 - DADOS CLÍNICOS OBTIDOS DA REVISÃO DE PRONTUÁRIOS E LAUDOS DE PACIENTES COM CCE ORAL

Legenda: M: masculino; F: feminino; NI: não informado; T: tamanho; N: nódulo; M: metástase

CASO	DISCRATOSE	PÉROLAS CÔRNEAS	HIPERCROMATISMO	AUMENTO DO NÚMERO DE FIGURAS MITÓTICAS	CÉLULAS COM MITOSES ATÍPICAS	ANISONUCLEOSE	PLEOMORFISMO NUCLEAR	ANISOCITOSE	PLEOMORFISMO CELULAR	AUMENTO DA RELAÇÃO NÚCLEO-CITOPLASMA	AUMENTO DO NÚMERO E TAMANHO DOS NUCLÉOLOS	GRADAÇÃO HISTOPATOLÓGICA	INFILTRADO INFLAMATÓRIO PERITUMORAL	INTENSIDADE DO INFILTRADO INFLAMATÓRIO
1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	BD	J	L
2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	BD	J	M
3	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	BD	J	I
4	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	BD	J	L
5	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	BD	J	M
6	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	BD	J	M
7	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	BD	J	I
8	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	BD	J	L
9	P	ND	P	P	P	P	P	P	P	P	P	MD	D	M
10	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	BD	J	I
11	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	BD	D	M
12	ND	ND	P	P	P	P	P	P	P	P	P	MD	J	M
13	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	BD	D	M
14	ND	ND	P	P	P	P	P	P	P	P	P	MD	D	M
15	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	BD	D	M
16	P	P	P	ND	ND	P	P	P	P	P	P	BD	J	M
17	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	BD	D	L
18	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	BD	D	M
19	P	ND	P	ND	ND	P	P	P	P	P	P	MD	D	M
20	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	BD	J	I
21	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	BD	D	I
22	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	BD	D	M
23	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	BD	D/J	M/I
24	ND	ND	P	P	P	P	P	P	P	P	P	MD	D	I
25	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	BD	D	I
26	ND	ND	P	P	P	P	P	P	P	P	P	MD	D	M
27	ND	ND	P	P	P	P	P	P	P	P	P	MD	D	I
28	ND	ND	P	ND	ND	P	P	P	P	P	P	MD	D	M
29	ND	ND	P	P	P	P	P	P	P	P	P	MD	D	M

QUADRO 2 - DADOS HISTOPATOLÓGICOS OBTIDOS PELA ANÁLISE DE CASOS SUBMETIDOS À TÉCNICA DE HE

Legenda: P: presente; ND: não diagnosticado; BD: bem diferenciado; MD: moderadamente diferenciado; J: justaposto; D: difuso; L: leve; M: moderado; I: intenso.

CASO	INVASÃO NEOPLÁSICA DE VASOS (HE)	ARRANJO DA CÉLULA NEOPLÁSICA VASCULAR (HE)	MORFOLOGIA DO VASO (HE)	INVASÃO NEOPLÁSICA PERINEURAL (HE)	ARRANJO DA CÉLULA NEOPLÁSICA PERINEURAL (HE)	MORFOLOGIA DO NERVO (HE)
1	ND	NA	NA	P	N	INT
2	P	N	INT	P	N	INT
3	P	N	INT	P	N	INT
4	ND	NA	NA	ND	NA	NA
5	ND	NA	NA	ND	NA	NA
6	ND	NA	NA	P	N	INT
7	ND	NA	NA	ND	NA	NA
8	ND	NA	NA	ND	NA	NA
9	ND	NA	NA	ND	NA	NA
10	ND	NA	NA	ND	NA	NA
11	ND	NA	NA	P	N	INT
12	P	N	INT	P	N	INT
13	ND	NA	NA	P	N	INT
14	ND	NA	NA	ND	NA	NA
15	P	N	INT	ND	NA	NA
16	ND	NA	NA	ND	NA	NA
17	ND	NA	NA	ND	NA	NA
18	ND	NA	NA	P	N	INT
19	ND	NA	NA	ND	NA	NA
20	ND	NA	NA	ND	NA	NA
21	ND	NA	NA	P	N	INT
22	ND	NA	NA	ND	NA	NA
23	ND	NA	NA	ND	NA	NA
24	ND	NA	NA	ND	NA	NA
25	P	N	INT	ND	NA	NA
26	ND	NA	NA	ND	NA	NA
27	ND	NA	NA	ND	NA	NA
28	ND	NA	NA	ND	NA	NA
29	ND	NA	NA	ND	NA	NA

