

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE GERIATRIA E GERONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GERONTOLOGIA BIOMÉDICA

**Expressão da endogлина (CD 105) em carcinomas epidermóide de cavidade oral de
pacientes adultos e idosos**

EDER ABREU HÜTTNER

Orientadora: Denise Cantarelli Machado, PhD

Porto Alegre, março de 2006

PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
INSTITUTO DE GERIATRIA E GERONTOLOGIA
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM GERONTOLOGIA BIOMÉDICA

**Expressão da endoglina (CD 105) em carcinomas epidermóide de cavidade oral de
pacientes adultos e idosos**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica do Instituto de Geriatria e Gerontologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul como parte dos requisitos para a obtenção do grau de Doutor em Gerontologia Biomédica.

EDER ABREU HÜTTNER

Orientadora: Denise Cantarelli Machado, PhD

Porto Alegre, março de 2006

H983e

Huttner, Eder Abreu

Expressão da endoglina (CD105) em carcinoma epidermóide de cavidade bucal de pacientes adultos e idosos / Eder Abreu Huttner; Orient. Denise Cantarelli Machado. Porto Alegre: PUCRS, 2006.
98f.: il. gráf. táb.

Tese (Doutorado) – Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul. Instituto de Geriatria e Gerontologia. Programa de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica.

1. NEOVASCULARIZAÇÃO PATOLÓGICA. 2. CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS. 3. NEOPLASIAS BUCAIS. 4. ENDOGLINA. 5. GLICOPROTEÍNAS DE MEMBRANA. 6. MARCADORES BIOLÓGICOS DE TUMOR. 7. ANGIOGÊNESE. 8. ADULTO. 9. IDOSO. 10. GERIATRIA. 11. ESTUDOS RETROSPECTIVOS. I. Machado, Denise Cantarelli. II. Título.

C.D.D. 618.976994
C.D.U. 616.31-053.9(043.2)
N.L.M. WU 280

AGRADECIMENTOS

A minha família pelo incansável e constante estímulo para a minha formação profissional e pessoal: Adair Carmen de Abreu Huttner, Edegar Huttner e Édison Huttner.

À minha companheira de todos os momentos Ana Cristina dos Santos Alves pelo carinho, dedicação e compreensão nesta caminhada de trabalho e estudo.

A minha segunda família em porto alegre, José edil, Vera, Francisco, Carla Estela e João.

Aos professores do Programa de pós-graduação em Gerontologia Biomédica da PUCRS pela qualidade na formação dos meus conceitos sobre o envelhecimento e geriatria.

A minha orientadora Denise Cantarelli Machado pela dedicação e apoio á minha formação na área da pesquisa biomédica.

Aos Irmãos Maristas da província de Porto Alegre, em especial aos Irmãos Joaquim Clotet, Evilázio Teixeira, Solimar Amaro, Jaime Biazus, Laurindo Viacelli e Miguel Orlandi pelo apoio e fonte de inspiração desde minha infância.

Aos pesquisadores, funcionários e bolsistas do Laboratório de Pneumologia; Cristian, Osama, Fernanda em especial ao vinícios michaelson pela dedicação e zelo pela qualidade no experimento.

Aos professores e Técnicos do laboratório de Patologia e Citologia: Dr Hartman, Dr. Vinícius Duval pela dedicação, carinho e possibilidade de acesso às dependências do laboratório para a realização de parte do experimento. Em especial ao Tiago pelo profissionalismo e dedicação na técnica imunoistoquímica.

A Dra Liliane Yurgel pelo apoio e possibilidade de acesso aos espécimes da amostra desse experimento.

Aos meus amigos Alan, Ademir, Tiago, Frederico, Gustavo, Lucas, Leonardo e outros não citados pela força e motivação nesta jornada de pós-graduação.

A CAPES pela possibilidade de realizar o doutorado com auxílio bolsa.

RESUMO

O carcinoma epidermóide (CEB) é a principal neoplasia maligna da cavidade bucal. A maior incidência desse tumor ocorre entre a quarta e sétima década de vida, sendo que tem sido constatado um aumento no número de adultos jovens com esta patologia em várias regiões do mundo. O objetivo deste estudo foi comparar as características anátomo-patológicas e a expressão da endogлина (CD105) em CEBS dos grupos etários adultos (< 60 anos) e idosos (>= 60 anos). Foram utilizadas 27 amostras de CEBS, entre as quais 14 espécimens eram oriundas de pacientes adultos e 13 espécimens de pacientes idosos. Foram comparados os aspectos clínicos, anátomo-patológicos e os padrões de neoangiogênese, através da expressão da glicoproteína endogлина (CD 105) entre os grupos de adultos e idosos. Os resultados mostraram que a baixa gradação de malignidade, o baixo padrão de invasão, o alto grau de queratinização e o baixo número de mitoses no grupo de idosos foram estatisticamente significantes para ($p < 0,03$), ($p < 0,04$), ($p < 0,04$), ($p < 0,04$), respectivamente, quando comparado com o grupo de adulto a neo-angiogênese avaliada através da quantificação da expressão da endogлина não apresentou diferenças estatisticamente significante para ($p < 0,05$) em ambos grupos estudados. Considerando os resultados apresentados neste estudo, pode-se concluir que os CEBS de pacientes idosos apresentam menor gradação de malignidade e algumas características anátomo-patológicas que sugerem menor agressividade tumoral em relação aos adultos, entretanto, não houve alteração quantitativa da expressão da endogлина entre os grupos analisados.

PALAVRAS-CHAVE: Carcinoma epidermóide bucal. Idosos. Endogлина. Gradação de malignidade. Neo-angiogênese. Imunoistoquímica.

ABSTRACT

Squamous cell carcinoma (SCC) is the main malignant neoplasm of the oral cavity. The higher incidence of this tumor occurs between the fourth and seventh decade of life, and it has been found a raise in the number of young adults with this pathology in several regions of the world. The aim of this study was to compare anatomopathological characteristics and endoglin expression in the groups of adults (<60 years) and elderly (≥ 60 years). In this study, 27 samples of oral SCC were analysed. Of the total, 14 specimens were from adult patients and 13 specimens were from elderly patients. The results showed that a low grade of malignancy, a low pattern of invasion, The clinical, the anatomopathological aspects and the patterns of neoangiogenesis, through the expression of endoglin glycoprotein (CD105) in the groups of adults and elderly, were compared. A high degree of keratinization and a low number of mitosis in the elderly group were statistically significant at ($p < 0,03$, $p < 0,04$, $p < 0,04$, $p < 0,04$, respectively). Neoangiogenesis evaluated through of endoglin expression did not show statistically significant differences in both studied groups. Based on the presented results, it can be concluded that oral SCC of elderly patients show lower grade of malignancy and some anatomopathological characteristics that suggest lower tumoral aggressiveness when compared. However, quantitative alteration of endoglin expression in the analysed groups was not detected.

Key words: Oral squamous cell carcinoma. Elderly. Endoglin. Grade of malignancy. Neoangiogenesis. Immunohistochemical.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 1	Representação esquemática dos caminhos que as células com instabilidade genética pode seguir de acordo com o balanço da expressão de proteínas de supressão tumoral e indutoras de senescência: p53, p16, pRB, p19, p21; indutoras de imortalidade e câncer: telomerase, ALT e pró-apoptóticas: bax, bcl-2	25
Figura 2	Fotomicrografia de células endoteliais positivas anti-CD105 (setas) nas regiões de maior vascularização do CEB. Aumento de 400 X	54
Figura 3	Imagem digitalizada da expressão do anticorpo anti-CD105 (setas) utilizada na quantificação da densidade vascular nos CEBs. Aumento de 200 X	54
Figura 4	Distribuição da localização dos CEBs intrabucais de acordo com os grupos etários: (< 60 anos) e (>= 60 anos)	56
Figura 5	Relação entre as variáveis histopatológicas categorizadas nos CEBs no grupo dos adultos (A) e idosos (B)	59
Figura 6	Fotomicrografia do padrão de invasão difuso de células neoplásicas do CEB (setas azuis), com alto grau de queratinização (setas vermelhas). Aumento de 200 X	60
Figura 7	Fotomicrografia do padrão de invasão em cordões na linha de invasão do CEB ao tecido conjuntivo adjacente. Aumento de 100 X	60
Figura 8	Diagrama de dispersão da idade versus a MDV nos CEBs	61
Figura 9	Fotomicrografia da Imunoexpressão do anticorpo anti-CD105 na neovascularização intratumoral do CEB. Aumento de 400 X	62
Figura 10	Fotomicrografia da infiltração maciça de células neoplásicas do CEB na linha de invasão tumoral. Aumento de 100 X	62
Figura 11	Fotomicrografia das pérolas de queratinização (setas vermelhas) e cordões e ilhas de invasão (setas azuis) do CEB. Aumento 100 X	63

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Sistema de gradação de malignidade proposto por Bryne et al. (1989)	49
Tabela 2 - Categorização das variáveis histopatológicas dos tumores de acordo com os respectivos escores do sistema Bryne et al. (1989)	50
Tabela 3 - Caracterização das variáveis clínicas, escores histopatológicos e MDV categorizados nos CEBs investigados	57
Tabela 4 - Distribuição em números absolutos e porcentagens das variáveis categorizadas de acordo com os grupos (< 60 anos) e (>= 60 anos)	58
Tabela 5 - Relação de significância estatística entre as variáveis histopatológicas categorizadas, considerando todos os tumores investigados independente do grupo etário	61

LISTA DE ABREVIATURAS

APCs	= Células apresentadoras de antígenos
ALT	= Mecanismo alternativo de alongamento dos telômeros
pb	= Pares de base
CD4⁺	= Linfócito T auxiliar
CD8⁺	= Linfócito T citotóxico/supressor
CpG	= Regiões ricas em nucleotídeos citosina e guanina
CD105	= Anticorpo endoglina ou CD105
COX-2	= Cicloxigenase 2
DNA	= Ácido desoxiribonucleico
EGF	= Fator de crescimento epidérmico
EMT	= Escore de malignidade tumoral
ER	= Receptor de estrogênio
ERCC3	= Proteína de complementação cruzada no reparo de DNA por excisão de nucleotídeos
E6	= Proteína E6
E7	= Proteína E7
gp100	= Glicoproteína 100
H&E	= Hematoxilina-eosina
HPV	= Vírus do papiloma humano
IBGE	= Instituto brasileiro de geografia e estatística
INCA	= Instituto nacional de câncer
IFN-γ	= Interferon gama
IL	= Infiltrado leucocitário
KL	= Gene klotho
IL-1	= Interleucina 1
Lyt-2⁺	= Glicoproteína Lyt 2
MDV	= Microdensidade vascular
MDM-2	= do inglês Murine Double Minute 2
MICA	= Cadeia alfa relacionada com o MHC de classe II
MICB	= Cadeia beta relacionada com o MHC de classe II

MMP-2	= Metaloproteinase de matriz 2
MMP-9	= Metaloproteinase de matriz 9
mtDNA	= DNA mitocondrial
MGMT	= O6-metilguanina-DNA metiltransferase
NO	= Óxido nitroso
NM	= Número de Mitoses
OMS	= Organização mundial de saúde
PBS	= Tampão fosfato de sódio
PDGF	= Fator de crescimento derivado de plaquetas
pH	= Potencial de hidrogênio
PI	= Padrão de invasão
PP	= Padrão de pleomorfismo
PN	= Pleoformismo nuclear
PUCRS	= Pontifícia universidade católica do rio grande do sul
PQ	= Padrão de queratinização
PGE	= Prostaglandina E
pRB	= Proteína do retinoblastoma
RPA	= Proteína de replicação A
ROS	= Espécies reativas de oxigênio
TGF-1β	= Fator de crescimento transformante 1 beta
TNF	= Fator de necrose tumoral
TNM	= Estadiamento clínico preconizado pela UICC
TSP-2	= Tromboplastina 2
TTAGG	= Seqüência da bases timina, timina, adenina, guanina, guanina, guanina
G	
UV	= Ultravioleta
UICC	= Internacional Union Against Cancer
VEGF	= Fator de crescimento endotelial vascular
XPA	= Proteína do xeroderma pigmentoso do grupo de complementação A

LISTA DE SÍMBOLOS

M	=	Molaridade
P*	=	Nível de significância
<	=	Menor
>	=	Maior
μm	=	Micrômetro
°C	=	Grau Celsius

SUMÁRIO

Agradecimentos	IV
Resumo.....	V
Abstract.....	VI
Lista de abreviaturas.....	VII
Lista de tabelas.....	VIII
Lista de figuras.....	IX
Lista de símbolo.....	XI
1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA.....	14
1.1 Envelhecimento e câncer.....	14
1.1.1 Aspectos epidemiológicos	14
1.1.2 Aspectos biológicos.....	16
1.1.2.1 Acúmulo de mutações	18
1.1.2.2 Metilação do DNA nuclear.....	20
1.1.2.3 Acúmulo de mutações no mtDNA.....	21
1.1.2.4 Senescência, apoptose e carcinogênese	23
1.1.2.5 Envelhecimento e estímulo pró-oncogênico.....	27
1.1.2.6 Imunosenescência e câncer.....	29
1.2 Câncer bucal.....	31
1.3 Angiogênese e câncer.....	36
1.4 Angiogênese e envelhecimento.....	41
1.5 Proposição do estudo.....	46
1.5.1 Proposições específicas.....	46
2. MATERIAIS E MÉTODOS.....	47
2.1 Aspectos bioéticos.....	47
2.2 Amostras investigadas.....	47
2.3 Variáveis.....	48
2.3.1 Variáveis descritivas	48
2.3.2 Variável experimental.....	48
2.4 Classificação histopatológica dos tumores.....	48
2.5 Método imunoistoquímico.....	51
2.6 Determinação das regiões de maior densidade vascular e mensuração da densidade vascular	53
2.7 Análise estatística.....	55
3. RESULTADOS.....	56
3.1 Parâmetros clínicos	56
3.2 Variáveis histopatológicas e microdensidade vascular.....	57
4. DISCUSSÃO.....	64
5. CONCLUSÕES.....	75
6. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	76
7. ANEXOS.....	87

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1 Envelhecimento e câncer

1.1.1 Aspectos epidemiológicos

Conforme os dados do Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística (IBGE), a proporção de pessoas com 60 anos ou mais passou de 7,9% em 1992 para 9,1% em 2001 e estima-se que chegue a 16% em 2030. Nas próximas duas décadas, a população idosa do Brasil poderá dobrar, passando de aproximadamente 15 milhões de pessoas com 60 anos ou mais de idade para cerca de 30 milhões (IBGE, 2005).

O envelhecimento populacional no Brasil está ocorrendo de forma acelerada, sendo registrado o aumento no número de idosos três vezes maior que o ocorrido na transição demográfica dos países desenvolvidos. Diferentemente do modo como ocorreu nos referidos países, a transição demográfica brasileira não está ocorrendo em consequência de transformações estruturais, com melhoria da qualidade de vida, mas de uma resposta às ações médico-sanitárias básicas (CHAIMOVICZ, 1997).

A alteração no perfil da população para um contingente maior de idosos influencia nas condições de saúde. Ao invés de processos agudos que “se resolvem” rapidamente através da cura ou do óbito, típicos nos indivíduos jovens, tornam-se predominantes as doenças crônicas, muitas vezes associadas a morbidades e comorbidades que implicam em décadas de utilização dos serviços de saúde. São exemplos disto as seqüelas do acidente vascular cerebral, as fraturas após quedas, as limitações provocadas pela insuficiência cardíaca e doença pulmonar obstrutiva crônica,

as amputações e cegueira provocados pelo diabetes, a dependência determinada pela demência do Alzheimer e as morbidades causadas pelo câncer (CHAIMOVICZ, 1997).

O câncer atualmente é responsável por 10 milhões de morte/ano no mundo, sendo que a Organização Mundial da Saúde (OMS) estima que o número de casos aumentará para 15 milhões de morte/ano até o ano de 2020 (WHO, 2005). Segundo Parkin et. al. (2005), um dos motivos para essa estimativa de aumento de morte por câncer é o envelhecimento populacional que ocorre em países em desenvolvimento como o Brasil.

Em nosso país, as estimativas para o ano de 2006 apontam que ocorrerão 472.050 novos casos de câncer. Conforme os dados do Instituto Nacional de Câncer (INCA), esse número distribui-se de forma heterogênea nas unidades da federação e capitais do país. Observa-se uma grande variação inter-regional na distribuição das taxas brutas de câncer. Nesse sentido, as maiores taxas relacionadas ao câncer são verificadas nas regiões sul e sudeste, passando pela região centro-oeste, e as menores taxas nas regiões nordeste e norte. (INCA, 2006a).

De acordo com a relação entre as faixas etárias, o número de óbitos e a taxa especificada de morte por câncer na população brasileira entre 1995-1999, pode se verificar a ocorrência de um aumento exponencial na taxa específica de morte por câncer com o aumento da faixa etária (INCA, 2006b). Deste modo, o aumento do número de habitantes na faixa etária de maior incidência da maioria dos tipos de câncer, em virtude da transição demográfica brasileira, poderá levar a um aumento expressivo de novos casos desta patologia nas próximas décadas (MORAES, 1997).

Mesmo que em números absolutos, ocorra um aumento da incidência de câncer com a idade existem diferenças na faixa etária de maior incidência de acordo com o tipo e localização dos tumores no organismo. Com isto, Dix, Cohen e Flanner (1980) dividiram os tumores em duas classes, segundo a faixa etária de maior incidência. A primeira classe corresponde a tumores que tem o pico de incidência após os 50 anos e a segunda classe, a tumores que têm dois picos de incidência. O primeiro pico antes dos 35 anos de idade e o segundo, após os 50 anos. A maioria dos tumores pertence à primeira classe, enquanto que os linfomas de Hodgkin, a leucemia linfocítica e o osteossarcoma são exemplos de neoplasias da segunda classe.

