

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
Faculdade de Odontologia  
Programa de Pós-graduação em Odontologia



Dissertação

**Lesões Potencialmente Malignas e Carcinoma Espinocelular  
oral: estudo de suas características individuais, clínicas e sua  
relação com a angiogênese**

Guilherme de Marco Antonello

Pelotas, 2014

**Guilherme de Marco Antonello**

**Lesões Potencialmente Malignas e Carcinoma Espinocelular oral: estudo de suas características individuais, clínicas e sua relação com a angiogênese.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre em Diagnóstico Bucal.

Orientador: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sandra Beatriz Chaves Tarquinio

Co-orientadores: Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Carolina Uchoa Vasconcelos

Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Ana Paula Neutzling Gomes

**Pelotas, 2014**

Universidade Federal de Pelotas / Sistema de Bibliotecas  
Catalogação na Publicação

A634I Antonello, Guilherme de Marco

Lesões potencialmente malignas e carcinoma espinocelular oral : estudo de suas características individuais, clínicas e sua relação com a angiogênese / Guilherme de Marco Antonello ; Sandra Beatriz Chaves Tarquinio, orientadora ; Ana Paula Neutzling Gomes, Ana Carolina Uchoa Vasconcelos, coorientadoras. — Pelotas, 2014.

91 f. : il.

Dissertação (Mestrado) — Programa de Pós-Graduação em Diagnóstico Bucal, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas, 2014.

1. Tabaco. 2. Álcool. 3. Câncer bucal. 4. Carcinoma de células escamosas. 5. Angiogênese. I. Tarquinio, Sandra Beatriz Chaves, orient. II. Gomes, Ana Paula Neutzling, coorient. III. Vasconcelos, Ana Carolina Uchoa, coorient. IV. Título.

Black : D6

Guilherme de Marco Antonello

**Lesões Potencialmente Malignas e Carcinoma Espinocelular oral: estudo de suas características individuais, clínicas e sua relação com a angiogênese**

Dissertação aprovada, como requisito parcial, para obtenção do grau de Mestre em Diagnóstico Bucal, Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas.

Data da Defesa: 30 de Maio de 2014

Banca examinadora:

.....  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Sandra Beatriz Chaves Tarquinio (Orientadora)  
Doutora em Odontologia (Área de Patologia Oral) pela Universidade de São Paulo

.....  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Adriana Etges  
Doutorado em Odontologia (Patologia Bucal) pela Universidade de São Paulo  
Professora Associada da Universidade Federal de Pelotas, Brasil

.....  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Fernanda Nedel  
Doutorado em Biotecnologia pela Universidade Federal de Pelotas,  
Professora Assistente da Universidade Católica de Pelotas, Brasil

.....  
Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Marina Sousa Azevedo (suplente)  
Doutorado em Odontologia pela Universidade Federal de Pelotas, Brasil  
Professora Adjunta da Universidade Federal de Pelotas, Brasil

Dedico este trabalho a minha mãe, **Marion de Marco**, a qual sempre acreditou em mim e fora me apoiar até hoje em tudo que foi necessário me serviu de exemplo de força de vontade e de dedicação, o exemplo é a melhor maneira de se educar, obrigado por tudo.

## **Agradecimentos**

Inicialmente agradeço à minha orientadora Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Sandra Beatriz Chaves Tarquinio pelos anos de ensinamentos, dedicação, amizade, carinho e paciência.

Aos meus coorientadores Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Ana Carolina Uchoa Vasconcelos e a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Ana Paula Neutzling Gomes pela ajuda ímpar na realização desse trabalho, bem como a Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup> Adriana Etges, pelos ensinamentos ao longo da minha formação.

À banca examinadora por aceitar prontamente o convite.

À minha colega Karine Duarte da Silva a qual participou ativamente no desenvolvimento deste trabalho, sendo fundamental para que ele se concretizasse.

A toda a equipe do Centro de Diagnóstico de Doenças da Boca (CDDB-UFPel), funcionários e bolsistas, em especial a Ivana e a Silvana que sem as quais nada disso seria possível.

Aos meus colegas, André Schinestsck, Felipe da Luz, Alessandro Menna e Aline Almeida, não apenas por terem dividido esse momento comigo, mas, principalmente pela amizade estabelecida que com certeza continuará. Em especial, à colega Silene Barbieri, que fora pelos mesmos motivos citados aos outros colegas, julgo importante agradecer ao fundamental apoio no desenvolver dessa pesquisa.

Gostaria, também, de agradecer a uma pessoa que mesmo não tendo participado diretamente deste trabalho me ajuda sempre, por servir de exemplo de profissional e ser humano Prof. Dr<sup>o</sup>. Marcos Torriani.

Ao amigo Marcos Britto Corrêa pelo constante apoio científico e pela amizade que vem desde 1988 na época em que convivíamos no “Bosque Encantado”.

Ao meu pai e minha madrasta, Paulo Antonello e Márcia Tavares, meus irmãos Giovanni e Paula Antonello, minha namorada Natália Jouglard e meus amigos Ricardo do Couto e Rafael Onofre agradeço o companheirismo e apoio incondicional.

## Resumo

ANTONELLO, Guilherme de Marco. **Lesões Potencialmente Malignas e Carcinoma Espinocelular oral: estudo de suas características individuais, clínicas e sua relação com angiogênese.** 91f. Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

O objetivo desta pesquisa foi realizar um estudo analítico-descritivo de casos de lesões potencialmente malignas (LPM), de baixo e alto risco de malignização e do carcinoma espinocelular (CEC), avaliando suas características individuais, clínicas e histopatológicas. Além disso, o presente estudo visa também correlacionar o potencial angiogênico das LPM e do CEC, através da identificação da microdensidade vascular (MVD), bem como, para os casos de CEC correlacionar a presença de metástase com tais variáveis. Uma amostra de 49 pacientes, sendo 15 (30.6%) LPM de baixo risco de malignização, 15 (30.6%) LPM de alto risco e 19 (38.8%) casos de CEC, foi investigada por meio de um questionário em forma de entrevista e por uma análise imunoistoquímica com o anticorpo anti-CD34 – para marcar os vasos sanguíneos neoformados - visando avaliar a MVD de cada grupo. Observou-se uma maior prevalência de LPM e CEC em homens e indivíduos adultos mais velhos. Em relação aos hábitos de tabaco e álcool, nossos achados corroboraram os da literatura, confirmando o papel desses dois principais fatores de risco na carcinogênese oral. A análise da MVD mostrou associação estatisticamente significativa entre os grupos de LPM de baixo risco com MVD média de 16.5, LPM de alto risco, com 21.9 e de CECs com 29.3. Considerando-se as limitações deste estudo, foi possível concluir que indivíduos do sexo masculino, adultos com idade mais avançada, fumantes e consumidores de bebidas alcoólicas estiveram associados há uma maior propensão de ocorrências de LPM e CEC. Além disso, o potencial angiogênico, representado pela MVD, mostra significativo aumento com a progressão das LPMs em malignas, sendo um marcador importante na estimativa do prognóstico dessas lesões.

**Palavras-chave:** tabaco, álcool, câncer bucal, Carcinoma de células escamosas, angiogênese.

## Abstract

ANTONELLO, Guilherme de Marco. **Potentially malignant lesions (PMLs) and Oral Squamous Cell Carcinoma: study of their individual, clinical and histological characteristics and their relation with the angiogenesis.**91f  
Dissertação de Mestrado. Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, 2014.

It was aimed to perform an analytic and descriptive study of cases from potentially malignant lesions (PML), presenting low or high risk of malignization, as well as cases of oral squamous cell carcinomas (OSCC), evaluating their individual, clinical and histological characteristics. Moreover, the angiogenic potential of PMLs and OSCCs were correlated with those variables and also with the presence of metastasis, through the microvessel density (MVD) analysis. A sample of 49 patients, being 15 (30.6%) cases of low risk PML, 15 (30.6%) of high risk PML and 19 patients (38.8%) with OSCC was investigate, using a questionnaire and also performing the immunohistochemical technique for the antigen anti-CD34 (blood vessel marker) in order to evaluate the MVD for each group. The results showed a higher prevalence of men and older adults with PMLs and OSCCs. Regarding to the tobacco and alcohol consumption our findings corroborated the literature, confirming the role of these main risk factors in the oral carcinogenesis. The MVD analysis showed a statistically significant association among the low risk PML median (16.5), high risk PML median (21.9) and OSCC group median (29.3). Considering the limitations of this study, it was possible to conclude that male, older adults, smokers and alcohol consumers had more likely PMLs and OSCCs. Moreover, the angiogenic potential expressed as MVD indexes showed significant increasing in PMLs progressing to OSCC lesions, being an important marker of prognosis for these conditions.

**Key words:** tobacco, alcohol, oral cancer, oral squamous cell carcinoma; angiogenesis.

## Sumário

1. Introdução e Revisão de Literatura.....	8
2. Projeto de Pesquisa.....	12
3. Relatório do Trabalho de Campo.....	41
4. Artigo.....	43
5. Considerações Finais.....	71
Referências.....	72
Anexos.....	84

## **1 Introdução e Revisão de Literatura**

O câncer de cabeça e pescoço representa o 6º tipo mais prevalente no mundo em homens (PARKIN et al., 2005), e as neoplasias malignas bucais perfazem cerca de 10% dos tumores malignos que ocorrem no corpo humano (INCA, 2013). No Brasil, de acordo com dados do Instituto Nacional de Câncer-INCA (2013), o câncer de boca constitui a quinta neoplasia mais frequente em homens.

Cerca de 95% das neoplasias orais são carcinomas espinocelulares (CECs) ou carcinomas epidermóides/carcinomas de células escamosas, predominando no gênero masculino e na faixa etária dos 50 aos 70 anos (NEVILLE et al., 2009; ZINI, CZEMINSKI, SGAN-COHEN, 2010). Apesar dos avanços na terapêutica a sobrevida de 5 anos para os pacientes com CEC fica em torno de 40% (SCULLY, BAGAN, 2009), não ultrapassando os 50% dos casos diagnosticados anualmente (WARNAKULASURIYA et al., 2008). Tal panorama decorre do atraso no diagnóstico da doença, o que pode ser notado nas populações de baixo nível socioeconômico, menor grau de escolaridade e que, geralmente, consomem álcool e tabaco em excesso (PUIGPNÓS et al., 2009; WUNSCH-FILHO, 2002; WÜNSCH FILHO et al., 2008)

CEC é um tumor epitelial agressivo, e apesar dos avanços terapêuticos utilizando os mais recentes protocolos cirúrgicos, radioterápicos e/ou quimioterápicos, a sobrevida dos pacientes em longo prazo permanece menor que 50%.

Mesmo com a alta prevalência desta doença em nosso país, estudos de base populacional relativos ao CEC e seus fatores de risco são surpreendentemente escassos no Brasil (GERVASIO et al., 2001; WUNSCH-FILHO, 2002). Alguns trabalhos demonstram prognóstico ruim e taxas de sobrevida reduzidas nas populações de baixos níveis socioeconômicos e que geralmente consomem álcool e tabaco em excesso, pois estes pacientes tendem a demorar mais para procurar cuidados profissionais (MACFARLANE et al., 1996; WUNSCH-FILHO, 2002). Desta forma, em um estudo comparando

pacientes com CEC entre instituições de um país desenvolvido e de um país em desenvolvimento, foi encontrada menor sobrevida para os pacientes desta última (CARVALHO et al., 2003).

A inspeção cuidadosa da cavidade oral pode revelar lesões pré-malignas (LPM) do câncer da cavidade oral ou diagnosticá-lo precocemente, melhorando o prognóstico (MACCARTHY, 2011; OLIVEIRA et al., 2006). Estudo de Sankaranarayanan et al. (2005), concluiu que o *screening* de lesões orais pode reduzir a mortalidade em pacientes considerados de alto risco, tendo o potencial de prevenção de pelo menos 37.000 mortes por câncer bucal em todo o mundo, diagnosticando lesões precocemente identificando as que podem sofrer mutações e se tornarem malignas.

As lesões potencialmente malignas são formadas por um tecido morfológicamente alterado no qual há maior probabilidade de surgimento do câncer do que no tecido equivalente aparentemente normal, e que pode assumir o caráter de tumor maligno a qualquer tempo, mas que, por outro lado, pode permanecer estável por um considerado período, particularmente se a irritação sobre a lesão é evitada (TOMMASI, 1998; MELO, 2006). Já a condição cancerizável é definida como um estado generalizado associado a um risco significativamente aumentado de desenvolver um câncer (NEVILLE et al., 2009).

As lesões da mucosa bucal que já estão bem estabelecidas na literatura como potencialmente malignas são: leucoplasia, eritroplasia, líquen plano, queilite actínica e nevo pigmentar (MARCUCCI, 2005; WARNAKULASURIYA et al., 2007).

Os termos pré-câncer, cancerizável, lesão precursora e neoplasia intraepitelial são inadequados uma vez que transmitem a ideia de que tais lesões certamente desenvolveriam um câncer. No ano de 2005, em Londres, o Centro Colaborador da Organização Mundial de Saúde (OMS) para Câncer Bucal e Lesões Potencialmente Malignas realizou um *workshop* com a presença de *experts* sobre lesões e condições da mucosa bucal, até então convencionalmente chamada de cancerizáveis. Desde então, vários artigos foram publicados sugerindo que os termos acima citados deveriam ser substituídos por Desordens Potencialmente Malignas (DPM), pois transmite a ideia de que nem todas as lesões e condições assim classificadas irão se

transformar em câncer, mas sim de que há um maior potencial de transformação maligna (WARNAKULASURIYA et al., 2007).

O conhecimento dos fatores de risco para o desenvolvimento do câncer de boca constitui a base para uma prevenção efetiva da doença. Do ponto de vista epidemiológico, o termo é usado para definir a probabilidade de que indivíduos sem certa doença, porém expostos a determinados fatores, adquiram esta moléstia (INCA, 2013).

O tabagismo é isoladamente a principal causa de câncer no mundo (WÜSCH FILHO et al., 2010). Segundo Takács et al. (2011), o tabaco provoca reações oxidativas nos tecidos, as quais contribuem para a produção de radicais livres nas células, danificando o DNA. No Brasil, as regiões Sul e a Sudeste representam as mais elevadas taxas de prevalência de consumo de fumo, sendo também aquelas com as maiores incidências de CECs com intensa associação com o tabaco, como aqueles localizados na boca, esôfago e pulmão (WÜSCH FILHO et al., 2010).

A ingestão de bebidas alcoólicas também tem sido associada com um maior risco de desenvolvimento do câncer de boca (BIAZEVIC et al., 2011; SANTOS et al., 2010). O álcool (etanol) é oxidado a acetaldeído, um suspeito carcinógeno (BOCCIA et al., 2009). Sabe-se que há um efeito sinérgico entre álcool e o tabaco, aumentando os riscos de ocorrência do CEC oral (VINEIS et al., 2004; INCA, 2013).

O CEC oral inclui o câncer de lábio, o qual representa a maioria dos CECs orais e apresenta forte associação com a exposição solar e o câncer intraoral, que afeta majoritariamente a língua, principalmente sua borda lateral (SCULLY, BAGAN, 2009). Outros sítios intraorais predominantemente acometidos são assoalho bucal e gengiva (ZINI, CZEMINSKI, SGAN-COHEN et al., 2010).

Todas as células precisam de suprimento adequado e da retirada de resíduos tóxicos para sobreviver. Isso é feito por meio de capilares sanguíneos que penetram os tecidos e suprem as células mais próximas. Para que as células não adjacentes ao capilar possam receber suprimento por difusão radial, elas só podem estar até 150 a 200  $\mu\text{m}$  de distância do capilar.

As células tumorais não são exceção. Um fenômeno essencial para o crescimento de um tumor e das metástases dele originadas é a angiogênese,

que é a proliferação de vasos e capilares. Esses vasos podem penetrar o tumor e suprir todas as suas células, ou podem ser periféricos, os quais estão relacionados com a frequente necrose da parte central de tumores de rápido crescimento. Podem também ser divididos de acordo com sua ultra-estrutura em: derivados de capilares, com paredes delgadas; sinusóides, destituídos de endotélio e recobertos por células tumorais e os vasos maduros, de aparência normal. O desprendimento e a proliferação das células dependem de ocorrer angiogênese no tumor primário. Sem essa condição, o tumor não pode se desenvolver e muito menos proliferar, logo a carcinogênese encontra-se diretamente relacionada com a neovascularização, a qual decorre do desequilíbrio entre os fatores angiogênicos e anti-angiogênicos, secretados pelas células neoplásicas, onde a inibição da angiogênese limita o crescimento da neoplasia.

Entretanto, durante o processo de estabelecimento e propagação do câncer, a angiogênese permite que o tumor tenha sua própria rede vascular. Portanto, ganhar acesso ao sistema vascular do hospedeiro e regenerar o suprimento de sangue tumoral são passos limitantes na progressão tumoral. Por isso, esclarecer a influência da angiogênese e relacionar com os fatores de risco no processo de carcinogênese é fundamental para compreender a progressão de lesões potencialmente malignas em CEC e estabelecer a angiogênese perilesional como um fator prognóstico importante dessa doença.

## **2 Projeto de pesquisa**

### **2.1 Antecedentes e justificativa**

#### **2.1.1 LESÕES POTENCIALMENTE MALIGNAS E CÂNCER BUCAL - ASPECTOS GERAIS, NOMENCLATURA E EPIDEMIOLOGIA**

As neoplasias malignas bucais representam cerca de 10% dos tumores malignos que ocorrem no corpo humano, sendo o câncer oral o 6º tipo de câncer mais prevalente no mundo (CARVALHO, 2003; PARKIN et al., 2005). Pelo menos 95% das neoplasias malignas orais consistem em carcinomas espinocelulares (CEC) ou epidermóides, e os tumores adicionais compreendem os glandulares, os melanomas, os sarcomas e os odontogênicos. Excluindo-se o câncer de pele, o CEC pode ser considerado o mais comum da região de cabeça e pescoço (38% dos casos), predominando no gênero masculino e na faixa etária acima dos 45 anos (75% dos casos) (GERVÁSIO et al., 2001; COSTA ADE et al., 2002; PARKIN et al., 2005; WUNSCH-FILHO, 2002).

O CEC é caracterizado como um tumor epitelial agressivo, pois apesar dos avanços terapêuticos utilizando os mais recentes protocolos cirúrgicos, radioterápicos e/ou quimioterápicos, a sobrevida dos pacientes em longo prazo permaneceu menor que 50% nos últimos 50 anos. Entre as principais causas para este prognóstico ruim está o atraso no diagnóstico da doença, sendo que, geralmente, o tumor é detectado quando já alcançou um estágio avançado (FORASTIERE et al., 2001).

Mesmo com a alta prevalência desta doença em nosso país, estudos de base populacional relativos ao CEC e seus fatores de risco são surpreendentemente escassos no Brasil (GERVASIO et al., 2001; WUNSCH-FILHO, 2002). Alguns trabalhos demonstram prognóstico ruim e taxas de sobrevida reduzidas nas populações de baixos níveis socioeconômicos e que geralmente consomem álcool e tabaco em excesso, pois estes pacientes tendem a demorar mais para procurar cuidados profissionais (MACFARLANE et al., 1996; WUNSCH-FILHO, 2002). Desta forma, em um estudo comparando

pacientes com CEC entre instituições de um país desenvolvido e de um país em desenvolvimento, foi encontrada menor sobrevida para os pacientes desta última (CARVALHO et al., 2003).

Dependendo da extensão da lesão primária e da localização anatômica específica, o CEC demonstra grande predisposição para a disseminação de metástases em linfonodos cervicais. Na prática clínica, o planejamento terapêutico e o prognóstico dos pacientes com CEC estão orientados, principalmente, pelo estadiamento clínico da lesão, seguindo a classificação TNM (Tumor-Nódulo-Metástase), onde o T representa o tamanho do tumor primário (maior diâmetro da lesão), o N representa a disseminação linfática regional pelo tumor e o M significa presença de doença metastática à distância (SOBIN & WITTEKIND, 2002). No entanto, o sistema TNM possui informações insuficientes sobre as características biológicas tumorais, sendo estas informações de fundamental importância para a obtenção de novos fatores prognósticos que possam providenciar informações mais acuradas sobre a agressividade deste tipo de tumor (HIRATSUKA et al., 1997).

