

UNIVERSIDADE FEDERAL DE GOIÁS

FACULDADE DE ODONTOLOGIA

JOSÉ VIEIRA DE SPÍNDULA FILHO

DETECÇÃO DE HPV E AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO
CELULAR EM CARCINOMAS ESPINOCELULARES E
CARCINOMAS VERRUCOSOS DE BOCA

GOIÂNIA

2006

JOSÉ VIEIRA DE SPÍNDULA FILHO

DETECÇÃO DE HPV E AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO
CELULAR EM CARCINOMAS ESPINOCELULARES E
CARCINOMAS VERRUCOSOS DE BOCA

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre ao
Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da
Universidade Federal de Goiás.

Área de Concentração: Clínica Odontológica
Linha de Pesquisa: Estudo das manifestações clínicas e
tratamentos das lesões do sistema estomatognático
Orientador: Prof. Dr. Elismauro Francisco de Mendonça
Co-orientadores : Prof^a. Dr^a. Aline Carvalho Batista
Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz

Goiânia
2006

JOSÉ VIEIRA DE SPÍNDULA FILHO

Detecção de HPV e avaliação do índice de proliferação celular entre carcinomas
espinocelulares e carcinomas verrucosos de boca

Dissertação apresentada para obtenção do título de Mestre ao Programa
de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade
Federal de Goiás.

Aprovada em ____/____/____

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. Elismauro Francisco Mendonça
Faculdade de Odontologia da UFG

Prof. Dr. Aparecido Divino da Cruz
Diretor do Departamento de Biologia da UCG

Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Junior
Faculdade de Odontologia da USP

Prof^a. Dr^a. Aline Carvalho Batista
Faculdade de Odontologia da UFG

A minha família,

Cláudia, João Paulo e Carla por compreenderem à
minha ausência e pelo apoio a realização deste
estudo.

Ao eterno amigo,
Roserval Elias de Lima – *in memoriam*.

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, pelo dom da vida, a dádiva dos filhos e todas as coisas boas.

À minha esposa, **Cláudia Antoine Esper Spíndula**, a meus filhos **João Paulo Esper Spíndula** e **Carla Esper Spíndula**, que são a fonte de vida que me faz caminhar.

À minha mãe, **Maria Aparecida Teles Spíndula**, pelas orações em meu nome e que me deram força e atitude.

Aos meus irmãos **Célio Vieira Spíndula**, **Divino Vieira Teles**, **Iram Vieira Teles** e **Neuzita Teles Spíndula**, que estiveram presentes na minha educação quando criança.

À minha cunhada Elenilda Spíndula e a minha sobrinha Vanessa Spíndula.

Ao amigo **Rosenval Elias de Lima**, que enquanto vivo me deu apoio e estímulo, e ao Padre **Robson de Oliveira**, pelos seus ensinamentos bíblicos.

À toda família do Rosenval Elias de Lima, os meus sinceros agradecimento pela amizade e companhia.

À amiga **Dr^a. Virginia Suassuna**, a minha admiração e eterna gratidão.

À Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás (UFG), na pessoa de seu diretor **Prof. Dr. Gersinei Carlos de Freitas**.

À Coordenadora do Curso de Pós-graduação **Prof^a. Dr^a. Luciane Ribeiro de Resende Sucasas da Costa** e ao seu antecessor, **Prof^o Marcos Augusto Lenza**.

A todos professores do curso de pós-graduação.

À **Universidade Católica de Goiás (UCG)** pelo apoio técnico e financeiro desta pesquisa.

Ao Conselho Nacional de Pesquisa (**CNPq**) pela bolsa de mestrado concedida.

Ao **Prof. Dr. Elismauro Francisco Mendonça**, que me recebeu como seu orientado e contribuiu sobremaneira para minha formação no curso de mestrado, o meu respeito e a minha gratidão.

À **Profª. Drª. Aline Carvalho Batista** pela parceria, dedicação, paciência e ensinamentos no desenvolvimento desta pesquisa, o meu reconhecimento.

Ao **Prof. Dr. Aparecido Divino Cruz**, carinhosamente chamado de **Peixoto**, por ter me aceito como orientando e acreditado no meu potencial, o meu respeito e a minha gratidão.

À **Profª. Drª. Vera Aparecida Saddi** pela orientação, pelos ensinamentos e disponibilidade em ensinar a quem procura conhecimento, o meu apreço e a minha admiração.

À **Profª. Drª. Rejane Faria Ribeiro-Rotta** e à **Profª. Drª Maria Alves Garcia S. Silva** pelos seus ensinamentos.

À **Drª. Glória Jabor Bittar Oton** pelo apoio e permissão do estudo das amostras do Serviço de Patologia do Hospital Araújo Jorge da Associação de Combate ao Câncer de Goiás.

Ao **Prof. Dr. Paulo Roberto Reis**, Departamento de Biomedicina da UCG, pelo apoio e respeito e aos colegas professores do Departamento de Biomedicina da UCG, em especial ao prof. **Bertin Zarete**.

Às secretárias do Departamento de Biomedicina, **Maria Rosa Pessoa, Hellen Pereira e Maria Sônia de Souza**, pelo apoio e respeito ao meu trabalho.

Aos amigos **Prof. Satiro Watanabe** e **Prof. Geraldo José Oliveira**, o meu respeito e a minha admiração.

Aos funcionários do Setor de Arquivo Médico e do Laboratório de Patologia do Hospital Araújo Jorge, em especial à **Dinalva Ferreira do Nascimento** e **Marilene Alves Rocha**, pela busca dos prontuários e blocos de parafina, respectivamente.

Aos funcionários do Centro Goiano de Doenças da Boca (CGDB), **Claudia Duarte Silva** e **Fabiana Azevedo**, pela presteza, dedicação, cooperação e ajuda, o meu obrigado.

Aos funcionários e novos amigos do **Núcleo de Pesquisa Replicon**, que foram fundamentais para a construção e a produção deste trabalho, em especial, ao **Eduardo Rocha Pedrosa** (Dudu), **Raimundo da Silva Júnior** (Bocão), **Leonardo Barcelos**, Prof^{ra}. **Ângela Adamski da Silva Reis**, Prof. **Rafael Souto**, **Jalsi Arruda Tacon**, **Hellen da Silva Cintra**, **Alessandra Gonçalves de Oliveira** e **Raquel Loren** e a todos aqueles que, de alguma forma, contribuíram para este trabalho, o meu respeito e eterna gratidão.

Aos colegas da pós-graduação, **Luciano Alberto de Castro**, **Janaína Benfica e Silva**, **Ana Flávia Nomelini M. da S. Diniz**, **Geisa Badauy Lauria Silva**, **Paulene de Carvalho Cardoso**, **Anailde Alves de Costa Azevedo**, **Frederico Augusto M. de Araújo**, **Marcio Nunes Segurado**, **Sesostres Perecles de M. Melo**, **Tâmara Porto de Castro Arruda**, **Ézio Jaime Perillo**, **Regina Mota de Carvalho** e **Liliane Braga Monteiro dos Reis**.

Ao amigo, **Dr. Roberto Marinho Cirino** a minha gratidão pela força.

A todos àqueles que dedicaram horas da suas vidas à pesquisa para gerar melhor qualidade de vida para nós, o meu reconhecimento pela contribuição para com este trabalho e a minha admiração.

Aos pacientes, que por força do destino tornaram-se sujeitos deste estudo, o meu sincero respeito.

RESUMO

O carcinoma espinocelular (CEC) é a neoplasia maligna mais comum na cavidade bucal, e uma de suas variantes é o carcinoma verrucoso (CV), considerado de baixo grau de malignidade. O diagnóstico do CV é difícil, tanto do ponto de vista clínico quanto histopatológico e um efetivo diagnóstico é fundamental para estabelecer o tratamento e o prognóstico desse tumor. Neste estudo foi avaliada a proliferação celular e investigada a presença de HPV em carcinomas espinocelulares de boca com intuito de verificar possíveis diferenças na etiopatogênese e comportamento biológico destas lesões. Foram selecionadas 47 amostras de CEC assim distribuídas: 39 CECs, 8 CVs e 9 controles (CT). A proliferação celular foi avaliada qualitativamente de acordo com a localização da expressão do imunomarcador na célula e nas camadas do epitélio e quantitativamente considerando o percentual de células positivas expressas. A análise de carcinomas HPV⁺ foi realizada por meio da reação em cadeia da polimerase (PCR), tendo como *primers* GP5+/6+ na identificação do vírus. A análise qualitativa revelou que a imunomarcagem tanto no CV como no controle concentrava-se principalmente nas camadas basal e parabasal e a contagem das células positivas na base do epitélio mostraram diferença estatisticamente significativa na expressão dos três marcadores ($p < 0,05$). A análise quantitativa dos marcadores de proliferação celular foi calculada pelos testes estatísticos Mann-Whitney, Kruskal Wallis, correlação de Pearson e Spearman, que revelaram diferenças entre o grupo CEC e CV para os marcadores PCNA e ciclina B1 ($p < 0,05$). Considerando os três grupos, verificou-se correlação positiva entre Ki67 e a ciclina B1 ($r = 0,56$) e inexistência de correlação entre o PCNA e Ki67. A imunomarcagem do PCNA foi maior no grupo controle (média=100%), e o Ki67, mostrou-se efetivo como marcador de proliferação celular, entretanto, não mostrou diferença significativa entre as variantes de carcinomas. Já a ciclina B1 apresentou diferença significativa na comparação entre o grupo CEC e o grupo CV ($p < 0,05$) e correlação positiva na medida em que a gradação histológica de malignidade (padrão OMS) dos carcinomas aumentava ($r = 0,44$). Todas as amostras de tumores foram negativas para o HPV. Embora as lesões apresentem comportamento biológico diferente, o índice de proliferação celular nos dois tipos de carcinomas de boca mostrou ser superior ao do grupo controle, por meio da análise dos marcadores Ki67 e ciclina B1. Quando considerada a amostra total de carcinomas, independente da variante tumoral, a ciclina B1 mostrou correlação positiva com o grau histológico de malignidade segundo a OMS. Há necessidade que mais estudos possam ser empreendidos na área de proliferação celular e detecção de HPV em especial com relação ao CV, por se tratar de uma variante rara do CEC.

Palavras-chave: PCNA. Ki67. Ciclina B1. Carcinoma espinocelular de boca. Carcinoma verrucoso de boca. HPV. PCR e Imunoistoquímica.

ABSTRACT

Squamous cell carcinoma (SCC) is the most common malignant neoplasm of the buccal cavity, and one of its variants is verrucous carcinoma (VC), of low degree malignancy. The diagnosis of VC is difficult from the clinical as well as from the histopathological point of view, and an effective diagnosis is vital when deciding on the treatment and prognosis of this tumor. The aim of this research was to evaluate cell proliferation and investigate the presence of HPV in spindle cell carcinoma of the mouth so as to check for possible differences in the aetiopathogenesis and biological behavior of these lesions. Forty-seven samples were selected and divided as follows: 39 SCCs, 8 VCs and 9 control (CT). Cell proliferation was qualitatively evaluated according to the location of the expression of the immunomarker in the cell and epithelium layers and by quantitatively considering the percentage of positive cells expressed. The analysis of HPV⁺ carcinomas was undertaken by means of the polymerase chain reaction (PCR), having GP5+/6+ as primers for identification of the virus. The qualitative analysis showed that the immunomarking in the VC as well as in the control group was concentrated mainly in the basal and parabasal layers and the counting of the positive cells at the base of the epithelium showed a significant statistical difference in the expressions of all three markers ($p < 0,05$). The quantitative analysis of the cell proliferation markers was calculated by means of the Mann-Whitney and Kruskal Wallis tests and through the Pearson and Sperman correlation. They pointed to differences between the SCC and VC groups for the PCNA and cyclin B1 markers ($p < 0,05$). On considering the three groups, it was proved that there was a positive correlation between Ki67 and the cyclin B1 ($r = 0,56$) but not between the PCNA and the Ki67. The PCNA immunomarking was greater in the control group (average=100%), and the Ki67 showed itself to be effective as a proliferation cell marker although it showed no significant difference between the carcinoma variants. Whereas the cyclin B1 showed a significant difference in the comparison between the SCC and the VC groups ($p < 0,05$), and a positive correlation to the extent that the histological grading of the malignancy (WHO model) of the carcinomas increased ($r = 0,44$). All tumor samples were negative for HPV. Although the lesions showed different biological behaviors, the cell proliferation index in both types of mouth carcinoma was higher than in the control group, as shown by the analysis of the Ki67 and cyclin B1 markers. On considering the total sample of carcinomas, independently of the tumor variety, cyclin B1 showed a positive correlation with the histological degree of malignancy according to WHO. There is a need for further study to be carried out in the field of cell proliferation and detection of HPV especially with regard to VC, because it is a rare variant of SCC.

Key words: PCNA, Ki67, Cyclin B1, Oral squamous cell carcinoma, Oral verrucous carcinoma, HPV, PCR and immunohistochemistry

LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS

Figura 1	Aspecto clínico do CEC — lesão úlcero-infiltrativa em borda lateral de língua e soalho de boca	24
Figura 2	Aspecto clínico do CV — lesão úlcero-vegetante em mucosa jugal e rebordo alveolar	26
Figura 3	Aspecto microscópico do CEC, mostrando frente de invasão tumoral, demonstrando-se que esta lesão possui um padrão invasivo em direção ao estroma conjuntivo (Hematoxilina e eosina, aumento original de 12,5 vezes em A e 100 vezes B em respectivamente)	27
Figura 4	Aspecto microscópico do CV, demonstrando a topografia expansiva dessa lesão com a compressão do estroma conjuntivo (Hematoxilina e eosina, aumento original de 12,5 vezes (A) e 25 vezes (B) respectivamente)	28
Figura 5	Esquema mostrando regiões flanqueadas pelos <i>primers</i> MY09 e MY11, no interior do gene L1, no genoma do HPV16	31
Figura 6	As fases do ciclo celular. As células crescem continuamente na interfase, a qual consiste de três fases: a replicação do DNA está confinada à fase S; a G1 é o intervalo entre a fase M e a fase S, enquanto a G2 é o intervalo entre a fase S e a fase M. Na fase M, o núcleo e depois o citoplasma dividem-se. As ciclinas são proteínas que regulam a transição de uma fase para outra, a ciclina B1 regula a transição G2/M pela formação do complexo ciclina B1/cdc2	45
Figura 7	Células PCNA ⁺ presentes no carcinoma espinocelular (A), no carcinoma verrucoso (B) e no tecido bucal clinicamente saudável (C). As fotomicroscopias A, B e C demonstram a intensa marcação nuclear da proteína PCNA em todas as camadas epiteliais (A, B e C – Imunoistoquímica, aumento original de 100x, respectivamente)	77 78
Figura 8	Células Ki67 ⁺ presentes no carcinoma espinocelular (A), no carcinoma verrucoso (B) e no tecido bucal clinicamente saudável (C). Na fotomicroscopia A observa-se uma intensa marcação nuclear distribuída em todas camadas epiteliais. As	

fotomicroscopias B e C ilustram uma intensa marcação nuclear da proteína Ki67 nas camadas basal e parabasal do epitélio (A, B e C – Imunoistoquímica, aumento original de 100x, respectivamente)

Figura 9	Células ciclina B1 ⁺ presentes no carcinoma espinocelular (A), no carcinoma verrucoso (B) e no tecido bucal clinicamente saudável (C). Na fotomicroscopia A verifica-se forte marcação citoplasmática com distribuição em todas as camadas epiteliais. As fotomicroscopias B e C ilustram a intensa marcação citoplasmática da proteína ciclina B1 nas camadas basal e parabasal epiteliais (A, B e C – Imunoistoquímica, aumento original de 100x, respectivamente)	79
Figura 10	Porcentagens (média ± d.p.) de células PCNA ⁺ , Ki67 ⁺ e ciclina B1 ⁺ nos três grupos avaliados: carcinoma espinocelular (CEC), carcinoma verrucoso (CV) e controle (CT). Não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos CEC e CV para células Ki67 ⁺ , entretanto para as células PCNA ⁺ e ciclina B1 ⁺ ocorreu diferença estatisticamente significativa (Mann-Whitney com p<0,05). Com relação aos grupos CEC e CV, considerando a porcentagem de células PCNA ⁺ , Ki67 ⁺ e ciclina B1 ⁺ , houve diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo CT (Mann-Whitney com p<0,05)	82
Figura 11	Correlação entre as células PCNA ⁺ e ciclina B1 ⁺ nas amostras de carcinoma espinocelular (CEC), carcinoma verrucoso e controle (CT)	85
Figura 12	Correlação entre as células Ki67 ⁺ e ciclina B1 ⁺ nas amostras de carcinoma espinocelular (CEC), carcinoma verrucoso e controle (CT)	86
Figura 13	Correlação entre células ciclina B1 ⁺ e a gradação histológica nas amostras de carcinoma espinocelular (CEC), carcinoma verrucoso e controle (CT)	89
Figura 14	Gel de poliacrilamida a 8% contendo produtos de amplificação corados por nitrato de prata (1,5%), utilizando o <i>primer</i> D8S135 para confirmação da presença de DNA humano na amostra	91
Figura 15	Gel de poliacrilamida a 8% contendo produtos de amplificação corados por nitrato de prata (1,5%), utilizando o <i>primer</i> GP5+/6+ para a detecção do genoma viral de HPV nas amostras de carcinomas de cavidade bucal	91
Quadro 1	Características dos anticorpos usados na detecção das proteínas PCNA, Ki67 e ciclina B1	66 69

Quadro 2	Seqüências dos primers utilizados, mostrando o tamanho do fragmento amplificado	
Tabela 5.1	Distribuição dos carcinomas espinocelulares e carcinomas verrucosos quanto aos critérios de inclusão estabelecidos	71
Tabela 5.2	Descrição das características demográficas dos pacientes acometidos por carcinomas espinocelulares (CEC) e verrucoso (CV) segundo as características demográficas e localização da lesão	72
Tabela 5.3	Distribuição de freqüência dos pacientes acometidos por carcinomas espinocelulares (CEC) e verrucoso (CV) segundo os fatores de risco.	73
Tabela 5.4	Distribuição de freqüência dos pacientes acometidos por carcinomas espinocelulares e verrucosos segundo as características clínicas da lesão, estadiamento e grau de malignidade de acordo com a OMS	74
Tabela 5.5	Distribuição de freqüência dos pacientes acometidos por carcinomas espinocelulares e verrucosos segundo os tratamentos utilizados	75
Tabela 5.6	Distribuição de freqüência dos pacientes acometidos por carcinomas espinocelulares e verrucosos segundo a sobrevida	76
Tabela 5.7	Análise quantitativa dos resultados da imunoexpressão de PCNA, Ki67, ciclina B1 nos grupos CEC, CV e controle	80
Tabela 5.8	Teste Mann-Whitney para comparações entre imunoexpressões de PCNA, Ki67, ciclina B1 nos grupos CEC, CV e CT	81
Tabela 5.9	Teste Mann-Whitney para comparações entre a imunoexpressão de PCNA, Ki67, ciclina B1 no grupo CV e no grupo controle (camadas basal e suprabasal)	82
Tabela 5.10	Média, mediana e desvio-padrão para imunoexpressão de PCNA, Ki67, ciclina B1 em carcinomas verrucosos de boca (camadas basal e parabasal)	83
Tabela 5.11	Média, mediana e desvio padrão para imunoexpressão de PCNA, Ki67, ciclina B1 no grupo CV (camada basal e parabasal)	83
Tabela 5.12	Teste Mann-Whitney para comparações entre imunoexpressões de PCNA, Ki67, ciclina B1 no grupo CV e no grupo controle (camada basal e parabasal)	84
Tabela 5.13	Teste de correlação de Pearson para associação entre a imunoexpressão de PCNA, Ki67, ciclina B1 considerando todos os grupos	84
Tabela 5.14	Distribuição da gradação histológica nos grupos CEC e CV	87

Tabela 5.15	Teste de Kruskal Wallis para comparações das imunorexpressões de PCNA, Ki67 e ciclina B1 com a gradação histológica	87
Tabela 5.16	Teste de correlação de Spearmans para associação entre imunorexpressões de PCNA, Ki67, ciclina B1 dos carcinomas com a gradação histológica	88

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ACCG	Associação de Combate ao Câncer em Goiás
AgNORS	Argyrophilic nuclear organizer regions/Regiões organizadoras nucleares argirofílicas
APS	Persulfato de amônia
Bax	BCL2-associated X protein/proteína X BCL-2-associada
Bcl-2	B cell lymphoma. Refere-se à proteína bcl-2
BrdU	Bromodeoxiuridina
BSA	Bovine serum albumine/albumina sérica bovina
β -Catenin,	Molécula de adesão tecidual
CEC	Carcinoma espinocelular
Cdc2	Cell division cycle protein 2/proteína de divisão do ciclo celular 2
CCND1	Cyclin D1 gene / gene da ciclina D 1
CDK	Cyclin dependent Kinase/Proteína quinase dependente de ciclina
CD44v9	Molécula de adesão entre células
C	Citosina, base nitrogenada
C ⁺	Controle positivo na PCR
C ⁻	Controle negativo na PCR
CKI	Cyclin dependent Kinase inhibitor/Inibidor da quinase dependente de ciclina
CEC	Carcinoma espinocelular
CT	Grupo controle
CV	Carcinoma verrucoso
Cy	Ciclina/Cyclin
DAB	Diaminobenzindina
DNA	Ácido desoxiribonucleico/Desoxyribonuclei acid
D8S135	Primer utilizado como controle interno da reação
E2F	Um tipo de fator de transcrição responsável pela transcrição de genes importantes para a replicação do DNA celular
EDTA	Etileno-diaminotetracético
ErbB-1	RNAs codificados pelo EBV (EBV-encoded RNAs)
Et al	do latim et alli e outros
F	<i>Primer</i> de amplificação direta
Fase M	Fase do ciclo celular em que ocorre a mitose
Fase S	Fase do ciclo celular em que corre a síntese de DNA
FO/UFGO	Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás
G	Guanina, base nitrogenada
GP5+/6	Primers genéricos para amplificação de HPV
G0	G-Gap 0/Intervalo de latência celular
G1	G-Gap 1/Intervalo após a mitose e antes da síntese de DNA
G2	G-Gap 2/Intervalo após a síntese de DNA e antes da mitose
Gray	Unidade de radiação
HAJ	Hospital Araújo Jorge

HE	Hemotoxilina e Eosina
Her-2/neu	Oncogene Her-2/neu
HPV	Papiloma vírus humano, do inglês <i>Human Papillomavirus</i>
H ₂ O _{dd}	Água bidestilada
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IHQ	Imunoistoquímica
Kd	Kilo base (1kb = 1000 pb)
Kd	Kilodalton
Ki67	Antígeno identificado pelo anticorpo monoclonal Ki67
L	Litro
LCR	Longa Região de Controle, do inglês (<i>Long Control Region</i>)
Ld	Marcador de tamanho ou escala alelica (<i>Ladder</i>)
M	Molar
Mg	Miligramas
Mg ⁺²	Íon Magnésio
MM	Milimolar
LSAB	Complexo de estreptavidina-biotina/Link streptavidin biotin complex
MO	Ausência de metástase à distância
M50	Marcador de peso molecular 50bp
NaOH	Hidróxido de Sódio
nmol	Nanomol
Pb	Pares de base
NO	Ausência de metástase em nódulo linfáticos regionais
N1	Metástase em linfonodo ipsilateral único, menor ou igual a 3cm em seu maior diâmetro
N2	Metástase em linfonodo ipsilateral ou contralateral, nenhum maior que 6cm em seu maior diâmetro
N3	Metástase em linfonodo maior que 6cm em seu maior diâmetro
OMS	Organização Mundial de Saúde
p	Probabilidade de significância
p15	Proteína de 15Kd
p16	Proteína de 16Kd
p18	Proteína de 18Kd
p19	Proteína de 19Kd
p21	Proteína de 21Kd
p27	Proteína de 27Kd
p53	Proteína de 53Kd – Proteína supressora de tumor expressa pelo gene p53
PCNA	da proliferação celular nuclear/ <i>Proliferating cell nuclear antigen</i> Antígeno
PCR	Reação em cadeia da Polimerase/ <i>Polymerase chain reactino</i>
pH	Potencial hidrogênio
pRb	Proteína supressora de tumor expressa pelo gene Rb (Retinoblastoma)
P450	Citocromo P450 – família de enzimas de hidroxilação envolvidas no metabolismo de xenobióticos, drogas, hormônios esteróides e está envolvida na carcinogênese do tabaco
RAS	O RAS desempenha papel importante na mitogênese induzida pelos fatores de crescimento.
RCBPG	Registro de câncer de base populacional de Goiânia
rpm	Rotação por minuto
T	Timina, base nitrogenada
TA	Temperatura ambiente

TBE	Tampão de Borato e EDTA
TF	Transcription Factor/ Fator de transcrição
TNM	Refere-se à classificação clínica, sendo: T= tumor primário, N= linfonodo regional e M= metástase à distância (<i>Tumor Node Metastasis</i>)
TP53	Gene da proteína TP53
T1	Tumor de até 2 cm em seu maior diâmetro
T2	Tumor maior que 2cm, mas menor que 4cm em seu maior diâmetro
T3	Tumor maior 4cm em seu maior diâmetro
T4	Tumor maior que 4cm com invasão de estruturas adjacentes
UCG	Universidade Católica de Goiás
UFG	Universidade Federal de Goiás
UICC	União Internacional Contra o Câncer
VDS	Sistema de Vídeo Documentação
WHO	World Health Organization
µg	Micrograma
µL	Microlitro
µM	Micrometro
%CG	Porcentagem de bases citosina e guanina

SUMÁRIO

	RESUMO	
	ABSTRACT	
	LISTA DE ILUSTRAÇÕES E TABELAS	
	LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	
1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA	22
2.1	ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS.....	22
2.2	CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS CARCINOMAS	
	ESPINOCELULAR E VERRUCOSO.....	23
2.2.1	Carcinoma espinocelular	23
2.2.2	Carcinoma verrucoso	25
2.3	ASPECTOS MICROSCÓPICOS E COMPORTAMENTO BIOLÓGICO	
	DOS CARCINOMAS ESPINOCELULAR E VERRUCOSO.....	26
2.4	ETIOLOGIA E FATORES DE RISCOS DOS CARCINOMAS	
	ESPINOCELULAR E VERRUCOSO.....	29
2.4.1	Carcinoma espinocelular	29
2.4.1.1	Agentes biológicos – papilomavírus humano.....	30
2.4.1.2	Agentes químicos	35
2.4.1.2.1	<i>Tabaco</i>	36
a)	Carcinogênese do tabaco nos tecidos bucais.....	37
b)	Dependência do tabaco.....	38
2.4.1.2.2	<i>Alcoolismo</i>	38
2.4.2	Carcinoma verrucoso	40
2.5	TRATAMENTO DOS CARCINOMAS ESPINOCELULARES E VERRUCOSO.....	41
2.6	CICLO CELULAR.....	43
2.7	MARCADORES DE PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	47
2.8	EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DO PCNA, KI67 E CICLINA B1 EM CECS E CVS DE CABEÇA E PESCOÇO.....	50
3	OBJETIVOS	60
3.1	OBJETIVO GERAL.....	60
3.2	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	60
4	MATERIAL E MÉTODOS	61
4.1	TIPO DE ESTUDO.....	61
4.2	OBTENÇÃO, SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRAGEM	61

4.3	CRITÉRIOS DE INCLUSÃO DA AMOSTRAGEM.....	62
4.4	CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO DA AMOSTRAGEM.....	62
4.5	REGISTROS DOS DADOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS.....	63
4.6	GRUPO CONTROLE – MUCOSA NORMAL.....	63
4.7	MÉTODOS EMPREGADOS PARA CARACTERIZAÇÃO MICROSCÓPICA DOS ESPÉCIMES.....	64
4.7.1	Técnica de coloração de rotina com hematoxilina e eosina (HE).....	64
4.7.2	Identificação e análise dos seguintes marcadores de proliferação celular : PCNA, Ki67 e ciclina B1.....	64
4.7.2.1	Técnica de imunistoquímica (IHQ).....	64
4.7.2.1.1	<i>Identificação e quantificação de células positivas.....</i>	66
4.7.2.1.2	<i>Identificação qualitativa de células positivas.....</i>	67
4.7.3	Reação em cadeia da polimerase (PCR).....	67
4.7.3.1	Obtenção das amostras.....	67
4.7.3.2	Desparafinização dos blocos.....	67
4.7.3.3	Extração de DNA.....	68
4.7.3.4	Reação em cadeia da polimerase.....	68
4.7.3.5	Análise dos amplicons.....	69
4.8	ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	69
5	RESULTADOS	71
5.1	CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DO GRUPO AMOSTRAL	71
5.2	CARACTERIZAÇÃO DEMOGRÁFICA	71
5.3	ANÁLISE QUALITATIVA DAS IMUNOMARCAÇÕES NAS AMOSTRAS DE CARCINOMAS ESPINOCELULAR, VERRUCOSO E GRUPO CONTROLE.....	76
5.4	QUANTIFICAÇÃO DA IMUNOEXPRESSÃO DOS MARCADORES DE PROLIFERAÇÃO CELULAR PCNA, KI67, CICLINA B1 NOS GRUPOS DE CARCINOMAS ESPINOCELULARES, VERRUCOSOS E CONTROLE – MUCOSA NORMAL	80
5.5	COMPARAÇÃO ENTRE AS IMUNOEXPRESSÃO DE PCNA, KI67 E CICLINA B1 ENTRE OS GRUPOS DE CARCINOMAS ESPINOCELULARES, VERRUCOSOS E GRUPO CONTROLE (CAMADAS BASAL, PARABASAL E ESPINHOSA)	81
5.6	COMPARAÇÃO ENTRE AS IMUNOEXPRESSÕES DE PCNA, KI67 E CICLINA B1 ENTRE OS GRUPOS CARCINOMA VERRUCOSO E CONTROLE. (CAMADAS BASAL, PARABASAL E ESPINHOSA).....	82
5.7	COMPARAÇÃO ENTRE A IMUNOEXPRESSÃO DE PCNA, KI67 E CICLINA B1 ENTRE OS GRUPOS DE CARCINOMAS VERRUCOSOS E GRUPO CONTROLE (CONSIDERANDO APENAS AS CAMADAS BASAL E PARABASAL).....	83
5.8	CORRELAÇÃO DAS IMUNOEXPRESSÕES DE PCNA, KI67 E CICLINA B1 NOS TRÊS GRUPOS, CARCINOMAS ESPINOCELULARES, CARCINOMA VERRUCOSO E CONTROLE.....	84

5.9	CORRELAÇÃO DAS IMUNOEXPRESSÕES DE PCNA, KI67 E CICLINA B1 COM A GRADAÇÃO HISTOLÓGICA DO TUMOR	87
5.10	IDENTIFICAÇÃO DE HPV NAS AMOSTRAS PESQUISADAS DOS GRUPOS DE CEC E CV	90
6	DISCUSSÃO	92
7	CONCLUSÕES	100
	REFERÊNCIAS	102
	ANEXOS	111

1 INTRODUÇÃO

O câncer de boca representa cerca de 5% do total das neoplasias malignas que afetam os seres humanos, dos quais 90% são carcinomas espinocelulares (CEC). O carcinoma verrucoso (CV) é uma variante de baixo grau do CEC. Os casos de CV representam de 0,3% a 10% de todos os CECs da cavidade bucal (INCA, 2006; OLIVEIRA *et al.*, 2006; CHAGÍN, 2000). A estimativa de câncer de boca em Goiás para 2006 é de 7,24 casos para cada 100 mil homens e 2,86 casos para 100 mil mulheres, demonstrando uma incidência maior no sexo masculino (INCA, 2006).

