

LUCIELMA SALMITO SOARES PINTO

**CORRELAÇÃO DAS CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS,
HISTOPATOLÓGICAS E EXPRESSÃO DE ÁCIDO GRAXO
SINTASE E ErbB2, EM CARCINOMAS ESPINOCELULARES
BUCAIS DE PACIENTES COM RECIDIVA LOCAL PRECOCE.**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
de Piracicaba, da Universidade Estadual de
Campinas, para a obtenção do Título de
Doutor em Estomatopatologia.

Orientador: Prof. Dr. Márcio Ajudarte Lopes

**PIRACICABA
2008**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA

Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

P658c

Pinto, Lucielma Salmito Soares.

Correlação das características clínicas, histopatológicas e expressão de ácido graxo sintase e ErbB2 em carcinomas espinocelulares bucais de pacientes com recidiva local precoce. / Lucielma Salmito Soares Pinto. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2008.

Orientador: Márcio Ajudarte Lopes.

Tese (Doutorado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Boca – Câncer. 2. Imunohistoquímica. 3. Prognóstico. I. Lopes, Márcio Ajudarte. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

(mg/fop)

Título em Inglês: Correlation among clinical and pathological characteristics and expressions of FAS and ErbB2 in early local recurrent oral squamous cell carcinoma

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Oral cancer. 2. Immunohistochemistry. 3.

Prognosis

Área de Concentração: Estomatologia

Titulação: Doutor em Estomatopatologia

Banca Examinadora: Albina Messias de Almeida Milani Altemani, Edgard Graner, Fábio

Augusto Ito, Luiz Paulo Kowalski, Márcio Ajudarte Lopes

Data da Defesa: 20-02-2008

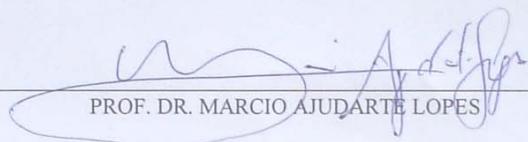
Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Tese de DOUTORADO, em sessão pública realizada em 20 de Fevereiro de 2008, considerou a candidata LUCIELMA SALMITO SOARES PINTO aprovada.



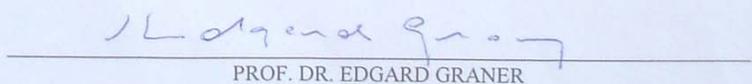
PROF. DR. MARCIO AJUDARTE LOPES



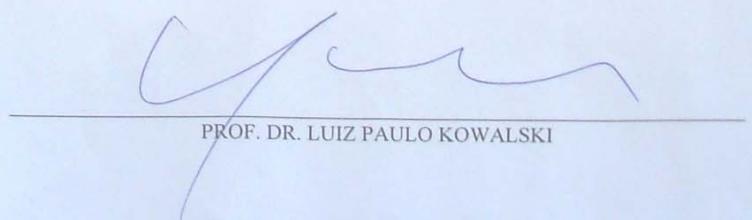
PROF^a. DR^a. ALBINA MESSIAS DE ALMEIDA MILANI ALTEMANI



PROF. DR. FABIO AUGUSTO ITO



PROF. DR. EDGARD GRANER



PROF. DR. LUIZ PAULO KOWALSKI

Dedico este trabalho aos meus pais, **José Francisco da Silva Pinto** e **Vanessa Salmito Soares Pinto**, pelo amor, apoio e confiança que sempre depositaram em mim, aos meus queridos irmãos **Danilo** e **Eduardo**, e ao meu noivo **Alexandre** pelo incentivo fundamental para que eu atingisse mais este objetivo.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por tornar possível a realização desse sonho.

Agradeço à Faculdade de Odontologia de Piracicaba / Universidade Estadual de Campinas, na pessoa do seu Diretor Prof. Dr. Francisco Haiter Neto, por proporcionar crescimento técnico-científico e cultural.

Ao Prof. Dr. Mário Alexandre Coelho Sinhoreti, coordenador dos Cursos de Pós-Graduação da FOP/UNICAMP.

Ao CNPq, Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão da bolsa de estudo.

Ao Prof. Dr. Jacks Jorge Júnior, Coordenador do Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia, por seus ensinamentos, especialmente em estomatologia, pela sua dedicação e amizade.

Ao Prof. Dr. Márcio Ajudarte Lopes, por sua atenção, incentivo e exemplos pessoal e profissional que me acompanharão. Pela orientação recebida, fundamental para a elaboração e conclusão deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Oslei Paes de Almeida, por dividir seu enorme conhecimento, em especial em histopatologia, e por seu exemplo de dedicação profissional. Todo o meu respeito e gratidão.

Ao Prof. Dr. Osvaldo Di Hipólito Júnior, pela orientação recebida no mestrado, por seu apoio e incentivo.

Aos Profs. Drs. Edgard Graner, Pablo Agustin Vargas e Ricardo Della Coletta por todos os ensinamentos transmitidos.

Aos amigos Ana Carolina de Mesquita Netto, Andréia Aparecida da Silva, Cynthia Bicalho Borini, Eduardo Bauml Campagnoli e Maíse Amorim Mendonça que com sua amizade fizeram tudo parecer mais fácil.

Aos amigos da pós-graduação: Jorge Esquiche Leon, Francisco Carlos A. Aguiar Júnior, Danyel Elias da Cruz Perez, Fábio Augusto Ito, Fabio Ornelas Prado, Michele Agostini, Sabrina Daniela da Silva, Dawton A. Pulhez, Guilherme Martinez Mata, Lília Alves Rocha, Patrícia Gemma Abrahão, Rebeca de Souza Azevedo, Michele Gassen Kellermann, Lays Martin Sobral, Alan Roger dos Santos Silva, Mário José Romanach Gonzales Sobrinho, Luiz Alcino Monteiro Gueiros, Ademar Takahama Junior, Adrielle Ferreira Gouvêa, Maria Fernanda Destro, Carolina Cavalcanti Bitu, Débora C. Bastos, Fabiana Seguin, Lívia Maris Paranaíba, Victor Hugo Rizo, Fernanda Viviane Mariano, Kenia Regina Silva, Ana Terezinha M. Mesquita e Marcelo Rodrigues pelos bons momentos que compartilhamos, pela ajuda que cada um soube prestar ao longo deste trabalho e de minha formação.

Aos amigos Rogério de Andrade Elias, Valéria Totti, Aparecida Conceição Champion e Débora Gazola pela companhia, amizade e pelos ensinamentos a mim transmitidos durante todo o período em que estive no Orocentro.

À funcionária Ana Cristina do Amaral Godoy pela sua atenção e apoio durante todo o curso de pós-graduação.

Agradeço aos funcionários da área de Patologia, Adriano Luis Martins, João Gomes da Silva, Rosa Maria Fornasiari e Valéria Alessandra Franco pelo auxílio e colaboração para o desenvolvimento desse trabalho.

Enfim, agradeço a todos que de algum modo contribuíram para que este sonho se tornasse realidade.

*“Se as coisas são inatingíveis... ora!
Não é motivo para não querê-las...
Que tristes os caminhos, se não fora
A presença distante das estrelas!”*

Mário Quintana

RESUMO

O carcinoma espinocelular (CEC) bucal ocorre em cerca de 30% dos casos. O reconhecimento de fatores prognósticos confiáveis pode resultar na predição do comportamento tumoral e prevenção de falhas no tratamento. O objetivo deste estudo foi analisar a correlação entre as características clínicas, histopatológicas e imunohistoquímicas em casos de CEC bucal com recidiva local precoce. Desta forma, 69 casos de carcinoma bucal sem tratamento prévio para tumores de cabeça e pescoço foram selecionados, sendo que 23 apresentaram recidiva precoce e 46 sem recidiva. Informações clínicas foram obtidas dos prontuários e as características histopatológicas foram avaliadas de acordo com os sistemas de gradação de Anneroth *et al.* (1987) e Bryne *et al.* (1992). Reações imunohistoquímicas foram feitas para FAS e ErbB2. Nossos resultados mostraram uma predileção pelo gênero masculino (89,85%) com idade média de 55,5 anos. Apesar de não ser estatisticamente significativa, observou-se um risco relativo de 2,62 e 2,89 para que usuários de fumo e o álcool desenvolvam recidiva local, respectivamente. Notou-se relação estatisticamente significativa entre o tratamento apenas cirúrgico e o desenvolvimento de recidivas ($p = 0,03$). A soma dos escores de Anneroth *et al.* (1987) maior que 15 foi estatisticamente associada à recidiva ($p = 0,03$). Menor expressão de FAS e maior expressão de ErbB2 citoplasmático foram estatisticamente associadas à recidiva tumoral ($p = 0,01$). Estiveram associados à pior sobrevida: o uso de álcool ($p = 0,0028$), e piores escores obtidos nos parâmetros queratinização ($p < 0,0001$), padrão de invasão ($p < 0,0001$) e inflamação ($p < 0,0001$) segundo Anneroth *et al.* (1987). A maior expressão de FAS esteve também significativamente associada à maior sobrevida global dos pacientes ($p = 0,0002$). Apesar de não estatisticamente significativa, FAS foi correlacionada com a queratinização ($p = 0,08$) e de forma significativa estatisticamente, a queratinização relacionou-se com ErbB2 expresso em membrana ($p = 0,0006$). De acordo com os nossos resultados, sugerimos a utilização do sistema de Anneroth *et al.* (1987), bem como o estudo

imunohistoquímico com os marcadores FAS e ErbB2 para melhor compreensão do comportamento dos CECs bucais.

ABSTRACT

Oral squamous cell carcinoma (SCC) recurs locally in about 30% of cases. The recognition of reliable factors may result in the tumor behavior prediction and prevent treatment failures. The purpose of this study was to evaluate the correlation among clinical, histopathological and immunohistochemical features in oral SCC with early local recurrence. Sixty-nine cases of oral SCC without previous treatment for head and neck tumors were selected, being: 23 cases with early local recurrence and 46 cases without recurrence. Clinical data were obtained from the medical records and the histopathological features were assessed according Anneroth's and Bryne's histological grading of malignancy. Immunohistochemical reactions for FAS and ErbB2 were performed. Our results showed a male predilection (89.85%), with a mean age of 55.5 years. Although there were no statistical differences, relative risks of 2.62 and 2.89 were observed for smokers and alcohol drinkers have local recurrence, respectively. Significant differences were observed between surgical treatment and local recurrence ($p = 0.03$). The sum of the Anneroth's histological grading degrees exceeding 15 was statistically associated to local recurrence ($p = 0.03$). Lower FAS and more cytoplasmic ErbB2 expression were statistically correlated to local recurrence ($p = 0.01$). An association between overall survival and alcohol use was observed ($p = 0.0028$). The parameters keratinization ($p < 0.0001$), mode of invasion ($p < 0.0001$) and lymphoplasmocytic infiltration ($p < 0.0001$) according Anneroth's histological grading were related to overall survival. More FAS expression was also associated with better overall patients survival ($p = 0.0002$). Although there was no statistical difference, FAS was related to keratinization ($p = 0.08$), similar but statistically, keratinization was associated with membrane ErbB2 expression ($p = 0.0006$). According our results, we suggest the use of Anneroth's histological grading system as well as the immunohistochemical markers FAS and ErbB2, for best comprehension of OSCC's behavior.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	1
2 REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1 Carcinoma espinocelular bucal	3
2.2 Gradação histopatológica	14
2.3 Ácido graxo sintase (FAS) e ErbB2	21
3 PROPOSIÇÃO	25
4 MATERIAL E MÉTODOS	27
4.1 Análise histopatológica	27
4.2 Reações imunohistoquímicas	29
4.3 Análise estatística	31
5 RESULTADOS	33
5.1 Características epidemiológicas e clínicas	33
5.2 Características histopatológicas	37
5.3 Expressão imunohistoquímica	54
5.4 Análises de sobrevida	57
5.5 Correlação entre queratinização e expressões de FAS e ErbB2	71
5.6 Correlação entre as variáveis FAS e ErbB2	74
6 DISCUSSÃO	77
7 CONCLUSÕES	85
REFERÊNCIAS	87
ANEXOS	97

1 INTRODUÇÃO

Estimativas recentes apontam para 14.160 casos novos de carcinoma bucal, no ano de 2008 no Brasil, sendo que mais de 90% deste número corresponde ao carcinoma espinocelular (CEC) bucal (Brasil, 2007). O prognóstico desta neoplasia é geralmente baseado no estadiamento clínico TNM do paciente e em alguns parâmetros histopatológicos (Niimi *et al.*, 2001; Carvalho *et al.*, 2003). Apesar de diversos esforços, como cirurgias agressivas e radioterapia adjuvante, a recorrência local ou regional da doença ocorre em 18% a 76% dos casos (Carvalho *et al.*, 2003). A recorrência local, ou seja, a ocorrência de um carcinoma em menos de 2cm de distância da lesão primária, é considerada um dos maiores empecilhos para a melhoria das taxas de sobrevida em 5 anos nas últimas duas décadas. Como os resultados de um retratamento são freqüentemente pobres, a primeira intervenção corresponde a maior possibilidade de cura do paciente (Carvalho *et al.*, 2003; Koo *et al.*, 2006).

No intuito de reconhecer precocemente lesões que possam apresentar um comportamento mais agressivo, com recorrência ou desenvolvimento de metástases, diversos estudos têm sido realizados, buscando associação entre estes tumores e características histopatológicas específicas ou expressão de marcadores moleculares (Lopes *et al.*, 2002; Liao *et al.*, 2007a). Recentemente, observou-se que tanto a ácido graxo sintase (FAS), enzima que fisiologicamente, atua na síntese de membranas e produção de ácidos graxos, como a oncoproteína ErbB2, que é um receptor de superfície com atividade de tirosina quinase, estão aumentadas em algumas neoplasias malignas, inclusive no CEC bucal (Krontiras *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2007). Uma conexão molecular entre os genes de FAS e ErbB2 já foi observada (Kumar-Sinha *et al.*, 2003). Interessantemente, em CECs bucais a marcação de FAS e de ErbB2 em membrana estão fortemente associadas e sua co-expressão indica melhor

prognóstico. Além disso, a expressão de FAS é vista especialmente em casos bem diferenciados, o que pode ser explicado pela sua participação no processo de queratinização (Silva *et al.*, 2007).

O estudo de marcadores biológicos, como FAS e ErbB2, e sua associação com características clínicas e histopatológicas pode resultar em informações úteis para a determinação do prognóstico e individualização do tratamento dos pacientes com esta neoplasia.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Carcinoma espinocelular bucal

Epidemiologia

Recente publicação do Instituto Nacional do Câncer (INCA) revelou que em 2005, de um total de 58 milhões de mortes ocorridas no mundo, o câncer foi responsável por 7,6 milhões, o que representou 13% de todas as mortes. Desta forma, o câncer já é considerado como a segunda maior causa de morte, atrás somente da doença cardiovascular, na maioria dos países desenvolvidos e em desenvolvimento da América do Sul e Ásia (Brasil, 2007). Os tipos de câncer mais associados à mortalidade foram o de pulmão, estômago, fígado, cólon e mama. Adicionalmente, além de mais da metade dos casos da doença ocorrer em países em desenvolvimento, é também nesses países mais pobres que se concentra cerca de 70% do número total de óbitos (WHO, 2006). Estima-se que o número de casos novos anuais no mundo salte dos 10 milhões vistos em 2000 para a ordem de 15 milhões em 2020, devido principalmente ao envelhecimento da população, à urbanização e adoção de novos estilos de vida. No Brasil, as estimativas do INCA prevêm para o ano de 2008, 466.730 novos casos de câncer, sendo que 115.010 são cânceres de pele não melanoma (Brasil, 2007).

Outros números que merecem destaque com relação ao câncer dizem respeito à crescente proporção dos gastos em saúde, devido ao aumento dos casos, à complexidade dos tratamentos, que envolvem diversos medicamentos e equipamentos de alto custo, e à mudança dos cuidados que levaram ao maior controle da doença (Bosanquet & Sikora, 2004). Dados do Reino Unido mostram

que os gastos em saúde com o câncer aumentaram 52% do ano 1.990 ao ano 2.000. Dentre as neoplasias consideradas mais caras, observam-se os cânceres de ovário, esôfago, pâncreas, cólon, pulmão, linfomas e de cabeça e pescoço (Bosanquet & Sikora, 2004). Estudos do INCA evidenciam que o crescente custo do tratamento do câncer já pode ser sentido no Brasil, pelos setores públicos e privados. Uma avaliação envolvendo o setor privado de saúde fez uma previsão de que entre 2008 e 2010, o tratamento do câncer em estágios avançados será quase oito vezes mais caro do que se esses mesmos pacientes tivessem sua doença detectada na fase inicial (Brasil, 2007).

Estimativas do INCA prevêem 14.160 novos casos de câncer bucal para o ano de 2008 no Brasil. Esta neoplasia é uma das mais freqüentes, sendo considerada a quinta entre homens e a sétima entre as mulheres, com estimativa de respectivamente, 10.380 e 3.780 casos novos para 2008 (Brasil, 2007). Entre as neoplasias da cavidade oral e orofaringe, mais de 90% correspondem a carcinomas espinocelures, enquanto os tumores de glândulas salivares e sarcomas são considerados menos comuns. O carcinoma espinocelular (CEC) apresenta maior prevalência no gênero masculino, com uma proporção de 3:1, em decorrência da maior associação com o tabagismo e o alcoolismo entre os homens. Entretanto, a proporção homem/mulher vem diminuindo provavelmente devido à adoção desses hábitos também pelas mulheres (Iamaroon *et al.*, 2004; Barnes *et al.*, 2005; Scully & Felix, 2006). Como um reflexo dessa situação, um estudo epidemiológico realizado no Reino Unido aponta para significantes taxas de crescimento na incidência de câncer entre homens e mulheres de respectivamente, 18% e 30% (Scully & Bagan, 2007).

O CEC acomete preferencialmente indivíduos da sexta a oitava décadas de vida, sendo que apenas de 0,4% a 3,9% desses tumores ocorrem em pacientes com menos de 40 anos (Sasaki *et al.*, 2005). Uma revisão na literatura feita por Stolk-Liefferink *et al.* (2007) de 1970 a 2005 revelou apenas 65 casos de CEC envolvendo pacientes pediátricos, com menos de 20 anos. Entretanto, um aumento significativo na incidência de CEC em indivíduos jovens, particularmente

homens, tem sido relatado nos últimas décadas na maioria dos países ocidentais. No Reino Unido, a taxa média de aumento anual na incidência de CEC entre pacientes abaixo de 45 anos e acima de 45 anos é de respectivamente, 3.5% e 2.4% (Scully & Bagan, 2007). Os papéis dos fatores de risco tradicionais como álcool e tabagismo, ainda não estão bem claros em pacientes mais jovens, desta forma alguns estudos apontam para a existência de predisposição à instabilidade genética nestes pacientes (Iamaroon *et al.*, 2004).

Etiologia

Os carcinomas têm origem a partir do dano ao DNA celular, o que pode ocorrer espontaneamente, provavelmente devido à ação de radicais livres, ou devido agentes químicos carcinógenos, radiação ionizante e microrganismos. Múltiplos eventos moleculares causam dano ao material genético afetando diversos cromossomos e genes e promovendo alterações no DNA. O acúmulo dessas alterações gera células neoplásicas, com crescimento autônomo e capacidade de invasão (Scully & Felix, 2006). É importante que seja entendido que a carcinogênese é um processo complexo que envolve múltiplas alterações patológicas do material genético, resultando conseqüentemente, em dano também no material transcrito, isto é nas proteínas, que desempenham importantes funções na manutenção do controle celular (Chen *et al.*, 2007). O desenvolvimento do CEC é precedido pelo desenvolvimento de alterações genéticas múltiplas e clonais, que levam uma população celular a crescer com vantagem sobre as demais. Devido ao mecanismo pelos quais os fatores de risco causam a transformação maligna, como por exemplo, a exposição crônica aos carcinógenos do tabaco, grande número de alterações moleculares têm sido associadas com o processo da carcinogênese. Além das mutações nos proto-oncogenes e genes supressores de tumor, existem também alterações citogenéticas, epigenéticas e

mutações mitocondriais implicadas no desenvolvimento do CEC bucal (Mithani *et al.*, 2007).

Os fatores de risco mais associados ao desenvolvimento do CEC bucal são o consumo de álcool e o tabagismo (Johnson, 2001; Wunsch-Filho, 2002; Mansour *et al.* 2003; Scully & Felix, 2006). Estes fatores são fortemente sinérgicos e responsáveis por 75% das neoplasias orais e de orofaringe na Europa, Américas e Japão (Barnes *et al.*, 2005). Entretanto, inúmeros outros fatores podem também atuar como agentes carcinogênicos como: deficiência de vitaminas A, E ou C, dificuldades em metabolizar carcinógenos e em reparar danos do DNA, defeitos imunes e vírus (Barnes *et al.*, 2005; Scully & Felix, 2006).

Mais de 300 carcinógenos têm sido identificados na fumaça do cigarro ou em seus componentes hidrossolúveis que se misturam à saliva. Os principais e mais estudados desses carcinógenos são hidrocarbonetos aromáticos e as nitrosaminas específicas do tabaco. O benzopireno é hidrocarboneto aromático altamente carcinógeno, e cada cigarro possui de 20 a 40 nanogramas desta substância. As nitrosaminas agem localmente nas células basais do epitélio, além de serem absorvidas e poderem agir em outros tecidos do corpo, produzindo alterações no DNA não só de células epiteliais, mas também inflamatórias, interferindo na sua replicação. O metabolismo desses carcinógenos normalmente envolve a ação das enzimas P450 nos citocromos e da GST (glutathione S-transferase). Polimorfismo nos genes P450 e GST estão em estudo a fim de identificar marcadores genéticos da susceptibilidade para cânceres de cabeça e pescoço assim como de outros sítios (Johnson, 2001).