Lesão potencialmente maligna é um tecido morfológicamente alterado no qual há maior probabilidade de surgimento do câncer do que no tecido equivalente aparentemente normal, e que pode assumir o caráter de tumor maligno a qualquer tempo, mas que, por outro lado, pode permanecer estável por um considerado período, particularmente se a irritação sobre a lesão é evitada (TOMMASI, 1998; MELO, 2006). Já a condição cancerizável é definida como um estado generalizado associado a um risco significativamente aumentado de desenvolver um câncer (NEVILLE et al., 2004).

As lesões da mucosa bucal que já estão bem estabelecidas na literatura como potencialmente malignas são: leucoplasia, eritroplasia, líquen plano, queilite actínica e nevo pigmentar (MARCUCCI, 2005; WARNAKULASURIYA et al., 2007).

Os termos pré-câncer, cancerizável, lesão precursora e neoplasia intraepitelial são inadequados uma vez que transmitem a ideia de que tais lesões certamente desenvolveriam um câncer. No ano de 2005, na cidade de Londres, o Centro Colaborador da Organização Mundial de Saúde (OMS) para Câncer Bucal e Lesões Potencialmente Malignas realizou um workshop com a presença de *experts* sobre lesões e condições da mucosa bucal, até então

convencionalmente chamada de cancerizáveis. Desde então vários artigos foram publicados sugerindo que os termos acima citados deveriam ser substituídos por Desordens Potencialmente Malignas (DPM), pois transmite a idéia de que nem todas as lesões e condições assim classificadas irão se transformar em câncer, mas sim de que há um maior potencial de transformação maligna (WARNAKULASURIYA et al., 2007).

As lesões potencialmente malignas podem ser mais bem compreendidas quando tomamos conhecimento da produção do tumor maligno, o qual se desenvolve em três estágios. No primeiro, chamado de iniciação (iniciação da alteração celular maligna), ocorreriam modificações moleculares provocadas por um ou mais agentes cancerígenos primários que tornariam a célula “sensibilizada ou preparada” para, sob a ação de um ou mais fatores agora denominados co-cancerígenos, passar ao segundo estágio que é a promoção (promoção da proliferação celular maligna) e, a partir daí, poderá, de forma irreversível, ocorrer à disseminação para outros órgãos, o que caracteriza a terceira fase. É fundamental recordar que entre os três estágios poderá decorrer um longo espaço de tempo, na dependência da sensibilidade individual e da persistência dos agentes iniciadores e promotores que permaneceriam agindo ou seriam superpostos à célula iniciada, portanto é imprescindível a eliminação de toda e qualquer agressão observável no controle das lesões potencialmente malignas (TOMMASI, 1998).

Ainda não se sabe se uma lesão cancerizável provoca na mucosa bucal algumas alterações moleculares semelhantes àquelas que ocorrem no estágio de iniciação do tumor maligno. Contudo, é certo que produzem modificações importantes que, sob ação de um agente promotor ou persistência do iniciador, podem levar ao desenvolvimento do câncer (TOMMASI, 1998).

Até recentemente, a grande maioria dos autores acreditava que uma lesão só poderia ser classificada como cancerizável se apresentasse histologicamente, displasia (ou atipia) epitelial (TOMMASI, 1998). No entanto, estudos já comprovam que lesões não-displásicas também podem se transformar em câncer (WARNAKULASURIYA et al., 2008).

### **2.1.2 Etiologia do CARCINOMA ESPINOCELULAR (CEC) E Lesões Potencialmente Malignas (LPM)**

Apesar de ainda não haver uma clara compreensão sobre a etiologia do câncer, vários fatores determinantes têm sido detectados e investigados. O conhecimento dos fatores de risco constitui a base para uma prevenção efetiva da doença.

O termo risco refere-se à probabilidade de um evento indesejado ocorrer. Do ponto de vista epidemiológico, o termo é usado para definir a probabilidade de que indivíduos sem uma certa doença, porém expostos a determinados fatores, adquiram esta moléstia (INCA, 2008). Os fatores de risco para o carcinoma espinocelular e as lesões potencialmente malignas que apresentam evidências científicas consolidadas são: tabagismo, etilismo, radiação solar, papiloma vírus humano (HPV) em alguns casos e fatores dietéticos como carência de vitaminas A, E, C e B2 (MELO, 2006).

De acordo com Braakhuis *et al.* (2002), no caso do CEC não há um agente ou fator causal isolado, claramente definido ou aceito, sendo por este motivo mais provável que dois ou mais fatores sejam necessários para produzir a malignidade, causando um acúmulo de alterações genéticas que são a base para o desenvolvimento e progressão do CEC.

A ingestão de bebidas alcoólicas também tem sido associada com um maior risco de desenvolvimento do câncer de boca (BIAZEVIC *et al.*, 2011; SANTOS *et al.*, 2010). Segundo o INCA (Brasil 2001), os riscos de desenvolver câncer bucal aumentam quando o tabagista é também alcoólatra. Boyle *et al.* (1990) relatam o sinergismo entre o álcool e o tabaco eleva em cerca de 100 vezes a probabilidade de desenvolvimento do câncer de bocal.

Mesmo sendo o CEC uma doença multifatorial, o consumo de tabaco e álcool são os dois fatores de risco mais importantes não só para o desenvolvimento da neoplasia, como também para a disseminação de metástases e para o prognóstico geral do paciente. Além disso, a exposição crônica desprotegida à radiação ultravioleta também é considerada um fator etiológico evidente nos casos de CEC em lábio inferior (BUNDGAARD *et al.*, 1994; MANSOUR *et al.*, 2003).

Outros fatores contribuintes que têm sido implicados na etiologia do CEC são: genética e estado sistêmico do indivíduo, meio ambiente com seus efeitos

sociais e comportamentais, irritação crônica (como as originadas de próteses mal ajustadas ou dentes quebrados), higiene bucal deficiente, calor (fumo do cachimbo e charuto), exposição a radiações e atrofia da mucosa oral na síndrome de Plummer-Vinson (VELLY et al., 1998). Uma outra influência predisponente, mas em nível regional, é a dos mascaradores de betel na Índia e em outras partes da Ásia (BALARAM et al., 2002).

O tabagismo é, isoladamente, a principal causa de câncer no mundo, entre eles o câncer de boca. No Brasil, entre suas diferentes regiões, a Sul e a Sudeste representam as mais elevadas taxas de prevalência de consumo de fumo, sendo também regiões com as maiores incidências dos três tumores com intensa associação com o tabaco: boca, esôfago e pulmão (WÜNSCH FILHO et al., 2002).

A relação entre o consumo de bebidas quentes, como chá e café, e o desenvolvimento do câncer de boca ainda é controversa (BIAZEVIC et al., 2011; GANGANE et al., 2007). Biazovic et al. (2011) apontou que não há associação significativa entre o consumo dessas bebidas e o desenvolvimento de câncer de boca e orofaringe, entretanto observou uma relação positiva entre o consumo de café e a proteção contra a doença, embora corresponda a um consumo médio diário de meio litro de café por quase 36 anos. Nkondjock em 2009 mostrou que o café possui substâncias antioxidantes, além de compostos que possuem efeitos biológicos compatíveis com propriedades antineoplásicas.

De acordo com Carvalho et al. (2003), estes fatores de risco associados com a herança genética podem gerar um efeito carcinogênico sobre as células normais da mucosa bucal, sendo postulado que a instabilidade genômica herdada pode aumentar a suscetibilidade ao desenvolvimento do CEC (JEFFERIES & FOULKES, 2001).

Apesar do consumo do tabaco e do álcool estar implicado com o principal fator de risco para a etiologia do CEC, este tumor pode também desenvolver-se em indivíduos sem história de exposição a estes fatores (DAHLSTROM et al., 2003), sugerindo a influência de outros fatores que podem desempenhar um papel etiológico na carcinogênese oral (BALARAM et al., 1995; SCULLY, 2002). Além disso, somente uma pequena proporção de indivíduos expostos a estes fatores desenvolve a neoplasia.

Um estudo com suplementação diária de vitaminas A, E, C e B2 durante 6 meses resultou em remissão completa ou parcial de lesões pré-cancerosas em 60% dos participantes (SHILS et al., 2003). O INCA além de citar os fatores acima mencionados, também aponta a idade superior a 40 anos, a pré-disposição genética, a exposição ocupacional, a má higiene bucal e o uso de próteses dentárias mal adaptadas como fatores de risco para o câncer bucal. No entanto, apesar de alguns autores sugerirem que o traumatismo crônico devido à má adaptação de próteses e má higiene possa sofrer transformação maligna, Swanson e Spougue (1981) acreditam que não há evidências significantes que estabeleça essas relações (BRUNETTI & MONTENEGRO, 2002).

### **2.1.3 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DO CEC E LPM**

De acordo com Kowalski & Souza (2001), os indivíduos com CEC geralmente percebem alguma alteração e procuram cuidados terapêuticos profissionais em média após quatro a oito meses do início da lesão, aumentando para até 24 meses nos grupos socioeconômicos mais baixos. Uma dor mínima ocorre na fase inicial de crescimento, sendo um dos principais fatores implicados no atraso do diagnóstico.

Segundo Neville (2009) o CEC tem uma apresentação clínica variada, incluindo: exofítica, endofítica, leucoplásica, eritroplásica ou eritroleucoplásica. O carcinoma típico do vermelhão do lábio inferior é uma ulceração endurecida, rígida, exudativa e crostosa, normalmente menor que 1 cm em seu diâmetro máximo quando diagnosticado.

O CEC pode ocorrer em qualquer parte da mucosa bucal, porém, a língua, o assoalho oral e o lábio inferior são os locais mais acometidos. Outros locais de envolvimento menos freqüente são: palato duro, mucosa retromolar, mucosa jugal e gengiva (GERVASIO et al., 2001). O CEC labial é tipicamente encontrado em pessoas com exposição crônica desprotegida à radiação ultravioleta (ANTONIADES et al., 1995), frequentemente em indivíduos que trabalham ao ar livre (70%). As lesões podem também surgir no local onde o cigarro, cachimbo ou charuto entram em contato com a mucosa labial e quase 90% delas surgem no lábio inferior.

Os sinais e sintomas do CEC geralmente estão associados às queixas relacionadas com feridas que não cicatrizam, nos lábios e/ou na boca. Ulcerações superficiais com menos de dois centímetros de diâmetro também podem ocorrer, podendo ser indolores e com ausência ou presença de sangramento. Outros sinais e sintomas relacionados são: manchas brancas e/ou avermelhadas na mucosa oral, dor ou desconforto à mastigação e deglutição, dificuldade na fala, emagrecimento acentuado e presença de linfadenomegalia cervical (BRASIL, 2003).

O CEC pode iniciar por uma proliferação atípica que evolui para uma displasia, com 10 a 20% de chances de passar pela fase de carcinoma *in situ* e depois para um carcinoma invasivo e culminar com metástases. No entanto, nem sempre os eventos ocorrem nesta sequência ou se sim, podem passar meses a anos para que aconteça a progressão da neoplasia através desses estágios (MASHBERG & SAMIT, 1989). A mucosa alterada aparece como uma mácula ou placa eritematosa bem demarcada e assintomática, com uma textura macia e aveludada. Apesar de uma significativa proporção dos carcinomas escamosos da mucosa de revestimento da cavidade oral originarem-se de superfícies epiteliais displásicas, a malignidade também pode originar-se de um epitélio desprovido destas alterações, dificultando sobremaneira o diagnóstico precoce da doença (CASIGLIA & WOO, 2001).

Assim, o diagnóstico das lesões que histologicamente representam as displasias da mucosa bucal, é extremamente importante, sendo seu aspecto clínico bastante variável. Clinicamente, lesões potencialmente malignas e malignas da boca podem apresentar-se na forma de leucoplasias, eritropias ou suas combinações (leucoeritropias ou eritroleucoplasias) (LUMERMAN et al., 1995; SPEIGHT; MORGAN, 1993). A OMS define como leucoplasia e eritropias, respectivamente, lesões apresentando-se como manchas ou placas brancas e alterações avermelhadas, que não podem ser caracterizadas clinicamente ou histopatologicamente como nenhuma outra doença.

A leucoplasia, uma placa branca associada com o uso do tabaco ou de origem idiopática, é a lesão potencialmente maligna mais comumente encontrada na cavidade bucal (WARNAKULASURIYA, 2007). Segundo Silverman et al. (1984), a presença e o grau da displasia epitelial são

reconhecidos como importantes na avaliação do potencial cancerígeno de uma lesão, contudo, estes diagnósticos podem diferir conforme a subjetividade e a experiência dos investigadores. Em geral, leucoplasias bucais com características verrucosas, nodulares ou associadas às lesões eritematosas (leucoplasias mosqueadas) são acompanhadas de maior risco de malignização (WARNAKULASURIYA, 2007). Apesar de ser menos comuns que as leucoplasias, as eritroplasias apresentam um maior potencial de transformação maligna.

Warnakulasuriya et al. (2007) acrescenta as seguintes lesões e condições consideradas como cancerizáveis: fibrose submucosa, lúpus eritematoso discóide, lesão de palato causada por tabagismo reverso e desordens congênitas como epidermólise bolhosa e disceratose congênita. No entanto, os papilomas, o lúpus eritematoso, a estomatite nicotínica e a candidose crônica ainda não estão bem estabelecidos na literatura como lesão cancerizável.

As desordens congênitas como epidermólise bolhosa e disceratose congênita, a fibrose submucosa e a lesão de palato causada por tabagismo reverso são desordens raras, sendo as duas últimas mais comuns em algumas regiões da Ásia, Índia e algumas culturas sulamericanas (WARNAKULASURIYA et al. 2007; NEVILLE et al., 2009).

As lesões bucais potencialmente malignas que possuem uma maior probabilidade de desenvolver um carcinoma espinocelular (CEC), apresentam as seguintes características: múltiplas, não-homogêneas e localizadas na língua (borda lateral e ventre), assoalho bucal e palato mole; bem como, lesões que acometem pacientes não fumantes e mais velhos, particularmente do sexo feminino (NAPIER & SPEIGHT, 2008 apud MELO, 2008).

As lesões do CEC tem apresentação clínica como: lesões exofíticas (formadoras de massa), endofíticas (com ulcerações), leucoplásicas, eritroplásicas e/ou eritroleucoplásicas (CASIGLIA&WOO, 2001). Nos primeiros estágios, o CEC pode apresentar-se como uma placa nacarada, elevada e firme ou como uma área de espessamento mucoso, irregular, grosseira e áspera, bem como uma área de espessamento verrucoso. Com a progressão, a lesão pode sofrer ulceração e necrose central, podendo ser delimitada por bordos elevados, hiperêmicos, firmes, duros e irregulares ou arredondados.

Com o decorrer do tempo, as úlceras tornam-se maiores e mais profundas, com extensão para os tecidos circunjacentes e, possivelmente, fixação às estruturas anatômicas adjacentes (MASHBERG & SAMIT, 1989). A destruição do osso subjacente, quando presente, pode ser dolorosa ou completamente indolor, aparecendo nas radiografias como uma radiotransparência com aspecto de “roída por traças”, com margens rotas e mal definidas. Em estágios avançados, além de dor os sintomas podem incluir dificuldades na fonação e deglutição, comprometimento das vias aéreas e disfunções de nervos craniofaciais (CASIGLIA & WOO, 2001; FORASTIERE et al., 2001).

De maneira geral, estes tumores tendem a se infiltrar localmente antes de disseminarem metástases. Porém, quando não diagnosticado em seu estágio inicial, o CEC pode propagar-se regionalmente para os linfonodos submandibulares e jugulares superiores internos, conforme o modelo anatômico do fluxo linfático na região cervical, podendo disseminarem-se posteriormente para sítios mais distantes (OKADA et al., 2003; WOOLGAR, 1999). Os lugares mais favoráveis às metástases à distância são os pulmões, o fígado, os ossos e os linfonodos mediastinais. Contudo, muitas vezes as metástases regionais e distantes podem estar ocultas no momento da descoberta da lesão primária, afetando sobremaneira o prognóstico dos pacientes (ASAKAGE et al., 1998; OKADA et al., 2003). Por outro lado, na literatura existem outros estudos evidenciando a ocorrência de linfonodos cervicais patologicamente positivos em pacientes sem evidências clínicas da doença (HICKS et al., 1998; LYDIATT et al., 1993).

Outra característica clínica importante e que influi no prognóstico dos pacientes com a doença é a alta frequência de formação de tumores primários múltiplos, que levou ao conceito de cancerização de campo, primeiramente utilizado por Slaughter et al. (1953). Em um trabalho clássico sobre o assunto, os autores examinaram cortes histológicos tumorais de 783 pacientes com carcinomas de cabeça e pescoço, numa tentativa de compreender as principais e mais evidentes alterações encontradas no epitélio adjacente aos tumores e, desta forma, explicar seu comportamento clínico. Foi descoberto então que todas as áreas além do limite tumoral possuíam alterações histológicas e que 88 (11%) pacientes possuíam mais do que uma área independente de malignidade. Os autores concluíram que a mucosa do trato digestivo superior

poderia ter sido submetida a alterações após anos de exposição crônica a carcinógenos, se tornando suscetível ao desenvolvimento de diversos focos neoplásicos independentes, com potencial para formação de múltiplas lesões que às vezes coalescem. Devido a este fato, um indivíduo que viver cinco anos após o diagnóstico do tumor primário inicial tem até 35% de chances de desenvolver um novo tumor primário dentro daquele período de tempo (SLAUGHTER et al., 1953).

A interpretação de que pequenos e independentes focos tumorais coalescem em um único tumor é questionável. Entretanto, o conceito de que alterações pré-cancerosas se estendem além da área macroscopicamente visível do tumor é bastante válida e considerada nos dias atuais (BRAAKHUIS et al., 2002).

#### **2.1.4 CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS DO CEC E LPM**

Histologicamente o CEC pode começar como uma lesão displásica, que pode ou não evoluir para uma displasia de toda espessura do epitélio (carcinoma *in situ*) previamente à invasão do estroma conjuntivo subjacente. No entanto, o padrão mais frequente de evolução constitui no CEC iniciando-se como uma lesão *in situ*, algumas vezes com áreas circundantes de atipia epitelial ou displasia. Com a progressão, o carcinoma *in situ* rompe-se através da membrana basal e invade o tecido conjuntivo subjacente.

As displasias são alterações histopatológicas associadas com uma maior probabilidade de desenvolvimento de carcinomas, mais especificamente os de células escamosas. Sendo caracterizadas por alterações celulares que podem ocorrer em inúmeras condições e não exclusivamente em relação às lesões potencialmente malignas. Entre as alterações que justificam tal denominação, podemos citar queratinização intraepitelial, aumento da atividade mitótica, perda da estratificação, perda da polaridade, hiperplasia basilar, pleomorfismo celular e nuclear, hiperchromatismo nuclear, alteração da relação núcleo-citoplasma e mitoses atípicas. A ocorrência dessas alterações, isoladamente ou em conjunto, e variações quantitativas individuais possibilitam a graduação em displasia leve, moderada e severa (TOMMASI, 1998; REIBEL, 2003).

O carcinoma *in situ* é uma entidade histopatológica, na qual os critérios citológicos de malignidade estão presentes e confinados ao tecido epitelial, sem invasão da lâmina própria. Características histológicas discretas separam a displasia epitelial severa do carcinoma *in situ*, o cruzamento dessas características depende em muito de fatores subjetivos e, portanto não mensuráveis (TOMMASI, 1998). Em termos clínicos pode-se concluir que a confirmação de achados histológicos em uma determinada lesão de displasia moderada ou severa deva ser tratada como um carcinoma *in situ* e o paciente classificado como de alto risco, inclusive porque a alteração não é localizada. Não se pode prever quando uma displasia leve, moderada ou severa irá transformar-se em carcinoma invasivo. Dessa forma, tais pacientes deverão receber cuidados correspondentes à “gravidade” das lesões que apresentam, sendo removidas quando possível afastados todos os agentes irritantes presentes e acompanhados por toda vida (TOMMASI, 1998).