O CEC de boca é uma doença que acomete indivíduos a partir da quarta década de vida e está intimamente ligado ao consumo de tabaco e etanol (GIROD *et al.*, 1998). Entretanto, nos últimos anos tem sido sugerida a transmissibilidade do papilomavírus humano (HPV) para cavidade bucal pela prática do sexo oral. Desta forma, este vírus poderia atuar como agente associado ao desenvolvimento do câncer de boca (SCULLY, 2001, HERRERO *et al.*, 2004; SCULLY, 2006).

Clinicamente, o CEC pode aparecer com aspecto de uma massa exofítica, às vezes vegetante, ou endofítica, de característica invasiva, ulcerada, crateriforme e com bordas elevadas e endurecidas (NEVILLE; DAY, 2002). Por outro lado, o CV, quando diagnosticado, apresenta-se como uma massa exofítica, grande, de limites imprecisos.

Podendo assumir aspecto papilar, em forma de couve-flor, com superfície rugosa, sulcada e de coloração branco-acinzentada (SPIRO, 1998; CHAGÍN, 2000; NEVILLE; DAY, 2002).

O CV difere do CEC por ser uma lesão menos agressiva, com bom prognóstico, pois raramente evolui para metástase regionais, e não há relatos de disseminação tumoral a distância.

O diagnóstico microscópico do CV é difícil e, muitas vezes, gera dúvidas, levando a laudos equivocados de lesões mais agressivas, portanto, o diagnóstico adequado de CV requer algumas considerações como por exemplo, uma biópsia com qualidade suficiente e quantidade adequada de tecido para uma avaliação precisa do patologista. Há controvérsias em relação ao tratamento de escolha para o CV. Geralmente, os pacientes são tratados cirurgicamente e com radioterapia coadjuvante, mas existem alguns autores que preconizam o uso de quimioterapia.

Apesar dos avanços no diagnóstico na área de oncologia, o prognóstico do CEC permanece desfavorável e o CV pode tornar-se mais agressivo em casos de longa evolução. Desta forma, a identificação precoce dos grupos de baixo e alto risco é extremamente importante no tratamento dos pacientes com lesões iniciais tendo em vista o comportamento biológico diferente destas lesões (TRALANGO *et al.*, 1999, OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Alguns estudos têm mostrado a grande contribuição dos marcadores de proliferação celular para o diagnóstico, tratamento e prognóstico tanto de CEC, quanto de CV. A partir desta premissa, o presente estudo teve por objetivo geral a avaliação da proliferação celular em carcinomas de cavidade bucal, utilizando o PCNA, Ki67 e ciclina B1 como imunomarcadores. A expressão dos imunomarcadores foi analisada por meio da imunohistoquímica com o intuito de se estabelecer diferenças em potencial entre o CEC e o CV com relação ao índice de proliferação celular. Simultaneamente, os resultados obtidos foram usados para se inferir sobre a relação entre índice de proliferação celular e comportamento

biológico dos tumores. Os resultados da imunexpressão desses marcadores foram comparados entre os dois grupos de carcinomas e com a mucosa bucal normal. Outro tópico investigado foi a possível presença de HPV nas amostras de carcinomas e sua relação com a proliferação celular. Além disso, dados clínicos e histológicos pertinentes à amostra desses pacientes foram considerados, incluindo fatores de riscos como o uso crônico de tabaco e álcool, e quando possível, comparados entre os grupos de CEC e CV.

2 REVISÃO DA LITERATURA

O câncer de boca representa cerca de 5% do total das neoplasias malignas que acometem os seres humanos e, desses, 90% são carcinomas espinocelulares (CEC). O carcinoma verrucoso (CV), considerado uma variante de baixo grau do CEC, figura entre 0,3 a 10% de todos CECs da cavidade bucal (INCA-2006; OLIVEIRA *et al.*, 2006; CHAGÍN, 2000).

Os fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de boca distribuem-se em três categorias: biológicos, físicos e químicos. Os fatores biológicos contemplam as infecções virais, com destaque para o papilomavírus humano (HPV), que já teve sua transmissibilidade sugerida pela prática do sexo oral (SCULLY, 2001, HERRERO, *et al.*, 2004; SCULLY, 2006). Quanto aos fatores físicos, destacam-se a exposição à radiação solar, que estão relacionados aos CECs de lábio inferior. Finalmente, os fatores químicos incluem agentes iniciadores e promotores do câncer de boca, incluindo frequentemente o tabaco e o álcool, respectivamente, que são considerados os carcinógenos mais importantes na etiopatogênese do câncer de boca (INCA, 1996; NEVILLE; DAY, 2002; SCULLY; FELIX, 2006).

2.1 ASPECTOS EPIDEMIOLÓGICOS

Segundo a estimativa de incidência de câncer para o Brasil em 2006 (INCA, 2006), o câncer de boca pode representar 13.470 novos casos no país, distribuídos na seguinte proporção: 10.060 casos em homens e 3.410 em mulheres. Já a estimativa de câncer de boca em Goiás para 2006 é de 7,24 novos casos para 100 mil homens e 2,86 casos para 100 mil mulheres, com uma incidência significativamente maior no sexo masculino (INCA, 2006).

Do ponto de vista epidemiológico, a frequência do CV, quando comparado com as outras formas de câncer bucal, é imprecisa, em virtude da não-descrição clara dessa lesão, por alguns patologistas, como enfermidade específica. Entretanto, diferentes estudos indicam que o CV representa até 10% de todos os CECs da cavidade bucal (BOUQUOT, MORGANTOOWN, 1998; CHAGÍN, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2006).

Dentre as regiões brasileiras, a de maior incidência de câncer de boca e faringe é o Sudeste, com maior predominância na cidade de São Paulo-SP, com 25,3 novos casos por 100 mil habitantes, seguida pela cidade de Porto Alegre-RS na Região Sul. A menor fração localiza-se na cidade Goiânia-GO, na Região Centro-Oeste. Esta pesquisa aponta ainda, que, no tocante aos sexos, o masculino possui uma incidência bem maior que o feminino (WÜNSCH-FILHO, 2002).

2.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DOS CARCINOMAS ESPINOCELULAR E VERRUCOSO

2.2.1 Carcinoma espinocelular

O carcinoma espinocelular (CEC) apresenta-se como a neoplasia maligna mais comum na cavidade bucal (CHEN, 1991; CAMARINI, 1999; DEDIVITIS *et al.*, 2004). Clinicamente, o CEC, em seu estágio inicial, surge como uma mancha branca (leucoplasia) ou vermelha

(eritroplasia) ou como a associação entre essas duas características, constituindo-se de um misto de eritroplasia com leucoplasia. Já as lesões maiores podem aparecer com aspecto de uma massa exofítica, às vezes vegetante, fungiforme, papilar ou verrucosa. Outros tumores assumem um crescimento endofítico de característica invasiva, ulcerada, crateriforme e com bordas elevadas e endurecidas (Figura 1).



Figura 1 — Aspecto clínico do CEC — lesão úlcero-infiltrativa em borda lateral de língua e soalho de boca

Fonte : Dr. Satiro Watanabe, 2005.

A dor não é um sintoma freqüente para as lesões malignas, e, no CEC, ela pode aparecer nos estágios mais avançados, mas também pode ser totalmente assintomática para as lesões iniciais ou, simplesmente, ser relatada como um discreto desconforto (NEVILLE e DAY, 2002).

A língua é o sítio, na cavidade bucal, mais freqüentemente acometido pelo CEC, representando 40% de todos os casos, seguidos pelo soalho de boca. Os locais de menor freqüência são: gengivas, mucosas jugais, mucosas labiais e palato duro (NEVILLE e DAY, 2002; SCULLY, 2006).

Embora qualquer região da boca possa ser acometida pela lesão, uma pesquisa nos Estados Unidos da América (EUA), realizada por Moore e Catlin (1967), mostrou que cerca de 70% dos tumores da cavidade bucal se desenvolve em uma área com formato de ferradura, localizada no soalho da boca e mucosa lingual adjacente ao sulco lingual e região retromolar.

Apenas 20% dos tumores bucais distribuem-se pelo restante da área total da cavidade bucal. Há duas explicações possíveis para a maior incidência nessas áreas. A primeira é que alguns carcinógenos se misturam à saliva, formando uma solução que preenche o soalho da boca, banhando constantemente as mucosas adjacentes do ventre da língua e soalho bucal. A segunda hipótese é que essas regiões da cavidade bucal são recobertas por uma fina camada de mucosa não-queratinizada, que não oferece resistência quando exposta aos carcinógenos (JOVANOVIC *et al.*, 1993).

2.2.2 Carcinoma verrucoso

O carcinoma verrucoso (CV) é considerado como uma variante de baixo grau do CEC e representa de 0,3% a 10% de todos CECs que acometem a cavidade bucal (NEVILLE *et al.*, 2004; OLIVEIRA *et al.*, 2006). Caracteriza-se pela baixa agressividade e bom prognóstico. O CV foi descrito pela primeira vez por Ackerman em 1948.

O CV ocorre essencialmente nas membranas mucosas da cabeça e pescoço, destacando-se as de cavidade bucal e laringe. Entretanto, existem outras mucosas onde a lesão pode ocorrer, como as da região anorretal e a da genitália. O CV também pode acometer a extremidade plantar (CHAGÍN, 2000; ZANINI *et al.*, 2004). Dependendo do local em que ocorre essa lesão, ela recebe designações distintas, na área genital, é dita tumor de Bushke-Loewentein; na região plantar, epitelioma *cuniculatum*; e, na boca, papilomatose oral florida, tumor de Ackerman ou carcinoma verrucoso de boca (ZANINI *et al.*, 2004).

Na cavidade bucal, os sítios de eleição para o seu desenvolvimento são a mucosa jugal, os rebordos alveolares, as gengivas, o soalho da boca e a língua. Em geral, o CV surge como uma massa exofítica, de limites imprecisos, que ocupa, às vezes, uma área extensa e unilateral, como a mucosa jugal. O CV pode assumir aspecto papilar, em formato de couve-

flor, com a presença ou não de uma placa leucoplásica que, em geral, recobre determinadas áreas da lesão. Na superfície rugosa do CV pode ser observada a presença de vários sulcos que dividem a massa tumoral em retalhos. A coloração da lesão varia de branco a branco-acinzentada, dependendo do grau de queratinização da superfície tumoral. O CV apresenta crescimento lento, podendo ocupar uma área extensa, e se caracteriza, nos casos com evolução longa, por ser superficialmente invasivo, em vez de infiltrativo (SPIRO, 1998; CHAGÍN, 2000; NEVILLE e DAY, 2002; ZANINI *et al.*, 2004). (Figura 2). Apesar de ser, na maioria das vezes, uma lesão curável nos estágios precoces, ela pode tornar-se localmente agressiva quando não recebe tratamento adequado (ACKERMAN, 1948; DEMIAN; BUSHKIN; ECHEVARRIA, 1973; MCCOY; WALDRON, 1981, KOCH *et al.*, 2001). Em decorrência da presença de infecções associadas ao tumor, pode ocorrer o enfartamento dos linfonodos, sobretudo submentonianos e submandibulares, o que pode induzir um diagnóstico falso positivo de metástase locorregional (ACKERMAN, 1948).



Figura 2 — Aspecto clínico do CV — lesão ulcero-vegetante em mucosa jugal e rebordo alveolar

Fonte : CGDB, 2006

2.3 ASPECTOS MICROSCÓPICOS E COMPORTAMENTO BIOLÓGICO DOS CARCINOMAS ESPINOCELULAR E VERRUCOSO

O carcinoma espinocelular (CEC) origina-se no epitélio displásico e se caracteriza histopatologicamente por ilhas e cordões invasivos de células epiteliais malignas. A invasão é caracterizada pela extensão irregular do epitélio através da membrana basal, em direção ao interior do tecido conjuntivo subepitelial. Células escamosas epiteliais e ninhos ou ilhas de células podem ser observados proliferando-se independentemente no interior do tecido conjuntivo, sem contato algum com o epitélio de superfície. Células invasoras e massas de células podem estender-se profundamente para o tecido adiposo subjacente, para o músculo ou para o osso, invadindo o tecido original conforme o fronte da invasão. As células da lesão podem destruir vasos sanguíneos e invadir o lume de veias ou vasos linfáticos. Frequentemente, pode ser observada uma intensa resposta celular inflamatória diante do epitélio invasor e áreas focais de necrose podem estar presentes. O epitélio da lesão é capaz de induzir a formação de novos e pequenos vasos sanguíneos (angiogênese) e, ocasionalmente, fibrose. Percebe-se que tanto nos tumores superficiais quanto nos altamente invasivos, as células geralmente exibem citoplasma eosinofílico abundante com núcleos grandes, geralmente hiper cromáticos, além de uma alteração na relação núcleo-citoplasma. Graus variados de pleomorfismo celular e nuclear são também observados. É comum encontrar disqueratose fora da camada córnea do epitélio (NEVILLE *et al.*, 2004) (Figura 3).

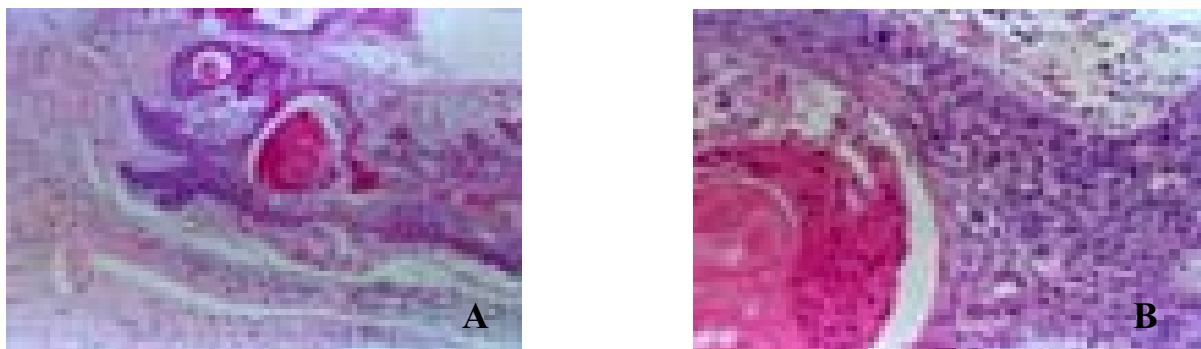


Figura 3 — Aspecto microscópico do CEC, mostrando frente de invasão tumoral, demonstrando-se que esta lesão possui um padrão invasivo em direção ao estroma conjuntivo (Hematoxilina e eosina, aumento original de 12,5 vezes em A e 100 vezes B em respectivamente)

Fonte: Dr. José Vieira de Spíndula Filho, 2006.

O CV apresenta características histológicas peculiares, tais como uma proliferação epitelial exofítica com acentuada queratinização, preenchendo as fendas ou criptas, e cristas epiteliais arredondadas. Tais projeções podem ser longas e pontiagudas ou curtas e rombudas. As células epiteliais tumorais exibem pouca atipia. As margens da lesão apresentam um padrão de invasão compressivo, causando o esmagamento do tecido conjuntivo subjacente, atingindo, em fases mais avançadas, os tecidos musculares, ósseos, glandulares e cartilagosos. As bordas epiteliais nas regiões profundas são amplas e a membrana basal permanece inalterada. Em geral, uma reação inflamatória mononuclear encontra-se presente no tecido conjuntivo adjacente à lesão neoplásica, conforme observado na Figura 4 (ACKERMAN, 1948; RAJENDRAN, 1989; SPIRO, 1998; CHAGÍN, 2000; OLIVEIRA 2006).

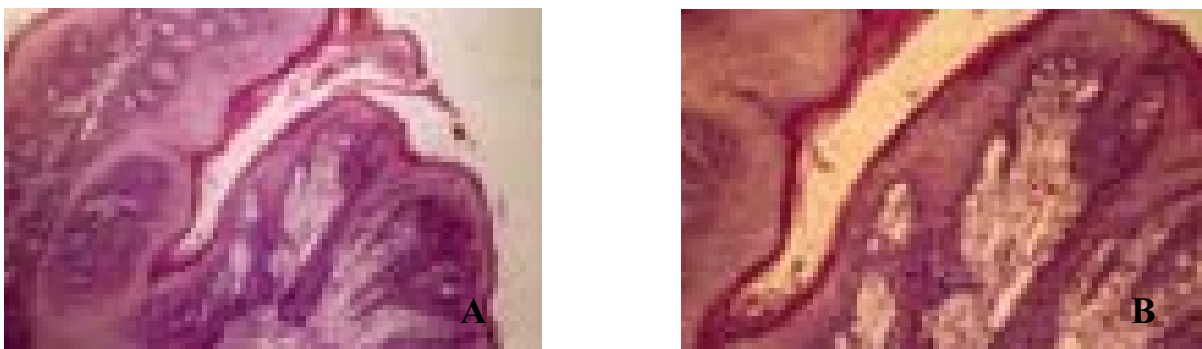


Figura 4 — Aspecto microscópico do CV, demonstrando a topografia expansiva dessa lesão com a compressão do estroma conjuntivo (hematoxilina e eosina, aumento original de 12,5 vezes em A e 25 vezes em B)

Fonte : Dr. José Vieira de Spíndula Filho, 2006.

Na análise das características microscópicas de 426 CVs de boca, realizada por Rajendran *et al.* (1989), verificou-se que 53% das amostras apresentam invasão local dos tecidos musculares, ósseos e glandulares. Entretanto, a disseminação tumoral a distância não foi detectada.

Mesmo com características microscópicas peculiares, deve-se incluir no diagnóstico diferencial do CV algumas lesões epiteliais hiperplásicas benignas, como a hiperplasia pseudoepiteliomatosa, hiperplasia verrucosa, leucoplasia verrucosa e do CEC (CHAGÍN, 2000; KOCH *et al.* 2001; OLIVEIRA, 2006).

Quanto às diferenças de comportamento biológico entre as duas lesões, percebe-se que a grande maioria dos CVs é clinicamente diferente dos CECs invasivos, em razão de seu crescimento lento, pouca atipia e ausência de metástase. Entretanto, focos de CEC podem ocorrer, simultaneamente, em CVs (FERLITO; RINALDO; MANNARÁ, 1998; FERLITO *et al.*, 1999; KOCH *et al.*, 2001). Portanto, o diagnóstico histopatológico do CV requer uma biópsia incisional adequada. Como as células individuais não são muito displásicas, o patologista deve avaliar a configuração histopatológica geral da lesão para chegar a um diagnóstico apropriado (FERLITO; RINALDO; MANNARÁ, 1998; BOUQUOT, 1998; SPIRO, 1998; FERLITO *et al.*, 1999).

2.4 ETIOLOGIA E FATORES DE RISCOS DOS CARCINOMAS ESPINOCELULAR E VERRUCOSO

2.4.1 Carcinoma espinocelular

A etiologia do CEC é composta por três categorias de agentes promotores — biológicos, químicos e físicos — que lesam o ácido desoxirribonucléico (DNA) nuclear, produzindo mutações, fraturas cromossômicas e diferentes alterações do material genético (INCA, 1996).

2.4.1.1 Agentes biológicos — papilomavírus humano

Os vírus são agentes carcinogênicos com potencial para lesar o DNA e promover mutações que resultam no câncer. O papilomavírus humano (HPV) tem sido citado por muitos autores, nos últimos anos, como um possível agente causador do câncer de boca (INCA, 2006).

Os papilomavírus são vírus que pertencem à família *Papovaviridae* e compreendem mais de 130 tipos de genótipos diferentes, classificados em dois grupos: cutâneo e mucoso. Os HPVs de mucosas são divididos em três grupos oncogênicos, de acordo com a agressividade e o tipo de lesão que produzem. Os HPVs são considerados de baixo risco, de risco intermediário e de alto risco oncogênico para o câncer de colo de útero

(SANCLEMENTE, 2002). Os HPV-16 e HPV-18 são considerados de alto risco e são relatados como agentes virais capazes de causar o câncer de boca, tanto no CEC quanto no CV (MILLER, JOHNSTONE, LEXINGTON, 2001; ZHANG *et al.*, 2004). Os papilomavírus são vírus ubíquos de DNA, epiteliotrópicos e infectam o epitélio cutâneo e mucoso, resultando em lesões benignas e malignas em animais e humanos (SCULLY *et al.*, 1985; ALANI, MUNGER, 1998). São vírus de 55-60 nm de diâmetro, não-envelopado, de simetria icosaédrica, com 72 capsômeros e um genoma de DNA de fita dupla circular, constituindo-se de aproximadamente 7.900 pares de bases (OLIVEIRA, 2003; SANCLEMENTE, 2002; SOUTO, 2005).

O genoma do papilomavírus pode ser dividido em três regiões: uma longa, de controle (LCR), que compreende cerca de 10% do genoma, e regiões precoce (E) e tardia (L) (Figura 5). A região E é formada pelos genes E1, E2, E4, E5, E6 e E7, e dentre eles, E1 está envolvido com a replicação viral, o E2, com a transcrição e replicação, E4, com a maturação viral e alteração da matriz intracelular. Já E5, E6 e E7 estão diretamente ligados à transformação celular (Figura 5). O HPV de alto risco é capaz de imortalizar células epiteliais de boca e cervicais *in vitro* (MORK, 2001; OLIVEIRA; SOARES; COSTA, 2002). As oncoproteínas E6 e E7 são os principais oncogenes virais expressos no tecido neoplásico, e ambos estimulam a proliferação celular, sendo capazes de ligar-se e tornar inativas proteínas supressoras tumorais do hospedeiro, como a proteína p53 e pRb, respectivamente (GASCO; GROOK, 2003).

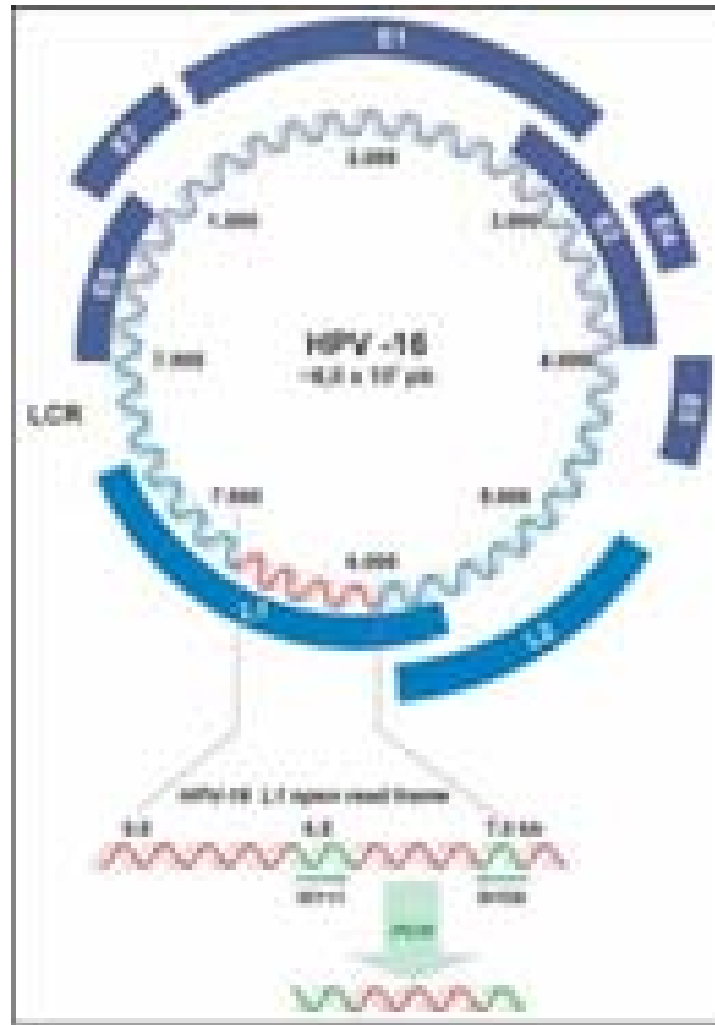


Figura 5 — Esquema mostrando regiões flanqueadas pelos *primers* MY09 e MY11, no interior do gene L1, no genoma do HPV16

Fonte: Silva *et al.*, 2003.

A infecção pelo HPV é iniciada quando uma partícula viral penetra nas células basais e células troncos, em divisão do epitélio. Para que isso ocorra, é necessário apenas um leve trauma, capaz de lesar o epitélio, o que não é difícil de ocorrer na cavidade bucal, uma vez que ela está sujeita a traumas e microtraumas variados. Estudos recentes têm apontado o sexo oral como o possível meio de transmissão do HPV para a cavidade bucal, uma vez que já é fato que o HPV é o principal agente causador do câncer de cérvix uterino (LIE *et al.*, 1998; SCULLY, 2002; FRACCHIOLI, 2003).

Atualmente, alguns autores defendem a hipótese de que o HPV presente na cavidade bucal e associado ao câncer de boca tem sua origem na genitália feminina ou masculina e é transmitido pelo sexo oral (SCULLY, 2001; KREIMER *et al.*, 2004; HERRERO *et al.*, 2004). Entretanto, há relatos de paciente com CEC de boca e câncer de cérvix de útero em que não houve correlação entre o HPV da lesão bucal e o da lesão uterina (FRACCHIOLI, 2002).

De acordo com Sugerman e Shillitoe (1997), a importância da infecção pelo HPV na carcinogênese bucal é explicada pela capacidade de os HPVs de alto risco imortalizarem queratinócitos orais *in vitro*. A imortalização pode envolver a inativação de proteínas supressoras de tumores pré-formados pelas oncoproteínas virais, o bloqueio da transcrição de genes supressores de tumores, como resultado da inserção do oncogene do HPV, ou a estimulação da transcrição dos oncogenes celulares pela inserção de seqüências ativadoras de transcrição derivadas do HPV. Desta forma, a infecção de queratinócitos bucais com HPV de alto risco pode fazer parte da patogênese de alguns carcinomas bucais, apesar de evidências que identificam o HPV na carcinogênese bucal serem, até o momento, sobretudo circunstanciais. A prevalência do HPV no câncer de boca tem variado de 0% a 100%, conforme dados da literatura, decorrente de variações no tamanho da amostra, população estudada e sensibilidade das técnicas empregadas (CHATTERJEE *et al.*, 1997; MILLER; JOHNSTONE; LEXIGTON, 2001).

Vários autores têm procurado realizar um estudo retrospectivo quanto à detecção de HPV em amostras de CEC e CV em blocos de parafina armazenados nos laboratórios de patologia dos hospitais e centros que diagnosticam e tratam câncer de boca no mundo (MILLER; JOHNSTONE; LEXIGTON, 2001).

Desde 1977, mais de 600 casos de carcinoma de boca têm sido estudados para a identificação de HPV. A prevalência citada, comprovada por diferentes técnicas de detecção, varia de 6% a 94%, e o método de maior sensibilidade para a detecção do HPV é a reação em

cadeia da polimerase (PCR) (SCULLY, 2002; BOUDA *et al.* 2000; PREMOLI-DEPERCOCO; RAMIREZ; GALINHADO, 1998); contudo, a média de prevalência é bem inferior à do câncer cervical. No entanto, assim como no trato genital, os HPV-16 e 18 são os tipos de maior ocorrência, perfazendo 80% das lesões HPV positivas (PREMOLI-DEPERCOCO, RAMIREZ, GALINHADO, 1998; MILLER; JOHNSTONE; LEXINGTON, 2001; MORRIS *et al.*, 2001).

A prevalência de HPV nos cânceres de boca é contraditória e intrigante ao mesmo tempo, uma vez que estudos com amostras e metodologias semelhantes apresentam respostas divergentes quanto à frequência de HPV no CEC. Um exemplo foi o estudo de Rivero e Nunes (2006), com quarenta amostras de CECs, que não detectou HPV em nenhuma delas. Por outro lado, há prevalência de até 60% de HPV positivo, como na investigação de Premoli-DePercoco e Ramirez, (2001), em uma amostra de cinquenta mulheres, e de L. Lo Muzio *et al.* (2004) que encontraram 57,1%(7/11) em CEC. Lazari *et al.* (2004) encontraram 11,3% (9/80) HPV⁺ em diferentes tipos de lesões benignas e malignas. Duas dessas amostras eram CEC e se revelaram negativas para o HPV. Em outros estudos, o HPV foi detectado em cerca de 100% dos casos de CEC (BOUDA *et al.*, 2000; UOBE *et al.*, 2001). Trabalhos de revisão de literatura confirmam essa discrepância nos resultados, como os de Miller, White e Lexington (1996) que revisaram 58 estudos de detecção de HPV em mucosa normal, em lesões pré-malignas e em CEC. Esses autores identificaram 13,5% de prevalência de HPV⁺ em mucosa normal (n=1026) de crianças e adultos, e essa prevalência elevou-se para 25,4% quando a análise se deu pela PCR. Para lesões benignas, a prevalência variou de 14,8% a 41,7% de acordo com o tipo de lesão, leucoplasia ou lesão intraepitelial, e com a metodologia, imunistoquímica, hibridização ou PCR. Já para os carcinomas (n=1051 para o CEC e n= 63 para o CV), a prevalência de HPV⁺ foi em média de 26,2% a 27% respectivamente. Quanto ao genótipo, os HPV 16 e 18 foram encontrados em 80% dos CECs e 35,3% dos CVs.

Em um estudo de meta-análise, que abrangeu os anos de 1982 a 1997, Miller e Johnstone (2001) verificaram, de acordo com os dados levantados em mais de 94 estudos, que, em um total de 4.680 casos, havia diferenças na prevalência de HPV em diferentes tipos de lesões bucais, benignas ou malignas, em comparação com a mucosa normal. Os dados encontrados sugerem que a probabilidade de se detectar HPV aumentou de acordo com alteração na natureza displásica da mucosa bucal e que houve semelhança na distribuição da probabilidade para leucoplasia benigna, neoplasia intraepitelial e carcinoma verrucoso. Já nos casos de CECs, a probabilidade de detectar HPV foi significativamente maior, 4,7 vezes, quando comparado à mucosa normal. Os HPV 16 e 18 foram detectados em 30% dos casos, ao passo que outros tipos de HPVs de alto risco representaram menos de 1% dos casos pesquisados. Esses achados confirmam a hipótese que os HPVs de alto risco estão mais comumente associados aos CECs do que os de baixo risco. Outro dado importante desse estudo é a afirmação dos autores de que o HPV é um fator de risco independentemente, dos demais, e que o HPV é um fator risco de igual valor ao do tabaco e álcool para o desenvolvimento do CEC, ou um fator preponderante, quando associado a eles. Esta afirmativa vai ao encontro de resultados de outros autores que afirmam que a associação desses três fatores de riscos aumenta a probabilidade de desenvolvimento do CEC de boca (SCULLY, 2002).