Segundo Caruso et al. (2004), o aumento no número absoluto de câncer ocorre em pacientes acima dos 65 anos, sendo verificado um platô entre 85 e 90 anos de idade. Após os 90 anos observa-se um declínio na incidência e mortalidade por câncer e acredita-se que esse fato se deva a uma seletividade de indivíduos que possuam os mecanismos de imunidade antitumoral pouco afetados pela idade.

1.1.2 Aspectos Biológicos

O fato da incidência absoluta de câncer crescer exponencialmente com a idade no homem e em outros mamíferos tem desafiado os gerontólogos na busca de uma possível conexão entre o envelhecimento e o câncer. Segundo Anisimov (2003), essa relação entre a maior tendência à formação neoplásica e o envelhecimento não ocorre homogeneamente em todo o organismo, pois de acordo com o órgão ou tecido do corpo humano a suscetibilidade à iniciação, à promoção e à progressão de tumores pode aumentar ou diminuir de acordo com a idade do indivíduo.

A literatura relata que existe uma tendência a menor agressividade tumoral em pacientes idosos, quando comparado com os pacientes jovens, no entanto, são constatadas variações nesta relação de acordo com o tipo e localização tumor. Um exemplo disto foi a constatação de Briggs et al. (1992) que investigaram a relação entre a faixa etária, o grau de malignidade e o prognóstico em câncer superficial de bexiga. Os resultados mostraram que os pacientes acima de 65 anos tinham três vezes mais chances de apresentarem tumores com alta graduação de malignidade e prognóstico ruim em relação aos pacientes abaixo de 50 anos de idade.

Por outro lado, Diab, Elledg e Clark (2000), analisando o comportamento biológico de tumores mamários de pacientes acima e abaixo de 55 anos, concluíram que os tumores de pacientes acima de 55 anos apresentaram maior expressão de receptores de estrogênio (ER) e altas taxas de células diplóides quando comparado com tumores de pacientes com idade abaixo dos 55 anos. Estas características indicam uma resposta terapêutica favorável e um baixo índice de crescimento tumoral em pacientes acima de 55 anos.

Segundo Anisimov (2003), em termos gerais o envelhecimento pode predispor ao câncer por vários mecanismos: (1) acúmulo de mutações oncológicas, (2) alterações nos sistemas imune e endócrino e (3) instabilidade genômica. Krtolica e Campisi (2002, 2003) sugerem que o aumento da incidência de câncer relacionado à idade pode resultar do efeito sinérgico entre o acúmulo de mutações genéticas e as alterações pró-oncogênicas que ocorrem em virtude do aumento de células senescentes nos tecidos com o envelhecimento.

1.1.2.1 Acúmulo de mutações

O acúmulo de mutações espontâneas e induzidas por carcinógenos nas células somáticas durante o envelhecimento é um processo que ocorre comumente no organismo, possivelmente causado pelo estresse oxidativo endógeno e por agentes exógenos (MARNETT, 2000). Em relação à influência da idade na sensibilidade tecidual à incidência de mutações induzidas por carcinógenos, Anisimov (2003) afirma que ocorrem diferenças nas taxas de mutações e transformações neoplásicas em animais velhos de acordo com o tecido analisado. Em alguns órgãos ocorre aumento, diminuição ou é mantida a sensibilidade ao carcinógeno com o aumento da idade.

O conceito de mutações espontâneas é utilizado em estudos com animais, quando os mesmos não são submetidos à exposição adicional de carcinógenos exógenos (ANISIMOV, 2003). Hill et al. (2004) avaliaram a relação entre a idade, a frequência e o tipo de mutações espontâneas em diferentes tecidos e órgãos de camundongos transgênicos. Os autores observaram que as mutações espontâneas aumentavam com a idade, sendo que as taxas mutacionais eram diferentes em cada tipo de tecido analisado. Entre o décimo e vigésimo quinto mês de vida ocorreu um aumento nas taxas de mutações no tecido hepático e adiposo, enquanto que nos tecidos cerebral e gonadal masculino as taxas se mantiveram.

King et al. (1994), analisando as taxas de mutações em linfócitos T *in vitro*, constataram um aumento nos níveis de mutações espontâneas nas células de doadores

com idade mais avançada. O aumento estimado nas taxas de mutações espontâneas foi de 1,33% ao ano, após os 54 anos de idade.

Segundo Vijg (2000), o aumento das mutações espontâneas ou evocadas por carcinógenos que acompanham o envelhecimento pode induzir a instabilidade genômica, aumentar a sensibilidade celular aos carcinógenos e ativar genes promotores tumorais. A existência de inúmeras formas de dano ao DNA exige que a célula possua diferentes mecanismos de reparo do material genético. Os mecanismos mais conhecidos e estudados são o reparo de DNA por excisão de nucleotídeos, o reparo recombinacional e o sistema de reparo por erro de adição de nucleotídeos (HOEIJMAKERS, 2001).

Goukassian et al. (2000) avaliaram a capacidade de reparo do DNA em danos ao material genético induzidos por raios UV em fibroblastos de doadores com diferentes idades. Os autores constataram uma diminuição estatisticamente significativa ($p=0.001$) na taxa de reparo do DNA com o aumento da idade do doador, além de uma redução na expressão de mRNA para as proteínas que participam do mecanismo de reparo do DNA (ERCC, PCNA, RPA, XPA, e p53).

Ben Yehuda et al. (2000) sugerem que a diminuição na função do sistema de reparo por erro de adição de nucleotídeos, sistema que repara erros de replicação do DNA, com a idade, conduz a maior instabilidade genômica em pacientes idosos e este fato pode ser um dos responsáveis pela maior suscetibilidade a transformações malignas nestes indivíduos.

1.1.2.2 Metilação do DNA nuclear

As alterações epigenéticas, principalmente a metilação do DNA e a desacetilação das histonas, emergiram recentemente na elucidação dos mecanismos biológicos do desenvolvimento e progressão do câncer (PLASS, 2002). Segundo Richardson (2003) e Feinberg (2004), as alterações referentes à metilação do DNA com a idade parecem ser um importante elo entre o câncer e o envelhecimento, pois estudos têm comprovado a sua ação na ativação de protooncogenes, no silenciamento de genes de supressão de tumor e na instabilidade cromossômica.

Com o envelhecimento, são constatadas alterações nas taxas de metilação do DNA e, dependendo do tipo de tecido ou gene envolvido, pode ocorrer tanto uma diminuição quanto um aumento na incorporação do radical metil na estrutura do DNA. Um dos principais mecanismos de ação da metilação no metabolismo celular é a modulação da expressão gênica que ocorre através dos efeitos do grupo metil na ligação entre bases nitrogenadas do DNA e na estrutura da cromatina (RICHARDSON, 2003).

Toyota e Issa (1999) consideram que a hipermetilação de regiões promotoras CpG é um mecanismo alternativo para o silenciamento de genes supressores tumorais como o *p16* e o retinoblastoma (*pRB*) que atuam na oncogênese e de genes controladores de crescimento e diferenciação celular, como o do receptor de estrogênio (*ER*).

Recentemente Nephew e Huang (2003) sugeriram um modelo para a atuação epigenética na iniciação e progressão do câncer. Os pesquisadores postulam que a ação da desacetilação e metilação das histonas resultaria em rearranjo cromossômico e que,

por outro lado, a hipermetilação das regiões CpG atuaria posteriormente na manutenção do silenciamento de genes supressores de tumor.

O padrão de hipermetilação genética em tumores tem sido extensivamente estudado nos últimos anos e os resultados mostram que, dependendo do tipo e localização do tumor, podem existir diferentes padrões de hipermetilação de genes envolvidos na oncogênese, como o *p14*, *p15*, *p16*, O6-metilguanina-DNA metiltransferase (MGMT) e o gene *caderina-E* (BAYLIN et al., 2001; RICHARDSON, 2003).

Nos tumores bucais e da região de cabeça e pescoço têm sido evidenciada a presença da hipermetilação dos genes *p16* (KRESTY et al., 2002; KULKARNI, SARANATH, 2004), proteína quinase ativada pela morte (DAPK) e do gene de reparo de DNA O6-metilguanina-DNA metiltransferase (PURI et al., 2005; KULKARNI, SARANATH, 2004). Esses resultados indicam que as alterações epigenéticas por metilação são freqüentes nas lesões malignas e pré-malignas bucais e possivelmente atuam na carcinogênese neste sítio do organismo (HASEGAWA et al., 2002; KULKARNI, SARANATH, 2004).

1.1.2.3 Acúmulo de mutações do mtDNA

O acúmulo de mutações no DNA mitocondrial (mtDNA) é um fenômeno constatado nos processos de envelhecimento, senescência celular e câncer. Esse acúmulo de mutações no mtDNA é causado principalmente pelo dano oxidativo gerado pelas espécies reativas de oxigênio (ROS) produzidas na cadeia respiratória, e pela

diminuição na capacidade de reparo do DNA mitocondrial que ocorre durante o processo de envelhecimento (WEI et al., 1998).

Hartman et al. (2004) propuseram três passos para a indução da carcinogênese através das mutações no mtDNA: (1) a disfunção mitocondrial produzida pelas mutações no mtDNA eleva a produção das ROS nas mitocôndrias; (2) além de causar danos no mtDNA, as ROS podem causar instabilidade no DNA nuclear; (3) o acúmulo de ROS na célula pode causar mutações em genes de supressão tumoral e protooncogenes. Essa instabilidade genômica causada pelo dano no DNA mitocondrial e nuclear associado ao acúmulo de mutações que acompanham o envelhecimento pode gerar um estado de hipermutabilidade que propicia a carcinogênese.

Recentemente, alguns estudos têm enfatizado a influência das ROS e das mutações do mtDNA nos eventos biológicos da carcinogênese do câncer bucal (LEE et al., 2001; SHIEH et al., 2004). Lee et al. (2001) verificaram, não somente o aumento de mutações no mtDNA em células de carcinoma epidermóide bucal (CEB), mas em células da mucosa de pacientes livre de câncer que utilizam o tabaco de mascar, um hábito típico da cultura indiana. O autor sugere que o acúmulo de mutações no mtDNA das células da mucosa oral, em virtude do uso do tabaco, pode ser um importante fator na iniciação da carcinogênese para esse fator etiológico.

Shieh et al. (2004), analisaram a prevalência de mutações no mtDNA em lesões pré-malignas e CEBs. Concluíram que ocorre um aumento de 546 vezes na deleção ocorrida na posição 4.977 pb do mtDNA em células de lesões pré-malignas e de 198 vezes em células de CEBs comparado às células da mucosa bucal normal.

1.1.2.4 Senescência, apoptose e carcinogênese

Desde o descobrimento dos telômeros, por Elizabeth Blackburn em 1978, e da enzima telomerase, por Carol Greider em 1985, essas estruturas têm sido extensivamente estudadas em inúmeros mecanismos celulares como a manutenção da estabilidade cromossômica, replicação celular e imortalização celular. Os telômeros correspondem a repetições de seqüências de nucleotídeos TTAGGG posicionadas nas porções finais dos cromossomos, já a telomerase é uma ribonucleoproteína responsável pela adição de seqüências TTAGGG nas extremidades teloméricas (GRANGER et al., 2000).

A manutenção da estrutura dos telômeros depende do balanço entre a adição das seqüências de nucleotídeos pela telomerase e a remoção de nucleotídeos a cada ciclo replicativo. Como em humanos, a maioria das células somáticas pouco expressam a enzima telomerase, as duplicações dessas células implicam no progressivo encurtamento telomérico (HACKETT, GREIDER, 2002).

A senescência celular é caracterizada pela perda da capacidade de divisão mitótica e a longa permanência nas fases G0 ou G1 do ciclo celular. A célula, quando atinge a senescência, assume características morfológicas específicas e apresentam alterações no padrão de expressão gênica e na fisiologia celular, sendo que algumas dessas alterações podem estar envolvidas nos processos de proteção ou indução do câncer (CAMPISI, 2001).

Segundo Kirkwood e austad (2000), o processo de senescência celular em indivíduos jovens e adultos atua como um mecanismo de escape para a formação de neoplasias a partir de células com instabilidade genética potencialmente oncogênicas. Já nas faixas etárias mais avançadas e nos idosos o acúmulo de células senescentes nos tecidos podem ter um efeito pró-oncogênico. Essa ação como duplo agente da senescência na indução ou proteção do câncer é considerada como antagonismo pleiotrópico.

Inúmeros estudos têm demonstrado a influência da disfunção telomérica, que ocorre com o envelhecimento, na ativação das proteínas de supressão tumoral p53, pRB, p16, na indução da senescência replicativa, na apoptose e na imortalização celular (STAMPFER, YASWEN, 2003). A senescência celular e a apoptose são considerados mecanismos protetores do organismo contra a carcinogênese, sendo que o caminho da senescência, apoptose ou carcinogênese dependerá do nível de dano ao DNA e do balanço da expressão de proteínas pró-oncogênicas/de supressão tumoral e pró-apoptóticas/anti-apoptóticas (CHEN et al., 2000).

Os telômeros possuem a função de manter a integridade genômica, entretanto, deste modo disfunção telomérica pode induzir a formação de cromossomos dicêntricos, translocações não recíprocas e outras anormalidades que conduzem à instabilidade genômica (MURNANE, SABATIER, 2004). Isto exige que, na fase pré-senescente, as células estejam com as funções da p53, pRB e p16 em condições de serem ativadas. Esse parece ser um ponto crítico para o destino da célula, pois se as proteínas p53, pRB e p16 forem ativadas, a célula poderá ser conduzida à senescência ou à apoptose. No

entanto, a inatividade dessas proteínas associada a outros eventos biológicos poderão conduzir essa célula à transformação maligna (DIMRI, 2005).

A célula que apresenta instabilidade genética que não segue o caminho da senescência ou apoptose pode caminhar para a imortalidade e transformação maligna. Segundo Newbold (2002), tanto a inativação das proteínas a p53 e a pRB, quanto a expressão de proteínas de manutenção telomérica, como a telomerase e as proteínas da via alternativa de alongamento telomérico (ALT), são fundamentais para o mecanismo de imortalização celular e transformação maligna.

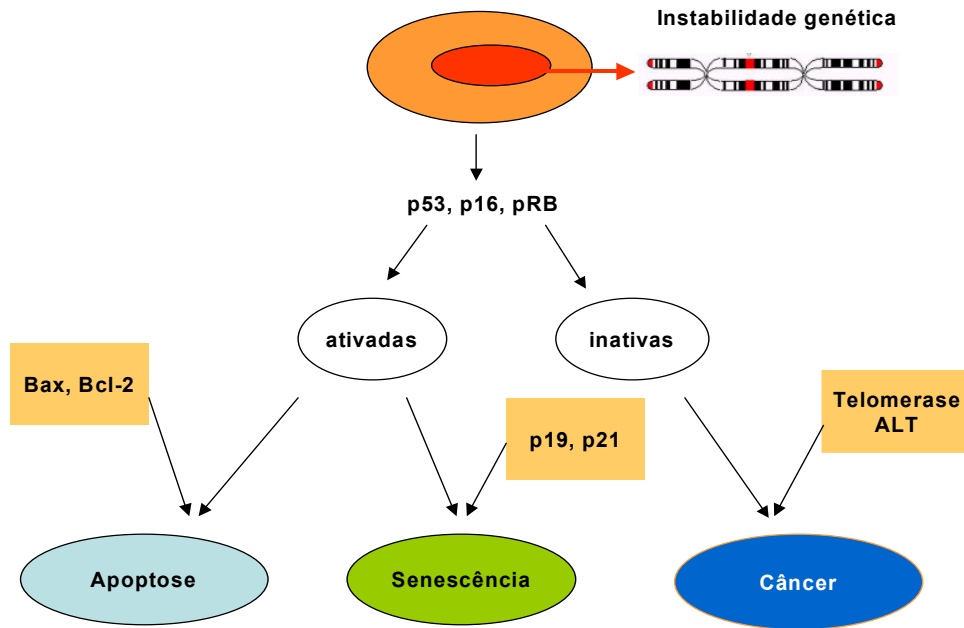


Figura 1. Representação esquemática dos caminhos que as células com instabilidade genética pode seguir de acordo com o balanço da expressão de proteínas de supressão tumoral e indutoras de senescência: p53, p16, pRB, p19, p21; indutoras de imortalidade e câncer: telomerase, ALT e pró-apoptóticas: bax, bcl-2.

Por outro lado, existem evidências que o encurtamento telomérico tem um efeito de supressão tumoral. O progressivo encurtamento telomérico, em virtude das sucessivas divisões celulares, modula a expressão de proteínas de supressão tumoral como a p53, pRB e p16 que atuam nos complexos mecanismos biológicos de indução da senescência replicativa ou apoptose (ARTANDI, DEPINHO, 2000).

Segundo Feldser, Hackett e Greider (2003), o aumento da instabilidade cromossômica gerada pela disfunção telomérica é um fator crucial na fase inicial da carcinogênese, pois recentemente foram constatados vários níveis de disfunção telomérica na formação das neoplasias intraepiteliais que são alterações precursoras de carcinomas.

Gisselsson et al. (2002) investigaram a relação entre as anormalidades teloméricas e as aberrações cromossômica em células de neoplasias malignas de cabeça e pescoço. Os resultados mostraram que as células malignas que apresentavam altas taxas de anormalidades mitóticas e altos níveis de cromossomos dicêntricos também apresentavam alta prevalência de disfunção telomérica.

Meeker et al. 2004 avaliaram a prevalência de células com disfunção telomérica em lesões precursoras de câncer epitelial (neoplasias intraepiteliais) de diversos sítios tumorais. As anormalidades teloméricas e mais especificamente do encurtamento telomérico foram constatadas respectivamente em 97,1 % e 88,6 % dos casos em todos os sítios analisados. Os autores concluem que existem fortes evidências do envolvimento da disfunção telomérica na indução da instabilidade cromossômica e na iniciação dos carcinomas.