Os CECs podem variar desde neoplasias bem diferenciadas até lesões altamente indiferenciadas (ANNEROTH et al., 1986). É considerado bem diferenciado quando faz lembrar a estrutura na qual foi originado, no caso, um epitélio escamoso, apresentando tendência das células para a ceratinização. O tumor é dito moderadamente diferenciado quando essas células são visualizadas em menor intensidade e é denominado de pouco diferenciado quando os aspectos histológicos e citológicos lembram vagamente as estruturas oriundas do epitélio escamoso (BRASIL, 2001), podendo apresentar características basalóides e algumas vezes até apresentar um padrão sarcomatóide.

As células tumorais geralmente apresentam núcleos grandes, com um aumento da razão núcleo-citoplasma. São vistos graus variados de pleomorfismo celular e hiperchromatismo nuclear, além de núcleos vesiculosos com nucléolos evidentes, mitoses atípicas, perda de coesão celular, bem como pérolas de ceratina produzidas por células individuais ou ilhas de epitélio escamoso. Podem ocorrer mudanças no estroma circundante, com a formação de novos vasos sanguíneos (angiogênese), além de ser geralmente, permeado por um infiltrado inflamatório proeminente.

De acordo com D'cruz e Mulherkar (2005), o grau de diferenciação, a profundidade de infiltração, a presença de invasão perineural ou linfovascular,

o envolvimento linfonodal e a extensão extra-capsular da doença são considerados importantes parâmetros histológicos para identificação do subgrupo de pacientes com pobre prognóstico. No entanto, como a resposta terapêutica pode variar amplamente entre os pacientes, outras características são necessárias para a identificação do grupo de tumores de alto risco, objetivando a otimização dos tratamentos padronizados contra o CEC.

### **2.1.5 ANGIOGÊNESE**

Para que uma célula evolua de seu estado normal até assumir as características de uma célula neoplásica, ocorrem uma série de mutações envolvendo genes que codificam proteínas cuja ação está relacionada ao controle do ciclo celular. Caso esta ação seja no sentido de estimular a divisão celular, estes genes são genericamente denominados como oncogêneses e caso tenham por função inibi-la serão considerados como genes supressores de tumor. Seja por função anormalmente exacerbada dos oncogêneses ou por inibição dos supressores, o resultado será a obtenção de uma célula que apresentará um ganho proliferativo em relação às demais, tornando-se insensível aos estímulos apoptóticos.

Entretanto, para que um determinado grupo de células consiga manter um crescimento sustentado é necessário que exista uma fonte de suprimento sanguíneo específico e constante. Há muitas décadas foi percebido que os tumores apresentam uma vascularização bastante proeminente em relação aos tecidos normais. Isto se deve ao desenvolvimento de microvasos a partir de células endoteliais pertencentes a capilares situados próximos às células neoplásicas. Estes achados foram sempre considerados como uma consequência do processo inflamatório decorrente das áreas focais de necrose existentes na massa tumoral.

Assim sendo, a presença de um crescimento vascular acentuado em um tecido tumoral demonstra dois aspectos bastante relevantes. O primeiro deles é a existência de um forte estímulo para estas células endoteliais, capaz de alterar seu estado proliferativo normal. O segundo é a natureza local deste estímulo, uma vez que tal proliferação irá ocorrer apenas no segmento adjacente ao surgimento de um diminuto clone de células neoplásicas. A este crescimento vascular localizado denominamos angiogênese.

Grande parte do mérito referente ao atual estado de conhecimentos sobre a angiogênese deve ser atribuída a Judah Folkman (Folkman, 1972), o qual propôs no princípio da década de setenta a importante participação do desenvolvimento de microcirculação no processo de crescimento tumoral. Já naquela época, Folkman antecipava o futuro ao sugerir que uma importante linha de estudos na terapêutica antineoplásica estaria relacionada ao desenvolvimento de técnicas capazes de bloquear o surgimento desta neovascularização, a fim de impedir o crescimento tumoral.

Experimentos demonstraram que apesar das anormalidades genéticas que promovem o crescimento tumoral, a sobrevivência das células neoplásicas dos tumores sólidos não seria possível a partir do diâmetro de 2 a 3 mm não fosse a ativação angiogênica. Até este diâmetro os tumores recebem oxigênio e nutrientes por difusão simples dispensando a irrigação por vasos sanguíneos próprios. A partir deste tamanho, na ausência de vascularização neoformada, o tumor deixa de crescer e ocorre morte celular induzida pela hipóxia e pela formação de óxido nítrico (HICKLIN&ELLIS, 2005; FOLKMAN,1990). Em 1971, Folkman e cols. difundiram o termo angiogênese para nomear o processo complexo em que são formados novos vasos sanguíneos a partir de uma rede vascular pré-existente. Eles isolaram um fator em tumores humanos denominado Fator de Angiogênese Tumoral (do inglês, Tumor Angiogenesis Fator - TAF) que demonstrou atividade mitogênica às células endoteliais, estimulando a rápida formação de novos capilares. Estas observações propuseram que a angiogênese seria um pré-requisito para o crescimento neoplásico e não um efeito colateral deste (TARTA, 2003). Assim surge a idéia de que o TAF seria um elemento produzido pelas células tumorais e que a sua inativação poderia ter grandes aplicações terapêuticas. Evidências sugerem que a angiogênese não só pode assegurar o crescimento tumoral pelo suprimento de mais nutrientes, mas também pode agir através de efeitos parácrinos das células endoteliais (FOLKMAN, 1995). As células endoteliais liberam fatores de crescimento que induzem a proliferação celular tumoral, sugerindo uma interação entre as células tumorais e as células endoteliais, na qual as primeiras liberam substâncias que estimulam as células endoteliais e, em troca, essas liberam substâncias que promovem o crescimento do tumor (MEURER, 2003).

Cerca de 95% dos tumores malignos humanos são carcinomas que se originam como diminutas lesões in situ que podem ser encontradas em epitélios como pele, mucosa gastrointestinal, bexiga, próstata, mama ou colo uterino, podendo permanecer sem sinais evidentes de crescimento durante anos. Estudos demonstram que durante esta fase as células neoplásicas poderão já apresentar uma atividade proliferativa aumentada, não ocorrendo, no entanto, um aumento do volume tumoral devido ao mecanismo compensatório representado pela apoptose celular.

Numerosos estudos realizados ao longo das últimas duas décadas demonstraram fortes evidências de que esta modificação do padrão de crescimento tumoral é dependente do desenvolvimento de uma neovascularização específica, a qual ocorre em decorrência de diversos fatores locais estimulantes da angiogênese como a hipóxia e a elevação de CO<sub>2</sub> ou óxido nítrico (WANG et al., 2005; POON et al., 2001)

Várias moléculas estimuladoras da angiogênese já foram caracterizadas, entre elas, o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF), fatores de crescimento ligados à heparina, o fator de crescimento derivado das plaquetas (PDGF), fatores de necrose tumoral (TNF $\alpha$  e TNF $\beta$ ) e fator de transformação de crescimento (TGF $\alpha$ ). Dentre todos estes, destaca-se o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), um potente mitógeno envolvido na angiogênese. Sua atuação parece estar relacionada com a regulação endógena deste processo (BUNONE et al., 1999; BROLL et al., 2001; XIONG et al., 2005).

Diversos estudos tem demonstrado que a determinação dos níveis séricos de VEGF pode ser utilizada como um importante marcador tumoral, apresentando uma sensibilidade diagnóstica superior à dosagem do antígeno carcinoembrionico (CEA), incluindo um valor prognóstico pré-operatório e uma forte correlação com o estado tumoral pós-operatório ou de acordo com a resposta à terapia adjuvante.

O VEGF atua através de sua ligação a receptores específicos do tipo tirosina quinase (RTK), promovendo uma cascata de eventos intracelulares, que incluem a proliferação, invasão e atividade quimiotática endotelial. Recentemente, estudos baseados no mecanismo molecular dessas vias de ativação e inativação dos fatores de crescimento tumoral que utilizam tais

receptores têm demonstrado uma promissora possibilidade terapêutica (HICKLIN & ELLIS 2005). Os receptores de VEGF são conhecidos como VEGFR-1 (fms-like tyrosine kinase 1 ou Flt-1), VEGFR-2 (fetal liver kinase, Flk-1 ou KDR) e VEGFR-3 (fms-like tyrosine kinase 4, Flt4). VEGFR-1 e VEGFR-2 são expressos nas células do endotélio vascular. VEGFR-2 e VEGFR-3 são os principais receptores da sinalização nas células endoteliais dos vasos sanguíneos e linfáticos, respectivamente. As proteínas tirosina quinase (PTK) são enzimas que catalizam a transferência do grupo fosfato da adenosina trifosfato (ATP) para resíduos tirosina de outras proteínas ou polipeptídeos (MANASH&MUKHOPADHYAY, 2004), um processo denominado fosforilação. Essas enzimas são importantes mediadoras no processo de transdução do sinal, levando à proliferação, diferenciação, migração, metabolismo e morte celular programada. A fosforilação dos resíduos tirosina nas proteínas alvo é essencial para manutenção da homeostase celular.

Estudos realizados utilizando o fator de crescimento fibroblástico básico (bFGF) (SEZER et al., 2001; AKBULUT et al., 2002) demonstraram que, além de uma elevada ação oncogênica, contribuindo para a transformação de fibroblastos normais em neoplásicos, esta proteína apresentava também uma grande capacidade de estimular o processo de angiogênese, sendo ambos revertidos após sua inativação pela adição de um anticorpo. Paralelamente a estes agentes considerados como angiogênicos, foram identificadas algumas proteínas capazes de exercer ação oposta, como a angiostatina e a endostatina (te VELDE et al., 2002; ZONDOR et al., 2004). É interessante notar que a ação inibidora destas proteínas restringe-se apenas à atividade angiogênica consequente à presença de tecido neoplásico, não exercendo qualquer influência negativa sobre a atividade proliferativa de células endoteliais normais.

Existem fortes evidências de que a angiogênese esteja relacionada não apenas ao crescimento tumoral, desempenhando ainda uma importante ação no processo de formação e desenvolvimento de metástases. Estudos experimentais demonstram ser bastante infrequente a formação de metástases a partir de tumores primários antes do desenvolvimento de neovascularização, ocorrendo, no entanto após esta uma facilitação da migração de células neoplásicas através da circulação sanguínea. Suportando estes achados,

diversos autores referem uma correlação positiva entre a microdensidade vascular e o risco de desenvolvimento de metástases em diversos tumores. Existem evidências de que a capacidade destas células neoplásicas de liberar fatores angiogênicos contribui para a formação de metástases através da ativação de plasminogênio e colagenases contribuindo para a degradação da membrana basal endotelial (LI et al., 2005).

Recentemente, Li et al. (2005) relataram achados semelhantes que VEGF tem expressão aumentada no CEC. Entre as lesões displásicas examinadas neste estudo, nenhuma correlação foi encontrada entre a expressão de VEGF e grau de displasia. Isto é consistente com um estudo anterior por Carlile et al. (2001), sugerindo que qualquer aumento na displasia não é necessariamente acompanhada por um aumento na expressão de VEGF. Outro estudo relatou que o epitélio moderadamente displásico expressa mais VEGF quando comparadas ao epitélio displásico leve ou normal (DENHART et al., 1997) .

As estratégias terapêuticas anti-neoplásicas, dada a consistência dos conhecimentos acumulados até o momento sobre a importância da angiogênese na tumorigênese, tem se baseado no desenvolvimento de medicamentos capazes de inibi-la, destacando-se o desenvolvimento de um anticorpo monoclonal anti-VEGF como a aplicação clínica mais bem sucedida até o momento. Produzido comercialmente após rápida tramitação pelo órgão de controle americano (FDA), devido a seus resultados positivos bastante consistentes, este medicamento, denominado como Bevacizumab (Avastin®) é a primeira terapia aprovada com ação específica na inibição da angiogênese tumoral (te VELDE et al., 2005).

Assim sendo, existem fortes evidências de que a determinação dos níveis de VEGF tornar-se-á uma importante ferramenta na caracterização do comportamento biológico tumoral. Além de fornecer uma informação prognóstica para o paciente, este procedimento representa o início de uma nova e revolucionária etapa na história do tratamento oncológico na qual a terapêutica será estabelecida de forma individualizada, baseada na identificação do perfil de proteínas expressas em cada tumor, possibilitando a utilização de medicações específicas mais eficientes e provavelmente menos deletérias.

### **2.1.6 CÉLULA TRONCO TUMORAL E SEU PAPEL NA TUMORIGÊNESE**

Durante muito tempo acreditou-se que a célula capaz de gerar um tumor poderia ser qualquer célula madura de um tecido que havia sofrido uma “desdiferenciação” devido às alterações fenotípicas e bioquímicas acumuladas por subseqüentes mutações. Entretanto, pelo que se sabe, dificilmente uma célula somática madura vive tempo suficiente para acumular mutações determinantes para a carcinogênese. Essa ainda é uma questão que é discutida e provavelmente esse ponto da tumorigênese deve ser determinado individualmente para cada tipo tumoral (BOMKEN et al., 2010).

Células tronco tumorais têm sido definidas como “células que possuem capacidade de auto renovação e de formar linhagens heterogêneas de células tumorais que compõem o tumor”. A hipótese das células tronco tumorais propõe que é a célula tronco o alvo da carcinogênese e não as células somáticas adultas (BOMKEN et al., 2010).

Apenas um pequeno número de células da massa tumoral parece ser capaz de se proliferar e formar novos tumores, as células com essas habilidades são denominadas de células tronco tumorais. Além disso, as primeiras evidências de células tronco tumorais foram descritas nas leucemias, desde então, células tronco tumorais têm sido descritas em diversos outros tumores, como o câncer de próstata, melanoma, pâncreas, fígado, cabeça e pescoço e colorretais (FANG et al., 2005; LI et al., 2007; MA et al., 2007; PRINCE et al., 2007).

Assim, uma vez que a diferenciação progressiva é acompanhada de diminuição da taxa proliferativa, as células terminalmente diferenciadas são incapazes de proliferar e tendem, após certo tempo, a iniciar o programa de apoptose. Assim, muitas das células que compõem a massa tumoral não são tumorigênicas. Desta forma, os tumores exibem células em diferentes estágios de proliferação e diferenciação, contribuindo para a heterogeneidade tumoral (COLLINS et al., 2005).

As células tronco dependem também de um microambiente específico para manterem a capacidade de auto renovação e tendo em vista que os tecidos do microambiente tumoral influenciam na manutenção do estado tumoral, estudos detalhados sobre a influência dos microambientes na

manutenção das células tronco tumorais são centrais para o entendimento da biologia dos cânceres (RICCI-VITIANI et al., 2007).

## **2.2 OBJETIVO GERAL**

Realizar dois estudos, um epidemiológico para avaliar o perfil clínico patológico dos pacientes diagnosticados com CEC bucal e/ou lesões potencialmente malignas (estudo 1) e outro laboratorial para estudar através de reações imunoistoquímicas o potencial angiogênico e a pesquisa de células troncos tumorais (estudo 2), em pacientes com essas mesmas patologias do Serviço de Diagnóstico das Doenças da Boca (CDDDB) da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas.

### **2.2.1 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

#### **ESTUDO 1**

**2.2.1.1-** Analisar através de estudo de casos, as características clínicas e histopatológicas dos casos.

#### **ESTUDO 2**

**2.2.1.2-** Identificar a presença de células tronco tumorais (CTT) nas condições patológicas estudadas, através da identificação de marcadores imunoistoquímicos para as mesmas.

**2.2.1.3-** Estabelecer a correlação entre a presença das CTT com o potencial angiogênico das lesões potencialmente malignas e do CEC bucal.

**2.2.1.4-** Correlacionar o potencial angiogênico dos casos estudados com o seu perfil clínico.

## **2.3 METODOLOGIA**

### **2.2.2 ESTUDO 1**

#### **2.2.2.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO E SELEÇÃO DE PACIENTES**

Este projeto foi previamente submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Pelotas (protocolo nº. 058/2008, ANEXO 1). Será realizado um estudo de casos que utilizará dados primários sobre a distribuição de eventos (lesões em tecidos moles bucais) em um único momento e relacionar com os aspectos clínicos e histopatológicos observados na população de indivíduos usuários do Centro de Diagnóstico das Doenças da Boca (CDDB) da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas.

O CDDB da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas tem funcionamento ininterrupto há aproximadamente meia década, caracterizando-se como centro de referência na área de diagnóstico clínico e histopatológico das afecções bucais para Pelotas e Região Sul. A demanda do Serviço tem ganhado volume nos últimos 10 anos graças à realização de Campanhas de Prevenção e Detecção do Câncer de Boca, realizadas periodicamente. Entretanto, participarão deste estudo somente os pacientes atendidos no período de maio/2009, no qual se iniciou a coleta de dados com o questionário, até maio/2013, data prevista para o final da execução do projeto.

Todos os pacientes selecionados serão previamente submetidos ao protocolo de atendimento do CDDB. Será realizado o registro da localização, tamanho e características clínicas de cada lesão, bem como, do diagnóstico clínico presuntivo, estabelecido pelo patologista responsável. Todos os indivíduos serão previamente esclarecidos quanto à natureza da pesquisa, autorizando por escrito sua participação livre e esclarecidos mediante um termo de consentimento (ANEXO 2).

Os indivíduos participantes da pesquisa serão submetidos ao questionário a respeito de seus hábitos diários de consumo de fumo, bebidas alcoólicas e quentes, bem como seus dados de escolaridade, os quais serão tabulados e analisados estatisticamente.

Serão incluídos os pacientes com lesões malignas ou potencialmente malignas atendidos, sem restrições de idade ou gênero, no entanto fichas consideradas inadequadamente preenchidas ou sem a indicação do diagnóstico final, serão eliminadas da pesquisa.

Uma coleta de dados das lesões malignas ou potencialmente malignas será efetuada para posterior avaliação percentual da prevalência dessas

condições patológicas. Serão avaliados a frequência das lesões examinadas bem como a distribuição das amostras quanto a localização, sexo e idade dos pacientes sendo os referidos dados tabulados.

#### **2.2.2.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO**

Farão parte do estudo os indivíduos com diagnóstico clínico e histopatológico de lesões malignas ou potencialmente malignas oriundos do Centro de Diagnóstico das Doenças da Boca (CDDB) da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas, sem restrição de gênero, idades, níveis sociais e raças.

#### **2.2.2.3 CRITÉRIOS DE EXCLUSÃO**

Indivíduos obedecendo aos critérios de inclusão, mas que se recusem a responder o questionário, bem como indivíduos portadores de condições não descritas nos critérios de inclusão serão automaticamente excluídos da pesquisa, não respondendo também ao questionário.

#### **2.2.2.4 APLICAÇÃO DE QUESTIONÁRIO**

Inicialmente será aplicado um questionário (ANEXO 3) em forma de entrevista com informações quanto ao sexo, idade, ocupação, procedência e fatores de risco como: tabagismo, etilismo, uso de bebidas quentes e chimarrão.

#### **2.2.2.5 EXAME FÍSICO**

Após a aplicação do questionário aos pacientes serão examinados obedecendo a semiotécnica adotada no CDDB. Inicialmente será realizada inspeção extra-bucal e de tecidos moles da cavidade bucal, onde serão examinados sistematicamente a pseudomucosa labial, mucosa labial, mucosa jugal, região retromolar, dorso da língua, laterais da língua, ventre lingual, assoalho bucal, palato duro, palato mole, orofaringe e gengivas (MORGER et al, 2010).

Os exames serão realizados utilizando as barreiras de biossegurança de acordo com o Manual de Biossegurança da FAO (PEREIRA et al, 2008) com o paciente sentado em uma cadeira com encosto sob iluminação artificial.