Herrero *et al.* (2004) realizaram estudo de caso-controle, de amostragem constituída de 1.670 casos de CEC, distribuídos em 1.415 CEC de boca e 255 CEC de orofaringe e 1.732 controles. As amostras para esse estudo foram obtidas por meio de raspado de mucosa e coleta sangüínea de todos participantes e por biópsias incisórias a fresco nos casos de CEC. A detecção do HPV foi realizada pela PCR em 79,2% (1323) carcinomas, devido à presença de tecido necrótico nos 347 restantes, entretanto, apenas 54,4% (908) foram amplificados para o *primer* de β -globina. Os resultados apontaram uma prevalência de 3,9% de HPV para 766

casos de CEC de boca e 18,3% para os 142 casos de CEC de orofaringe, obtidos dos espécimes de biópsia, e 94,7% dos HPV⁺ eram do tipo 16. Os autores concluíram que o HPV está associado ao câncer de orofaringe e, possivelmente, pode estar comprometido na origem do CEC de boca.

De acordo com Massano *et al.* (2006), o HPV-16 pode ser responsável por 80% dos HPV positivos em CEC, e o melhor método de detecção desse vírus é pela PCR. Para Miller *et al.* (1996), contudo a variabilidade na prevalência do HPV em CEC de boca deve-se a duas possibilidades: a lesão pode ser inerente à população estudada, ou então, a escolha dos *primers* utilizados na PCR pode ter afetado a detecção do HPV.

2.4.1.2 Agentes químicos

Os agentes químicos são representados sobretudo pelo tabaco e álcool, particularmente considerados os dois fatores de risco mais importantes na origem do câncer de boca (WARNAKULASURIYA; SUTHERLAND; SCULLY, 2005). Estudos têm demonstrado que tanto o tabaco quanto o álcool são agentes promotores do CEC, e a associação dos dois é maléfica para a saúde (NEVILLE; TERRY, 2002; SCULLY; FELIX, 2006; MASSANO *et al.*, 2006).

2.4.1.2.1 Tabaco

O tabagismo torna-se um fator de risco preocupante porque o fumo é um dos agentes cancerígenos mais conhecidos que o ser humano introduz voluntariamente no organismo (INCA, 1996). Estima-se que 4,9 milhões de pessoas morrerão em decorrência de doenças relacionadas ao uso crônico de tabaco no mundo nos anos 2000. Para o ano de 2020, esse valor pode atingir a casa dos 10 milhões anuais, e destes, 70% terão origem em países em

desenvolvimento. Já em relação ao câncer de boca, percebe-se que diferentes pessoas de etnias e regiões geográficas distribuídas pelo globo são dependentes de tabaco e álcool (WARNAKULASURIYA; SUTHERLAND e SCULLY, 2005).

Um levantamento realizado pelo Instituto Nacional do Câncer indicou que, no Brasil, 23% dos homens e 15% das mulheres são fumantes e o número de óbitos relacionados ao tabagismo é de cerca de 200 mil anualmente (SALOMON; TASSIN, 2006). Várias são as formas de consumo do tabaco, desde o uso de cigarros industrializados, cigarros de palha, charutos, de fumar invertido (no qual a ponta acesa do cigarro é colocada dentro da boca, elevando-se a temperatura da cavidade bucal e queimando a mucosa), o rapé e até o ato de deixar o tabaco diretamente na boca. Na Índia, além do tabaco, cultivava-se o hábito de mascar bétel (INCA, 1996; ZANINI *et al.*, 2004; WARNAKULASURIYA; SUTHERLAND e SCULLY, 2005; MASSANO *et al.*, 2006).

Diversos estudos têm verificado que, no tabaco e na fumaça que dele se desprende, podem ser identificadas cerca de 4.700 substâncias tóxicas. Destas, 50 têm potencial carcinogênico conhecido, incluindo os hidrocarbonetos policíclicos aromáticos, como benzeno, nitrosaminas, aldeídos e aminas aromatizantes (INCA, 1996; SCULLY e FELIX, 2006; NEVILLE; TERRY, 2002). Além disso, há outras substâncias carcinogênicas, como o níquel e o cádmio, elementos radioativos como o carbono 14 e o polônio 210, e até mesmo resíduos de agrotóxicos utilizados na lavoura do tabaco também podem ser detectados no tabaco e na sua fumaça (INCA, 1996; SCULLY e FÉLIX 2006). Não obstante a existência desses agentes agressores, ainda ocorre a exposição contínua ao calor desprendido pela combustão do tabaco, que potencializa as agressões à mucosa da cavidade bucal — a temperatura na ponta do cigarro aceso varia de 835 a 884°C (INCA, 1996). Deve-se lembrar, também, que a presença de úlceras bucais, mesmo transitórias, possibilita o contato direto dos produtos do tabaco com camadas internas e paredes laterais do epitélio da mucosa,

favorecendo agressões mais fortes. Este dado sugere existir um risco maior para pessoas que fazem uso de próteses mal adaptadas que, por sua vez, geram traumas permanentes na mucosa (INCA, 1996).

Um estudo de caso controle realizado nas cidades de São Paulo, Curitiba e Goiânia apontou que há uma forte associação entre o consumo de tabaco e o câncer de boca e, particularmente entre os fumantes de cachimbo e o CEC de língua. Além disso, esse trabalho mostrou que os efeitos da combinação entre o tabaco e álcool foram potencializados além dos efeitos independentes desses agentes em separado (PINTOS *et al.*, 1989).

a) Carcinogênese do tabaco nos tecidos bucais

A fumaça do tabaco contém muitos carcinógenos que são produtos de sua combustão dos quais os hidrocarbonetos aromáticos polinucleares (HAP) são predominantes. Dentre os HAPs ressalta-se o benzopireno que, quando ativado pela enzima P450, produz como metabólito o carcinogêneo epóxido dihidroxilado de benzopireno. Esse metabólito, quando interage com o DNA, pode dar início à carcinogênese. Outra forma de produção de carcinogênese origina-se oriunda do contato direto do fumo com a mucosa, nos casos em que ele é mastigado. Nessa forma, os carcinógenos são as nitrosaminas específicas do tabaco e, em muitos estudos, esse carcinogêneo foi encontrado em alta concentração na saliva dos dependentes (WARNAKULASURIYA; SUTHERLAND e SCULLY, 2005).

b) Dependência do tabaco

As causas da dependência do tabaco sempre tiveram na nicotina a sua âncora, ou seja, essa substância era considerada a principal responsável por induzir a dependência, por ligar-se

a receptores neuronais, provocando a liberação de monoaminas, substâncias associadas ao prazer (WARNAKULASURIYA; SUTHERLAND e SCULLY, 2005). No entanto, estudos recentes com ratos verificaram que a nicotina por si só não leva ao consumo compulsivo. Outros componentes do tabaco, como substâncias que inibem a degradação das monoaminas, exercem influência no circuito de recompensa cerebral e prolongam o prazer, levando à repetição do fumo. Alguns desses inibidores, supostamente adicionados ao cigarro para aumentar seu sabor, agem por muitos meses e criam uma longa dependência (SALOMON, TASSIN, 2006). Diante da constatação do envolvimento do tabaco com a origem de vários tipos de câncer, incluindo o de boca, vários países têm procurado, através da mídia, aconselhar os dependentes a deixar o vício (WARNAKULASURIYA; SUTHERLAND e SCULLY, 2005).

2.4.1.2.2 *Alcoolismo*

A relação entre álcool e o câncer de boca tem sido avaliada no Brasil por meio de estudos de caso-controle, que estabeleceram a associação epidemiológica entre consumo de álcool e cânceres da cavidade bucal e de esôfago (INCA, 2006).

O álcool é considerado um forte fator de risco para o desenvolvimento de cânceres no trato aerodigestório superior, sobretudo na cavidade bucal, na faringe, no esôfago e na laringe (BROWN, 2005). Em um estudo de caso-controle, em que se compararam 535 casos de cânceres de boca e de faringe com 1.031 controles, concluiu-se que tanto o álcool quanto o tabaco são fatores de riscos independentes na origem destes tumores e a combinação dos dois fatores multiplica em muito o risco de desenvolvê-los (BROWN, 2005).

O alcoolismo está relacionado de 2 a 4% das mortes por câncer e, também, à gênese dos cânceres de fígado, reto e, possivelmente, mama. Estudos epidemiológicos têm

demonstrado que o tipo de bebida (cerveja, vinho, cachaça etc.) é indiferente, pois o etanol parece ser o agente agressor. Esta substância psicoativa tem a capacidade de produzir alteração no sistema nervoso central, podendo modificar o comportamento dos indivíduos que dela fazem uso. Por seu efeito prazeroso, induz à repetição e, assim, à dependência (INCA, 2006).

Os tumores de soalho de boca e de língua são os de maior incidência, quando correlacionados ao álcool como fator de risco. Os mecanismos pelos quais as bebidas alcoólicas exercem seus efeitos carcinogênicos não são completamente entendidos, e, provavelmente, diferem nos diferentes órgãos afetados, da mesma maneira como outros carcinógenos que atuam em diferentes locais (BOFFETA e HASHIBE, 2006). Entretanto, as seguintes possibilidades são discutidas: aumento da permeabilidade das células da mucosa aos agentes carcinogênicos contidos no tabaco, em razão do efeito solubilizante do álcool; presença de substâncias carcinogênicas nas bebidas alcoólicas, dentre elas, a nitrosamina e os hidrocarbonetos; agressão celular produzida pelos metabólitos do etanol, os chamados aldeídos; deficiências nutricionais secundárias provocadas pelo consumo crônico do próprio álcool e diminuição dos mecanismos locais de defesa (INCA, 1996).

O problema dos fatores de riscos, como álcool e o tabaco, é que o início de consumo é muito precoce na população brasileira. Vários estudos demonstraram que a incidência de jovens que consomem álcool é alta, e que o início do vício ocorre por volta dos dez anos de idade. Um estudo publicado em 1995, envolvendo 950 jovens entre dez e dezoito anos, mostrou uma prevalência de 70% de consumidores de álcool (WHO, 2001; WÜNSCH-FILHO, 2002).

2.4.2 Carcinoma verrucoso

A etiologia do carcinoma verrucoso (CV) é bastante discutida. A alta frequência de alterações na mucosa bucal advindas de lesões cancerizáveis como leucoplasia, hiperplasia verrucosa, próximas à área do tumor, bem como o desenvolvimento de carcinomas decorrentes de lesões proliferativas verrucosas, reforçam a hipótese de que essa neoplasia pode ter sua origem ligada a um precursor benigno (KOCH *et al.*, 2001).

Na mucosa bucal, o CV tem sido associado aos diferentes carcinógenos do tabaco, sobretudo ao tabaco sem fumaça. O sítio de ocorrência maior está na mucosa jugal, no palato e na gengiva ou rebordos alveolares inferiores, isto é, locais em que há contato direto com o tabaco ou seus derivados. Ackerman (1948) relatou em seu artigo clássico de CV, que o hábito de mascar tabaco e ter carcinoma se apresentou fortemente correlacionado nos achados de Friedell e Rosenthal, em 1941, que identificaram a presença de lesões verrucóides em oito pacientes que fizeram uso de tabaco sem fumaça.

Entretanto, McCoy e Waldron, (1981), ao realizarem um estudo retrospectivo de 49 CVs de boca, constataram que 20 (41%) indivíduos eram usuários de tabaco e apenas 9 (18%) faziam uso do tabaco sem fumaça. Além disso, em 29 indivíduos, a lesão não estava associada ao uso do tabaco. Em outro estudo de Link, Kaugars e Burns (1992), ao analisarem 129 CVs de boca, notaram que apenas 10 pacientes (7,7%) faziam uso do tabaco. Embora o tabaco seja um dos fatores de risco etiológico do carcinoma verrucoso, em muitos casos não foi possível estabelecer essa associação, pois as lesões também ocorrem em indivíduos não-fumantes (MCCOY E WALDRON, 1981; LINK, KAUGARS, BURNS, 1992; BOUQUOT, 1998; KAUGARS *et al.*, 1999).

Os avanços da ciência, sobretudo da biotecnologia e da biologia molecular, possibilitaram estabelecer uma relação entre o CV e o HPV (SAITO, NAKAJIMA, MOGI, 1999, MILLER *et al.*, 2001). Em uma meta-análise, realizada por Miller *et al.* (2001), foi constatado que a probabilidade de detectar HPV em CV é semelhante tanto na leucoplasia,

quanto na neoplasia intraepitelial e muito aquém no CEC. Entretanto, como também é alta e até maior que no CV a probabilidade de encontrar HPV na mucosa normal, a infecção desse vírus de maneira isolada não parece ser um fator preponderante nos tumores malignos de cavidade bucal, especialmente em virtude de sua localização na mucosa normal, o que já foi relatada em vários trabalhos. Portanto, para a carcinogênese, o HPV associado a outros fatores de riscos mais clássicos, como o tabaco e o álcool, pode produzir modificações no epitélio que levaram ao surgimento de lesões malignas (PREMOLI-DE-PERCOCO; RAMIREZ, 2001; MILLER *et al.*, 2001).

2.5 TRATAMENTO DOS CARCINOMAS ESPINOCELULAR E VERRUCOSO

As opções de tratamento para o CEC são variadas e dependem do tamanho, da localização do tumor primário, da presença de linfonodos infartados, da presença ou ausência de metástases a distância, da tolerância do paciente ao tratamento proposto e, acima de tudo, da predisposição ou desejo de cura do paciente (NEVILLE e TERRY, 2002). A cirurgia e/ou a radioterapia têm sido padrões utilizados para o tratamento de câncer de boca com esvaziamento cervical para controle do tumor primário (NEVILLE e TERRY, 2002; SCULLY e FÉLIX, 2006).

Em relação ao CV, desde a primeira descrição de Ackerman (1948), até aos dias atuais, muitas controvérsias persistem na literatura em relação ao tipo de tratamento a ser dado para essa neoplasia. A maioria dos pacientes é tratada cirurgicamente (RAJENDRAN *et al.*, 1988; POMATTO *et al.*, 1993; SPIRO, 1998; CHAGÍN ; 2000, KOCH, *et al.*, 2001). Porém a radioterapia (JYOTHIRMAYI, 1997; KOCH, *et al.*, 2001) e/ou quimioterapia (POMATTO *et al.*, 1993; YOSHIMURA *et al.*, 2001) também têm sido usadas como tratamento inicial em pacientes considerados inoperáveis, em decorrência de lesões extensas ou alterações

sistêmicas que comprometem a cirurgia. Em estudo retrospectivo, Oliveira *et al.* (2006) encontraram 38,5% de recidiva pós-tratamento cirúrgico (excluindo os casos de *follow-up* perdido) em um total de vinte pacientes com CV. Já para Ogawa *et al.* (2004), que analisaram o tratamento em doze pacientes, o tratamento cirúrgico foi realizado em quatro pacientes, cinco fizeram cirurgia pós-quimioterapia e três fizeram cirurgia pós-quimioterapia e radioterapia associados. Houve recidiva para um paciente que submeteu ao tratamento cirúrgico pós-quimioterapia e também um caso para aqueles que seguiram o protocolo quimioterápico, radioterápico e cirurgia. A sobrevida para nove desses pacientes foi de 91,3% nos primeiros cinco anos, e de 52,4%, nos dez anos. As opiniões sobre o tratamento radioterápico como única alternativa tem gerado discussão, uma vez que o desenvolvimento de formas mais agressivas de carcinomas espinocelulares tem sido relatado na literatura (FERLITO *et al.*, 1999; YOSHIMURA *et al.*, 2001; OGAWA, 2004).

Em uma revisão de literatura sobre a possibilidade de transformação do CV em carcinoma espinocelular após radioterapia primária, Ferlito, Rinaldo e Mannarà (1998) analisaram 148 espécimes de CVs, dos quais dez (6,7%) apresentaram essa alteração. Para esses autores, há uma possibilidade remota e muitas vezes superestimada na literatura, como no trabalho de (DEMIAN, BUSHKIN e ECHERVARRIA, 1973) que relataram a possibilidade (30%) desta transformação, mas em uma casuística muito baixa (15 espécimes, dos quais onze eram de boca, três de laringe e um de útero). Acrescentam ainda que apenas 64 (43,2%) dos pacientes com CV analisados apresentaram cura pós-radioterapia, estando de acordo com a teoria proposta por Lundgrenn *et al.* (1986), de que o CV é menos sensível à radioterapia do que o CEC.

Em uma recente análise de uma amostra significativa de 2.350 CVs de boca e laringe diagnosticados no *National Cancer Data Base* (NCDB), no período de 1985 a 1996, Koch *et al.* (2004) constataram que o tratamento cirúrgico isoladamente foi o mais freqüente (69,7%)

seguido pela cirurgia combinada com a radioterapia (11%) e apenas radioterapia (10,3%). Para as lesões da cavidade bucal, a sobrevida relativa de cinco anos foi de 88,9% para pacientes tratados inicialmente com cirurgia e de 57,6%, para aqueles que receberam tratamento cirúrgico associado com radioterapia. Esses autores concluíram que os pacientes tratados somente com cirurgia alcançaram uma sobrevida maior do que aqueles tratados com radioterapia.

2.6 CICLO CELULAR

Uma célula reproduz-se por meio de uma seqüência ordenada de eventos que duplicam seus componentes e depois a divide em duas. Este mecanismo de duplicação e divisão é denominado de ciclo celular (ALBERTS *et al.*, 2004).

A função básica do ciclo celular consiste em duplicar exatamente todo o conteúdo de DNA nos cromossomos e, com precisão, segregar as cópias no interior das duas células-filha geneticamente idênticas. Este processo define as duas principais fases do ciclo celular. A duplicação do DNA ocorre durante a *fase de síntese* (fase S), que dura de dez a doze horas, e ocupa a metade do tempo do ciclo celular. Após a *fase S*, a segregação do cromossomo e a divisão celular ocorrem na *fase de mitose* (fase M), que precisa de muito menos tempo. A fase M envolve uma série de eventos que começa com a divisão nuclear ou mitose. A mitose inicia-se com a condensação do cromossomo da seguinte forma: as fitas de DNA duplicadas e empacotadas no interior do cromossomo alongado condensam-se no interior de um cromossomo mais compacto, necessário para a segregação. O envelope nuclear é então rompido, os cromossomos replicados, cada um consistindo de um par de *cromátides-irmã*,

que se fixarão nos microtúbulos do fuso mitótico. Com a continuação da mitose, as células fazem uma breve pausa em um estado denominado *metáfase*, no qual os cromossomos se apresentam alinhados na região equatorial do fuso mitótico e posicionados para a segregação. A súbita separação das cromátides-irmã marca o início da *anáfase*, durante a qual os cromossomos se movem para os pólos opostos do fuso, nos quais eles se descondensam e reorganizam os núcleos intactos. A célula é então dividida em duas pela divisão citoplasmática, ou *citocinese*, e a divisão celular completa-se (ALBERTS *et al.*, 2004).

A maioria das células necessita de muito mais tempo para crescer e duplicar a sua massa de proteínas e de organelas do que o tempo exigido para replicar o seu DNA e dividir-se. Para permitir um maior tempo para o crescimento, as *fases de intervalos* extras são introduzidas em muitos ciclos celulares – uma fase G1, entre a fase M e S, e uma fase G2, entre a fase S e a mitose. Dessa forma, o ciclo celular eucariótico é tradicionalmente dividido em quatro fases seqüenciais: G1, S, G2 e M (Figura 6). As fases G1, S, e G2 consideradas em conjunto são chamadas *interfase*. Em uma típica célula humana que se prolifera em cultura, a interfase pode ocupar 23 das 24 horas do ciclo, restando uma hora para a fase M.

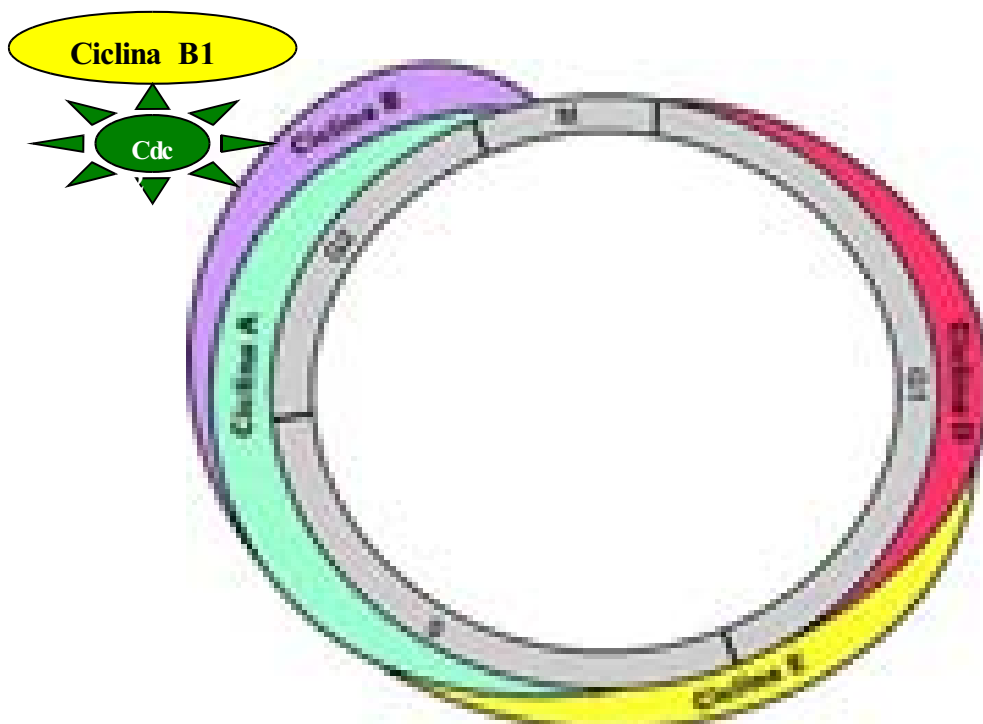


Figura 6 — As fases do ciclo celular, as células crescem continuamente na interfase, a qual consiste de três fases: a replicação do DNA está confinada à fase S; a G1 é o intervalo entre a fase M e a fase S, enquanto a G2 é o intervalo entre a fase S e a fase M. Na fase M, o núcleo e depois o citoplasma dividem-se. As ciclinas são proteínas que regulam a transição de uma fase para outra, a ciclina B1 regula a transição G2/M pela formação do complexo ciclina B1/cdc2

Fonte : Adaptado do site < http://www.eurekah.com/dbimages/blagosklonny_9_2.gif >

As duas fases de intervalo representam um complexo tempo de retardo para permitir o crescimento celular. Elas também fornecem tempo para a célula monitorar o ambiente interno e externo, para ter certeza de que as condições estão apropriadas e de que preparação está completa para a célula passar da *fase S* para a mitose. Dessa forma, a fase G1 é especialmente importante e, portanto, sua duração pode variar muito, dependendo das condições externas e dos sinais extracelulares de outras células. Se as condições extracelulares não são favoráveis, por exemplo, as células retardam o avanço de G1 e podem entrar em um estado de inativação especializado denominado de G0 (G zero), no qual elas podem permanecer por dias, semanas ou até mesmos, anos antes de reassumirem a proliferação. No entanto, se as condições extracelulares são favoráveis, e os sinais para o crescimento e divisão estão presentes, as células no início de G1 ou de G0 avançam até um ponto próximo ao fim de G1, conhecido como ponto de restrição. Após a passagem desse ponto, as células estão preparadas para replicação do DNA, mesmo que os sinais extracelulares que estimulam o crescimento celular e a divisão sejam removidos.

O ciclo celular é monitorado por um sistema de controle que determina o momento certo de ocorrência dos eventos sucessivos e dependentes, isto é, para que uma próxima etapa seja realizada é necessário que a etapa anterior a ela esteja completa. Em muitas células, existem vários pontos no ciclo celular, denominados pontos de checagem (*checkpoints*), nos quais o ciclo pode ser interrompido, se os eventos anteriores não se completarem. Um exemplo é o impedimento da entrada na mitose quando a replicação do DNA não está pronta.

O atraso nesses pontos de checagem de dano do DNA fornece tempo para que o DNA danificado seja reparado, dessa forma, a frenagem do mecanismo é liberada, e o ciclo celular é retomado.

A seqüência de fases do ciclo celular, com seus respectivos pontos de checagem, permite que a célula complete seu ciclo normal, replicando-se sem dar origem a células anormais. A divisão celular normal é positivamente regulada ou estimulada pelas vias sinalizadoras, que respondem a fatores extracelulares, os quais agem por meio de uma seqüência de proteínas. A progressão pelo ciclo celular é controlada por uma série de proteínas chamadas quinases dependentes de ciclinas (CDKs), particularmente nas transições de fases tanto de G1 para S quanto de G2 para M (PAULOVICH; TOCZYSIKI; HARTWELL, 1997). Os níveis de ciclina oscilam durante as fases do ciclo, determinando o momento apropriado de sua ligação com CDKs.

Existem quatro classes de ciclinas, cada uma definida pelo estágio do ciclo celular em que elas se ligam a CDKs e pela função. Três dessas classes são necessárias em todas as células eucarióticas: a ciclina B1 é uma proteína que regula a passagem da fase G2 para a fase M, possui 62Kd e é encontrada em associação com CDKs e, por isso, regula a sua atividade. A ciclina B1 forma um complexo com a proteína cdc2, conhecida também como CDK1, formando o fator promotor de maturação (MPF). O complexo MPF é essencial para a transição de G2/M e atua também no controle dos *checkpoints* (WASNER *et al.*, 2003). Entretanto, a atividade ciclina/CDK é bloqueada por uma série de inibidores específicos, que podem ser agrupados em famílias como a do p21/p27/p57, que bloqueiam múltiplos complexos ciclina/CDKs e na família p16/p15/p18/p19, que inibe os complexos CDK4/CDK6 (PAULOVICH; TOCZYSIKI, HARTWELL, 1997).

2.7 MARCADORES DE PROLIFERAÇÃO CELULAR

A proliferação celular pode ser definida como o aumento do número de células resultante da conclusão do ciclo celular (LEVINE *et al.*, 1994). Trata-se de um processo biológico de importância para o organismo, entretanto, o controle desse processo mostra-se desregulado nas lesões tumorais (TUMULURI *et al.*, 2002). De acordo com Bacchi e Gown (1993), a proliferação celular surge como um fator precursor na origem de tumores malignos.

O aumento da proliferação celular em neoplasia é um evento inicial, não necessariamente específico, de descontrole do crescimento tecidual. Ocorre que células submetidas aos estímulos contínuos de proliferação celular são, de certa forma, propensas a ter lesões no DNA, graças à diminuição da eficácia dos mecanismos responsáveis pela manutenção da integridade genômica. Dessa forma, situações de intensa proliferação celular propiciam o surgimento de possíveis mutações em células previamente iniciadas, aumentando sua instabilidade genética e tornando iminente o aparecimento de células transformadas, que podem dar origem a um tumor. No entanto, mesmo após o estabelecimento da neoplasia, o balanço entre a proliferação e a morte celular desempenha importante papel ao selecionar os clones mais adaptados às condições adversas, tais como a falta de nutrientes ou citotoxicidade mediada por células do sistema imunológico. Por esse motivo, a proliferação celular destaca-se dentre os fatores prognósticos de maior importância para diversas neoplasias humanas, constitui indicador de agressividade da neoplasia e, por vezes, estabelece diagnóstico de malignidade para lesões de difícil avaliação, consideradas como lesões limítrofes (OLIVEIRA, 2002).

A atividade proliferativa de qualquer tecido, ou neoplasia, pode ser determinada pela taxa de crescimento, isto é, pelo número de células proliferantes e o tempo que elas levam para completar o ciclo celular (BROWN; GATTER, 1990).

A descoberta de inúmeras proteínas que desempenham papel fundamental na fase replicativa do DNA permite, por meio da sua detecção e quantificação, tanto o reconhecimento objetivo das células proliferantes como o estabelecimento de uma estimativa da taxa de proliferação tecidual da neoplasia.

O antígeno nuclear de células proliferativas (PCNA) tem sido relatado em inúmeros trabalhos, por ser esse marcador um indicador útil do comportamento biológico de alguns tumores (TSUJI *et al.*, 1995; ARISAWA *et al.*, 1999; CHANG *et al.*, 2000; SCHILDT *et al.*, 2003).

Myiachi *et al.* (1978), descreveram, com base no soro de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico, um antígeno nuclear presente em células proliferantes que, inicialmente foi considerado uma ciclina, em virtude de seu aparecimento cíclico. Posteriormente, Bravo *et al.* (1987) relataram que se tratava de uma proteína nuclear ácida de 36kDa, que funcionava como uma proteína auxiliar da DNA polimerase delta, associada tanto à replicação do DNA quanto ao seu reparo (MCMORMICK, HALL, 1992).

De acordo com Mighell (1995), o PCNA não pode ser considerado um bom marcador de proliferação celular, visto que os níveis de PCNA podem se manter elevados quando induzidos por fatores de crescimento, como resultado de danos ao DNA. Além dele, outros fatores podem influenciar a proliferação celular, como o tipo de fixador, tempo de fixação, estado dos espécimes. O inconveniente é que o PCNA tem uma meia vida bastante longa,

aproximadamente vinte horas, indicando que o núcleo celular pode permanecer PCNA positivo mesmo após o estímulo.

O anticorpo Ki67 é outro marcador celular bem estudado que reconhece um antígeno que está associado ao núcleo celular e que, em células continuamente ciclizantes, é expresso em todas as fases do ciclo celular, exceto em G0 (ARISAWA *et al.*, 1999).

O anticorpo monoclonal que reconhece epítipo da proteína Ki67 foi produzido, pela primeira vez, por GERDES *et al.* (1984), e se mostrou útil e de amplo uso na determinação do número de células em divisão em tumores e tecidos não-neoplásicos.

O tempo da meia vida da proteína Ki67, em média, é de menos de uma hora (BRUNO; DARZYNKIEWIKZ, 1992). O uso da proteína Ki67 era muito limitado, em virtude de serem necessários tecidos frescos ou congelados, porém recentemente, novos anticorpos que reconhecem esse antígeno em espécimes fixados em formol e processados rotineiramente ampliaram o seu leque de utilização em muitas pesquisas (GERDES *et al.*, 1992).

Alguns trabalhos têm mostrado a superioridade da proteína Ki67 como marcador de proliferação celular, por não sofrer tantas influências de fatores internos e externos como o PCNA. Além disso, sua expressão nuclear, em um período definido do ciclo celular, em contraste com o PCNA, pode representar uma vantagem em relação ao seu uso como marcador biológico, o que se deve à expressão nuclear do Ki67 ser limitada a todas as fases, exceto G0, no ciclo celular, ao passo que o PCNA ocupa o ciclo inteiro (ARISAWA *et al.*, 1999). De acordo com Arisawa *et al.* (1999), essa pode ser uma vantagem no seu uso como marcador biológico.

2.8 EXPRESSÃO IMUNOISTOQUÍMICA DE PCNA, KI67 E CICLINA B1 EM CECS E CVS DE CABEÇA E PESCOÇO

Sittel *et al.* (1999) estudaram os marcadores de proliferação celular Ki67, PCNA e de p53 em grupo de 239 pacientes com CEC de boca e orofaringe com estadiamento de T1-T3. Deste grupo, foram selecionados 28 pacientes que tiveram recidiva e foram comparados com 28 pacientes sem recidiva. Todos os pacientes tiveram tratamento cirúrgico associado com radioterapia pós-operatória. O índice de marcação do Ki67 (59,1%) foi significativamente maior nos pacientes que tiveram recidivas ($p=0,032$) do que naqueles que obtiveram sucesso no tratamento (50,5%). Para os carcinomas que apresentaram maior índice de marcação para o Ki67, correspondendo a 53,7% da população geral, ocorreu um tempo de recidiva menor, em média de 45 meses. Em contrapartida, para aqueles casos que apresentaram menor índice de marcação do Ki67, houve um tempo maior do surgimento da recidiva, em média de 61,7 meses ($p=0,029$). O índice de marcação para o PCNA não demonstrou correlação significativa com o tempo de recidiva tumoral (média=50,2% para tratamentos considerados de insucesso e 45% para os casos bem-sucedidos, $p=0,32$). Os autores concluíram que o índice de marcação da proteína Ki67 pode direcionar o tratamento do CEC de boca e orofaringe. A superexpressão de p53 ocorreu em 46% dos tumores. Não foi encontrada correlação significativa entre a superexpressão de p53 e a recidiva tumoral. Também concluíram que o Ki67 é um indicador de prognóstico desfavorável para os casos de CECS de orofaringe e de boca tratados com a combinação de cirurgia e radioterapia pós-operatória.