O efeito carcinogênico do álcool independente do papel do cigarro foi inicialmente descrito em 1961 e desde então o álcool tem sido associado aos cânceres de boca, faringe, laringe, esôfago, fígado, cólon, reto e de mama e ainda é pesquisada uma relação com os cânceres de pulmão e pâncreas. Apesar dos seus mecanismos carcinogênicos ainda não serem completamente entendidos e provavelmente diferirem nos vários tecidos, diversas pesquisas sugerem uma modulação pelo polimorfismo de genes que codificam enzimas que atuam no

metabolismo alcoólico, como as álcool e aldeído desidrogenases e enzimas P450, enzimas do metabolismo do folato e do reparo do DNA (Boffetta & Hashibe, 2006). Sabe-se também que o etanol puro não funciona como um carcinógeno em estudos animais, servindo apenas como solvente para outras substâncias. Entretanto, um dos seus principais metabólitos, o acetaldeído, é um forte candidato a agente carcinogênico. Estudos *in vitro* com células humanas mostraram que o acetaldeído é capaz de alterar o DNA e estudos em animais evidenciaram que a inalação de acetaldeído causa adenocarcinomas no trato respiratório e CECs em mucosa nasal e laringe. Outras prováveis formas de ação do álcool incluem a produção de espécies reativas de oxigênio e nitrogênio, aumento na concentração de estrogênio, importante para o câncer de mama, e mudanças no metabolismo do folato (Boffetta & Hashibe, 2006).

A associação entre o HPV (papilomavírus humano) e os cânceres de cabeça e pescoço baseou-se na similaridade entre as lesões genitais e orais e tem sido investigada há pelo menos 20 anos, apesar disso, o papel do HPV na carcinogênese bucal ainda apresenta controvérsias (Syrjanen, 2007). A infecção pelo HPV, especialmente dos tipos altamente oncogênicos em colo uterino e pele, HPV 16 e 18, é vista em pequena parcela de cânceres de boca e em mais de 50% dos casos de tumores em tonsila e orofaringe (Barnes *et al.*, 2005). Um parâmetro molecular crítico que suporta o efeito causal do HPV 16 em CEC de cabeça e pescoço é a expressão dos oncogenes E6 e E7 associados à inativação de p53 e pRB (proteína do retinoblastoma), respectivamente (Nair & Pillai, 2005). Estudo recente revelou um risco aumentado 14 vezes para câncer de orofaringe em paciente soropositivos para HPV16 e sugeriu que a exposição ao HPV pode preceder a aparência do câncer em 10 ou mais anos (Mork *et al.*, 2001). Tsantoulis *et al.* (2007) sugeriram que o HPV sozinho é incapaz de induzir a transformação maligna nas células orais, o que seria possibilitado apenas em sinergismo com os demais agentes carcinogênicos. Além disso, apesar de não ser sabida a implicação clínica de tais informações, observou-se que os pacientes com CEC bucal positivos para o HPV parecem ser mais jovens, consumir menos

álcool e tendem a apresentar um melhor prognóstico (Tsantoulis *et al.*, 2007). O EBV (Epstein-Barr vírus) é um membro da família herpes vírus. Embora sua participação esteja associada à transformação maligna de linfócitos, sua influência na carcinogênese bucal ainda não foi bem estabelecida (Tsantoulis *et al.*, 2007).

Outros fatores de risco têm um mecanismo menos elucidado, como as deficiências de ferro, antioxidantes, vitaminas A, C e E e elementos como zinco e selênio. Uma maior incidência de câncer do trato gastrointestinal superior é observada em mulheres adultas com anemia crônica, disfagia, glossite e mucosa atrófica com associação às síndromes de Plummer-Vinson ou Patterson-Brown-Kelly. Em animais, a deficiência de ferro leva à atrofia do epitélio e se exposto a carcinógenos, há um risco aumentado de CEC. De 13 estudos caso-controle que examinaram a relação entre o consumo de frutas e vegetais e o CEC bucal e de faringe, 11 apresentaram um efeito protetor destes alimentos. A redução do risco de desenvolver um câncer, do maior para o menor consumo de frutas varia de 20% a 80% e é mais evidente em língua e faringe. Um poderoso efeito protetor também é observado no consumo de vegetais ricos em carotenóides e frutas cítricas (Johnson, 2001). Estudos estimam que 15% dos cânceres de boca e faringe da Europa podem ser atribuídos a deficiências na dieta, o que resultaria em cerca de 5.000 mortes por ano (La Vecchia *et al.*, 1997).

Aspectos clínicos

As lesões bucais, mais comuns em borda lateral posterior de língua, soalho bucal, gengiva, rebordo alveolar, palato mole e mucosa jugal, podem apresentar-se clinicamente como ulcerações, lesões de aspecto leucoplásico, eritroplásico ou eritroleucoplásico e lesões exofíticas de superfície verrucosa, crostosa ou granular, as bordas são geralmente irregulares, endurecidas e elevadas e sua duração geralmente é superior a 3 semanas (Silva *et al.*, 2004;

Scully & Felix, 2006). Pacientes com pequenas lesões orais ou de orofaringe são usualmente assintomáticos ou com sintomas mínimos, entretanto com o avanço das lesões, as queixas podem surgir e variar de acordo com o estágio e o local de envolvimento da doença, as mais comuns são dor, odor, disfagia, odinofagia, disfonia, sangramento, perda de peso, dificuldade em abrir a boca e aumento de volume em linfonodos cervicais. Estágios ainda mais avançados podem apresentar extensas áreas de necrose envolvendo estruturas adjacentes como ossos e músculos, fístula orocutânea, anemia severa e caquexia (Barnes *et al.*, 2005; Scully & Felix, 2006).

De acordo com a localização do CEC, especialmente em lesões adjacentes ao rebordo, radiografias intraorais e panorâmica podem auxiliar na identificação do envolvimento ósseo pelo tumor. Exames como endoscopia, radiografia, ultra-sonografia, CT (tomografia computadorizada), RMI (imagem por ressonância magnética), cintilografia óssea ou modalidades mais modernas como o PET (tomografia por emissão de pósitrons) podem ser utilizados para o estadiamento do paciente, investigação de linfonodos cervicais e metástases à distância, e planejamento do tratamento (Scully & Bagan, 2007).

Além da necessidade da avaliação de metástases à distância, geralmente envolvendo pulmão, ossos, pele, fígado, mediastino, linfonodos axilares, rins e músculos, deve-se considerar também a possibilidade de existirem segundos tumores primários, mais comuns nos tratos aéreo e digestivo superiores (Braakhuis *et al.*, 2002; Barnes *et al.*, 2005; Liao *et al.*, 2007a). A justificativa para a ocorrência de segundos tumores primários deve-se ao fato de os CECs de cabeça e pescoço serem envolvidos em uma teoria de cancerização em campo, pois todo o epitélio do trato aéreo e digestivo alto é repetidamente exposto aos carcinógenos, colocando todo este campo no risco do desenvolvimento de tumores (Shin *et al.*, 1996).

Aspectos histopatológicos

Do ponto de vista microscópico, as lesões de CEC bucal apresentam-se como proliferações de células epiteliais neoplásicas com perda da camada basal e invasão do tecido conjuntivo subjacente. As células podem apresentar núcleos hiper cromáticos, nucléolos evidentes e figuras de mitoses atípicas. O tecido em crescimento invade o conjuntivo subjacente, formando ninhos ou ilhas epiteliais. Focos de necrose, pérolas de queratina, áreas de invasão de vasos sanguíneos, linfáticos e nervos podem também ser observados (Neville *et al.*, 1998; Barnes *et al.*, 2005; Pereira *et al.*, 2007). Uma minoria dos CECs bucais pode mostrar diferentes subtipos histológicos, os principais são os carcinomas verrucoso, basalóide, papilar, de células fusiformes, acantolítico, adenoescamoso e cuniculatum (Pereira *et al.*, 2007).

O carcinoma verrucoso é uma variante bem diferenciada do carcinoma espinocelular com comportamento indolente e excelente prognóstico. Embora a cavidade bucal seja o sítio mais comumente afetado, 75% dos casos, este tumor pode ser visto também na região genital e pele das extremidades, principalmente planta dos pés. Clinicamente, caracteriza-se por crescimento exofítico de superfícies queratóticas e projeções verrucosas, e microscopicamente, há uma lesão bem diferenciada de epitélio pavimentoso estratificado sem atipias marcantes e com projeções largas para o conjuntivo subjacente preenchidas com orto ou paraqueratina. Metástases regionais ou à distância são raras. (Neville *et al.*, 1998; Barnes *et al.*, 2005; Pereira *et al.*, 2007). O CEC basalóide é uma variante rara e agressiva, que acomete usualmente a laringe, faringe, epiglote e base de língua, e em menor frequência, palato, assoalho bucal e tuberosidade maxilar têm sido descritos. Há predileção por homens tabagistas e usuários de álcool, nas sexta e sétima décadas de vida. Clinicamente, o tumor aparece como uma massa exofítica ulcerada e firme; microscopicamente, exhibe padrão lobular, cribiforme, tubular, em cordões ou pseudo-glandular conectado à superfície do

epitélio. As células da periferia dos lóbulos são geralmente em paliçada, com núcleo hipercromático e citoplasma escasso. As áreas centrais dos lóbulos são caracterizadas por espaços císticos, às vezes contendo material PAS-positivo que lembra mucina, e comedonecrose. Os demais subtipos de CEC são observados preferencialmente em laringe e faringe, e devido o número restrito de casos na cavidade bucal, informações a respeito de seus prognóstico e comportamento clínico não são bem estabelecidas (Barnes *et al.*, 2005; Pereira *et al.*, 2007).

A classificação TNM (tumor-linfonodo-metástase) é um sistema de estadiamento clínico em que os pacientes são classificados de acordo com as características do T (tumor primário), N (linfonodos) e M (metástases à distância). O TNM é subdividido em 4 estádios: de uma forma geral, o nível I envolve tumores iniciais, com menos de 2cm de diâmetro e sem metástases cervicais ou à distância, os níveis II e III são intermediários e englobam tumores de maior tamanho com ou sem metástase cervical homolateral mas sem metástases à distância, enquanto o nível IV abrange tumores em estádios mais avançados, envolvendo estruturas adjacentes como músculos, pele ou seio maxilar, ou há mais de um linfonodo comprometido pela doença, ou frente a qualquer tumor ou envolvimento cervical, existe metástase à distância. O estádio do TNM do paciente é acessado e considerado conjuntamente com a experiência da instituição em questão, a saúde geral e as preferências do paciente, no intuito de determinar a conduta terapêutica. Maior taxa de sobrevida, menor morbidade e cirurgias menos mutilantes estão diretamente relacionadas ao diagnóstico precoce desta neoplasia (Scully & Felix, 2006). Entretanto, menos de 1% dos casos de CEC na cavidade oral são detectados precocemente, ainda como carcinoma *in situ*, sendo que a maioria, cerca de 60% dos casos, é diagnosticada em estágios avançados e conseqüentemente, pior prognóstico (Silva *et al.*, 2004).

Tratamento

O tratamento para o CEC bucal varia consideravelmente. Desde cirurgia (com ou sem dissecação do pescoço) ou radioterapia até uma combinação de cirurgia, radioterapia com ou sem quimioterapia, de acordo com a extensão local do tumor, do comprometimento linfonodal, experiência do profissional, das preferências e condição de saúde do paciente e dos recursos da instituição (Boyle *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2003).

Pacientes com carcinomas em estágios iniciais podem ser tratados com resultados comparáveis tanto por cirurgia como por radioterapia. Carvalho *et al.* (2003) descreveram que no Brasil, na década de 60, a maioria dos casos era tratada por cirurgia, porém, nas décadas seguintes optou-se preferencialmente por radioterapia, e a partir da década de 90, aumentou-se o número de tratamentos combinados com estas duas modalidades. Casos mais avançados eram tratados geralmente com radioterapia, dos anos 50 aos anos 80, entretanto, também desde o início dos anos 90, o tratamento é feito na maioria das vezes, com cirurgia e radioterapia (Carvalho *et al.*, 2003). Agentes quimioterápicos podem ser utilizados como tratamento adjuvante, entretanto, apesar de poderem reduzir de alguma forma o tamanho dos tumores, nenhum agente especificamente foi capaz de aumentar as taxas de sobrevida (Neville *et al.*, 2004; Scully & Felix, 2006).

Apesar das divergências com relação a este tema entre as várias instituições, há um forte suporte da literatura para que os CECs bucais em geral sejam abordados cirurgicamente, com a remoção dos linfonodos cervicais e implementação com radioterapia adjuvante pós-operatória, quando apropriado (Boyle *et al.*, 2003).

Prognóstico

Observa-se que apesar de cirurgias agressivas e radioterapia adjuvante, o CEC bucal tem altas taxas de recorrência e a despeito dos avanços no tratamento destes pacientes, os resultados são geralmente pobres, o que leva os cirurgiões a considerarem a primeira intervenção terapêutica como a melhor chance para a cura. Os mais freqüentes tipos de recorrência são local e regional, em respectivamente, de 20,3% a 62,6% e de 16% a 50% dos casos, e variam de acordo, principalmente, com o sítio do tumor, estágio clínico e características patológicas (Kowalski, 2002; Silva *et al.*, 2004; Agra *et al.*, 2006; Koo *et al.*, 2006). Considera-se como recorrência ou recidiva local, a ocorrência de um novo tumor com distância de até 2 cm do tumor primário. Essas recidivas podem resultar de células malignas remanescentes não detectadas na avaliação histológica das margens ou de células geneticamente alteradas adjacentes ao tumor primário. Normalmente, as recidivas locais ocorrem em até 5 anos após o tratamento inicial, entretanto, a maior parte ocorre antes dos 2 anos de seguimento clínico (Aguiar *et al.*, 2007). Koo *et al.* (2006), observaram que 28% dos pacientes desenvolveram recorrência local ou regional ou metástase à distância, sendo que em 78% dos casos, a recorrência foi vista em 1 ano, e em 92%, em 2 anos de seguimento. Para os autores, o tempo médio para a recorrência foi de 11,9 meses.

As taxas de sobrevida são normalmente correlacionadas ao estadiamento TNM do paciente. A taxa de sobrevida de 5 anos dos pacientes nos níveis I e II é de 76%, no nível III é de 41% e no nível IV, apenas 9% dos pacientes tratados apresentam esta sobrevida (Neville *et al.*, 2004). Em geral, o comprometimento de um único linfonodo homolateral já reflete em 50% de redução na sobrevida total (Lopes *et al.*, 2002).

Características histopatológicas e marcadores moleculares do CEC bucal têm sido estudados com o objetivo de prever seu comportamento clínico.

Alguns dos marcadores mais investigados são: o gene supressor de tumor p53 e seu produto protéico que funciona como inibidor da divisão celular na fase G1 do ciclo celular, podendo induzir apoptose (Tsantoulis *et al.* 2007); bcl-2, proteína que reside predominantemente na membrana externa da mitocôndria, na membrana do retículo endoplasmático e na membrana nuclear, atuando na inibição dos mecanismos de apoptose (Gastman, 2001); β -catenina, proteína que parece ter papel crucial na transformação maligna, sugerindo um papel importante no controle da proliferação celular ou mesmo apoptose (Hardisson, 2003); caderina E, molécula de adesão do epitélio implicada na carcinogênese por se encontrar suprimida numa grande variedade de cânceres humanos (Hardisson, 2003); Ki-67, proteína vista nas fases G1, S e G2 do ciclo celular e utilizada como marcador de proliferação celular (Kurokawa *et al.*, 2005); entre outros.

Entretanto, apesar do grande número de estudos envolvendo biomarcadores em CECs bucais, ainda não há um consenso em sua utilização como fatores prognósticos, sendo indicados maiores esforços neste sentido (Shin *et al.*, 1996; Khan *et al.*, 2002; Lopes *et al.*, 2002; Parise Jr. *et al.*, 2004).

2.2 Gradação histopatológica

Diversos estudos têm buscado uma relação entre a gradação histopatológica dos CECs bucais e diferentes parâmetros clínicos, como estadiamento do tumor, recorrência e prognóstico (Anneroth *et al.*, 1987; Bryne *et al.* 1992; Bryne, 1998). Broders (1927), citado por Anneroth *et al.* (1987), desenvolveu um sistema de gradação monofatorial, baseado na proporção em que a neoplasia apresentava as características de epitélio pavimentoso estratificado normal. Entretanto, observou-se subsequentemente a falta de correlação entre o sistema proposto e o prognóstico dos pacientes, o que se deveu em grande parte à heterogeneidade dos CECs bucais. Em 1967, Lever, citado por Lund *et al.*

(1975), instituiu um sistema bifatorial compreendendo o nível de diferenciação celular e a avaliação do crescimento do tumor em profundidade. Jakobsson *et al.* (1973) desenvolveram um outro sistema de gradação mais completo, no intuito de acessar de forma mais precisa o potencial agressivo do tumor, onde não apenas as características da neoplasia, mas também a relação entre a neoplasia e o hospedeiro era avaliada. Os itens da classificação eram: estrutura do tumor, diferenciação com relação à queratinização, mitoses, pleomorfismo nuclear, modo e estágio de invasão, invasão vascular e infiltrado inflamatório. Além disso, quatro parâmetros foram incluídos para cada item, em ordem decrescente de diferenciação. Esse sistema foi validado pelos autores em estudo com biópsias de 42 carcinomas de laringe tratados por radioterapia, mostrando-se superior à classificação clínica TNM tanto na predição de recorrência como na sobrevida dos pacientes (Jakobsson *et al.*, 1973).

Lund *et al.* (1975) alteraram o sistema de gradação de Jakobsson *et al.* (1973), entretanto, sem modificar seus itens. Foram acrescentados limites, por exemplo, com percentual da quantidade de queratina necessária para classificação em cada item e introduziu-se uma pontuação histológica que representava a soma total dos pontos atribuídos a cada item, desta forma, obteve-se um sistema mais objetivo. Em estudo com biópsias de 49 pacientes com CEC em língua, a gradação mostrou-se bastante útil na predição clínica, tendo em vista que todos os 5 casos com metástases ocorreram em pacientes com pontuação alta. Os autores sugeriram que uma correlação deveria ser feita entre o TNM e a gradação histopatológica a fim de identificar tumores com comportamento mais agressivo (Lund *et al.*, 1975).

Willén *et al.* (1975) também modificaram o sistema proposto por Jakobsson, excluindo dois padrões morfológicos: estrutura do tumor e invasão vascular, todavia, em estudo de 124 pacientes com CECs em gengiva não houve correlação da gradação histológica com o estadiamento clínico. Entretanto, Holm *et al.* (1982) aplicaram, subsequentemente, o sistema de Willén *et al.* (1975) em 95 casos de CEC de língua e tiveram como resultados uma sobrevida de 5 anos

de 85% entre pacientes com pontuação na gradação histopatológica menor que 13, de 65% para pacientes com pontuação entre 13 e 16 e sobrevida de 44% para pontuação acima de 16. Além disso, houve diferença estatisticamente significativa entre os grupos com baixa e alta pontuação histopatológica e o tamanho do tumor e a presença de metástases regionais no momento do diagnóstico (Holm *et al.*, 1982).

Em 1984, Anneroth & Hansen propuseram-se a construir um sistema de gradação, correlacioná-lo ao primeiro sistema desenvolvido por Broders (1927) e avaliar sua reprodutibilidade e validade. O método de gradação tumoral foi modificado a partir de Jakobsson *et al.* (1973), com a omissão do critério de invasão vascular e foi testado em 52 CECs de língua e assoalho bucal. Como resultados, os autores observaram a validade do sistema, sua superioridade ao sistema de Broders (1927) e a associação estatisticamente significativa entre a pontuação total e estadiamento clínico, recorrência tumoral e sobrevida dos pacientes. Finalmente, em 1987, Anneroth *et al.*, propuseram o estabelecimento de um sistema de gradação tumoral, dividido em características da população de células do tumor, que engloba nível de queratinização, polimorfismo nuclear e número de mitoses por campo de maior aumento, e características da interação tumor-hospedeiro, que são o padrão e estágio de invasão e infiltrado inflamatório (Tabela 1). Os autores destacaram ainda a importância do delineamento adequado de pesquisas que utilizam sistemas de gradação histopatológica, para tal, requisitos clínicos e histológicos são mencionados. Dentre os requisitos clínicos, são citados a utilização de tumores preferencialmente de mesma localização, classificados sob o mesmo sistema de estadiamento clínico, e para a avaliação dever-se-ia utilizar apenas peças cirúrgicas com margens livres de doença. Os requisitos histológicos são fatores histotécnicos, como a mesma técnica de inclusão e coloração (Anneroth *et al.*, 1987).

Em 1992, Bryne *et al.*, avaliaram 61 biópsias de pacientes com CEC bucal e apenas o fronte invasivo do tumor foi submetido ao sistema de gradação histopatológico que consistia de 5 itens: nível de queratinização, pleomorfismo

nuclear, mitoses, modo de invasão e infiltrado linfoplasmocitário, cada item recebeu um escore que variou de 1 a 4, de acordo com o preconizado por Anneroth *et al.*, 1987. Os autores observaram que os tumores são freqüentemente menos diferenciados nas áreas mais invasivas, comparadas às áreas centrais e concluíram que o fronte invasivo do tumor é um fator independente de prognóstico, enquanto a gradação do tumor como um todo não mostrou relação estatística significativa com o prognóstico dos casos. Os autores recomendaram ainda a exclusão do item “mitoses”, a fim de aumentar a reprodutibilidade do sistema (Tabela 2). Em revisão sobre o papel do fronte invasivo para o prognóstico dos CECs bucais, Bryne (1998) concluiu que esta área tem alto valor prognóstico e deve ser utilizada como um complemento ao estadiamento TNM, além disso, recomendou sua introdução em estudos clínicos, tendo em vista a simplicidade, ao baixo custo e alta reprodutibilidade desse método.

Diversos estudos vêm desde então, utilizando os sistemas de gradação histopatológica ou seus parâmetros individualmente, e buscando associação entre estes e o desenvolvimento de metástases cervicais e sobrevida dos pacientes (Yamamoto *et al.*, 1984; Bryne *et al.*, 1995; Altemani *et al.*, 1999; Okada *et al.*, 2003; Kurokawa *et al.*, 2005).