### **2.2.2.6 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados serão coletados, tabulados e submetidos às análises estatísticas específicas.

### **2.2.3 ESTUDO 2**

#### **2.2.3.1 DELINEAMENTO DO ESTUDO E SELEÇÃO DE PACIENTES**

Este projeto foi previamente submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Pelotas (protocolo nº. 058/2008, ANEXO 1). Será realizada uma pesquisa laboratorial para estudar através de reações imunoistoquímicas o potencial angiogênico e a presença de células troncos tumorais, observados na população de indivíduos usuários do Serviço de Diagnóstico das Doenças da Boca (CDDB) da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas.

O CDDB da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas, tem funcionamento ininterrupto há aproximadamente meia década, caracterizando-se como centro de referência na área de diagnóstico clínico e histopatológico das afecções bucais para Pelotas e Região Sul. A demanda do Serviço tem ganhado volume nos últimos 10 anos graças à realização de Campanhas de Prevenção e Detecção do Câncer de Boca, realizadas periodicamente. Entretanto, participarão deste estudo somente os pacientes atendidos no período de maio/2009, no qual se iniciou a coleta de dados com o questionário, até maio/2013, data prevista para o final da execução do projeto.

Todos os pacientes selecionados serão previamente submetidos ao protocolo de atendimento do CDDB. Será realizado o registro da localização, tamanho e características clínicas de cada lesão, bem como, do diagnóstico clínico presuntivo, estabelecido pelo patologista responsável. Todos os indivíduos serão previamente esclarecidos quanto à natureza da pesquisa, autorizando por escrito sua participação livre e esclarecidos mediante um termo de consentimento (ANEXO 2).

Os indivíduos participantes da pesquisa serão submetidos ao questionário a respeito de seus hábitos diários de consumo de fumo, bebidas alcoólicas e quentes, bem como seus dados de escolaridade, os quais serão tabulados e analisados estatisticamente.

Serão incluídos os pacientes com lesões malignas ou potencialmente malignas atendidos, sem restrições de idade ou gênero, no entanto fichas consideradas inadequadamente preenchidas ou sem a indicação do diagnóstico final, serão eliminadas da pesquisa.

Uma coleta de dados das lesões malignas ou potencialmente malignas será efetuada para posterior avaliação percentual da prevalência dessas condições patológicas. Serão avaliados a frequência das lesões examinadas, bem como a distribuição das amostras quanto a localização, sexo e idade dos pacientes sendo os referidos dados tabulados.

#### **2.2.3.2 CRITÉRIOS DE INCLUSÃO**

Farão parte do estudo os espécimes biopsiados dos indivíduos com diagnóstico clínico e histopatológico de lesões malignas ou potencialmente malignas oriundos do Centro de Diagnóstico das Doenças da Boca (CDDDB) da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas, sem restrição de gênero, idades, níveis sociais e raças.

#### **2.3.2.3 ESTUDO HISTOPATOLÓGICO e IMUNOISTOQUÍMICO**

Entre os métodos imunoistoquímicos rotineiramente utilizados em laboratórios de patologia, iremos utilizar o método da streptavidina-biotina ((SABC, do inglês Streptavidina-Biotin Complex), sendo utilizados os anticorpos monoclonais anti-CD44, anti- CD133, anti-Nanog e anti-Oct-4 e anti-CD34, todos anti-humanos (Tabela 1).

Todas as amostras utilizadas serão fixadas em formol 10% e emblocadas em parafina. A reação imuno-histoquímica será realizada sobre secções teciduais de 3µm de espessura, estendidas em lâminas de vidro previamente limpas e desengorduradas, preparadas com adesivo à base de 3-aminopropyltriethoxy-silene SIGMA CHEMICAL CO, St. Louis, MO, USA) a 5%

em etanol absoluto. Inicialmente, os cortes serão desparafinizados em dois banhos de xilol, sendo o primeiro a 60°C por 30 minutos e o segundo a temperatura ambiente por 20 minutos. Os cortes serão reidratados em cadeia descendente de etanol, a partir de três passagens em etanol absoluto, seguidos por etanol 95, 85 e 80%, durante 5 minutos cada, e imersos por 10 minutos em solução de hidróxido de amônia a 10% para remoção do pigmento formólico. Após, proceder-se-á a lavagem em água corrente por 10 minutos e em duas passagens por água destilada.

As secções teciduais serão então submetidas ao tratamento para recuperação antigênica, o qual será realizado através da colocação das amostras histológicas em cuba contendo solução tampão de ácido cítrico pH 6,0, no microondas (1,3KW), em três ciclos de 5 minutos cada.

A seguir será realizado o bloqueio da peroxidase endógena tecidual, através de duas passagens de 5 minutos em solução de peróxido de hidrogênio 20 volumes em metanol (1:1, v/v).

Após, as secções teciduais serão incubadas com os anticorpos primários por 18h (overnight), à 4°C e nas condições de trabalho especificadas na tab. 1. Após duas lavagens em tampão Tris-HCl (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro-RJ) por 5 minutos cada, os cortes receberão o kit LSAB (Dako Corporation, Carpinteira, CA, USA), com período de incubação de 30 minutos à temperatura ambiente, tanto para o anticorpo secundário como para o complexo terciário.

As lâminas que serão incubadas com o MAGE-(Y18), após o bloqueio da peroxidase endógena, serão incubadas por 1h seguido por duas lavagens de cinco minutos cada, com tampão Tris-HCl. Em seguida, os cortes histológicos serão incubados com o anticorpo secundário Rabbit anti-Goat IgG (Pierce® - Rockford, IL USA) por trinta minutos, seguido, novamente, por dupla lavagem em tampão Tris-HCl. Logo após, a incubação com o complexo terciário (Vectastain ABC Kit – Vector Laboratories, Inc.) será de 30 minutos.

Para todos os anticorpos, a revelação da reação será realizada com solução cromógena de diaminobenzidina (3,3'-diamino-benzidina, DakoCytomation, Inc. 6392 Via Real Carpinteria, California 93013 USA), como recomendado pelo fabricante. Os cortes serão lavados em água corrente por

10 minutos, passados duas vezes por água destilada, contra-corados com hematoxilina de Mayer por 5 minutos e novamente lavados. Após a desidratação e diafanização, montagem das lâminas será feita em Permount® (Fischer Scientific, Fair Lawn, NJ, USA).

Como controle positivo, serão utilizadas amostras de tecido sabidamente positivo. Os controles negativos serão obtidos através da omissão dos anticorpos primários.

Todos os passos da reação de imunistoquímica serão realizados à temperatura ambiente, com exceção da etapa da recuperação antigênica, realizada no microondas. Entre cada passo da reação, antes do uso de Diaminobenzidina (DAB), as lâminas serão lavadas várias vezes com SST (pH 7,4), e após o uso de DAB as lavagens foram feitas com água comum.

A graduação das lesões submetidas à imunistoquímica será realizada através da análise qualitativa, sendo consideradas positivas para os anticorpos anti-CTT descritos, as lesões com marcação intra-citoplasmática nas células epiteliais tumorais e para o anticorpo anti-CD34 as células endoteliais revestindo os vasos neoformados. As lâminas serão avaliadas de forma cega e independente por 2 examinadores, sendo o escore final estabelecido pelo consenso entre estes.

**Tabela 1.** Anticorpos utilizados no estudo, suas diluições, condições de incubação e especificações do fabricante.

<b>Anticorpo</b>	<b>Diluição</b>	<b>Tempo de Incubação</b>	<b>Fabricante/Clone</b>
<b>ANTI NANOG</b>	1:1000	2h a 4°C	Chemicon Cat. AB9220
<b>ANTI OCT4</b>	1:500	2h a 4°C	Millipore/Chemicon Cat. MAB4305
<b>CD 133</b>	1:100	O.N. a 4°C	Anti-CD133 (Prominin-1), clone 17A6.1
<b>CD 44</b>	1:100 a 1:250	O.N. a 4°C	MILLIPORE - Anti-CD44 [H-CAM], clone EPR1013Y - Rabbit Monoclonal - Cat: 04- 1123
<b>CD 34</b>	1:50	1h, 37 °C	Novocastra, NCL-END, Mouse Monoclonal - Clone 121224S

**Tabela 2** - Soros primários - especificidades, diluições, fontes e tempo de incubação

Especificidade	Fonte	Diluição	Tempo de incubação
Multi-MAGE- $\alpha^*$	57B	Sem diluição	18 horas
MAGE-A1*	57B	Sem diluição	18 horas
MAGE-(Y-18)**		1:50 a 1:500	1 hora
MAGE-A10*	57B	Sem diluição	18 horas
NY-ESO*		Sem diluição	18 horas

\* **Cedido pelo Prof. Dr. Giulio Spagnoli - Switzerland**

\*\* **SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.**

#### 2.3.2.4 MICRODENSIDADE VASCULAR (MDV)

A MVD das lesões potencialmente malignas e dos CEC estudados será avaliada segundo os critérios de Gasparini et al. por dois observadores independentes, os quais desconhecem os dados clínicos e os fatores de risco dos pacientes em estudo. Em um aumento 40x, as secções teciduais serão escaneadas, sendo selecionadas cinco áreas de maior intensidade de marcação para o anticorpo anti-CD34 (*hot spots*). A contagem dos microvasos dessas áreas será realizada em um aumento de 200x. Visando reduzir as variações interobservadores a contagem dos vasos neoformados será realizada por um programa de análise de imagem Image J (Rasband, W.S., ImageJ v1.44p, U. S. National Institutes of Health, Bethesda, Maryland,

USA, <http://rsb.info.nih.gov/ij/>, 1997–2011). Todas as células endoteliais ou grupos delas que forem CD34 positivos e estiverem claramente separados das estruturas adjacentes, sejam elas outros microvasos, células tumorais ou células do tecido conjuntivo, serão contadas como um vaso, independentemente da existência de lúmen vascular. A análise da imagem permitirá ao operador selecionar os vasos corados e subtrair o *background*. A média de microvasos dos cinco campos mais vascularizados será tomada como a MDV, sendo expressa por número absoluto de vasos por 0.74 mm<sup>2</sup> (aumento de 200x).

#### **2.3.2.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados serão coletados, tabulados e submetidos às análises estatísticas específicas.



## 2.4 ORÇAMENTO

MATERIAL	ORÇAMENTO	QUANT. 1	FABRICANTE
ANTI NANOG	R\$ 460.00	100UI	Chemicon Cat. AB9220
ANTI OCT4	R\$ 448.00	100ug	Millipore/Chemicon Cat. MAB4305
CD 133	R\$ 448.00	100ug	Anti-CD133 (Prominin-1), clone 17A6.1
CD 44	R\$ 474.00	100UI	Anti-CD44 [H-CAM], clone EPR1013Y - Rabbit Monoclonal - MILLIPORE - Cat: 04-1123
CD34	R\$ 530,00	15mM	Anti-Cd34, NCL-End , Mouse Monoclonal, Novocastra, Clone 121224S
<b>TOTAL</b>	<b>R\$ 2.360,00</b>		

### **3 Relatório do Trabalho de Campo**

Este estudo foi realizado com um grupo de pacientes usuários do Centro de Diagnóstico das Doenças da Boca (CDDDB) no período de 2009 à 2014. As entrevistas foram realizadas até janeiro de 2014, devido aos prazos para a defesa, por entrevistadores devidamente calibrados.

Após as entrevistas, foram realizadas as análises histopatológicas e classificados cada paciente nos três grupos de interesse. Em seguida, os espécimes foram submetidos à reação de imunohistoquímica com o “kit Easylink One” do fabricante Erviegas® o qual obtivemos por um custo melhor do que o citado no projeto (kit LSAB Dako Corporation, Carpinteira, CA, USA) solução cromógena de diaminobenzidina além de apresentar maior especificidade e menos passos laboratoriais, com o anticorpo primário CD34.

Nesta fase optamos em realizar a análise apenas do potencial angiogênico com o anticorpo descrito, pois houve dificuldades na otimização dos outros anticorpos descritos no projeto: Anti Nanog, Anti Oct4, CD33 e CD44.

O projeto tinha como objetivo a realização de dois estudos, um realizando uma análise das características clínicas e histopatológicas de cada caso, seguido de uma avaliação descritiva. Tal objetivo foi obtido com o auxílio dos bancos de dados fornecidos pelas entrevistas com os pacientes.

No entanto, no segundo estudo, mais amplo, não foi possível alcançar todos os objetivos. “Identificar a presença de células tronco tumorais (CTT) nas condições patológicas estudadas, através da identificação de marcadores imunohistoquímicos para as mesmas” e “Estabelecer a correlação entre a presença das CTT com o potencial angiogênico das lesões potencialmente malignas e do CEC bucal”, foram metas não obtidas em decorrência de dificuldades na otimização dos anticorpos, além do fato de que a maior parte espécimes eram oriundos de biópsias incisionais, fato que revelaria o viés da não representatividade, ou seja, risco elevado de falsos negativos.

Ainda, dentro dos objetivos propostos pelo segundo foi possível correlacionar o potencial angiogênico dos casos estudados com o seu perfil clínico, pela quantificação da MVD realizada por meio da marcação do anticorpo CD34, cuja otimização foi bem sucedida.

As reações de imunistoquímica foram realizadas no laboratório do CDDB com o auxílio das técnicas de laboratório e de uma colega de mestrado, sem intercorrências.

A digitalização dessas lâminas foram realizadas no laboratório da Faculdade de Biotecnologia da Universidade Federal de Pelotas, utilizando um microscópio da marca Olympus BX51 e o software DP2-BSW. Foram registradas cinco imagens de cada lâmina onde havia maior marcação pelo anticorpo (*hot spots*).

Após a digitalização, foram realizadas as contagens dos microvasos com o auxílio do *software Image Pro Plus®*, o qual apresenta o registro numérico em planilhas *excel* facilitando, desta forma, a tabulação dos resultados.

Em função de apenas parte da segunda proposta ter sido realizada, decidiu-se unir os dois objetivos iniciais em único artigo científico.

#### 4 Artigo

### **Lesões Potencialmente Malignas e Carcinoma Espinocelular oral: estudo de suas características individuais, clínicas e sua relação com a angiogênese**

Guilherme De Marco Antonello<sup>1</sup>, Karine Duarte da Silva<sup>1</sup>, Ana Paula Neutzling Gomes<sup>1,2</sup>, Ana Carolina Uchoa Vasconcelos<sup>1,2</sup>, Fernanda Nedel<sup>3</sup>, Marcos Britto Corrêa<sup>1</sup>, Sandra Beatriz Chaves Tarquinio<sup>1,2</sup>,

<sup>1</sup> Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil.

<sup>2</sup> Centro de Diagnóstico de Doenças da Boca da Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Brasil.

<sup>3</sup> Professora Assistente da Universidade Católica de Pelotas, Brasil.

Autor correspondente:

S. B. C. Tarquinio

Programa de Pós-graduação em Odontologia, Universidade Federal de Pelotas.

Rua Gonçalves Chaves, 457, sala 607, Pelotas, RS, CEP 96015560, Brasil.

[sbtarquinio@gmail.com](mailto:sbtarquinio@gmail.com)

Este trabalho será submetido para a Revista Brasileira de Cancerologia

## Resumo

O objetivo desta pesquisa foi realizar um estudo analítico-descritivo de casos de lesões potencialmente malignas (LPM), de baixo e alto risco de malignização e do carcinoma espinocelular (CEC), avaliando suas características individuais, clínicas e histopatológicas. Além disso, o presente estudo visa também correlacionar o potencial angiogênico das LPM e do CEC, através da identificação da microdensidade vascular (MVD), bem como, para os casos de CEC correlacionar a presença de metástase com tais variáveis. Uma amostra de 49 pacientes, sendo 15 (30.6%) LPM de baixo risco de malignização, 15 (30.6%) LPM de alto risco e 19 (38.8%) casos de CEC, foi investigada por meio de um questionário em forma de entrevista e por uma análise imunoistoquímica com o anticorpo anti-CD34 – para marcar os vasos sanguíneos neoformados - visando avaliar a MVD de cada grupo. Observou-se uma maior prevalência de LPM e CEC em homens e indivíduos adultos mais velhos. Em relação aos hábitos de tabaco e álcool, nossos achados corroboraram os da literatura, confirmando o papel desses dois principais fatores de risco na carcinogênese oral. A análise da MVD mostrou associação estatisticamente significativa entre os grupos de LPM de baixo risco com MVD média de 16.5, LPM de alto risco, com 21.9 e de CECs com 29.3. Considerando-se as limitações deste estudo, foi possível concluir que indivíduos do sexo masculino, adultos com idade mais avançada, fumantes e consumidores de bebidas alcoólicas estiveram associados há uma maior propensão de ocorrências de LPM e CEC. Além disso, o potencial angiogênico, representado pela MVD, mostra significativo aumento com a progressão das LPMs em malignas, sendo um marcador importante na estimativa do prognóstico dessas lesões.

**Palavras-chave:** tabaco, álcool, câncer bucal, Carcinoma de células escamosas, angiogênese

**Abstract**

It was aimed to perform an analytic and descriptive study of cases from potentially malignant lesions (PML), presenting low or high risk of malignization, as well as cases of oral squamous cell carcinomas (OSCC), evaluating their individual, clinical and histological characteristics. Moreover, the angiogenic potential of PMLs and OSCCs were correlated with those variables and also with the presence of metastasis, through the microvessel density (MVD) analysis. A sample of 49 patients, being 15 (30.6%) cases of low risk PML, 15 (30.6%) of high risk PML and 19 patients (38.8%) with OSCC was investigate, using a questionnaire and also performing the immunohistochemical technique for the antigen anti-CD34 (blood vessel marker) in order to evaluate the MVD for each group. The results showed a higher prevalence of men and older adults with PMLs and OSCCs. Regarding to the tobacco and alcohol consumption our findings corroborated the literature, confirming the role of these main risk factors in the oral carcinogenesis. The MVD analysis showed a statistically significant association among the low risk PML median (16.5), high risk PML median (21.9) and OSCC group median (29.3). Considering the limitations of this study, it was possible to conclude that male, older adults, smokers and alcohol consumers had more likely PMLs and OSCCs. Moreover, the angiogenic potential expressed as MVD indexes showed significant increasing in PMLs progressing to OSCC lesions, being an important marker of prognosis for these conditions.

**Key words:** tobacco, alcohol, oral cancer, oral squamous cell carcinoma, angiogenesis.

## **Introdução**

O câncer de cabeça e pescoço é o 6º tipo de câncer mais prevalente no mundo, sendo que as neoplasias malignas bucais representam cerca de 10% dos tumores malignos que ocorrem no corpo humano. No Brasil, de acordo com dados do Instituto Nacional do Câncer<sup>1</sup> o câncer de boca constitui a quinta neoplasia mais frequente em homens<sup>1</sup>.

Cerca de 95% das neoplasias orais são carcinomas espinocelulares (CECs) ou carcinomas epidermoides/carcinomas de células escamosas, predominando no gênero masculino e na faixa etária dos 50 aos 70 anos<sup>2,3</sup>. Apesar dos avanços na terapêutica a sobrevivência de 5 anos para os pacientes com CEC fica em torno de 40%, não ultrapassando os 50% dos casos diagnosticados anualmente. Tal panorama decorre do atraso no diagnóstico da doença, notadamente nas populações de baixo nível socioeconômico, com menor grau de escolaridade e que, geralmente, consomem álcool e tabaco em excesso<sup>4,5</sup>.

Leucoplasia e eritroplasia ou suas combinações (leucoeritroplasias ou eritroleucoplasias) são as principais lesões potencialmente malignas (LPM) da cavidade bucal, sendo a leucoplasia a mais comum<sup>4</sup>. A Organização Mundial de Saúde (OMS) define como leucoplasia e eritroplasia, respectivamente, lesões apresentando-se como manchas ou placas brancas e alterações avermelhadas, que não podem ser caracterizadas clinicamente ou histopatologicamente como nenhuma outra doença<sup>6</sup>. Quando se considera o componente histopatológico das lesões potencialmente malignas orais, tem-se as displasias, que são alterações associadas com uma maior probabilidade de desenvolvimento de carcinomas e podem ser graduadas em leve, moderada e severa<sup>7</sup>.