QUADRO 3 - DADOS DA INVASÃO PERINEURAL E VASCULAR DOS CCEs ORAIS SUBMETIDOS À TÉCNICA DE HE

Legenda: ND: não detectado; P: presente; NA: não avaliado; N: ninho; INT: integro

CASO	DENSIDADE MICROVASCULAR PERITUMORAL (CD 31)	INVASÃO NEOPLÁSICA DE VASOS SANGÜÍNEOS (CD 34)	ARRANJO DA CÉLULA NEOPLÁSICA VASCULAR (CD 34)	MORFOLOGIA DO VASO SANGÜÍNEO (CD 34)	INVASÃO NEOPLÁSICA PERINEURAL (S100)	ARRANJO DA CÉLULA NEOPLÁSICA PERINEURAL (S100)	MORFOLOGIA DO NERVO (S100)	INVASÃO NEOPLÁSICA PERINEURAL (PGP9.5)	ARRANJO DA CÉLULA NEOPLÁSICA PERINEURAL (PGP9.5)	MORFOLOGIA DO NERVO (PGP9.5)
1	I	ND	NA	NA	P	N	INT	P	N	INT
2	I	P	N	PD	P	N	INT	P	N	INT
3	I	ND	NA	NA	P	N	INT	P	N	INT
4	I	ND	NA	NA	P	N	INT	P	N	INT
5	I	ND	NA	NA	P	N	INT	P	N	INT
6	I	ND	NA	NA	P	N	INT	P	N	INT
7	I	ND	NA	NA	ND	NA	NA	ND	NA	NA
8	I	ND	NA	NA	ND	NA	NA	ND	NA	NA
9	I	ND	NA	NA	ND	NA	NA	ND	NA	NA
10	I	ND	NA	NA	ND	NA	NA	P	N	INT
11	I	ND	NA	NA	P	N	INT	P	N	INT
12	I	ND	NA	NA	P	N	INT	P	N	INT
13	M	P	ISOL	INT	P	N	INT	P	N	INT
14	M	ND	NA	NA	ND	NA	NA	P	N	INT
15	I	ND	NA	NA	P	N	INT	ND	NA	NA
16	M	ND	NA	NA	ND	NA	NA	ND	NA	NA
17	M	ND	NA	NA	ND	NA	NA	P	N	INT
18	I	ND	NA	NA	P	N	INT	P	N	INT
19	M	ND	NA	NA	ND	NA	NA	ND	NA	NA
20	I	ND	NA	NA	P	N	INT	ND	NA	NA
21	I	ND	NA	NA	P	N	INT	ND	NA	NA
22	I	ND	NA	NA	P	N	INT	P	N	INT
23	I	ND	NA	NA	ND	NA	NA	ND	NA	NA
24	I	ND	NA	NA	ND	NA	NA	ND	NA	NA
25	I	ND	NA	NA	ND	NA	NA	P	N	INT
26	I	ND	NA	NA	ND	NA	NA	P	N	INT
27	I	ND	NA	NA	ND	NA	NA	ND	NA	NA
28	I	ND	NA	NA	ND	NA	NA	P	N	INT
29	I	ND	NA	NA	ND	NA	NA	ND	NA	NA

QUADRO 4 - CRITÉRIOS AVALIADOS NOS CCEs ORAIS SUBMETIDOS À TÉCNICA DE IMUNOISTOQUÍMICA

I: intensa; M: moderada; ND: não detectado; P: presente; NA: não avaliado; N: ninho; ISOL: isolada; PD: parcialmente destruído; INT: íntegro;

APÊNDICE C – Resultados estatísticos

TABELA 1 – RELAÇÃO ENTRE INVASÃO NEOPLÁSICA DE VASOS (HE) COM ALGUMAS VARIÁVEIS.