Yamamoto *et al.* (1984) reconhecendo o papel das metástases cervicais no controle do CEC bucal e na sobrevida dos pacientes, buscaram uma associação entre o padrão de invasão dos tumores e o desenvolvimento destas metástases. Os autores observaram que casos com padrões de invasão menos agressivos tiveram menor freqüência de metástase cervical (13,9%), enquanto os padrões com cordões estreitos ou células difusas tiveram índices de metástase cervical de respectivamente, 61,1% e 75%. Altemani *et al.* (1999) estudaram também uma relação entre o padrão de invasão dos tumores e o desenvolvimento destas metástases, e observaram que em um total de 42 casos de CECs, 20 com metástases cervicais, a maioria dos casos (95,2%) apresentou dois ou mais padrões de invasão e que o padrão de invasão em bandas foi o mais comum.

Entretanto, nenhum destes padrões mostrou-se significativamente associado ao desenvolvimento de metástases.

Okada *et al.* (2003) investigaram também o desenvolvimento de metástases cervicais, porém, de forma mais abrangente, procuraram uma relação entre estas e o sistema de gradação de Anneroth *et al.* (1987) como um todo e com seus parâmetros individualmente. CECs de 38 pacientes, sendo que 17 apresentavam metástase cervical, foram estudados e uma relação positiva estatisticamente significativa foi vista entre a maior gradação histopatológica e metástases cervicais. Entre os seis parâmetros avaliados, queratinização e o padrão de invasão foram significativamente associados a metástases. Além disso, os autores observaram que quando a pontuação total é superior a 15, as metástases cervicais devem ser consideradas.

Kurokawa *et al.* (2005) avaliaram 124 casos de CEC em língua e buscaram uma associação entre as características clínicas e histopatológicas e o desenvolvimento de metástases cervicais e prognóstico dos pacientes. Para avaliação histopatológica foram utilizados os sistemas propostos por Anneroth *et al.* (1987) e Bryne *et al.* (1992). A média das pontuações obtidas foi de 13,2 e 9,5 para os sistemas de Anneroth e Bryne, respectivamente, sendo que houve uma correlação linear entre ambas. Entretanto, a sobrevida livre de doença de 5 anos foi melhor correlacionada ao sistema de Bryne, em que a análise restringe-se ao fronte invasivo do tumor. Além disso, os autores concluíram que a profundidade tumoral ≥ 4 mm, pontuação de Bryne ≥ 8 e metástase cervical reduzem as taxas de sobrevida livre de doença e que pontuação de Bryne ≥ 11 pontos é um importante fator para a predição de metástases cervicais.

Tabela 1 – Sistema de gradação proposto por Anneroth *et al.* (1987).

Parâmetro morfológico	Pontos			
	1	2	3	4
Nível de queratinização	Alto (>50% das células)	Moderado (20-50% das células)	Mínimo (5-20% das células)	Nenhuma (0-5% das células)
Pleomorfismo nuclear	Pequeno (>75% de células maduras)	Moderadamente abundante (50-75% de células maduras)	Abundante (25-50% de células maduras)	Extremo (<25% de células maduras)
Número de mitoses	0-1	2-3	4-5	>5
Padrão de invasão	Empurrando, bordas bem delineadas	Ilhas ou cordões infiltrantes	Grupos ou cordões de células (n>15)	Células soltas ou pequenos grupos (n<15)
Estágio de invasão	Carcinoma <i>in situ</i> ou invasão questionável	Invasão na lâmina própria apenas	Adjacente a músculo, glândulas e perióstio	Profundamente no estroma, infiltrando osso
Infiltrado linfoplasmocitário	Abundante	Moderado	Discreto	Nenhum

Tabela 2 – Sistema de gradação histopatológica do fronte invasivo do tumor, segundo Bryne *et al.* (1992).

Parâmetro Morfológico	Pontos			
	1	2	3	4
Queratinização da lesão	Alta (>50% das células)	Moderada (20-50% das células)	Mínima (5-20% das células)	Nenhuma (0-5% das células)
Polimorfismo nuclear	Pequeno (>75% de células maduras)	Moderado (50-75% de células maduras)	Abundante (25-50% de células maduras)	Extremo (<25% de células maduras)
Padrão de invasão	Empurrando, bordas bem delineadas	Ilhas ou cordões infiltrantes	Grupos ou cordões de células (n>15)	Células soltas ou pequenos grupos (n<15)
Infiltrado linfoplasmocitário	Abundante	Moderado	Discreto	Nenhum

2.3 Ácido graxo sintase (FAS) e ErbB2

Apesar da enorme diversidade genotípica, as células malignas apresentam algumas similaridades fenotípicas principalmente com relação ao seu metabolismo energético. Uma dessas características é o consumo ávido de glicose e a produção de ácido láctico sob condições anaeróbias, outra é o alto consumo de energia empregado em síntese protéica e de DNA, e finalmente, a terceira característica é a síntese de ácidos graxos. Os ácidos graxos são constituintes essenciais de todas as membranas biológicas lipídicas e são importantes substratos para o metabolismo energético. As fontes desses ácidos graxos são exógena, através de alimentos ingeridos na dieta, e endógena, que requer a participação de um complexo enzimático composto por 7 sítios catalíticos, denominado ácido graxo sintase (FAS). O papel da FAS em indivíduos normais, bem nutridos é de reduzida importância, tendo em vista que a maioria das células e tecidos, mesmo com alto consumo energético, utilizam-se dos lipídeos circulantes. A síntese fisiológica de ácidos graxos é considerada bastante ativa durante a embriogênese e no pulmão do feto, e em adultos em situações como na proliferação endometrial durante o ciclo menstrual e na composição do leite durante a lactação (Krontiras *et al.*, 1999; Menendez *et al.*, 2007).

Em meados de 1950, determinou-se que independente dos níveis extracelulares de lipídeos, 93% dos ácidos graxos esterificados em tumores derivavam da síntese endógena. Entretanto, esse aumento da lipogênese na biologia do câncer só passou a ser mais estudado a partir da década de 90, quando se associou a marcação de FAS a um pior prognóstico no carcinoma de mama (Menendez *et al.*, 2007). Desde então, a relação de FAS com diversas neoplasias tem sido estudada e já se sabe que em alguns tumores e lesões cancerizáveis, em órgãos como próstata (Rossi *et al.*, 2003), mama (Wang *et al.*, 2001), endométrio (Pizer *et al.*, 1998), pulmão (Piyathilake *et al.*, 2000), bexiga (Visca *et al.*, 2003), estômago (Kusakabe *et al.*, 2002), esôfago (Nemoto *et al.*,

2001) e em lesões como sarcoma de tecidos moles (Takahiro *et al.*, 2003) e melanomas (Innocenzi *et al.*, 2003), há expressão anormalmente aumentada de FAS, o que estaria relacionado a um curso mais agressivo da doença e pior prognóstico (Kuhajda, 2000).

Com relação ao CEC bucal, Krontiras *et al.* (1999) foram os pioneiros, avaliando FAS em carcinomas de língua. Dos 53 tumores pesquisados, 98% apresentaram marcação positiva, e ao contrário do padrão observado em tumores de outros sítios, os CECs bucais que apresentaram maior marcação eram tumores bem diferenciados, associados a melhor prognóstico. Sendo assim, nestes casos FAS funcionaria como um marcador de diferenciação. Áreas de displasia também foram estudadas e os autores puderam observar marcação mais forte que no tecido normal, o que pode sugerir um papel importante de FAS também na marcação precoce de alterações neoplásicas.

Agostini *et al.* (2004) viram que FAS é expressa pelas células de CEC em cultura e desempenha um importante papel na sua proliferação, de tal forma que quando se administrou cerulenina às células, que é um potente inibidor específico de FAS, houve uma redução estatisticamente significativa de sua proliferação. Zhang *et al.* (2005) também pesquisaram em cultura de células de CEC os efeitos de FAS e cerulenina, e observaram que além da maior incorporação de acetato (substrato para formação dos ácidos graxos) marcado radioativamente pelas células de CEC que por fibroblastos gengivais, que a partir da administração de cerulenina, houve acentuada redução dessa incorporação e finalmente, notou-se que a cerulenina causou efeitos citotóxicos seletivos que culminaram com a apoptose da célula de CEC.

Em estudo envolvendo 102 pacientes com CEC em língua, Silva *et al.* (2007) observaram que a marcação de FAS foi fraca, citoplasmática e restrita às camadas basais no epitélio normal, enquanto os CECs marcaram positivamente para FAS em 79.41% dos casos, sendo que as marcações mais fortes foram vistas nos CECs mais bem diferenciados. Os autores também chamaram atenção para a relação entre a maior marcação de FAS e melhor prognóstico e creditaram

tal achado à predileção de FAS por tumores bem diferenciados, o que poderia ser explicado pelo papel desta enzima no processo de queratinização.

Mais um dos potenciais fatores envolvidos na carcinogênese do CEC bucal é o protooncogene ErbB2. O gene humano ErbB2 (HER-2/neu), localizado no cromossomo 17, codifica uma glicoproteína transmembrana com atividade de tirosina-quinase que faz parte da família do receptor de fator crescimento epidérmico (EGFR), composta por quatro integrantes (ErbB1/EGFR, ErbB2, ErbB3 e ErbB4). Apesar do ligante de ErbB2 não ter sido ainda identificado, este receptor é capaz de se dimerizar com outros receptores desta família, como o EGFR, formando heterodímeros capazes de causar intensa e prolongada ativação das vias de sinalização. Uma vez que esses receptores são ativados, reações deflagram fosforilação de fatores de transcrição que controlam diversos processos celulares (Holbro *et al.*, 2003). O oncogene de ErbB2 pode ser resultado de mutações, truncamentos de domínios extracelular e citoplasmático e amplificação e/ou super expressão do gene normal (Kazkayasi *et al.*, 2001). Tal super expressão leva à atividade basal de tirosina quinase aumentada, transformando as células através de estímulo crônico dos sinais de transdução (Khan *et al.*, 2002). Além disso, a super expressão aumenta o potencial metastático dos tumores por meio de interação com moléculas de adesão da matriz extracelular (Xia *et al.*, 1997).

Super expressão de ErbB2 tem sido associada a pior prognóstico em tumores de mama, ovário, pulmão, estômago e CEC bucal (Xia *et al.*, 1997; Xia *et al.*, 1999; Kuropkat *et al.*, 2002). Persistem controvérsias a respeito da validade da marcação citoplasmática de ErbB2. Alguns autores somente consideram a marcação em membrana celular em suas metodologias e interpretam a expressão citoplasmática como um artefato ou um achado não específico (Khan *et al.*, 2002; Kuropkat *et al.*, 2002; Nagler *et al.*, 2002; Parise Jr. *et al.*, 2004). Outros julgam a marcação no citoplasma como um resultado específico e sugerem que os membros da família do EGFR, inclusive ErbB2, poderiam funcionar não somente como receptores transmembrânicos, mas também participariam de outras

atividades no interior ou no exterior das células. Entretanto, o significado da marcação citoplasmática permanece obscuro (Xia *et al.*, 1997; Xia *et al.*, 1999).

Nas neoplasias bucais, diversos estudos têm mostrado aumento na expressão de ErbB2 (Field, 1992; Xia *et al.*, 1997; Khan *et al.*, 2002; Lopes *et al.*, 2002; Agostini *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2007). Field (1992) ao analisar a expressão de ErbB2 em 75 casos de CECs bucais, verificou que 60% dos tumores apresentavam marcação citoplasmática para ErbB2, porém ao correlacionar esses dados com os parâmetros clínicos, patológicos ou com a sobrevida dos pacientes, nenhuma relação foi identificada. Em estudo desenvolvido por Lopes *et al.*, (2002), com 20 CECs bucais, compararam-se tumores em estágios iniciais (T1 e T2) com metástases regionais, com tumores de estadios mais avançados (T3 e T4) sem metástases. Os resultados não mostraram diferenças significantes entre as marcações citoplasmática e de membrana, sendo que ambas foram vistas aumentadas em associação com tumores T3 e T4 sem metástases (Lopes *et al.*, 2002).

Silva *et al.* (2007) caracterizaram em detalhes os dois padrões de marcação de ErbB2, descrevendo que o primeiro demarca a membrana celular vista no extrato espinhoso e granuloso adjacente ao epitélio oral normal e também em áreas bem queratinizadas do tumor, em especial nas pérolas de queratina. O segundo padrão de marcação positiva é visualizado no citoplasma, observada em células tumorais indiferenciadas e mais freqüentes em CECs em estágios mais avançados. Em análise também de CECs bucais, os autores viram forte relação positiva entre as marcações de FAS e ErbB2 de membrana, e relação inversa entre a marcação de FAS e ErbB2 citoplasmático.

3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste estudo foram:

- Comparar em grupos de carcinomas espinocelulares bucais com recidiva local precoce e controle (sem recidiva), a correlação entre o comportamento dos mesmos e sua gradação histopatológica segundo o proposto por Anneroth *et al.* (1987) e Bryne *et al.* (1992);
- Analisar nestes tumores, os itens da gradação histopatológica e as expressões de FAS e ErbB2 quanto ao prognóstico e à sobrevida dos pacientes;
- Associar a intensidade da expressão de FAS à ErbB2 e à queratinização dos CECs bucais.

4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi submetido à apreciação e aprovação da Comissão de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas (n° 165/2006 – Anexo 1).

Foram analisadas as características clínicas, histopatológicas e expressão imunohistoquímica de FAS e ErbB2, em 23 CECs bucais de pacientes acometidos por recidiva local precoce, comparando-os com um grupo controle constituído por 46 pacientes com CEC sem história de recorrência. Foram classificados como tumores com recidiva local precoce aqueles em que a recidiva ocorreu antes do período de 1 ano após o tratamento inicial. O grupo controle foi formado da seguinte forma: 2 CECs bucais sem recidiva e de mesma localização e estadiamento clínico foram selecionados para cada caso com recidiva. Todos os pacientes incluídos neste estudo foram submetidos à cirurgia como primeiro tratamento, no período de 1981 a 2000, no Departamento de Cirurgia de Cabeça e Pescoço e Otorrinolaringologia do Hospital A.C. Camargo, São Paulo/SP.

Os critérios de inclusão foram biópsias prévias com laudo histopatológico de CEC, nenhuma terapia oncológica anterior do tumor primário e cirurgia como tratamento inicial no Hospital A.C. Camargo. Os critérios de exclusão foram margem cirúrgica positiva ou exígua (<5 mm) e menos de 2 anos de seguimento clínico após o tratamento definitivo.

4.1 Análise Histopatológica

Cortes histológicos com 5 µm de espessura foram feitos a partir dos blocos contendo as peças cirúrgicas dos 69 CECs bucais, em seqüência os cortes

foram corados com Hematoxilina e Eosina (H&E), conforme protocolo adotado no Laboratório de Histopatologia da FOP/Unicamp.

Protocolo:

01. Xilol 1	10 minutos
02. Xilol 2	10 minutos
03. Álcool absoluto	pôr e tirar
04. Álcool 90%	pôr e tirar
05. Álcool 70%	pôr e tirar
06. Álcool 50%	pôr e tirar
07. Água de torneira	duas trocas
08. Passar em água destilada	duas trocas
09. Corar na Hematoxilina de Mayer	12 minutos
10. Lavar em água de torneira	2 trocas
11. Deixar diferenciando com água	15 minutos
12. Colocar em álcool 80%	02 minutos
13. Colocar na Eosina-Floxina	05 minutos
14. Álcool absolutos I	pôr e tirar
15. Álcool absolutos II	pôr e tirar
16. Álcool absolutos III	pôr e tirar
17. Xilol diafanização	03 minutos
18. Xilol de montagem	03 minutos
19. Montar em bálsamo-do-canadá	

A análise dos cortes histológicos corados em H&E foi realizada em microscopia de luz nos laboratórios da Área de Patologia da FOP/Unicamp, por meio de microscópio binocular (Nikon YS 100, Japão) adaptado com ocular WSCF 10X/18 e objetivas NIKON 4X/0,10, 10X/0,25, 40X/0,65 e 100X/1,25. Previamente à leitura, as lâminas tiveram as identificações cobertas, para a realização de

estudo duplo-cego, evitando desta maneira qualquer indução de resultado durante a leitura pelos 2 avaliadores (MAL e LSSP). Em casos de discordância, a lâmina era reavaliada a fim de se chegar a um consenso.

4.2 Reações Imunohistoquímicas

Para as reações de imunohistoquímica, foram realizados cortes com 3 µm de espessura dos blocos de parafina. Os cortes foram fixados em lâminas silanizadas (3-aminopropyl-triethoxysilane, Sigma Aldrich, EUA) e colocados em estufa a 56°C por 24 horas. Na seqüência, foram feitas a primeira e a segunda desparafinização em xilol por 10 minutos cada uma, em temperatura ambiente, e hidratação dos cortes em etanol absoluto, etanol a 90%, etanol a 70%, etanol a 50% e lavagens em água corrente e destilada. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com a água oxigenada (10 volumes) em 5 banhos de 5 minutos cada. A recuperação antigênica foi feita através do forno de microondas, com solução de ácido cítrico 0,01M / pH 6.0 em dois ciclos de 9 minutos cada, em potência máxima (750W), sendo deixado esfriar até atingir a temperatura ambiente, seguido por lavagens em água corrente e destilada e solução salina tamponada com fosfato pH 7,4 (PBS).

Posteriormente, incubação com o anticorpo primário diluído em solução de albumina a 1% e azida sódica a 0,1% em PBS, em câmara úmida por 18 horas a 4°C foi feita seguida por 3 lavagens em solução de PBS. Para cada anticorpo foi utilizada a seguinte diluição: anti-FAS (Transduction Laboratories, Lexington, KY) 1:3.000 e anti- ErbB2 (Dako, Carpinteria, CA) 1:200. As lâminas depois foram incubadas com anticorpos secundários conjugados com peroxidase (Strept ABC Complex/Hrp Duet, Mouse/Rabbit, Dako) por 30 minutos a 37°C na diluição de 1:500, seguido de 3 lavagens em tampão PBS. Após estas etapas, as lâminas foram incubadas com complexo Streptavidina – Biotina (Dako) por mais 30 minutos, e reveladas com substrato cromogênico (3,3 diaminobenzidina – DAB, Sigma), 120 mg por 100 ml de PBS mais 2 ml de água oxigenada 10 volumes por

5 minutos a 37°C, seguido por lavagens em água corrente e destilada. Contra-coloração com Hematoxilina de Carrazzi por 3 minutos e lavagens em água corrente e destilada foram feitas, e subseqüentemente, as lâminas foram desidratadas em 3 banhos de álcool absoluto, diafanizadas em xilol por 3 minutos e montadas com Bálsamo do Canadá.

FAS e ErbB2 tiveram suas intensidades de suas marcações avaliadas pelos mesmos 2 observadores, de maneira independente. Os critérios para avaliação foram a positividade da marcação, em que as lâminas foram consideradas positivas se ocorreu marcação específica no tumor, independente de sua extensão, e a intensidade de marcação, em que, quando positivas, as lâminas foram classificadas de acordo com a intensidade forte ou fraca, considerando a marcação que predominou na maior parte do corte (Silva *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2007) (Tabela 3). Como controles positivos utilizaram-se cortes de carcinoma de próstata e mama para FAS e ErbB2, respectivamente.

Tabela 3 - Descrição dos critérios para interpretação das reações imunohistoquímicas.

Padrão da reação	Resultado
Reação negativa	0
Reação com intensidade fraca	1
Reação com intensidade forte	2

4.3 Análise Estatística

Para a análise estatística, os dados foram inseridos no programa SAS e testes paramétricos e não paramétricos foram realizados. A relação entre os grupos e os fatores clínicos como gênero, idade, o uso de fumo e álcool, tamanho do tumor, comprometimento linfonodal e estadiamento clínico, e fatores histopatológicos e imunohistoquímicos foi realizada empregando-se o teste qui-quadrado e Exato de Fisher em tabelas de contingência de dupla. O único teste paramétrico utilizado foi a análise de variância (ANOVA), para a comparação entre as médias dos escores dos grupos recidiva e controle nos sistemas de gradação de Anneroth *et al.* (1987) e Bryne *et al.* (1992).

A sobrevida global, que corresponde ao tempo decorrido entre a data do início do tratamento e o óbito do paciente ou o tempo entre o início do tratamento e a última informação objetiva, foi analisado através do método de Kaplan-Meier. A comparação entre as curvas de sobrevida global, de acordo com as variáveis estudadas (informações clínicas, histopatológicas e imunohistoquímicas), foi analisada pelo teste de log-rank. A significância estatística foi definida por um valor de p menor que 0,05.

5 RESULTADOS

5.1 Características epidemiológicas e clínicas

Neste estudo foram incluídos 69 casos de pacientes com CEC bucal, sendo que 23 pacientes apresentaram recidiva local precoce e 46 faziam parte do grupo controle, sem recidiva. Observou-se predileção pelo gênero masculino, já que no grupo recidiva havia 22 homens e 1 mulher, e no grupo controle, havia 40 homens e 6 mulheres. Não houve uma correlação significativa ($p = 0,41$), entre o gênero masculino e ocorrência de recidivas. O risco relativo observado foi de 2,48. A idade dos pacientes variou de 21 a 79 anos, com a média total de 55,5 anos e mediana de 56 anos. No grupo recidiva, esses números foram de 55,4 anos e 54 anos e no controle foram de 55,5 e 56 anos, respectivamente. Para análise do comportamento dos tumores nos pacientes jovens ou mais idosos, selecionou-se um ponto de corte em 45 anos, conforme sugerido por alguns autores (Iamaroon *et al.*, 2004). Não houve correlação entre as faixas etárias maior e menor ou igual a 45 anos e a ocorrência de recidivas ($p = 1$) (Tabela 4).

Tabela 4 – Descrição da variável gênero para os pacientes dos grupos recidiva e controle.