Estudos epidemiológicos como os de Kuroda<sup>8</sup> sugerem que a etiologia do câncer bucal seja multifatorial, onde múltiplos eventos moleculares se desenvolvem da combinação entre predisposição genética individual e exposição crônica à carcinógenos ambientais, o tabaco, o álcool, vírus oncogênicos, radiação solar e radiação ionizante. Infecções, imunodeficiência e fatores dietéticos como carência das vitaminas A, E, C e B2 também podem desempenhar papel no desenvolvimento de lesões malignas e potencialmente malignas orais.

O tabagismo é, isoladamente, a principal causa de câncer no mundo<sup>9</sup>, e as regiões Sul e Sudeste, no Brasil, apresentam as mais elevadas taxas de prevalência de seu consumo além das maiores incidências de CECs orais, de esôfago e pulmões<sup>10</sup>.

Além disso, a angiogênese - mecanismo de proliferação de novos vasos sanguíneos a partir dos já existentes- envolve múltiplos passos e representa um processo fundamental para o desenvolvimento tumoral, graças ao aporte nutricional fornecido às células neoplásicas proliferantes e à facilitação da disseminação metastática. Quando os tumores sólidos atingem um volume de 1 a 2 mm<sup>2</sup>, seu crescimento passa a ser diretamente dependente da angiogênese<sup>11</sup>. A hipóxia tecidual gerada do excessivo crescimento celular neoplásico pode induzir fatores de crescimento, sendo o mais potente e específico o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), que é secretado por quase todos os tumores sólidos<sup>12</sup>. Vem sendo verificada a existência de correlação significativa entre o índice angiogênico e o prognóstico das lesões. Entretanto, existem ainda, muitas controvérsias a respeito do tema<sup>13</sup>.

O uso de técnicas imunoistoquímicas permite verificar e quantificar a presença da microcirculação tumoral, através de diversos anticorpos e a sua identificação pode ser realizada por meio de diversos métodos, sendo a densidade microvascular (MVD) um dos mais utilizados. A MVD reflete a intensidade da angiogênese tumoral e vários

estudos demonstram a sua correlação com o crescimento tumoral e com a ocorrência de metástases à distância<sup>14</sup>. Além do carcinoma de mama, a vascularização tumoral correlaciona-se diretamente ao prognóstico de outros tumores como o carcinoma de pulmão, de próstata e ao melanoma<sup>15</sup>.

Desta forma, o objetivo deste trabalho foi realizar um estudo analítico-descritivo de casos de lesões potencialmente malignas (LPM) de baixo e alto risco de malignização e do CEC, avaliando suas características individuais, clínicas e histopatológicas. Além disso, o presente estudo visa correlacionar o potencial angiogênico das LPM e do CEC, através da identificação da microdensidade vascular (MVD), correlacionando com as variáveis acima descritas, bem como, para os casos de CEC correlacionar a presença de metástase com tais variáveis.

## **Material e Métodos**

O trabalho consistiu em um estudo analítico descritivo, no qual um questionário em forma de entrevista foi aplicado aos pacientes atendidos por livre demanda no Centro de Diagnóstico das Doenças da Boca (CDDDB) da Universidade Federal de Pelotas (UFPel), que funciona como um centro de referência para o atendimento, diagnóstico e tratamento de pacientes portadores de enfermidades orais, assistindo a população da Região Sul do Rio Grande do Sul, predominantemente de Pelotas.

As entrevistas iniciaram em junho de 2009 e estenderam-se até agosto de 2013. Foram utilizados os dados primários observados em um único momento na população de indivíduos usuários do CDDDB-UFPel, obtidos por meio de um questionário. Os dez entrevistadores que fizeram parte deste trabalho foram anteriormente treinados por um único supervisor. O questionário usado baseou-se no CAGE (acrônimo referente às suas

quatro perguntas- *cut down, annoyed by criticisms, guilty and eye-opener*) e AUDIT (*The Alcohol Use Disorders Identification Test*), instrumentos usados para métodos simples de *screening* do consumo excessivo de álcool.

Todos os pacientes selecionados para a pesquisa, sem restrição de gênero, idade, nível social e raça, foram previamente submetidos ao protocolo de atendimento do CDDDB, o qual inclui: uma anamnese detalhada, um exame físico extra e intrabucal minucioso, bem como a avaliação da necessidade de diagnóstico histopatológico e providenciado seus tratamentos. Todos os indivíduos foram previamente informados quanto à natureza da pesquisa, por meio de uma carta de informação ao paciente, e autorizaram por escrito sua participação livre e esclarecida, mediante um termo de consentimento.

No grupo foram selecionados pacientes com lesões malignas ou potencialmente malignas da mucosa bucal (exceto vermelhão de lábio) diagnosticados no CDDDB - UFPel (critérios clínicos, confirmados pela análise histopatológica).

Para aqueles que apresentavam mais de um diagnóstico histopatológico no momento da aplicação do questionário, foi considerado para análise quanto às exposições o diagnóstico de maior gravidade. Os diagnósticos histopatológicos encontrados foram agrupados, segundo a OMS, em: grupo de baixo risco, o qual incluiu pacientes sem displasia epitelial (com acantose e/ou hiperqueratose) e pacientes com displasia epitelial discreta (n=15); grupo de alto risco incluiu pacientes com displasias epiteliais moderada e severa, bem como carcinoma *in situ* (n=15); e o último grupo, que incluiu aqueles pacientes com CEC (n=19).

A partir dos dados das entrevistas e análise histopatológica obteve-se informações sobre gênero, (masculino ou feminino), idade (categorizada em 2 grupos: até 60 anos, e acima de 60 anos), realização de autoexame e quanto a localização, a qual foi

inicialmente dividida em 8 regiões: rebordo alveolar, língua, mucosa jugal, mucosa labial, palato, assoalho bucal, região retromolar e pilar amigdaliano. No entanto, para facilitar a análise dos dados essas regiões foram agrupadas em região anterior e posterior da boca. A apresentação clínica foi classificada em úlcera, leucoplasia, eritroplasia e leucoeritroplasia. Em relação ao uso de tabaco, a classificação seguiu quatro categorias: não-fumante, ex-fumante, fumante atual leve (até 20 cigarros/dia) e fumante atual pesado (mais de 20 cigarros/dia), baseando-se em parte no estudo de Hildebrand. Além disso, para os pacientes com CEC foram avaliadas a presença ou não de metástases cervicais através da consulta dos prontuários dos pacientes.

### **Imunoistoquímica**

Todas as amostras foram submetidas à reação de imunoistoquímica, com o “kit Easylink One” (Erviégas® São Paulo, SP, Brasil) e o anticorpo primário anti-CD 34 (DAKO, Dinamarca, distribuído por Dako North America, Inc. 6392 Via Real, California USA), conforme recomendações do fabricante. Em resumo, os cortes foram desparafinizados em xilol e reidratados em concentrações de álcool. Posteriormente, para a recuperação antigênica, as seções foram aquecidas em “banho-maria” a temperatura de 90°C, em tampão de citrato (pH 6,0), por 30 minutos. O bloqueio da peroxidase endógena foi feito com uma solução de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> em metanol, durante 30 min. Depois da lavagem com Tris-HCl (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro, RJ, Brasil) em duas trocas de 5 minutos, o anticorpo primário para a detecção de vasos sanguíneos (anti-CD 34) foi incubado durante 1 hora em temperatura ambiente. Na sequência, foi utilizado o kit EasyLink One (Erviégas Ltda, São Paulo, SP, Brasil), incubado por 30 minutos à temperatura ambiente. Posteriormente, após 3 lavagens com tampão (2 minutos cada uma), o kit cromógeno líquido DAB (3, 3'-diaminobenzidina; Erviégas

Ltda, São Paulo, SP, Brasil) foi empregado. A contra coloração foi feita com Hematoxilina de Mayer e em seguida a lavagem com água destilada. Por fim, a reidratação e montagem foram realizadas.

### **Quantificação da MVD**

A análise da densidade microvascular foi realizada segundo o método descrito por Weidner et al. (1991), com modificações, pois as lâminas foram digitalizadas e a contagem foi realizada com a auxílio do *software* Image Pro Plus (Media Cybernetics, Bethesda, MD, USA) (Figura 1). Com a objetiva de 10x foram identificadas as áreas com maior marcação, denominadas de “*Hot Spot*” e dentro desta área foram registrados cinco imagens em aumento de 20x, sendo os vasos contados por toda a sua extensão. As médias dessas cinco áreas determinaram a MVD de cada caso (Figura 2).

### **Análise Estatística**

Para análise estatística os dados foram tabulados e analisados no programa Stata 11.0. Foi realizada análise descritiva das variáveis individuais e clínicas. A associação das variáveis independentes com a microdensidade vascular foi realizada através de análise de variância (ANOVA) de um fator. Para analisar a associação das variáveis independentes com a presença de metástase, entre os casos de CEC, foi utilizado teste exato de Fisher. Para todas as análises foi considerado um nível de significância de 5% ( $p < 0,05$ ).

### **Resultados**

A análise descritiva das variáveis relativas ao sexo, idade, consumo de tabaco e álcool está apresentada na Tabela 1, mostrando que o número total de pacientes do

estudo foi 49 indivíduos. Destes, 28 (57,1%) pacientes fumavam e bebiam concomitantemente.

Mesmo esses pacientes tendo lesões orais, 17 (34,7%) nunca fizeram auto-exame (Tabela 1), enquanto que 23 (46,9%) tinham o hábito de realizar e 9 (18,4%) o faziam esporadicamente. Quanto à localização, de início foi feita uma categorização mais detalhada: 11 lesões em rebordo alveolar, 9 em língua, 5 em mucosa jugal, 4 em mucosa labial, 8 em palato, 6 em assoalho, 3 em região retromolar e 3 pilar amigdaliano. Porém, para facilitar a análise dos dados, os sítios foram categorizados em apenas 2 grupos, tendo 17 (35,4%) lesões situadas na região anterior da boca e 31 (64,6%) em região posterior.

A apresentação clínica mostrou predominância de lesões leucoplásicas - 31 (63,3%), seguida pelas úlceras 16 (32,7%), e apenas 1 (2%) eritroplasia e 1 (2%) leucoeritroplasia, sendo quase todos os 16 casos de úlcera eram CECs (14). Dos outros cinco casos de CEC, quatro apresentaram-se como leucoplasia e um como eritroplasia. Das LPMs de baixo risco apenas um caso tinha aspecto clínico de úlcera, sendo os demais leucoplasias. As LPMs de alto risco também eram predominantemente leucoplasias, sendo observado apenas um caso de lesão ulcerada e um de leucoeritroplasia.

Os grupos foram divididos histologicamente em LPM de baixo risco, com 15 casos (30,6%), LPM de alto risco, com 15 casos (30,6%) e 19 casos (38,8%) de CEC. A correlação entre a MVD e as variáveis individuais, clínicas e histológicas estão apresentadas na Tabela 2, tendo sido revelada associação estatisticamente significativa apenas entre os grupos de LPM de baixo risco com MVD média de 16,5, LPM de alto risco, com 21,9 e de CECs com 29,3 (Figura 3). Para o grupo dos CECs, foi ainda

realizada a análise da presença ou não de metástases cervicais, relacionando com a distribuição das características individuais, com os dados descritos na Tabela 3.

Além disso, para esses mesmos 19 casos de CEC foi feita a correlação entre a presença ou não de metástases e a MVD, subdividindo-a em baixa e alta, onde foram considerados baixos os valores abaixo do ponto de corte (estabelecido pela MVD média = 29,3), e com MVD alta os casos com valores iguais ou superiores à MVD média, como mostra a Tabela 4, a qual não demonstrou ser estatisticamente ( $p = 1,0$ ).

## **Discussão**

Embora seja a neoplasia mais comum na cavidade bucal, o CEC tem sido muito estudado, na tentativa de conhecer melhor a doença e identificar marcadores prognósticos. Neste contexto a avaliação do potencial angiogênico desta neoplasia tem sido amplamente abordada<sup>16</sup>. O presente trabalho, além de propor-se a ser um estudo descritivo dos casos de lesões potencialmente malignas e de CEC da cavidade oral de um Serviço sul brasileiro, objetivou também correlacionar os dados clínico-histopatológicos destas entidades nosológicas com o seu potencial angiogênico, avaliando ainda a relação da angiogênese com a metástase para as amostras de CEC.

Confirmou-se o que a literatura reporta em relação ao sexo e à faixa etária, com maior ocorrência de casos de câncer de boca e lesões potencialmente malignas em homens adultos de meia-idade e idosos<sup>17</sup>.

Apesar de o CEC ser considerado uma doença multifatorial, para a localização intrabucal, os hábitos de tabaco e álcool são os fatores de risco mais importantes, não apenas para o desenvolvimento desta neoplasia, como também interferem no estabelecimento de seu prognóstico<sup>18, 19</sup>. Tais fatores também são responsáveis pelo

aparecimento de leucoplasias e eritroplasias, lesões com potencialidade de evolução para o CEC oral<sup>20</sup>. O presente estudo revelou que apenas 16,3% dos indivíduos com CEC ou LPMs nunca apresentaram experiência com o uso de tabaco e que aproximadamente dois terços bebiam algum tipo de bebida alcoólica (de forma leve ou moderada/pesada), o que vem corroborar com o que vem sendo demonstrado na literatura sobre tais fatores de risco em relação ao tema em questão<sup>21</sup>. Scully e Began<sup>22</sup> verificaram a existência de um risco 20 vezes maior de CEC oral entre fumantes pesados, sendo que o risco aumenta com o número de cigarros consumidos por dia e a duração do hábito. Além disso, estudos indicam que o câncer de cabeça e pescoço em fumantes pode mostrar-se biologicamente mais agressivo do que aqueles encontrados em não fumantes<sup>21</sup>.

Além disso, a concomitância entre paciente que fumavam e bebiam foi de 28 indivíduos, cerca de quase 60% da amostra, sendo os casos de CEC, 84% eram correspondentes a etilistas e fumantes. Tal fato está de acordo com a literatura, pois sabe-se que a exposição simultânea ao álcool e ao fumo é associada a um maior risco de câncer bucal, devido ao efeito sinérgico dessas substâncias no processo da carcinogênese<sup>19,23</sup>.

O exame visual continua sendo o padrão ouro na detecção precoce das alterações epiteliais. Os critérios para suspeita de alguma lesão potencialmente maligna ou CEC incluem mudanças na textura e perda da integridade da superfície, cor (eritroplasia ou leucoeritroplasia), tamanho, desvios de contorno, mobilidade de estruturas intra ou extrabuciais e localização<sup>24,25</sup>. No entanto, apenas 23 pacientes, ou menos de 50% da amostra desse estudo relataram, na entrevista, ter o hábito de realizar o autoexame com frequência, o que nos faz refletir sobre a necessidade de estimular de maneira mais efetiva que os indivíduos possam observar com mais frequência as alterações que

apresentam na cavidade bucal, como uns dos principais meios de prevenir e detectar precocemente o câncer bucal e suas lesões precursoras.

É evidente que um sistema circulatório eficiente é fundamental para as atividades de qualquer organismo, visando assegurar a oferta de oxigênio e de nutrientes para auxiliar o processo de excreção. A angiogênese está envolvida em uma série de condições patológicas nas quais os processos de inflamação e de isquemia estão presentes<sup>26</sup>. O conceito de que o crescimento tumoral e o processo de formação de metástases sejam dependentes do desenvolvimento de novos vasos sanguíneos foi consolidado por Folkman, no início da década de 70, e inúmeros estudos a partir dessa data têm confirmado suas hipóteses, demonstrado a importância do processo de angiogênese no desenvolvimento dos tumores<sup>27</sup>.

Nem todo tumor se mostra angiogênico desde o seu início, e a evolução do processo de neoformação vascular reflete a habilidade do tumor e das células inflamatórias em secretar fatores angiogênicos em seu microambiente<sup>29</sup>. Recentes estudos têm demonstrado que o potencial angiogênico não é uma característica exclusiva das neoplasias e que os fatores angiogênicos podem expressar-se em lesões pré-malignas e não invasivas<sup>29, 30</sup>, persistindo durante a progressão da carcinogênese. Parece que o desenvolvimento da angiogênese no contexto das lesões potencialmente malignas é órgão-específica<sup>31, 32</sup>.

A avaliação da densidade microvascular (MVD) tem sido utilizada como uma forma importante de mensurar a atividade angiogênica de uma condição<sup>33</sup>. Quando foi avaliada a associação entre MVD e as variáveis individuais, clínicas e histopatológicas dos indivíduos com LPMs de baixo e alto risco, bem como com o CEC invasivo, foi observado maior potencial angiogênico nas neoplasias malignas, comparado às demais lesões. Estudos prévios têm demonstrado que a vascularidade aumenta de forma

gradativa quando a mucosa oral normal evolui para alterações displásicas até o desenvolvimento de carcinomas<sup>34,35,36,37,38</sup>. Shivamallappa<sup>38</sup> também investigaram a angiogênese em LPMs e CEC. Embora não tenham mostrado nenhuma diferença na vascularidade quando compararam mucosa normal e leucoplasia, estes autores verificaram diferença estatisticamente significativa entre mucosa oral normal e CEC, bem como entre leucoplasia e CEC. Apesar de terem trabalhado com amostras de amplitude semelhante às do presente estudo, estes autores não classificaram histopatologicamente, como fizemos, as LPMs sob a forma clínica de leucoplasia em lesões de baixo e alto risco de transformação maligna, razão que os mesmos apontam como uma limitação de sua análise e também responsável por dificultar a modificação do fenótipo angiogênico nos estágios pré-cancerosos. Esta é uma importante vantagem do presente estudo em relação ao de Shivamallappa<sup>38</sup>, o que nos permitiu melhor compreender e avaliar a progressão da doença e a sua relação com a MVD.

Além disso, a avaliação da angiogênese em lesões potencialmente malignas proporciona a possibilidade de interferir precocemente no desenvolvimento dos tumores, bloqueando o gatilho angiogênico antes que haja a invasão neoplásica<sup>29,38,39,36,37</sup>. Estudos futuros que esclareçam os mecanismos moleculares que regulem a angiogênese em lesões potencialmente malignas são necessários, para que as terapias anti-angiogênicas possam ser aplicadas também a estas condições.

A maioria dos estudos que discutem a relação entre MVD com câncer e LPM's, está de acordo que o aumento da MVD está diretamente relacionado com a progressão da doença, provavelmente porque o principal fator envolvido na angiogênese, o VEGF, demonstra uma associação positiva com o estágio clínico mais avançado de CEC oral e geralmente esses pacientes estão expostos aos principais fatores de risco envolvidos, como tabaco e álcool<sup>40</sup>. No entanto, os resultados do presente estudo não mostraram

diferença estatística significativa da MVD entre pacientes fumantes e não fumantes e nem mesmo entre pacientes que bebiam e que não bebiam o que vai ao encontro de estudos como os de Faustino<sup>40</sup> e Kyzas<sup>41</sup>, os quais não encontraram correlação entre a imunorreatividade desse marcador angiogênico com o tabagismo e o consumo de álcool em pacientes com carcinoma epidermoide de boca.

Entretanto, em relação ao diagnóstico histológico os resultados desta pesquisa mostraram diferença estatisticamente significativa entre a MVD dos grupos das displasias de baixo risco de malignização, de alto risco e dos carcinomas, mostrando um aumento desta média, a medida que progride a doença, corroborando com estudos importantes com os de Nijsten<sup>32</sup> que chegaram a resultados semelhantes.

Além disso, o CEC oral tem mostrado uma forte relação entre a MVD elevada e a presença metástase<sup>44</sup>. Os tumores bem vascularizados são indiscutivelmente mais propensos a realizar metástase, devido ao acesso facilitado ao transporte intravascular. Por isso, como uma medida da atividade angiogênica, a maioria dos estudos conta o número de microvasos em secções de tecidos, expresso em MVD. Esta técnica foi designada como fator prognóstico para o comportamento clínico de tumores<sup>42</sup>.