1.1.2.5 Envelhecimento e estímulo pró-oncogênico

Outra hipótese para ação das células senescentes na carcinogênese é o potencial dessas células em secretar fatores que podem destruir a integridade tecidual e estimular a proliferação de células malignas. O aumento no número de células senescentes em órgãos e tecidos associado a maior liberação de fatores de degradação tecidual por estas células pode conduzir ao mau funcionamento dos órgãos e eventualmente ao declínio da função do organismo (SCHWARTSBURD, 2004). Depinho (2000), Krtorica e Campisi (2002) sugerem também que o acúmulo das células senescentes nos tecidos, com o envelhecimento, pode criar alterações no estroma tecidual que estimulam a proliferação de células neoplásicas.

Krtorica et al. (2001) investigaram o comportamento de linhagens de células neoplásicas e pré-neoplásicas de origem epitelial em cultura de fibroblastos jovens e fibroblastos senescentes. Foi constatado um aumento da proliferação das células pré-neoplásicas nas culturas de fibroblastos senescentes em relação às culturas de fibroblastos jovens. Nas culturas de fibroblastos senescentes também foi constatado uma maior progressão das células pré-neoplásicas no caminho da transformação maligna. Os autores concluíram que as células senescentes criam um ambiente que pode estimular a progressão de células tumorais.

Segundo Schwartsburd (2004), os idosos têm dificuldade em combater patógenos devido à imunossupressão, o que favorece a persistência de processos infecciosos e o estabelecimento de processos inflamatórios crônicos. Os autores sugerem que esta situação pode estimular a criação de um ambiente tecidual pró-

oncogênico por dois mecanismos: (1) irritação crônica de patógenos que resistem a defesa do organismo, (2) ação dos metabólitos do processo inflamatório crônico. Outro fator é desregulação da produção de citocinas e mediadores químicos do processo inflamatório com o envelhecimento. Ocorre um aumento da produção de moléculas pró-inflamatórias envolvidas na carcinogênese como a prostaglandina E (PGE), a cicloxigenase 2 (COX-2), a metaloproteinase de matriz 9 (MMP-9) e as ROS.

As alterações na matriz extracelular com o envelhecimento têm sido propostas como uma das possíveis causas do aumento da incidência de carcinomas em função a idade. Segundo Ktorica e Campisi (2003), o aumento na liberação de citocinas e de fatores de crescimento, o acúmulo de células senescentes no ambiente tecidual e as alterações da matriz extracelular com o envelhecimento podem atuar sinergicamente com o acúmulo nas taxas de mutações celulares no sentido de criar um estado pró-oncogênico.

1.1.2.6 Imunosenescência e câncer

A resposta imunológica do hospedeiro ao câncer pode envolver tanto a resposta imune adaptativa específica para antígenos presentes nas células malignas quanto uma resposta inata para as características que são próprias dessas células. A resposta imune específica ocorre em virtude da expressão de antígenos tumorais: proteínas mutadas originadas da expressão de oncogenes (*p53*, *Ras*...), proteínas normais superexpressas (tirosinase, gp100), produtos de vírus oncogênicos (papiloma vírus, E6, E7...) e proteínas induzidas pelo estresse (MICA, MICB). Já a resposta imune

inata antitumoral compreende principalmente a ação dos monócitos, neutrófilos e células dendríticas (NAKACHI et al., 2004).

A imunosenescência é caracterizada por modificações da imunidade humoral e citotóxica relacionadas ao envelhecimento e acredita-se que esse processo influencie na diminuição da imunidade antitumoral com o avanço da idade (URBAN, SCHREIBER, 1984; WIN, UENAKA, NAKAYAMA 2002; NORIAN, ALLEN, 2004).

Segundo Urban e Schreiber (1984) ratos velhos têm menos habilidade em produzir defesa citotóxica antitumoral. Em seu estudo foi demonstrado que esse defeito pode ocorrer em virtude da baixa responsividade das células precursoras de células T tumor- específicas (Lyt-2⁺). Win, Uenaka e Nakayama (2002) e Haynes et al. (2004) também afirmam que em ratos velhos ocorre deficiência na produção de resposta citotóxica. Os autores sugerem que este fato pode ocorrer devido a diminuição da capacidade proliferativa e redução na síntese de interleucina-2 (IL-2) pelas células T CD4⁺.

Outra evidência na alteração da resposta antitumoral com o envelhecimento é a capacidade reduzida dos macrófagos velhos em sintetizar o fator de necrose tumoral (TNF), a interleucina-1(IL-1) e o óxido nítrico (NO). Essas são moléculas efetoras na inibição do crescimento tumoral e na destruição das células tumorais (WALLACE et al., 1995).

Win, Uenaka e Nakayama (2002), Norian e Allen (2004) afirmam que as células T CD8⁺ não apresentam uma redução populacional ou deficiências intrínsecas na

citotoxicidade com o envelhecimento. Por outro lado, Messaoudi (2004) sugerem que com a idade, ocorre a perda funcional da expansão clonal de células T CD8⁺ na resposta antiviral e antigênica.

Plowden et al. (2004) demonstrou que as células T CD8⁺ de ratos velhos não apresentam defeitos na indução proliferativa por antígenos, quando estimuladas por células apresentadoras de antígenos (APCs) de ratos jovens. Entretanto, as células T CD8⁺ de ratos jovens exibem uma redução na expansão proliferativa e uma significativa diminuição da produção do Interferon gama (IFN- γ), quando estimuladas por APCs de ratos velhos. Os autores sugerem que as APCs velhas são defeituosas na expressão de moléculas co-estimuladoras e na secreção de citocinas que podem influenciar na deficiência de estimulação e da expansão clonal das células T CD8⁺.

Mesmo com resultados adversos na literatura, a maioria dos estudos relatam que os idosos apresentam um aumento na população das células natural killer (Nks) no sangue periférico. Entretanto, paralelamente a esta constatação, tem se verificado que com o avanço da idade ocorre uma diminuição na citotoxicidade dessas células (SOLANA, MARIANI, 2000). Essa diminuição na citotoxicidade tem sido atribuída a uma menor capacidade de ligação a antígenos, incluindo os antígenos específicos de células tumorais, (DUSSAULT, MILLER, 1994) e a menor capacidade de secreção de perforinas (RUKAVINA et al., 1998).

1.2 Câncer bucal

O CEB corresponde a 95% das neoplasias malignas da cavidade bucal, sendo que sua maior prevalência ocorre em indivíduos de meia idade (40 anos) e idosos, com predileção pelo gênero masculino, em relação ao feminino (NEVILLE, DAY, 2002). A estimativa de incidência de câncer para o ano de 2006, no Brasil, indica o tumor de cavidade oral como o 8º mais freqüente entre os homens (10.060 novos casos) e o 9º entre as mulheres (3.410 novos casos). No Rio Grande do Sul a estimativa da incidência de novos casos de câncer bucal para o ano de 2006 é de 800 novos casos entre homens e 220 novos casos entre mulheres (INCA, 2006).

As lesões pré-malignas do CEB inicialmente podem assumir o aspecto clínico em forma de uma placa branca (leucoplásica) ou avermelhada (eritroplasia). A condição de lesão maligna pode apresentar-se clinicamente como ulcerações com bordas endurecidas de fundo necrótico e dolorosa ou ainda como uma lesão exofítica vegetante indolor (NEVILLE et al., 1998).

O câncer é considerado uma doença multifatorial relacionada a fatores intrínsecos como a idade, o gênero, a raça, o sistema imunológico e o componente genético. Os fatores extrínsecos mais associados ao câncer bucal são o alcoolismo, o tabagismo, a radiação solar, os fatores ocupacionais e os agentes biológicos, sendo o tabagismo e o alcoolismo os principais fatores de risco do câncer no sítio intrabucal. O tabaco possui 60 substâncias com reconhecida ação carcinogênica e o seu uso crônico está relacionado com 80 % dos indivíduos com câncer bucal. Já o alcoolismo crônico, principalmente de bebidas destiladas, está associado ao alto índice de neoplasias de

assoalho bucal, língua e faringe. O álcool associado ao tabaco suscita um efeito sinérgico no potencial carcinogênico, aumentando consideravelmente o risco de desenvolver o câncer bucal em relação ao uso somente do tabaco ou do álcool (NEVILLE et al., 1998; OGDEN, 2005).

Com o avanço dos estudos sobre o comportamento tumoral foram estabelecidos alguns parâmetros clínicos e biológicos, a fim de indicar a extensão, o comportamento e o prognóstico da doença. O estadiamento clínico TNM preconizado pelo *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) e pela *International Union Against Cancer* (UICC) é comumente utilizado para a avaliação da extensão e do prognóstico do CEB, onde T é a medida do tumor primário, N é a presença de metástase em linfonodos regionais e M a presença de metástases à distância (UICC, 2005).

A utilização da gradação histológica como indicador de comportamento biológico tumoral foi preconizada por Broders 1941. Entretanto, Arthur e Fenner em 1966 foram os primeiros a sugerir um escore de malignidade para o CEB. Depois de diversas sugestões de modificações nas variáveis do escore de malignidade proposto por Arthur e Fenner em 1966, Anneroth, Batsakis e Luna em 1987 propuseram um sistema de escore de malignidade de fácil reprodutibilidade que tem sido utilizado como referência nos estudos que envolvem a caracterização da gradação de malignidade para o câncer bucal (MARTINS, 2001).

Bryne et al. (1989) e Bryne et al. (1992) propuseram um sistema de gradação de malignidade para o CEB onde as características histopatológicas analisadas no sistema de graduação de malignidade preconizado por Anneroth, Batsakis e Luna (1987) sejam

realizadas na linha de invasão tumoral. Esses autores sugerem que esta região representa melhor o comportamento biológico em relação à agressividade tumoral, à presença de metástases regionais e à distância, e à sobrevida do paciente do que a região central dos tumores.

Com o avanço das pesquisas biogerontológicas e oncogeriátricas tem se procurado verificar alterações comportamento tumoral de acordo com a idade do paciente. Em relação ao câncer bucal, recentes estudos sugerem um aumento da incidência de CEBs em pacientes adultos jovens (<45anos) em várias regiões do mundo como nos Estados Unidos (MYERS et al., 2000), na Escandinávia (ANNERTZ et al., 2002) e na Tailândia (IAMAROON et al., 2004). Esses estudos têm procurado analisar os aspectos clinico-patológicos das neoplasias malignas bucais que acometem os pacientes adultos jovens, comparado-os com outras faixas etárias, principalmente no que tange ao aumento da incidência, etiologia, comportamento tumoral, protocolos terapêuticos e respostas ao tratamento.

Kuriakose et al. (1992) compararam os aspectos clínicos-patológicos de CEBs em pacientes indianos adultos (< 60 anos) e idosos (60 anos). Nos pacientes jovens ocorreram maior prevalência do gênero feminino, predomínio de lesões invasivas no sítio lingual e rápido desenvolvimento de metástases regionais. Em contraste, nos pacientes idosos o gênero masculino, as lesões exofíticas nos sítios jugal e gengival e o desenvolvimento de metástases regionais tardias foram mais prevalentes.

Siegelmann-Danieli et al. (1998) compararam os aspectos clínicos-patológicos de 30 CEBs de pacientes abaixo de 45 anos e 57 CEBs de pacientes acima de 46 anos.

As variáveis analisadas foram o consumo de álcool, o tabagismo, a recorrência tumoral e a sobrevida livre de câncer em 5 anos. O consumo de álcool e tabaco esteve presente em 40% em adultos jovens (<45 anos) e em 80% dos pacientes acima dos 46 anos, entretanto, não foi encontrada relação estatisticamente significativa na recorrência tumoral e na sobrevida livre de câncer em 5 anos entre as grupos etários analisados.

Friedlander et al. (1998) compararam o comportamento clínico de CEBs do sítio lingual oriundos de pacientes adultos jovens (<40 anos) e idosos (>65 anos). Em pacientes adultos jovens a recorrência tumoral foi de 44% enquanto que nos idosos foi de 22%. Os resultados referentes à sobrevida de 5 anos sem doença e a presença metástases à distância não evidenciaram diferenças significativas entre os grupos pesquisados.

Verschuur et al. (1999) analisaram 185 carcinomas da região de cabeça e pescoço de pacientes com idade abaixo de 40 anos e acima de 40 anos. Os resultados demonstraram que não houve diferenças estatisticamente significantes na morte específica por câncer em 5 anos em pacientes abaixo e acima de 40 anos, entretanto os indivíduos acima de 40 anos tiveram maior recorrência tumoral e menor sobrevida no tempo de seguimento do estudo. Pitman et al. (2001) em seu estudo avaliando a recorrência tumoral após 3 anos do tratamento cirúrgico em pacientes com CEBs de língua com idade abaixo e acima de 40 anos sugerem que não há necessidade de alteração de protocolos de tratamento do CEB em virtude da idade do paciente.

Yamazaki et al. (1997) estudaram a influência da idade na recorrência local e morte por tumor e de 152 CEBs de língua em pacientes submetidos ao tratamento

cirúrgico associado à radioterapia. Os autores encontraram diminuição significativa ($p=0,003$) na recorrência local dos tumores em idosos (62 %/ > 65 anos) quando comparado ao grupo controle (90 %/ < 65 anos) e a menor incidência de morte associada ao tumor em idosos (75 %) em relação ao grupo controle (93 %), considerando 10 anos de seguimento ($p=0,02$). Foi concluído também que a idade pode ser um fator predictivo importante para a recidiva tumoral local em CEB de língua.

Perussi et al. (2002) avaliaram os aspectos clínicos de 562 CEBs de pacientes idosos do estado de São Paulo. A relação masculino:feminino foi de 3:1 em pacientes com 60 anos ou mais, enquanto que pacientes abaixo de 60 anos de idade, esta relação foi de 8:1. O sítio lingual foi predominante em ambos grupos etários pesquisados. Não foram observadas diferenças na percentagem de óbitos entre jovens e adultos no período entre seis meses e cinco anos de seguimento. Os autores sugerem que em virtude da maior incidência de morte por doenças crônico-degenerativas em idosos, esse aspecto pode ser um fator confundidor para a análise dos resultados sobre morte específica por câncer.

Popovtzer et al. (2004) analisaram o comportamento biológico e o curso clínico do CEB de língua em pacientes jovens. Os autores concluíram que em pacientes jovens, existem dois padrões distintos de agressividade e prognóstico: 1) padrão extremamente agressivo com taxa de mortalidade de 40% em dois anos, comparado com 10 % de mortalidade nos idosos 2) padrão indolente, com sobrevida livre de doenças tumor-específica de 15 anos, semelhante ao curso clínico dos carcinomas bucais em idosos.

Sasaki et al. (2005) analisaram os aspectos clínicos e patológicos de CEBs de língua em pacientes com idade abaixo de 40 anos. Os resultados encontrados não mostraram diferença no prognóstico dos tumores em pacientes abaixo e acima de 40 anos. Os autores afirmam que o estadiamento clínico e o modo de invasão são os fatores mais importantes do que a idade no prognóstico destes pacientes.

Os estudos sobre as diferenças biomoleculares dos CEBs em adultos jovens e idosos ainda são escassos. Regezi et al. (1999) analisaram as alterações na expressão de proteínas do ciclo celular p53, p21, pRB e MDM2 em CEBs da região lateral de língua de pacientes com idade abaixo de 35 anos e acima de 75 anos. Os resultados evidenciaram que as proteínas p53, p21, pRB e MDM2 estão super expressas em CEBs laterais de língua, entretanto, não foram verificadas diferenças na expressão dessas proteínas entre as faixas etárias analisadas.

1.3 Angiogênese e câncer

A ação da angiogênese na biologia tumoral foi preconizada por Folkman em 1971. Naquela ocasião o pesquisador afirmou que “as células tumorais liberam substâncias que induzem a migração de vasos sanguíneos do tecido adjacente para o interior da massa tumoral”. Esta teoria foi inicialmente refutada pela comunidade científica, entretanto, a partir do avanço nos estudos envolvendo a identificação dos fatores angiogênicos e a biopatogênese tumoral nas décadas de 80 e 90, a teoria de Folkman foi paulatinamente aceita. Atualmente, existem evidências experimentais e clínicas de que a microvasculatura tumoral exerce importante função na progressão, crescimento, metástase, latência e apoptose de células tumorais (MAKHNI, 2003).

Segundo Folkmann (1990), a maioria dos tumores e metástases originam-se como pequenas estruturas celulares avasculares que induzem a neoformação vascular, após poucos milímetros de tamanho. Polverini (2002) postula que a angiogênese tumoral pode ter diversas origens: a) expansão dos vasos do hospedeiro para o espaço intratumoral; b) formação de vasos tumorais, a partir do estímulo as células endoteliais pré-existentes no tecido adjacente ao tumor c) formação dos vasos tumorais, a partir de precursores endoteliais embrionários (vasculogênese).

Stoll et al. (2003) analisaram, através de modelos matemáticos, os resultados dos estudos que envolvem a contribuição do endotélio pré-existente no tecido adjacente ao tumor e das células progenitoras endoteliais embrionárias derivadas da medula óssea na angiogênese tumoral. Os autores concluíram que a participação do componente celular endotelial local na angiogênese tumoral é significativamente maior do que dos precursores endoteliais embrionários.

Segundo Gasparini (1999), ocorrem diferenças estruturais nos vasos intratumorais em relação aos demais vasos sanguíneos do organismo. Geralmente a arquitetura vascular tumoral é caracterizada pela pobre diferenciação endotelial, má formação da membrana basal, fragilidade capilar e tortuosidades. O autor salienta que essas peculiaridades da estrutura vascular intratumoral têm sido uma barreira para o controle e efetividade da terapia anti-angiogênica.

Nas últimas décadas, inúmeros estudos foram desenvolvidos a fim de correlacionar os fatores angiogênicos e a densidade vascular do tumor com os aspectos

clínicos-patológicos dos tumores (FOLKMAN, 1990; ALBO et al., 1994; SCHIMMING, MARME, 2002; SCHIMMING et al., 2004 e NAGATSUKA et al., 2005). Depois do emprego de diversas propostas metodológicas para a quantificação da vasculatura intratumoral, as áreas de maior densidade vascular (*hot spots*) foram consideradas as áreas preferenciais para a quantificação da densidade vascular dos tumores (VERMEULEN et al., 1996, VERMEULEN et al., 2002). Weidner et al. (1991) descreveram o método de escolha dessas áreas de maior densidade vascular intratumoral e desde então essa metodologia tem sido padronizada para estudos que objetivam a quantificação vascular intratumoral.