Variáveis	Categorias	Grupo Recidiva		Grupo Controle		p*	Risco Relativo
		n	%	n	%		
Gênero	Masculino	22	95,65	40	86,96	0,41	2,48
	Feminino	1	4,35	6	13,04		
Idade	> 45	19	82,61	37	80,43	1	1,10
	≤ 45	4	17,39	9	19,57		

*Teste exato de Fisher

Dos 23 pacientes com recidiva, 18 (94,74%) eram fumantes e apenas 1 (5,26%) não fumava. Prontuários de 4 pacientes deste grupo não dispunham de informações relativas ao tabagismo. Entre os sem recidiva, 37 (84,09%) eram fumantes e 7 (15,91%) não fumantes. Em 2 prontuários, essa informação não estava disponível. Vale ressaltar que dos 8 pacientes não fumantes, 1 (12,5%) estava no grupo recidiva enquanto 7 (87,5%) estavam no grupo controle. Apesar de não ser observada uma relação estatisticamente significativa ($p = 0,41$) entre o fumo e a recidiva, o risco relativo do fumante desenvolver recidiva foi de 2,62. Com relação à ingestão de álcool, 4 prontuários de pacientes com recidiva e 2 do grupo controle não continham essa informação. No grupo recidiva, 17 (89,47%) pacientes eram etilistas e 2 (10,53%) não ingeriam álcool, já no grupo controle, 30 (68,18%) pacientes ingeriam álcool enquanto 14 (31,82%) não o faziam. Dos 16 pacientes não etilistas, 14 (87,5%) e 2 (12,5%) estavam no grupo controle e recidiva, respectivamente. Apesar de também não ser vista uma relação estatisticamente significativa ($p = 0,11$) entre o álcool e a recidiva, o risco relativo do etilista desenvolver recidiva foi de 2,89 (Tabela 5).

Tabela 5 – Descrição do uso de tabaco e álcool dos pacientes com recidiva e controle.

Variáveis	Categorias	Grupo Recidiva		Grupo Controle		p*	Risco Relativo
		n	%	n	%		
Tabaco	Sim	18	94,74	37	84,09	0,41	2,62
	Não	1	5,26	7	15,91		
Álcool	Sim	17	89,47	30	68,18	0,11	2,89
	Não	2	10,53	14	31,82		

*Teste exato de Fisher

A localização dos tumores do grupo recidiva foi a seguinte: 18 em língua (78,26%), 4 em região retromolar (17,39%) e 1 (4,35%) em gengiva inferior. No grupo controle havia o dobro do número de casos em cada uma destas localizações. O tumor foi avaliado como T1 (menos de 2cm de diâmetro) em 13% dos casos de recidiva e 15,2% do grupo controle, como T2 (de 2cm a 4cm de diâmetro) em 17,4% dos casos de recidiva e 21,7% do grupo controle, como T3 (mais de 4cm no seu maior diâmetro) em 30,4% dos casos de recidiva e 23,9% dos casos controle, e como T4 (tumor maior que 4cm de diâmetro envolvendo antro, músculos pterigóides, base de língua ou pele) em 39,1% dos casos com recidiva e 39,1% dos casos controle. Não houve uma associação linear considerável entre o estadiamento T e os grupos ($p = 0,75$). No critério metástase regional, foram considerados N0 (nenhum linfonodo positivo clinicamente), 43,5% dos casos com recidiva e 47,8% do grupo controle, N1 (único linfonodo homolateral clinicamente positivo com menos de 3cm de diâmetro), 39,1% dos casos com recidiva e 45,7% do grupo controle e N2 (único linfonodo homolateral clinicamente positivo com 3cm a 6cm de diâmetro ou múltiplos linfonodos homolaterais clinicamente positivos, nenhum com mais de 6cm de diâmetro), 17,4% dos casos recidiva e 6,5% dos casos controle. Apesar de um maior número de casos com recidiva apresentar pior estadiamento linfonodal, este valor não foi estatisticamente

significante ($p = 0,36$). O estadiamento clínico teve a seguinte distribuição: 3 casos do grupo recidiva no nível I, 2 no II, 9 no III e 9 no IV, e no grupo controle temos o dobro do grupo recidiva, tendo em vista que este foi um critério de seleção dos casos, 6, 4, 18 e 18 casos para os níveis I, II, III e IV, respectivamente ($p = 1$) (Tabela 6).

Tabela 6 – Descrição das características do tumor, dos linfonodos cervicais e estadiamento clínico dos pacientes com recidiva e controle.

Variáveis	Categorias	Grupo recidiva		Grupo controle		p
		n	%	n	%	
T	1	3	13	7	15,2	0,75
	2	4	17,4	10	21,7	
	3	7	30,4	11	23,9	
	4	9	39,1	18	39,1	
N	0	10	43,5	22	47,8	0,36
	1	9	39,1	21	45,7	
	2	4	17,4	3	6,5	
EC	I	3	13	6	13	1
	II	2	8,7	4	8,7	
	III	9	39,1	18	39,1	
	IV	9	39,1	18	39,1	

*Qui-quadrado de Mantel-Haenszel

Com relação ao tratamento adotado, no grupo recidiva, observaram-se 15 (65,22%) pacientes tratados primariamente somente por cirurgia e 8 (34,78%) pacientes tratados com cirurgia e radioterapia. Já no grupo controle esse números foram de 17 (36,96%) casos tratados por cirurgia apenas e 29 (63,04%) tratados por ambas as terapias cirúrgica e radioterápica. Observou-se relação estatisticamente significante entre o tratamento apenas por cirurgia e o

desenvolvimento de recidivas ($p = 0,03$) (Tabela 7). As recidivas ocorreram em períodos que variaram de 1 a 8 meses, sendo que a média foi de 4,7 meses.

Tabela 7 – Descrição das formas de tratamento para os pacientes de ambos os grupos.

Tratamento	Grupo Recidiva		Grupo Controle		p*
	n	%	n	%	
Cirurgia	15	65,22	17	36,96	0,03
Cirurgia + Radioterapia	8	34,78	29	63,04	

*Teste exato de Fisher

5.2 Características histopatológicas

Os tumores foram classificados de acordo com suas características histopatológicas segundo Anneroth *et al.* (1987) e Bryne *et al.* (1992). Apesar de Bryne *et al.* (1992) considerarem o fronte invasivo do tumor como o local mais adequado para a classificação dos tumores, ambos os sistemas utilizam-se critérios em comum, exceto pelo fato de Anneroth *et al.* (1987) considerarem 2 parâmetros a mais, número de mitoses e nível de invasão. Os tumores estudados, de uma forma geral, apresentaram os 4 escores de queratinização, 3 escores de pleomorfismo, 3 de mitose, 4 de padrão de invasão, 2 de níveis de invasão e 4 de inflamação (Figuras 1, 2, 3, 4, 5 e 6).

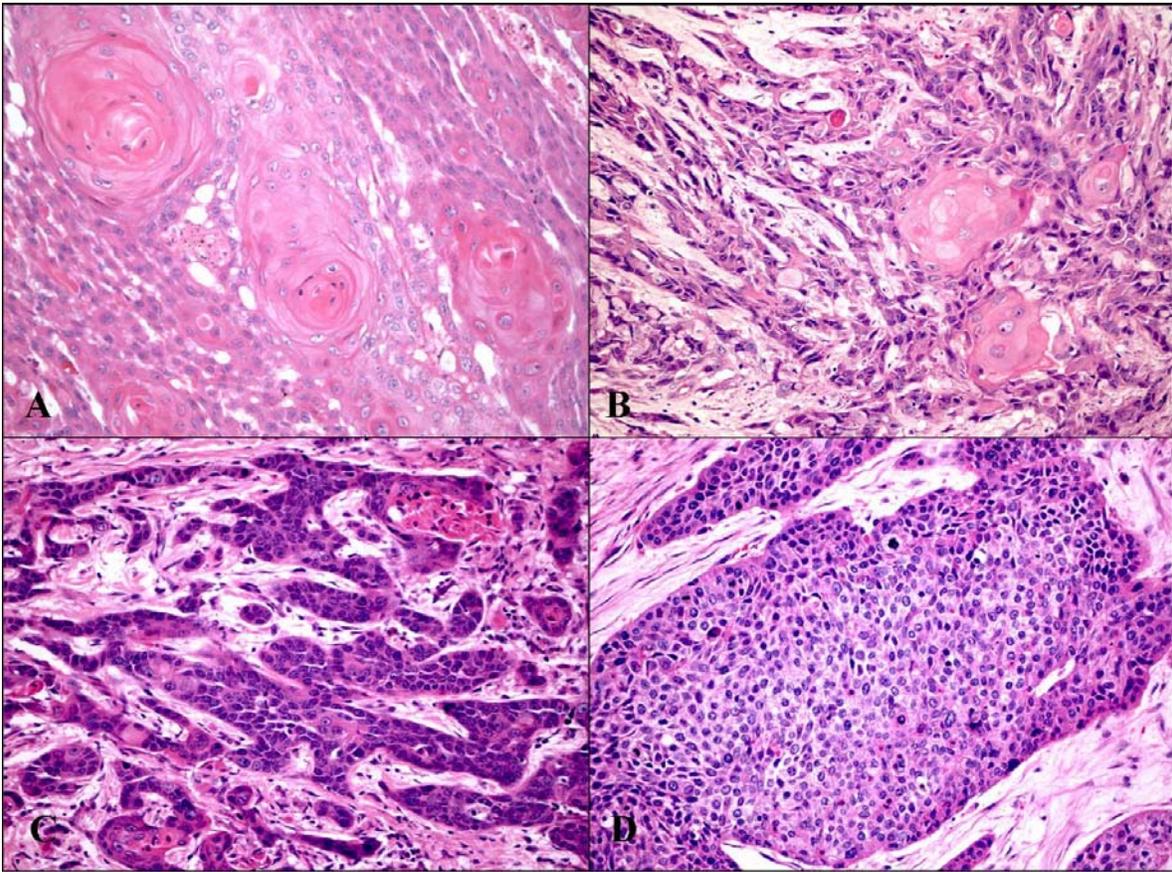


Figura 1 – Tumores classificados de acordo com a queratinização. H&E, aumento original, X100. (A) Escore 1 - altamente queratinizado (>50% das células); (B) Escore 2 - Moderadamente queratinizado de 20-50% das células; (C) Escore 3 - Mínima queratinização de 5-20% das células; (D) Nenhuma queratinização de 0-5% das células.

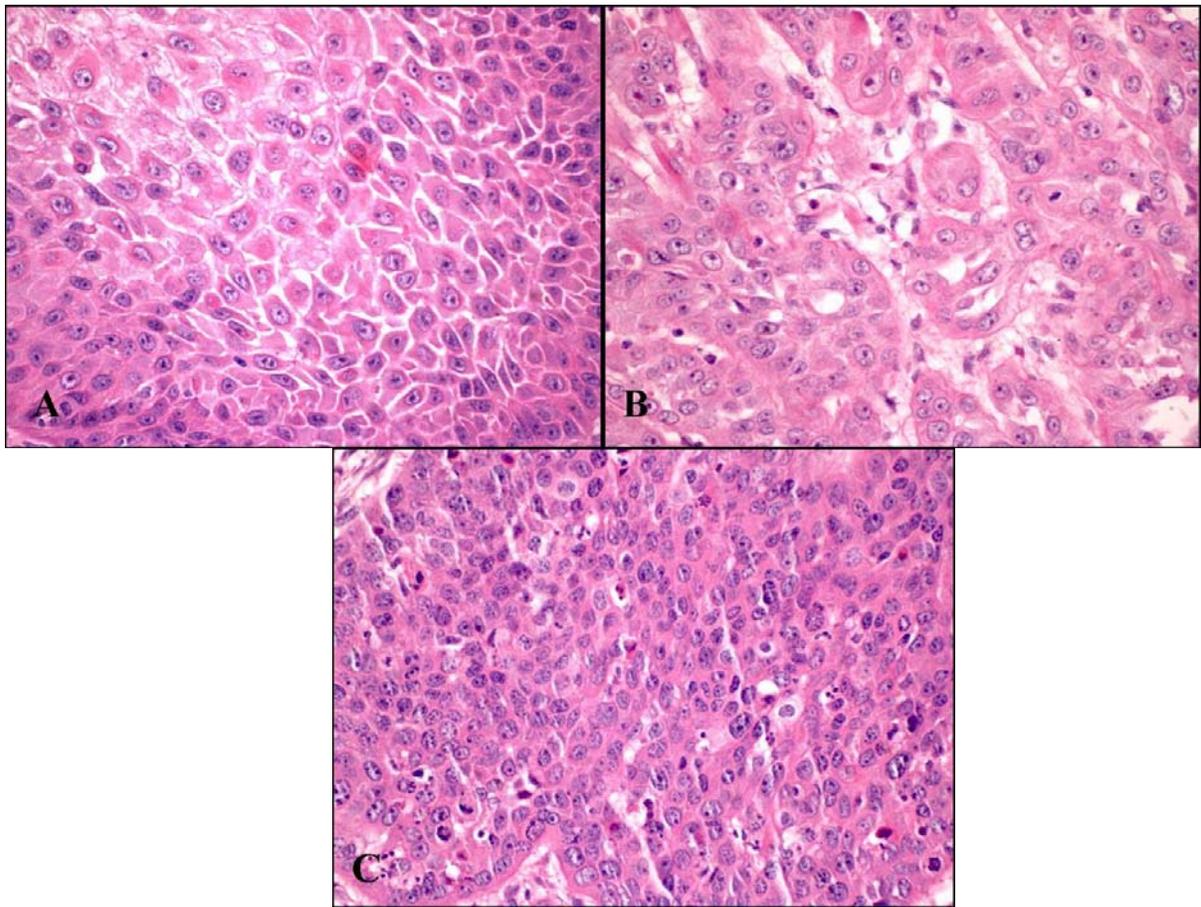


Figura 2 - Tumores classificados de acordo com o pleomorfismo nuclear. H&E, aumento original, X160. (A) Escore 1 - Pequeno pleomorfismo nuclear, >75% de células maduras; (B) Escore 2 - Moderadamente abundante pleomorfismo nuclear, 50-75% de células maduras; (C) Escore 3 - Abundante pleomorfismo nuclear, 25-50% de células maduras.

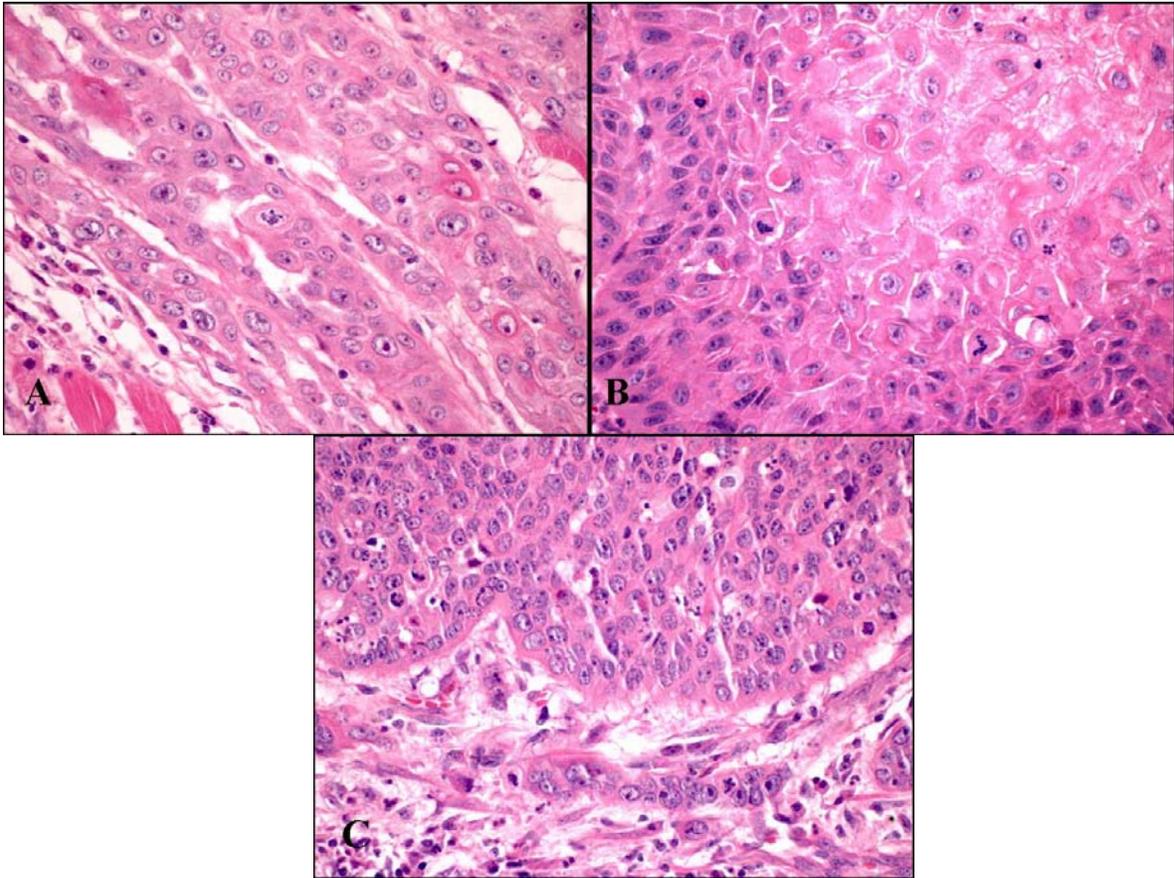


Figura 3 - Tumores classificados de acordo com o número de mitoses. H&E, aumento original, X160. (A) Escore 1 – de 0-1 mitose; (B) Escore 2 – de 2-3 mitoses; (C) Escore 3 – de 4-5 mitoses.

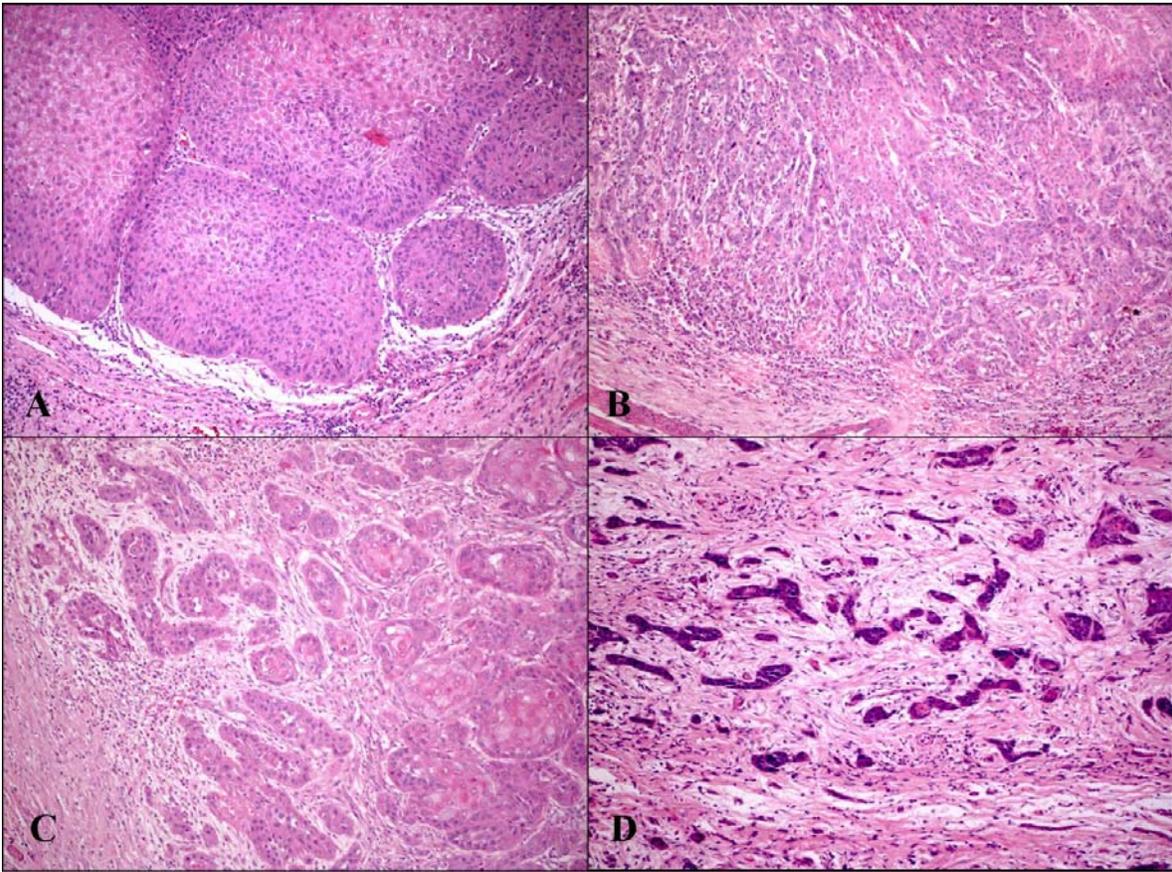


Figura 4 - Tumores classificados de acordo com o padrão de invasão. H&E, aumento original, X40. (A) Escore 1 - Empurrando, bordas bem delineadas; (B) Escore 2 - Ilhas ou cordões infiltrantes; (C) Escore 3 - Grupos ou cordões de células ($n > 15$); (D) Células soltas ou pequenos grupos ($n < 15$).