Entretanto é improvável que um único recurso, como o potencial angiogênico, seja determinante da ocorrência de metástase. A angiogênese provavelmente facilita o acontecimento desse fenômeno, mas existem outras vias, como a linfática, que atuam simultaneamente e que são tão importantes ou mais para o surgimento de lesões a distância<sup>42</sup>.

O presente estudo, e a maioria dos que estamos discutindo, os quais procuram identificar a MVD como fator prognóstico, possuem limitações, principalmente devido à metodologia que pode variar em vários aspectos, como por exemplo: a seleção de anticorpos, tipo de fixador utilizado, os métodos de contagem de vasos, o cálculo da

densidade de vasos e a variabilidade do observador. No entanto, este estudo foi o primeiro a avaliar separadamente as LPM's, em dois grupos, classificando-as em lesões de baixo e alto risco de malignização, além de cruzar esses dados com informações clínicas importantes, como a exposição ao álcool e ao tabaco.

Por isso, mesmo com um número amostral limitado, o que em alguns aspectos dificultou a análise dos dados, essa pesquisa possui grande valor científico, por possuir uma metodologia criteriosa e abrangente além, de ter atingido resultados importantes os quais concordam com os principais estudos que abordaram esse tema.

### **Conclusões**

Considerando-se as limitações deste estudo, foi possível concluir que indivíduos do sexo masculino, adultos com idade mais avançada, fumantes e consumidores de bebidas alcoólicas estiveram associados há uma maior propensão de ocorrências de LPM e CEC. Além disso, o potencial angiogênico, representado pela MVD, mostra significativo aumento com a progressão das LPMs em malignas, sendo um marcador importante na estimativa do prognóstico dessas lesões.

### **Referências**

- 1- INCA-INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Disponível em: <http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>. Acesso em: 13 dez. 2013.
- 2- Neville BW et al. Patologia oral e maxilofacial. 3.ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. 972 p.

- 3- Zini A, Czerninski R, Sgan-Cohen HD. Oral cancer over four decades: epidemiology, trends, histology, and survival by anatomical sites. *Journal of Oral Pathology and Medicine* 2010; 39(4): 299-305.
- 4- Warnakulasuriya S, Reibel J, Bouquot J, Dabelsteen E. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. *Journal of Oral Pathology and Medicine* 2008; 37(3): 127-33.
- 5- Puigpinós R, Borrell C, Antunes JL, Azlor E, Pasarin MI, Serral G, et al. Trends in socioeconomic inequalities in cancer mortality in Barcelona: 1992-2003. *BMC Public Health* 2009; 9:35.
- 6- Reibel J. Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. *Critical Reviews in Oral Biology and Medicine* 2003; 14(1): 47-62.
- 7- Tommasi AF. *Diagnóstico em patologia bucal*. 2.ed. Porto Alegre: Pancast editorial, 1998. 664 p.
- 8- Kuroda Y, Nakao H, Ikemura K, Katoh T. Association between the TP53 codon72 polymorphism and oral cancer risk and prognosis. *Oral Oncology* 2007; 43(10): 1043-8.
- 9- Wünsch-Filho V, Mirra AP, López RVM, Antunes LF. Tabagismo e câncer no Brasil: evidências e perspectivas. *Rev Bras Epidemiol* 2010; 13:175-87.
- 10- Biazevic MG, Toporcov TN, Antunes JL, Rotundo ID, Brasileiro RS, de Carvalho MB, et al. Cumulative coffee consumption and reduced risk of oral and oropharyngeal cancer. *Nutrition and Cancer* 2011; 63(3): 350-6.

- 11-Folkman J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. *N Engl J Med* 1971; 285(21): 1182-6.
- 12-Shweiki D, Itin A, Soffer D, Keshet E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. *Nature* 1992; 359(6398): 843-5.
- 13-Maeda K, Chung YS, Takatsuka S, Ogawa Y, Onoda N, Sawada T, et al. Tumour angiogenesis and tumour cell proliferation as prognostic indicators in gastric carcinoma. *British Journal of Cancer* 1995; 72: 319-23.
- 14-Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Colpaert C, Marson LP, Gion M, et al. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours. *European Journal of Cancer* 2002; 38: 1564–79.
- 15-Macchiarini P, Fontanini G, Hardin MJ, Squartini F, Angeletti CA. Relation of neovascularisation to metastasis of non-small-cell lung cancer. *Lancet* 1992; 340(8812):145-6.
- 16-Gandolfo M, Keszler A, Lanfranchi H, Itoiz ME. Increased subepithelial vascularization and VEGF expression reveal potentially malignant changes in human oral mucosa lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011;111:486-93.
- 17-Gangane N, Chawla S, Anshu, Gupta SS, Sharma SM. Reassessment of risk factors for oral cancer. *Asian Pacific Journal of Cancer Prevention* 2007; 8(2): 243-8
- 18-Bundgaard T, Bentzen SM, Wildt J. The prognostic effect of tobacco and alcohol consumption in intra-oral squamous cell carcinoma. *Eur J Cancer B Oral Oncol* 1994; 30(5): 323-8.

- 19- Scheidt JH, Yurgel LS, Romanini J, Cherubini K, Figueiredo MA, Salum FG. Characteristics of oral squamous cell carcinoma in users or non users of tobacco and alcohol. *Rev Odonto Cienc* 2012; 27(1):69-73.
- 20-Li L, Psoter JW, Buxó CJ, Elias A, Cuádrado L. Smoking and drinking in relation to oral potentially malignant disorders in Puerto Rico: a case-control study. *BMC Cancer* 2011; 11:324.
- 21-Genden EM, Ferlito A, Silver CE. Contemporary management of cancer of the oral cavity. *Eur Arch Otorhinolaryngol* 2010; 267:1001–17.
- 22-Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. *Oral Diseases* 2009; 15(6):388-99.
- 23-Kruse AL, Bredell M, Grätz KW. Oral squamous cell carcinoma in non-smoking and non-drinking patients. *Head & Neck Oncology* 2010; 2:24.
- 24-Messadi DV, Wilder-Smith P, Wolinsky L. Improving oral cancer survival: the role of dental providers. *J Calif Dent Assoc* 2009; 37(11):789–798.
- 25-Epstein JB, Gorsky M, Cabay RJ, Day T, Gonsalves W. Screening for and diagnosis of oral premalignant lesions and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Can Fam Physician* 2008; 54: 870-5.
- 26-Carmeliet P, Jain RK. Angiogenesis in cancer and other diseases. *Nature* 2000; 407(6801): 249-57.

- 27-Zorgetto V, Silveira G, Oliveira-Costa JP, Soave D, Soares F, Ribeiro-Silva A. The relationship between lymphatic vascular density and vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) expression with clinical-pathological features and survival in pancreatic adenocarcinomas. *Diagnostic Pathology* 2013, 8: 170.
- 28-Raica M, Cimpean AM, Ribatti D. Angiogenesis in pre-malignant conditions. *European Journal of Cancer* 2009; 45: 1924–34.
- 29-Folkman J, Watson K, Ingber D, Hanahan D. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. *Nature* 1989; 339:58–61.
- 30-Sauter ER, Nesbit M, Watson JC, Klein-Szanto AJP, Herlyn M. Vascular endothelial growth factor expression is a marker of tumor invasion and metastasis in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Clin Cancer Res* 1999; 5:775–82.
- 31-Laitakari J, Naäyhä V, Stenbaäck F. Size, shape, structure, and direction of angiogenesis in laryngeal tumour development. *J Clin Pathol* 2004; 57:394–401.
- 32-Nijsten T, Colpaert CG, Vermeulen PB, Harris AL, Van Marck E, Lambert J. Cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis in squamous cell carcinoma of the skin and its precursors: a paired immunohistochemical study of 35 cases. *Br J Dermatol* 2004; 151: 837–45.
- 33-Vermeulen PB, Gasparini G, Fox SB, Colpaert C, Marson LP, Gion M, et al. Second international consensus on the methodology and criteria

- of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours. Eur J Cancer 2002; 38: 1564–79.
- 34-Jin Y, Tipoe GL, White FH, Yang L. A quantitative investigation of immunocytochemically stained blood vessels in normal, benign, premalignant and malignant human oral cheek epithelium. Virchows Arch 1995; 427: 145–51.
- 35-Macluskey M, Chandrachud LM, Pazouki S. Apoptosis, proliferation, and angiogenesis in oral tissues. Possible relevance to tumour progression. J Pathol 2000; 191: 368–75.
- 36-Carlile J, Harada K, Baillie R. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in oral tissues: possible relevance to angiogenesis, tumour progression and field cancerisation. J Oral Pathol Med 2001; 30: 449–57.
- 37-Shieh YS, Lee HS, Shiah SG. Role of angiogenic and non-angiogenic mechanisms in oral squamous cell carcinoma: correlation with histologic differentiation and tumor progression. J Oral Pathol Med 2004; 33: 601–6.
- 38-Shivamallappa SM, Venkatraman NT, Shreedhar B, Mohanty L, Shenoy S. Role of angiogenesis in oral squamous cell carcinoma development and metastasis: an immunohistochemical study. Int J Oral Sci 2011; 3:216-24.
- 39-Goddard JC, Sutton CD, Peter N, Kockelbergh RC, O'Byrne KJ; A computer image analysis system for microvessel density measurement in solid tumours. Angiogenesis 2002; 5: 15–20.

- 40-Faustino SE, Oliveira DT, Nonogaki S, Landman G, Carvalho AL, Kowalski LP. Expression of vascular endothelial growth factor-C does not predict occult lymph-node metastasis in early oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2008;37:372-8.
- 41-Kyzas PA, Geleff S, Batistatou A, Agnantis NJ, Stefanou D. Evidence for lymphangiogenesis and its prognostic implications in head and neck squamous cell carcinoma. *J Pathol* 2005;206:170-7.
- 42-Hannen EJM, Riediger D;The quantification of angiogenesis in relation to metastasis in oral cancer:a review.*Int. J. Oral Maxillofac. Surg.* 2004; 33: 2–7.

Tabela 1. Análise descritiva das variáveis de interesse dos participantes do estudo.

Variável	N	%
Sexo		
Feminino	19	38.8
Masculino	30	61.2
Idade (anos)		
Até 60	33	67.4
Mais de 60	16	32.7
Consumo de Álcool		
Não bebe	16	32.7
Leve	15	30.6
Moderado ou severo	18	36.7
Consumo de tabaco		
Não fumante	8	16.3
Ex-fumante	7	14.3
Até 20 cigarros/dia	19	38.8
Mais de 20 cigarros/dia	15	30.6
Auto-exame bucal		
Não	17	34.7
Sim	23	46.9
Às vezes	9	18.4
Diagnóstico Histológico		
Baixo Risco	15	30.6
Alto Risco	15	30.6
Carcinoma Espinocelular	19	38.8
Localização		
Região anterior boca/ palato duro	17	35.4
Região posterior boca/ palato mole	31	64.6
Apresentação Clínica		
Úlcera	16	32.7
Leucoplasia	31	63.3
Leucoeritroplasia	1	2.0
Eritroplasia	1	2.0

Tabela 2. Associação entre microdensidade vascular e as variáveis individuais (demográficas, consumo de tabaco e álcool e realização de auto-exame), clínicas e histológicas. Análise de variância.

Variável	MVD média (dp)	P
Sexo		0.283
Feminino	20.6 (10.3)	
Masculino	24.7 (14.1)	
Idade (anos)		0.462
Até 60	22.2 (12.6)	
Mais de 60	25.1 (13.3)	
Consumo de Álcool		0.817
Não bebe	21.6 (12.7)	
Leve	23.1 (12.9)	
Moderado ou severo	24.5 (13.3)	
Consumo de tabaco		0.761
Não fumante	27.0 (16.2)	
Ex-fumante	22.4 (10.3)	
Até 20 cigarros/dia	21.2 (10.0)	
Mais de 20 cigarros/dia	23.8 (15.6)	
Auto-exame bucal		0.830
Não	21.8 (10.4)	
Sim	23.3 (15.2)	
Às vezes	25.1 (10.9)	
Diagnóstico Histológico		0.011
Baixo Risco	16.5 (10.2)	
Alto Risco	21.9 (10.5)	
Carcinoma Espinocelular	29.3 (13.9)	
Localização		0.288
região anterior boca/ palato duro	25.7 (15.1)	
região posterior boca/ palato mole	21.5 (11.5)	
Apresentação Clínica		0.087
Úlcera	27.6 (12.8)	
Leuco/Eritroplasia	20.9 (12.4)	

Tabela 3. Distribuição das características individuais (demográficas, consumo de tabaco e álcool e realização de auto-exame), clínicas, e histológicas dos pacientes apresentando CEC, segundo a presença de metástase (n=19).

Variável	Sem metástase	Com metástase	P
Sexo			1.000
Feminino	0 (0.0)	2 (100.0)	
Masculino	4 (23.5)	13 (76.5)	
Idade (anos)			1.000
Até 60	3 (21.4)	11 (78.6)	
Mais de 60	1 (20.0)	4 (80.0)	
Consumo de Alcool			0.577
Não bebe	1 (50.0)	1 (50.0)	
Leve	2 (22.2)	7 (77.8)	
Moderado ou severo	1 (12.5)	7 (87.5)	
Consumo de tabaco			0.052
Não fumante	0 (0.0)	1 (100.0)	
Ex-fumante	0 (0.0)	4 (100.0)	
Até 20 cigarros/dia	0 (0.0)	7 (100.0)	
Mais de 20 cigarros/dia	4 (57.1)	3 (42.9)	
Auto-exame bucal			0.805
Não	2 (33.3)	4 (66.7)	
Sim	1 (16.7)	5 (83.3)	
Às vezes	1 (14.3)	6 (85.7)	
Localização			0.272
região anterior boca/ palato duro	2 (40.0)	3 (60.0)	
região posterior boca/ palato mole	2 (14.3)	12 (85.7)	
Apresentação Clínica			1.000
Úlcera	3 (21.4)	11 (78.6)	
Leucoplasia	1 (25.0)	3 (75.0)	
Eritroplasia	0 (0.0)	1 (100.0)	

Tabela 4. Associação entre a presença de metástase e a microdensidade vascular nos casos de CEC estudados (n=19). Teste Exato de Fisher.

MVD (CEC)	Metástase		
	Sem Metástase	Com Metástase	Total
MVD baixa	3 (25%)	9 (75%)	12 (100%)
MVD alta	1 (14,29%)	6 (85,71%)	7 (100%)
Total	4 (21,05)	15 (78,95%)	19 (100%)

p = 1,0

Figura 1: Área de *Hot Spot* de imagem capturada de um caso de LPM – Alto risco. H & E/200x.

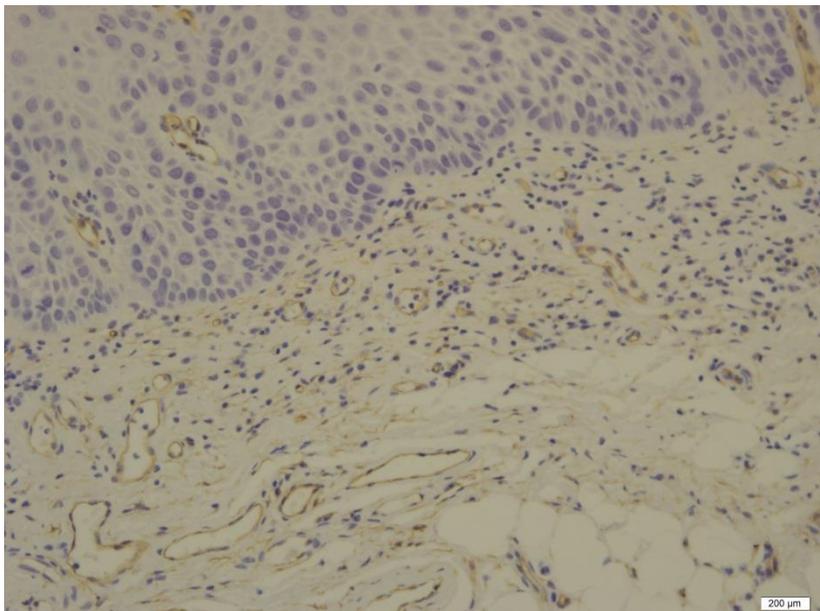


Figura 2: Contagem manual dos microvasos em uma amostra de LPM Displasia de Alto Risco, com o auxílio do Software Image-Pro Plus. H & E/200x.

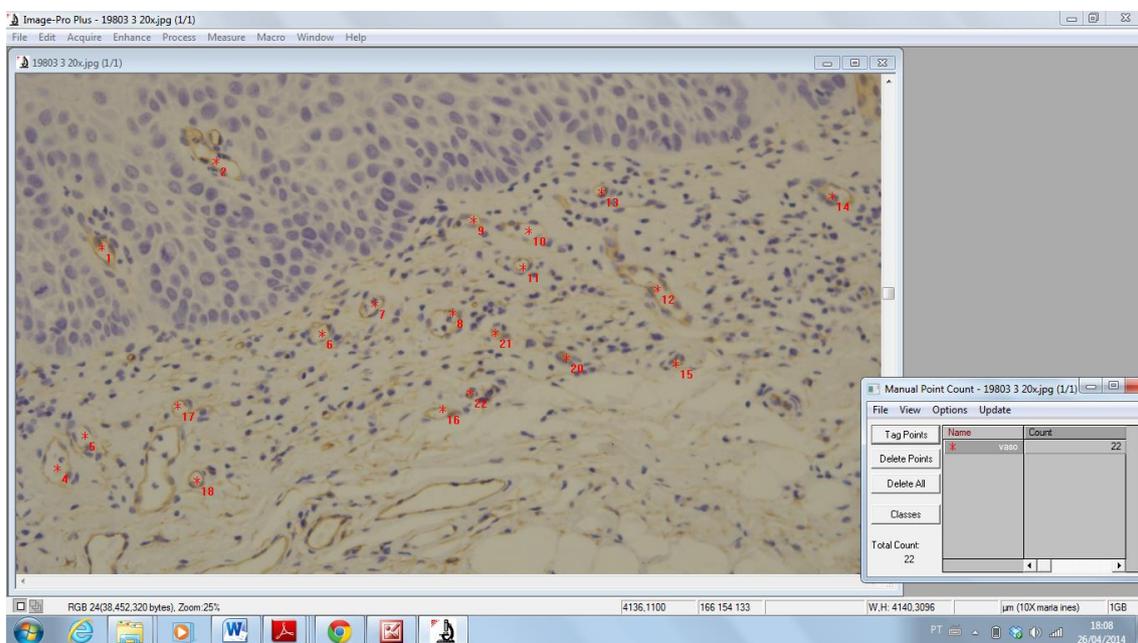
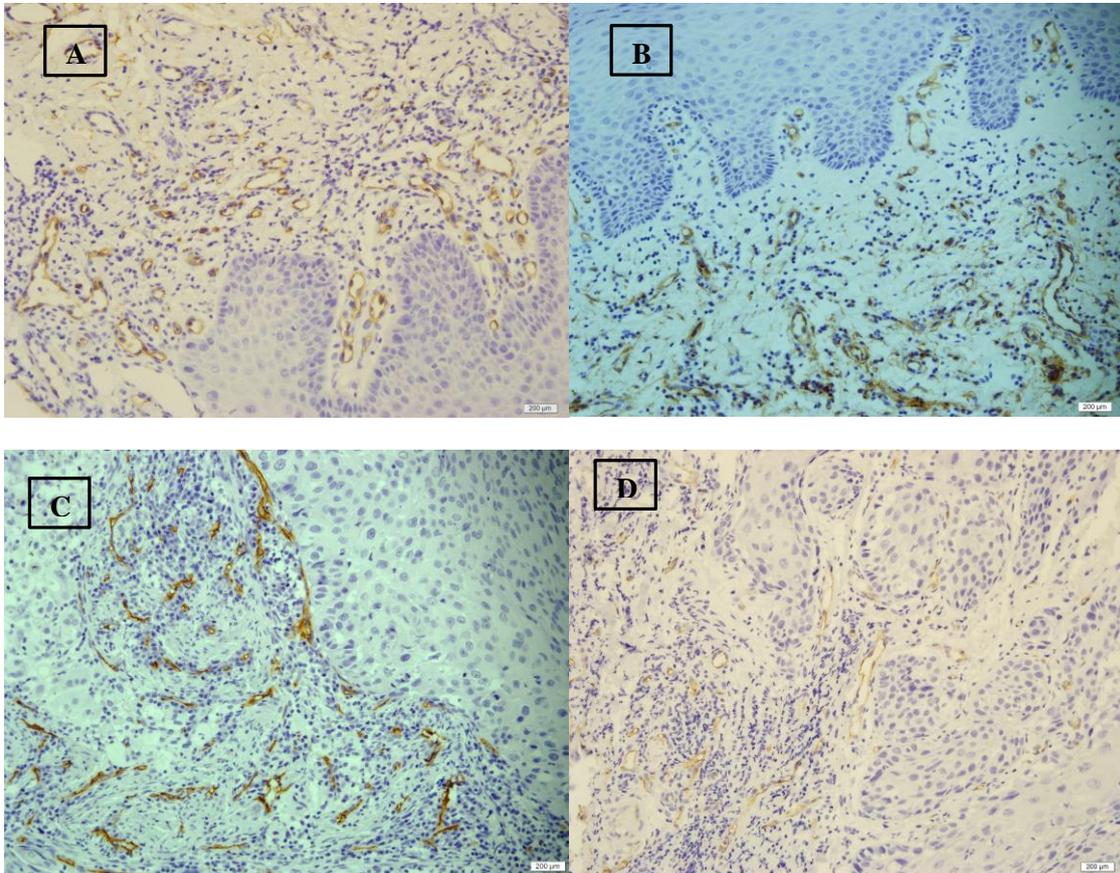


Figura 3 (A-D) – Imunoistoquímica para antígeno CD34, sendo utilizada para identificar os vasos sanguíneos nas LPMs de baixo risco (A), alto risco (B) e no CEC, em localização peritumoral (C) e intratumoral (D) na realização da MVD. Kit Easylink One<sup>®</sup> (Erviagas<sup>®</sup> São Paulo, SP, Brasil) e anticorpo primário anti-CD 34 (DAKO, California USA), 200x.