Xie *et al.* (1999) pesquisaram vários marcadores, no CEC de língua, dentre eles, a expressão do Ki67 e correlacionaram os resultados com parâmetros clínicos e resposta ao tratamento. O estudo teve como amostra 85 casos, e todos os espécimes mostraram expressão

para o Ki67 com valores que variaram de 29 a 95% (média=65%). O índice foi significativamente maior nos casos de insucesso com o tratamento (70 a 95%, respectivamente; $p=0,0003$). De acordo com esses resultados, bem como de outros marcadores de proliferação (AgNOR) e apoptose (bcl-2), os autores sugerem que os usos dessas proteínas têm valor no prognóstico do CEC.

Chang *et al.* (2000) verificaram a expressão do PCNA em lesões com displasia epitelial e constataram que houve marcação nas camadas basal, parabasal e espinhosa. Já no caso da mucosa oral normal, em um total de dez casos, todos apresentaram marcação nas camadas basal e parabasal, e apenas dois tiveram marcação na camada espinhosa.

Merne *et al.* (2002) pesquisaram a expressão dos marcadores de proliferação PCNA e Ki67, gene supressor p53, p21, citoqueratina, colágeno tipo IV, em 14 espécimes de biópsias de lesões provenientes de mucosa bucal induzida por rapé. Os resultados demonstraram que a marcação de Ki67⁺ ($24,6 \pm 9,7$, $p=0,000$) foi menor do que para o PCNA⁺ ($34,4 \pm 16,15$, $p=0,000$), nas lesões que usaram rapé induzido. Os controles apresentaram 100% de células positivas para o PCNA e ($71,5 \pm 6,6$) para o Ki67. Os dois marcadores de proliferação celular PCNA e Ki67 tiveram células positivas sobretudo na camada basal das lesões induzidas.

Vicente *et al.* (2002), com o objetivo de investigar a influência da ciclina D1 e da proteína Ki67 no prognóstico de carcinomas por método imunohistoquímico, analisaram essas proteínas em 35 carcinomas de células escamosas intrabucais. A superexpressão da ciclina D1 foi correlacionada positivamente com a metástase em linfonodos e tamanho do tumor primário, ao passo que o Ki67, com um valor médio de marcação de 34,1%, não obteve associação com o acompanhamento clínico dos pacientes, entretanto, sua expressão encontrava-se aumentada em tumores pouco diferenciados. A superexpressão da ciclina D1

estava relacionada a um prognóstico pior e positivamente correlacionada à expressão da proteína Ki67.

Tumuluri *et al.* (2002), ao pesquisarem a proliferação celular de 42 carcinomas de células escamosas bucais por meio da imunomarcação da proteína Ki67, observaram que o índice de positividade era cinco vezes maior no fronte de invasão dos tumores do que nas áreas de limites cirúrgicos da lesão e, ainda, quanto mais pobre a diferenciação do tumor, maior foi a quantidade de imunopositividade para a proteína Ki67 nas áreas de invasão tumoral.

Schildt *et al.* (2003) realizaram um estudo com um grupo de 133 carcinomas de boca para verificar a relação entre a exposição aos fatores de riscos e os parâmetros biológicos tumorais, com foco no gene *TP53* e na proteína p53. Os tumores foram, ainda, avaliados pelo método da imunistoquímica para a análise da expressão das proteínas p53, PCNA, Ki67 e bcl-2. O gene *TP53* foi estudado pela técnica do PCR para avaliação das mutações. Os resultados foram correlacionados à exposição individual aos fatores de riscos tais como: tabaco, álcool, infecções por herpes simples, fatores dentários, raios-X. Nesse estudo, houve decréscimo do *Odds ratio* (ORs), à medida que a expressão do PCNA aumentava para os pacientes fumantes, enquanto para o Ki67 ocorreu o contrário. Dessa forma, os autores apontaram não ser possível estabelecer correlação entre os dois marcadores e os fatores de riscos nas amostras estudadas. Para os marcadores bcl-2 e p53, houve pouca expressão do primeiro, e não ocorreu associação entre o tabaco e a proteína p53. Entretanto, houve associação entre a p53 e infecções por herpes simples (OR 12) e não se obteve correlação entre esse fator de risco e a *TP53*. Por fim, concluíram que, possivelmente, a infecção por herpes simples, direta ou indiretamente, pode inativar a proteína p53.

Piattelli *et al.* (2002) pesquisaram a prevalência da p53, bcl-2 e imunoreatividade do Ki67 para obter o índice de apoptose no epitélio bucal normal, leucoplasia, displasia e no CEC de cavidade bucal. Setenta amostras foram analisadas, sendo dez casos de mucosa normal, doze casos de leucoplasia, doze casos de displasia epitelial e 36 casos de CEC distribuídos em três grupos de doze, de acordo com a graduação histológica da lesão: bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pouco diferenciado. Os resultados evidenciam uma forte associação entre a p53 e a proliferação celular aferida pela marcação de Ki67 e pelo índice de apoptose. A proteína p53 esteve presente na camada basal do epitélio bucal normal e houve marcação também da camada parabasal nas lesões cancerizáveis. Nos CECs, p53 expressou-se na periferia e frente de invasão tumoral. Já a bcl-2 estava presente na camada basal do epitélio bucal normal e, na displasia, sua presença na camada parabasal foi rara, diferentemente dos carcinomas no quais a marcação se concentrou, sobretudo, nas regiões central e periférica da área de invasão tumoral. A expressão da proteína Ki67 no epitélio normal foi de 5,2%, 9,0% na leucoplasia, 15,3%, na displasia leve, para a displasia severa e carcinoma *in situ*, 28,6%, para os carcinomas bem diferenciados, 18,8%, nos moderadamente diferenciados, 20,8% e nos pouco diferenciados, 24,2%. Constataram-se diferenças estatisticamente significantes entre a mucosa normal e leucoplasia ($p=0,0161$), a mucosa normal e os carcinomas ($p<0,0001$), leucoplasia e displasia leve ($p=0,039$), leucoplasia e displasia leve ($p=0,017$), mucosa bucal normal e displasia severa ($p=0,0011$), leucoplasia e displasia severa ($p=0,0007$), leucoplasia e displasia leve ($p=0,00065$), displasia leve e carcinoma ($p=0,0455$) e displasia severa e carcinoma ($p=0,0455$). Não foram encontradas diferenças estatisticamente significantes entre os diferentes graus de carcinomas ($p=0,1209$).

Ogawa *et al.* (2004) estudaram a expressão do gene supressor *p53*, da molécula de adesão celular CD44v9 e o índice de proliferação celular, por meio do PCNA em CV e CEC bem diferenciado com o objetivo de se comparar tratamento e comportamento biológico das

duas lesões. Foram selecionados doze casos de CV (3,5%) entre 315 casos de CEC. A expressão do PCNA no CV variou de $27,7 \pm 2,8\%$ e $35,0 \pm 5,0$ para o CEC bem diferenciado. Em relação ao índice de proliferação celular no CV e no CEC bem diferenciado, não houve diferença estaticamente significativa na avaliação das células PCNA⁺ ($p=0,21$). Outro resultado importante dessa pesquisa foi a alta expressão da CD44v9 no CV (80%). Como essa proteína promove a adesão entre as células, os autores inferiram que o baixo risco de metástase cervical se deve à forte presença de CD44v9. Dessa forma, a cirurgia é o tratamento de escolha para o CV.

Odajima *et al.* (2005) pesquisaram os aspectos clínicos, patológicos e de sobrevida em 110 pacientes com CEC, utilizando correlação entre expressão dos marcadores ciclina D1, EGFR e de proliferação celular Ki67, com β -catenin, uma molécula de adesão tecidual. A atividade de proliferação celular foi verificada pelo Ki67 e houve reatividade dela no epitélio bucal normal nas camadas basal e parabasal, ao passo que nos tumores ocorreram marcação no fronte de invasão tumoral. A média de células Ki67 positivas no epitélio oral variou de $(19,9 \pm 3,1)$ e de $(43,9 \pm 10,3)$ em CECs que tiveram redução na membrana basal, e para os que não sofreram redução, a média variou de $39,91 \pm 10,64$ ($p=0,04$). Já a ciclina D1 foi negativa no epitélio normal e detectada em 39,1% dos tumores. A imunorreatividade da proteína EGFR expressou-se nas camadas basal e suprabasal do epitélio normal, e, células tumorais. Os autores identificaram apenas 40,1% de células positivas e expressas freqüentemente nas suas membranas e citoplasmas. Não foram observadas diferenças estatísticas entre a ciclina D1 e EGFR em CEC ($p=0,338$). A proteína β -catenin mostrou-se estatisticamente associada à expressão da Ki67, ou seja, quando a expressão da proteína de adesão diminui, a expressão de Ki67 ($45,89 \pm 9,71$) aumenta e quando a membrana se mostra preservada, o índice de Ki67 é menor ($39,91 \pm 10,64$) com $p=0,004$.

Sharma *et al.* (2005) avaliaram o índice da proteína Ki67 em raspados da superfície tumores bucais e os associaram aos efeitos da radioterapia. A amostra desse estudo foi de 43 pacientes que receberam 2 gray por dia de irradiação. Os raspados eram realizados antes da irradiação, e após 24 horas. Como resultado, os autores encontraram drástica redução no número de células displásicas. Houve uma baixa expressão do Ki67 em amostras que receberam o pré-tratamento. Apenas dez tumores (23,3%) apresentaram células positivas para o Ki67, ao passo que do restante (33) não se obteve marcação. Os autores concluíram que a expressão do Ki67 é baixa para raspados de CEC.

Em um estudo cujo objetivo era verificar o balanço entre a proliferação celular e apoptose nos diferentes estágios da carcinogênese bucal em hamsters, utilizou-se o Ki67 como marcador de proliferação celular, Bax e bcl-2 para investigar apoptose (DERKA *et al.*, 2006). A amostra foi composta de 40 hamsters em 4 grupos, n=7 para o controle e n=10 para três grupos (A,B,C) experimentais no tratamento da carcinogênese distribuídos ao acaso. Três hamsters morreram durante o experimento. O grupo A apresentava amostras de displasias (6), CEC inicial (3), CEC bem diferenciado (1); no grupo B, a displasia foi trocada pelo CEC moderadamente diferenciado, e grupo C tinha apenas os CECs bem e moderadamente diferenciados. A imunodetectação de Ki67 teve variação significativa nos diferentes estágios de carcinogênese. Para a mucosa normal, a média de células positivas foi de 24,5%, as lesões pré-cancerígenas apresentaram 65% ($p<0,001$) de células positivas. Já nos CECs, os bem diferenciados apresentaram índice de 26,8% ($p<0,001$), e os moderadamente diferenciados de 40,3% ($p<0,005$). O índice do Ki67 foi mais acentuado nos estágios iniciais da carcinogênese e decresceu no CEC bem diferenciado para índices próximos aos da mucosa normal. Os autores concluíram que esses achados contradizem os estudos realizados em humanos, que relatam um aumento gradual da expressão do Ki67 à medida que se aproxima do CEC (DERKA *et al.*, 2006).

Gimenez-Conti *et al.* (1996) investigaram as possíveis alterações das proteínas p53, Rb e ciclina D1 em 29 espécimes de CV. O imunomarcador *p53* mostrou superexpressão em 15 dos 29 casos, com marcação nuclear e expressa nas camadas basal e parabasal. Em relação ao *Rb*, em nenhum dos casos houve superexpressão desse anticorpo e a sua marcação concentrou-se nas camadas basal e parabasal na mucosa normal e no CV. A ciclina D1 foi expressa em 61% dos casos e não foi detectada em células proliferativas de mucosa normal. De acordo com os autores, a ausência de alterações na proteína Rb em CV pode dever-se à superexpressão da ciclina D1. Além disso, alternativamente, essa falta de expressão de Rb está ligada a uma possível infecção por HPV. Dessa forma, os autores concluíram que a alteração dos genes *Rb* não está implicada na patogênese do CV, e a sua falta deveu-se à alta expressão da ciclina D1 e às células p53+ que denotam possível mutação.

Saito, Nakajima e Moji (1999) estudaram a expressão de várias proteínas associadas ao ciclo celular, incluindo p16 e p27, que são inibidoras de CDKs e atuam na transição de G1 para a fase S, além dos genes supressores de tumor pRb e p53 e de Ki67 em diversos tipos de lesões displásicas, CEC e CV de cavidade bucal, por meio da imunoistoquímica. A amostra era composta de 116 biópsias com a idade dos participantes variando de 26 a 93 anos. A origem tecidual das lesões foi 54 lesões de tecido gengival, 33 de língua, 17 mucosa bucal, oito de palato mole e quatro de soalho bucal. Os grupos de CEC foram compostos por 35 carcinomas bem diferenciados, sete moderadamente diferenciados e dois pouco diferenciados, e, para o grupo de CV foram selecionadas quinze amostras. Os resultados obtidos foram: a porcentagem média de p27 positiva, CEC (24,0±6,03); CV (52,6±15,7), foi inversamente proporcional a da proteína Ki67, CEC (63,0±6,47); CV (27,4±9,11). As proteínas p27 e Ki67 foram detectadas exclusivamente no núcleo das lesões displásicas, tumorais e no epitélio normal da mucosa. Quanto à distribuição entre as camadas do epitélio, a p27 marcou presença na camada basal, com decréscimo da expressão de acordo com o aumento da displasia, ao

contrário do Ki67 que teve forte marcação tão-somente nas camadas basal e parabasal na displasia epitelial. No tocante do CEC, a p27 foi positiva nas ilhotas tumorais presentes na região de invasão. Em contrapartida, a Ki67 expressou-se na periferia do tumor, no qual se observaram mitoses com freqüência. O estudo mostrou que houve diferença nas marcações de p27 e Ki67 do CEC, em comparação com CV. A porcentagem média de p27 foi duas vezes maior no CV do que no CEC ($p < 0.0001$), ao passo que a prevalência de Ki67 positiva no CV foi aproximadamente a metade da expressão no CEC ($p < 0.0001$). No CV, a camada com maior expressão de Ki67 aparece em áreas da camada basal, ao passo que a p27 apresentou decréscimo. As proteínas p16, pRb e p53 demonstraram maior expressão de acordo com o aumento da severidade da lesão. Entretanto, as proteínas p16 e pRb mostraram-se mais expressas no CV do que no CEC. Os autores concluíram que há diferenças entre a expressão dessas proteínas em diferentes lesões, até mesmo entre o CEC e CV, e indicaram a possibilidade de relação do HPV com o CV.

Kushner *et al.* (1999) pesquisaram os marcadores ciclina A, ciclina B1 e Ki67 em CEC de soalho bucal ($n=50$), de 21 mulheres e 29 homens, com idade média de 61 anos. Foram selecionados também dez controles provenientes do soalho bucal sadio. O número de células foi registrado com o auxílio de um programa de computador. A distribuição, de acordo com a graduação histológica, foi a seguinte: oito tumores pouco diferenciados, dezessete bem diferenciados e 25 moderadamente diferenciados, e os resultados obtidos da contagem nos CECs apontaram o seguinte: ciclina A ($29,50 \pm 4,10$), ciclina B1 ($2,05 \pm 0,3$) e Ki67 ($49,46 \pm 55,91$) valores significativamente mais altos se comparados aos controles (ciclina A: $9,3 \pm 1,72$; ciclina B1: $1,01 \pm 0,36$; Ki67: $17,40 \pm 4,17$). Quando comparados se os escores médios eram maiores no CEC do que nos controles, a ciclina A e o Ki67 apresentaram forte correlação em todos grupos tumorais ($r=0,68$). No entanto, as correlações entre a ciclina B1 e a ciclina A ($r=0,35$) e a ciclina B1 e Ki67 ($r=0,39$) foram fracas. Os autores concluíram que

houve superexpressão de ciclina A e ciclina B1 no CEC de cavidade bucal. Além disso, sugeriram que as fracas correlações entre a ciclina B1 e as outras proteínas do ciclo celular indicaram que pode existir uma irregularidade de progressão no ciclo celular durante o *checkpoint* G2/M em CEC de boca.

Hassan *et al.* (2001) estudaram a imunoexpressão da ciclina B1 em 41 CEC de língua, em lesões existentes em 25 homens e 16 mulheres, com média de idade de 56,2 anos. Todos os indivíduos dessa pesquisa que se submeteram à cirurgia tiveram acompanhamento por 83 meses. Observou-se pouca marcação das camadas basal e parabasal nas áreas adjacentes ao tumor. A porcentagem de células positiva foi menos de 1%. A marcação ocorreu no citoplasma. Houve superexpressão em 37% (15) dos tumores e pouca ou nenhuma expressão nos outros 26 restantes. Para os autores, em razão do tamanho da amostra, não foi possível estabelecer relação com álcool ou tabaco. Também concluíram que a ciclina B1 possui valor de prognóstico independente, por meio da análise multivariável dos fatores clínico-patológicos clássicos.

Hassan *et al.* (2002) pesquisaram a influência da radioterapia na expressão da ciclina B1 em CEC de cabeça e pescoço. A amostra era composta por oitenta pacientes que participaram de um ensaio clínico, recebendo dose e regimes fracionados de tratamento radioterápico pós cirúrgicos. Três grupos foram criados e distribuídos de acordo com grau de risco — baixo risco, intermediário e de alto risco — e foram tratados somente com cirurgia, com cirurgia e dose intermediária de radioterapia, e cirurgia e dose alta de radioterapia, respectivamente. Trinta e oito dos oitenta pacientes tiveram superexpressão, perfazendo um percentual de 47%. Onze dos pacientes (29%) com tumores apresentaram recidivas locais ou nodais, e 3/42 pacientes (7%) tiveram baixa expressão de ciclina B1 ($p=0,01$). Quando o controle locorregional foi utilizado como ponto final para o grupo de alto risco,

os pacientes com tumores não demonstraram superexpressão de ciclina B1 ($p=0,01$). Diante desses resultados, os autores concluíram que a ciclina B1 poderia ser um indicador de risco de recidiva locorregional e metástase em pacientes com CEC de cabeça e pescoço em tratamento com radioterapia.

Bjarnason, Jordan e Sothorn (1999) estudaram a variação das proteínas ciclinas A, E e B1, bem como a expressão de p53 e Ki67 no epitélio bucal, durante 24 horas no ciclo circadiano. O tamanho da amostra foi oito pacientes, e as coletas de material foram realizadas em seis períodos de quatro horas. Um resultado interessante dessa pesquisa é que houve marcação das camadas basal e parabasal no epitélio bucal normal para os diferentes tipos de marcadores, para o grupo da ciclina B1 ($p=0,016$) e para o grupo do Ki67 ($p=0,012$) em relação ao ritmo circadiano. De acordo com os autores, o pico de Ki67 foi às três horas, seis horas após o pico da ciclina B1 (marcador da *fase M*) e oito horas antes do pico de p53 (marcador expresso em G1). Eles concluíram que seus resultados são importante para utilização de quimioterápicos e radioterápicos, de acordo com momento de maior expressão das proteínas.

3 OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Neste estudo foi avaliada a proliferação celular e investigada a presença de HPV em carcinomas espinocelulares e verrucosos de boca, com o intuito de se identificar possíveis diferenças na etiopatogênese e comportamento biológico destas lesões.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- a) descrever os dados demográficos, aspectos clínicos (localização, morfologia, presença de metástase, recidiva e sobrevida) e estágio clínico TNM dos pacientes com carcinomas;
- b) relacionar os fatores de risco (tabagismo, etilismo e HPV) com os dois grupos de carcinomas avaliados;
- c) analisar qualitativamente a imunomarcagem de PCNA, Ki67 e ciclina B1 nas amostras de CEC, CV e grupo controle;
- d) estudar comparativamente o índice de proliferação celular utilizando os marcadores PCNA, Ki67 e ciclina B1 por meio de imunohistoquímica;
- e) determinar a prevalência de HPV nas amostras de CEC e CV por meio de PCR, utilizando os *primers* GP5+/6+.

MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 TIPO DE ESTUDO — descritivo transversal.

4.2 OBTENÇÃO, SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRAGEM

As amostras utilizadas neste estudo foram obtidas no Setor de Anatomia Patológica do Hospital Araújo Jorge (HAJ), provenientes de pacientes que foram atendidos no Centro Goiano de Doenças da Boca (CGDB), situado na Faculdade de Odontologia da Universidade

Federal de Goiás (FO/UFG), no período de 1985 a 2006. Todos os pacientes tiveram seus laudos de biópsias incisionais, diagnosticados com carcinomas pelo Laboratório de Patologia Bucal da FO/UFG e foram encaminhados ao Hospital Araújo Jorge da Associação de Combate ao Câncer em Goiás (HAJ-ACCG) para tratamento clínico e cirúrgico.

Os prontuários de 65 pacientes foram analisados, dos quais 47 (39 lesões de CEC e 8 de CV) foram selecionados para a pesquisa, de acordo com os critérios de inclusão/exclusão estabelecidos para este estudo. A análise dos prontuários forneceu os principais dados pertinentes a cada paciente, tais como, idade, sexo, raça, decisão de tratamento e laudo anatomopatológico final da peça cirúrgica. Os blocos parafinados foram resgatados no Setor de Anatomia Patológica do Hospital Araújo Jorge (HAJ) e novamente processados por meios histotécnicos e imunohistoquímicos para permitir as investigações deste estudo.

Todos os procedimentos para obtenção de material/tecido de origem humana foram aprovados pelo Comitê de Ética do Hospital das Clínicas da Faculdade de Medicina da UFG, e estão de acordo com as exigências da Comissão Nacional de Ética em Pesquisa (CONEP Protocolo CEPMHA/HC/UFG nº 121/04; Anexo A).

4.3 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO

Foram considerados aptos a integrar este estudo indivíduos que atendessem aos seguintes critérios:

- a) pacientes com tumor primário com diagnóstico de CEC ou CV confirmado por anatomopatológico nos seguintes sítios anatômicos: língua, soalho bucal, área retromolar, palato duro, mucosa jugal, gengiva e mucosa alveolar;
- b) indivíduos não submetidos a tratamento prévio;

- c) indivíduos submetidos à cirurgia como tratamento inicial, com ou sem radioterapia pós-operatória;
- d) tumores com estadiamento clínico I, II, III, e IV;
- e) indivíduo com acompanhamento clínico pós-cirurgia;
- f) fragmento de peça cirúrgica suficiente para análise microscópica e imunoistoquímica;
- g) disponibilidade do bloco de parafina;
- h) cortes microscópicos, corados previamente por hematoxilina e eosina (HE), apresentando estrutura morfológica e celular preservada.

4.4 EXCLUSÃO DE AMOSTRAGEM

Foram excluídos do grupo de amostragem os pacientes que:

- a) se submeteram à quimioterapia e/ou radioterapia prévias;
- b) e amostras com extensas áreas de necrose e/ou estrutura morfológica/celular não-preservada.

4.5 REGISTROS DOS DADOS DEMOGRÁFICOS E CLÍNICOS

Todas as informações pertinentes aos pacientes foram registradas em formulário próprio e adquiridas mediante consulta aos prontuários no setor de arquivos do HAJ-ACCG. Os dados obtidos incluíram a identificação e informações demográficas dos pacientes, além das informações referentes à anamnese como fatores de risco, história clínica, exame loco-regional, laudo anatomopatológico da peça cirúrgica, de acordo com a Organização Mundial

de Saúde (OMS, 1997), o procedimento cirúrgico realizado, os tratamentos complementares, a evolução e o acompanhamento do paciente (Anexo B).

4.6 GRUPO CONTROLE – MUCOSA NORMAL

Como controle da imunoreação dos marcadores de proliferação utilizados nesta pesquisa, em relação ao grupo de CEC e CV, o grupo controle (CT) foi elaborado a partir de nove amostras de tecido gengival de pacientes que foram atendidos no Serviço de Periodontia da Polícia Militar do Estado do Tocantins. Para todos os indivíduos havia indicação para ressecção de tecido gengival saudável durante cirurgia de aumento de coroa clínica. Assim, um fragmento de gengiva vestibular clinicamente saudável que seria descartado, foi encaminhado para as análises laboratoriais e, obedeceram aos princípios éticos que regem a pesquisa com seres humanos.

4.7 MÉTODOS EMPREGADOS PARA CARACTERIZAÇÃO MICROSCÓPICA DOS ESPÉCIMES

4.7.1 Técnica de coloração de rotina com hematoxilina e eosina (HE)

O bloco de parafina selecionado foi seccionado em micrótomo (Leica Rm2165), obtendo-se cortes de 5 μ m, que foram dispostos sobre lâminas histológicas e corados pelo método do HE. Todos os procedimentos histotécnicos foram realizados no Laboratório de

Patologia Bucal da FO-UFG e seguiram os protocolos operacionais de rotina do referido Laboratório.

A análise microscópica foi realizada em conjunto por dois examinadores treinados, ambos patologistas bucais por meio do microscópio - OLYMPUS-BX41.

4.7.2 Identificação e análise dos seguintes marcadores de proliferação celular: PCNA, Ki67 e ciclina B1

4.7.2.1 Técnica de imunistoquímica (IHQ)

As amostras selecionadas, incluídas em parafina, foram seccionadas em micrótomo (Leica RM2165). De cada bloco de parafina, foram obtidos cortes de 3 µm que foram colocados sobre lâminas silanizadas com 3-aminopropiltrietilsilano a 2% (Sigma Chemicals, St. Louis, MO, EUA) e submetidos à técnica imunistoquímica por meio de imunoperoxidase (streptavidina-biotina-peroxidase) para a identificação das moléculas PCNA, Ki67 e ciclina B1. Inicialmente, os cortes sobre as lâminas foram desparafinizados e hidratados por meio de: **1** — xilol, 3 vezes, 5 minutos cada vez; **2**— etanol absoluto, 3 vezes, 2 minutos cada vez; **3**— etanol etílico 95% 1 vez, 2 minutos; **4**— solução salina tamponada de Tris (TBS), Ph=7.2— 1 minuto. Em seguida, as lâminas foram incubadas em tampão citrato, pH=6.0 (SIGMA, P4809, Saint Louis – USA) aquecido a uma temperatura de 95°C, com auxílio de Banho Maria Digital (DeLeo), para exposição dos seguintes antígenos: PCNA, Ki67 e ciclina B1, por 20 minutos. Após lavagens com TBS, as lâminas foram mergulhadas em peróxido de hidrogênio (Merck) a 3% em solução salina tamponada (PBS), por 40 minutos, para o bloqueio da peroxidase endógena.

Após serem lavadas com TBS, as lâminas foram incubadas com soro de leite a 3% em água destilada (leite desnatado Molico®) por 20 minutos, a fim de se obter o bloqueio das

ligações protéicas inespecíficas. Em seguida, as lâminas foram secas e incubadas com os anticorpos primários, por 18 horas e mantidas na temperatura de 4°C. Os anticorpos que foram utilizados e suas respectivas diluições estão especificados no quadro 1. Todas as diluições foram realizadas utilizando PBS associado a soro-albumina bovina (PBS-BSA) a 1%. Após o período de 18 horas, realizaram-se as lavagens consecutivas e posteriormente a incubação com os anticorpos biotinizados anti-IgG de coelho/camundongo/cabra por 30 minutos, à temperatura de 22 a 25°C, seguidos pela incubação da streptoavidina marcada com peroxidase por 30 minutos, à temperatura ambiente (kit DAKO LSAB+, Peroxidase- Universal- K0690).

Posteriormente às lavagens consecutivas com TBS, procedeu-se à revelação da reação utilizando o 3.3'Diaminobenzidina (DAB) em uma solução cromogênica (DAKO, K3468), por 2 a 3 minutos, à temperatura ambiente e protegida da luz. A reação foi interrompida com água destilada e as lâminas contra-coradas com hematoxilina de Mayer, por 3 minutos, à temperatura ambiente. Após serem lavadas com água destilada por duas vezes, as lâminas foram desidratadas com álcoois (70, 95 e 100 GL), passadas em xilol (3 vezes) e montadas com solução de resina não aquosa (Entellan-Mikroskopie-Merck).

Os controles negativos das reações foram realizados mediante substituição dos anticorpos primários por PBS-BSA 1%, bem como por soro normal de camundongo (DAKO, X0910-1, Glostrup-Denmark), descartando assim possíveis falsos positivos.

Quadro 1 — Características dos anticorpos usados na detecção das proteínas PCNA, Ki67 e ciclina B1

Características dos anticorpos	PCNA	Ki67	Ciclina B1
Identificação	Anticorpos monoclonais de camundongo anti-PCNA humano	Anticorpos monoclonais de camundongo anti-Ki67 humano	Anticorpos monoclonais de camundongo anti-Ciclina B1 humano
Clone	PC10	MM1	7A9
Especificação	M 0879 - DakoCytomation	NCL-Ki67-MM1 – Novocastra	NCL- CYCLIN B1 -Novocastra
Diluição	1:2000	1:100	1:40

4.7.2.1.1 *Identificação e quantificação de células positivas*

A identificação e a quantificação de células positivas foram realizadas em todas as camadas dos epitélios de CEC, CV e grupo controle. Em uma segunda abordagem no grupo do CV, considerou-se apenas as camadas basal e parabasal que foram comparadas ao controle, que seguiu o mesmo método de contagem. A mensuração do índice de células PCNA positivas, Ki67 positivas (Ki67⁺) e ciclina B1 positivas (ciclina B1⁺) foi realizada por meio de análise morfométrica, utilizando microscópio óptico, contendo um retículo de integração em rede quadrada (CARL ZEISS-474068000000- Netzmikrometer 12.5x). Para esta contagem, utilizou-se a objetiva de 40 vezes.

Em cada amostra selecionada, as células epiteliais das camadas basais e suprabasais foram quantificadas em cinco campos microscópicos alternados. Registrou-se o número total de células epiteliais marcadas e o número total de células não-marcadas. Em seguida, foi calculado o seu índice, usando a seguinte fórmula: $P = C^+ / (C^+ + C^-)$, em que **P** = porcentagem, **C⁺** = Células positivas e **C⁻** = células negativas.

Todas as contagens foram realizadas por um único examinador previamente treinado e orientado.

4.7.2.1.2 *Identificação qualitativa de células positivas*

Avaliou-se, ainda, a distribuição da expressão dos marcadores PCNA, Ki67 e ciclina B1 nas camadas do epitélio, se basais e/ou parabasais, bem como a localização dessa expressão na célula, se nuclear ou citoplasmática.