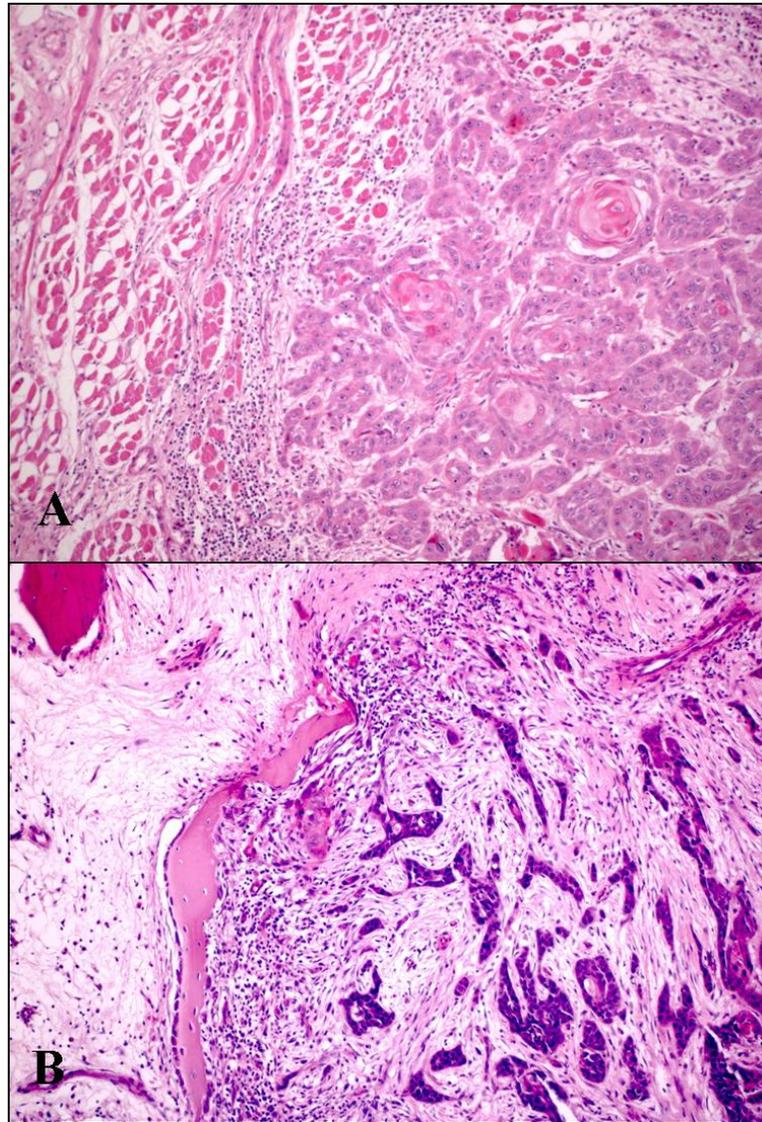


Figura 5 - Tumores classificados de acordo com o nível de invasão. H&E, aumento original, X40. (A) Escore 3 - Adjacente a músculo, glândula salivar e periósteo; (B) Escore 4 - Invasão profunda no estroma infiltrando osso.

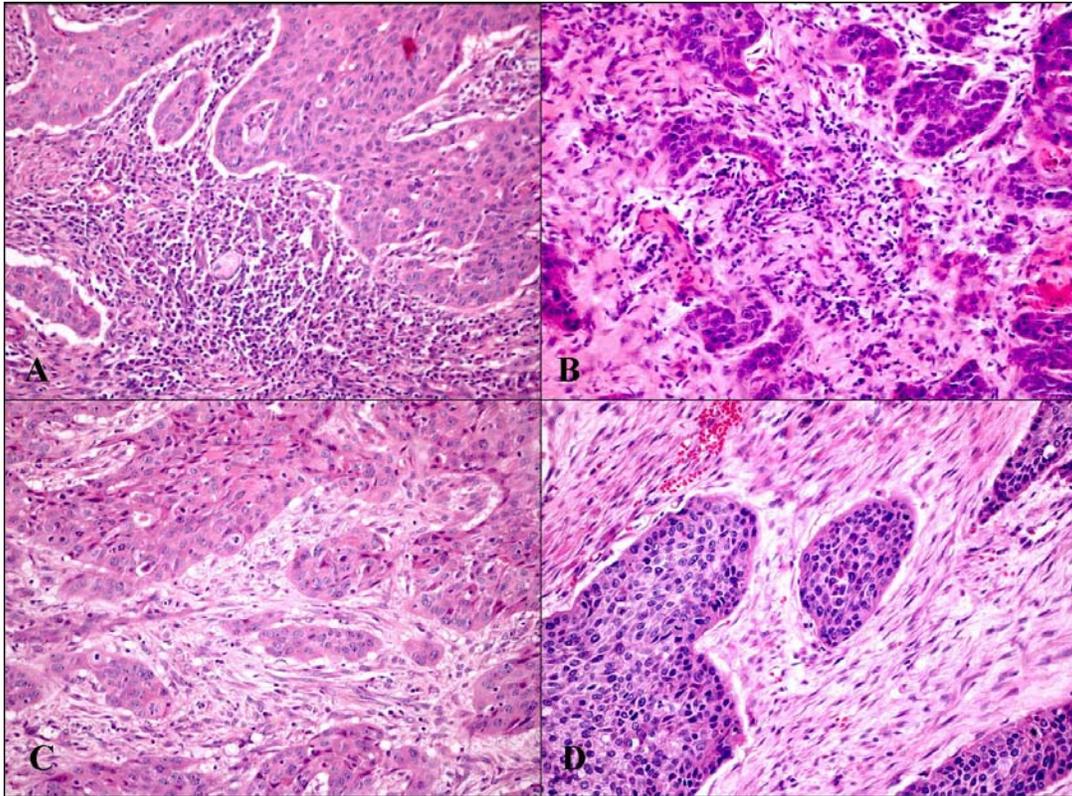


Figura 6 - Tumores classificados de acordo com o infiltrado inflamatório. H&E, aumento original, X100. (A) Escore 1 - Abundante; (B) Escore 2 - Moderado; (C) Escore 3 - Discreto; (D) Nenhum.

Com relação à gradação histopatológica de Anneroth *et al.* (1987), observou-se que, apesar de não estatisticamente significativa, houve uma forte tendência de associação global entre a soma dos pontos de todos os parâmetros e a recidiva ($p = 0,16$). Entretanto, já com a distribuição dos casos entre as faixas de pontuação, notou-se a existência de 5 (21,74%) casos com recidiva e apenas 2 (4,35%) casos do grupo controle com escore maior que 15, enquanto com pontuação menor ou igual a 15, havia 18 (78,26%) e 44 (95,65%) casos dos grupos recidiva e controle, respectivamente. Desta forma, quando a soma dos escores foi maior que 15, houve uma relação estatisticamente significativa para o desenvolvimento de recidivas (Teste exato de Fisher, $p = 0,03$) (Tabela 8).

Tabela 8 – Distribuição dos casos de acordo com a pontuação total de Anneroth *et al.* (1987).

Pontuação Anneroth	Grupo Recidiva		Grupo Controle		p*
	n	%	n	%	
8	0	0,00	1	2,17	
9	1	4,35	2	4,35	
10	2	8,70	5	10,87	
11	8	34,78	8	17,39	
12	2	8,70	8	17,39	
13	2	8,70	11	23,91	0,16
14	3	13,04	5	10,87	
15	0	0,00	4	8,70	
16	4	17,39	1	2,17	
17	0	0,00	0	0,00	
18	1	4,35	1	2,17	

*Teste exato de Fisher

Analisando-se cada parâmetro de Anneroth *et al.* (1987) individualmente, observou-se que os escores de queratinização mostraram forte tendência de associação linear com a ocorrência de recidivas. Enquanto o grupo recidiva apresentou 14 (60,87%), 6 (26,09%), 1 (4,35%) e 2 (8,70%) casos com escores 1, 2, 3 e 4, respectivamente, o grupo controle apresentou maior número de casos com maior queratinização, 34 (73,91%) com escore 1, 10 (21,74%) com escore 2 e 2 (4,35) casos com escore 3, não houve caso do grupo controle com escore 4 de queratinização, isto é, com mínima ou ausência total de queratinização ($p = 0,09$) (Tabela 9). De acordo com o item pleomorfismo nuclear, observou-se que nenhum dos grupos apresentou um nível 4, isto é, com extremo polimorfismo, em que menos de 25% das células são maduras. Os grupos recidiva e controle apresentaram mesmo percentual, 17,39%, de casos no escore 1, entretanto, nos demais escores observou-se que 69,57% e 13,04% dos casos recidiva estavam nos escores 2 e 3, respectivamente, e 65,22% e 17,39% dos casos controle tinham esta distribuição. Desta forma, apesar de percentuais muito próximos, houve um maior número de casos com maior pleomorfismo nuclear no grupo controle ($p = 0,76$) (Tabela 10). A análise do item mitose evidenciou que nem no grupo recidiva nem no controle, houve tumor com escore 4, isto é com mais de 5 mitoses por campo de maior aumento. Observou-se que houve uma distribuição maior de mitoses no grupo controle, pois enquanto no grupo recidiva, 20 (86,96%) casos apresentaram escore 1 e 3 (13,04%) casos apresentaram escore 2, no grupo controle, 31 (67,39%) casos e 13 (28,26%) casos apresentaram os escores 1 e 2, respectivamente. Ainda, somente o grupo controle teve casos com índice mitótico 3, 2 (4,35%) casos. Tal relação entre maior escore no parâmetro mitose e os casos controle foi marginalmente significativa ($p = 0,07$) (Tabela 11).

Com relação ao padrão de invasão de Anneroth *et al.* (1987), observamos um padrão mais infiltrativo nos casos com recidiva, enquanto o grupo controle apresentou 3 casos (6,52%), 35 (76,09%), 7 (15,22%) e 1 (2,17%) com escores de 1, 2, 3 e 4, respectivamente, o grupo recidiva não apresentou nenhum

caso com escore 1 ou 4, tinha 16 casos (69,57%) com escore 2 e 7 (30,43%) com escore 3. Assim vemos que enquanto mais de 82% dos casos do grupo controle tiveram escore 1 ou 2, mais de 30% dos casos recidiva tiveram escore 3, o que, apesar de não estatisticamente significativa, mostra uma associação entre o pior padrão de invasão e a ocorrência de recidivas ($p = 0,19$) (Tabela 12). O nível de invasão dos tumores apresentou distribuição apenas entre os escores 3 e 4, tendo em vista que o escore 1 engloba tumores *in situ* ou com invasão questionável, e o 2 envolve apenas lâmina própria, e tumores em estágios tão iniciais não foram observados na nossa amostra. No grupo recidiva, 14 (60,87%) tumores tiveram escore 3, em que o tumor se estende além da lâmina própria e envolve o conjuntivo adjacente à tecido muscular ou glândulas salivares, 9 (39,13%) tumores apresentaram o escore 4, representado por invasão profunda nas camadas de células musculares com disposição da maioria do tecido estromal ou com invasão óssea. No grupo controle, mesmos percentuais de distribuição foram vistos em ambos os escores 3 e 4 ($p = 1$) (Tabela 13). A inflamação predominou no grupo controle, já que foi considerada intensa, escore 1, em apenas 3 (13,04%) casos com recidiva e em 13 (28,26%) casos controle. Nos escores 2, inflamação moderada, e 3, inflamação discreta, observou-se maior número de casos do grupo recidiva com 11 (47,83%) e 9 (39,13%), respectivamente, que do grupo controle com 15 (32,61%) casos no escore 2 e 17 (36,96%) no escore 3. A inflamação somente foi considerada ausente em 1 caso, do grupo controle. Deste modo, apesar de não significativa, viu-se que os casos com infiltrado inflamatório mais intenso estavam no grupo controle ($p = 0,52$) (Tabela 14).

Tabela 9 – Distribuição dos casos segundo a queratinização de Anneroth *et al.* (1987).

Queratinização	Grupo Recidiva		Grupo Controle		p*
	n	%	n	%	
1	14	60,87	34	73,91	0,09
2	6	26,09	10	21,74	
3	1	4,35	2	4,35	
4	2	8,70	0	0,00	

*Qui-quadrado de Mantel-Haenszel

Tabela 10 – Distribuição dos casos de acordo com os escores de pleomorfismo nuclear de Anneroth *et al.* (1987).

Pleomorfismo Nuclear	Grupo Recidiva		Grupo Controle		p*
	n	%	n	%	
1	4	17,39	8	17,39	0,76
2	16	69,57	30	65,22	
3	3	13,04	8	66,67	
4	0	0,00	0	0,00	

*Qui-quadrado de Mantel-Haenszel

Tabela 11 – Distribuição dos casos de acordo com os escores de mitoses de Anneroth *et al.* (1987).

Mitoses	Grupo Recidiva		Grupo Controle		p*
	n	%	n	%	
1	20	86,96	31	67,39	0,07
2	3	13,04	13	28,26	
3	0	0,00	2	4,35	
4	0	0,00	0	0,00	

*Qui-quadrado de Mantel-Haenszel

Tabela 12 – Distribuição dos casos de acordo com o padrão de invasão de Anneroth *et al.* (1987).

Padrão de Invasão	Grupo Recidiva		Grupo Controle		p*
	n	%	n	%	
1	0	0,00	3	6,52	0,19
2	16	69,57	35	76,09	
3	7	30,43	7	15,22	
4	0	0,00	1	2,17	

*Qui-quadrado de Mantel-Haenszel

Tabela 13 – Distribuição dos casos segundo o nível de invasão de Anneroth *et al.* (1987).

Nível de Invasão	Grupo Recidiva		Grupo Controle		p*
	n	%	n	%	
1	0	0,00	0	0,00	1
2	0	0,00	0	0,00	
3	14	60,87	28	60,87	
4	9	39,13	18	39,13	

*Qui-quadrado de Mantel-Haenszel

Tabela 14 – Distribuição dos casos de acordo a inflamação de Anneroth *et al.* (1987).

Inflamação	Grupo Recidiva		Grupo Controle		p*
	n	%	n	%	
1	3	13,04	13	28,26	0,52
2	11	47,83	15	32,61	
3	9	39,13	17	36,96	
4	0	0,00	1	2,17	

*Qui-quadrado de Mantel-Haenszel

Com relação à gradação histopatológica segundo Bryne *et al.* (1992), observou-se que apesar de não ser estatisticamente significativa, houve uma tendência de associação entre a soma dos pontos de todos os parâmetros e a recidiva (Teste exato de Fisher, $p = 0,18$). Inicialmente, houve uma predominância de casos com menor pontuação no grupo recidiva, com 3 (13,04%) e 5 (21,74%) casos com escores 6 e 7, respectivamente, e 6 (26,09%) casos com escore 8, enquanto no grupo controle, nos escores 5 e 6, havia 1 (2,17%) caso em cada um dos escores e nos escores 7 e 8, havia 7 (15,22%) casos em cada. Com escore 9,

predominaram os casos do grupo controle, com 13 (28,26%) casos, enquanto no grupo recidiva havia 3 (13,04%) casos. Com escore 10, houve distribuição com percentual (8,70%) similar entre os grupos. Apenas casos controle apresentaram escore 11, foram 8 (17,39%) casos. Interessantemente, com o maior escore, 12 pontos, houve maior percentual de casos do grupo recidiva, 17,39% (4 casos), que grupo controle, 10,87% (5 casos), tal achado, apesar de não ser estatisticamente significativo, mostrou associação entre escore maior que 11 e as recidivas (Teste exato de Fisher, $p = 0,46$) (Tabela 15).

Tabela 15 – Distribuição dos casos de acordo com a pontuação total de Bryne *et al.* (1992).

Pontuação Bryne	Grupo Recidiva		Grupo Controle		p*
	n	%	n	%	
5	0	0,00	1	2,17	0,18
6	3	13,04	1	2,17	
7	5	21,74	7	15,22	
8	6	26,09	7	15,22	
9	3	13,04	13	28,26	
10	2	8,70	4	8,70	
11	0	0,00	8	17,39	
12	4	17,39	5	10,87	

*Teste exato de Fisher

A análise de cada parâmetro individualmente na área do fronte de invasão tumoral, como proposto por Bryne *et al.* (1992), também foi realizada. A queratinização revelou que 10 (43,48%) casos do grupo recidiva e 24 (52,17%) dos casos controle tiveram mais de 50% das células queratinizadas, escore 1. Com escore 2, em que 20% a 50% das células são queratinizadas, houve maior

número de casos recidiva, 10 (43,48%) casos, que casos controle, 16 (34,78%) casos. Apenas um menor número de casos apresentou escores 3 ou 4. No primeiro, havia 1 (4,35%) caso recidiva e 6 (13,04%) controle. Já no escore 4, queratinização mínima (de 0% a 5% das células), apenas foram vistos casos recidiva, 2 (8,70%) casos. Esta distribuição revelou uma associação entre menor queratinização e a ocorrência de recidivas ($p = 0,38$) (Tabela 16). Com relação ao pleomorfismo nuclear, assim como em Anneroth *et al.* (1987), foram vistos casos apenas nos escores 1, 2 e 3. Observou-se apenas 1 (4,35%) caso recidiva e 1 (2,17%) controle com escore 1. No escore 2, vimos a maioria dos casos, 18 (78,26%) casos do grupo recidiva e 30 (65,22%) casos do grupo controle. Já no escore 3, um maior percentual foi visto no grupo controle, 32,61% dos casos, que no recidiva, 17,39%. Observou-se de uma forma geral, um padrão contrário ao esperado, com maior pleomorfismo no grupo controle ($p = 0,17$) (Tabela 17). Com o item padrão de invasão, observou-se que apenas 1 (2,17%) caso controle mostrou o escore 1. Igual número de casos com escore 2 foi visto em ambos os grupos, 10 (43,48%) casos com recidiva e 10 (21,74%) do grupo controle. Já com escores 3 e 4, diversamente do esperado, observou-se um maior número de casos controle, tendo em vista que enquanto havia 11 (47,83%) e 2 (8,70%) casos recidiva nos escores 3 e 4, respectivamente, havia 26 (56,52%) e 9 (19,57%) casos controle. Desta forma, viu-se que piores padrões de invasão estavam associados ao grupo controle ($p = 0,11$) (Tabela 18). O critério inflamação mostrou a seguinte distribuição pelos escores, no grupo recidiva, 9 (39,13%) casos, 7 (30,43%), 6 (26,09%) e 1 (4,35%) caso com o escore 1, 2, 3 e 4, respectivamente, e no grupo controle, 6 (13,04%), 21 (45,65%), 18 (39,13%) e 1 (2,17%) caso com escores 1, 2, 3 e 4, respectivamente. Assim, também para o escore inflamação, foi vista uma relação invertida do que seria o esperado, pois de forma marginalmente significativa, os casos recidiva tiveram infiltrado inflamatório mais intenso que os casos do grupo controle ($p = 0,09$) (Tabela 19).

Tabela 16 – Distribuição dos casos de acordo com os escores de queratinização de Bryne *et al.* (1992).

Queratinização	Grupo Recidiva		Grupo Controle		p*
	n	%	n	%	
1	10	43,48	24	52,17	0,38
2	10	43,48	16	34,78	
3	1	4,35	6	13,04	
4	2	8,70	0	2,90	

*Qui-quadrado de Mantel-Haenszel

Tabela 17 – Distribuição dos casos de acordo com os escores de pleomorfismo nuclear de Bryne *et al.* (1992).

Pleomorfismo Nuclear	Grupo Recidiva		Grupo Controle		p*
	n	%	n	%	
1	1	4,35	1	2,17	0,17
2	18	78,26	30	65,22	
3	4	17,39	15	32,61	
4	0	0,00	0	0,00	

*Qui-quadrado de Mantel-Haenszel

Tabela 18 – Distribuição dos casos de acordo com os escores de padrão de invasão de Bryne *et al.* (1992).

Padrão de Invasão	Grupo Recidiva		Grupo Controle		p*
	n	%	n	%	
1	0	0,00	1	2,17	0,11
2	10	43,48	10	21,74	
3	11	47,83	26	56,52	
4	2	8,70	9	19,57	

*Qui-quadrado de Mantel-Haenszel

Tabela 19 – Distribuição dos casos de acordo com os escores de inflamação de Bryne *et al.* (1992).

Inflamação	Grupo Recidiva		Grupo Controle		p*
	n	%	n	%	
1	9	39,13	6	13,04	0,09
2	7	30,43	21	45,65	
3	6	26,09	18	39,13	
4	1	4,35	1	2,17	

*Qui-quadrado de Mantel-Haenszel

A fim de possibilitar uma comparação entre os escores de Anneroth *et al.* (1987) e Bryne *et al.* (1992), calcularam-se, através do teste ANOVA, média e desvio padrão dos escores para ambos os sistemas de gradação. Tendo em vista que os escores são variáveis ordinais, sua soma dentro de cada parâmetro, para a análise da média da queratinização, por exemplo, não é adequada, entretanto, pode-se calcular a soma dos escores para cada tumor, e através de média e desvio padrão, comparar os grupos. Observou-se que a média de Anneroth *et al.* (1987) para o grupo recidiva foi de 2,11 e de 2,05 para o grupo controle. Para

Bryne *et al.* (1992), as médias foram 2,13 e 2,29 para os grupos recidiva e controle, respectivamente. Para ambos os sistemas, a diferença entre os grupos não foi estatisticamente significativa, apesar disso, o valor de Bryne ($p = 0,18$) foi mais importante que o de Anneroth ($p = 0,55$). Porém, de acordo com os valores das médias, notou-se que para Bryne, contrariamente ao esperado, a média do grupo controle foi maior que a do grupo recidiva. Deste modo, apesar de menos significativa estatisticamente, o sistema de Anneroth mostrou-se mais coerente para a análise dos tumores e correlação com o prognóstico (Tabela 20).

Tabela 20 – Análise de média e desvio padrão dos sistemas de gradação de Anneroth *et al.* (1987) e Bryne *et al.* (1992) para os grupos recidiva e controle.

Sistemas	Grupo Recidiva		Grupo Controle		p*
	Média	Desvio padrão	Média	Desvio padrão	
Anneroth	2,11	0,40	2,05	0,32	0,55
Bryne	2,13	0,49	2,29	0,44	0,18

*ANOVA

5.3 Expressão imunohistoquímica

A análise da expressão dos marcadores FAS e ErbB2 foi realizada. Com relação à FAS, notou-se marcação principalmente nas áreas mais diferenciadas do tumor (Figura 7). De uma forma geral todos os casos expressaram FAS, entretanto, apenas casos do grupo recidiva tiveram marcação considerada fraca, 4 casos (17,39%). A expressão foi avaliada como intensa em 100% dos casos

controle e em 82,61% dos casos com recidiva. Uma relação estatisticamente significativa foi vista entre FAS e a ocorrência de recidiva ($p = 0,01$) (Tabela 21).