Em virtude dos diferentes resultados encontrados nos estudos envolvendo angiogênese tumoral e o avanço dos testes de medicamentos anti-angiogênese tumoral, nos anos de 1996 e 2002 foram realizados o primeiro e o segundo Consenso Internacional de Metodologia e Critério de Avaliação em Quantificação de Angiogênese em Tumores Sólidos Humanos. Os principais problemas levantados nos estudos sobre a angiogênese foram a falta de padronização da metodologia empregada na escolha do marcador imunohistoquímico, na seleção das áreas de maior densidade vascular, no método de contagem e na variação intra-observador e interobservador (VERMEULEN et al., 1996; VERMEULEN et al., 2002).

Os marcadores endoteliais CD31, CD34, Fator VIII, RW 200 e CD105 são os mais utilizados na análise de microvasculatura tumoral através da técnica imunohistoquímica (VERMEULEN et al., 2002). Entretanto, recentemente Fonsate et al. (2003) indicam a endogлина (CD105) como o marcador endotelial mais indicado no monitoramento terapêutico do tratamento anti-angiogênico em neoplasias malignas e

salientam que inúmeras pesquisas evidenciam esse marcador como um importante fator de prognóstico para a presença de metástases regionais e sobrevida dos pacientes oncológicos.

A endoglina (CD105) é uma glicoproteína expressa no endotélio angiogênico peritumoral e intratumoral e a sua ação está relacionada à ativação da proliferação endotelial (FONSATII et al., 2003). Segundo Schimming e Marme (2002), Schimming et al. (2004) e Nagatsuka et al. (2005), a endoglina é o marcador endotelial com melhor especificidade para avaliação do padrão da angiogênese em CEBs, pois esta glicoproteína está envolvida no processo de indução da neovascularização. Deste modo, esta característica permite uma melhor avaliação do estado proliferativo da vasculatura tumoral.

Nas últimas décadas tem sido investigada a relação entre a angiogênese intratumoral e a iniciação e progressão do CEB, bem como o uso do tabaco, o consumo de álcool, a agressividade tumoral, a produção de metástases, a sobrevida do paciente, a resposta ao tratamento e a recorrência tumoral (HANNEN, RIEDIGER, 2004).

Albo et al. (1994) avaliaram a relação entre o grau de angiogênese intratumoral e os aspectos clínicos de carcinomas de cabeça e pescoço. Os resultados mostraram que a microdensidade vascular (MDV) pode ser utilizada como fator de prognóstico independente para a recorrência tumoral e a presença de metástases regionais. Os autores sugerem ainda que a MDV intratumoral pode ser útil na triagem de pacientes que necessitam de terapia agressiva.

Alcade et al. (1997) analisaram a correlação entre a angiogênese e a presença de metástases regionais de 55 CEBs. Os autores encontraram uma correlação significativa entre a MDV intratumoral e a presença de metástases regionais. Em semelhante estudo Artese et al. (2001) relacionaram a MDV intratumoral com a gradação histológica e a presença de metástases regionais em 52 casos de CEBs. Foi verificada que a alta MDV foi relacionada com os carcinomas que apresentavam pouco grau de diferenciação e positivos para metástases regionais.

Macluskey et al. (2000) analisaram as taxas de angiogênese na mucosa bucal e na progressão do câncer bucal. O padrão de angiogênese foi verificado em espécimens da mucosa normal, em tecido displásico e no CEB. A angiogênese aumentou significativamente ($p=0.0001$) no sentido da progressão do carcinoma bucal tendo como referência a mucosa normal. Segundo os autores estes resultados evidenciaram a importância da angiogênese na progressão do câncer bucal.

Lopez-Graniel et al. (2001) estudaram a correlação entre a MDV intratumoral e as variáveis, estadiamento clínico TNM, recorrência tumoral e presença de metástases regionais em 33 amostras de CEBs. Foi encontrada correlação estatisticamente significativa entre a alta MDV e a recorrência tumoral, a presença de metástases regionais e o tamanho do tumor. No entanto, TAE et al. (2000), ao avaliar 57 biópsias de pacientes com carcinomas de cabeça e pescoço sendo que 19 amostras eram de CEBs, não encontraram uma correlação significativa entre a MDV intratumoral, o estadiamento TNM e a presença de metástases regionais.

Schimming et al. (2004) analisaram a expressão do fator de crescimento endotelial vascular (VEGF) e o marcador vascular de neo-angiogênese CD105 em 51 CEBs. A quantificação da expressão do VEGF não mostrou relação estatisticamente significativa com o estadiamento TNM dos tumores. No entanto a marcação da CD105 apresentou correlação significativa com o estadiamento TNM, onde os tumores com estadiamento T1 possuíam uma menor taxa de neovascularização do que os tumores com os estadiamentos T2, T3 e T4.

1.4 Angiogênese e envelhecimento

A neoformação vascular é um importante evento biológico na manutenção da fisiologia do organismo, na inflamação, na reparação tecidual e também está envolvido em inúmeras patologias como o câncer, retinopatia diabética, artrite reumatóide e doenças vasculares. Os vasos sanguíneos têm a função de prover o aporte de nutrientes, oxigênio e sinalizadores hormonais contidos no sangue que atuam no controle das atividades celulares sejam fisiológicas ou patológicas (DISTLER et al., 2003).

Existem dois processos distintos de neoformação vascular: a vasculogênese e a angiogênese. A vasculogênese ocorre principalmente na fase embrionária onde os plexos capilares se originam de precursores endoteliais de origem mesodérmica. Na angiogênese, a formação das novas células endoteliais dá-se a partir de vasos pré-existentes nos tecidos e isto ocorre tanto na fase embrionária como na vida pós-natal (LUTTUN, CARMELIET, 2004). A angiogênese é um processo complexo que envolve as fases de proliferação, migração e diferenciação endotelial. Em todas essas fases existe um orquestramento específico de eventos celulares e moleculares, sendo que a

formação vascular dependerá do balanço das ações pró-angiogênicas e anti-angiogênicas (GUPTA, QIN, 2003).

Além das inúmeras alterações fisiológicas que ocorrem com o envelhecimento, tem-se evidenciado experimental e clinicamente a diminuição da capacidade de neoformação vascular com o avanço da idade (PUOLAKKAINEN et al., 1995). Essa menor capacidade de neoformação vascular com o envelhecimento tem sido atribuída principalmente à diminuição da capacidade proliferativa endotelial e a diminuição na expressão de fatores pró-angiogênicos (SADOUN, REED, 2003).

Os estudos de Phillips e Stone (1994) verificaram que com o envelhecimento a menor capacidade de neovascularização na reparação tecidual pode ocorrer em virtude da diminuição da capacidade proliferativa e migração celular endotelial em resposta ao fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF). Do mesmo modo, Reed et al. (1998) constataram uma diminuição na expressão do colágeno tipo 1 e do fator de crescimento e transformação-1 beta (TGF-1beta) no tecido neo-angiogênico subcutâneo de ratos velhos em relação a ratos jovens.

Rivard et al. 1999 analisaram a expressão do VEGF e das taxas de neovascularização colateral por meio de uma isquemia induzida na arterial femoral de coelhos. Foi constatado que nos animais velhos ocorreu uma menor taxa de angiogênese e menor expressão do VEGF, quando comparado aos animais jovens.

Segundo o experimento de Sadoun e Reed (2003), a alteração na capacidade angiogênica com o avanço da idade ocorre devido à baixa expressão do TGF-1 e do

VEGF além da alta expressão da tromboplastina-2 (TSP-2). AGAH et al. (2004) estudaram o efeito do envelhecimento na expressão das proteínas TSP-2 e metaloproteinase de matriz-2 (MMP-2). Os resultados mostraram que com o envelhecimento ocorre aumento da expressão dessas proteínas na região da neoformação vascular. Os autores sugerem que a super expressão dessas proteínas podem colaborar para a diminuição da capacidade de neoformação vascular com a idade, pois elas possuem efeitos inibidores no processo angiogênese.

Shimada et al. 2004 investigaram os efeitos do envelhecimento na angiogênese e vasculogênese em camundongos mutantes klotho (KL). Esses camundongos alterados geneticamente são considerados modelos animais para estudos sobre o envelhecimento. A partir de uma isquemia induzida em camundongos KL e camundongos normais, foi verificada a supressão da angiogênese, a diminuição da enzima óxido nítrico sintetase produzida pelo endotélio vascular e a diminuição da incorporação de células precursoras de endotélio da medula óssea vermelha (vasculogênese) no grupo experimental em relação ao controle. Os autores concluem que ocorre diminuição na neo-angiogênese e vasculogênese no modelo animal de estudo do envelhecimento

Até então a relação entre o potencial angiogênico, crescimento tumoral e o envelhecimento foi pouco explorada na literatura. Walmsley et al. (1987) analisaram o padrão de crescimento tumoral e neoformação vascular em tumores originados de linhagens de células malignas (melanoma B16 e F10) implantadas em ratos jovens e ratos velhos. Os resultados mostraram que em ambos tumores formados a partir das duas linhagens de melanomas investigadas presentes nos ratos velhos ocorreram menores crescimento tumoral, densidade vascular e padrão de invasão tecidual. A maior

tortuosidade do lúmen vascular também foi encontrada nos tumores presentes nos ratos velhos em relação aos ratos jovens.

Kreisle et al. (1990) investigaram o padrão de crescimento tumoral e a neo-angiogênese na formação tumoral a partir de linhagem de células de melanoma (B16) e fibrossarcoma (SP1) implantadas em ratos jovens e velhos. O volume tumoral foi menor nos ratos velhos em relação aos jovens para o melanoma B16, entretanto, para o fibrossarcoma não houve alteração no volume tumoral em ambas idades analisadas. Em relação à neo-angiogênese, foi verificada uma diminuição no grupo dos ratos velhos em relação aos ratos jovens nas duas linhagens de tumores analisados.

Pili et al. (1994) estudaram as alterações no padrão de crescimento tumoral e na neo-angiogênese intratumoral de acordo com a idade do hospedeiro. Células tumorais da linhagem de melanoma B16 foram injetadas em camundongos jovens e velhos. Foi constatado que nos hospedeiros jovens os tumores tiveram maior tamanho e maior vascularização do que nos tumores de hospedeiros velhos. Os tumores nos hospedeiros velhos também apresentaram baixa taxa de síntese de DNA e quando esses eram transferidos para os hospedeiros jovens, ocorria um rápido crescimento tumoral.

Donin et al. (1997) avaliaram o padrão de crescimento de tumores originados de linhagens de células de melanoma B16 e de uma linhagem de melanoma altamente agressivo (B16/Col/R) implantados em camundongos jovens e de meia idade. Em ambas linhagens tumorais ocorreu um maior crescimento tumoral em camundongos jovens em comparação aos de meia idade, sendo que na linhagem de melanoma B16/Col/R, a redução no crescimento tumoral nos camundongos de meia idade foi seis

vezes maior do que em camundongos jovens, enquanto que na linhagem B16 a redução foi de apenas duas vezes.

Considerando os conhecimentos disponíveis na literatura e descritos até aqui torna-se evidente que ainda há muitos eventos biológicos que ocorrem durante o envelhecimento a serem estudados e compreendidos. A literatura sobre as ações do envelhecimento nos tecidos bucais é escassa e muitas vezes as pesquisas odontológicas não têm acompanhado a evolução do conhecimento gerontológico.

A neo-angiogênese que sofre alterações em sua dinâmica em diversos órgãos e tecidos do organismo com a idade, mas que pouco se sabe sobre o efeito do envelhecimento na neo-angiogênese nos tecidos bucais ou mesmo no câncer bucal.

A angiogênese tem sido apontada como um importante fator de prognóstico para o câncer bucal, com isso achamos importante avaliar a influência do envelhecimento nas taxas de neo-angiogênese. Acreditamos que os resultados desse estudo sejam importantes para se sugerir a necessidade de ajustes nos resultados quantitativos da angiogênese em virtude da idade do paciente. Além do que, os resultados gerados nesse estudo pode nos ajudar a compreender melhor a influencia da angiogênese no comportamento CEBs em indivíduos adultos e idosos.

1.5 Proposição geral

Investigar, através da técnica de imunohistoquímica, a presença da glicoproteína (CD105), sua relação com a neo-angiogênese intratumoral e os aspectos clínico-patológicos do carcinoma epidermóide bucal em adultos e idosos.

1.5.1 proposições específicas

- Comparar as taxas de neo-angiogênese tumoral no carcinoma epidermóide bucal entre pacientes adultos e idosos.
- Investigar a relação entre a neo-angiogênese do carcinoma epidermóide bucal e os aspectos clínico-patológicos nos grupos de indivíduos adultos e idosos.
- Analisar os aspectos anátomo-patológicos dos carcinomas epidermóides bucais em adultos e idosos.

MATERIAIS E MÉTODOS

2.1 Aspectos bioéticos

A presente investigação está em conformidade com as Diretrizes e as Normas Regulamentadoras de Pesquisa Envolvendo Seres Humanos (Resolução CNS 196/96). O projeto de pesquisa deste estudo foi aprovado pela Comissão Científica do Programa de Pós-Graduação em Gerontologia Biomédica da PUCRS e pelo Comitê de Ética em pesquisa do Hospital São Lucas da PUCRS (Protocolo número 403/05 - Anexo 1).

2.2 Amostras investigadas

Esta investigação foi desenvolvida a partir de 27 amostras de carcinoma epidermóide bucal (CEB), procedentes do Laboratório de Patologia Clínica Dr. Zanol e do Serviço de Estomatologia Clínica da Faculdade de Odontologia da PUCRS.

Os critérios de inclusão das amostras neste estudo seguiram a orientação de Kowalsky et al. (1999) adaptada:

- a) Tumor primário em cavidade bucal com diagnóstico confirmado por exame histopatológico.
- b) Pacientes não submetidos a tratamento prévio (quimioterapia e/ou radioterapia).
- c) Disponibilidade de fragmentos do tumor em blocos de parafina em condições de processamento imunohistoquímico.

2.3 Variáveis

2.3.1 Variáveis descritivas

As variáveis descritivas do estudo são: a faixa etária, onde o grupo dos adultos foi constituído por indivíduos com idade abaixo dos 60 anos, aqueles pacientes com 60 anos de idade ou mais constituíram o grupo dos idosos, o gênero (masculino ou feminino), o sítio de localização (1-língua, 2-assoalho, 3-mucosa jugal, 4-gengiva, 5-palato duro, 6-área retromolar) e a gradação de malignidade. Os dados relativos à idade, ao gênero e à localização foram coletados nas fichas clínicas dos pacientes. A variável gradação de malignidade foi estabelecida segundo a descrição do item 2.4.

2.3.2 Variável experimental

A variável experimental desse estudo é a marcação imunoistoquímica com o anticorpo endoglina (CD 105) para a neo-angiogênese intratumoral.

2.4 Classificação histopatológica dos tumores

Realizou-se a confecção de cortes de 3 µm de espessura, sendo os mesmos corados pela técnica da hematoxilina-eosina (H&E), seguindo os procedimentos histotécnicos de rotina do Laboratório de Patologia e Citologia do Hospital São Lucas da PUCRS. Através da análise histológica em microscopia óptica foi escolhida uma área representativa da massa tumoral. Essa área de escolha deveria conter uma secção transversal do tumor e regiões da linha de invasão tumoral aos tecidos adjacentes.

A avaliação da gradação histológica de malignidade foi realizada individualmente por 2 examinadores utilizando-se um microscópio óptico binocular calibrado. O corte histológico foi percorrido com a lente objetiva de 100 X e 40 X. Utilizou-se o sistema de gradação de malignidade proposto por Bryne et al. (1989) que consiste na atribuição de escores que variam de 1 a 4 em cinco características histopatológicas na linha de invasão tumoral: grau de queratinização, pleomorfismo nuclear, número de mitoses, padrão de invasão e infiltração leucocitária (tabela 1). Os pontos de divergência entre os parâmetros analisados pelos examinadores foram reavaliados e estabelecidos por consenso. O escore de malignidade de cada tumor (EMT) foi determinado pela média da soma total de pontos dos parâmetros analisados conforme a fórmula a seguir:

$$\text{EMT} = \frac{\text{O total dos escores de cada parâmetro}}{\text{Número de parâmetros (5)}}$$

Tabela 1. Sistema de gradação de malignidade proposto por Bryne et al. (1989).

Aspecto Morfológico	Escore			
	1	2	3	4
Grau de Queratinização (Q)	Alta queratinização (>50% das células)	Moderada queratinização (21-50% de células)	Mínima queratinização (6-20% de células)	Nenhuma queratinização (0-5% de células)
Pleomorfismo Nuclear (PN)	Discreto PN (>75% das células bem diferenciadas)	Moderado PN (51-75% das células bem diferenciadas)	Abundante PN (26-50% das células bem diferenciadas)	Extremo PN (0-25% das células bem diferenciadas)
Número de Mitoses*(NM)	0-1	2-3	4-5	>5
Padrão de Invasão (PI)	Bordas bem definidas	Infiltração em cordões grossos ou ilhas	Pequenos grupos ou cordões celulares infiltrando (< 15 células)	Dissociação celular difusa e marcante com células infiltrando em forma individual ou pequenos grupos (< 5 células)
Infiltrado Leucocitário (IL)	Intenso	Moderado	Leve	Ausente

* Número de mitose analisado com objetiva de 40x.

Os CEBs com valores de EMT abaixo de 10 (EMT<10) foram considerados de baixo grau de malignidade ou alto grau de malignidade quando encontravam-se com valores igual ou acima de 10 (EMT>=10). A fim de categorizar as variáveis histopatológicas do sistema de Bryne (Tabela 1) essas foram reagrupadas de acordo com a tabela 2.

Tabela 2. Categorização das variáveis histopatológicas dos tumores de acordo com os respectivos escores do sistema Bryne et al. (1989).