4.7.3 Reação em Cadeia da Polimerase (PCR)

4.7.3.1 Obtenção das amostras

Para a abordagem molecular, foram obtidos de cada bloco cortes de 7 μ m dos blocos de parafina, incluindo a amostra tecidual dos 47 pacientes selecionados, para realizar a desparafinização, extração e amplificação de DNA por PCR.

4.7.3.2 Desparafinização dos blocos

Os filetes de parafina, contendo amostras de tecidos do 47 pacientes, foram desparafinados de acordo com o protocolo proposto por Nascimento *et al.* (2003) (Anexo G).

4.7.3.3 Extração de DNA

O material histológico já desparafinado foi submetido à extração de DNA com o Kit de purificação de DNA genômico Pure Gene[®]— Genra Systems, EUA, de acordo com as instruções do fabricante (Anexo G).

Reação em cadeia da polimerase

Todas as amostras que tiveram seu DNA extraído foram submetidas a reações de PCR utilizando-se *primers* genéricos GP5+/6+ para a detecção de qualquer HPV. O protocolo

usado foi adaptado de acordo com o protocolo proposto por Roda Husman *et al.* (1995) utilizando-se como volume final da reação 25µL, contendo aproximadamente 50 ng de DNA genômico, 10mM Tris-HCl, pH 8,3, 50mM KCL, 3,5 mM MgCl₂, 200 µM de cada dNTP, 0,2 U de Taq DNA Polimerase (Invitrogen®). As amostras só foram consideradas negativas para o HPV após serem submetidas a duas PCRs. As amostras positivas tiveram a PCR repetida para confirmação do resultado.

As amostras que apresentaram resultado negativo foram submetidas a um conjunto de *primers* que amplificam fragmentos de aproximadamente 92bp da região D8S135 do 8p,11, como controle interno da reação. As seqüências consenso dos *primers* utilizados no presente estudo encontram-se no Quadro 2. O protocolo de termociclagem da PCR encontra-se no anexo H.

Quadro 2 — Seqüências consenso dos *primers* utilizados para a amplificação de DNA de HPV mostrando o tamanho do fragmento amplificado

Tipos	Sentido	Seqüência 5' – 3'	Fragmento (pb)
GP 05+	F	TTT GTT ACT GTG GTA GAT ACT AC	147
GP 06+	R	GAA AAA TAA ACT GTA AAT CAT ATT C	147
D8S135	F	GGG AGG CTT TAT AAT TAT TTA GC	92
D8S135	R	CTG GGC AAC AGA GTG GGA C	92

Fontes: Roda Husman *et al.* (1995); Patel *et al.* (1994)., F = senso; R= anti-senso.

4.7.3.5 Análise dos amplicons

Para a análise dos produtos de PCR, o DNA foi submetido a eletroforese em campo elétrico constante de 10V/cm em gel de poliacrilamida 8% em TBE 1X. Para a visualização do DNA amplificado, o gel foi corado em solução de nitrato de prata. As imagens foram capturadas e analisadas pelo sistema de vídeo documentação Image Master — VDS® (Amersham Pharmacia Biotech, EUA, Anexo I).

4.8 ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados relativos aos índices de células positivas para os três marcadores (PCNA, Ki67, ciclina B1) foram submetidas à análise descritiva e comparação dos grupos CEC, CV e grupo controle. Em relação aos marcadores, a análise estatística foi realizada utilizando o programa SPSS® 14.0.0 para Windows® (Microsoft Corporation, EUA).

Os seguintes testes estatísticos foram aplicados neste trabalho:

- a) teste não-paramétrico Mann-Whitney, para analisar as diferenças na proliferação celular entre os grupos CEC, CV e CT por meio dos marcadores (PCNA, Ki67 e ciclina B1);
- b) teste não paramétrico de Krukal-Wallis, para analisar as diferenças entre os índices de proliferação celular de cada marcador com a gradação histológica;
- c) teste de correlação de Pearson, para verificar associação entre as imunexpressão de PCNA, Ki67 e ciclina B1;
- d) teste de correlação de Spearman para associação entre imunexpressão de PCNA, Ki67 e ciclina B1 e a gradação histológica;

O nível de significância (α) para os testes adotados foi fixado em 5%.

5 RESULTADOS

Os resultados foram demonstrados descritivamente, e também por meio de quadros (em anexos), tabelas e figuras (fotos e gráficos).

5.1 CARACTERIZAÇÃO CLÍNICA DO GRUPO AMOSTRAL

Para este estudo, foram selecionadas 47 amostras de carcinomas de boca, dos quais 39 eram de carcinomas espinocelulares (CEC) e 8 carcinomas verrucosos (CV). Nove amostras de tecido normal foram consideradas como grupo controle (CT). Nesta pesquisa, os CVs representaram 17% da amostra geral de carcinomas (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 – Distribuição dos carcinomas espinocelulares e carcinomas verrucosos quanto aos critérios de inclusão estabelecidos

Amostra	Pacientes (N)	%
Carcinomas espinocelulares	39	83,0
Carcinomas verrucosos	8	17,0

TOTAL	47	100,0
-------	----	-------

Fonte: Hospital Araújo Jorge de Goiânia; Anexos D e E.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DEMOGRÁFICA

A análise dos pacientes com CEC revelou uma maior incidência no sexo masculino, 77%. A idade mínima foi de 33 anos, e a máxima, de 90 anos (idade média de 60,7 e desvio padrão de 13,02). A maioria dos pacientes apresentava idade superior ou igual a 60 anos (51,3%), como pode ser observado na Tabela 5.2.

Os locais mais freqüentemente acometidos pelo CEC foram língua 33%, soalho bucal 28,3%, região retromolar 12,8% e 34% distribuíram-se entre rebordo alveolar, gengiva, mucosa jugal e região retromolar conforme Tabela 5.2.

Em relação ao carcinoma verrucoso (n=8), houve equilíbrio de casos entre os sexos masculino e feminino na proporção de 50% para ambos. A idade mínima foi de 49 anos e a máxima de 85 anos (idade média de 62,75 e desvio padrão de 13,5). A maioria dos pacientes apresentou idade superior ou igual a 50 anos (75%), como pode ser observado na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 – Descrição das características demográficas dos pacientes acometidos por carcinomas espinocelulares (CEC) e verrucosos (CV) segundo as características demográficas e localização da lesão

Características	(n) de CEC	% de CEC	(n) de CV	% de CV
Sexo				
Masculino	30	77,0	4	50,0
Feminino	9	23,0	4	50,0
Idade				
≤ 60 anos	19	48,7	2	25,0
> 60 anos	20	51,3	6	75,0
Localização da lesão				
Língua	13	33,0	2	25,0
Soalho bucal	11	28,3	-	-
Região retromolar	5	12,8	-	-
Palato duro	4	10,2	2	25,0
Rebordo alveolar	3	7,7	-	-
Mucosa jugal	2	5,2	4	50,0

Gengiva	1	2,5	-	-
Total	39	100,0	8	100,0

Fonte: Hospital Araújo Jorge de Goiânia; Anexos D e E.

O tabagismo (84,6%) e o etilismo (61,54%) foram os fatores de riscos constantemente observados na amostra estudada. Do total da amostra de CEC, seis indivíduos (15,40%) não eram tabagistas e nem etilistas, e do total de indivíduos tabagistas 24,25% não eram etilistas, e 15 indivíduos (38,46%) da amostra estudada não eram etilistas (Tabela 5.3).

Na amostra estudada, os locais mais freqüentes acometidos pelo CV foram de mucosa jugal (50%), de língua (25%), de palato duro e rebordo alveolar (25%) (Tabela 5.2).

O tabagismo e o etilismo foram os fatores de riscos observados na amostra de CV, (50% tabagistas e 25,% etilistas), conforme Tabela 5.3.

Do total da amostra, três indivíduos (37,5%) não eram tabagistas e nem etilistas e dos que eram tabagistas, 50% não eram etilistas. Cinco indivíduos (62,5%) da amostra estudada não eram etilistas de acordo com Tabela 5.3.

Tabela 5.3 – Distribuição de freqüência dos pacientes acometidos por carcinomas espinocelulares (CEC) e verrucosos (CV) segundo os fatores de risco

Características	(n) de CEC	% de CEC	(n) de CV	% de CV
Tabagismo				
Sim	33	77,00	4	50,00
Não	6	23,00	4	50,00
Etilismo				
Sim	24	61,50	3	62,50
Não	15	38,50	5	37,50
Tabagismo + etilismo				
Sim	25	64,10	2	25,00
Não	6	15,40	6	75,00
Apenas Tabaco	8	20,50	-	-
Total	39	100,0	8	100,00

Fonte: Hospital Araújo Jorge de Goiânia; anexos D e E.

O exame físico dos pacientes com base no sistema TNM, considerando o T, permitiu a seguinte observação (**n — %**). Os tumores classificados como Tis (1-2,56%) , T1 (5-12,80%), T2 (11-28,20%), T3 (10-25,64%), T4 (12- 30,80%). Quanto aos linfonodos regionais (N), a distribuição foi: N0 (33-84,60%), N1 (3-7,70%), N2 (2-5,10%) e N3(1-2,60%). Verificou-se que nenhum desses pacientes apresentou metástases, portanto todos foram considerados M0. Quanto ao grau de anaplasia, os resultados foram: grau I, com 10,25%; grau II, 28,25%; grau III , 41%; grau IV, 20,50%, conforme Tabela 5.4.

A análise clínica dos pacientes com CV revelou, no momento do diagnóstico, os seguintes estadiamentos clínico. Em relação ao estadiamento T, os pacientes apresentavam tumores classificados como T_x (5-62,50%), T3 (2-25%), T4 (1-12,5%). Quanto aos linfonodos regionais e as metástases dos que foram classificados, todos tiveram como resultado N₀M₀. Clinicamente, 100% dos CVs apresentaram aspecto úlcero-vegetante. No tocante ao grau de anaplasia, os resultados foram: o grau I, 87,5%; grau II, 12,50% (Tabela 5.4).

Tabela 5.4 – Distribuição de freqüência dos pacientes acometidos por carcinomas espinocelulares (CEC) e verrucosos (CV) segundo as características clínicas da lesão, estadiamento e grau de malignidade de acordo com a OMS

Características	(n) de CEC	% de CEC	(n) de CV	% de CV
Tipo de lesão				
Úlcero-vegetante	30	77,0	8	100,0
Úlcero-infiltrativa	9	23,0	-	-
Estadiamento T				
T _x	-	-	5	62,5
Tis	1	2,56	-	-
T1	5	12,80	-	-
T2	11	28,20	-	-
T3	10	25,64	2	25,0
T4	12	30,80	1	12,5
Estadiamento N				
N0	33	84,60	-	-
N1	3	7,70	-	-
N2	2	5,10	-	-
N3	1	2,60	-	-
Grau de malignidade				
Grau I	4	10,25	7	87,5

Grau II	11	28,25	1	12,5
Grau III	16	41,00	-	-
Grau IV	8	20,50	-	-
Total	39	100,0	8	100,0

Fonte: Hospital Araújo Jorge de Goiânia; Anexos D e E. Fonte – Laboratório de Patologia do HAJ-ACCG; Anexos D e E.

De acordo com os critérios de inclusão dos pacientes no estudo, 100% foram submetidos à cirurgia como tratamento inicial do carcinoma espinocelular e 56,40% receberam tratamento coadjuvante com radioterapia. Não houve indicação para tratamento com quimioterápicos dos pacientes (Tabela 5.5).

Em relação ao grupo do CV, 100% foram submetidos à cirurgia como tratamento inicial do carcinoma verrucoso. Em apenas um caso (12,50%), houve tratamento coadjuvante com radioterapia. A quimioterapia não foi utilizada em nenhum dos pacientes (Tabela 5.5).

Tabela 5.5 — Distribuição de frequência dos pacientes acometidos por carcinomas espinocelulares (CEC) e verrucosos (CV) segundo os tratamentos utilizados

Características	(n) de CEC	% de CEC	(n) de CV	% de CV
Cirúrgico				
Sim	39	100,0	8	100,0
Não	-	-	-	-
Radioterapia				
Sim	24	56,40	1	12,5
Não	15	43,40	7	87,5
Quimioterapia				
Sim	-	-	-	-
Não	39	100,0	-	-
Total	39	100,0	-	100,0

Fonte: Hospital Araújo Jorge de Goiânia; anexos D e E.

De acordo com os critérios de sobrevida e o número de óbitos, a média de sobrevida dos pacientes com CEC foi de quatro anos, com máxima de 131 meses e mínima de quatro meses. Os dados foram colhidos somente em 31 pacientes, uma vez que 8 deles não foram localizados. Quanto aos óbitos foram dez, oito estão vivos e vinte não foram localizados.

Já para as amostras de CVs, a média de sobrevida foi de 24 meses (dois anos). Sete pacientes (87,5%) estão vivos e um paciente (12,5%) foi a óbito na cirurgia (Tabela 5.6).

Tabela 5.6 – Distribuição de frequência dos pacientes acometidos por carcinomas espinocelulares (CEC) e verrucosos (CV) segundo a sobrevida

Características	(n) de CEC	% de CEC	(n) de CV	% de CV
Tempo de acompanhamento				
Média	4 anos		2 anos	
≤ 5 anos	19	48,71	8	100,0
> 5 anos	12	30,71	-	-
Perdidos	8	20,58		
Óbitos				
Sim	10	25,64	1	12,5
Não	29	74,36	7	87,5
Total	39	100,0	8	100,0

Fonte: RCBPG – Registro de câncer de base populacional de Goiânia e HAJ-ACCG (2006).

5.3 ANALISE QUALITATIVA DAS IMUNOMARCAÇÕES NAS AMOSTRAS DE CARCINOMAS ESPINOCELULAR, VERRUCOSO E GRUPO CONTROLE

A análise qualitativa das células positivas (PCNA⁺, Ki67⁺, ciclina B1⁺) nas amostras estudadas demonstrou que houve diferenças nas marcações. O PCNA e o Ki67 expressaram-se no núcleo das células, ao passo que a expressão da ciclina B1 ocorreu no citoplasma (Figuras 7, 8 e 9).

Em relação à localização da expressão dos marcadores, nas diferentes camadas do epitélio, foi observado, no grupo do CEC, que as proteínas Ki67, ciclina B1 e PCNA se

apresentavam distribuídas tanto nas camadas da base como próximo dela e nas camadas superficiais.

No grupo CV, observou-se, diferentemente do grupo CEC, que a expressão das proteínas Ki67 e ciclina B1 se limitava às camadas basal e parabasal, ao passo que o PCNA avançou em outras camadas. O mesmo comportamento foi verificado nas amostras do grupo controle, no qual a ciclina B1 e o Ki67 se expressaram nas camadas basal e parabasal com o PCNA distribuído-se por todo epitélio.

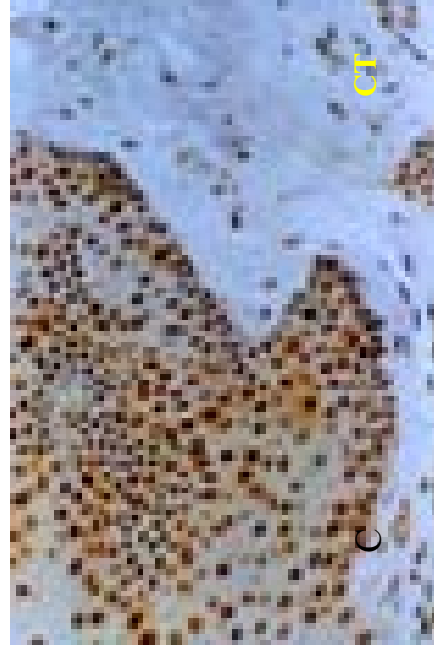
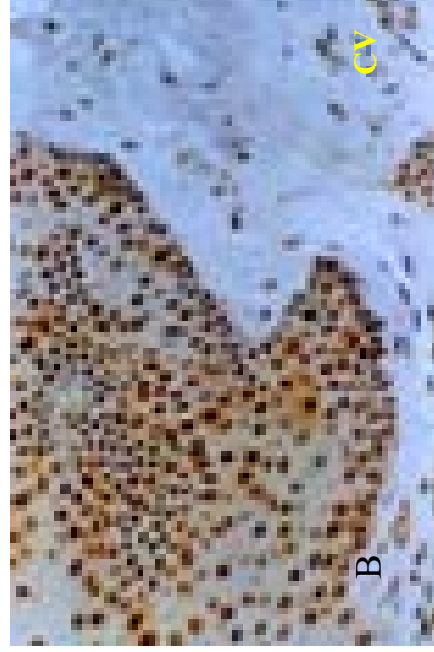
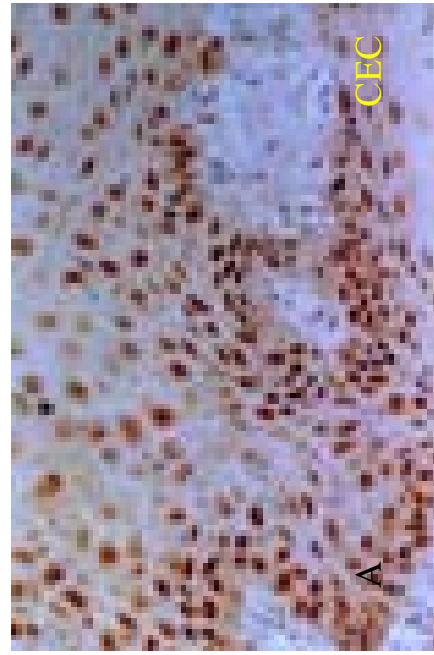


Figura 7 — Células PCNA⁺ presentes no carcinoma espinocelular (A), no carcinoma verrucoso (B) e no tecido bucal clinicamente saudável (C). As fotomicroscopias A, B e C demonstram a intensa marcação nuclear da proteína PCNA em todas as camadas epiteliais (A, B e C – Imunoistoquímica, aumento original de 100 vezes)

Fonte : José Vieira de Spíndula Filho, 2006.

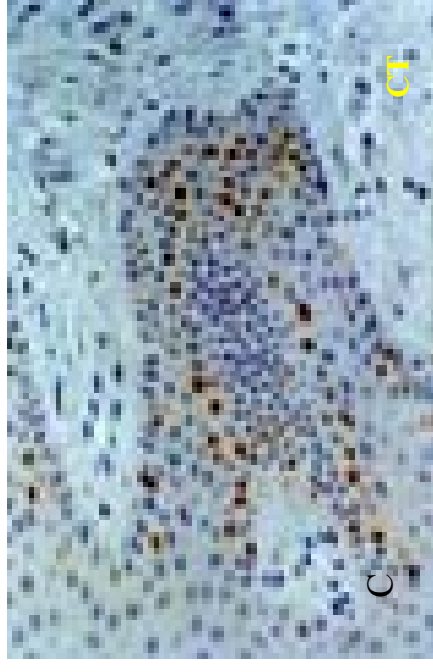
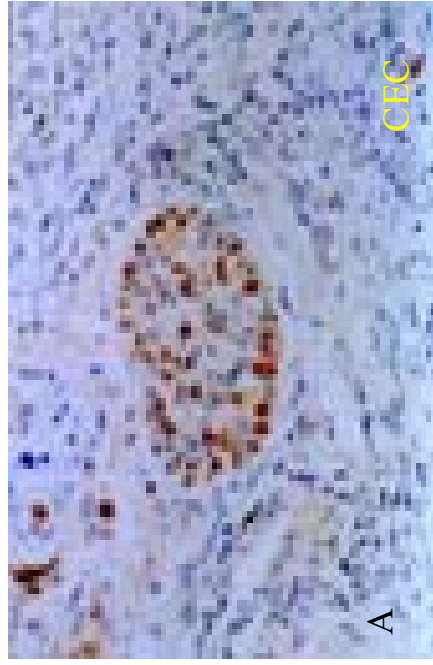


Figura 8 — Células Ki67⁺ presentes no carcinoma espinocelular (A), no carcinoma verrucoso (B) e no tecido bucal clinicamente saudável (C). Na fotomicroscopia A observa-se uma intensa marcação nuclear distribuída em todas camadas epiteliais. As fotomicroscopias B e C ilustram uma intensa marcação nuclear da proteína Ki67 nas camadas basal e parabasal do epitélio (A, B e C – Imunoistoquímica, aumento original de 100 vezes, respectivamente)

Fonte: José Vieira de Spíndula Filho, 2006.

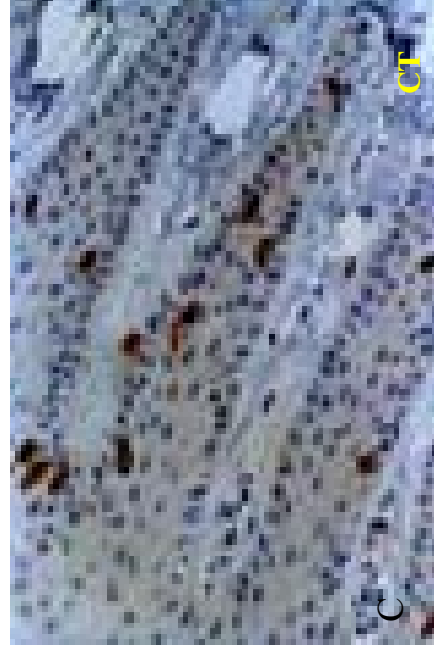
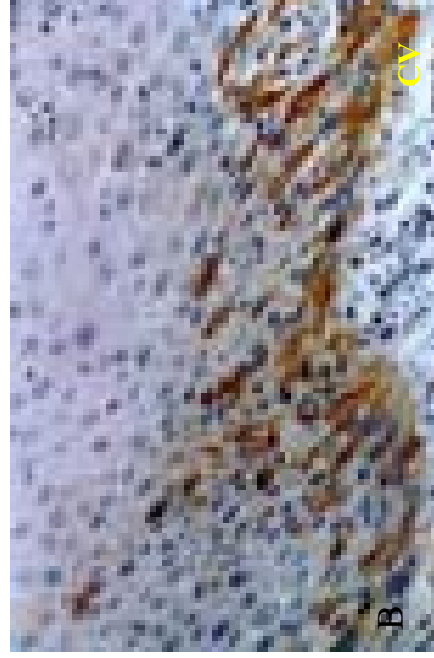
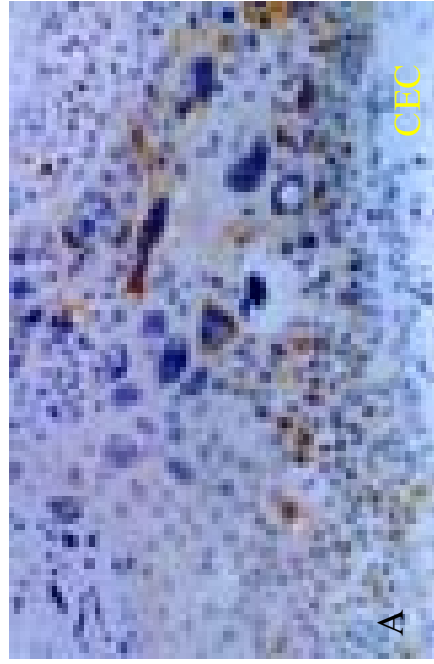


Figura 9 — Células ciclina B1⁺ presentes no carcinoma espinocelular (A), no carcinoma verrucoso (B) e no tecido bucal clinicamente saudável (C). Na fotomicroscopia A verifica-se forte marcação citoplasmática com distribuição em todas camadas epiteliais. As fotomicroscopias B e C ilustram a intensa marcação citoplasmática da proteína ciclina B1 nas camadas basal e parabasal epiteliais (A, B e C – Imunoistoquímica, aumento original de 100 vezes, respectivamente)

Fonte: José Vieira de Spíndula Filho, 2006.

5.4 QUANTIFICAÇÃO DA IMUNOEXPRESSIONO DOS MARCADORES DE PROLIFERAÇÃO CELULAR PCNA, Ki67, E CICLINA B1 NOS GRUPOS DE CARCINOMAS ESPINOCELULARES, VERRUCOSOS E CONTROLE – MUCOSA NORMAL (CAMADAS BASAL, PARABASAL E ESPINHOSA)

Em relação à imunoexpressão das proteínas no CEC de boca, a média de expressão do PCNA foi de 76,2%, do Ki67 de 26,95% e da ciclina B1 de 10,44%. As medianas encontradas foram 80,5%, 24,72% e 9,4% respectivamente. A imunoexpressão de PCNA variou de 28,3% a 100%, para o Ki67, de 13,03% a 81,23% e para ciclina B1, 3,5% a 22,39%. Em relação as imunoexpressão das proteínas no CV de boca, a média de expressão do PCNA foi de 93,4%, do Ki67, de 30,5%, e da ciclina B1, de 5,5%. As medianas encontradas foram 96,8%, 25,9% e 4,9%, respectivamente. A imunoexpressão de PCNA variou de 82,3% a 98,7%, para o Ki67 de 13,73% a 49,01% e para ciclina B1 de 1,8% a 9,6%. Já em relação as imunoexpressão das proteínas no controle, a média de expressão do PCNA foi de 100%, do Ki67, de 89,3%, e da ciclina B1, de 19,9%. As medianas encontradas foram 100%, 89,9% e 18,4%, respectivamente. A imunoexpressão de PCNA foi constante em 100%, para o Ki67 foi de 4,2% a 13,7% e para ciclina B1 foi 0,9% a 3,5% (Tabela 5.7¹; Figura 10).

Tabela 5.7 – Análise quantitativa dos resultados da imunoexpressão de PCNA, Ki67, ciclina B1 nos grupos CEC, CV e controle (contagem de células positivas em todas camadas)

Diagnóstico (n° de amostra)	PCNA %	Ki67 %	Ciclina B1 %
Grupo CEC (39)*	76,2± 19,4	26,9±12,4	10,4±4,6
Grupo CV (8)**	93,4 ± 6,4	30,5±14,3	5,5±2,6
Grupo CT (9)***	100,0	8,9±3,4	1,99±0,8

*CEC: carcinoma espinocelular; **CV: carcinoma verrucoso; ***CT: controle.

Resultados são expressos em porcentagem para células positivas (±95% de intervalo de confiança).

5.5 COMPARAÇÃO ENTRE AS IMUNOEXPRESSIONO DE PCNA, KI67 E CICLINA B1 ENTRE OS GRUPOS DE CARCINOMAS ESPINOCELULARES, VERRUCOSOS E GRUPO CONTROLE (CAMADAS BASAL, PARABASAL E ESPINHOSA)

A imunoexpressão do PCNA foi maior no grupo controle (CT) tanto em relação ao grupo CV, quanto em relação ao grupo CEC ($p < 0,05$). Em relação ao Ki67, a imunoexpressão foi maior no CV, mas não foi observada diferença estatisticamente significativa ($p = 0,5$), quando comparado ao grupo CEC. Já em comparação ao grupo CT, houve diferença estatisticamente significativa deste com o CEC e com o CV. Em relação a imunoexpressão da ciclina B1, foi maior no grupo CEC no tocante ao grupo CV ($p < 0,05$), e também em relação ao grupo CT ($p < 0,05$) (Tabela 5.8¹ e Figura 10).

Tabela 5.8 – Teste Mann-Whitney para comparações entre a imunoexpressão de PCNA, Ki67, ciclina B1 nos grupos CEC, CV e CT

Diagnóstico	n	PCNA %	N	Ki67 %	n	Ciclina B1 %
Grupo CEC*	37	19,12	39	28,95 ^a	35	27,00
Grupo CV**	8	34,00	7	26,57 ^a	8	11,13
Grupo CT***	9	41,50	9	5,22	9	5,00

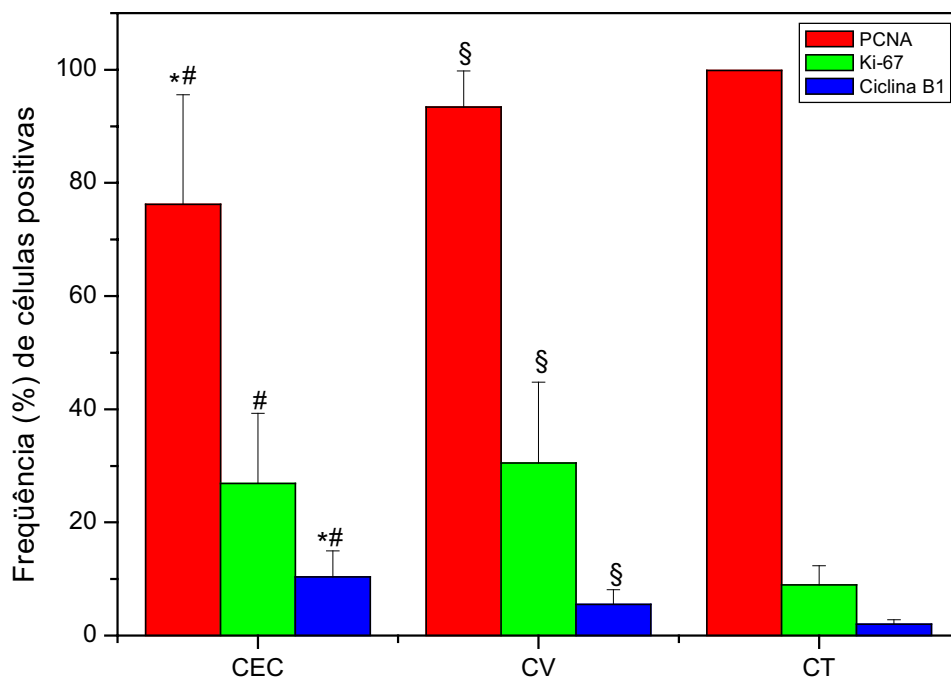
CEC* e CT*** com $p < 0,05$; CEC* e CV** com $p < 0,05$, exceto para Ki67^a $p > 0,05$, n=número de amostras que expressaram as proteínas. Os resultados foram em postos médios e expresso em porcentagem.

5.6 COMPARAÇÃO ENTRE A IMUNOEXPRESSIONO DE PCNA, KI67 E CICLINA B1 ENTRE OS GRUPOS CARCINOMAS VERRUCOSOS E CONTROLE (CAMADAS BASAL, PARABASAL E ESPINHOSA)

A imunopressão do Ki67 e da ciclina B1 foi maior no grupo do CV em relação ao grupo controle (CT), com $p < 0,05$, ao passo que a imunopressão do PCNA foi maior no CT do que no CV, com $p < 0,05$ (tabela 5.9¹ e figura 10).

Tabela 5.9 — Teste Mann-Whitney para comparações entre a imunopressão de PCNA, Ki67, ciclina B1 no grupo CV e no grupo controle (camadas basal e suprabasal)

		N	Posto-médio	Valor-p
PCNA	CV.	8	4,50	$p < 0,05$
	Controle	9	13,00	
Ki67	CV.	7	12,86	$p < 0,05$
	Controle	9	5,11	
ciclina B1	CV.	8	12,88	$p < 0,05$
	Controle	9	5,55	



Observações:

* Representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos CEC e CV com $p < 0,05$.

Representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos CEC e CT com $p < 0,05$.

§ Representa diferença estatisticamente significativa entre os grupos CV e CT com $p < 0,05$.