Variáveis	Invasão Neoplásica de vasos (HE)		p-valor
	Presente	Não detectado	
Gênero			
Masculino	5 (100,0%)	19 (79,2%)	0,553*
Feminino	0 (0,0%)	5 (20,8%)	
Faixa etária			
< 40 anos	0 (0,0%)	1 (4,2%)	1,000*
≥ 40 anos	5 (100,0%)	23 (95,8%)	
Raça / Cor			
Branca	4 (80,0%)	8 (34,8%)	0,133*
Negra / Parda	1 (20,0%)	15 (65,2%)	
Tabagismo			
Sim	5 (100,0%)	19 (79,2%)	0,553*
Não	0 (0,0%)	5 (20,8%)	
Etilismo			
Sim	4 (80,0%)	10 (41,7%)	0,169*
Não	1 (20,0%)	14 (58,3%)	
Grupamento por estádios			
I	1 (50,0%)	2 (16,7%)	-
II	0 (0,0%)	1 (8,3%)	
III	0 (0,0%)	1 (8,3%)	
IV	1 (50,0%)	8 (66,7%)	
Tamanho do tumor			
≤ 4 cm	1 (50,0%)	3 (25,0%)	0,505*
> 4 cm	1 (50,0%)	9 (75,0%)	
Gradação histopatológica			
Bem diferenciado	4 (80,0%)	16 (66,7%)	1,000*
Moderadamente diferenciado	1 (20,0%)	8 (33,3%)	
Total	100,0%	100,0%	-

* Teste exato de fisher

** Razão da máxima verossimilhança

Não foi possível se observar na Tabela 1 resultados estatisticamente significativos, ou seja, não houve relação entre as variáveis.

TABELA 2 – RELAÇÃO ENTRE INVASÃO NEOPLÁSICA PERINEURAL (HE) COM VARIÁVEIS CLÍNICOPATOLÓGICAS.

Variáveis	Invasão Neoplásica Perineural (HE)		p-valor
	Presente	Não detectado	
Gênero			
Masculino	7 (77,8%)	17 (85,0%)	0,633*
Feminino	2 (22,2%)	3 (15,0%)	
Faixa etária			
< 40 anos	0 (0,0%)	1 (5,0%)	1,000*
≥ 40 anos	9 (100,0%)	19 (95,0%)	
Raça / Cor			
Branca	3 (33,3%)	9 (47,4%)	0,687*
Negra / Parda	6 (66,7%)	10 (52,6%)	
Tabagismo			
Sim	8 (88,9%)	16 (80,0%)	1,000*
Não	1 (11,1%)	4 (20,0%)	
Etilismo			
Sim	4 (44,4%)	10 (50,0%)	1,000*
Não	5 (55,6%)	10 (50,0%)	
Grupamento por estádios			
I	0 (0,0%)	3 (25,0%)	-
II	0 (0,0%)	1 (8,3%)	
III	0 (0,0%)	1 (8,3%)	
IV	2 (100,0%)	7 (58,3%)	
Tamanho do tumor			
≤ 4 cm	0 (0,0%)	4 (33,3%)	1,000*
> 4 cm	2 (100,0%)	8 (66,7%)	
Gradação histopatológica			
Bem diferenciado	8 (88,9%)	12 (60,0%)	0,201*
Moderadamente diferenciado	1 (11,1%)	8 (40,0%)	
Total	100,0%	100,0%	-

* Teste exato de fisher

** Razão da máxima verossimilhança

Não foi possível se observar na Tabela 2 resultados estatisticamente significativos, ou seja, não houve relação entre as variáveis.

TABELA 3 – RELAÇÃO ENTRE INVASÃO NEOPLÁSICA DE VASOS (CD34) COM VARIÁVEIS CLINICOPATOLÓGICAS.

Variáveis	Invasão Neoplásica de Vasos (CD34)		p-valor
	Presente	Não detectado	
Gênero			
Masculino	1 (50,0%)	23 (85,2%)	0,320*
Feminino	1 (50,0%)	4 (14,8%)	
Faixa etária			
< 40 anos	0 (0,0%)	1 (3,7%)	1,000*
≥ 40 anos	2 (100,0%)	26 (96,3%)	
Raça / Cor			
Branca	1 (50,0%)	11 (42,3%)	1,000*
Negra / Parda	1 (50,0%)	15 (57,7%)	
Tabagismo			
Sim	2 (100,0%)	22 (81,5%)	1,000*
Não	0 (0,0%)	5 (18,5%)	
Etilismo			
Sim	0 (0,0%)	14 (51,9%)	0,483*
Não	2 (100,0%)	13 (48,1%)	
Grupamento por estádios			
I	0 (0,0%)	3 (21,4%)	
II	0 (0,0%)	1 (7,1%)	-
III	0 (0,0%)	1 (7,1%)	
IV	0 (0,0%)	9 (64,3%)	
Tamanho do tumor			
≤ 4 cm	0 (0,0%)	4 (28,6%)	-
> 4 cm	0 (0,0%)	10 (71,4%)	
Gradação histopatológica			
Bem diferenciado	2 (100,0%)	18 (66,7%)	1,000*
Moderadamente diferenciado	0 (0,0%)	9 (33,3%)	
Total	100,0%	100,0%	-