Variáveis	Categorias	Escore
Grau de Queratinização (Q)	Alto	1-2
	Baixo	3-4
Pleomorfismo Nuclear (PN)	Alto	3-4
	Baixo	1-2
Número de Mitoses (NM)	Alto	3-4
	Baixo	1-2
Padrão de Invasão (PI)	Baixo	1-2
	Alto	3-4
Infiltrado leucocitario (IL)	Alto	1-2
	Baixo	3-4

2.5 Método imunoistoquímico

A técnica imunoistoquímica e a análise histopatológica dos espécimens tumorais foram realizadas no Laboratório de Pneumologia do Instituto de Pesquisas Biomédicas e Laboratório de Anatomia Patológica e Citopatologia da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Na marcação imunohistoquímica utilizou-se a técnica da streptavidina-biotina-peroxidase para o anticorpo endoglina[®]; Código NCL-CD105, clone 4G11(Novocastra[®], Newcastle, USA). As reações foram realizadas observando-se o seguinte protocolo: foram obtidas secções de 3 µm de espessura das peças incluídas em parafina. Os cortes foram colocados em lâminas Superfrost Plus[®] (Fischer Scinetific[®], Pittsburgh, Alemanha) e levados à estufa a 60°C por 24 horas. A desparafinização se deu por incubação em xileno por 10 minutos por três vezes, seguido da re-hidratação dos cortes em seqüência de etanol em concentrações decrescentes, começando com etanol absoluto, 90%, 80% e 70% por 3 minutos em cada diluição. A seguir, os cortes foram lavados três vezes em água destilada.

A recuperação dos sítios antigênicos com digestão por tripsina foi realizada por meio do aquecimento a 37°C de uma solução de tripsina 0,1% contendo 0,1% de cloreto de cálcio em pH 7,8. As lâminas foram incubadas nesta solução por 30 minutos a 37°C, seguido de uma lavagem com água destilada. Já a exposição do antígeno em alta temperatura se deu pela incubação das lâminas em berço de vidro, com Tampão Citrato

0,01M dispostos em ângulo de 45°, em potência média por 5 minutos e 50 segundos, seguido de 8 minutos em potência baixa (Microondas Panasonic, 1.500W).

Após a recuperação dos sítios antigênicos, seguiu-se o bloqueio da peroxidase endógena com 3% de H₂O₂. Após 10 minutos de incubação, as lâminas foram lavadas 3 vezes com água destilada e uma vez com PBS pH 7.2. Posteriormente, os cortes foram incubados por uma hora com o anticorpo primário Endoglin clone 4G11, diluído em solução diluente Dako® (Dako®, Carpinteria, USA) na concentração de 1:50, seguido de duas lavagens em (PBS).

Em seguida da incubação com o anticorpo primário, os cortes foram incubados com o sistema biotina-estreptavidina (Dako LSAB®2 System peroxidase, Carpinteria, USA), que consiste na incubação com anticorpo biotilado por 10 minutos, seguido de uma lavagem em PBS e posterior incubação com estreptavidina conjugado a peroxidase. Após 10 minutos de incubação, as lâminas foram lavadas em PBS e uma solução com diaminobenzidina líquida (Dako® Liquid DAB Substrate Chromogen system, Carpinteria, USA).

Após lavagem em água destilada, as lâminas foram contra-coradas com Hematoxilina de Harris por 15 segundos. Seguidas de três banhos de água, as lâminas foram mergulhadas em uma solução de amônia 37 mM. Após a contra-coloração, as lâminas foram lavadas em três banhos de água morna, seguidas de desidratação em concentrações crescentes de etanol (80%, 90% e puro, respectivamente) por 3 minutos em cada diluição. Após dois tratamentos por 5 minutos em xileno, os cortes foram cobertos com lamínulas montadas em Bálsamo do Canadá sintético® (Produtos

Citológicos Soldan[®], Porto alegre, Brasil). Lâminas com secções de tonsila foram eleitas como controle positivo do experimento, conforme a orientação do fabricante do anticorpo primário.

2.6 Determinação das regiões de maior densidade vascular e mensuração da densidade vascular

A avaliação da expressão do anticorpo endoglina (CD105) foi realizada nas áreas de maior densidade vascular. A escolha dessas áreas seguiu a orientação de Weidner et al. (1991). Esses foram identificados com auxílio do microscópio óptico Axioskop 40[®] (Carl Zeiss[®], Oberkochen, Alemanha) calibrado com aumentos de 50X e 100X. Após a eleição das regiões de maior densidade vascular do tumor, todos os campos com marcação positiva para endoglina foram nessas regiões foram capturados com objetiva de 100x através da câmera CoolSnapPro color[®] (Media Cybernetics[®] inc, Silver Spring, USA) acoplada ao microscópio óptico e conectada a um computador Pentium IV (Dell[®] Computer Corporation, Boston, USA) que continha o sistema computadorizado de captura de imagens Image-Pro Plus[®] versão 3.0 (Media Cybernetics[®] inc, Silver Spring, USA).

A identificação das células marcadas com o anticorpo anti-CD105 em 2 a 4 regiões de grande vascularização de cada espécime seguiu o protocolo de Weidner (1991) e Charpin et al. (2004), onde cada célula endotelial ou grupo de células endoteliais positivas para a endoglina são consideradas como vasos individuais, conforme setas indicativas na (Figura 2). A média do número de células marcadas nas áreas de maior densidade vascular escolhidas de cada espécime analisado foi

considerada como a microdensidade vascular do respectivo tumor. A MDV foi categorizada em padrão alto quando acima ou igual a 70 ($MDV \geq 70$) e padrão baixo quando esse valor era inferior a 70 ($MDV < 70$).

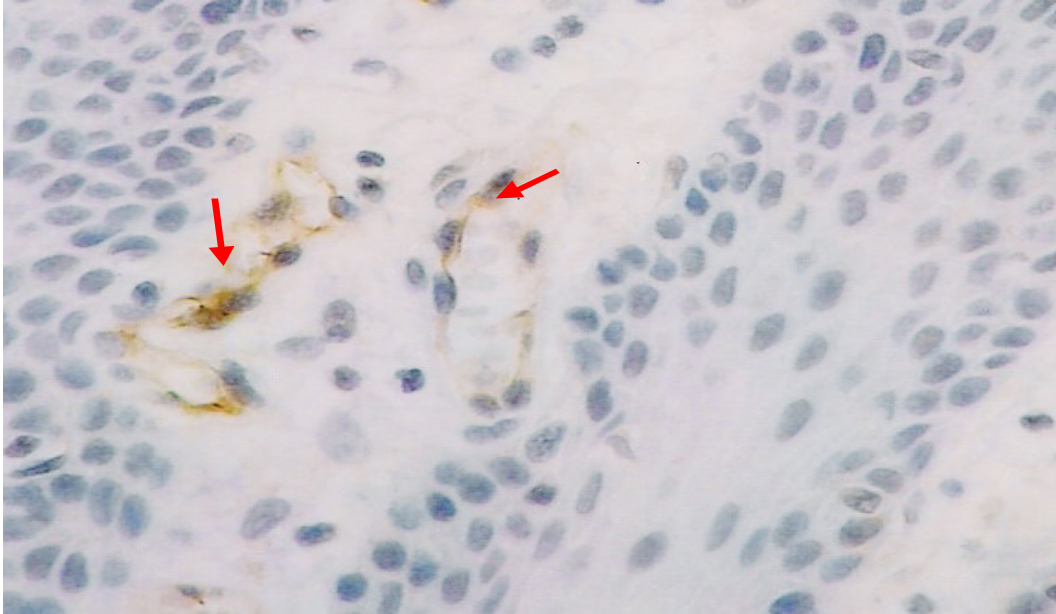


Figura 2. Fotomicrografia de células endoteliais positivas anti-CD105 (setas) nas regiões de maior vascularização do CEB. Aumento de 400 X.

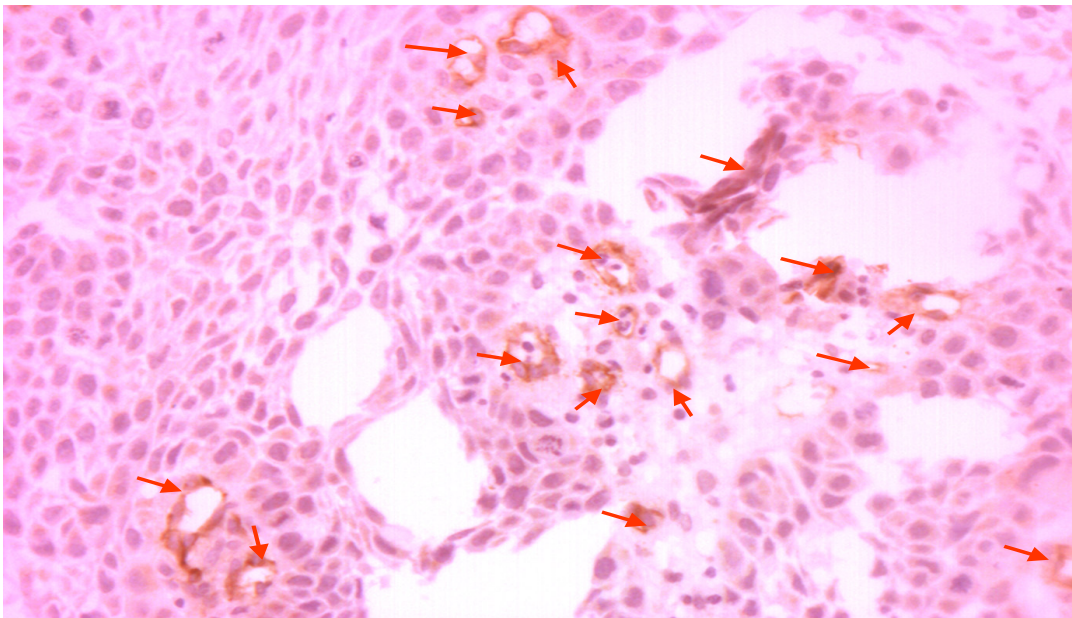


Figura 3. Imagem digitalizada da expressão do anticorpo anti-CD105 (setas) utilizada na quantificação da microdensidade vascular nos CEBs. Aumento de 200 X.

2.7 Análise estatística

A correlação entre as variáveis clínico-patológicas e média de densidade vascular foram analisadas no programa SPSS (SPSS[®] Inc, Chicago, EUA), versão 11.0 e o intervalo de confiança estabelecido para esta pesquisa foi de 95% ($p \leq 0,05$).

3 RESULTADOS

3.1 Parâmetros clínicos

Foram analisadas, neste estudo, 27 amostras de carcinoma epidemóide bucal (CEB). A média das idades de todos os indivíduos do estudo foi de 57 anos e 9 meses, sendo que no grupo com idade abaixo de 60 anos (adultos) a média foi de 43 anos e no grupo igual ou acima de 60 anos (idosos) a média foi de 69 anos e 8 meses. O gênero masculino foi mais prevalente em ambos os grupos, na relação 2.5:1 no grupo (adultos) e 3:1 no grupo (idosos) em relação ao gênero feminino. A distribuição da localização do CEBs nos sítios intrabucais de acordo com as faixas etárias investigada seguiu as proporções descritas na figura 4.

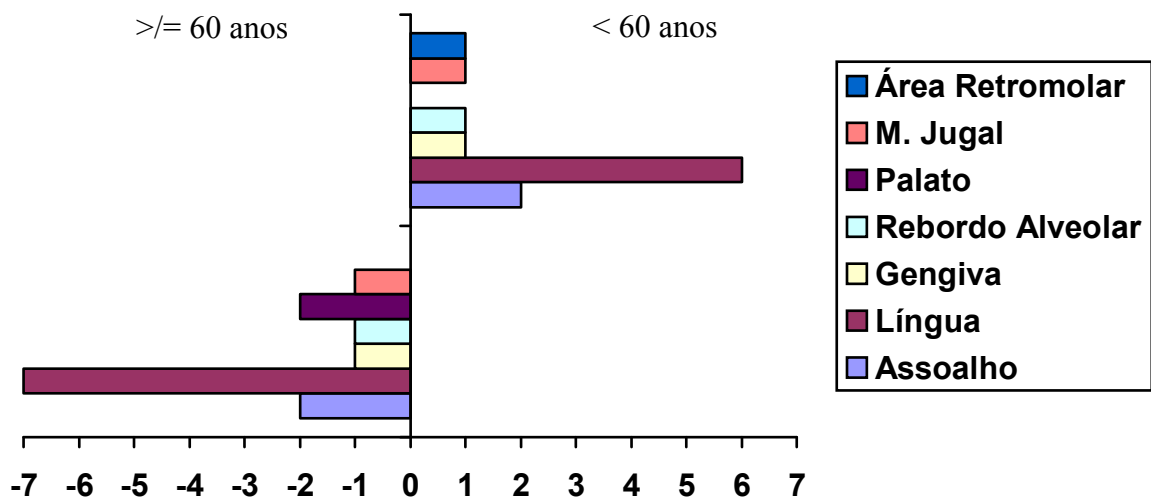


Figura 4. Distribuição da localização dos sítios dos CEBs de acordo com os grupos etários: (< 60 anos) e (>= 60 anos).

No grupo dos adultos houve uma prevalência pelo sítio lingual na relação 6/12 (50%), enquanto que no grupo dos idosos pelo sítio lingual na relação 7/13 (53%).

Tabela 3. Caracterização das variáveis clínicas, escores histopatológicos e MDV categorizados nos CEBs investigados.

		Localização	Idade	PI	Q	PN	NM	IL	EMT	MDV	MDV*
Adultos	1	Língua	56	1	1	1	2	1	7	59	1
	2	Língua	39	1	2	1	2	1	11	76	2
	3	Rebordo	52	1	1	2	1	1	9	81,5	2
	4	Assoalho	43	2	1	2	1	1	11	43	1
	5	Língua	47	2	2	1	1	2	15	70	2
	6	Língua	48	1	1	2	1	1	9	57	1
	7	Assoalho	55	2	2	2	2	2	16	180	2
	8	n.i	51	2	2	1	2	2	17	54	1
	9	Língua	55	2	1	2	1	1	11	158	2
	10	A. retromolar	42	2	2	1	2	2	13	42	1
	11	n.i	54	2	2	1	1	1	12	54	1
	12	Gengiva	42	1	1	2	2	1	11	41	1
	13	n.i	18	2	2	2	2	2	15	73	2
	14	Língua	52	1	1	2	2	1	11	84	2
	15	m.Jugal	46	1	1	2	1	1	12	86	2
Idosos	1	Jugal	77	1	1	1	1	2	6	56	1
	2	Gengiva	73	1	1	1	1	1	9	73	2
	3	Língua	61	1	1	2	1	2	5	61	1
	4	Língua	68	1	1	2	2	1	9	70	2
	5	Língua	65	1	1	2	1	2	9	245	2
	6	Língua	65	1	1	2	1	2	7	105	2
	7	Língua	82	2	2	2	2	2	15	112	2
	8	Rebordo	64	2	1	2	1	2	15	47	1
	9	Palato	68	1	2	1	1	1	6	62	1
	10	Língua	67	1	1	1	1	1	7	67	1
	11	Língua	75	1	1	1	1	2	8	100	2
	12	Assoalho	60	1	1	1	1	2	8	80	2
	13	Palato	82	1	1	2	1	2	7	40	1

3.2 Variáveis histopatológicas e microdensidade vascular

A tabela 3 demonstra a caracterização da amostra em relação à idade, localização, variáveis histopatológicas categorizadas, escore de malignidade tumoral e

Tabela 4. Distribuição em números absolutos e porcentagens das variáveis categorizadas de acordo com os grupos (< 60 anos) e (>= 60 anos).

Variáveis	< 60 anos		> 60 anos		p*
	N	%	N	%	
Queratinização					
Alta	8	50	11	85	
Baixa	7	50	2	15	p<0,04
Pleomorfismo					
Alto	9	60	6	46	-
Baixo	6	40	7	54	
Mitoses					
Alta	8	53	2	15	
Baixa	7	47	11	85	p<0,04
Inf. leucocitário					
Intenso	10	67	4	30	
Discreto	5	13	9	70	p<0,06
Padrão de invasão					
Alto	8	47	2	15	
Baixo	7	53	11	85	p< 0,04
Gradação de malignidade					
Alto	11	74	2	15	p<0,03
Baixo	4	26	11	85	
MDV					
		*76,75		86	
Alta	7	50	7	54	-
Baixa	7	50	6	56	

PI = Padrão de Invasão; **Q** = Grau de Queratinização; **PN** = Pleomorfismo Nuclear; **NM** = Número de Mitoses); **IL** = (Infiltrado Leucocitário); **EMT** = Escore de malignidade tumoral; **MDV** = Média de densidade vascular. **MDV*** Média de densidade vascular, considerando 1= MDV (<70) e 2 = p* Nível de significância de 95%. * Média das MDVs em cada grupo etário. MDV (>=70). n. i = Não identificado.

microdensidade vascular (MDV). As variáveis com alto grau de queratinização (Figura 6), baixo número de mitoses, discreto infiltrado leucocitário, baixo padrão de invasão (Figura 7) e baixa gradação de malignidade, foram preponderantes no grupo dos idosos em relação ao grupo dos jovens com níveis de significância de p<0,04, p<0,04, p<0,06, p<0,04, p<0,03, respectivamente (Tabela 4).