Figura 10 — Porcentagens (média \pm d.p.) de células PCNA⁺, Ki67⁺ e ciclina B1⁺ nos três grupos avaliados: carcinoma espinocelular (CEC), carcinoma verrucoso (CV) e controle (CT). Não há diferença estatisticamente significativa entre os grupos CEC e CV para células Ki67⁺, entretanto para as células PCNA⁺ e ciclina B1⁺ ocorreu diferença estatisticamente significativa (Mann-Whitney com $p < 0,05$). Com relação aos grupos CEC e CV, considerando a porcentagem de células PCNA⁺, Ki67⁺ e ciclina B1⁺, houve diferença estatisticamente significativa quando comparado ao grupo CT (Mann-Whitney com $p < 0,05$)

¹As tabelas 5.7, 5.8, 5.9 foram construídas com base nos dados constantes do anexo I

5.7 COMPARAÇÃO ENTRE A IMUNOEXPRESSION DE PCNA, KI67 E CICLINA B1 ENTRE OS GRUPOS DE CARCINOMAS VERRUCOSOS E GRUPO CONTROLE (CONSIDERANDO APENAS AS CAMADAS BASAL E PARABASAL)

Em relação ao CV, à imunoexpressão das proteínas, foram consideradas apenas camadas basal e parabasal, a média de expressão do PCNA foi de 99,17%, do Ki67, de 56,52% e ciclina B1, de 17,6%. As medianas encontradas foram 99,44%, 64,92% e 13,13%, respectivamente. O maior desvio padrão foi encontrado para proteína Ki67 (Tabela 5.10).

Tabela 5.10 — Média, mediana e desvio-padrão para imunoexpressão de PCNA, Ki67, ciclina B1 em carcinomas verrucosos de boca (camadas basal e parabasal)

	<i>PCNA</i>	<i>Ki67</i>	<i>ciclina B1</i>
Média	99,17	56,52	17,6
Mediana	99,44	64,92	13,13
Desvio-padrão	$\pm 0,9$	$\pm 20,7$	$\pm 11,5$

Em relação à imunoexpressão das proteínas no grupo controle, a média de expressão do PCNA foi de 100%, do Ki67 foi de 13,04%, e da ciclina B1 foi de 3,69%. As medianas encontradas foram 100%, 12,05%, 3,02% respectivamente. Quanto ao desvio-padrão, o PCNA apresentou zero, o Ki67 teve 4,4% e a ciclina 1,6% (Tabela 5.11).

Tabela 5.11 – Média, mediana e desvio-padrão para imunopressão de PCNA, Ki67, ciclina B1 no grupo controle (camadas basal e parabasal)

	<i>PCNA</i>	<i>Ki67</i>	<i>ciclina B1</i>
Média	100	13,04	3,69
Mediana	100	12,05	3,02
Desvio-padrão	±0	±4,4	±1,6

As imunopressão do Ki67 e ciclina B1 foram maiores no grupo do CV em relação ao grupo controle ($p < 0,05$), ao passo que para a imunopressão do PCNA foi maior no grupo controle do que no CEC ($p < 0,05$) (Tabela 5.12).

Tabela 5.12 – Teste Mann-Whitney para comparações entre imunopressão de PCNA, Ki67, ciclina B1 no grupo CV e no grupo controle (camada basal e parabasal)

		N	Posto-médio	Valor-p
PCNA	CV.	8	6,19	$p < 0,05$
	Controle	9	11,50	
Ki67	CV.	7	13,00	$p < 0,05$
	Controle	9	5,00	
ciclina B1	CV.	8	13,25	$p < 0,05$
	Controle	9	5,22	

5.8 CORRELAÇÃO DA IMUNOEXPRESSÃO DE PCNA, KI67 E CICLINA B1 NOS TRÊS GRUPOS, CARCINOMAS ESPINOCELULARES, VERRUCOSOS DE BOCA E GRUPO CONTROLE

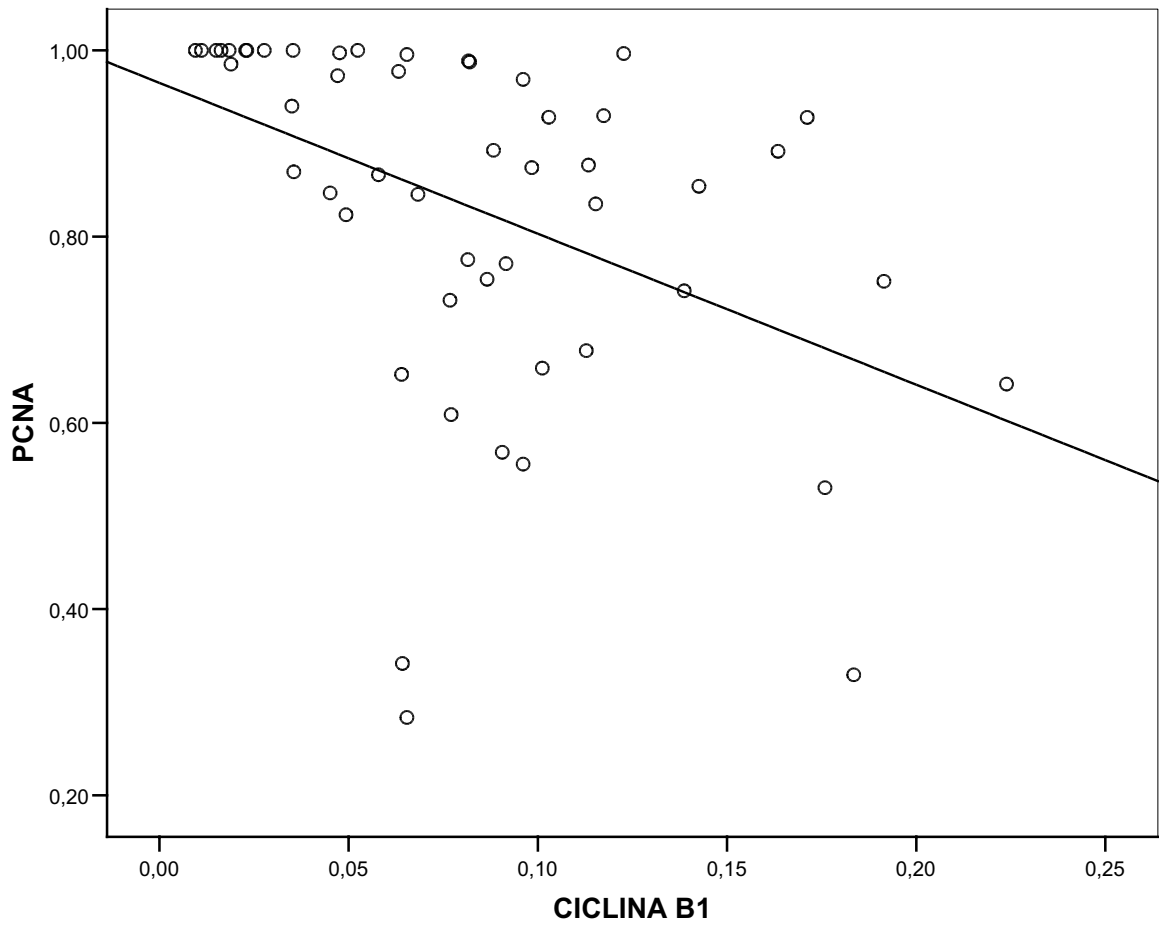
Quando comparados os três marcadores, o teste de correlação de Pearson mostrou que não houve correlação entre os valores de PCNA e Ki67 ($r = 0,17$ e $p = 0,217$). Entretanto, houve correlação negativa entre PCNA e ciclina B1, com os seguintes valores ($r = -0,044$ e $p < 0,05$), ao

passo, que entre Ki67 e ciclina B1 houve correlação positiva ($r=0,56$ e $p < 0,05$), (Tabela 5.13 e Figuras 11 e 12).

Tabela 5.13 – Teste de correlação de Pearson para associação entre a imunexpressão de PCNA, Ki67, ciclina B1 considerando todos os grupos

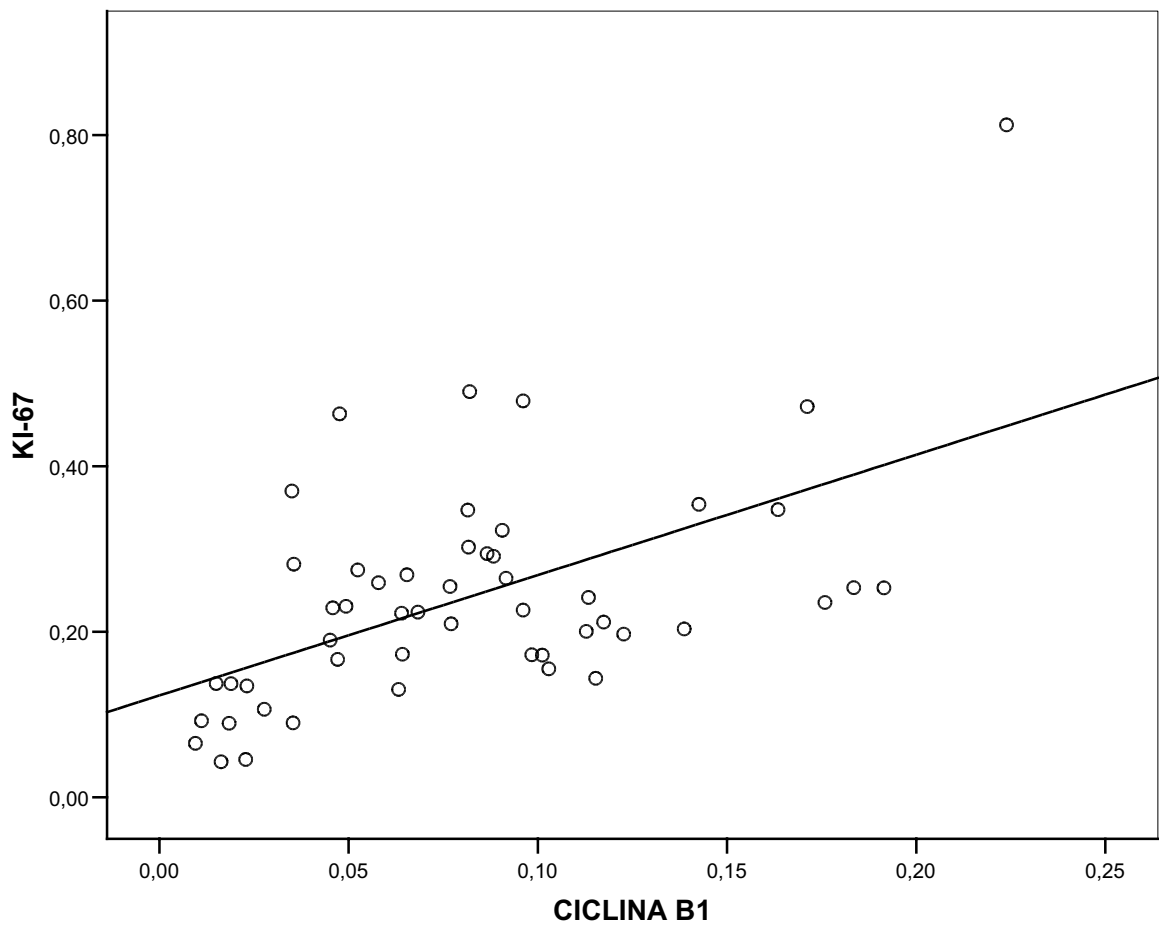
		PCNA	Ki67	ciclina B1
PCNA	r	1	-0,172	-0,440**
	p		0,217	0,001
	n	54	53	51
Ki67	r	-0,172	1	0,557**
	p	0,217		0,000
	n	53	55	51
ciclina B1	r	-0,440**	0,557**	1
	p	0,001	0,000	
	n	51	51	52

** $p < 0,05$. No qual r = coeficiente de correlação de Pearson, p = valor de probabilidade, n = número de amostra.



Teste de correlação de Pearson, $r=-0,44$ e $p=0,001$

Figura 11 — Correlação entre as células PCNA⁺ e ciclina B1⁺ nas amostras de carcinoma espinocelular (CEC), carcinoma verrucoso e controle (CT)



Teste de correlação de Pearson, $r=0,56$ e $p=0,0001$

Figura 12 — Correlação entre as células $Ki67^+$ e ciclina $B1^+$ nas amostras de carcinoma espinocelular (CEC), carcinoma verrucoso e controle (CT)

5.9 CORRELAÇÃO DA IMUNOEXPRESSÃO DE PCNA, KI67 E CICLINA B1 COM A GRADAÇÃO HISTOLÓGICA DO TUMOR DE ACORDO COM A ORGANIZAÇÃO MUNDIAL DA SAÚDE (OMS)

Para correlacionar a gradação histológica aos marcadores foram considerados todos os carcinomas (Tabela 5.14).

Tabela 5.14 – Distribuição da gradação histológica nos grupos do CEC e CV

Gradação histológica	CEC	CV	TOTAL
Grau I	4	7	11
Grau II	11	1	12
Grau III	16	-	16
Grau IV	8	-	8
Total	39	8	47

De acordo com a Tabela 5.15, por meio do teste de Kruskal-Wallis, percebeu-se que apenas a ciclina B1 foi estatisticamente associada à gradação histológica ($p=0,04$). Já na Tabela 5.16 por meio do teste de correlação de Spearmans, verificou-se que quanto mais indiferenciado o tumor, maior a expressão da ciclina B1 (Tabela 5.16 e figura 13).

Tabela 5.15 – Teste de Kruskal Wallis para comparações das imunoexpressão de PCNA, Ki67 e ciclina B1 com a gradação histológica

MARCADOR	GRADAÇÃO	N	POSTO-MÉDIO
PCNA ($p=0,15$)	Grau I	10	30,20
	Grau II	12	22,08
	Grau III	16	22,31
	Grau IV	7	15,86
	TOTAL	45	
Ki67 ($p=0,7$)	Grau I	10	19,50
	Grau II	12	25,92
	Grau III	16	23,88
	Grau IV	8	24,13
	TOTAL	46	
Ciclina B1 ($p=0,04$)	Grau I	11	14,55
	Grau II	11	19,95

Grau III	14	25,43
Grau IV	7	30,07
TOTAL	43	

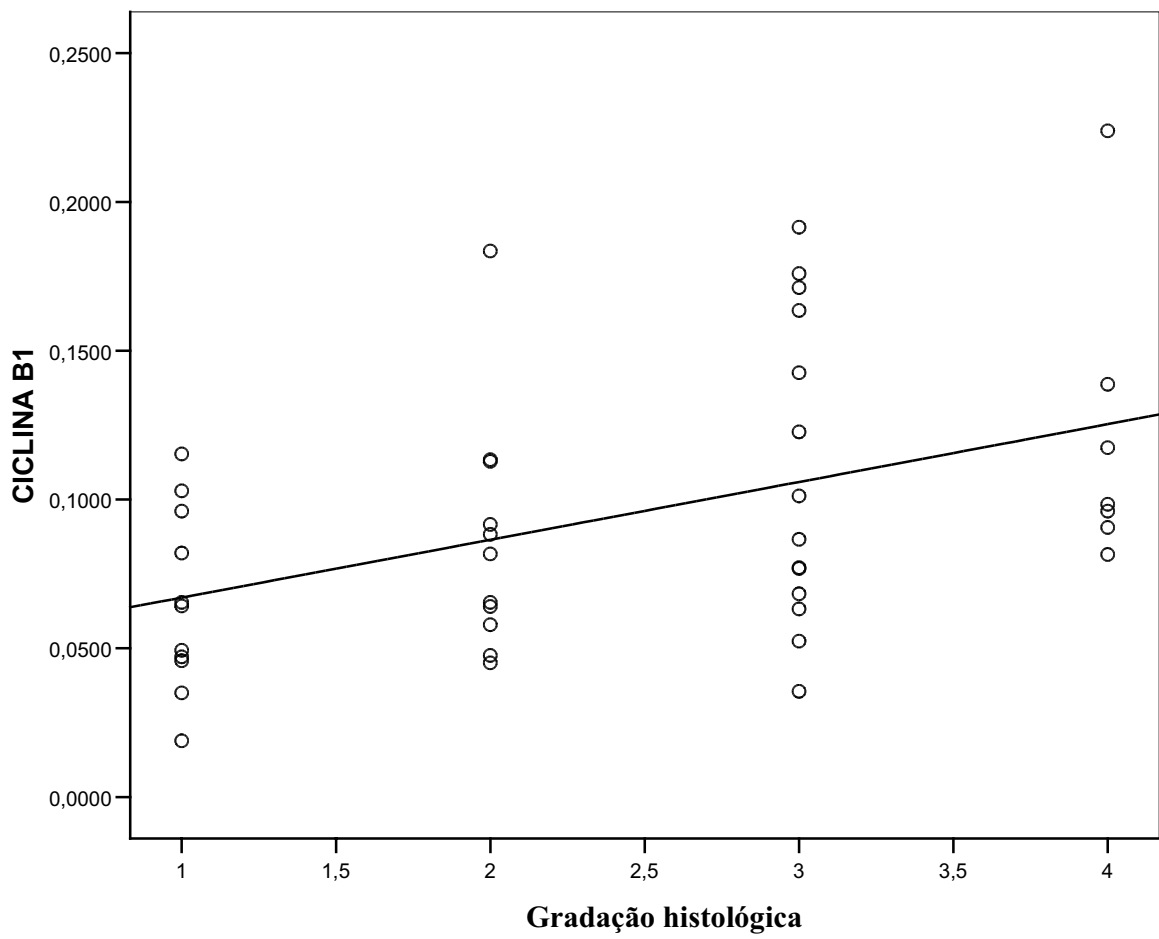
Tabela 5.16 – Teste de correlação de Spearmans para associação entre imunexpressão de PCNA, Ki67, ciclina B1 dos carcinomas com a gradação histológica

Marcador		Gradação histológica
PCNA	r	-0,305*
	p	0,042
	n	45
Ki67	r	0,84
	p	0,579
	n	46
Ciclina B1	r	0,439**
	p	0,003
	n	43

* A correlação é significativa até o nível 0,05.

** A correlação é significante até o nível 0,05.

Em que r = coeficiente de correlação de Spearmans, p = valor de probabilidade, n= número de amostra

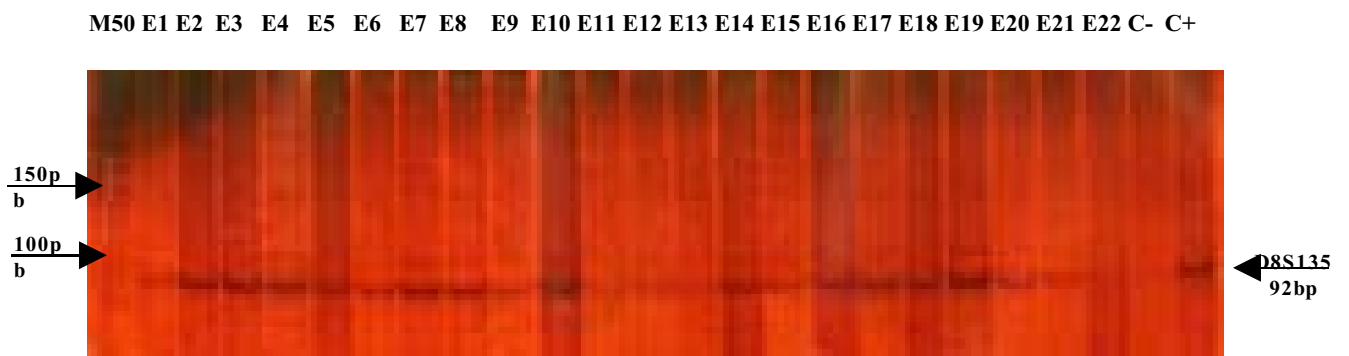


Teste de correlação de Spermans, $r=0,44$ e $p=0,003$.

Figura 13 — Correlação entre células ciclina B1⁺ e a gradação histológica nas amostras de carcinoma espinocelular (CEC), carcinoma verrucoso e controle (CT)

5.10 IDENTIFICAÇÃO DE HPV NAS AMOSTRAS PESQUISADAS DOS GRUPOS DE CEC E CV

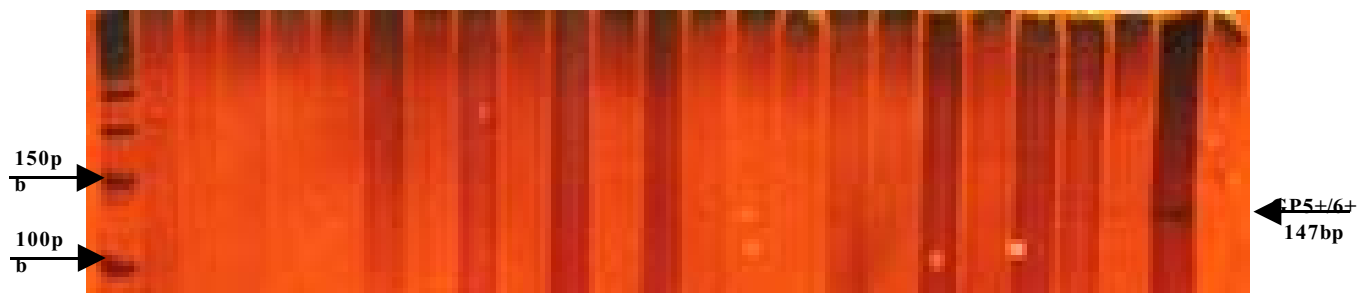
A identificação de HPV nas amostras pesquisadas de CEC e CV foi negativa. Foram analisadas 39 amostras do grupo de CEC, e 6 do grupo de CV. Todas elas passaram por PCR com *primers* genéricos GP5+/6+, e não se verificou nenhuma amostra positiva (Figura 15). A comprovação da PCR foi feita pelo controle positivo (C+) de uma amostra de colo de útero com HPV⁺. Como o resultado foi negativo para HPV, todas as amostras foram submetidas a uma PCR com o *primer* D8135S para detectar a viabilidade (ácido desoxirribonucléico) do DNA humano extraído. O resultado foi positivo para todas as amostras extraídas (Figura 14).



Legenda: E: Carcinoma espinocelular; V: Carcinoma verrucoso; C- : Controle negativo; C+ : Controle Positivo; M50: Marcador de peso molecular de 50pb.

Figura 14 — Gel de poliacrilamida a 8% contendo produtos de amplificação corados por nitrato de prata (1,5%), utilizando os *primers* D8S135 para confirmação da presença de DNA humano na amostra biológicas analisadas

M50 V1 V2 V3 V4 V5 V6 E1 E2 E3 E4 E5 E6 E7 E8 E9 E10 E11 E12 E13 E14 E15 E16 C+ C-



Legenda — E: Carcinoma espinocelular; V: Carcinoma verrucoso; C- : Controle negativo; C+: Controle Positivo; M50: Marcador de peso molecular de 50pb.

Figura 15 — Gel de poliacrilamida a 8% contendo produtos de amplificação corados por nitrato de prata (1,5%), utilizando os *primers* GP5+/6+ para a detecção do genoma viral de HPV nas amostras de carcinomas de cavidade bucal

DISCUSSÃO

O carcinoma espinocelular de boca apresenta-se como a neoplasia mais freqüente da cavidade bucal. Geralmente, a língua é o local mais afetado, seguido pelo soalho bucal. O carcinoma verrucoso é considerado uma variante rara do CEC bem diferenciado, uma vez que apresenta uma evolução clínica com algumas características comuns às lesões benignas. Chama a atenção o crescimento lento, o padrão evolutivo mais expansivo do que invasivo e alto grau de diferenciação celular (ACKERMAN, 1948; RAJENDRAN *et al.*, 1988).

Neste estudo, verificou-se que das 47 amostras selecionadas, 8 eram de CV, o que representou 17% da amostra total (Tabela 5.1). Comparando com a literatura, notam-se

freqüências com valores bem menores ao encontrado e que variaram de 0,6% a 10% (BOUQUOT; MORGANTOWN, 1998; CHAGÍN, 2000; KOCH *et al.*, 2001; OLIVEIRA *et al.*, 2006). Entretanto, deve-se levar em conta que o grupo total de carcinomas selecionados é um pequeno em relação ao universo do total de CEC presentes no estado de Goiás.

No presente estudo, o gênero masculino representou 76,9% (30) dos casos de CEC (Tabela 5.2) e 23,1% (9) eram do gênero feminino, e esses dados estão de acordo com a literatura (HASSAN *et al.*, 2001). Nos casos de CVs, houve um equilíbrio (Tabela 5.2) entre os sexos masculino e feminino (1:1). Na literatura, o índice relativo ao gênero masculino, em dez amostras de CV, é maior (60%) (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

A idade média dos pacientes nos casos de CEC foi de 60,7 anos, correspondendo à faixa etária de 60 a 70 anos, mais freqüentemente relatada por outros pesquisadores (KUSHNER *et al.*, 1999; HASSAN *et al.*, 2001; CARVALHO *et al.*, 2001). A idade média encontrada para o CV foi de 62 anos e esse resultado também é corroborado por outros autores (RAJENDRAN *et al.*, 1988; CHAGÍN, 2000; OLIVEIRA *et al.*, 2006).

No CEC, a localização preferencial foi a língua (13 casos; 33,3%) seguida pelo soalho de boca com 28,2% dos casos e o restante (38,5%) distribuído nas outras regiões anatômicas (região retromolar, gengiva, palato duro, mucosa bucal e rebordo alveolar), o que está de acordo com a literatura (MOORE; CATLIN, 1967; JOVANIC *et al.*, 1993; CARVALHO *et al.*, 2001; NEVILLE; DAY., 2002). Para o CV, o sítio de maior ocorrência foi à mucosa jugal (4 casos; 50%), dois (25%) casos ocorreram na língua, e outros dois simultaneamente no palato duro e rebordo alveolar (25%). Estes dados são semelhantes aos obtidos por Rajendran *et al.* (1988) que encontraram uma maior freqüência de CV na mucosa jugal .

Quanto aos fatores de riscos, o consumo de tabaco destacou-se em 84,6% dos indivíduos portadores de CEC, e o de etanol em 61,5% (Tabela 5.3). Esses resultados só realçam as informações científicas, segundo as quais os produtos do tabaco, como o benzeno, e os do etanol, como o etanol, são agentes oncoiniciadores e oncopromotores, respectivamente, no processo da carcinogênese bucal. Outros autores também encontraram alta prevalência desses fatores de riscos em suas pesquisas (PINTO *et al.*, 1998; CARVALHO *et al.*, 2001; INCA, 2006; MASSANO *et al.*, 2006). Nos casos de CV, o consumo de tabaco apareceu em 50%, e o etanol teve 37,5% de incidência (Tabela 5.3). Este resultado foi considerado um pouco maior que os obtidos por Oliveira *et al.*, (2006) que, em um número mais expressivo de amostra, encontrou uma prevalência menor de fumantes (35%). Entretanto, Chagín (2000) observou uma prevalência superior, cerca de 81,25%, em um número semelhante de casos. Esses dados reforçam os argumentos acerca dos efeitos produzidos pela fumaça do tabaco serem agentes iniciadores de lesões malignas de cavidade bucal, tanto nos casos de CECs quanto nos CVs.

No grupo do CEC, 77% (30) das lesões foram classificadas com aspecto clínico úlcero-vegetante e 23% (9), com aspecto úlcero-infiltrativo (Tabela 5.4). Esses resultados diferem da maioria encontrada na literatura que apresenta uma maior porcentagem de índice para lesões úlcero-infiltrativas (CAMARINI *et al.*, 1998). A maioria das lesões do grupo de CECs pertence ao grupo III e IV de anaplasia (Tabela 5.4). Entretanto, Spiro *et al.* (1999) encontraram maior prevalência nos graus II e IV em sua pesquisa, e as diferenças podem estar ligadas à particularidade da amostra estudada. Já no grupo do CV, observou-se o aspecto clínico úlcero-vegetante na maioria das lesões (Tabela 5.4), e todas as lesões apresentavam-se em estágios iniciais (grau I e II de anaplasia). Estes resultados são corroborados por

Jyothirmayi *et al.*, (1997) e Koch *et al.* (2001), que verificaram uma frequência de CV em estágios iniciais superior a 70 % nos indivíduos estudados.

Em relação ao estadiamento T, a maioria das lesões foi estadiada em T3 e T4 no grupo do CEC. Estes dados estão de acordo com os de Carvalho *et al.* (2001), que encontraram 65% das lesões estudadas classificadas nesses estádios. Para o grupo do CV, a maioria dos casos foi estadiada em Tx (62,5%), conforme Tabela 5.4. Esse resultado contradiz os obtidos por Oliveira *et al.*, (2006), que encontraram 65% de CV estadiados como T1 e T2. Em relação às metástases locoregional e a distância, nenhum caso em pacientes com CV foi detectado nesta pesquisa, o que está de acordo com dados observados por outros autores (OLIVEIRA *et al.*, 2006).

No grupo de CEC, todos os pacientes foram submetidos à cirurgia como tratamento de escolha, e destes, 56,4% tiveram radioterapia como tratamento coadjuvante (Tabela 5.5). Essa conduta terapêutica confere com o preconizado na literatura (NIVELLE; DAY, 2002; SCULLY; FELIX, 2006).

Em relação ao tratamento, 100% dos casos de CV foi tratada cirurgicamente e, apenas em um caso, foi utilizada a radioterapia como tratamento coadjuvante (Tabela 5.5). Embora a radioterapia e a quimioterapia sejam usadas em casos inoperáveis, alguns autores apresentam a possibilidade de transformação do CV em lesões mais agressivas (DEMIAN; BUSHKIN; ECHEVARRIA, 1973; FERLITO *et al.*, 1999). Todavia, Koch *et al.* (2001) recomendam radioterapia nos casos em que as margens cirúrgicas são imprecisas.

Em relação à sobrevida no CEC, praticamente um quarto dos indivíduos foram a óbito, e destes, 70% eram do sexo masculino (Tabela 5.6). Este resultado está de acordo com os encontrados por Blazenic *et al.* (2006), que afirmam ser a mortalidade 4,7 vezes maior no

sexo masculino, e que o CEC de língua é considerado o maior responsável pela mortalidade em câncer de boca. Para os casos do CV (Tabela 5.6), apenas um paciente foi a óbito por outro motivo.

A análise qualitativa das expressões das proteínas PCNA, Ki67 e ciclina B1, utilizadas neste estudo, demonstrou que existiu variabilidade na localização da marcação nas células positivas nas camadas do epitélio (Figuras 7, 8 e 9). As proteínas PCNA e Ki67 expressaram-se no núcleo das células positivas, e a ciclina B1, no citoplasma. Estes resultados estão de acordo com os encontrados por outros autores (NOVELLINO *et al.*, 2003; TSUJI *et al.*, 1995; COSTA *et al.*, 1999; HASSAN *et al.*, 2001). Outro aspecto desta análise diz respeito à diferença encontrada na localização da expressão dos marcadores nas camadas do epitélio dos carcinomas e no grupo controle. No grupo CEC, a expressão dos marcadores distribuiu-se pelas camadas mais superficiais e no fronte de invasão tumoral para os três anticorpos pesquisados. Estes resultados estão de acordo com os relatados por outros autores, como Steinberck *et al.* (1993), que pesquisaram a imunoreatividade do PCNA em lesões cancerígenas e CEC, e também por Costa *et al.* (1999), que estudaram PCNA e Ki67 em CEC. Em relação ao CV, ocorreu uma superexpressão na base do epitélio e pouca marcação nas camadas superficiais quando consideradas apenas as proteínas Ki67 e ciclina B1. Entretanto, na marcação pelo PCNA, houve uma distribuição por outras áreas no CV. Saito *et al.* (1999), descreveram em seu estudo a superexpressão da proteína Ki67 nas camadas basal e parabasal. A mesma constatação foi feita por Drachenberg *et al.* (1997), em relação ao anticorpo Ki67, que teve superexpressão nas camadas basal e parabasal do CV e se distribuiu aleatoriamente pelo CEC.