* Teste exato de fisher

** Razão da máxima verossimilhança

Não foi possível se observar na Tabela 3 resultados estatisticamente significativos, ou seja, não houve relação entre as variáveis.

TABELA 4 – RELAÇÃO ENTRE INVASÃO NEOPLÁSICA PERINEURAL (PGP9.5) COM VARIÁVEIS CLINICOPATOLÓGICAS.

Variáveis	Invasão Neoplásica Perineural (PGP9.5)		p-valor
	Presente	Não detectado	
Gênero			
Masculino	14 (82,4%)	10 (83,3%)	1,000*
Feminino	3 (17,6%)	2 (16,7%)	
Faixa etária			
< 40 anos	1 (5,9%)	0 (0,0%)	1,000*
≥ 40 anos	16 (94,1%)	12 (100,0%)	
Raça / Cor			
Branca	7 (41,2%)	5 (45,5%)	1,000*
Negra / Parda	10 (58,8%)	6 (54,5%)	
Tabagismo			
Sim	14 (82,4%)	10 (83,3%)	1,000*
Não	3 (17,6%)	2 (16,7%)	
Etilismo			
Sim	8 (47,1%)	6 (50,0%)	0,876
Não	9 (52,9%)	6 (50,0%)	
Grupamento por estádios			
I	1 (16,7%)	2 (25,0%)	
II	1 (16,7%)	0 (0,0%)	-
III	0 (0,0%)	1 (12,5%)	
IV	4 (66,7%)	5 (62,5%)	
Tamanho do tumor			
≤ 4 cm	2 (33,3%)	2 (25,0%)	1,000*
> 4 cm	4 (66,7%)	6 (75,0%)	
Gradação histopatológica			
Bem diferenciado	13 (76,5%)	7 (58,3%)	0,422*
Moderadamente diferenciado	4 (23,5%)	5 (41,7%)	
Total	(100,0%)	(100,0%)	-

* Teste exato de fisher

** Razão da máxima verossimilhança

Não foi possível se observar na Tabela 4 resultados estatisticamente significativos, ou seja, não houve relação entre as variáveis.

ANEXO

ANEXO A – Documento de aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa



**UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE**

Vitória-ES, 25 de outubro de 2010.

Da: Profa. Dr^a. Ethel Leonor Noia Maciel
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde

Para: Prof. (a) Leticia Nogueira da Gama de Souza
Pesquisador (a) Responsável pelo Projeto de Pesquisa intitulado: **“Estudo retrospectivo por meio de imunohistoquímica da invasão perineural e perivascular em lesões de carcinoma de células escamosas orais”**.

Senhor (a) Pesquisador (a),

Informamos a Vossa Senhoria, que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, após analisar o Projeto de Pesquisa nº. 138/10 intitulado: **“Estudo retrospectivo por meio de imunohistoquímica da invasão perineural e perivascular em lesões de carcinoma de células escamosas orais”** e o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**, cumprindo os procedimentos internos desta Instituição, bem como as exigências das Resoluções 196 de 10.10.96, 251 de 07.08.97 e 292 de 08.07.99, **APROVOU** o referido projeto, em Reunião Ordinária realizada em 29 de setembro de 2010.

Gostaríamos de lembrar que cabe ao pesquisador responsável elaborar e apresentar os relatórios parciais e finais de acordo com a resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196 de 10/10/96, inciso IX.2. letra “c”.

Atenciosamente,


 Prof.^a Dr.^a Ethel Leonor Noia Maciel
 COORDENADORA
 Comitê de Ética em Pesquisa
 Centro de Ciências da Saúde UFES