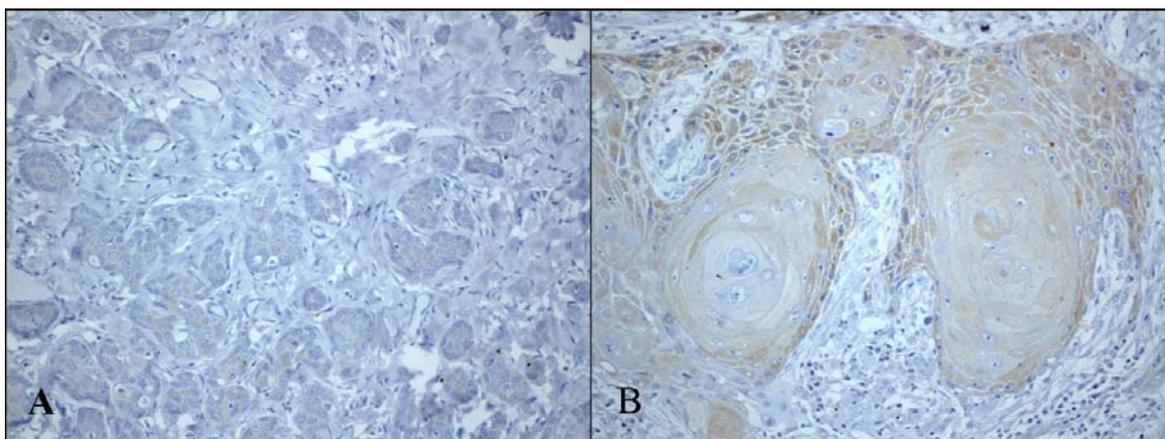


Figura 7 – Expressão de FAS. Aumento original, X100. (A) Marcação fraca, vista especialmente nas áreas menos queratinizadas do tumor; (B) Marcação intensa, em áreas de queratinização.

Tabela 21 – Distribuição dos casos de acordo com a expressão de FAS.

FAS	Grupo Recidiva		Grupo Controle		p
	n	%	n	%	
1	4	17,39	0	0	0,01
2	19	82,61	46	100	

*Teste exato de Fisher

Para ErbB2, observou-se padrão duplo de marcação, em membrana e no citoplasma. A marcação em membrana foi evidente, assim como ocorreu para FAS, nas áreas mais diferenciadas do tumor, enquanto de uma forma contrária, a marcação no citoplasma foi mais forte em áreas menos diferenciadas (Figura 8). A

marcação de ErbB2 em membrana foi negativa em 5 casos, sendo 2 (8,79%) do grupo recidiva e 3 (6,52%) do grupo controle. Em 11 casos (47,83%) do grupo recidiva a expressão foi considerada fraca, enquanto 19 casos (41,30%) do grupo controle tiveram a mesma intensidade de marcação. Já uma expressão forte foi vista em mais da metade dos casos do grupo controle (52,17%) e em 43,48% dos casos recidiva (Tabela 22). Apesar de maior intensidade de marcação ter sido observada nos casos controle, não houve uma relação estatisticamente significativa ($p = 0,72$). Contrariamente, a marcação de ErbB2 em citoplasma foi vista em maior intensidade no grupo recidiva, tendo em vista que 26,09% dos casos recidiva e 60,87% dos casos controle tiveram marcação fraca e 73,91% dos casos recidiva foram considerados intensamente marcados enquanto 39,13% dos casos controle apresentaram esta marcação. Tal relação entre recidiva e ErbB2 citoplasmático foi considerada estatisticamente significativa ($p = 0,01$) (Tabela 23).

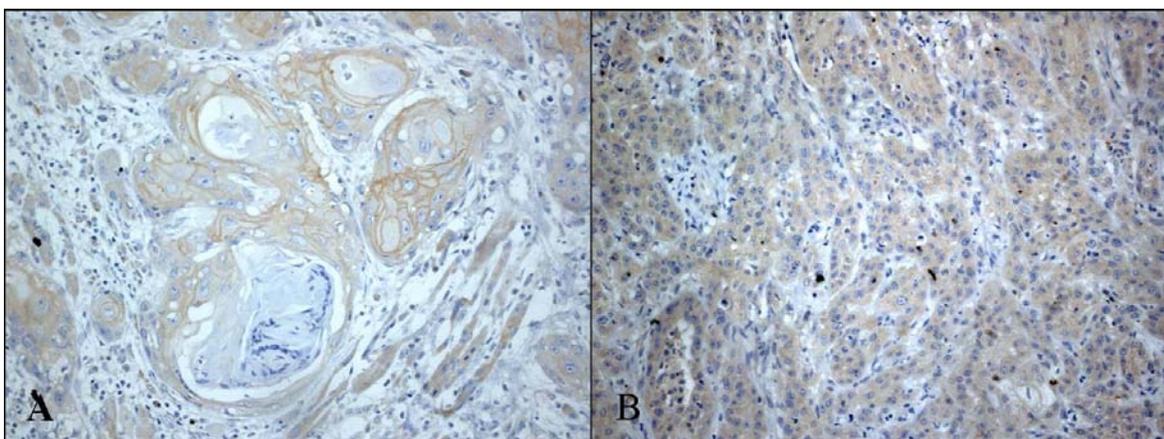


Figura 8 – Expressão de ErbB2. Aumento original, X100. (A) Marcação citoplasmática fraca e forte na membrana celular em área diferenciada do tumor; (B) Marcação intensa no citoplasma e fraca na membrana celular de área não queratinizada.

Tabela 22 – Distribuição dos casos de acordo com a expressão de ErbB2 em membrana celular.

ErbB2 Membrana	Grupo Recidiva		Grupo Controle		p
	n	%	n	%	
0	2	8,70	3	6,52	0,72
1	11	47,83	19	41,30	
2	10	43,48	24	52,17	

*Teste exato de Fisher

Tabela 23 – Distribuição dos casos de acordo com a expressão de ErbB2 no citoplasma.

ErbB2 Citoplasma	Grupo Recidiva		Grupo Controle		p
	n	%	n	%	
1	6	26,09	28	60,87	0,01
2	17	73,91	18	39,13	

*Teste exato de Fisher

5.4 Análises de sobrevida

A sobrevida global em 5 anos dos pacientes da amostra foi de 57,97%, sendo que especificamente para o grupo recidiva este percentual foi de 39,13% e para o grupo controle, de 67,39%. Já a sobrevida global em 10 anos foi de 24,64% para o total dos pacientes, e de 4,35% e 34,78% para os grupos recidiva e controle, respectivamente. A diferença entre a sobrevida de ambos os grupos foi estatisticamente significativa ($p < 0,0001$) (Tabela 24).

Tabela 24 – Sobrevida global em 5 e 10 anos dos pacientes com recidiva e controle.

Grupos	Sobrevida global				p
	5 anos		10 anos		
	n	%	n	%	
Recidiva	9	39,13	1	4,35	<0,0001
Controle	31	67,39	16	34,78	

*Log-Rank

As correlações entre a sobrevida global em 5 e 10 anos com características como gênero e idade não se mostraram estatisticamente significantes. O gênero masculino apresentou sobrevida em 5 e 10 anos de 56,45% e 22,58%, respectivamente, e o feminino, de 71,43% e 42,86% ($p = 0,26$). Com relação à idade, observou-se que o grupo de pacientes maiores de 45 anos teve sobrevida em 5 e 10 anos de 55,36% e 25%, respectivamente, e o grupo com idade igual ou inferior a 45 anos teve sobrevida de 69,23% e 23,08% ($p = 0,65$) (Tabela 25).

As demais características clínicas foram também correlacionadas à sobrevida global dos pacientes. O uso de fumo revelou que apesar de não ser estatisticamente significativo, houve uma maior sobrevida para os pacientes não fumantes, tendo em vista que a sobrevida dos usuários de fumo em 5 e 10 anos foi de 58,18% e 20%, respectivamente, e dos não fumantes foi de 62,5% e 50% ($p = 0,21$). O uso de álcool, por sua vez, teve papel estatisticamente significativo na sobrevida, já que os etilistas tiveram sobrevida de 53,19% e 12,77% em 5 e 10 anos, respectivamente, enquanto os pacientes que não ingeriam álcool tiveram sobrevida de 68,75% e 56,25% em 5 e 10 anos ($p = 0,0028$) (Tabela 26).

Tabela 25 – Sobrevida global em 5 e 10 anos de acordo com o gênero e a idade dos pacientes.

Variáveis	Categorias	Sobrevida				p
		5 anos		10 anos		
		n	%	n	%	
Gênero	Masculino	35	56,45	14	22,58	0,26
	Feminino	5	71,43	3	42,86	
Idade	> 45 anos	31	55,36	14	25	0,65
	≤ 45 anos	9	69,23	3	23,08	

*Log-Rank

Tabela 26 – Sobrevida global em 5 e 10 anos de acordo com o uso de tabaco e álcool.

Variáveis	Categorias	Sobrevida				p
		5 anos		10 anos		
		n	%	n	%	
Fumo	Sim	32	58,18	11	20	0,21
	Não	5	62,5	4	50	
Álcool	Sim	25	53,19	6	12,77	0,0028
	Não	11	68,75	9	56,25	

*Log-Rank

Associações entre a sobrevida e o estadiamento clínico do paciente foram realizadas. Com relação ao T, observou-se que T1 apresentou sobrevida maior que T4, porém, as demais categorias de T, 2 e 3, tiveram sobrevidas menores que T4, diferentemente do esperado. Assim, não houve uma associação entre o tamanho do tumor com a sobrevida global dos pacientes ($p = 0,78$). O comprometimento linfonodal (N), revelou sobrevidas em 5 anos próximas para NO,

N1 e N2, entretanto, para a sobrevida em 10 anos, como esperado, houve um decréscimo, sobrevidas de 34,37%, 20% e 0 para N0, N1 e N2, respectivamente. Uma correlação interessante, apesar de não ser estatisticamente significativa, foi vista entre maior N e menor sobrevida ($p = 0,11$). Para o estadiamento clínico (EC), seria esperado um decréscimo das sobrevidas com os piores estadios. Entretanto, foram observadas sobrevidas em 5 anos maiores para o estadio I, 66,66%, e IV, 62,96%, seguidas por III, com 51,85%, e II, com 50%. Na sobrevida em 10 anos, observou-se igual percentual, 33,3%, para os estadios I e II, o estadio III apresentou sobrevida de 18,52% e o IV, 25,93%. Deste modo, não houve uma associação entre estas variáveis ($p = 0,80$) (Tabela 27).

Tabela 27 – Sobrevida global em 5 e 10 anos de acordo com o tamanho do tumor (T), comprometimento linfonodal (N) e estadiamento clínico (EC).

Variáveis	Categorias	Sobrevida				p
		5 anos		10 anos		
		n	%	n	%	
T	1	7	70	3	30	0,78
	2	8	57,14	3	21,43	
	3	8	44,44	4	22,22	
	4	17	62,96	7	25,93	
N	0	18	56,25	11	34,37	0,11
	1	18	60	6	20	
	2	4	57,14	0	0	
EC	I	6	66,66	3	33,33	0,80
	II	3	50	2	33,33	
	III	14	51,85	5	18,52	
	IV	17	62,96	7	25,93	

*Log-Rank

Os pacientes foram divididos de acordo com o tratamento realizado: somente cirurgia e cirurgia e radioterapia. Maior sobrevida foi observada nos pacientes submetidos a ambos os tratamentos, correspondendo, em 5 e 10 anos, a 59,46% e 27,03%, já no grupo tratado apenas por cirurgia as sobrevidas em 5 e 10 anos foram de 56,25% e 21,88%, respectivamente. No entanto, a diferença não foi estatisticamente significativa ($p = 0,75$) (Tabela 28).

Tabela 28 – Sobrevida global em 5 e 10 anos de acordo com o tratamento dos pacientes.

Tratamento	Sobrevida				p
	5 anos		10 anos		
	n	%	n	%	
Cirurgia	18	56,25	7	21,88	0,75
Cirurgia + Radioterapia	22	59,46	10	27,03	

*Log-Rank

Os parâmetros e a soma total dos escores de Anneroth *et al.* (1987) e Bryne *et al.* (1992) foram também correlacionados com a sobrevida global dos pacientes.

A soma dos itens de Anneroth *et al.* (1987) revelou uma associação marginalmente significativa com a sobrevida dos pacientes. Quando a soma dos escores foi menor ou igual a 15, viu-se sobrevida em 5 e 10 anos de respectivamente, 61,29% e 25,81%, já quando a soma dos escores foi maior que 15, as sobrevidas caíram para 28,57% e 14,28%, em 5 e 10 anos ($p = 0,06$) (Tabela 29).

Tabela 29 – Sobrevida global em 5 e 10 anos de acordo com a soma dos escores de Anneroth *et al.* (1987).

Soma dos escores	Sobrevida				p
	5 anos		10 anos		
	n	%	n	%	
8-15	38	61,29	16	25,81	0,06
>15	2	28,57	1	14,28	

*Log-Rank

Uma associação estatisticamente significativa foi vista entre uma menor queratinização dos tumores segundo Anneroth *et al.* (1987) e menor sobrevida dos pacientes. Enquanto os pacientes com escore 1 de queratinização tiveram sobrevida em 5 e 10 anos de 64,58% e 27,08%, respectivamente, os pacientes com queratinização com escore 2 apresentaram sobrevida de 56,25% e 25%, para 5 e 10 anos, respectivamente. Nenhum dos 3 pacientes que tiveram escore 3 de queratinização e dos 2 que tiveram escore 4 estavam vivos após 5 anos do tratamento inicial ($p < 0,0001$) (Tabela 30).

Com relação ao pleomorfismo nuclear de Anneroth *et al.* (1987), viu-se que houve uma diminuição dos percentuais de sobrevida em 5 anos com o aumento do pleomorfismo, entretanto, o contrário aconteceu com os percentuais de 10 anos de sobrevida. Deste modo, não se verificou uma associação interessante entre estes itens ($p = 0,86$) (Tabela 31). Comportamento similar foi verificado para o parâmetro mitose dos mesmos autores: a sobrevida em 5 anos diminuiu com o aumento do número de mitoses, porém a sobrevida em 10 anos teve um aumento nos percentuais de sobrevida com o aumento do número de mitoses ($p = 0,62$) (Tabela 32).

Importante também foi o resultado da correlação entre sobrevida e padrão de invasão de Anneroth *et al.* (1987). Houve uma associação estatisticamente significativa entre pior padrão de invasão e menores sobrevidas.

Os pacientes com tumores que apresentaram padrão menos invasivo, escore 1, mostraram sobrevidas em 5 e 10 anos de 66,66% e 33,33%, respectivamente, o escore 2 teve sobrevidas de 58,82% e 25,49%, o escore 3 teve sobrevidas de 57,14% e 21,43% e o único paciente com escore 4 de padrão de invasão foi a óbito em menos de 5 anos ($p < 0,0001$) (Tabela 33).

O nível de invasão não se mostrou fidedigno para a predição da sobrevida, tendo em vista que o pior escore, 4, teve sobrevidas de 5 e 10 anos maiores, 62,96% e 25,93%, que o escore 3, com sobrevidas de 54,76% e 23,81% ($p = 0,87$) (Tabela 34).

Mais um parâmetro com associação significativa com a sobrevida global foi a inflamação de acordo com Anneroth et al. (1987). Com sobrevida em 5 anos, os percentuais para os escores 1, 2, 3 e 4 foram de 75%, 61,54%, 46,15% e 0, respectivamente, e com sobrevida em 10 anos, os percentuais foram de 31,25%, 34,62%, 11,54% e 0. De uma forma geral, quanto menor a inflamação presente no tumor, menor a sobrevida dos pacientes ($p < 0,0001$) (Tabela 35).

Tabela 30 – Sobrevida global em 5 e 10 anos de acordo com a queratinização de Anneroth *et al.* (1987).

Queratinização	Sobrevida				p
	5 anos		10 anos		
	n	%	n	%	
1	31	64,58	13	27,08	<0,0001
2	9	56,25	4	25	
3	0	0	0	0	
4	0	0	0	0	

*Log-Rank

Tabela 31 – Sobrevida global em 5 e 10 anos de acordo com o pleomorfismo nuclear de Anneroth *et al.* (1987).

Pleomorfismo nuclear	Sobrevida				p
	5 anos		10 anos		
	n	%	n	%	
1	7	58,33	2	16,66	0,86
2	26	56,52	12	26,09	
3	5	45,45	3	27,27	

*Log-Rank

Tabela 32 – Sobrevida global em 5 e 10 anos de acordo com a mitose de Anneroth *et al.* (1987).

Mitose	Sobrevida				p
	5 anos		10 anos		
	n	%	n	%	
1	30	58,82	11	21,57	0,62
2	9	56,25	5	31,25	
3	1	50	1	50	

*Log-Rank

Tabela 33 – Sobrevida global em 5 e 10 anos de acordo com o padrão de invasão de Anneroth *et al.* (1987).

Padrão de invasão	Sobrevida				p
	5 anos		10 anos		
	n	%	n	%	
1	2	66,66	1	33,33	<0,0001
2	30	58,82	13	25,49	
3	8	57,14	3	21,43	
4	0	0	0	0	

*Log-Rank

Tabela 34 – Sobrevida global em 5 e 10 anos de acordo com o nível de invasão de Anneroth *et al.* (1987).

Nível de invasão	Sobrevida				p
	5 anos		10 anos		
	n	%	n	%	
3	23	54,76	10	23,81	0,87
4	17	62,96	7	25,93	

*Log-Rank

Tabela 35 – Sobrevida global em 5 e 10 anos de acordo com a inflamação de Anneroth *et al.* (1987).

Inflamação	Sobrevida				p
	5 anos		10 anos		
	n	%	n	%	
1	12	75	5	31,25	<0,0001
2	16	61,54	9	34,62	
3	12	46,15	3	11,54	
4	0	0	0	0	

*Log-Rank

Com relação à soma dos itens de Bryne *et al.* (1992), viu-se que os casos que tiveram soma de 8 a 11 mostraram sobrevida em 5 e 10 anos de 61,66% e 25%, enquanto os casos com soma maior que 11 tiveram sobrevidas de 33,33% e 22,22%. Apesar da diminuição das sobrevidas, de acordo com a maior soma dos escores, não foi observada relação estatisticamente significativa entre estas variáveis ($p = 0,18$) (Tabela 36).

Tabela 36 – Sobrevida global em 5 e 10 anos de acordo com a soma dos itens de Bryne *et al.* (1992).

Soma dos escores	Sobrevida				p
	5 anos		10 anos		
	n	%	n	%	
8-11	37	61,66	15	25	0,18
>11	3	33,33	2	22,22	

*Log-Rank

Os parâmetros individuais segundo Bryne *et al.* (1992) foram também analisados e observou-se que o único resultado estatisticamente significativo foi a correlação entre maior queratinização e maior sobrevida. Para a sobrevida de 5 anos, visualizou-se um decréscimo dos percentuais de acordo com o maior escore de queratinização, exceto para o escore 4. Os escores 1, 2, 3 e 4 tiveram respectivamente, os seguintes percentuais de sobrevida: 67,65%, 53,85%, 42,86% e 50%. Com sobrevida em 10 anos, notaram-se os percentuais de 29,41%, 23,08%, 14,29% e 0, para os escores 1, 2, 3 e 4, respectivamente ($p < 0,0001$) (Tabela 37).

O item pleomorfismo nuclear mostrou sobrevidas em 5 anos de 0, 60,47% e 57,89% para os escores 1, 2 e 3. Já para a sobrevida em 10 anos, houve um acréscimo de sobrevida de acordo com o aumento dos escores. Para os escores 1, 2 e 3, foram vistas as seguintes sobrevidas em 10 anos: 0, 18,75% e 42,11%. Tal associação de aumento da sobrevida com maior pleomorfismo mostrou-se marginalmente significativa ($p = 0,08$) (Tabela 38).

Para o item padrão de invasão, observaram-se sobrevidas em 5 anos de 0, 65%, 56,75% e 54,54% para os escores 1, 2, 3 e 4, respectivamente. As sobrevidas em 10 anos foram de 0, 25%, 24,32% e 27,27%, para os escores 1, 2, 3 e 4. Desta forma, não houve um padrão de apresentação das sobrevidas que justificasse uma correlação significativa com o padrão de invasão ($p = 0,91$) (Tabela 39).

A inflamação, exceto para o escore 1 que teve sobrevidas em 5 e 10 anos de 60% e 13,33%, mostrou-se mais intensa nos casos com melhor sobrevida. Os escores 2, 3 e 4 tiveram sobrevidas em 5 anos de 60,71%, 54,16% e 50%, e em 10 anos de 32,14%, 25% e 0 ($p = 0,22$) (Tabela 40).

Tabela 37 – Sobrevida global em 5 e 10 anos de acordo com a queratinização de Bryne *et al.* (1992).

Queratinização	Sobrevida				p
	5 anos		10 anos		
	n	%	n	%	
1	23	67,65	10	29,41	<0,0001
2	14	53,85	6	23,08	
3	3	42,86	1	14,29	
4	1	50	0	0	

*Log-Rank

Tabela 38 – Sobrevida global em 5 e 10 anos de acordo com o pleomorfismo nuclear de Bryne *et al.* (1992).

Pleomorfismo nuclear	Sobrevida				p
	5 anos		10 anos		
	n	%	n	%	
1	0	0	0	0	0,08
2	29	60,47	9	18,75	
3	11	57,89	8	42,11	

*Log-Rank

Tabela 39 – Sobrevida global em 5 e 10 anos de acordo com o padrão de invasão de Bryne *et al.* (1992).

Padrão de invasão	Sobrevida				p
	5 anos		10 anos		
	n	%	n	%	
1	0	0	0	0	0,91
2	13	65	5	25	
3	21	56,75	9	24,32	
4	6	54,54	3	27,27	

*Log-Rank

Tabela 40 – Sobrevida global em 5 e 10 anos de acordo com a inflamação de Bryne *et al.* (1992).