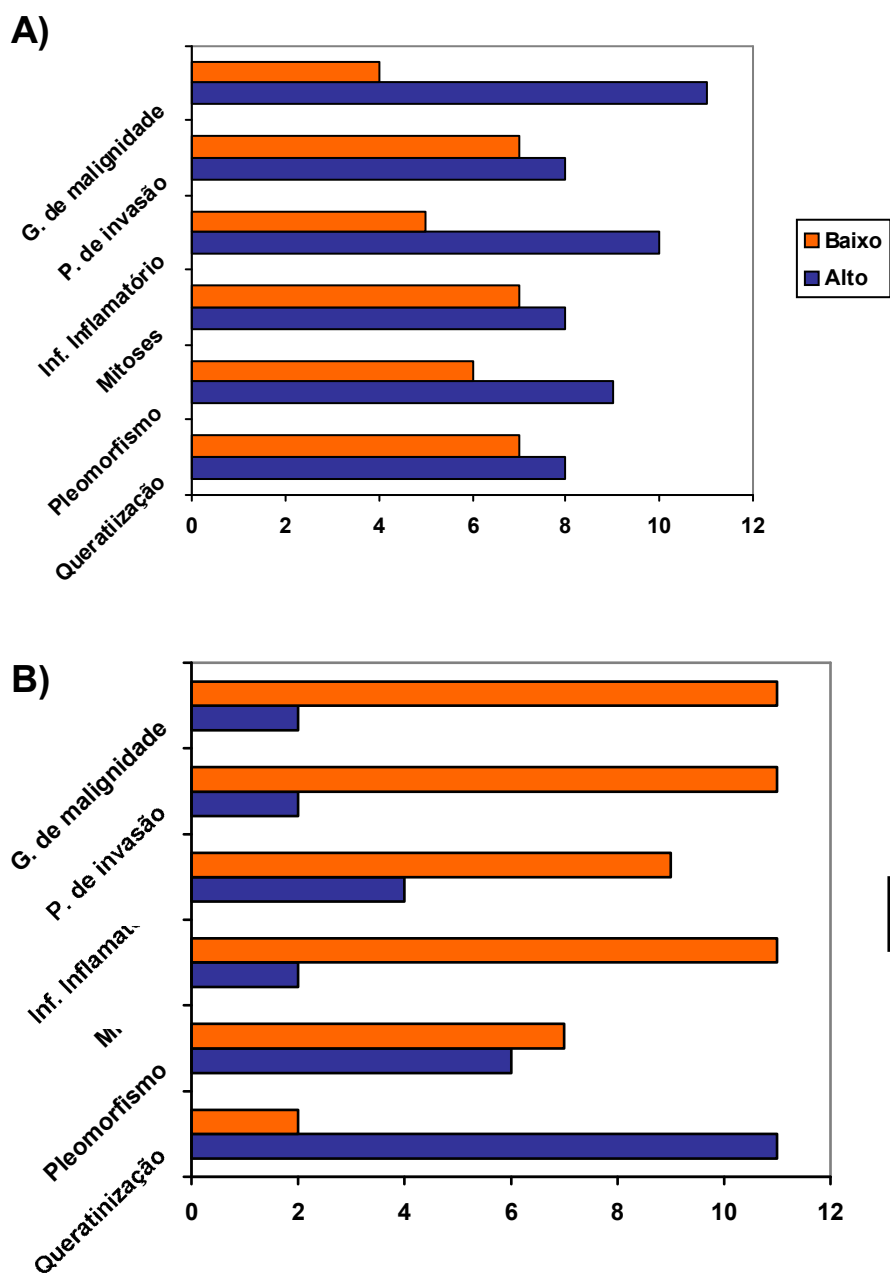


Figura 5. Relação entre as variáveis histopatológicas categorizadas nos CEBs no grupo dos adultos (A) e idosos (B).

Na figura 5 é demonstrado o padrão de distribuição das variáveis histopatológicas nas faixas etárias investigadas.

Algumas variáveis histopatológicas categorizadas, quando correlacionadas entre si, independente do grupo etário, demonstraram significância estatística de acordo com a tabela 5. O alto escore de malignidade foi estatisticamente significante em relação ao

padrão altamente invasivo (Figura 10) $p < 0,00$, ao alto número de mitose ($p < 0,01$) e à baixa queratinização ($p < 0,03$), enquanto que, a alta queratinização (Figura 5) foi relacionada ao baixo padrão de invasão (Figuras 7 e 101), $p < 0,03$) e ao baixo número de mitose ($p < 0,02$).

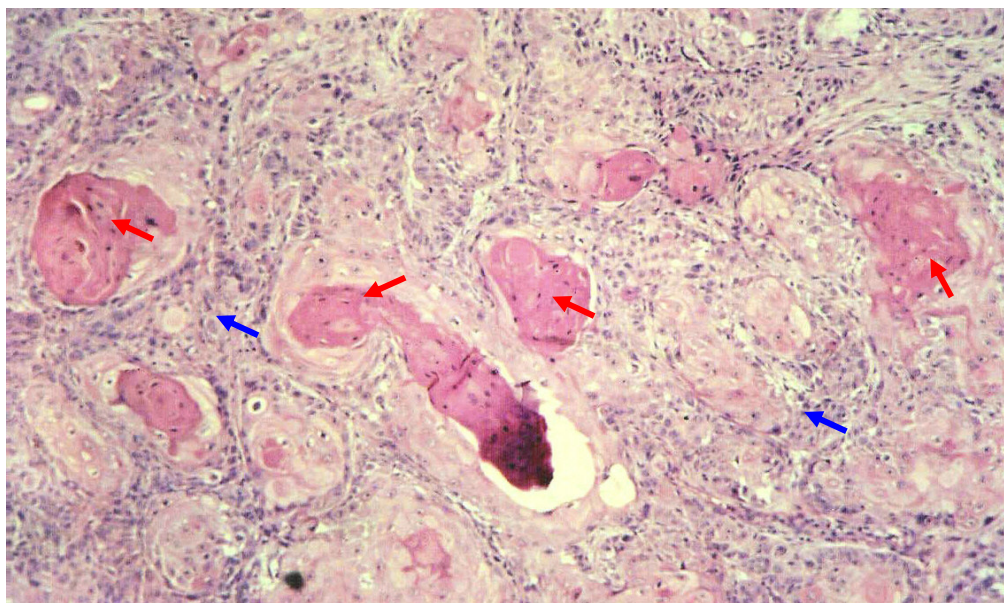


Figura 6. Fotomicrografia do padrão de invasão difuso de células neoplásicas do CEB (setas azuis), com alto grau de queratinização (setas vermelhas). Aumento de 200 X.



Figura 7. Fotomicrografia do padrão de invasão em cordões na linha de invasão do CEB ao tecido conjuntivo adjacente. Aumento de 100 X.

Tabela 5 - Relação de significância estatística entre as variáveis histopatológicas categorizadas, considerando todos os tumores investigados independente do grupo etário.

	Escore de malignidade	Queratinização
Padrão de Invasão	p<0,00	p<0,03
Mitose	p<0,01	p<0,02
Queratinização	p<0,03	-

Em relação à neo-angiogênese (Figura 9), as médias das MDVs* dos grupos etários investigados foram semelhantes, sem correlação estatisticamente significativa conforme a tabela 4. Conforme mostrado na figura 8, houve uma distribuição homogênea entre as MDVs alta e baixa em relação à idade. Do mesmo modo, a MDV não teve correlação estatística com as variáveis histopatológicas.

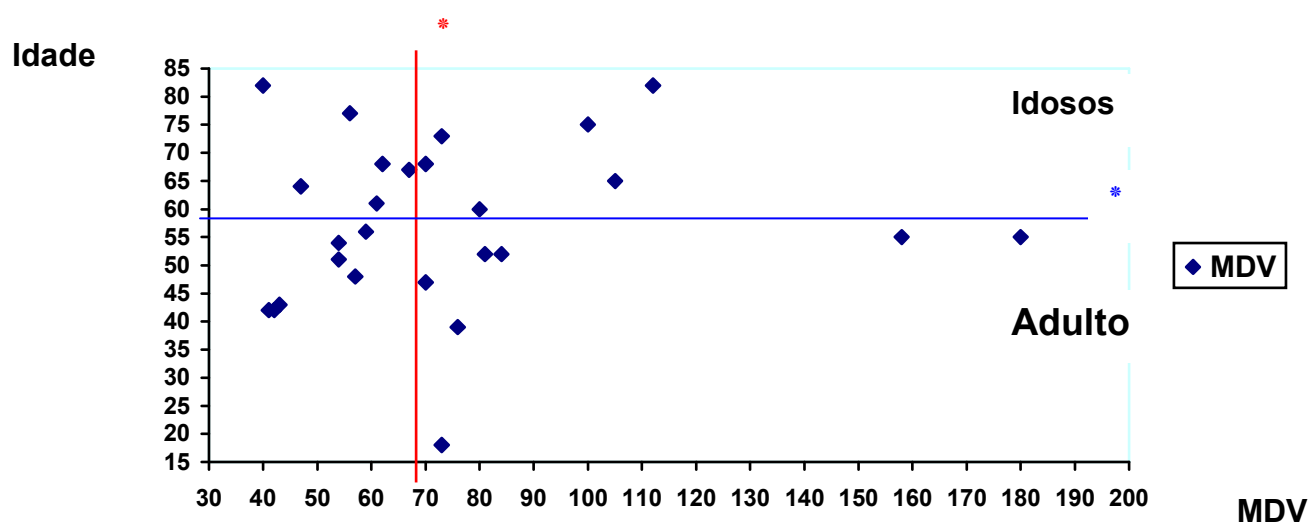


Figura 8 - Diagrama de dispersão da idade versus a MDV nos CEBs.

- * Posição de corte entre baixa MDV (<70) e alta MDV (>=70).
- * Posição de corte entre adultos (60 <anos) e idosos (>=60anos).

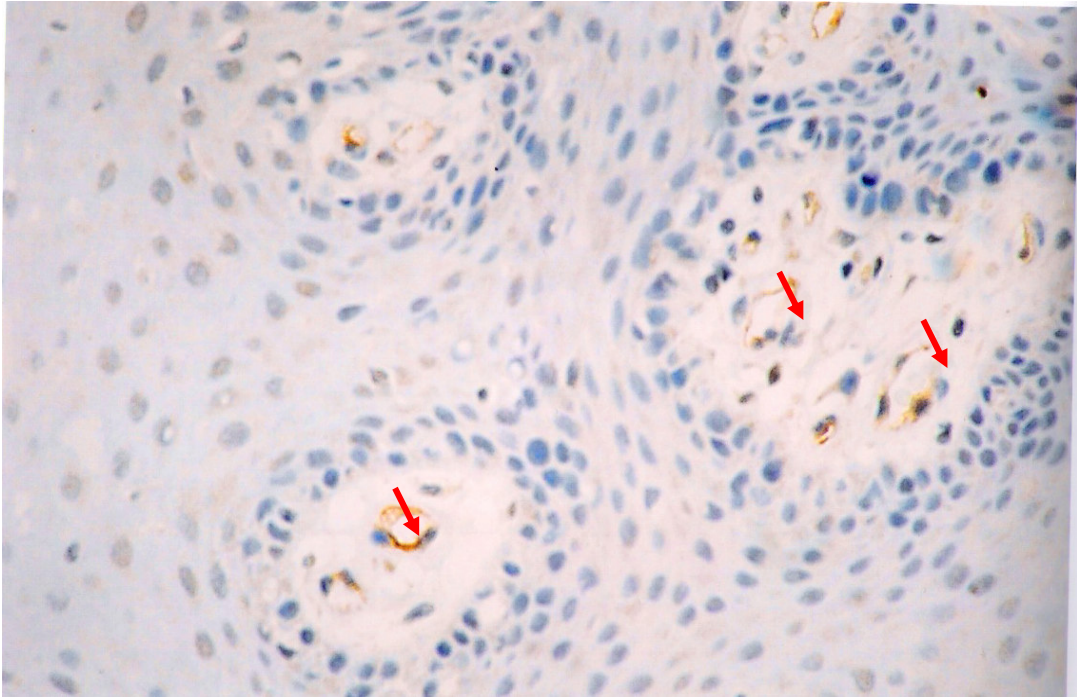


Figura 9. Fotomicrografia da Imunoexpressão do anticorpo anti-CD105 na neovascularização intratumoral do CEB. Aumento de 400 X.

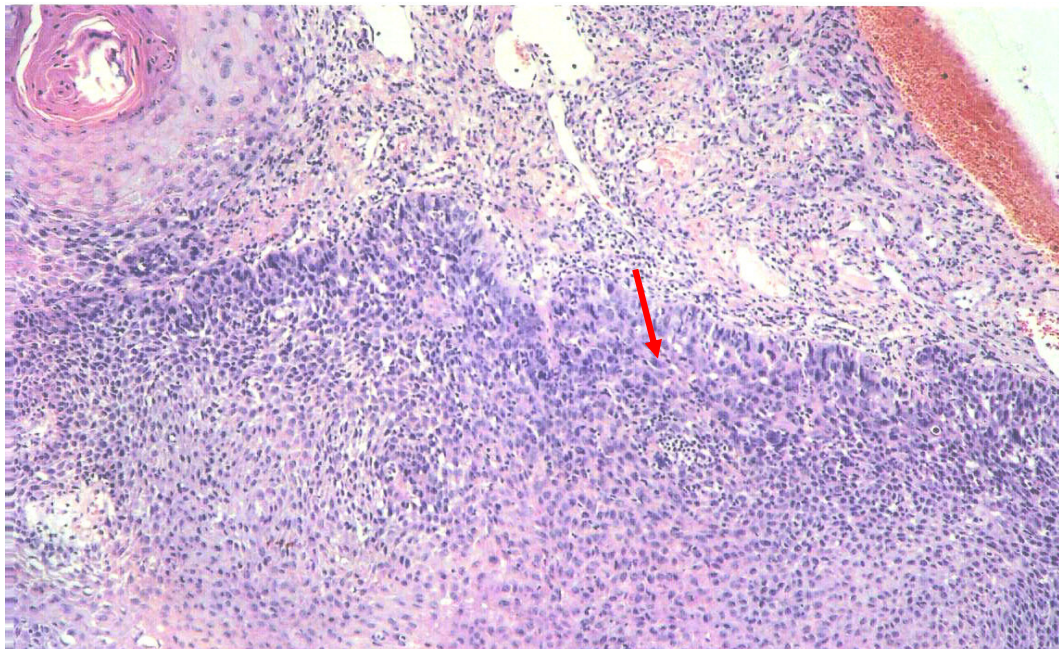


Figura 10. Fotomicrografia da Infiltração maciça de células neoplásicas do CEB na linha de invasão tumoral. Aumento de 100 X.

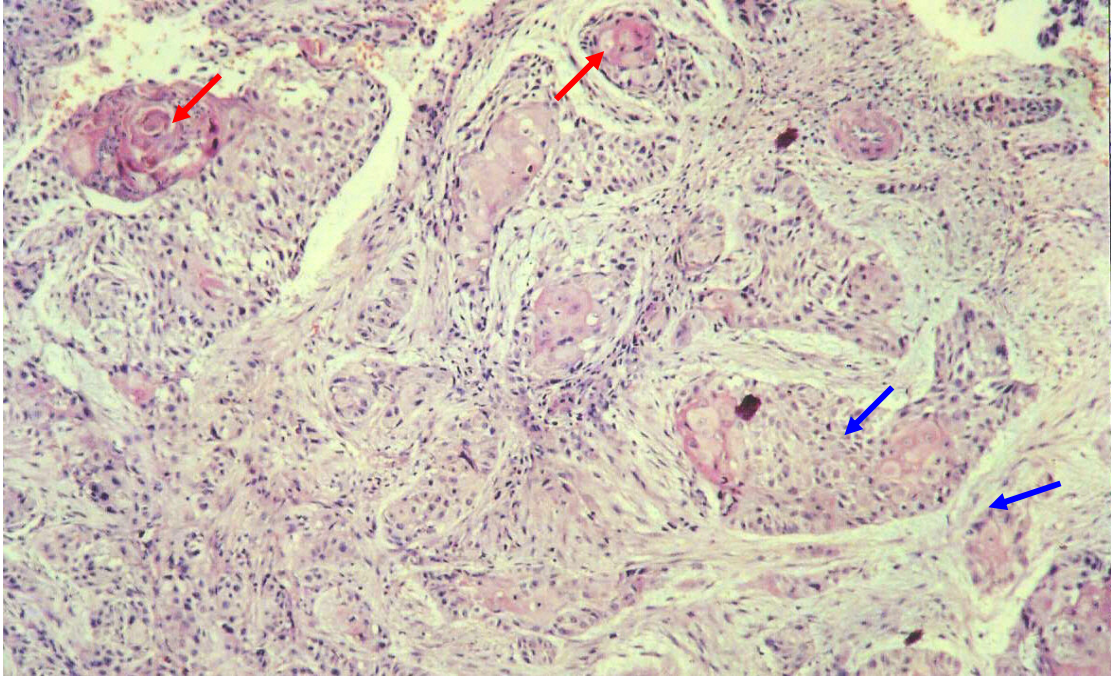


Figura 11. Fotomicrografia das pérolas de queratinização (setas vermelhas) e cordões e ilhas de invasão (setas azuis) do CEB. Aumento 100 X.

4. DISCUSSÃO

O carcinoma epidermóide bucal (CEB) é o principal tumor maligno da cavidade bucal com maior prevalência entre a quarta e sétima década de vida, no entanto, têm sido evidenciado um aumento da incidência desses tumores em pacientes abaixo dos 45 anos de idade (MYERS et al., 2000, ANNERTZ et al., 2002, IAMAROON et al., 2004). Esse aumento no número de pacientes jovens com câncer bucal tem despertado o interesse nos estudos envolvendo o envelhecimento e o câncer bucal no que tange aos fatores etiológicos, predisposição genética, comportamento tumoral, conduta e resposta terapêutica de acordo com a faixa etária.

Quanto a presença dos fatores de risco associados aos CEBs em pacientes adultos-jovens tem sido verificada pouca associação dos fatores etiológicos clássicos como o consumo de álcool e o tabagismo, no grupo de idade mais precoce (KURIAKOSE et al., 1992, SIEGELMANN-DANIELI et al., 1998). Segundo o estudo de LLEWELLYN et al. (2004), a etiologia do CEB em adultos-jovens (< 45 anos) parece estar fortemente associado à predisposição genética e a outros fatores de risco além do álcool e fumo. Foi verificado também que o hábito de uma alimentação rica em frutas frescas e vegetais nos adultos-jovens tem um efeito protetor à carcinogênese oral.