No grupo controle, também foi observado que a imunomarcção se concentrou nas camadas basal e parabasal (Figuras 7, 8 e 9). Este dado também foi constatado nos trabalhos de Hirota *et al.* (2002), que obtiveram 30% de expresso da proteina Ki67 em mucosa normal, distribuídas nas camadas basal e parabasal. A mesma localizao foi observada em outros trabalhos (BJARNASON; JORDAN; SOTHERN,1999). A concentrao da imunomarcção nessas camadas está diretamente relacionada à divisao celular que se concentra na base do epitélio.

Quanto à análise quantitativa das imunoexpresso de PCNA, Ki67 e ciclina B1, foi observada diferença estatisticamente significativa entre o grupo de CEC e o grupo controle ($p < 0,05$) (Tabela 5.8 e Figura 10). Estes resultados estão de acordo com o trabalho de Kushner *et al.* (1999), que encontraram diferença estatisticamente significativa na comparao do grupo de CEC com o grupo controle em relao aos marcadores ciclina B1 e Ki67, como ocorreu neste estudo. O PCNA obteve uma alta freqüência no grupo controle, dado confirmado pelo estudo de Merne *et al.* (2002), que encontraram 100% de expresso de PCNA em mucosa normal. A menor expresso de PCNA nos grupos de CECs pode ser reflexo da heterogeneidade histomorfológica de tal lesao, quando comparada ao tecido da mucosa normal bucal. Sabe-se ,ainda, que células interfásicas, cujo sistema de reparo a danos ao DNA tenha sido ativado, além daquelas estimuladas pela ao de determinados fatores de crescimento, também expressam PCNA (HALL *et al.*, 1994; McCORMICK & HALL, 1994). No tocante à comparao entre a imnuoexpresso de PCNA, de Ki67 e ciclina B1 entre os grupos CEC e CV, notou-se diferença significativa em relao ao PCNA e a ciclina B1 ($p < 0,05$), entretanto, ela não foi observada para o Ki67 (Tabela 5.8 e Figura 10). Este resultado do Ki67 contradiz os achados de Saito, Nakajima e Mogi (1999), que encontraram

diferença estatisticamente significativa entre o CEC e o CV, em relação ao anticorpo Ki67, ou seja, os valores maiores eram expressos no CEC ($63,0 \pm 6,47$), comparados aos do CV ($27,4 \pm 9,11$), com $p < 0.0001$. Esta discordância entre os dois resultados não invalida nenhum deles, uma vez que as amostras são diferentes. Vale ressaltar que outros autores também encontraram médias de Ki67 semelhantes às deste estudo ($26,9 \pm 13,4$; Tabela 5.12) no grupo CEC, como os estudos de Watanabe (2005), com, ($25,2 \pm 13,2$), e de Kurokawa *et al.* (2005), com ($32,8 \pm 12,0$). A comparação do CV com o grupo controle, tanto neste estudo quanto no trabalho de Saito, Nakajima e Mogi (1999), foi estatisticamente diferente.

As correlações das imunopressão de PCNA, Ki67 e ciclina B1, considerando todas os três grupos, demonstraram correlação entre ciclina B1 e Ki67 ($r=0,557$; Tabela 5.13 e Figura 12), o que está de acordo com o trabalho de Kushner *et al.* (1999), no qual também foi demonstrada correlação entre ciclina B1 e Ki67 ($r=0,39$). Estes dados, por não apresentarem uma forte correlação, sugerem que pode haver uma irregularidade de progressão do ciclo celular, durante o *checkpoint* G2/M em CEC de boca. Também houve uma correlação ($r=-0,44$; Tabela 5.13 e Figura 11) negativa entre PCNA e a ciclina B1 — à medida que a imunoreatividade de ciclina B1 aumentava a do PCNA decaía.

O estudo de Tumuluri *et al.* (2002) demonstrou que o índice de Ki67 é mais alto em pacientes com CEC pouco diferenciado do que nos casos bem diferenciados. Os resultados desta pesquisa não mostraram correlação entre a proteína Ki67 e a gradação histológica. Entretanto, quando a gradação histológica foi correlacionada à ciclina B1, como demonstrou o teste de correlação de Spermans ($r=0,44$; Tabela 5.16 e Figura 13), verificou-se que quanto mais indiferenciado o tumor, maior foi a imunopressão da ciclina B1 ($p < 0,05$), quando considerados todos os carcinomas, dados que estão de acordo com Kushner *et al.* (1999).

Estes resultados sugerem uma maior atividade proliferativa indicada pelas maiores taxas de ciclina B1 nos tumores mais indiferenciados, quando se utiliza o sistema de GHM proposto pela OMS (tumores pouco diferenciados, moderadamente diferenciados e bem diferenciados). Os resultados de Hassan *et al.* (2001) também corroboram com estes resultados, pois eles concluem em seu trabalho que quanto menos diferenciado o tumor, maior a marcação da ciclina B1.

É importante ressaltar que a imunexpressão da ciclina B1 (Tabelas 5.8), nos dois tipos de tumores nesta pesquisa, apresentou diferença significativa na marcação com $p < 0,05$; o CV apresentou uma média de 5,5%, e o CEC, de 10,4%. Este dado permite inferir um provável maior número de mitoses no CEC do que no CV, uma vez que a ciclina B1 se expressa na fase G2/M do ciclo celular no qual ocorre a divisão celular propriamente dita.

Em relação à prevalência de HPV nas amostras de CEC e CV, o resultado foi negativo. Embora a técnica de extração de material parafinado dificulte a obtenção do DNA, o método utilizado nesta investigação mostrou-se eficaz (NASCIMENTO *et al.*, 2003; MESQUITA *et al.*, 2001), e os controles positivos de HPV e DNA humano utilizados comprovaram o sucesso na extração e na técnica de PCR. Estes resultados contrapõem-se aos encontrados na literatura, que apresentaram positividade para HPV em lesões neoplásicas malignas (MILLER; JOHNSTONE; LEXINGTON, 2001; PREMOLI-DE-PERCOCO; RAMIREZ, 2001; Lo MUZIO *et al.*, 2004). De maneira semelhante a este estudo, Rivero e Nunes (2006), analisando quarenta amostras de CECs, também não detectaram lesões HPV⁺. A semelhança entre os dois estudos ocorre no número das amostras e na prevalência do sexo masculino. No presente estudo, o gênero masculino também esteve próximo dos dois terços da amostra de 47 carcinomas, e, no trabalho de Rivero e Nunes, em 80% da amostra. Por

outro lado, pode ser observada em outros estudos uma baixa prevalência do gênero masculino ou até de 100% de prevalência do gênero feminino (PREMOLI-DE-PERCOCO; RAMIREZ, 2001) nas amostras estudadas que tiveram lesões HPV⁺ (60%). Estes dados devem-se sobretudo ao fato do sexo feminino estar diretamente relacionado à história da infecção pelo HPV genital (LIE *et al.*, 1998). Entretanto, existem também estudos nos quais houve o equilíbrio entre os gêneros e foi encontrado o HPV (SUMMERSGILL *et al.*, 2001; CAMPISI, 2006).

A credibilidade dos resultados encontrados na PCR neste estudo deve-se ao uso de controles negativo e positivo nas reações, bem como na utilização dos *primers* GP5+/6+, que é comprovadamente superior para a detecção do HPV em amostras de tecidos parafinados, de acordo com o estudo de Remmerbach *et al.* (2004).

Finalizando as observações desta investigação, considera-se importante que mais estudos possam ser realizados, com um número maior de casos para o grupo de carcinomas verrucosos, pois esta lesão apresenta um comportamento biológico diferenciado em relação ao CEC e, com certeza, maior número de pesquisas sobre o assunto propiciarão um diagnóstico mais efetivo, o que implicará o desenvolvimento de novas modalidades de tratamento.

7 CONCLUSÕES

Os resultados desta investigação permitem as seguintes conclusões:

- a) embora as lesões apresentem comportamento biológico diferentes, o índice de proliferação celular nos dois tipos de carcinomas de boca mostrou ser superior ao do grupo controle, por meio da análise dos marcadores Ki67 e ciclina B1. Quando considerada a amostra total de carcinomas, independentemente de variantes, a ciclina B1 mostrou correlação com o grau histológico de malignidade segundo a OMS; quanto maior a imunexpressão de ciclina B1 maior o grau de diferenciação celular;
- b) a presença de HPV em CEC e CV de boca foi negativa e não foi possível correlacionar os fatores de risco tabagismo e etanol no presente estudo devido a limitação da amostra;
- c) os dados demográficos, foram similares aos encontrados na literatura;
- d) a análise qualitativa dos grupos permite concluir que as expressões das proteínas diferem-se tanto na localização celular quanto na distribuição nas camadas do epitélio nos grupos estudados, com destaque para a superexpressão das proteínas Ki67 e

ciclina B1 nas camadas basal e parabasal do CV e grupo controle; este dado permite concluir que há diferença na localização da imunomarcação entre os dois grupos de carcinomas pesquisados, uma vez que no CEC há uma distribuição na imunomarcação dos marcadores Ki67 e ciclina B1 em todas as células tumorais, diferentemente do CV que ocorreu maior concentração nas camadas da base do epitélio tumoral, possibilitando diferenciar os dois tumores no diagnóstico microscópico qualitativamente;

e) houve diferença estatisticamente significativa no índice de proliferação celular avaliado nos grupos CEC e CV, quando considerados os marcadores PCNA e ciclina B1; o PCNA foi mais expresso no CV do que no CEC e a ciclina B1 foi mais expressa no CEC do que no CV indicando, portanto, a ciclina B1 pode ser um indicador de maior agressividade entre lesões;

f) não foi observada diferença estatisticamente significativa entre os dois tumores, quando considerado a proteína Ki67; portanto, para este marcador, os dois tumores apresentam o mesmo padrão de proliferação celular, não indicando maior agressividade do CEC em relação ao CV.

REFERÊNCIAS*

- ACKERMAN, L. V. Verrucous carcinoma of the oral cavity. **Surgery**, St. Louis, v.23, n. 3, p. 670-8, 1948.
- ALANI R.M; MUNGER K. Human papillomaviruses and associated malignancies. **J. Clin. Oncol.**, Hagerstown, v.16, n. 1, p. 330-7, Jan. 1998.
- ALBERTS, B *et al.* **Biologia Molecular da Célula**. 4.ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p. 984-1025.
- ARISAWA *et al.* Marcadores Biológicos: PCNA e Ki67: breve revisão. **Rev. Fac. Odontol. São José dos Campos**, São José dos Campos, v.2, n..1, p.54-60 jan/jun. 1999.
- BJANASON, G; JORDAN, R.C.K; SOTHERN, R. Circadian variation in the expression of cell-cycle proteins in human oral epithelium. **Am. J. Pathol.**, Bethesda, v.154, n.2, p.613-622, Feb. 1999.
- BLAZENIC, M.G.H. Tendências de mortalidade por câncer de boca e orofaringe no Município de São Paulo, Brasil, 1980/2002. **Cad. Saúde Pública**, São Paulo, v.22, n.10, p.2105-2114, Out. 2006.

* Este trabalho foi formatado de acordo como guia para apresentação de trabalhos monográficos da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Goiás.

- BOFFETA, P; HASHIBE, M. Alcohol and cancer. **Lancet Oncol.**, London, v.7, n. 2, p. 149-56, Feb. 2006.
- BOUDA, M. *et al.* "High Risk" HPV types are frequently detected in potentially malignant and oral lesions, but not in normal oral mucosa. **J. Mod. Pathol.**, New York, v.13, n.6, p.644-653, June 2000.
- BOUQUOT, J.E. Oral verrucous carcinoma incidence in two US populations. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v.86, n.3, p.318-24, Mar. 1998.
- BOUQUOT, J.E. Oral cancer in a tobacco-chewing US population-no apparent increased incidence or mortality. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v.86, n.6, p.697-706, Dec. 1998.
- BROWN, D.C.; GATTER, K. C. Monoclonal antibody Ki67: its use in histopathology. **Histopathology**, Oxford, v.17, n. 3, p.489-493, 1990.
- BROWN, L.M. Epidemiology of alcohol-associated cancers. **Alcohol**, New York, v.35, n. 2, p.161-168, Feb. 2005.
- BRUNO, S.; DARZYNKIEWICZ, Z. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki67 antibody in HL-60 cell. **Cell. Prolif.**, Oxford, v.25, n.1, p.31-40, Jan. 1992.
- CAMARINI, E.T. **Estudo epidemiológico dos carcinomas espinocelulares de boca dos pacientes atendidos nas cidades de Bauru, estado de São Paulo, Brasil.** 1999. 130f Tese (Doutorado) - Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo, Bauru.
- CAMPISI, G. *et al.* HPV infection in relation to OSCC histological grading and TNM stage. Evaluation by traditional statistics and fuzzy logic model. **Oral Oncol.**, Oxford, v.42, n.6, p.638-45, Feb. 2006.
- CARVALHO M.B. *et al.* Características clínico-epidemiológicas do carcinoma epidermóide de cavidade oral no sexo feminino. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, Rio de Janeiro, v.47, n.3, p.208-14, 2001.
- CHAGÍN, A.L. Factores de riesgo etiopatogenicos del carcinoma verrugoso en cavidad bucal. **Acta Odontol. Venez.**, Venezuela, v.38, n.2, p.9-14, June 2000.
- CHANG, C.P. *et al.* Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in oral submucous fibrosis, oral epithelial hyperkeratosis and oral epithelial dysplasia in Taiwan. **Oral Oncol.**, Oxford, v.36, n. 4, p.353-359, July 2000.
- CHANG, J.Y.F; LIN, M.C., CHIANG, C.P, High- risk human papillomaviruses may have an important role in non-oral habits-associated oral squamous cell carcinomas in Taiwan. **Am. J. Clin. Pathol.**, Chicago, v.120, n.6, p.909-16, Dec. 2003.

CHATTERJEE, R. et al. Evaluation of orygrophilic nucleolar organizaer regions (AgNORS) in oral carcinomas in relation to human papilomavírus infection and cytokiwetics. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v.26, n.7, p.310-4, Aug. 1997.

CHEN, J.K. *et al.*, Changing trends in oral cancer in the United States, 1935 to 1985: a Connecticut study. **J Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v.49, n.11, p.1152-8, Nov. 1991.

COSTA A.L.L. *et al.* PCNA/AgNOR and Ki67/ AgNOR double staining in oral squamous cell carcinoma. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v.28, n. 10, p 438-41, Nov. 1999.

DEMIAN, S.D.; BUSHKIN, F.L.; ECHEVARRIA, R.A. Perineural invasion and anaplastic transformation of verrucous carcinoma. **Cancer**, New York, v.32, n.2, p.395-401, Aug. 1973.

DE RODA HUSMAN, A.M. The use of general primers GP5 and gp6 elongaten at their 3' ends with adjacent highly conserved sequences improves human papilomavírus detection by PCR. **J. Gen. Virol.**, London, v.76, n. 4, p.1057-1062, Apr. 1995.

DERKA, S. *et al.* Cell proliferation and apoptosis culminate in early stages of oral oncogenesis. **Oral Oncol.**, Oxford, v.42, n.5, p.540-550, May 2006.

DEDIVITIS *et al.* Clinical and epidemiologic characteristic in the with squamous cell carcinoma of the mouth and oropharynx. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.**, São Paulo, v.70, n.1, p. 26-24, jan./fev. 2004.

DRACHENBERG, C.B. *et al.* Comparative study of invasive squamous cell carcinoma and verrucous carcinoma of the oral cavity: expression of bcl-2, p53, and Her-2/neu, and indexes of cell turnover. **Cancer Detect. Prev.**, Cambridge, v.21, n.6, p.483-489, June 1997.

EISENBERG, E.; ROSENBERG, B.; KRUTCHKOFF, D. J. Verrucous carcinoma: a possible viral pathogenesis. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v.59, n.1, p.52-7, Jan. 1985.

FERLITO, A.; RINALDO, A; MANNARÀ, G.M. Is primary radiotherapy an appropriate option for the treatment of verruocus carcinoma of the head and neck? **J. Laryngol. Otol.**, London, v. 112, n.2, p.132-9, Feb. 1998.

FERLITO, A. *et al.* Papillary squamous cell carcinoma versus verruocus squamous cell carcinoma of the head and neck. **Ann. Otol. Rhinol. Laryngol.**, St Louis, v.108, n.3, p.318-22, Mar.1999.

FRACCHIOLI, S. *et al.* Oral squamous carcinoma in a patient with cervix câncer: use of human papillomavirus analysis to differentiate synchronous versus metastatic tumor. **Gynecol. Oncol.**, New York, v.89, n. 3, p.522-525, June 2003.

GASCO, M.; GROOK, T. The p53 network in head and neck cancer. **Oral Oncol.**, Oxford, v.39, n. 3, p.222-31, Apr. 2003.

GERDES, J. *et al.*, Cell cycle análise of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki67. **J Immunol**, v. 133, p.1710-5, 1984.

GERDES, J. BECKER, M.H.G., KEY, G. Immunohistological detection of tumor growth fraction (ki67 antigen) in formalin fixed and routinely tissues. **J. Pathol.**, Chichester, v.168, n.1, p.85-7, Jan. 1992.

GIMENEZ-CONTI, I.B. *et al.* p53, Rb, and cyclin D1 expression in human Oral Verrucous carcinomas. **Cancer**, New York, v.78, n.1, p.17-23, Jan. 1996.

GIROD, S.C. *et al.* Proliferative activity and loss of function of tumour suppressor genes as "biomarkers" in diagnosis and prognosis of benign and preneoplastic oral lesion and oral squamous cell carcinoma. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Edinburgh, v.36, n. 2, p.252-260, Feb. 1998.

HASSAN KA *et al.* Clinical significance of cyclin B1 protein expression in squamous cell carcinoma of the tongue. **Clin. Cancer Res.**, Denville, v.7, n.8, p.2458-62, Aug. 2001.

HASSAN KA *et al.* Cyclin B1 overexpression and resistance to radiotherapy in head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer Res.**, Baltimore, v.15, n.22, p.6414-7, Feb. 2002.

HIROTA, M. *et al.* Cell proliferation activity and the expression of cell cycle regulatory proteins in oral lichen planus. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v.31, n. 4, p.204-12, Apr. 2002.

HERRERO, R. *et al.* Human papillomavirus and oral cancer: the international agency for research on cancer multicenter study. **J. Natl. Cancer Inst.**, Cary, v.95, n.23, p. 1772-1783, Dec. 2003.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. (INCA). **Manual de detecção de lesões suspeitas de câncer de boca**. 2. ed. Rio de Janeiro: INCA/PRO-ONCO, 47p. 1996.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. (INCA). **Estimativas**. 2005. Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/estimativas/2005>>. Acesso: 15 set. 2006.

JYOTHIRMAYI, R. *et al.* Radiotherapy in the treatment of verrucous carcinoma of the oral cavity. **Oral Oncol.**, Oxford, v.33, n.2, p.124-8, Mar. 1997.

JOVANOVIC *et al.* Tobacco and alcohol related to the anatomical site of oral squamous cell carcinoma. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v.22, n.10, p 459-63, Nov. 1993.

KAUGARS, G.E. *et al.* Oral verrucous carcinoma. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v.87, n.3, p.268-9, Mar. 1999.

KOCH, B.B. *et al.* National survey of head and neck verrucous carcinoma. **Cancer**, New York, v.92, n.1, p. 110-20, July 2001.

KUSHNER, J. *et al.* Aberrant expression of cyclin A and cyclin B1 proteins in oral carcinoma. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v.28, n.2 p.77-81, Feb. 1999.

KUROKAWA, H. *et al.* The relationship of the histologic grade at the deep invasive front and the expression of Ki67 antigen and p53 protein in oral squamous cell carcinoma. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v.34, n. 10, p.602-7, Nov. 2005.

LAZZARI C.M. *et al.* Human papillomavirus frequency in oral epithelial lesions. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v.33, n. 5, p. 260-3, May 2004.

LEVINE, A.J. *et al.* The 993 Walter Hubert Lecture: The role of p53 tumour suppressor gene in tumorigenesis. **Br. J. Cancer**, Edinburgh, v.29, n.3, p.409-6, Mar. 1994.

LIE, A.K. *et al.* Human papillomavirus (HPV) in high-grade cervical intraepithelial neoplasia (CIN) detected by morphology and polymerase chain reaction (PCR)- a cytohistologic correlation of 277 cases treated by laser conization. **Cytopathology**, Oxford, v. 10, n. 2, 112-21, Apr. 1998.

LINK, J.O.; KAUGARS, G.E.; BURNS, J.C. Comparison of oral carcinomas in smokeless tobacco users and nonusers. **J. Oral Maxillofac. Surg.**, Philadelphia, v.50, n.5, p.452-5, May 1992.

Lo MUZIO, L *et al.* HPV DNA and survivin expression in epithelial oral carcinogenesis: a relationship. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 40, n. 7, p.736-41, Aug. 2004.

LÜBBE, J. *et al.* HPV-11 and HPV-16 associated oral verrucous carcinoma. **Dermatol.**, Basel, v.192, n.3, p.217-21, Mar. 1996.

LUNDEGREN, J.A.V. *et al.* Verrucous carcinoma (Ackerman's tumor) of the larynx: diagnostic and therapeutic considerations. **Head Neck Surg.**, New York, v.9, n.1, p.19-26, Sept/Oct. 1986.

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

MCCOY, J.M.; WALDRON, C.A. Verrucous carcinoma of the oral cavity. A review of forty-nine cases. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St. Louis, v.52, n.6, p.623-9, Dec. 1981.

McMORMICK, D.; HALL, P.A. The complexities of proliferating cell nuclear antigen. **Histopathology**, Oxford, v.21, n.6, p.591-4, June 1992.

MERNE, M. et al. Proliferation and differentiation markers in snuff-induced oral mucosal lesions. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v.31, n.5, p.259-66, May 2002.

MESQUITA, R.A. Avaliação de três métodos de extração de DNA de material parafinado para amplificação de DNA genômico pela técnica da PCR. **Pesqui. Odontol. Bras.**, São Paulo, v.15, n.4, p.314-319, out./dez. 2001.

MIGHEL, A. PCNA and p53. **Eur. J. Cancer**, Oxford, v.31, n.6, p. 403-04, 1995.

MILLER, C.S; WHITE, D.K; LEXINGTON. Human papilomavírus expression in oral mucosa, premalignant conditions, and squamous cell carcinoma: A retrospective review of literature. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St Louis, v.82, n.1, p.57-68, Jan. 1996.

MILLER, C.S.; JOHNSTONE, B.M.; LEXINGTON, N. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St Louis, v.91, n. 6, 622-35, June 2001.

MOORE, C; CATLIN, D. Anatomic origins and locations of oral cancer. **Am. J. Surg.**, Belle Mead, v.114, n. 4, p. 510-513, Oct. 1967.

MORK, J *et al.* Human papilomavírus infection as a risk factor for squamous cell carcinoma of the head and neck . **N. Engl. J. Med.**, Boston, v.344, n.15, p.1125-31, June 2001.

NASCIMENTO, E.M. Protocolo da extração de DNA de material parafinado para análise de microssatélites em leiomioma. **J. Bras. Patol. Med. Lab**, Rio de Janeiro, v.39, n.3, p 253-255, jul./set. 2003.

NEVILLE, B.W.; DAY, T.A. Oral cancer and precancerous lesions. **CA Cancer Clin.**, New York, v.52, n.4, p.195-215, July/Aug.2002.

NEVILLE, B. W. *et al.* **Patologia Oral e Maxilofacial**. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.

NOVELLINO *et al.* Análise da imunoexpressão do PCNA e p53 em carcinomas de células escamosas oral. Correlação com a gradação histológica de malignidade e características clínicas. **Acta Cir. Bras.**, São Paulo, v.18, n.5, p.458-464, abr. 2003.

ODAJIMA, T. *et al.* Abnormal β -catenin expression in oral cancer with no gene mutation: correlation with expression of cyclin D1 and epidermal growth factor receptor, Ki67 labeling index, and clinicopathological features. **Hum. Pathol.**, Philadelphia, v.36, n.3, p.234-241, Mar. 2005.

OGAWA, A. *et al.* Treatment results of oral verrucous carcinoma and its biological behavior. **Oral Oncol.**, Oxford, v.40, n.8, p.793-797, Sept. 2004.

OGAWA, A. *et al.* Treatment results of oral verrucous carcinoma and its biological behavior. **Oral Oncol.**, Oxford, v.41, n.4, p.436-438, Apr. 2005.

OLIVEIRA, D. E. **Infecção pelos vírus Epstein-Barr(EBV) e vírus papiloma humano (HPV) expressão da proteína p53 e proliferação celular em carcinomas de nasofaringe e laringe.**2002. 117f. Tese (Doutorado)- Faculdade de Medicina de Botucatu. Universidade Estadual Paulista, São Paulo.

OLIVEIRA, M. C. *et al.* HPV and oral carcinogenesis: bibliographic review. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.**, São Paulo, v.69, n.4, p.553-9. July/Ago. 2003.

OLIVEIRA, D. T. *et al.* Oral verrucous carcinoma: a retrospective study in São Paulo Region, Brazil. **Clin. Oral Investig.**, Berlin, v.10, n.3, 205-9, Sept. 2006.

PATEL U *et al.* Microsatellite instabilities at five chromosomes in primary breast tumors. **Oncogene**, London, v.9, n.12, p.3695-700, Dec. 1994.

PAULOVICH, A.G.; TOCZYSKI, D.P.; HARTWELL, L.H. When check-points fail. **Cell**, Cambridge, v.88, n.3, p.315-21, Feb. 1997.

PIATTELLI, A. *et al.* Prevalence of p53, bcl-2, and Ki67 immunoreactivity and of apoptosis in normal oral epithelium and in premalignant and malignant lesions of the oral cavity. **J Oral Maxillofac Surg**, Philadelphia, v.60, n.5, p. 532-540, May 2002.

PERUSSI, M.R. *et al.* Carcinoma epidermóide da boca em idosos de São Paulo. **Rev. Assoc. Med. Bras.**, São Paulo, v.48, n.4, p.341-4, Apr. 2002.

PINTOS, J. *et al.* Use of wood stoves and risk of cancers of the upper aero-digestive tract: a case-control study. **Int. J. Epidemiol.**, London, v.27, n. 6, p.936-940, Dec. 1998.

POMATTO, E. *et al.* Carcinoma verrucoso del cavo orale. Esperienze personali sul trattamento chemio-chirurgico integrato. **Minerva Chir.**, Torino, v.48, n.5, p.213-9, Mar. 1993.

PREMOLI-DE-PERCOCO, G; RAMIREZ J.L. High risk human papillomavirus in oral squamous carcinoma: evidence of risk factors in a Venezuelan rural population. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v. 30, n. 6, p. 355-61, July 2001.

RAJENDRAN, R. *et al.* Ackerman's tumor (Verrucous Carcinoma) of the oral cavity: a clinico-epidemiologic study of 426 cases. **Aust. Dent. J.**, Sydney, v.33, n.4, p.295-8, Aug. 1988.

RAJENDRAN, R. et al. Ackerman's tumor (Verrucous Carcinoma) of the oral cavity: a histopathologic study of 426 cases. **Singapore Dent. J.**, Singapore, v.14, n.1, p.48-53, Dec. 1989.

REMMERBACH, T.W. *et al.* PCR detection of human papillomavirus of the mucosa: comparison between MY09/11 and GP5+/6+ primer sets. **J. Clin. Virol.**, Amsterdam, v.30, n. 4, p.302-308, Aug. 2004.

RIVERO, E. R. C.; NUNES, F. D. HPV in oral squamous cell carcinomas of a Brazilian population: amplification by PCR. **Braz. Oral Res.**, São Paulo, v.20, n.1, p.21-4, Jan. 2006.

SAITO, T.; NAKAJIMAT, T.; MOGI, K. Immunohistochemical analysis of cell cycle-associated proteins p16, pRb, p53, p27 and Ki67 in oral cancer and precancer with especial reference to verrucous carcinomas. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v.28, n.5, p. 229-32, May 1999.

SALOMON, L.; TASSIN, J.P. Novos vilões no tabaco. **Sci. Am. Bras.**, São Paulo, n.51, p.49-55, ago/2006.

SANCLEMENTE, G.; GILL, DK. Human papillomavirus molecular biology and pathogenesis. **Eur. Acad. Dermatol. Venereol.**, New York, v.16, n. 3, p.231-40, May 2002.

SCHILD, E.B. *et al.* Expression of p53, PCNA, Ki67 and bcl-2 in relation to risk factors in oral cancer – a molecular epidemiological study. **Int. J. Oncol.**, Athens, v.22, n.4, p.861-68, Apr. 2003.

SCULLY, C. Oral squamous cell carcinoma; from an hypothesis about a virus, to concern about possible sexual transmission. **Oral Oncol.**, Oxford, v.38, n.3, p.227-34, Apr. 2002.

SCULLY, C. Oral câncer: the evidence for sexual transmission. **Br. Dent. J.**, London, v. 199, n.4, p.203-207, Aug. 2006.

SCULLY, C; FÉLIX, D.H. Oral medicine-update for the dental practitioner oral cancer. **Br. Dent. J.**, London, v. 200, n.1, p.13-17, Jan. 2006.

SHARMA, P. et al. Ki67 expression in cytologic scrapes from oral squamous cell carcinoma before and after 24 Gray radiotherapy- a study on 43 patients. **Med. Patol. Oral**, New York, v.10, n. 3, p.15-17, Mar. 2004.

SILVA A.M.T.C; AMARAL M.V.T; CRUZ A.D. HPV e câncer: o papel do papiloma vírus humano na carcinogênese. **Rev Biotecnologia**, Rio de Janeiro, v.29, n. 2, p.48-54, Feb. 2003.

SITTEL, C. *et al.* Prognostic significance of Ki67 (MIB1), PCNA and p53 in cancer of the oropharynx and oral cavity. **Oral Oncol.**, Oxford, v.35, n.6, p.583-589, Nov. 1999.

SPIRO, R. Verrucous carcinoma, then and now. **Am. J. Surg.**, Belle Mead, v.176, n.5, p.393-7, Nov. 1998.

SOUTO, R.; FALHARI, J.P.B.; CRUZ, A.D. O papilomavírus humano: um fator relacionado com a formação de neoplasias. **Rev. Bras. Cancerol.**, São Paulo, v.51, n.2, p.155-160. 2005.

STEINBERCK, R.G. DNA content and PCNA immunoreactivity in oral precancerous and cancerous lesions. **Oral Oncol.**, Oxford, v.29B, n.4, p.279-284, Apr. 1993.

SUMMERSGILL, KF *et al.*, Human papilomavírus in the oral cavities of children and adolescents. **Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endod.**, St Louis, v.91, n.1, 62-9, Jan. 2001.

SUGERMAN, P.B; SHILITOE, E. J. The high risk human papilomavírus and oral cancer: evidence for and against a causal relationship. **Oral Dis.**, Houndmills, v.3, n.3, p.130-147, Sept. 1997.

SYRJÄNEN K, *et al.* Morphological and immunohistochemical evidence suggesting human papillomavirus (HPV) involvement in oral squamous cell carcinogenesis. **Int. J. Maxillofac. Oral Surg.**, Copenhagen, v.12, n.6, p.418-24, Dec. 1983.