Inflamação	Sobrevida				p
	5 anos		10 anos		
	n	%	n	%	
1	9	60	2	13,33	0,22
2	17	60,71	9	32,14	
3	13	54,16	6	25	
4	1	50	0	0	

*Log-Rank

Como importante resultado deste estudo, observaram-se que as sobrevidas em 5 e 10 anos foram fortemente associadas à FAS, tendo em vista que os 4 pacientes que tiveram expressão fraca de FAS faleceram antes mesmo de 5 anos ($p = 0,0002$) (Tabela 41). Para ErbB2 expresso em membrana, notou-se também uma sobrevida crescente de acordo com marcação mais forte: sobrevidas

em 5 anos de 43,33% e em 10 anos de 16,66% para o escore 1, e sobrevidas em 5 anos de 70,59% e em 10 anos de 29,41%. Entretanto, para os 5 casos com marcação nula de ErbB2 houve uma sobrevida de 5 e 10 anos de 60% e 40%, respectivamente, o que provavelmente afastou a significância deste marcador ($p = 0,14$) (Tabela 42). Embora também não estatisticamente significativa, a marcação de ErbB2 no citoplasma das células foi intensamente relacionada à sobrevida. Os casos que tiveram expressão forte apresentaram sobrevidas em 5 e 10 anos de 54,28% e 14,28, respectivamente, enquanto os que expressaram fracamente este marcador tiveram maiores sobrevidas, 61,76% aos 5 anos e 35,29% aos 10 anos ($p = 0,12$) (Tabela 43).

Tabela 41 – Sobrevida global em 5 e 10 anos de acordo com a expressão de FAS.

FAS	Sobrevida				p
	5 anos		10 anos		
	n	%	n	%	
1	0	0	0	0	0,0002
2	40	61,54	17	26,15	

*Log-Rank

Tabela 42 – Sobrevida global em 5 e 10 anos de acordo com a expressão de ErbB2 na membrana celular.

ErbB2 membrana	Sobrevida				p
	5 anos		10 anos		
	n	%	n	%	
0	3	60	2	40	0,14
1	13	43,33	5	16,66	
2	24	70,59	10	29,41	

*Log-Rank

Tabela 43 – Sobrevida global em 5 e 10 anos de acordo com a expressão de ErbB2 no citoplasma celular.

ErbB2 citoplasmático	Sobrevida				p
	5 anos		10 anos		
	n	%	n	%	
1	21	61,76	12	35,29	0,12
2	19	54,28	5	14,28	

*Log-Rank

5.5 Correlação entre queratinização e expressões de FAS e ErbB2

A queratinização obtida através do sistema de gradação de Anneroth *et al.* (1987), devido sua melhor significância para o prognóstico ($p = 0,09$) que a obtida segundo Bryne *et al.* (1992), ($p = 0,38$), foi correlacionada com os marcadores imunohistoquímicos.

Queratinização e a expressão de FAS foram associadas de forma marginalmente significativa. Mais de 70% dos casos com escore 2 de FAS tiveram queratinização em mais de 50% das células (escore 1), 23,08% tiveram escore de queratinização 2 e cerca de 6% tiveram escores 3 e 4 de queratinização. Apenas 4 casos apresentaram escore 1 de FAS, sendo que 2 (50%) eram bastante queratinizados, 1 tinha escore de queratinização 2 e o restante tinha queratinização mínima (escore 4) ($p = 0,08$) (Tabela 44).

Tabela 44 – Distribuição da expressão de FAS de acordo com a queratinização.

Variável	Escore	FAS				p
		1		2		
		n	%	n	%	
Queratinização	1	2	50	46	70,77	0,08
	2	1	25	15	23,08	
	3	0	0	3	4,62	
	4	1	25	1	1,54	

*Qui-quadrado de Mantel-Haenszel

A expressão de ErbB2 na membrana celular foi significativamente associada à queratinização. Dos casos com intensa expressão de ErbB2 (escore 2), quase 90% eram intensamente queratinizados, 8,82% tinham escore 2 de queratinização e apenas 1 (2,94%) caso tinha escore 3. Com expressão fraca de ErbB2 membrana (escore 1), foram vistos 16 (53,33%) casos com queratinização 1, 12 (40%) casos com queratinização 2 e apenas 1 (3,33%) caso em ambos os escores 3 e 4 de queratinização. Com marcação negativa, observaram-se 2 (40%) casos com escore 1 de queratina, e 1 (20%) caso em cada um dos demais escores ($p = 0,0006$) (Tabela 45).

Com relação à ErbB2 citoplasmático, apenas uma discreta associação foi vista com a queratinização do tumor. Dos casos com escore 2, 77,14% tinha escore 1 de queratinização e cerca de 20% estava distribuído entre os demais escores de queratinização. Com expressão fraca de ErbB2 citoplasmático, 61,76% dos casos eram intensamente queratinizados e 29,41%, 5,88% e 2,94% tiveram queratinização com escores 2, 3 e 4 ($p = 0,27$) (Tabela 46).

Tabela 45 – Distribuição da expressão de ErbB2 membrana de acordo com a queratinização.

Variável	Escore	ErbB2 membrana						p
		0		1		2		
		n	%	n	%	N	%	
Queratinização	1	2	40	16	53,33	30	88,24	0,0006
	2	1	20	12	40	3	8,82	
	3	1	20	1	3,33	1	2,94	
	4	1	20	1	3,33	0	0	

*Qui-quadrado de Mantel-Haenszel

Tabela 46 – Distribuição da expressão de ErbB2 citoplasmático de acordo com a queratinização.

Variável	Escore	ErbB2 citoplasmático				p
		1		2		
		n	%	n	%	
Queratinização	1	21	61,76	27	77,14	0,27
	2	10	29,41	6	17,14	
	3	2	5,88	1	2,86	
	4	1	2,94	1	2,86	

*Qui-quadrado de Mantel-Haenszel

Os demais parâmetros histopatológicos, obtidos através dos sistemas de gradação de Anneroth *et al.* (1987) ou Bryne *et al.* (1992), não se revelaram estatisticamente associados às expressões de FAS e ErbB2.

5.6 Correlação entre as variáveis FAS e ErbB2

As expressões de FAS e ErbB2 em membrana mostraram-se fortemente relacionadas, sendo consideradas marginalmente significantes. Tal fato pode ser verificado observando-se que mais de 50% dos casos de expressão intensa de FAS também tiveram expressão intensa de ErbB2 em membrana. Da mesma forma, os 4 únicos casos que foram fracos para FAS, também o foram para ErbB2 ($p = 0,07$) (Tabela 47). Já as correlações entre FAS e ErbB2 em citoplasma e as correlações entre ErbB2 em membrana e citoplasmático não revelaram significância estatística $p = 0,61$ e $p = 0,14$, respectivamente (Tabelas 48 e 49).

Tabela 47 – Correlação entre as expressões de FAS e ErbB2 em membrana.

Variável	Escore	FAS				p
		1		2		
		n	%	n	%	
ErbB2 membrana	0	0	0	5	7,69	0,07
	1	4	100	26	40	
	2	0	0	34	52,31	

*Teste exato de Fisher

Tabela 48 – Correlação entre as expressões de FAS e ErbB2 citoplasmático.

Variável	Escore	FAS				p
		1		2		
		n	%	n	%	
ErbB2 citoplasmático	1	1	25	33	50,77	0,61
	2	3	75	32	49,23	

*Teste exato de Fisher

Tabela 49 – Correlação entre as expressões de ErbB2 citoplasmático e de membrana.

Variável	Escore	ErbB2 membrana						p
		0		1		2		
		n	%	n	%	n	%	
ErbB2	1	4	80	17	56,67	13	38,24	0,14
citoplasmático	2	1	20	13	43,33	21	61,76	

*Teste exato de Fisher

6 DISCUSSÃO

A recidiva local é considerada a ocorrência de um novo tumor com distância de 1,5cm ou até 2cm do tumor primário (Braakhuis *et al.*, 2002). Diversos estudos têm mostrado um percentual de recidiva local, em casos de CEC bucal, que varia de 20,3% a 62,6% (Kowalski, 2002; Silva *et al.*, 2004; Agra *et al.*, 2006; Koo *et al.*, 2006). Em cerca de 90% dos pacientes, as recidivas ocorrem em até 2 anos após o tratamento inicial (Kowalski, 2002; Koo *et al.*, 2006). Quando as recorrências surgem antes de 1 ano, são consideradas precoces (Agra *et al.*, 2006). Dos pacientes com recorrências loco-regionais de CEC bucal, apenas cerca de 50% são indicados para cirurgia de resgate, devido ao estadio avançado da doença e pobre sobrevividas (Kowalski, 2002). Tendo em vista a importância das recorrências, principalmente a local precoce, no controle da doença e do seu impacto negativo na sobrevivida, parâmetros que ajudem a compreender o comportamento tumoral precisam ser definidos e postos em prática no intuito de individualizar o tratamento dos pacientes e possibilitar sua cura (Braakhuis *et al.*, 2002).

A amostra observada neste estudo apresentou maior prevalência masculina (89,85%), com uma distribuição de 8,8:1. Esta proporção entre homens e mulheres depende do estudo em questão e varia de 3:1 a 15:1 (Iamaroon *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2004; Scully & Felix, 2006). A idade média dos pacientes foi de 55,5 anos. A predileção por este grupo etário é normalmente observada em pacientes com CEC bucal, entretanto, vale ressaltar um acometimento crescente de pacientes mais jovens (Barnes *et al.*, 2005; Sasaki *et al.*, 2005; Koo *et al.*, 2006; Scully & Felix, 2006). Gênero e idade não foram estatisticamente relacionados ao desenvolvimento de recidivas, conforme observado também por Brandwein-Gensler *et al.* (2005) e Koo *et al.* (2006). Com relação aos fatores etiológicos principais para o CEC bucal, fumo e álcool, observou-se um maior número de pacientes sem o uso dessas substâncias no grupo controle, e apesar

de não ser observada relação estatisticamente significativa, os riscos relativos para fumantes e etilistas desenvolverem recidivas foram de 2,62 e 2,89, respectivamente. O papel do fumo e álcool como fatores etiológicos sinérgicos para o CEC bucal já é bem estabelecido, além disso, a associação desses fatores a um pobre controle local já foi vista em alguns trabalhos (Johnson, 2001; Mansour *et al.*, 2003; Scully & Felix, 2006; Liao *et al.*, 2007).

Conforme os pacientes foram selecionados de acordo com o estadiamento clínico da doença e a localização dos tumores, esses dados foram proporcionais entre os grupos. A localização mais comum dos tumores foi a língua, cerca de 80% dos casos, assim como o descrito em outros trabalhos e em recente revisão sobre o tema, em que a língua foi apontada como principal sítio da doença (Silva *et al.*, 2004; Koo *et al.*, 2006; Scully & Felix, 2006). Apesar de o estadiamento clínico ter sido similar entre os grupos, variações puderam ser vistas com relação ao T e ao N. Enquanto o T sofreu apenas discreta variação entre os pacientes dos grupos controle e recidiva, observou-se que o N foi maior, apesar de não estatisticamente significativa, entre os pacientes do grupo recidiva, já que 17,4% dos pacientes do grupo recidiva eram N2 e apenas 6,5% dos pacientes do grupo controle tiveram esta classificação. Tal observação está de acordo com maiores taxas de recorrência local e metástases em pacientes com estadiamento clínico mais avançado e maior comprometimento linfonodal (Koo *et al.*, 2006, Scully & Felix, 2006; Scully & Bagan, 2007).

O tratamento dos pacientes com CEC bucal é selecionado com base na extensão local do tumor, status linfonodal, preferências do paciente e na experiência de cada instituição (Boyle *et al.*, 2003; Carvalho *et al.*, 2003). Nossos resultados mostraram uma relação estatisticamente significativa entre o tratamento apenas por cirurgia e o desenvolvimento de recidivas ($p = 0,03$). Carvalho *et al.* (2003) enfatizaram que no seu grupo de pacientes em estádios iniciais, em que foram realizadas cirurgia e radioterapia não se observou menor taxa de recorrência loco-regional do que nos que foram submetidos à cirurgia somente, entretanto, nos casos mais avançados, os autores recomendam a radioterapia

adjuvante a fim de reduzir a recorrência. Os autores citam como importantes fatores do tratamento cirúrgico, o papel das margens livres e do tratamento das metástases cervicais e com relação à radioterapia, equipamento, fracionamento e dose seriam decisivos para o sucesso. Tendo em vista que todos os nossos casos tinham margens cirúrgicas livres, devemos destacar que eventuais células malignas remanescentes ou células intensamente displásicas, associadas ao conceito de malignização de campo, podem ter sido destruídas através de radioterapia adjuvante, diminuindo assim a recidiva tumoral (Braakhuis *et al.*, 2002).

Diversos sistemas de gradação histopatológica bem como marcadores biológicos têm sido desenvolvidos e testados, no intuito de extrair subsídios para a predição do comportamento tumoral, no que tange às recorrências locais ou regionais, metástases e análise da sobrevida dos pacientes (Anneroth & Hansen, 1984; Anneroth *et al.*, 1987; Broders, 1987; Bryne *et al.*, 1992; Field, 1992; Lopes *et al.*, 2002; Hardisson, 2003; Chen *et al.*, 2007). Neste estudo, analisamos os sistemas de gradação histopatológica propostos por Anneroth *et al.* (1987) e Bryne *et al.* (1992) e os marcadores FAS e ErbB2 em casos com e sem recidiva local precoce.

O sistema de gradação de Anneroth *et al.* (1987) evidenciou uma forte tendência de associação entre a soma dos pontos de todos os parâmetros e o desenvolvimento de recidivas ($p = 0,16$). Quando o valor desta soma foi superior a 15, o desenvolvimento de recidiva local foi estatisticamente significativo ($p = 0,03$). Tumores com pontuação maior que 15 são pobremente diferenciados, o que resultaria em pior prognóstico (Okada *et al.*, 2003; Siriwardena *et al.*, 2007). A análise individual dos parâmetros revelou como mais importantes, apesar de não estatisticamente significativa, em relação às recidivas, a queratinização ($p = 0,09$) e o padrão de invasão ($p = 0,19$). Apesar do item número de mitoses ter se mostrado marginalmente significativo ($p = 0,07$), observou-se pior escore entre os tumores do grupo controle. Da mesma forma, Siriwardena *et al.* (2007) observaram maior número de mitoses em tumores de pacientes idosos, mais bem

diferenciados, que em pacientes jovens. Entretanto, o maior número de mitoses é geralmente observado em tumores com menor diferenciação (De Araújo *et al.* 1997, Okada *et al.*, 2003). Tal dificuldade na avaliação do item número de mitoses pode ser destacada, pela opção de Bryne *et al.* (1992) em remover este item do seu sistema de gradação a fim de aumentar sua reprodutibilidade, além disso, os autores confirmaram que esta remoção não prejudicaria a confiabilidade do sistema. Os demais critérios, pleomorfismo nuclear, inflamação e nível de invasão não se mostraram tão apropriados para a predição dos grupos. De uma forma geral, nossos resultados foram concordes com o visto por Okada *et al.* (2003), que estudaram tumores com metástases cervicais, e observaram como parâmetros individuais mais importantes a queratinização e o padrão de invasão. Lopes *et al.*, (2002) visualizaram relação estatisticamente significativa apenas entre a queratinização e a ocorrência de metástases regionais. Para Warburton *et al.* (2007), também avaliando metástases regionais, apenas o pleomorfismo nuclear foi estatisticamente significativo, mas também foram importantes os itens queratinização e padrão de invasão.

O sistema de gradação proposto por Bryne *et al.* (1992) apesar de não estatisticamente significativo, associou uma pontuação maior que 11 às recidivas ($p = 0,46$). Entretanto, a análise individual dos parâmetros revelou correlação apropriada apenas do item queratinização com a recorrência local ($p = 0,38$). Nos demais itens houve uma inversão, pois piores escores foram vistos associados ao grupo controle. Kurokawa *et al.* (2005) observaram que uma pontuação maior ou igual a 11 tem valor preditivo para metástases regionais, entretanto, os efeitos de cada parâmetro não foram expostos. Altemani *et al.* (1999) não viram correlação do infiltrado inflamatório e padrão de invasão com o desenvolvimento de metástases regionais. Keski-Santti *et al.* (2007) também não associaram estatisticamente o padrão de invasão às metástases regionais. Spiro *et al.* (1999) viram uma correlação entre o padrão de invasão com metástases, mas não com a recorrência local. Odell *et al.* (1994) concordaram com a importância da queratinização e padrão de invasão tanto para recidiva quanto para metástase,

mas não viram relação do pleomorfismo ou inflamação com o prognóstico. Este sistema de gradação se baseia na análise das características tumorais na região do fronte invasivo, que é geralmente interpretado como a área mais profunda do tumor, ou a que apresenta um pior padrão de invasão (Bryne *et al.*, 1992). A falta de homogeneidade entre os resultados vistos pelos diversos autores, bem como a inversão vista nos nosso parâmetros, com maiores escores no grupo controle que no recidiva, poderia ser resultante da avaliação de uma área que não corresponda de fato ao fronte do tumor.

A análise da imunexpressão de FAS revelou uma marcação mais intensa principalmente nas áreas mais diferenciadas do tumor e uma relação estatisticamente significativa foi vista entre a expressão mais fraca de FAS e a ocorrência de recidiva ($p = 0,01$). Estes resultados confirmam dados já expostos na literatura, de que diferentemente do que ocorre em tumores como o de mama, endométrio, pulmão, entre outros, a maior expressão de FAS em CECs de boca está associada a melhor prognóstico (Krontiras *et al.*, 1999; Kuhajda, 2000; Silva *et al.*, 2004; Amanajás *et al.*, 2007; Silva *et al.*, 2007). Para ErbB2, um padrão duplo de marcação foi observado, em membrana e citoplasma, de forma que ao observarmos uma intensa marcação em membrana, o contrário era visto no citoplasma, assim como o descrito por Silva *et al.* (2007). Em nossos resultados de forma similar ao descrito na literatura, enquanto a marcação de ErbB2 em membrana foi evidente nas áreas mais diferenciadas do tumor, assim como visto para FAS, a marcação no citoplasma foi mais forte em áreas menos diferenciadas (Krontiras *et al.*, 1999; Silva *et al.*, 2004; Silva *et al.*, 2007). A maior marcação de ErbB2 em citoplasma foi estatisticamente significativa associada à recidiva ($p = 0,01$). Enquanto, diferentemente, a marcação de ErbB2 em membrana, apesar de não ser estatisticamente significativa, foi mais observada nos casos do grupo controle, concorde com a literatura ($p = 0,72$) (Silva *et al.*, 2007).

A sobrevida global em 5 anos dos pacientes envolvidos no estudo foi de 57,97%, valor próximo ao visto por outros autores (Kademani *et al.*, 2005; Vallecillo-Capilla *et al.*, 2007; Warburton *et al.*, 2007,). Para o grupo com recidiva

este valor foi de 39,13% aos 5 anos e de 4,35% aos 10 anos, e no grupo controle estes valores foram de 67,39% e 34,78%, respectivamente. A diferença entre os grupos foi estatisticamente significativa ($p < 0,0001$), o que é concorde com o grande impacto das recorrências loco-regionais na sobrevida dos pacientes (Agra *et al.*, 2006; Liao *et al.*, 2007b). Gênero, idade e fumo não foram estatisticamente significantes para a sobrevida global dos pacientes, diferentemente do álcool ($p = 0,0028$). Apesar de a literatura ser controversa, há resultados que associam pior sobrevida ao gênero feminino, pacientes mais idosos, fumantes e etilistas (Hosal *et al.*, 1998; Massano *et al.*, 2006; Koo *et al.*, 2006; Liao *et al.*, 2007; Vallecillo-Capilla *et al.*, 2007).

Nossos resultados não foram estatisticamente significantes, mas houve uma associação entre maior comprometimento linfonodal e menor sobrevida, assim como descrito por diversos autores (Massano *et al.*, 2006; Kademani *et al.*, 2005; Koo *et al.*, 2006; Vallecillo-Capilla *et al.*, 2007). Da mesma forma, foi observada melhor sobrevida, embora também não estatisticamente significativa, para os pacientes tratados com cirurgia e radioterapia. Boyle *et al.* (2003) descreveram em um editorial a experiência de sua instituição, em que em 50 anos houve uma melhoria da sobrevida dos pacientes com CECs de boca, a partir da associação da cirurgia com a radioterapia adjuvante.

A sobrevida global em 5 e 10 anos foi fortemente associada aos seguintes parâmetros de Anneroth *et al.* (1987): queratinização ($p < 0,0001$), padrão de invasão ($p < 0,0001$) e inflamação ($p < 0,0001$). Com relação à Bryne *et al.* (1992), a sobrevida esteve significativamente associada apenas à queratinização ($p < 0,0001$). A soma dos escores de Anneroth *et al.* (1987) acima de 15 revelou-se importante fator para a sobrevida ($p = 0,06$), diferentemente da soma maior que 11 para Bryne *et al.* (1992) ($p = 0,18$). A associação entre as características microscópicas do tumor e a sobrevida dos pacientes tem sido pesquisada, entretanto, os resultados permanecem controversos (Massano *et al.*, 2006). Keski-Santti *et al.* (2007) não acharam correlação entre parâmetros histopatológicos e sobrevida, diferentemente de Kademani *et al.* (2005) e Liao *et*

al. (2007b). Os nossos resultados evidenciaram maior correlação do sistema de gradação proposto por Anneroth *et al.* (1987) que por Bryne *et al.* (1992) com o desenvolvimento de recidivas e análise de sobrevida. A comparação entre ambos os sistemas através de médias, apesar de não ser significativa, mostrou também uma superioridade do sistema de Anneroth *et al.* (1987), tendo em vista que a média para o grupo recidiva foi maior que para o grupo controle, representando uma melhor diferenciação destes tumores. Explicações prováveis tal superioridade deste sistema são a análise do tumor como um todo sem a necessidade de eleição de uma área como frente invasivo e a opção por escores que melhor irão representar a maior parte da lesão. Ainda assim, há estudos, que verificaram o contrário, isto é uma superioridade do sistema de Bryne *et al.* (1992) em predizer o pronóstico de CECs bucais (Bryne *et al.* 1995; Bryne, 1998; Sawair *et al.*, 2003).