O aumento da população idosa em nosso país prevista para as próximas décadas em virtude da transição demográfica tem alertado as autoridades para um maior índice absolutos de câncer (MORAES, 1997), entretanto, conforme (ANISIMOV, 2003) a relação incidência de câncer-envelhecimento não ocorre uniformemente em todos os órgãos e tecidos do organismo. Assim, o aumento nos casos de câncer, com o aumento

da população idosa, tenderá a ocorrer nos tumores em que a maior incidência ocorre nas faixas etárias mais avançadas.

Se no Brasil a incidência CEB seguir a tendência de precocidade de outros países como Estados Unidos (MYERS et al., 2000), Escandinávia (ANNERTZ et al., 2002), Tailândia (IAMAROON et al., 2004), o aumento de indivíduos na faixa etária acima dos 60 anos nas próximas décadas e a diminuição da população jovem poderá implicar na diminuição das taxas dos CEB.

No entanto como salienta Araújo (1992), o termo transição demográfica no Brasil deve ser analisado com cautela devido à característica heterogênea da população. No país prevalece a polarização epidemiológica que de acordo com a região do país ou mesmo do nível de discrepância social de uma determinada região o perfil populacional se altera. Segundo estimativas do censo de 2000 do IBGE, no Brasil, os estados mais jovens estão nas regiões norte e centro-oeste: em oito deles, a população entre 0 e 14 anos supera os 40%, e no Amapá, em Rondônia e em Roraima, as crianças representam mais da metade da população (IBGE, 2005a). Do mesmo modo um estudo abrangendo cinco bairros mais carentes da cidade de São Paulo - Parelheiros, Itaim Paulista, Cidade Tiradentes, Guaianazes e Perus -, a proporção de habitantes inferior a 15 anos varia de 30,4% a 33,4% da população (VARELLA, 2005). Outro aspecto é o crescimento acelerado das populações indígenas no Brasil com o alto índice de crianças e adolescentes nas aldeias (IBGE, 2005b). Assim, em qualquer cálculo estimativa de aumento ou diminuição da incidência de câncer de boca em função da transição demográfica deve respeitar as regionalidades, os grupos sociais e as etnias.

Outro fator a ser analisado são as interações genético-ambientais. O estilo de vida e a exposição a carcinógenos que as diferentes faixas etárias são submetidas pode interferir na prevalência e comportamento tumoral. As gerações que nasceram nas décadas de 1960 e 1970 (3^a e 4^a década de vida atual) possuíram diferentes padrões alimentares e estilo de vida em relação às gerações que nasceram nas décadas de 1930 e 1940, 6^a e 7^a décadas de vida atual (BATISTA FILHO, RISSIN, 2002).

Em relação à urbanização, em 1950 este índice alcançava 36,16% sobre o total da população do País, em 1970 representava 56,80%, ou seja, mais da metade da população, e em 1990, chega a 77,13%. Dentre as alterações que a urbanização trouxe esta o aumento de produtos manufaturados em detrimento dos alimentos naturais típicos do ambiente rural (frutas, verduras, legumes). Exemplo das mudanças no estilo de vida e perfil nutricional com a urbanização é o aumento da obesidade da população brasileira nas últimas décadas associado a maior ingestão de alimentos altamente calóricos e a diminuição da atividade (BATISTA FILHO & RISSIN, 2002). Os estudos multicêntricos realizados na Espanha (SANCHEZ et. al., 2003) e Estados Unidos (KREIMER et. al., 2005) revelam o efeito protetor do consumo de frutas e verduras na carcinogênese de tumores de cavidade oral e orofaringe, do mesmo modo, recentes pesquisas em animais e humanos tem relacionado a restrição de energia calórica alimentar com a menor incidência e menor padrão de crescimento tumoral as custas da menor atividade proliferativa das células neoplásicas e maior estímulo pró-apoptóticos.

SCULLY, (2005) sugere que a hipótese da ação da infecção do HPV no fenômeno de precocidade do CEB em adultos-jovens, pois nesse grupo geralmente não tem sido encontrada relação com os fatores de risco clássicos; consumo o consumo de

álcool e o tabagismo. SMITH et al. (2004) constataram que a presença do Vírus HPV em tumores de boca foi maior nos adultos-jovens em relação aos idosos e este resultado teve relação estatisticamente significativa com a sexo orogenital, considerado uma pratica sexual de risco para a transmissão do HPV. Segundo o estudo CRUZ et al. (1996) o número de CEB de pacientes idosos com a presença do HPV é menor do que em adultos e jovens, sendo que em todos os CEBs de pacientes jovens onde estes não tinham hábitos de consumo etílico ou tabagismo ocorreu a presença de infecção por HPV.

As alterações no padrão comportamental sexual do brasileiro conflui para a iniciação sexual cada vez mais precoce e o maior número de parceiros sexuais, ao contrário do comportamento sexual adotado por gerações mais antigas. Deste modo, o padrão de comportamento sexual propício à infecção de HPV pode contribuir para desenvolvimento mais precoce de tumores em que este vírus participa como fator etiológico, incluindo o câncer bucal. A baixa associação entre os fatores etiológicos clássicos, etilismo e tabagismo, do CEB em pacientes jovens abre o espaço para investigação de outros fatores de risco como, a tendência genética, o padrão comportamental e o perfil nutricional e exposição viral.

Neste estudo não diferenças significativa entre a prevalência de sítios bucais nos CEBs em adultos e idosos. Entretanto, 50 % dos CEB no grupo dos idosos eram oriundas do sito lingual. Esse dado não concorda com os estudos de KURIAKOSE et al. (1992) e PERUSSI et al. (2002) em pacientes idosos com CEB, onde houve um predomínio de tumores nas regiões (jugal e genvival) e (palatal e jugal) respectivamente. No grupo dos adultos a maior frequência foi encontrada em assoalho

bucal, contrastando com maior incidência no sítio lingual que ocorreu no estudo de KURIAKOSE et al. (1992) e PERUSSI et al. (2002).

Os estudos para analisar a relação sítio tumoral – comportamento tumoral - envelhecimento são importantes, pois de acordo com o tecido ou órgão em que esta situado o tumor o envelhecimento pode aumentar, manter ou diminuir a suscetibilidade as carcinógenos, a iniciação, promoção, progressão e agressividade dos tumores (ANISIMOV, 2003).

Exemplo disso é a constatação que os tumores de mama em idosas são menos agressivos e respondem melhor ao tratamento em comparação aos tumores de mama em adulto-jovens DIAB & ELLEDG (2000). Por Outro lado em tumores superficiais de bexiga os tumores malignos em pacientes acima de 65 anos são três vezes mais agressivos do que paciente em pacientes abaixo de 50 anos (BRIGGS et al. 1992). Essas informações comportamentais dos tumores são decisivas para a definição do tratamento empregado a fim de proporcionar melhores resultados e proporcionar melhor qualidade de vida trans e pós-terapia do câncer nos pacientes idosos.

Na classificação dos CEBs utilizou-se o sistema de gradação de malignidade de Bryne et al. (1989) que consiste na avaliação de 5 características histopatológicas na linha de invasão do tumor (Tabela 1). Segundo Bryne et al. (1989), Bryne et al. (1996) e Kurokawa et al. (2005) as características histopatológicas analisadas na linha de invasão aos tecidos adjacentes podem predizer melhor o comportamento do tumor do que as características da região central e acredita-se que isto ocorra porque nessa região ocorrem importante eventos responsáveis na disseminação do tumor, aquisição e perda

de moléculas de adesão, secreção de enzimas proteolíticas, atividade de proliferação celular e angiogênese.

A baixa gradação de malignidade, os baixos padrões de invasão, a alta queratinização e o baixo nível mitótico foram preponderantes no grupo dos idosos em relação ao grupo dos adultos com relação estatisticamente significativa (Tabela 4), já o discreto infiltrado inflamatório teve significância de ($p < 0,06$).

Para Bryne et al. (1989), Bryne et al. (1996), Sawair et al. (2003) e Kurokawa et al. (2005) a baixa gradação de malignidade esta diretamente relacionada a maior sobrevida do paciente e ao baixo índice de metástases regionais. Assim, essas características tumorais podem ser responsáveis pelo desenvolvimento tardio de metástases (Kuriakose et al., 1992), menor recorrência tumoral (Friedlander et al., 1998 e YAMAZAKI et al., 2001) nos CEBs em pacientes idosos. Entretanto, no estudo de Friedlander et al. (1998) a menor recorrência tumoral no grupo dos idosos não refletiu no aumento da sobrevida nos idosos em relação aos adultos (< 45 anos).

A maioria dos estudos relatam não haver diferenças estatisticamente na sobrevida entre os pacientes mais velhos e adultos-jovens com CEB (FRIEDLANDER et al. 1998, VERSCHUUR et al. 1999, PERUSSi et al. 2002, SASAKI et al. 2005). Perussi et al. 2002 sugerem que o alto índice de morte por doenças crônico degenerativas nos pode ser um fator que dificulta a avaliação da morte específica por câncer nos idosos. Outro fator que dificulta a comparação entre os resultados entre as pesquisas nesta área, é o alto número de estudos que tem o limite de corte entre os

adulto-jovens e os pacientes mais velhos de 30, 35, 40 ou 45 anos conforme citado na revisão de literatura.

As altas de alta queratinização celular encontradas nos CEB nos idosos são uma característica de células bem diferenciadas que geralmente competem ao tumor um comportamento menos agressivo. De acordo o estudo de Lopes et al. (2002) o grau de queratinização pode ser considerado um fator de risco independente para o desenvolvimento de metástases regionais, quanto maior a presença de queratinização no tecido tumoral, menor presença de metástases regionais.

Segundo Tumuluri, Thomas e Fraser (2004) os baixos padrões invasão das células tumorais aos tecidos subjacentes nos CEBs estão relacionados ao lento crescimento tumoral e baixo índice de proliferação celular. Brandwein-Gensler et al. 2005 constataram também que os baixos padrões de invasão tem relação estisticamente significativa com a recorrência tumoral e sobrevida do paciente

Os escores correspondentes ao baixo número de mitose também foi mais encontrado no grupo dos idosos sugerindo uma menor atividade proliferativa das células neoplásicas nesse grupo. Estes resultados são compatíveis com os achados de WALMSLEY et al. (1987) que verificaram o lento crescimento de linhagens celulares de melanoma inoculadas em animais velhos, comparado com animais jovens. Do mesmo modo, o estudo de PILI (1994) verificou a influência da faixa etária no comportamento tumoral. As células tumorais inoculadas em animais velhos apresentaram menor índice mitótico, menor volume da massa tumoral e menor padrão de angiogênese. O fato de que quando transferidas as células tumorais dos animais

velhos para os animais jovens ocorria uma rápida expansão tumoral é um forte indício da influência do envelhecimento nesse processo.

A influência da resposta imune mediada pelas células T no menor crescimento tumoral de melanomas em animais velhos é sugerida WEKSLER, et al. (1990) Segundo o autor o menor crescimento tumoral em animais velhos é atribuído inabilidade das células T desse grupo secretar fatores de proliferação e fatores pró-angiogênicos. Por outro lado DEPINHO, (2000), KRTORICA et al. (2001), KTRORICA & CAMPISI (2002) e SCHWARTSBURD, (2004) postulam que o acúmulo de células senescentes nos tecidos com o envelhecimento cria um ambiente pro-oncogênico através da maior liberação de fatores de crescimento que atua na progressão das células tumorais.

Deste modo, futuros estudos devem ser realizados a fim de se verificar quais tipos de células tumorais são mais sensíveis a este ambiente pró-oncogênico promovido pelo aumento das células senescente nos tecidos com envelhecimento e se este estímulo que inclui inúmeros fatores pró-angiogênicos - COX, PGE, MMP-9 – (SUN et al., 2005) tem atuação na possível manutenção da angiogênese tumoral bucal em idosos.

Do mesmo modo a literatura tem encontrado inúmeros fenômenos relacionados ao envelhecimento da mucosa bucal e o CEB: diminuição da capacidade de reparo do DNA na mucosa bucal com o avanço da idade (ZHOU & YANG & ZHOU, 2003) e alterações epigenéticas por metilação (HASEGAWA et al., 2002, KULKARNI & SARANATH, 2004), aumento nas taxas de mutações do mtDNA SHIEH et al. (2004), disfunção telomérica GISSELSSON et al. (2002) em neoplasias malignas da cavidade bucal. No entanto, raros estudos discutem o envolvimento dos fatores associados ao

envelhecimento, a exposição e a sensibilidade aos carcinógenos que estão envolvidos no menor padrão de malignidade dos CEBs em idosos.

O anticorpo anti-endogлина (CD105) foi escolhido para esse estudo devido sua expressão no endotélio em atividade proliferativa. Segundo SCHIMMING & MARME (2002), SCHIMMING et al. (2004) e NAGATSUKA et al. (2005) essa especificidade da endogлина pela vasculatura neoformada permite uma melhor avaliação da atividade angiogênica na massa tumoral.

A MDV não apresentou relação estatisticamente significativa com as variáveis histopatológicas isoladas ou com a gradação de malignidade. Esses resultados estão de acordo com os estudos de Schimming e Marme (2002) e SCHIMMING et al. (2004) que não encontraram, no entanto, a expressão da endogлина foi associada ao tamanho tumoral em ambos estudos. A MDV analisada pela expressão de outros marcadores endoteliais não demonstrou correlação significativa com a gradação de malignidade na investigação de TAE et al. (2000), contrastando com ARTESE et al. (2001) e LOPEZ-GRANIEL et al. (2001) que encontraram relação significativa entre a MDV e a gradação histopatológica do CEB.

O envolvimento na progressão do câncer bucal é inquestionável, entretanto, a capacidade e algumas células tumorais assumirem aspecto e função semelhante às células endoteliais em relação à condução sanguínea tem sido sugerida como um dos fatores para a divergência nos resultados entre a angiogênese e o comportamento tumoral (Shieh et al 2004).

A média de densidade vascular avaliada pela quantificação da expressão da glicoproteína endoglina não demonstrou diferença significativa entre o grupo dos idosos e dos adultos (Tabela 3). A não alteração no padrão de neo-angiogênese tumoral entre idosos e adultos jovens sugere que a diminuição fisiológica da angiogênese em inúmeros órgãos e tecidos do organismo com idade (PATERNO et al., 1994, PHILLIPS & STONE, 1994 e REED et al. 1998) não se repete na relação tumor-hospedeiro dos CEBs.

Os estudos direcionados a investigação das alterações fisiopatológicas da angiogênese tumoral com a idade ainda são escassos. Entretanto, alguns eventos que ocorrem na cavidade bucal têm sido citados como de fundamental importância para a manutenção da integridade da mucosa bucal e pode estar atuando como estímulo angiogênico. A mucosa bucal é continuamente irrigada pela saliva, que contém fatores de crescimento que atuam na angiogênese. Segundo (TAICHMAN et al., 1998) o VEGF é expresso no tecido glandular parotídeo e está presente na saliva, os autores sugerem que esse pode ser um importante fator na indução fisiológica e patológica da angiogênese, sendo a facilidade de cicatrização das feridas na mucosa bucal um reflexo da ação do VEGF e outros fatores de crescimento presentes na saliva.

Outro aspecto a salientar é a não alteração da expressão do VEGF nos tecidos glandulares de acordo com a idade o que representa um indício da não alteração das taxas de VEGF na saliva dos idosos, mesmo que esse grupo tenha maior propensão à xerostomia (DE OLIVEIRA, DE OLIVEIRA VASCONCELOS e GOMES, 2002).

Outro fator de crescimento presente na cavidade bucal é o fator de crescimento epidérmico (EGF). O EGF tem importante atuação na estimulação proliferativa endotelial sendo que tem sido testado na terapia oncológica a associação de drogas inibidoras de EGF e inibidoras de VEGF em tumores de cabeça e pescoço, entre outros resultados foi constatado diminuição da angiogênese tumoral nos pacientes que utilizavam essas drogas (YIGITBASI , 2004) .

Segundo Ohshima et al. (2002) as taxas fisiológicas de EGF salivar tem capacidade de estimular a proliferação e migração das células epiteliais da mucosa bucal. Ma et al. (2000) constataram que a diminuição do EGF salivar em fumantes é responsável pela diminuição da angiogênese e em consequência da reparação tecidual em úlcera gástrica. A ação da EGF salivar na angiogênese tumoral bucal ainda não foi testada, mas existem evidencias que nos permitem inferir uma possível ação na manutenção do estímulo angiogênico por esse fator de crescimento. Um fator que pode influenciar na manutenção do estímulo angiogênico com a idade é a constante irrigação da mucosa bucal pela saliva, que contém fatores de crescimento que atuam na angiogênese.

5. CONCLUSÕES

- Os carcinomas epidermóides bucais (CEBs) de pacientes idosos apresentam características histopatológicas que lhe conferem menor gradação de malignidade em relação aos CEBs de pacientes adultos.
- O padrão de neo-angiogênese analisado pela expressão da endogлина não evidenciou alterações na comparação entre CEBs do grupo dos idosos e adultos.

6. REFERÊNCIAS

ALBO, D. et. al. The relationship of angiogenesis to biological activity in human squamous cell carcinomas of the head and neck. *Ann. Plast. Surg.*, Boston, v. 32, n. 6, p. 588-594, Jun. 1994.

ALCALDE, R.E. et. al. Angiogenesis and expression of platelet-derived endothelial cell growth factor in oral squamous cell carcinomas. *Oncology.*, New York, v. 54, n. 4. p. 324-328, Jul-Aug. 1997.

AGAH, A. et. al. Thrombospondin 2 levels are increased in aged mice: consequences for cutaneous wound healing and angiogenesis. *Matrix Biol.*, Stuttgart, v. 22, n. 7, p. 539-547, Jan. 2004.

ANNERTH, G.; BATSAKIS, J.; LUNA, M. Review of the literature and a recommended system of malignancy grading in oral squamous cell carcinomas. *Scand. J. Dent. Res.*, Copenhagen, v. 95, n. 3, p. 229-249, Jun. 1987.