## **5 Considerações Finais**

Considerando-se as limitações deste estudo, foi possível concluir que indivíduos do sexo masculino, adultos com idade mais avançada, fumantes e consumidores de bebidas alcoólicas estiveram associados há uma maior propensão de ocorrências de LPM e CEC. Além disso, o potencial angiogênico, representado pela MVD, mostra significativo aumento com a progressão das LPMs em malignas, sendo um marcador importante na estimativa do prognóstico dessas lesões.

## 6 Referências

AKBULUT, H.; ALTUNTAS, F.; AKBULUT, K.G.; OZTURK, G.; CINDORUK, M.; UNAL, E.; ICLI, F. Prognostic role of serum vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor and nitric oxide in patients with colorectal carcinoma. **Cytokine**, v. 20, n. 4, p. 184-190, 2002.

ANTONIADES, D.Z.; STYANIDIS, K.; PAPANAYOTOU, P.; TRIGONIDIS, G. Squamous cell carcinoma of the lips in a northern Greek population. Evaluation of prognostic factors on 5-year survival rate - I **European Journal of Cancer Part B: Oral Oncology**, v. 31, n. 5, p. 333-339, 1995.

ANNEROTH, G.; HANSEN, L.S.; SILVERMAN, S. JR. Malignancy grading in oral squamous cell carcinoma. I. Squamous cell carcinoma of the tongue and floor of mouth: histologic grading in the clinical evaluation. **Journal Oral Pathology**, v. 15, n. 3, p. 162-168, 1986.

ASAKAGE, T.; YOKOSE, T.; MUKAI, K.; TSUGANE, S.; TSUBONO, Y.; ASAI, M. Tumor thickness predicts cervical metastasis in patients with stage I/II carcinoma of the tongue. **Cancer**, v. 82, n. 8, p. 1443-1448, 1998.

BALARAM, P.; SRIDHAR, H.; RAJKUMAR, T.; VACCARELLA, S.; HERRERO, R.; NANDAKUMAR, A. Oral cancer in southern India: the influence of smoking, drinking, paan-chewing and oral hygiene. **International Journal Cancer**, v. 98, n. 3, p. 440-445, 2002.

BALARAM, P.; NALINAKUMARI, K.R.; ABRAHAM, E.; BALAN, A.; HAREENDRAN, N.K.; BERNARD, H.U. Human papillomaviruses in 91 oral cancers from Indian betel quid chewers--high prevalence and multiplicity of infections. **Int Journal Cancer**, v. 61, n. 4, p. 450-454, 1995.

BUNDGAARD, T.; BENTZEN, S. M. ; WILDT, J. The prognostic effect of tobacco and alcohol consumption in intra-oral squamous cell carcinoma. **European Journal of Cancer Part B: Oral Oncology**, v.30B, n.5, p.323-8, 1994.

BIAZEVIC, M. G.; TOPORCOV, T. N.; ANTUNES, J. L.; ROTUNDO, L. D.; RASILEIRO, R. S.; DE CARVALHO, M. B.; DE GOIS FILHO, J. F.; OWALSKI, L. P. Cumulative coffee consumption and reduced risk of oral and oropharyngeal cancer. **Nutrition and Cancer**, v.63, n.3, p.350-6, 2011.

BOMKEN, S; FISER, K; HEIDENREICH, O; VORMOOR, J. Understanding the cancer stem cell. **British Journal of Cancer**, v. 103, n. 4, p. 439-445, 2010.

BOYLE, P.; MACFARLANE, G.J.; ZHENG, T.; MCGINN, R.; MAISONNEUVE, P.; LAVECCHIA, C. Recent advances in the etiology and epidemiology of head and neck cancer. **Oncology**. v. 2, n. 3, p.539-545, 1990.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer-INCA. Carcinoma epidermóide da cabeça e pescoço. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 47, n. 4, p. 361-376, 2001.

BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer-INCA. Prevenção do câncer de boca. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 49, n. 4, p. 206, 2003.

BRAAKHUIS, B.J.; TABOR, M.P.; LEEMANS, C.R.; VAN DER WAAL, I.; SNOW, G.B.; BRAKENHOFF, R.H. Second primary tumors and field cancerization in oral and oropharyngeal cancer: molecular techniques provide new insights and definitions. **Head and Neck**, v. 24, n. 2, p. 198-206, 2002.

BROLL, R.; ERDMANN, H.; DUCHROW, M.; OEVERMANN, E.; SCHWANDNER, O.; MARKERT, U.; BRUCH, H.P.; WINDHOVEL, U. Vascular endothelial growth factor (VEGF)—a valuable serum tumour marker in patients with colorectal cancer? **European Journal Surgery Oncology**, v. 27, n. 1, p. 37-42, 2001.

BRUNETTI, RF; MONTENEGRO, FLB. Odontogeriatrics: Noções de interesse clínico. São Paulo: **Artes Médicas**, 2002.

BUNONE, G.; VIGNERI, P.; MARIANI, L.; BUTÓ, S.; COLLINI, P.; PILOTTI, S.; Expression of angiogenesis stimulators and inhibitors in human thyroid tumors and correlation with clinical pathological features. **American Journal Pathology**, v.155, n. 6, p. 1967-1976, 1999.

CARMELIET, P.; JAIN, R.K. Angiogenesis in cancer and other diseases. **Nature**, v.407, n.6801, p.249-57, 2000.

CARVALHO, A.L.; MAGRIN, J.; KOWALSKI, L.P. Sites of recurrence in oral and oropharyngeal cancers according to the treatment approach. **Oral Disease**, v. 9, n. 3, p. 112-118, 2003.

CARLILE, J.; HARADA, K.; BAILLIE, R.; MACCLUSKEY, M.; CHISHOLM, D.M.; OGDEN, G.R.; SCHOR, S.L.; SCHORAM. Vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in oral tissues: possible relevance to angiogenesis, tumour progression and field cancerisation. **Journal Oral Pathology Medicine**, v. 30, p. 449–457, 2001.

CASIGLIA, J.; WOO, S.B. A comprehensive review of oral cancer. **General Dentistry**, v. 49, n. 1, p. 72-82, 2001.

COLLINS, A.T.; BERRY, P.A.; HYDE, C. Prospective identification of tumorigenic prostate cancer stem cells. **Cancer Research**, v. 65, n. 23, p. 1094-1095, 2005.

COSTA ADE, L.; PEREIRA, J.C.; NUNES, A.A.; ARRUDA, M.D.E L. Correlation between TNM classification, histological grading and anatomical location in oral squamous cell carcinoma. **Pesquisa Odontologica Brasileira**, v. 16, n. 3, p. 216-220, 2002.

DAHLSTROM, K.R.; ADLER-STORTHZ, K.; ETZEL, C.J.; LIU, Z.; DILLON, L.; EL-NAGGAR, A.K. Human papillomavirus type 16 infection and squamous cell carcinoma of the head and neck in never-smokers: a matched pair analysis. **Clinical Cancer Research**, v. 9, n. 7, p. 2620-2626, 2003.

D'CRUZ AK, MULHERKAR R. Optimizing treatment in head and neck cancers - are molecular markers the answer? **Indian Journal Medicine Research**, v. 122, n. 3, p. 196-198, 2005.

DENHART, B.C.; GUIDI, A.J.; TOGNAZZI, K.; DVORAK, H.F.; BROWN, L.F. Vascular permeability factor/vascular endothelial growth factor and its receptors in oral and laryngeal squamous cell carcinoma and dysplasia. **Laboratory Investigation**, v. 77, p. 659–664, 1997.

EPSTEIN, J.B.; GORSKY, M.; CABAY, R.J.; DAY, T.; GONSALVES, W. Screening for and diagnosis of oral premalignant lesions and oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Farmacology Physician**, v.54, p.870-5, 2008.

FÁBIÁN, A.; BAROK, M.; VEREB, G.; SZOLLO, J. Die Hard: Are Cancer Stem Cells the Bruce Willises of Tumor Biology? **Cytometry**, v.75, p. 67-74, 2009.

FANG, D.; NGUYEN, T.K.; LEISHEAR, K.; A tumorigenic subpopulation with stem cell properties in melanomas. **Cancer Research**, v. 65, n. 20, p. 9328-9337, 2005.

FERNANDES, J.P.; BRANDÃO, V.S.G.; LIMA, A.A.S. Prevalência de lesões cancerizáveis bucais em indivíduos portadores de alcoolismo. **Revista Brasileira de Cancerologia**, v. 54, n. 3, p. 239-244, 2008.

FOLKMAN F. Anti-angiogenesis: new concept for therapy of solid tumors. **American Surgery**, v.175, p. 409-416, 1972.

FOLKMAN J. What is the evidence that tumors are angiogenesis dependent? **Journal Cancer Research**, v. 82, p. 4-6, 1990.

FOLKMAN J. Seminars in medicine of the Beth Israel Hospital, Boston. Clinical applications of research on angiogenesis. **National England Journal Medicine**, v. 333, p. 1757-1763, 1995.

FOLKMAN, J. Tumor angiogenesis: therapeutic implications. **National England Journal Medicine**, v.285, n.21, p.1182-6, 1971.

FOLKMAN, J.; WATSON, K.; INGBER, D.; HANAHAN, D. Induction of angiogenesis during the transition from hyperplasia to neoplasia. **Nature**, v.339, p.58-61, 1989

FORASTIERE, A.; KOCH, W.; TROTTI, A.; SIDRANSKY, D. Head and neck cancer. **National England Journal Medicine**, v. 345, n. 26, p. 1890-1900, 2001.

GANGANE, N.; CHAWLA, S.; AUSHU; GUPTA, S.S.; SHARMA, S.M. Reassessment of Risk Factors for Oral Cancer. **Asian Pacific journal of cancer prevention**, v.8, n. 2, p. 243-248, 2007.

GANDOLFO, M.; KESZLER, A.; LANFRANCHI, H.; ITOIZ, M.E. Increased subepithelial vascularization and VEGF expression reveal potentially malignant changes in human oral mucosa lesions. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontology**, v.111, p.486-93, 2011.

GENDEN, E.M.; FERLITO, A.; SILVER, C.E. Contemporary management of cancer of the oral cavity. **European Otorhinolaryngol**, v.267, p.1001-17, 2010.

GERVÁSIO, O.L.; DUTRA, R.A.; TARTAGLIA, S.M.; VASCONCELLOS, W.A.; BARBOSA, A.A.; AGUIAR, M.C. Oral squamous cell carcinoma: a retrospective study of 740 cases in a Brazilian population. **Brazilian Dentistry Journal**, v. 12, n. 1, p. 57-61, 2001.

HICKS, W.L.; NORTH, J.H.; LOREE, T.R.; MAAMOUN, S.; MULLINS, A.; ORNER, J.B. Surgery as a single modality therapy for squamous cell carcinoma of the tongue. **American Journal Otolaryngology**, v. 24, n. 8, p. 24-28, 1998.

HICKLIN, D.J.; ELLIS, L.M. Role of the vascular endothelial growth factor pathway in tumor growth and angiogenesis. **Journal Clinical Oncology**, v. 23, p.1011-1027, 2005.

HIRATSUKA, H.; MIYAKAWA, A.; NAKAMORI, K.; KIDO, Y.; SUNAKAWA, H.; KOHAMA, G. Multivariate analysis of occult lymph node metastasis as a prognostic indicator for patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity. **Cancer**, v. 80, n. 3, p. 351-356, 1997.

INCA - INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER. Disponível em: <<http://www2.inca.gov.br/wps/wcm/connect/inca/portal/home>>. Acesso em: 13 dez. 2013.

JIN, Y.; TIPOE, G.L.; WHITE, F.H.; YANG, L. A quantitative investigation of immunocytochemically stained blood vessels in normal, benign, premalignant and malignant human oral cheek epithelium. **Virchows Research**, v.427, p.145-51, 1995.

JEFFERIES, S.; FOULKES, W.D. Genetic mechanisms in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Oral Oncology**, v. 37, n. 2, p. 115-26, 2001.

KOWALSKI, I.S.G.; SOUZA, C.P. Social representations of relatives and patients with oral and oropharyngeal squamous carcinoma on the prevention and diagnosis of cancer. **Acta Oncology Brazilian**, v. 21, n. 1, p. 206-10, 2001.

KRUSE, A.L.; BREDELL, M.; GRÄTZ, K.W. Oral squamous cell carcinoma in non-smoking and non-drinking patients. **Head & Neck Oncology**, v.2, p.24, 2010.

LAITAKARI, J.; NAYHA, V.; STENBACK, F. Size, shape, structure, and direction of angiogenesis in laryngeal tumour development. **Journal Clinical Pathology**, v.57, p.394-401, 2004.

LI, C.S.; SHINTANI, N.; TERAOKA, S.K.; KLOSECK, T.; ISHIKAWA, K.; NAKASHIRO, H.; HAMAKAWA. Microvessel density and expression of vascular endothelial growth factor, basic fibroblast growth factor, and platelet-derived endothelial growth factor in oral squamous cell carcinoma. **International Journal Oral Maxillofacial Surgery**, v. 34, p. 559–565, 2005.

LI, L.; PSOTER, J.W.; BUXÓ, C.J.; ELIAS, A.; CUÁDRADO, L. Smoking and drinking in relation to oral potentially malignant disorders in Puerto Rico: a case-control study. **BMC Cancer**, v.11, p.324, 2011.

LI, C.; HEIDT, D.G.; DALERBA, P. Identification of pancreatic cancer stem cells. **Cancer Research**, v. 67, n. 3, p. 1030-1037, 2007.

LYDIATT, D.D.; ROBBINS, K.T.; BYERS, R.M.; WOLF, P.F. Treatment of stage I and II oral tongue cancer. **Head Neck**, v. 15, n. 4, p. 308-312, 1993.

LUMERMAN, H.; FREEDMAN, P.; KERPEL, S. Oral epithelial dysplasia and the development of invasive squamous cell carcinoma. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology and Endodontology**, v. 79, n. 3, p.321-329, 1995.

MA, S.; CHAN, K.W.; HU L. Identification and characterization of tumorigenic liver cancer stem / progenitor cells. **Gastroenterology**, v. 132, p. 2542–56, 2007.

MAEDA, K.; CHUNG, Y.S.; TAKATSUKA, S.; OGAWA, Y.; ONODA, N.; SAWADA, T.; KATO, Y.; NITTA, A.; ARIMOTO, Y.; KONDO, Y.; et al. Tumour angiogenesis and tumour cell proliferation as prognostic indicators in gastric carcinoma. **British Journal of Cancer**, v.72, p.319-23, 1995.

MACCHIARINI, P.; FONTANINI, G.; HARDIN, M.J.; SQUARTINI, F.; ANGELETTI, C.A. Relation of neovascularisation to metastasis of non-small-cell lung cancer. **Lancet**, v.340, n.8812, p.145-6, 1992

MACFARLANE, G.J.; MACFARLANE, T.V.; LOWENFELS, A.B. The influence of alcohol consumption on worldwide trends in mortality from upper aerodigestive tract cancers in men. **Journal Epidemiol Community Health**, v. 50, n. 6, p. 636-639, 1996.

MACLUSKEY, M.; CHANDRACHUD, L.M.; PAZOUKI, S. Apoptosis, proliferation, and angiogenesis in oral tissues. Possible relevance to tumour progression. **Journal Pathology**, v.191, p.368-75, 2000

MANASH, K.P.; MUKHOPADHYAY, A.K. Tyrosine kinase: Role and significance in Cancer. **International Journal Medicine**, v. 1, p. 101-115, 2004.

MANSOUR, O.I.; SNYDERMAN, C.H.; D'AMICO, F. Association between tobacco use and metastatic neck disease. **Laryngoscope**, v. 113, n. 1, p. 161-166, 2003.

MARCUCCI, G. Estomatologia: fundamentos de odontologia. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2005.

MASHBERG A, SAMIT AM. Early detection, diagnosis, and management of oral and oropharyngeal cancer. **Cancer Journal Clinical**, v. 39, n. 2, p. 67-88, 1989.

MESSADI, D.V.; WILDER-SMITH, P.; WOLINSKY, L. Improving oral cancer survival: the role of dental providers. **Journal Californial Dentistry Association**, v.37, n.11, p.789-798, 2009.

MELO AUC de. Nível de informação e de comportamento preventivo de cirurgiões-dentistas e usuários das unidades básicas de saúde do programa saúde da família de Aracajú-SE a respeito de câncer bucal. 2006. 160 f. Dissertação (Mestrado em Odontologia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2006.

MELO AUC de. Avaliação da expressão imuno-histoquímica das proteínas B-catenina e WNT-5a em displasias epiteliais bucais. 2008. 48 f. Dissertação(Doutorado em odontologia) - Universidade Federal da Paraíba, João Pessoa, 2008.

MEURER, L. Densidade microvascular e expressão imunoistoquímica de p21: associação com sobrevida em pacientes submetidos à cirurgia por carcinoma epidermóide de esôfago [tese]. Porto Alegre, UFRGS, 2003.

MORGER, R. Oral Mucosal Findings Related to Tobacco Use and Alcohol Consumption: A Study on Swiss Army Recruits Involving Self-Reported and Clinical Data. **Oral Health Prevence Dentistry**, v. 8 p. 143-151, 2010.

NEVILLE, BW et al. Patologia oral e maxilofacial. 3 ed. Rio de Janeiro: Elsevier. 2009, 972p.

NIJSTEN, T.; COLPAERT, C.G.; VERMEULEN, P.B.; HARRIS, A.L.; VAN MARCK, E.; LAMBERT, J. Cyclooxygenase-2 expression and angiogenesis in squamous cell carcinoma of the skin and its precursors: a paired immunohistochemical study of 35 cases. **British Dermatology**, v.151, p.837-45, 2004.