As sobrevidas em 5 e 10 anos foram fortemente associadas à intensidade de expressão de FAS ($p = 0,0002$). Enquanto maior expressão de ErbB2 em membrana resultou em maior sobrevida, a expressão em citoplasma levou ao decréscimo desses percentuais, apesar de não significativa estatisticamente ($p = 0,14$ e $p = 0,12$, respectivamente). Silva *et al.* (2007) observaram uma associação estatisticamente significativa entre pior sobrevida dos pacientes e maiores expressões de ErbB2 citoplasmático. Uma relação entre a queratinização dos tumores e a expressão dos marcadores também foi avaliada, e observou-se que de forma marginalmente significativa, os tumores mais queratinizados expressaram FAS mais intensamente ($p = 0,08$). Tal informação pode ser embasada no papel de FAS no processo de queratinização (Silva *et al.*, 2007). Queratinização e ErbB2 citoplasmático não foram associados estatisticamente ($p = 0,27$). Já uma associação estatisticamente significativa foi vista entre ErbB2 em membrana e a queratinização dos tumores ($p = 0,0006$). Além disso, viu-se uma relação marginalmente significativa entre FAS e ErbB2 em membrana ($p = 0,07$), o que corrobora com uma relação entre este marcador e FAS, e conseqüentemente à queratinização dos tumores (Silva *et al.*, 2007).

Em resumo, nossos resultados ressaltam a importância da análise das características histopatológicas do tumor, conforme proposto por Anneroth *et al.* (1987), devido o papel preditivo que a soma dos seus escores representou para o desenvolvimento de recidivas e sobrevida dos pacientes, bem como das suas características individuais de queratinização, padrão de invasão e inflamação para o estabelecimento das sobrevidas. O marcador FAS se mostrou extremamente interessante, tendo em vista sua menor expressão em casos com recidiva e pior sobrevida. Da mesma forma, ErbB2 expresso em citoplasma mostrou forte associação com os casos que desenvolveram recidiva. Vimos também que a queratinização, esteve fortemente associada à FAS e ErbB2 expresso em membrana, que por sua vez estiveram associados entre si. Sugerimos então, a utilização do sistema de Anneroth *et al.* (1987), bem como o estudo imunohistoquímico com os marcadores FAS e ErbB2 para melhor compreensão do comportamento dos CECs bucais.

7 CONCLUSÕES

– O sistema de gradação histopatológica proposto por Anneroth *et al.* (1987) mostrou-se superior ao de Bryne *et al.* (1992), e quando a soma dos seus escores foi maior que 15, o desenvolvimento de recidiva foi estatisticamente significativo;

– Menor expressão de FAS e maior expressão de ErbB2 citoplasmático foram significativamente associadas à recidiva tumoral;

– A sobrevida em pacientes com recidiva foi estatisticamente menor. Das variáveis clínicas analisadas, o uso de álcool foi a única correlacionada à menor sobrevida;

– Os parâmetros histopatológicos de Anneroth *et al.* (1987), significativamente correlacionados com a sobrevida, foram queratinização, padrão de invasão e inflamação. Dos parâmetros de Bryne *et al.* (1992), apenas queratinização foi estatisticamente significativa;

– Maior expressão de FAS esteve também significativamente associada à maior sobrevida.

– FAS e ErbB2 expresso em membrana estão intimamente relacionados entre si e à queratinização dos tumores.

REFERÊNCIAS*

1. Agostini M, Silva S, Zecchin KG, Coletta RD, Jorge J, Loda M *et al.* Fatty acid synthase is required for the proliferation of human oral squamous carcinoma cells. *Oral Oncol.* 2004; 40(7): 728-35.
2. Agra IM, Carvalho AL, Ulbrich FS, de Campos OD, Martins EP, Magrin J *et al.* Prognostic factors in salvage surgery for recurrent oral and oropharyngeal cancer. *Head Neck.* 2006; 28(2): 107-13.
3. Aguiar FC, Kowalski LP, Almeida OP. Clinicopathological and immunohistochemical evaluation of oral squamous cell carcinoma in patients with early local recurrence. *Oral Oncol.* 2007; 43(6): 593-601.
4. Altemani AM, Guimarães P, Metze K, Queiroz LS. Quantitative analysis of modes of invasion and lymph node metastases in oral squamous cell carcinoma. *Neoplasma.* 1999; 46(5): 323-8.
5. Anneroth G, Hansen LS. A methodologic study of histologic classification and grading of malignancy in oral squamous cell carcinoma. *Scand J Dent Res.* 1984; 92(5): 448-68.
6. Anneroth G, Batsakis J, Luna M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. *Scand J Dent Res.* 1987; 95(3): 229-49.
7. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sindrinsky D. World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumors. IARC Press: Lyon 2005.

* De acordo com a norma de UNICAMP/FOP, baseadas na norma do *International Committee of Medical Journal Editors* – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos em conformidade com o Medline.

8. Boffetta P, Hashibe M. Alcohol and cancer. *Lancet Oncol.* 2006; 7(2): 149-56.
9. Bosanquet N, Sikora K. The economics of cancer care in the UK. *Lancet Oncol.* 2004; 5(9): 568-74.
10. Boyle J, Patel S, Shah JP. Management of oral and oropharyngeal cancers. *Oral Dis.* 2003; 9(3): 109-11.
11. Braakhuis BJ, Tabor MP, Leemans CR, van der Waal I, Snow GB, Brakenhoff RH. Second primary tumors and field cancerization in oral and oropharyngeal cancer: molecular techniques provide new insights and definitions. *Head Neck.* 2002; 24(2): 198-206.
12. Brandwein-Gensler M, Teixeira MS, Lewis CM, Lee B, Rolnitzky L, Hille JJ *et al.* Oral squamous cell carcinoma: histologic risk assessment, but not margin status, is strongly predictive of local disease-free and overall survival. *Am J Surg Pathol.* 2005; 29(2): 167-78.
13. Brasil, Ministério da Saúde. Instituto Nacional do Câncer – INCA. Estimativa 2008: Incidência do câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2007.
14. Broders AC. Carcinoma of the mouth: types and degree of malignancy. *Ann J Roentgenol Rad Ther Nucl Med.* 1927; 17: 90-3. Apud Anneroth G, Batsakis J, Luna M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. *Scand J Dent Res.* 1987; 95(3): 229-49.
15. Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Kjaerheim A. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. *J Pathol.* 1992; 166(4): 375-81.
16. Bryne M, Jenssen N, Boysen M. Histological grading in the deep invasive front of T1 and T2 glottic squamous cell carcinomas has high prognostic value. *Virchows Arch* 1995; 427: 277–81.

17. Bryne M. Is the invasive front of an oral carcinoma the most important area for prognostication? *Oral Dis.* 1998; 4(2): 70-7.
18. Carvalho AL, Magrin J, Kowalski LP. Sites of recurrence in oral and oropharyngeal cancers according to the treatment approach. *Oral Dis.* 2003; 9(3): 112-8.
19. Chen CH, Tsai TL, Yang YS, Tsai CC. Studies of the serum HER-2/neu and squamous cell carcinoma-related antigen expression in patients with oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2007; 36(2): 83-7.
20. De Araújo VC, Loyola AM, Pinto Júnior DD, Borra RC, De Araújo NS. p53 In biopsies of oral squamous cell carcinoma. A comparative study with a malignancy grading system. *Oral Oncol.* 1997; 33(1): 5-9.
21. Field JK. Oncogenes and tumour-suppressor genes in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1992; 28(1): 67-76.
22. Gastman BR. Apoptosis and its clinical impact. *Head Neck.* 2001; 23(5): 409-25.
23. Hardisson D. Molecular pathogenesis of head and neck squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2003; 260(9): 502-8.
24. Holbro T, Civenni G, Hynes NE. The ErbB receptors and their role in cancer progression. *Exp Cell Res.* 2003; 284(1): 99-110.
25. Holm LE, Lundquist PG, Silfverswärd C, Sobin A. Histological grading of malignancy in squamous cell carcinoma of the oral tongue. *Acta Otolaryngol.* 1982; 94(1-2): 185-92.
26. Hoşal AS, Unal OF, Ayhan A. Possible prognostic value of histopathologic parameters in patients with carcinoma of the oral tongue. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 1998; 255(4): 216-9.

27. Iamaroon A, Pattanaporn K, Pongsiriwet S, Wanachantararak S, Prapayasatok S, Jittidecharaks S *et al.* Analysis of 587 cases of oral squamous cell carcinoma in northern Thailand with a focus on young people. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2004; 33(1): 84-8.
28. Innocenzi D, Alò PL, Balzani A, Sebastiani V, Silipo V, La Torre G *et al.* Fatty acid synthase expression in melanoma. *J Cutan Pathol.* 2003; 30(1): 23-8.
29. Jakobsson PA, Eneroth CM, Killander D, Moberger G, Mårtensson B. Histologic classification and grading of malignancy in carcinoma of the larynx. *Acta Radiol Ther Phys Biol.* 1973; 12(1): 1-8.
30. Johnson N. Tobacco use and oral cancer: a global perspective. *J Dent Educ.* 2001; 65(4): 328-39.
31. Kademani D, Bell RB, Bagheri S, Holmgren E, Dierks E, Potter B *et al.* Prognostic factors in intraoral squamous cell carcinoma: the influence of histologic grade. *J Oral Maxillofac Surg.* 2005 Nov; 63(11): 1599-605.
32. Kazkayasi M, Hücümenoğlu S, Siriner GI, Hücümenoğlu M. Over-expression of p53 and c-erbB-2 oncoproteins in laryngeal carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol.* 2001; 258(7): 329-35.
33. Keski-Säntti H, Atula T, Tikka J, Hollmén J, Mäkitie AA, Leivo I. Predictive value of histopathologic parameters in early squamous cell carcinoma of oral tongue. *Oral Oncol.* 2007; 43(10): 1007-13.
34. Khademi B, Shirazi FM, Vasei M, Doroudchi M, Gandomi B, Modjtahedi H *et al.* The expression of p53, c-erbB-1 and c-erbB-2 molecules and their correlation with prognostic markers in patients with head and neck tumors. *Cancer Lett.* 2002; 184(2): 223-30.
35. Khan AJ, King BL, Smith BD, Smith GL, DiGiovanna MP, Carter D *et al.* Characterization of the HER-2/neu oncogene by immunohistochemical and

- fluorescence in situ hybridization analysis in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 2002; 8(2): 540-8.
36. Koo BS, Lim YC, Lee JS, Choi EC. Recurrence and salvage treatment of squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Oral Oncol.* 2006; 42(8): 789-94.
37. Kowalski, LP. Results of salvage treatment of the neck in patients with oral cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2002; 128: 58-62.
38. Krontiras H, Roye GD, Beenken SE, Myers RB, Mayo MS, Peters GE *et al.* Fatty acid synthase expression is increased in neoplastic lesions of the oral tongue. *Head Neck.* 1999; 21(4):325-9.
39. Kuhajda FP. Fatty-acid synthase and human cancer: new perspectives on its role in tumor biology. *Nutrition.* 2000; 16(3): 202-8.
40. Kumar-Sinha C, Ignatoski KW, Lippman ME, Ethier SP, Chinnaiyan AM. Transcriptome analysis of HER2 reveals a molecular connection to fatty acid synthesis. *Cancer Res.* 2003; 63(1): 132-9.
41. Kurokawa H, Zhang M, Matsumoto S, Yamashita Y, Tanaka T, Tomoyose T *et al.* The relationship of the histologic grade at the deep invasive front and the expression of Ki-67 antigen and p53 protein in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2005; 34(10): 602-7.
42. Kusakabe T, Nashimoto A, Honma K, Suzuki T. Fatty acid synthase is highly expressed in carcinoma, adenoma and in regenerative epithelium and intestinal metaplasia of the stomach. *Histopathology.* 2002; 40(1): 71-9.
43. La Vecchia C, Tavani A, Franceschi S, Levi F, Corrao G, Negri E. Epidemiology and prevention of oral cancer. *Oral Oncol.* 1997; 33(5): 302-12.
44. Lever WF. *Histopathology of the skin.* JB. Lippincott. Philadelphia and Toronto, 1967. Apud Lund C, Sogaard H, Elbrond O, Jorgensen K,

- Andersen AP. Epidermoid carcinoma of the tongue. Histologic grading in the clinical evaluation. *Acta Radiol Ther Phys Biol.* 1975; 14(6): 513-21.
45. Liao CT, Wang HM, Chang JT, Ng SH, Hsueh C, Lee LY *et al.* Analysis of risk factors for distant metastases in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer.* 2007; 110(7): 1501-8.
46. Liao CT, Chang JT, Wang HM, Ng SH, Hsueh C, Lee LY, Lin CH, Chen IH, Huang SF, Cheng AJ, Yen TC. Analysis of Risk Factors of Predictive Local Tumor Control in Oral Cavity Cancer. *Ann Surg Oncol.* 2007; 29.
47. Lopes MA, Nikitakis NG, Reynolds MA, Ord RA, Sauk J Jr. Biomarkers predictive of lymph node metastases in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg.* 2002; 60(2): 142-7.
48. Lund C, Sogaard H, Elbrond O, Jorgensen K, Andersen AP. Epidermoid carcinoma of the tongue. Histologic grading in the clinical evaluation. *Acta Radiol Ther Phys Biol.* 1975; 14(6): 513-21.
49. Mansour OI, Snyderman CH, D'Amico F. Association between tobacco use and metastatic neck disease. *Laryngoscope.* 2003; 113(1): 161-6.
50. Massano J, Regateiro FS, Januário G, Ferreira A. Oral squamous cell carcinoma: review of prognostic and predictive factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2006; 102(1): 67-76.
51. Menendez JA, Lupu R. Fatty acid synthase and the lipogenic phenotype in cancer pathogenesis. *Nat Rev Cancer.* 2007; 7(10): 763-77.
52. Mithani SK, Mydlarz WK, Grumbine FL, Smith IM, Califano JA. Molecular genetics of premalignant oral lesions. *Oral Dis.* 2007; 13(2): 126-33.
53. Mork J, Lie AK, Glattre E, Hallmans G, Jellum E, Koskela P *et al.* Human papillomavirus infection as a risk factor for squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med.* 2001; 344(15): 1125-31.

54. Nair S, Pillai MR. Human papillomavirus and disease mechanisms: relevance to oral and cervical cancers. *Oral Dis.* 2005; 11(6): 350-9.
55. Nemoto T, Terashima S, Kogure M, Hoshino Y, Kusakabe T, Suzuki T, Gotoh M. Overexpression of fatty acid synthase in oesophageal squamous cell dysplasia and carcinoma. *Pathobiology.* 2001; 69(6): 297-303.
56. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. *Patologia Oral e Maxilofacial.* 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004.
57. Niimi K, Yoshizawa M, Nakajima T, Saku T. Vascular invasion in squamous cell carcinomas of human oral mucosa. *Oral Oncol.* 2001; 37(4): 357-64.
58. Odell EW, Jani P, Sherriff M, Ahluwalia SM, Hibbert J, Levison DA *et al.* The prognostic value of individual histologic grading parameters in small lingual squamous cell carcinomas. The importance of the pattern of invasion. *Cancer.* 1994; 74(3): 789-94.
59. Okada Y, Mataga I, Katagiri M, Ishii K. An analysis of cervical lymph nodes metastasis in oral squamous cell carcinoma. Relationship between grade of histopathological malignancy and lymph nodes metastasis. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2003; 32(3): 284-8.
60. Parise Junior O, Carvalho LV, Miguel RE, Kowalski LP. Prognostic impact of p53, c-erbB-2 and epidermal growth factor receptor on head and neck carcinoma. *Sao Paulo Med J.* 2004; 122(6): 264-8.
61. Pereira MC, Oliveira DT, Landman G, Kowalski LP. Histologic Subtypes of Oral Squamous Cell Carcinoma: Prognostic Relevance. *J Can Dent Assoc.* 2007; 73(4): 339-44.
62. Piyathilake CJ, Frost AR, Manne U, Bell WC, Weiss H, Heimbürger DC *et al.* The expression of fatty acid synthase (FASE) is an early event in the development and progression of squamous cell carcinoma of the lung. *Hum Pathol.* 2000; 31(9): 1068-73.

63. Pizer ES, Lax SF, Kuhajda FP, Pasternack GR, Kurman RJ. Fatty acid synthase expression in endometrial carcinoma: correlation with cell proliferation and hormone receptors. *Cancer*. 1998; 83(3): 528-37.
64. Rossi S, Graner E, Febbo P, Weinstein L, Bhattacharya N, Onody T *et al*. Fatty acid synthase expression defines distinct molecular signatures in prostate cancer. *Mol Cancer Res*. 2003; 1(10): 707-15.
65. Sasaki T, Moles DR, Imai Y, Speight PM. Clinico-pathological features of squamous cell carcinoma of the oral cavity in patients <40 years of age. *J Oral Pathol Med*. 2005; 34(3): 129-33.
66. Sawair FA, Irwin CR, Gordon DJ, Leonard AG, Stephenson M, Napier SS. Invasive front grading: reliability and usefulness in the management of oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2003; 32(1): 1-9.
67. Scully C, Felix DH. Oral medicine--update for the dental practitioner oral cancer. *Br Dent J*. 2006; 200(1): 13-7.
68. Scully C, Bagan JV. Recent advances in Oral Oncology. *Oral Oncol*. 2007; 43(2): 107-15.
69. Shin DM, Lee JS, Lippman SM, Lee JJ, Tu ZN, Choi G *et al*. p53 expressions: predicting recurrence and second primary tumors in head and neck squamous cell carcinoma. *J Natl Cancer Inst*. 1996; 88(8): 519-29.
70. Silva SD, Agostini M, Nishimoto IN, Coletta RD, Alves FA, Lopes MA *et al*. Expression of fatty acid synthase, ErbB2 and Ki-67 in head and neck squamous cell carcinoma. A clinicopathological study. *Oral Oncol*. 2004; 40(7): 688-96.
71. Silva SD, Perez DE, Alves FA, Nishimoto IN, Pinto CA, Kowalski LP *et al*. ErbB2 and fatty acid synthase (FAS) expression in 102 squamous cell carcinomas of the tongue: Correlation with clinical outcomes. *Oral Oncol*. 2007.
72. Siriwardena BS, Tilakaratne A, Amaratunga EA, Udagama MN, Ogawa I, Kudo Y *et al*. Analysis of histopathological and immunohistochemical

- differences of oral squamous cell carcinoma in young and old patients in Sri Lanka. *J Oral Pathol Med.* 2007; 36(6): 357-62.
73. Spiro RH, Guillaumondegui O Jr, Paulino AF, Huvos AG. Pattern of invasion and margin assessment in patients with oral tongue cancer. *Head Neck.* 1999; 21(5): 408-13.
74. Stolk-Liefferink SA, Dumans AG, van der Meij EH, Knegt PP, van der Wal KG. Oral squamous cell carcinoma in children; review of an unusual entity. *Int J Pediatr Otorhinolaryngol.* 2007; 26.
75. Syrjänen S. Human papillomaviruses in head and neck carcinomas. *N Engl J Med.* 2007; 356(19): 1993-5.
76. Takahiro T, Shinichi K, Toshimitsu S. Expression of fatty acid synthase as a prognostic indicator in soft tissue sarcomas. *Clin Cancer Res.* 2003; 9(6): 2204-12.
77. Tsantoulis PK, Kastrinakis NG, Tourvas AD, Laskaris G, Gorgoulis VG. Advances in the biology of oral cancer. *Oral Oncol.* 2007; 43(6): 523-34.
78. Vallecillo Capilla M, Romero Olid MN, Olmedo Gaya MV, Reyes Botella C, Bustos Ruiz V. Factors related to survival from oral cancer in an Andalusian population sample (Spain). *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2007; 12(7): E518-23.
79. Visca P, Sebastiani V, Pizer ES, Botti C, De Carli P, Filippi S *et al.* Immunohistochemical expression and prognostic significance of FAS and GLUT1 in bladder carcinoma. *Anticancer Res.* 2003; 23(1A): 335-9.
80. Wang Y, Kuhajda FP, Li JN, Pizer ES, Han WF, Sokoll LJ *et al.* Fatty acid synthase (FAS) expression in human breast cancer cell culture supernatants and in breast cancer patients. *Cancer Lett.* 2001; 167(1): 99-104.
81. Warburton G, Nikitakis NG, Roberson P, Marinos NJ, Wu T, Sauk JJ Jr, Ord RA, Wahl SM. Histopathological and lymphangiogenic parameters in relation to lymph node metastasis in early stage oral squamous cell carcinoma. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007; 65(3): 475-84.

82. WHO. Cancer. Geneva: World Health Organization; 2006.
83. Willén R, Nathanson A, Moberger G, Anneroth G. Squamous cell carcinoma of the gingiva. Histological classification and grading of malignancy. *Acta Otolaryngol.* 1975; 79(1-2): 146-54.
84. Wünsch-Filho V. The epidemiology of oral and pharynx cancer in Brazil. *Oral Oncol.* 2002; 38(8): 737-46.
85. Xia W, Lau YK, Zhang HZ, Liu AR, Li L, Kiyokawa N *et al.* Strong correlation between c-erbB-2 overexpression and overall survival of patients with oral squamous cell carcinoma. *Clin Cancer Res.* 1997; 3(1): 3-9.
86. Yamamoto E, Miyakawa A, Kohama G. Mode of invasion and lymph node metastasis in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head Neck Surg.* 1984; 6(5): 938-47.
87. Zhang Y, Guo C, Yu G. A pilot study of fatty acid metabolism in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2005; 34(1): 78-81.



**COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS**



CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "Correlação das características histopatológicas e expressão de FAS e ErbB2 em carcinomas espinocelulares bucais de pacientes com recidiva local precoce", protocolo nº 165/2006, dos pesquisadores **LUCIELMA SALMITO SOARES PINTO** e **MARCIO AJUDARTE LOPES**, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 08/11/2006.

The Research Ethics Committee of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that project "Correlation of histopathological features and FAS and ErbB2 expression in oral squamous cell carcinomas of patients with early local recurrence", register number 165/2006, of **LUCIELMA SALMITO SOARES PINTO** and **MARCIO AJUDARTE LOPES**, comply with the recommendations of the National Health Council – Ministry of Health of Brazil for researching in human subjects and was approved by this committee at 08/11/2006.


Prof. Cecilia Gatti Guirado
Secretária
CEP/FOP/UNICAMP


Prof. Jacks Jorge Júnior
Coordenador
CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.