TRALONGO, V. *et al.* Prognostic factors in oral squamous cell carcinoma. A Review of the Literature. **Anticancer Res.**, Athens, v.19, n. 2, p.3503-3510, Feb. 1999.

TSUJI, T. *et al.* The significance of PCNA and p53 protein in some oral tumors. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, Copenhagen, v.24, n. 3, p.221-225, Mar. 1995.

TUMULURI, V., THOMAS, A.G., FRASER, I.S. Analysis of the Ki67 antigen at the invasive tumour front of human oral squamous cell carcinoma. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v.31, n.10, p.598-604, nov. 2002.

TUMULURI, V., THOMAS, A.G., FRASER, I.S. The relationship of proliferating cell density at the invasive tumour front with prognostic and risk factors in human oral squamous cell carcinoma. **J. Oral Pathol. Med.**, Copenhagen, v.33, n. 5, p.204-8, Apr. 2004.

VENTURI, B. R. M; CABRAL, M. G.; LOURENÇO, S. Q. C. oral squamous cell carcinoma-contribution of oncogenic virus and some molecular markers in the development and prognosis of the lesion: a review. **Rev Bras Otorrinolaringol.**, São Paulo, v.70, n.3, p.385-92, 2004.

UOBE K. *et al.* Detection of HPV in Japanese and Chinese oral carcinomas by in situ PCR. **Oral Oncol.**, Oxford, v.37, n.8, p.146-52, Aug. 2001.

VICENTE, J.C. Expression of cyclin D1 and Ki67 in squamous cell carcinoma of the oral cavity: clinicopathological and prognostic significance. **Oral Oncol.**, Oxford, v.38, n. 1, p.301-308, Jan. 2002.

WARNAKULASURIYA, S.; SUTHERLAND, G.; SCULLY, C. Tobacco, oral cancer, and treatment of dependence. **Oral Oncol.**, Oxford, v.41, n.2, p. 244-260, Feb. 2005.

WASNER, M. *et al.* Cyclin B1 transcription is enhanced by the p300 coactivator and regulated during the cell cycle by a CHR-dependent repression mechanism. **FEBS Lett**, Amsterdam, v.536, n.3, p.66-70, Mar. 2003.

WATANABE, S. **Avaliação da imunoexpressão do PCNA, Ki67 e ciclina B1 considerando o padrão de invasão celular no carcinoma espinocelular de boca.** 2005. 111 f. Dissertação (Mestrado) - Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Goiás, Goiânia.

WÜNSCH-FILHO, V. The epidemiology of oral and pharynx cancer in Brazil. **Oral Oncol.**, Oxford, v. 38, n. 6, p. 737-746, July 2002.

XIE, X. *et al.* Prognostic significance of proliferative and apoptotic markers in oral tongue squamous cell carcinomas. **Oral Oncol.**, Oxford, v.35, n. 6, p.502-509, July 1999.

YOSHIMURA, Y. *et al.* Treatment modalities for oral verrucous carcinoma and their outcomes: contribution of radiotherapy and chemotherapy. **Int. J. Clin. Oncol.**, New York, v.6, n.4, p.192-200, Aug. 2001.

ZANINI, M. *et al.* Carcinoma verrucoso: uma variante clínico-histopatológica do carcinoma espinocelular. **An. Bras. Dermatol**, Rio de Janeiro, v.79, n.5, p.619-621, set/out. 2004.

ZHANG *et al.* Human papillomavirus type 16 and DNA in oral squamous cell carcinoma and normal mucosa. **Int. J. Oral Maxillofac. Surg.**, St. Louis, v.33, n. 1, p. 71-4. 2004.

ANEXOS

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa Médica Humana e Animal — Hospital das clínicas UFG e registro do trabalho na VPG-UCG.

ANEXO B - Formulário de registro de informações clínicas obtidas de prontuários no Setor de arquivos do HAJ-ACCG

Trabalho de Pesquisa
José Vieira de Spíndula Filho

DETECÇÃO DE HPV E AVALIAÇÃO DO ÍNDICE DE PROLIFERAÇÃO CELULAR EM CARCINOMAS ESPINOCELULARES E CARCINOMAS VERRUCOSOS DE BOCA

Formulário

- a) Identificação
 - 1) Nome
 - 2) Idade
 - 3) Sexo
 - 4) Raça
 - 5) Endereço
 - 6) Procedência
 - 7) Telefone

- b) Hábitos
 - 1) Tabagismo
 - 2) Etilismo
 - 3) Outros
- c) Localização do tumor primário

- d) Estádio clínico TNM

- e) Morfologia de lesão:
 - 1) Úlcero-vegetativa;
 - 2) Úlcero-infiltrativa;
- f) Gradação de malignidade;
- g) Linfonodos metastáticos;
- h) Procedimento;
- i) Tratamento coajuvantes
- j) Acompanhamento (período)

ANEXO C — Classificação clínica TNM para carcinomas de lábios e cavidade bucal, segundo UICC (1987)

Regras para classificação

As categorias TNM são obtidas pelas análise de exame físico e por imagens.

Áreas anatômicas

Lábios

- 1 Lábio superior (vermelhão)
- 2 Lábio inferior (vermelhão)
- 3 Comissuras

Cavidade bucal

- 1 Mucosa bucal;
 - I) Mucosa dos lábios superior e inferior;
 - II) Mucosa jugal;
 - III) Áreas retromolares;
 - IV) Sulco buço-alveolar, superior e inferior (vestíbulo bucal)
- 2 Alvéolo e gengiva superior
- 3 Alvéolo e gengiva inferior
- 4 Palato duro
- 5 Língua
 - a. Superfície dorsal e bordas laterais anteriores às valadas (dois terços superficiais)
 - b. Superfície inferior (ventral)
- 6 Soalho bucal.

Linfonodos regionais

Os linfonodos regionais são os linfonodos cervicais.

Classificação clínica TNM

T = Tumor primário

TX Tumor primário não pode ser avaliado.

- T0 Não há evidência de tumor primário.
- Tis Carcinoma *in situ*.
- T1 Tumor de até 2cm em seu maior diâmetro.
- T2 Tumor maior que 2cm, mas menor que 4 cm em seu maior diâmetro.
- T3 Tumor maior 4cm em seu maior diâmetro.
- T4 Tumor maior que 4cm com invasão de estruturas adjacentes. (Lábio — EX.: osso cortical, língua e pele do pescoço. Cavidade bucal — Ex.: osso cortical, seio maxilar e pele).

N — Linfonodos regionais

- NX Linfonodos regionais não podem ser avaliados.
- N0 Ausência de metástases regionais.
- N1 Metástase em linfonodo ipsilateral único, menor ou igual a 3cm em seu maior N2 diâmetro.
- N2 Metástase em linfonodo ipsilateral único, maior que 3cm mas menor que 6cm na maior dimensão, ou metástase em múltiplos linfonodos ipsilaterais, com nenhum maior que 6cm na maior dimensão, ou metástase em linfonodos bilaterais ou contra-laterais, com nenhum maior que 6cm na maior dimensão.
- N3 Metástase em linfonodo maior que 6cm em seu maior diâmetro.

M — Metástase a distância.

- MX Metástase a distancia não podem ser avaliadas.
- M0 Ausência de metástase a distância.
- M1 Presença de metástases a distância.

Estádios

- 0 T_{is} N0 M0
- I T1 N0 M0
- II T2 N0 M0
- III T3 N0 M0 ; T1 ou T2 ou T3N1 M0
- IV T4 N0 M0 ou
Qualquer T N2 M0
Qualquer T N3 M0
Qualquer T qualquer N M1

Anexo D: Características demográficas, fatores de risco, características clínicas, tratamento e dados pós-operatórios dos pacientes acometidos por carcinoma espinocelular de boca. Associação de combate ao câncer de Goiás - Hospital Araújo Jorge, Goiânia, Goiás, 1996 a 2004*

Caso- (Lâmina)	Idade	Sexo	Raça	Tabaco	Alcool	Tumor Primário	Caract. Clínica	Estadiamento clínico (OMS)	Gradação (Biópsia Excisional- Patologista HAJ)	Procedimento cirúrgico	Tratamento coadjuvante	Tempo acompanhamento
1- 7592-1 B98	58	F	M	+	+	Língua	Úlcero-vegetante	T3N2aM0	Grau III	Glossectomia parcial + esv.cervical+ mandibulectomia	Radioterapia	1 ano (recidiva RHD)
2-4238-B02	63	M	M	+	+	Soalho de boca	Úlcero-vegetante	T1N1M0	Grau I	Glossectomia parcial + esv.cervical+ mandibulectomia	Radioterapia	4 anos (com metástase cervical)
3-4026-1 B96	73	M	L	+	+	Língua	Úlcero-vegetante	T3N0M0	Grau IV	Glossectomia parcial + esv.cervical	Radioterapia	1ano e 5 meses (abandonou tratamento)
4-10645-B96	43	M	L	+	+	Região retromolar	Úlcero-vegetante	T3N0M0	Grau IV	Esv.cervical+ Hemimandibulectomia	-	4 anos
5-10250-B98	60	M	M	+	+	Palato	Úlcero-vegetante	T2N0M0	Grau III	Palatolectomia parcial	-	5 anos e 6 meses
6-4028-B96	60	M	L	+	+	Região retromolar + Língua	Úlcero-infiltrativa	T3N0M0	Grau II	Glossectomia parcial + esv.cervical+ mandibulectomia	Radioterapia	7 anos (com recidiva)
7-5709-1 B97	62	M	M	+	+	Palato	Úlcero-vegetante	T2N0M0	Grau II	Maxilalectomia parcial	-	5 anos
8- 3791-1 B96	73	M	M	+	+	Língua	Úlcero-vegetante	T4N0M0	Grau II	Glossectomia parcial + esv.cervical+ hemimandibulectomia	Radioterapia	3 anos (com metástase em linfonodo)- abandonou tratamento
9- 6255-A B96	59	M	L	+	+	Região retromolar + Língua	Úlcero-infiltrativa	T4N0M0	Grau IV	Hemimandibulectomia+esv.cervical	-	8 anos (com metástase para linfonodo)
10-02850-1B03	68	M	L	+	-	Língua	Úlcero-vegetante	T3N0M0		Glossectomia parcial + esv.cervical	Radioterapia	1 ano (com recidiva e óbito por septicemia)
11-09647-1B98	41	M	L	+	+	Língua	Úlcero-vegetante	T2N0M0	Grau III	Pelviglossectomia parcial + esv.cervical	-	6 anos
12-8504 B96	53	M	M	+	+	Língua	Úlcero-vegetante	T2N0M0	Grau IV	Glossectomia parcial	Radioterapia	8 anos
13-8791-1 B98	78	F	L	-	-	Rebordo gengival	Úlcero-vegetante	T4N0M0	Grau II	Hemimandibulectomia	Radioterapia	1 ano (com metástase)

28-07122 B99	64	M	L	+	+				Úlcero-infiltrativa	T3N0M0	Grau III	mandibulectomia Pelviglossectomia parcial + esv.cervical	Radioterapia	7 meses (Óbito)
29-8235 B04	41	M	M	+	+			Retromolar	Úlcero-vegetante	T2N0M0	Grau II	Hemimandibulectomia+ esv.cervical	Radioterapia	2 anos
30-6909 B98	62	F	L	-	-			Lingua	Úlcero-vegetante	T2N0M0	Grau III	Glossectomia parcial + esv.cervical	-	2 anos (com metástase)
31-02811 B00	61	M	L	-	+			Soalho da boca	Úlcero-vegetante	T4N1M0	Grau III	Pelvmandibulectomia	Radioterapia	4 meses (com metástase)
32-04219 B03	64	M	L	-	+			Soalho da boca	Úlcero-vegetante	T1N3M0	Grau III	Pelviglossectomia + esv.cervical	Radioterapia	2 anos
33-9243 B98	52	F	L	-	+			Soalho da boca	Úlcero-vegetante	T2N0M0	Grau IV	Pelviglossectomia parcial + esv.cervical+ mandibulectomia	Radioterapia	2 anos
34-02866 B99	56	M	M	+	+			Lingua	Úlcero-vegetante	T2N0M0	Grau III	Pelviglossectomia parcial + esv.cervical	-	4 anos (com recidiva)
35-7579 B04	39	M	M	-	-			Lingua	Úlcero-vegetante	T1N0M0	Grau III	Pelviglossectomia parcial + esv.cervical	-	1 ano
36-03265 B04	52	M	L	-	+			Gengiva inferior	Úlcero-infiltrativa	T4N0M0	Grau IV	Hemimandibulectomia+ esv.cervical	Radioterapia	2 anos
37-0148 B02	33	M	L	-	-			Lingua	Úlcero-vegetante	T3N0M0	Grau II	Glossectomia parcial + esv.cervical	-	4 anos (com recidiva)
38-10438 B01	82	M	L	+	+			Retromolar	Úlcero-infiltrativa	T3N0M0	Grau III	Hemimandibulectomia+ esv.cervical	Radioterapia	4 anos
39-105204 B98	59	M	M	+	+			Soalho da boca	Úlcero-vegetante	T3N0M0	Grau III	Pelviglossectomia parcial + esv.cervical+ mandibulectomia	Radioterapia	6 anos (com metástase cervical)

*Foram selecionados casos que continham espécimes, provenientes de biópsias excisionais, mais representativos e preservados

Anexo E: Características demográficas, fatores de risco, características clínicas, tratamento e dados pós-operatórios dos pacientes acometidos por carcinoma verrucoso de boca. Associação de combate ao câncer de Goiás - Hospital Araújo Jorge, Goiânia, Goiás 2002 a 2006*

Caso- (Lâmina)	Idade	Sexo	Raça	Tabaco	Alcool	Tumor Primário	Caract. Clínica	Estadiamento clínico (OMS)	Gradação (Biópsia Excisional- Patologista HAJ)	Procedimento cirúrgico	Tratamento coadjuvante	Tempo acompanhamento
01- 13768/ B05	66	F	L	-	-	Mucosa Jugal	Papilomatosa	Não estadiado	Grau I	Ressecção cirúrgica da mucosa jugal	-	1 ano
02- 14486/02	85	F	M	-	-	Palato, rebordo gengival vestibular e mucosa jugal	Papilomatosa	T3N0M0	Não classificado	Maxilectomia de meso e infraestutura	-	4 anos
03 - 04128/04	50	M	M	+	+	Língua e soalho bucal	papilomatosa	T3N0M0	Grau II	Glossectomia	-	2 anos
04 - 02411/04	69	M	M	-	-	Lábio inferior e mucosa jugal	Papilomatosa	Não classificado	Grau I	Conferir	-	2 anos
05- 08924	62	F	L	+	-	Palato duro	Papilomatosa	Não classificado	Não classificado	Maxilectomia	-	3 anos sem recidiva
06 - 14311/03	54	M	L	+	+	Língua	Ulceroso-vegetante	Não classificado	Grau I	Glossectomia parcial	-	3 anos
07- 034/03	56	F	L	-	+	Gengiva inferior	Proliferativa	Não classificada	Não classificada	Ampliação de margens cirúrgicas	-	3 anos
08-426/06	47	M	M	-	-	Mucosa jugal	papilomatosa	Não classificada	Grau I	Ressecção cirúrgica da mucosa jugal	-	1 mês

*Foram selecionados casos que continham espécimes, provenientes de biópsias excisionais, mais representativos e preservados

ANEXO F - Porcentagem de células PCNA+, Ki67+ e ciclina B1 e fatores etiológicos considerando todos grupos : CEC;CV e CT

CONTAGEM DE TODAS CAMADAS DO EPITÉLIO

LÂMINAS	PCNA	KI-67	CICLINA B1	IDADE	SEXO	RAÇA	TABACO	ÁLCOOL	HPV	CASOS
1- 7592-1 B98	0,85	0,22	0,07	58	F	M	1	1	0	CEC
2- 4238-B02		0,23	0,05	63	M	M	1	1	0	CEC
3-4026-1 B96		0,23		73	M	L	1	1	0	CEC
4-10645-B96	0,78	0,35	0,08	43	M	L	1	1	0	CEC
5-10250-B98	0,53	0,24	0,18	60	M	M	1	1	0	CEC
6-4028-B96	0,28	0,27	0,07	60	M	L	1	1	0	CEC
7-5709-1 B97	0,65	0,22	0,06	62	M	M	1	1	0	CEC
8- 3791-1 B96	0,33	0,25	0,18	73	M	M	1	1	0	CEC
9- 6255-A B96	0,56	0,23	0,10	59	M	L	1	1	0	CEC
10-02850-1B03	0,88	0,24	0,11	68	M	L	1	0	0	CEC
11-09647-1B98	0,66	0,17	0,10	41	M	L	1	1	0	CEC
12-8504 B96	0,87	0,17	0,10	53	M	M	1	1	0	CEC
13-8791-1 B98	0,85	0,19	0,05	78	F	L	0	0	0	CEC
14-03526-1 B04	0,64	0,81	0,22	81	M	L	1	1	0	CEC
15-03589-1AB02	1,00	0,46	0,05	69	F	M	0	0	0	CEC
16-8267 B98	0,74	0,34		43	M	L	1	0	0	CEC
17-2098-1B96	0,84	0,14	0,12	72	M	M	1	1	0	CEC
18-0941B99	0,89	0,35	0,16	80	M	M	1	1	0	CEC
19-10149A2B98	0,34	0,17	0,06	58	F	L	1	0	0	CEC
20-09495-7B99	0,93	0,47	0,17	68	M	M	1	1	0	CEC
21-06777-1B03	0,93	0,16	0,10	62	M	L	1	1	0	CEC
22-07235-1B98	0,75	0,25	0,19	69	F	L	0	0	0	CEC
23-0547-1B99	0,99	0,30	0,08	47	F	L	1	1	0	CEC
24-7575-1B98	0,89	0,29	0,09	70	M	L	1	1	0	CEC
25-11164 B98	0,77	0,26	0,09	90	F	L	1	0	0	CEC
26-12051-1B02	0,86	0,16		52	M	M	1	1	0	CEC
27-10873 B97	0,93	0,21	0,12	51	M	L	1	1	0	CEC
28-07122 B99	0,98	0,13	0,06	64	M	L	1	1	0	CEC
29-8235 B04	0,96	0,28		41	M	M	1	1	0	CEC
30-6909 B98	1,00	0,20	0,12	62	F	L	0	0	0	CEC
31-02811 B00	0,85	0,35	0,14	61	M	L	1	0	0	CEC
32-04219 B03	0,75	0,29	0,09	64	M	L	1	0	0	CEC
33-9243 B98	0,74	0,20	0,14	52	F	L	1	0	0	CEC
34-02866 B99	1,00	0,27	0,05	56	M	M	1	1	0	CEC
35-7579 B04	0,73	0,25	0,08	39	M	M	0	0	0	CEC
36-03265 B04	0,57	0,32	0,09	52	M	L	1	0	0	CEC
37-0148 B02	0,68	0,20	0,11	33	M	L	0	0	0	CEC
38-10438 B01	0,87	0,28	0,04	82	M	L	1	1	0	CEC
39-105204 B98	0,61	0,21	0,08	59	M	M	1	1	0	CEC
1- 13768	0,97	0,48	0,10	66	F	L	0	0	0	CV
2- 14486/02	1,00		0,07	85	F	L	0	0	0	CV
3-034/03	0,99	0,49	0,08	56	F	L	0	0	0	CV

4- 8924/02	0,99	0,14	0,02	62	F	L	1	0	0	CV
5-14311/03	0,97	0,17	0,05	54	M	M	1	1	0	CV
6-4128/04	0,87	0,26	0,06	50	M	M	1	1	0	CV
7-6254/06	0,82	0,23	0,05	80	M	M	0	0	0	CV
8-426/06	0,94	0,37	0,04	49	M	M	1	0	0	CV
2 PL	1,00	0,13	0,02	47	M	L	0	0	0	CT
4 PL	1,00	0,09	0,02	50	M	L	0	0	0	CT
6 PL	1,00	0,11	0,03	35	M	L	0	0	0	CT
8 PL	1,00	0,09	0,04	33	F	L	0	0	0	CT
9 PL	1,00	0,14	0,02	28	F	L	0	0	0	CT
13 PL	1,00	0,09	0,01	24	F	L	0	0	0	CT
15 PL	1,00	0,07	0,01	48	M	L	0	0	0	CT
16 PL	1,00	0,05	0,02	51	M	L	0	0	0	CT
17 PL	1,00	0,04	0,02	44	F	L	0	0	0	CT

CONTAGEM APENAS DAS CAMADAS BASAL E PARABASAL

LÂMINAS	PCNA	KI-67	CICLINA B1	IDADE	SEXO	RAÇA	TABACO	ÁLCOOL	HPV	CASOS
1- 13768	1,00	0,84	0,34	66	F	L	0	0	0	CV
2- 14486/02	1,00		0,26	85	F	M	0	0	0	CV
3-034/03	1,00	0,65	0,34	56	F	L	0	0	0	CV
4- 8924/02	0,99	0,33	0,10	62	F	L	1	0	0	CV
5-14311/03	0,97	0,30	0,13	54	M	M	1	1	0	CV
6-4128/04	0,99	0,67	0,11	50	M	M	1	1	0	CV
7-6254/06	0,99	0,45	0,15	80	M	M	0	0		CV
8-426/06	1,00	0,73	0,05	49	M	M	1	0		CV
2 PL	1,00	0,15	0,06	47	M	L	0	0		CT
4 PL	1,00	0,15	0,04	50	M	L	0	0		CT
6 PL	1,00	0,16	0,05	35	M	L	0	0		CT
8 PL	1,00	0,11	0,06	33	F	L	0	0		CT
9 PL	1,00	0,22	0,03	28	F	L	0	0		CT
13 PL	1,00	0,09	0,02	24	F	L	0	0		CT
15 PL	1,00	0,12	0,02	48	M	L	0	0		CT
16 PL	1,00	0,08	0,03	51	M	L	0	0		CT
17 PL	1,00	0,09	0,02	44	F	L	0	0		CT

ANEXO G — PROTOCOLO DE EXTRAÇÃO DE MATERIAL PARAFINADO

DESPARAFINIZAÇÃO

1. Amostras de 2mg a 5mg de material parafinado.
2. transferir para um tubo de 2000 μ L, por duas vezes a banho de 1000 μ L de Xilol por 30' a 65°.
3. Centrifugado a 14.000 rpm pro 5', descartando-se o sobrenadamento.
4. Repetir os passos 2 e 3 por 2 vezes até ou até a parafina sair.

REMOÇÃO DO XILOL

1. Banho de 1.000 μ L de Etanol a 100%, temperatura ambiente por 1' .
2. Centrifugado a 14.000 rpm pro 5', descartando-se o sobrenadamente'.
3. Banho de 1.000 μ L de Etanol a 95%, temperatura ambiente por 1' .
4. Centrifugado a 14.000 rpm pro 5', descartando-se o sobrenadamente'.
5. Banho de 1.000 μ L de Etanol a 70%, temperatura ambiente por 1' .
6. Centrifugado a 14.000 rpm pro 5', descartando-se o sobrenadamente'.
7. Banho de 1.000 μ L de Etanol a 70%, temperatura ambiente por 1' .
8. Centrifugado a 14.000 rpm pro 5', descartando-se o sobrenadamente'.
9. Banho de 1.000 μ L de água deionizada temperatura ambiente por 1' .
10. Centrifugado a 14.000 rpm pro 5', descartando-se o sobrenadamente'.
11. Banho de 1.000 μ L de água deionizada temperatura ambiente por 1' .
12. Centrifugado a 14.000 rpm pro 5', descartando-se o sobrenadamente'.

DIGESTÃO DAS PROTEÍNAS (EXTRAÇÃO PROPRIAMENTE DITA DO DNA)

LISE CELULAR

1. Adicionar 100 μ L de Solução de Lise e homogeneizar, macerando o tecido com um bastão ou ponteira em um tubo Eppendorf.
2. Incubar o lisado a 65° por 15 – 60'.
3. Adicionar 0,3 μ L de Proteinase K (20mg/ml).
4. Misturar o conteúdo por inversão 25X.
5. Incubar a 55° até que as partículas de tecido estejam dissolvidas OVERNIGHT.
6. Inverter os tubos periodicamente durante a incubação.

PRECIPITAÇÃO DE PROTEÍNAS

1. Resfrie as amostras a temperatura ambiente.
2. Adicione 33 μ L de Solução de precipitação de proteínas ao lisado de células.
3. Vórtex rigorosamente por 20 segundos para misturar a solução de precipitação de proteínas uniformemente ao lisado de células.
4. Coloque as amostras no GELO por 15'.
5. Centrifugado a 14.000 rpm por 6'.
6. O precipitado de proteínas formará um pellet no fundo do tubo. Se o precipitado de proteínas não estiver visível repetir o passo 3 seguido de incubação em GELO por 5', em seguida repita o passo 4.

PRECIPITAÇÃO DE DNA

1. Transferir o sobrenadante contendo o DNA (deixando o pellet de proteínas no fundo do tubo) para um Eppendorf de 1,5 ml limpo e adicionar 200 μ L de Isopropanol 100% gelado (2-propanol).
2. Misturar cada amostra por inversão cerca de 50X.
3. Colocar no freezer OVERNIGHT.
4. Centrifugar 14.000 rpm por 10'.
5. Descartar o sobrenadante e secar o tubo na estufa a 37°.
6. Adicionar 100 μ L de Etanol a 70%.
7. Inverter o tubo várias vezes para lavar o pellet de DNA.
8. Centrifugar 14.000 rpm por 6'.
9. Descartar o Etanol com cuidado para não perder o pellet de DNA. (remover com ponteira).
10. Inverter e secar o tubo sobre um papel absorvente durante 15'.

HIDRATAÇÃO DO DNA

1. Adicionar 20 μ L de DNA Hydration Solution (20 μ L fornecerão uma concentração total de 50ng, cujo rendimento é 1 μ g de DNA)
2. Deixar o DNA reidratar OVERNIGHT a temperatura ambiente. Alternativamente, aqueça por 65° por 1 hora, agitando o tubo ocasionalmente.
3. Estocar o DNA a 2 – 8°.

ANEXO H — AMPLIFICAÇÃO DE DNA POR PCR

1 Protocolo de amplificação por PCR

Os fragmentos de DNA de Papilomavírus Humano (HPV) foram amplificados pela técnica da Reação da Polimerase em Cadeia (PCR), utilizando *primers* específicos para regiões genômicas de HPV.

As reações de PCR foram realizadas de acordo com o protocolo apresentado na tabela 1 sendo o volume final de cada reação igual a 25µL. Os volumes de água e de DNA acrescidos na reação oscilarão em alguns casos de acordo com a concentração de DNA da amostra.

Tabela 1 – Protocolo das reações de PCR individuais para amplificação de fragmentos de genoma de HPV

Reagentes	Concentração Inicial	Concentração Final	Volume/ reação (µL)
H ₂ O miliq	N/A	N/A	14,0
Tampão 10X	10X	*1X	2,5
MgCl ₂	50mM	3,5mM	2,0
DNTP's	200mM	200mM	2,5
Primers GP5+/6+	15pmol	15pmol	1,75
Taq polimerase	5U/mL	2,5U	0,25
DNA(amostra)	8-12 ng/mL	-	2,0

- Usar 2,5 do tampão 10X, porém na solução ficará a 1X; N/A: não aplicável.

Para cada análise de amplificação foi utilizado um protocolo específico de acordo com os *primers* utilizados, os protocolos de termociclagem seguem as tabelas 2 e 3.

Tabela 2 – Protocolo de termociclagem para amplificação de fragmentos de genoma HPV, utilizando os *primers* GP5+/6+

Estágios	Temperatura °C	Tempo (minutos)	Números de ciclos
Desnaturação inicial	94	4	1
Desnaturação cíclica	94	1	40
Anelamento	41,5	2	
Extensão cíclica	72	1	

Extensão final	72	7	1
Repouso	4	Infinito	N/A

N/A: não aplicável

Tabela 3 – Protocolo de termociclagem para amplificação de fragmentos de genoma HPV, utilizando os *primers* D8S135

Estágios	Temperatura °C	Tempo (minutos)	Números de ciclos
Desnaturação inicial	94	5	1
Desnaturação cíclica	94	1	10
Anelamento (<i>Touchdown</i>)	56	0,4	20
Extensão	72	0,4	
Desnaturação cíclica	94	1	20
Anelamento	46	0,4	
Extensão cíclica	71	0,4	
Desnaturação cíclica	94	1	1
Anelamento	46	0,4	
Extensão cíclica	72	0,4	
Extensão final	72	4	N/A
Repouso	4	Infinito	

N/A: não aplicável

ANEXO I — ELETROFORESE EM GEL DE POLIACRILAMIDA

1 Protocolo de eletroforese

Neste trabalho, todos os géis utilizados para separar fragmentos de DNA, amplificados por PCR, foram de poliacrilamida a 8% (tabela I). Para a realização da eletroforese submeteram-se os géis a uma voltagem constante de 10V/cm, por um tempo médio de 2:00h em TBE1X. Em cada canaleta, foram aplicados cerca de 10 μ L de amostra amplificada com 3 μ L de corante de corrida. Após realizada a corrida eletroforética, os géis foram corados ,utilizando solução de nitrato de prata, ou pela solução de brometo de etídeo (0,5 μ g/ml) por 20 a 30 minutos. E finalmente, os fragmentos foram visualizados em luz ultravioleta por meio do Vídeo Documentation System (VDS)[®] *Amersham Pharmacia Biotech*, EUA.

A acrilamida é um monômero neurotoxico potente com ação cumulativa. O brometo de etídeo é uma substância altamente mutagênica e carcinogênica. Por isso, deve-se trabalhar com esses produtos com equipamentos de proteção adequados.

O gel de poliacrilamida é recomendado para o tamanho dos fragmentos esperados, pois permitem a separação de fragmentos muito pequenos de até 500pb.

Tabela I – Protocolo de preraparação do gel de poliacrilamida a 8%

Gel para cuba de 45 mL	
Reagentes	Volume
Acrilamida 40%	9,0 mL
TBE 10X	4,5 mL
H ₂ O dd	31,5 mL

APS 10%	450 μ L
TEMED	45 μ L

* Para a confecção da acrilamida a 40% acrescenta-se acrilamida e bis-acrilamida em uma proporção 19:1 ou 38g de acrilamida para 2g de bis – acrilamida q.s.p. 100mL.

2 Soluções utilizadas

2.1 TRIS-BORATO DE EDTA (TBE 10X)

- Tris Base 108g
- Ácido Bórico 55g
- EDTA 0,5 M (pH 8.0) 40 ml
- H₂O dd q.s.p 1 litro

2.3 PERSULFATO DE AMÔNIA (APS 10%)

- APS 10g
- H₂O dd Q.S.P 100 ml

2.2 EDTA 0,5M Ph (8.0)

- EDTA (p.m 372,24) 186,12g
- H₂O dd q.s.p 1000 ml
- Controle do pH com NaOH(20g NaOH)

2.4 CORANTE DE CORRIDA 6X

- Azul de Bromofenol 0,25%
- Xileno Cianol FF 0,25%
- Ficol tipo 4000 15%
- EDTA 120mM

2.5 TAMPÃO DE ELETROFORESE

Usa-se o tampão de corrida TBE 1X produzido a partir do tampão stock TBE 10X.
A corrida é controlada a 10V/cm.