NKONDJOCK, A. Coffee consumption and the risk of cancer: An overview. **Cancer letters**, v. 277, p. 121-125, 2009.

O'BRIEN, C.A.; POLLETT, A.; GALLINGER, S. A human colon cancer cell capable of initiating tumour growth in immunodeficient mice. **Nature**, v. 445, p. 106–110, 2007.

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. **International Journal Oral Maxillofacial Surgery**, v. 32, n. 3, p. 284-288, 2003.

PARKIN, D.M.; BRAY, F.; FERLAY, J.; PISANI, P. Global cancer statistics, 2002. **Cancer Journal Clinical**, v. 55, n. 2, p. 74-108, 2005.

POON, R.T.; LAU C.; YU, W.C.; FAN, S.T.; WONG, J. Correlation of serum basic fibroblast growth factor levels with clinicopathologic features and postoperative recurrence in hepatocellular carcinoma. **American Journal Surgery**, v. 182, p. 298-304, 2001.

PRINCE, M.E.; SIVANANDAN, R.; KACZOROWSKI, A. Identification of a subpopulation of cells with cancer stem cell properties in head and neck squamous cell carcinoma. **Proc Natl Acad Sci USA**, v. 104, p. 973–978, 2007.

PUIGPINOS, R.; BORRELL, C.; ANTUNES, J. L.; AZLOR, E.; PASARIN, M. I.; SERRAL, G.; PONS-VIGUES, M.; RODRIGUEZ-SANZ, M. ; FERNANDEZ, E. Trends in socioeconomic inequalities in cancer mortality in Barcelona: 1992-2003. **BMC Public Health**, v.9, p.35, 2009.

KURODA, Y.; NAKAO, H.; IKEMURA, K.; KATOH, T. Association between the TP53 codon72 polymorphism and oral cancer risk and prognosis. **Oral Oncology**, v.43, n.10, p.1043-8, 2007.

RAICA, M.; CIMPEAN, A.M.; RIBATTI, D. Angiogenesis in pre-malignant conditions. **European Journal of Cancer**, v.45, p.1924-34, 2009.

REIBEL, J. Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. **Oral Biology Medicine**, v.14, n.1, p.47-62, 2003.

RICCI-VITIANI, L.; LOMBARDI, D.G.; PILOZZI, E. Identification and expansion of human colon-cancer-initiating cells. **Nature**, v. 445, p. 111–115, 2007.

SANTOS, G.L.; FREITAS, V.S.; ANDRADE, M.C.; OLIVEIRA, M.C.; Fumo e álcool como fatores de risco para o câncer bucal. **Odontology Clínica, Research** v. 9, n. 2, p. 131-133, 2010.

SAUTER, E.R.; NESBIT, M.; WATSON, J.C.; KLEIN-SZANTO, A.J.P.; HERLYN, M. Vascular endothelial growth factor expression is a marker of tumor invasion and metastasis in squamous cell carcinomas of the head and neck. **Clinical Cancer** , v.5, p.775-82, 1999.

SCULLY, C.; BAGAN, J. Oral squamous cell carcinoma: overview of current understanding of aetiopathogenesis and clinical implications. **Oral Diseases**, v.15, n.6, p.388-99, 2009.

SEZER, O.; JAKOB, C.; EUCKER, J.; NIEMOLLER, K.; GATZ, F.; WERNECKE, K.; POSSINGER, K.; Serum levels of the angiogenic cytokines basic fibroblast growth factor (bFGF), vascular endothelial growth factor (VEGF) and hepatocyte growth factor (HGF) in multiple myeloma. **European Journal Haematology**, v. 66, p. 83-88, 2001.

SHARMAM, K.; GOUR, N.; PANDEY, A.; WALLIA, D. Epidemiological Study of Risk Factors for Oral, Laryngeal and Esophageal Cancers at a Tertiary Care Hospital in India. **Asian Pacific Journal Cancer**, v.12, p. 1215-1218, 2011.

SLAUGHTER, D.P.; SOUTHWICK, H.W.; SMEJKAL, W. "Field cancerization" in oral stratified squamous epithelium: clinical implications of multicentric origin. **Cancer**, v. 6, n. 5, p. 963-968, 1953.

SCHEIDT, J.H.; YURGEL, L.S.; ROMANINI, J.; CHERUBINI, K.; FIGUEIREDO, M.A.; SALUM, F.G. Characteristics of oral squamous cell carcinoma in users or non-users of tobacco and alcohol. **Revista Odonto Ciencia**, v.27, n.1, p.69-73, 2012.

SHWEIKI, D.; ITIN, A.; SOFFER, D.; KESHET, E. Vascular endothelial growth factor induced by hypoxia may mediate hypoxia-initiated angiogenesis. **Nature**, v.359, n.6398, p.843-5, 1992.

SHILS, M.E. Tratado de Nutrição Moderna na Saúde e na Doença. 1 ed. v.2. Barueri: Manole, 2003.

SILVERMAN, S.J.; GORSKY, M.; LOZADA, F. Oral leukoplakia and malignant transformation. A follow-up study of 257 patients. **Cancer**, v. 53, n. 3, p. 563-568, 1984.

SOBIN, L.H.; WITTEKIND, C.H.; TNM Classification of Malignant Tumours. 6<sup>th</sup> ed. New York: John Wiley & Sons; 2002.

SPEIGHT, P.M.; MORGAN, P.R. The natural history and pathology of oral cancer and precancer. **Community Dentistry Health**, v. 10, n. 1, p. 31-41, 1993.

TARTA, C.; Análise digital de imagem e estereologia da angiogênese em adenomas e no adenocarcinoma colorretal invasivo de submucosa [tese]. Porto Alegre, UFRGS, 2003.

TE VELDE, E.A.; VOGTEN, J.M.; GEBBINK, M.F.; VAN GORP, J.M.; VOEST, E.E.; BOREL; RINKES; IH.Enhanced antitumour efficacy by combining conventional chemotherapy with angiostatin or endostatin in a liver metastasis model. **British Journal Surgery**, v. 89, n. 10, p. 1302-1309, 2002.

TOMMASI, A. N. Diagnóstico em patologia bucal. 2 ed.-reimpr. Porto Alegre: Pancast editorial, 1998.

VERMEULEN, P.B.; GASPARINI, G.; FOX, S.B.; COLPAERT, C.; MARSON, L.P.; GION, M.; BELIËN, J.A.; DE WAAL, R.M.; VAN MARCK, E.; MAGNANI, E.; WEIDNER, N.; HARRIS, A.L.; DIRIX, L.Y. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours. **European Journal of Cancer**, v.38, p.1564-79, 2002.

VELLY, A.M.; FRANCO, E.L.; SCHLECHT, N.; PINTOS, J.; KOWALSKI, L.P.; OLIVEIRA, B.V. Relationship between dental factors and risk of upper aerodigestive tract cancer. **Oral Oncology**, v. 34, n. 4, p. 284-291, 1998.

WANG, L.; SHI, G.G.; YAO, J.C.; GONG, W.; WEI, D.; WU, T.T.; AJANI, J.A.; HUANG, S.; XIE, K. Expression of endothelial nitric oxide synthase correlates with the angiogenic phenotype of and predicts poor prognosis in human gastric cancer. **Gastric Cancer**, v. 8, n. 1, p. 18-28, 2005.

WARNAKULASURIYA, S.; JOHNSON, N.W.; VAN, D.E.R.; WAAL, I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. **Journal Oral Pathology Medicine**, v.36, n.10, p. 575-580, 2007.

WARNAKULASURIYA, S. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weakness and scope for improvement. **Journal Oral Pathology Medicine**, v.37, n.3, p. 127-133, 2008.

WOOLGAR, J.A. Histological distribution of cervical lymph node metastases from intraoral/oropharyngeal squamous cell carcinomas. **British Journal Oral Maxillofacial Surgery**, v. 37, n. 3, p. 175-180, 1999.

WUNSCH-FILHO, V. The epidemiology of oral and pharynx cancer in Brazil. **Oral Oncology**, v. 38, n. 8, p. 737-746, 2002.

WÜSCH FILHO, V.; MIRRA, A.P.; LÓPEZ, R.V.M.; ANTUNES, L.F. Tabagismo e câncer no Brasil: evidências e perspectivas. **Revista Brasileira de Epidemiologia**, v. 13, n.2, p. 175-87, 2010.

XIONG, B.; SUN, T.J.; HU W.D.; CHENG, F.L.; MAO, M.; ZHOU, Y.F..Expression of cyclooxygenase-2 in colorectal cancer and its clinical significance. **World Journal Gastroenterol**, v. 11, n. 8, p. 1105-1108, 2005.

ZORGETTO, V.; SILVEIRA, G.; OLIVEIRA-COSTA, J.P.; SOAVE, D.; SOARES, F.; RIBEIRO-SILVA, A. The relationship between lymphatic vascular density and vascular endothelial growth factor A (VEGF-A) expression with clinical-pathological features and survival in pancreatic adenocarcinomas. **Diagnostic Pathology**, v.8, p.170, 2013.

ZONDOR, S.D.; MEDINA, P.J.; Bevacizumab. an angiogenesis inhibitor with efficacy in colorectal and other malignancies. **Pharmacother**, v. 38, n. 7, p. 1258-1264, 2004.

ZINI, A.; CZERNINSKI, R.; SGAN-COHEN, H. D. Oral cancer over four decades: epidemiology, trends, histology, and survival by anatomical sites. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v.39, n.4, p.299-305, 2010.

## **Anexos**

**Anexo I:** parecer do Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Pelotas (protocolo nº. 058/2008)

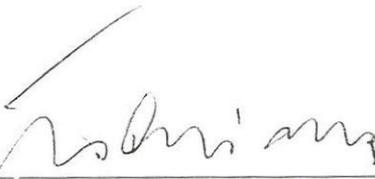


MINISTÉRIO DA EDUCAÇÃO  
UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA  
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

PELOTAS, 19 de novembro de 2008.

PARECER Nº 058/2008

O projeto de pesquisa intitulado: “AÇÕES COLETIVAS PARA A PREVENÇÃO E DETECÇÃO DO CÂNCER DE BOCA E IDENTIFICAÇÃO DE MARCADORES MOLECULARES DO CARCINOMA ESPINOCELULAR NA POPULAÇÃO DA REGIÃO SUL DO RIO GRANDE DO SUL”, está constituído de forma adequada, cumprindo, nas suas plenitudes preceitos éticos estabelecidos por este Comitê e pela legislação vigente recebendo, portanto, **PARECER FAVORÁVEL** à sua execução.

  
Prof. Marcos Antonio Torriani  
Coordenador do CEP/FO/UFPEL

Prof. Marcos A. Torriani  
Coordenador  
Comitê de Ética e Pesquisa

**Anexo II** - Termo de consentimento ético para pesquisa em seres humanos.

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS**

**FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

Autorização para Pesquisa e Execução de Tratamento

**Responsável:** Prof. Dra. Sandra Beatriz Chaves Tarquínio

**NOME DO PACIENTE:** \_\_\_\_\_

**FICHA N.º:** \_\_\_\_\_

Por este instrumento que atende às exigências legais, o(a) senhor(a) \_\_\_\_\_, portador (a) da cédula de identidade n.º \_\_\_\_\_ SSP/\_\_\_\_, após leitura minuciosa da CARTA DE INFORMAÇÃO AO PACIENTE, devidamente explicada pelo(s) profissional(is) em seus mínimos detalhes, ciente dos serviços e procedimentos aos quais será submetido, não restando quaisquer dúvidas a respeito do lido e do explicado, firma seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO em concordância em participar da pesquisa proposta no que lhe é cabível, conforme a CARTA DE INFORMAÇÃO AO PACIENTE.

Fica claro que o paciente ou seu representante legal pode, a qualquer momento, retirar seu CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO, sem ser prejudicado no tratamento, e deixar de participar do estudo alvo da pesquisa e ciente que todo trabalho realizado torna-se informação confidencial guardada por força do sigilo profissional (Art. 9º do Código de Ética odontológica).

Por estarem entendidos e conformados, assinam o presente termo.

Pelotas, \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de 2012.

\_\_\_\_\_  
Assinatura do paciente

\_\_\_\_\_  
Responsáveis pelo estudo

**Anexo III: Questionário**

<b>Anexo III</b> Universidade Federal de Pelotas <b>Faculdade de Odontologia</b> <b>Projeto de Pesquisa</b>
---

Nº de identificação:

RG:

Nome:

Sexo: ( )F ( )M

Data de nascimento:

Cor (observar):

(1)BRANCA

(2)PRETA

(3)MISTA

Endereço:

Bairro:

Cidade:

Telefone de casa:

Celular:

Outro tel:

Outro endereço de contato:

Bairro:

Telefone:

## INFORMAÇÃO ADICIONAL

Endereço de trabalho:

Bairro:

Telefone:

## VAI SE MUDAR: ENDEREÇO FUTURO

Endereço:

Bairro:

Telefone:

OBS.:

Data da entrevista:

---

1. Até que série tu estudastes na escola? SÉRIE:                      GRAU:  
 2. Terminastes a \_\_\_série? N° DE SÉRIES COMPLETAS:                      GRAU:

**HÁBITOS PESSOAIS**

**Agora vou te perguntar sobre teus hábitos diários.**

**Primeiro vamos falar sobre cigarro.**

*NESSA ABORDAGEM, FUMANTE É QUEM FUMA TODOS OS DIAS PELO MENOS 1 CIGARRO POR DIA.*

3. Tu costumás fumar? (1)NÃO (2)SIM (3)EX-FUMANTE SE A RESPOSTA FOR NÃO, PULE PARA A QUESTÃO 7)

SE SIM ou se EX-FUMANTE:

4. Tu fumas/fumavas todos os dias? (1)NÃO (2)SIM-

SE SIM ou EX-FUMANTE:

5. Há quanto tempo fumas/ paraste de fumar? \_\_\_ dias OU \_\_\_ meses OU \_\_\_ anos

6. SE SIM OU EX-FUMANTE, preencha o quadro abaixo (perguntando)

a) - Tipo de fumo:

b) - Quantos cigarros por dia? \_\_\_\_\_

(MARCAR NO QUADRO, AO LADO DE CADA TIPO DE FUMO, O NÚMERO CONSUMIDO POR DIA, LEMBRANDO QUE 1 MAÇO DE CIGARROS= 20 CIGARROS)

a) Tipo de fumo	b) No./dia
( ) Cigarro com filtro (comum)	
( ) Fumo de corda (rolo)	
( ) Cachimbo	
( ) Outros:	

**Agora vamos falar sobre tomar bebidas quentes (café, chá e outros, menos chimarrão).**

*CONSIDERADO CONSUMIDOR QUEM TOMA 1 VEZ OU MAIS POR SEMANA. SE FOR MENOS DE 1 VEZ POR SEMANA, PULA AS DEMAIS PERGUNTAS E VAI PARA CHIMARRÃO (PERGUNTA 11)*

7. Tu costumás tomar bebidas quentes como café, chá ou outra (menos chimarrão)?

(1) NÃO (2) SIM (3)BEBIA, MAS PAROU (SE A RESPOSTA FOR NÃO, PULE PARA A QUESTÃO 11)

8. SE SIM OU SE BEBIA MAS PAROU.: Uma vez ou mais por semana? (0)NÃO (1)SIM

9. SE SIM OU SE BEBIA, MAS PAROU: Quantos dias por semana? \_\_\_ dias (7) todos os dias

10. SE RESPONDEU SIM À PERGUNTA "UMA VEZ OU MAIS POR SEMANA", PREENCHER O QUADRO ABAIXO (perguntando)

a) - Em que tipo de vasilha tu costumavas/costumavas tomar café, chá ou outra bebida quente? (MARCAR NO QUADRO AS VASILHAS CORRESPONDENTES)

b) - Quantas dessa <vasilha> tu costumavas/costumavas tomar por dia?

(MARCAR NO QUADRO, AO LADO DE CADA TIPO DE <vasilha> E, O NÚMERO CONSUMIDO POR DIA)

a) Tipo de vasilha	b) N°/DIA
( ) XÍCARA	
( ) MEIA TAÇA	
( ) XÍCARA DE CAFEZINHO	
( ) COPO COMUM – 200ml	
( ) OUTRO: _____	

Agora vamos falar de chimarrão.

CONSIDERADO CONSUMIDOR QUEM TOMA 1 VEZ OU MAIS POR SEMANA. SE FOR MENOS DE 1 VEZ POR SEMANA, PULA AS DEMAIS PERGUNTAS E VAI PARA ÁLCOOL (PERGUNTA 15)

11. Tu costumavas tomar chimarrão?

(1)NÃO (2)SIM- (3)BEBIA, MAS PAROU (SE A RESPOSTA FOR NÃO, PULE PARA A QUESTÃO 15)

SE SIM OU SE BEBIA MAS PAROU:

12. Uma vez ou mais por semana? (1)Não (2)SIM

13. Quantos dias por semana? \_\_\_\_\_ DIAS/SEMANA (7) Todos os dias

14. SE RESPONDEU SIM À PERGUNTA "UMA VEZ OU MAIS POR SEMANA", PREENCHER O QUADRO ABAIXO (perguntando)

- A) Tu medes/medias o chimarrão que tu tomas/tomavas em (cuia, térmica ou chaleira)?(MARCAR NO QUADRO AS VASILHAS CORRESPONDENTES)
- B) Quanto tu costumavas/costumavas tomar por dia?
- C) A <vasilha> que tu costumavas tomar é: (1) pequena (2) grande (3) média

(MARCAR NO QUADRO, AO LADO DE CADA TIPO DE <vasilha>, O TAMANHO E, O NÚMERO CONSUMIDO POR DIA)

A) Vasilha	B) N°/DIA	C) TAMANHO (pequena, média ou grande)
( ) CUIA		
( ) CHALEIRA		
( ) TÉRMICA		

1. **Agora vamos falar de bebidas de álcool**

CONSIDERADO CONSUMIDOR QUEM TOMA 1 VEZ OU MAIS POR SEMANA. SE FOR MENOS DE 1 VEZ POR SEMANA, PULA AS DEMAIS PERGUNTAS E VAI A PERGUNTA 20)

15. Tu costumás tomar bebidas de álcool?

(1)NÃO (2) SIM- (3)Bebia mas parou (SE A RESPOSTA FOR NÃO, PULE PARA A QUESTÃO 20)

SE SIM OU SE BEBIA MAS PAROU:

16. Uma vez ou mais por semana? (1)Não (2)Sim

17. Há quanto tempo bebes/ paraste de BEBER? \_\_\_ dias OU \_\_\_ meses OU \_\_\_ anos

SE SIM OU SE BEBIA MAS PAROU:

18. Quantos dias por semana? \_\_\_\_\_ DIAS/SEMANA (7) Todos os dias

19. SE RESPONDEU SIM OU SE BEBIA MAS PAROU, preencher o quadro abaixo (perguntando)

a) -Que bebida tu tomas/tomavas? (ASSINALAR NO QUADRO ABAIXO)

PARA CADA BEBIDA MENCIONADA, PERGUNTAR:

b) -Que tipo de vasilha tu usas/usavas? (ASSINALAR NO QUADRO ABAIXO, MARCANDO O NO. CORRESPONDENTE DÀ VASILHA)

c) - Quantas <vasilha> tu tomas/tomavas por dia? (ANOTAR NO QUADRO ABAIXO)

(01) COPO COMUM (200ml) (de BAR)

(04)LATA(350,355ml)

(02) TAÇA (cálice)

(05) GARRAFA PEQUENA (300ml)

(03) MARTELO (100ml)

(06) GARRAFA MAIOR (600, 720ml)

(07) OUTRO= \_\_\_\_\_

	RECIPIENTE	Nº/DIA
( ) Vinho		
( ) Cerveja		
( ) Bebidas destiladas (aguardente, vodca,uísque...)		
( ) Outra		

20. Tu mesmo costumás examinar a tua boca no espelho?

(1) NÃO (2) SIM (3)ÀS VEZES (4)NÃO SABE

**MUITO OBRIGADA PELA SUA COLABORAÇÃO!!!**