ANNERTZ, K. et al. Incidence and survival of squamous cell carcinoma of the tongue in Scandinavia, with special reference to young adults. *Int. J. Cancer*, New York, v. 101, n. 1, p. 95-99, Sep. 2002.

ANISIMOV, V.N. The relationship between aging and carcinogenesis: a critical appraisal. *Crit. Rev. Oncol. Hematol.*, Boca Raton, v. 45, n. 3, p. 277-304, Mar. 2003.

ARAÚJO, J.D. Polarização epidemiológica no Brasil. *Informe Epidemiológico do SUS*, Brasília, v. 1, n. 2, p. 5-16, 1992.

ARTESE, L. et. al. Microvessel density (MVD) and vascular endothelial growth factor expression (VEGF) in human oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res.*, Athens, v. 21, n. 1, p. 689-695, Jan-Feb. 2001.

ARTANDI, S.E.; DEPINHO, R.A. critical role for telomeres in suppressing and facilitating carcinogenesis. *Curr. Opin. Genet. Dev.*, Philadelphia, v. 10, n. 3, p. 39-46, Nov. 2000.

BAYLIN, S.B. et. al. Aberrant patterns of DNA methylation, chromatin formation and gene expression in cancer - Review. *Hum. Mol. Genet.*, Oxford, v. 10, n. 7, p. 687-692, Apr. 2001.

BATISTA FILHO, M.; RISSIN, A. Nutritional transition in Brazil: geographic and temporal trends. *Cad. Saud. Publica*, Rio de Janeiro, v. 19, n. 1, p. S181-191, 2003.

B E M FAM (Sociedade Civil de Bem-Estar Familiar no Brasil). *Brasil-Pesquisa Nacional sobre Demografia e Saúde: 1996*. Rio de Janeiro; 1997.

BEN YEHUDA, A. et. al. Ageing and the mismatch repair system - Review. *Mech. Ageing Dev.*, Limerick, v. 20, n.1-3, p.173-9, Dec. 2000.

BERNARDES, A. Urbanização do território. Disponível em: <<http://www.mre.gov.br/cdbrasil/itamaraty/web/port/consnac/ocupa/procurb/apresent.htm>>. Acesso em: 06 Dez. 2005.

BRANDWEIN-GENSLER, M. et al. Oral squamous cell carcinoma: histologic risk assessment, but not margin status, is strongly predictive of local disease-free and overall survival. *Am. J. Surg. Pathol.*, New York, v. 29, n. 2, p. 167-178, Feb. 2005.

BRIGGS, N.C. et al. Age as a predictor of an aggressive clinical course for superficial bladder cancer in men. *Cancer*, New York, v. 69, n. 6, p.1445-1451, Mar. 1992.

BRYNE, M. et al. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas. *J. Oral Pathol. Med.*, Copenhagen, v. 18, n. 8, p.432-437, Sep. 1989.

BRYNE, M. et al. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. *J. Pathol.*, London, v. 166, n. 4, p. 375-381, Apr. 1992.

BRYNE, M. et al. Is the invasive front of an oral carcinoma the most important area for prognostication? *Oral Dis.*, Copenhagen, v. 4, n. 2, p. 70-77, Jun. 1998.

CAMPISI, J. Cellular senescence as a tumor-suppressor mechanism. *Trends Cell. Biol.*, Cambridge, v. 11, n. 11, p. S27-S31, Nov. 2001.

CARUSO, C. et al. Aging, longevity, inflammation, and cancer. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, New York, v. 1028, p. 1-13, Dec. 2004.

CEBRAP. Comportamento sexual da população brasileira e percepções do HIV/Aids. Brasília: Ministério da Saúde, 2000.

CHAIMOWICZ, F. A saúde dos idosos brasileiros às vésperas do século XXI: problemas, projeções e alternativas. *Rev. Saúde Públ.*, São Paulo, v. 31, n. 2, p. 184-200, Abr.1997.

CRUZ, I.B. et al. Age-dependence of human papillomavirus DNA presence in oral squamous cell carcinomas. *Eur. J. Cancer B. Oral Oncol.*, Oxford, v. 32, n. 1, p. 55-62, Jan. 1996.

DEPINHO, R.A. The age of cancer. *Nature*, London, v. 408, n. 6809, p. 248-254, Nov. 2000.

DE OLIVEIRA, L.A.; DE OLIVEIRA VASCONCELOS, F.; GOMEZ, R.S. Vascular endothelial growth factor in minor salivary glands: effect of ageing. *J. Oral Rehabil.*, Oxford, v. 29, n. 1, p.105-107, Jan. 2002.

DIAB, S.G.; ELLEDGE, R.M.; CLARK, G.M.; Tumor characteristics and clinical outcome of elderly women with breast cancer. *J. Natl. Cancer. Inst.*, Bethesda, v. 92, n. 7, p. 550-556, Apr. 2000.

DIMRI, G. P. What has senescence got to do with cancer? *Cancer Cell.*, Cambridge v. 7, n. 6, p. 505-512, Jun. 2005.

DISTLER, J. H. et. al. Angiogenic and angiostatic factors in the molecular control of angiogenesis. *Q. J. Nucl. Med.*, Torino, v. 47, n. 3, p. 149-161, Sep. 2003.

DIX, D.; COHEN, P.; FLANNER, Y.J. On the role of aging in cancer incidence. *J. Theor. Biol.*, London, v. 7, n. 1, p. 163-173, Mar. 1980.

DONIN, N. et al. Comparison of growth rate of two B16 melanomas differing in metastatic potential in young versus middle-aged mice. *Cancer Invest.* Philadelphia, v. 15, n. 5, p. 416-421, Nov. 1997.

DUSSAULT, I.; MILLER, S.C. Decline in natural killer cell-mediated immunosurveillance in aging mice: a consequence of reduced cell production and tumor binding capacity. *Mech. Ageing Dev.* Limerick, v. 75, n. 2, p.115-129, Aug. 1994.

FEINBERG, A.P. The epigenetics of cancer etiology. *Semin. Cancer Biol.*, London, v. 14, n. 6, p. 427-32, Dec. 2004.

FELDSER, D.M; HACKETT, J.A.; GREIDER, C.W. Telomere dysfunction and the initiation of genome instability. *Nat. Rev. Cancer*, London, v. 3, n. 8, p. 623-627, Aug. 2003.

FOLKMAN, J. Endothelial cells and angiogenic growth factors in cancer growth and Metastasis: Introduction. *Cancer Metastasis Rev.*, Boston, v. 9, n. 3, p. 171-174, Nov. 1990.

FONSATTI, E. et. al. Emerging role of endoglin (CD105) as a marker of angiogenesis with clinical potential in human malignancies - Review. *Curr. Cancer Drug. Targets*, Hilversum, v. 3, n. 6, p. 427-432, Dec. 2003.

FRIEDLANDER, P.L. et. al. Squamous cell carcinoma of the tongue in young patients: a matched-pair analysis. *Head & Neck.*, Chicago, v. 20, n. 5, p.363-368. Aug. 1998.

GASPARINI, G. The rationale and future potential of angiogenesis inhibitors in neoplasia - Review. *Drugs*, Auckland, v. 58, n. 1, p. 17-38. Jul. 1999.

GISSELSSON D, et. al. Centrosomal abnormalities, multipolar mitoses, and chromosomal instability in head and neck tumours with dysfunctional telomeres. *Br J Cancer*. London, v. 15, n. 87, p. 202-207, Jul 2002

GOUKASSIAN, D. et. al. Mechanisms and implications of the age-associated decrease in DNA repair capacity. *FASEB J.*, Bethesda, v. 14, n. 10, p. 1325-1334, Jul. 2000.

GUPTA, M. K.; QIN, R.Y. Mechanism and its regulation of tumor-induced angiogenesis. *World J. Gastroenterol.*, Beijing, v. 9, n. 6, p. 1144-1155, Jun. 2003.

HACKETT, J.A.; GREIDER, C.W. Balancing instability: dual roles for telomerase and telomere dysfunction in tumorigenesis. *Oncogene*, Basingstoke, v. 21, n. 4, p. 619-626, Jan. 2002.

HAYNES, L. et al. Inflammatory cytokines overcome age-related defects in CD4 T cell responses in vivo. *J. Immunol. Baltimore*, v. 172, n. 9, p. 5194-5199, May. 2004.

HANNEN, E.J.; RIEDIGER, D. The quantification of angiogenesis in relation to metastasis in oral cancer: a review. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, Copenhagen, v. 33, n. 1, p. 2-7. Jan. 2004.

HASEGAWA, M. et al. Patterns of gene promoter methylation in squamous cell cancer of the head and neck. *Oncogene*, Basingstoke, v. 20, n. 27, p. 4231-4236, Jun. 2002.

HARTMAN, P. et al. Mitochondrial oxidative stress can lead to nuclear hypermutability. *Mech. Ageing Dev.*, Limerick, v. 125, n. 6, p. 417-420, Jun. 2004.

HILL, K.A. et al. Spontaneous mutation in Big Blue mice from fetus to old age: tissue-specific time courses of mutation frequency but similar mutation types. *Environ. Mol. Mutagen.*, New York, v. 43, n. 2, p. 110-120, Dec. 2004.

HOEIJMAKERS, J.H. DNA repair mechanisms. *Maturitas*, Limerick, v. 28, n.1, p. 17-22, Feb. 2001.

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

INCA a. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa da Incidência e Mortalidade por Câncer no Brasil. Disponível em: <www.inca.org.br/estimativa/2006>. Acesso em: 2 Jan. 2006.

INCA b. Instituto Nacional de Câncer. Atlas de mortalidade por câncer no Brasil. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/atlas/docs/txMort_Brasil_BR.pdf>. Acesso em: 15 Jan. 2006.

INCA c. Instituto Nacional de Câncer. Câncer de boca. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/conteudo_view.asp?id=324>. Acesso em: 15 Jan. 2006.

IBGE a. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Comunicação Social. c<<http://www.ibge.gov.br/home/presidencia/noticias/25072002pidoso.shtm>>. Acesso em: 7 Set. 2005.

IBGE b. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Censo Demográfico 2000 - Resultados do universo. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 20 out. 2005.

IBGE c. Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística. Tendências demográficas: uma análise dos indígenas com base nos resultados da amostra dos Censos Demográficos 1991 e 2000. Disponível em: <http://www.ibge.gov.br>. Acesso em: 23 Nov. 2005.

YIGITBASI, O.G. et al. Tumor cell and endothelial cell therapy of oral cancer by dual tyrosine kinase receptor blockade. *Cancer Res. Baltimore* v. 64, n.21, p. 977-984, Nov. 2004.

KING, C.M. et. al. An investigation of mutation as a function of age in humans. *Mutat. Res., Amsterdam*, v. 316, n. 2, p. 79-90, Aug. 1994.

KIRKWOOD, T.B.; AUSTAD, S.N. Why do we age? *Nature, London*, v. 408, n. 2, p.233-238, Oct. 2000.

KREIMER, A.R. et. al. Diet and body mass, and oral and oropharyngeal squamous cell carcinomas: Analysis from the IARC multinational case-control study. *Int J Cancer. New York*, n. 42, v. 6, p.84-85, Dec. 2005.

KRESTY, L.A. et. al. Alterations of p16 (INK4a) and p14 (ARF) in patients with severe oral epithelial dysplasia. *Cancer Res., Baltimore*, v. 15, n. 18, p. 5295-5300, Sep. 2002.

KRITCHEVSKY D. Caloric restriction and experimental carcinogenesis. *Toxicol. Sci. Cary*, v. 52, Supl. 2. p.13-16. Dec. 1999.

KRTOLICA, A.; CAMPISI, J. Cancer and aging: a model for the cancer promoting effects of the aging stroma. *Int. J. Biochem. Cell. Biol., Exeter*, v. 34, n. 11, p. 1401-1414, Nov. 2002.

KRTOLICA, A.; CAMPISI, J. Integrating epithelial cancer, aging stroma and cellular senescence. *Adv. Gerontol., Sankt-Peterburg*, v.11, p.109-116, Nov. 2003.

KRTOLICA, A. et al. Senescent fibroblasts promote epithelial cell growth and tumorigenesis: A link between cancer and aging. *PNAS, Washington*, v. 98, n. 21, p.12072-12-75, Oct. 2001

KULKARNI, V.; SARANATH, D. Concurrent hypermethylation of multiple regulatory genes in chewing tobacco associated oral squamous cell carcinomas and adjacent normal tissues. *Oral Oncol., Oxford*, v. 40, n. 2, p.145-153, Feb. 2004.

KURIAKOSE, M. et. al. Comparison of oral squamous cell carcinoma in younger and older patients in India. *Eur. J. Cancer. B. Oral Oncol., Oxford*, v. 28, n. 2, p.113-120, Oct. 1992.

KUROKAWA, H. et. al. The high prognostic value of the histologic grade at the deep invasive front oftongue squamous cell carcinoma. *J. Oral Pathol. Med., Copenhagen*, v. 34, n. 6, p. 329-333, Jul. 2005.

KREISLE, R.A. et al. Effect of host age on tumor-associated angiogenesis in mice. *J. Natl. Cancer Inst., Bethesda*, v. 3, n. 82, p. 44-47, Jan. 1990.

YAMAZAKI H, et al. Age as a prognostic factor for late local recurrence of early tongue cancer treated with brachytherapy. *Anticancer Res.*, Athens, v. 17, n. 6, p. 4709-4712, Nov-Dec. 1997.

LEE, H.C. et. al. Accumulation of mitochondrial DNA deletions in human oral tissues - effects of betel quid chewing and oral cancer. *Mutat. Res.*, Amsterdam. v. 27, n. 493, p. 67-74, Jun. 2001.

LOPES, M.A. et al. Biomarkers predictive of lymph node metastases in oral squamous cell carcinoma. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, Copenhagen, v. 60, n. 2, p. 142-147, Feb. 2002.

LOPEZ-GRANIEL, C.M. et. al. Tumor angiogenesis as a prognostic factor in oral cavity carcinomas. *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, Roma, v. 20, n. 4, p. 463-468. Dec. 2001.

LUTTUN, A.; CARMELIET, P. Angiogenesis and lymphangiogenesis: highlights of the past year. *Curr. Opin. Hematol.*, Philadelphia, v. 11, n. 4, p. 262-271, Jul. 2004.

MA, L. et al. Role of capsaicin sensory nerves and EGF in the healing of gastric ulcer in rats. *Life Sci.*, Oxford, v. 3, n. 66, p. 213-220, Mar. 2000.

MACCLUSKEY, M. Apoptosis, proliferation, and angiogenesis in oral tissues: Possible relevance to tumour progression. *J. Pathol.*, Chichester, v. 191, n. 4, p. 368-375, Aug. 2000.

MARX, J. Telomeres. Chromosome end game draws a crowd. *Science*, Cambridge, v. 29, n. 295, p. 2348-2351, Mar 2002

MARNETT, L.J. Oxyradicals and DNA damage. *Carcinogenesis*, London, v. 21, n. 3, p. 361-370, Mar. 2000.

MARTINS, G.B. Matriz extracelular e miofibroblastos em carcinoma epidermóide da cavidade oral – Análise morfológica, imunohistoquímica e ultra-estrutural. 2001. 101 f. Dissertação (Mestrado) – Programa de pós-graduação em Odontologia com área de concentração em Clínica Odontológica, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal da Bahia, Salvador, 2001.

MEEKER, A.K. et. al. Telomere length abnormalities occur early in the initiation of epithelial carcinogenesis. *Clin. Cancer Res.*, Clin., Denville, v. 10, n. 10, p. 3317-3326, May. 2004.

MORAES, M.F. Incidência e mortalidade por câncer no Brasil. *Rev. Bras. Cancerol.*, Rio de Janeiro, v. 43, n. 3, p. 3-5, Jul/Ago/Set. 1997.

MURNANE, J.P.; SABATIER, L. Chromosome rearrangements resulting from telomere dysfunction and their role in cancer. *Bioessays*, New York, v. 26, n. 11, p. 1164-1174, Nov. 2004.

MYERS, J.N. et al. Squamous cell carcinoma of the tongue in young adults: increasing incidence and factors that predict treatment outcomes. *Otolaryngol. Head Neck Surg.*, Rochester, v. 122, n. 1, p. 44-51, Jan. 2000.

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

NAKACHI, K. et al. Perspectives on cancer immuno-epidemiology. *Cancer Sci.*, Oxford, v. 95, n. 12, p. 921-929, Dec. 2004.

NEPHEW, K.P.; HUANG, T.H. Epigenetic gene silencing in cancer initiation and progression. *Cancer Lett.*, Amsterdam, v. 20, n. 2, p. 125-133, Feb. 2003.

NEWBOLD, R.F. The significance of telomerase activation and cellular immortalization in human cancer. *Mutagenesis*, Oxford, v. 17, n. 6, p. 539-550, Nov. 2002.

NEVILLE, B.W. et al. *Patologia Oral e Maxilofacial*. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998.

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

NORIAN, L.A.; ALLEN, P.M. No intrinsic deficiencies in CD8+ T cell-mediated antitumor immunity with aging. *J. Immunol.*, Baltimore, v. 173, n. 2, p. 835-844, Jul. 2004.

OGDEN, G.R. Alcohol and oral cancer. *Alcohol*, Indianapolis, v. 35, n. 3, p.169-173, Apr. 2005.

OHSHIMA, M. et al. Physiologic levels of epidermal growth factor in saliva stimulate cell migration of an oral epithelial cell line, HO-1-N-1. *Eur. J. Oral Sci.* Copenhagen, v.110, n. 2, p.130-136, Apr. 2002.

PARKIN, D.M. et.al. Global cancer statistics, 2002 *CA. Cancer J. Clin.*, New York, v. 55, n. 2, p. 74-108, Mar-Apr. 2005.

PERUSSI, M.R. et. al. Squamous cell carcinoma of the mouth in the elderly in Sao Paulo. *Rev. Assoc. Med. Bras.*, São Paulo, v. 48, n. 4, p. 341-344, Oct-Dec. 2002.

PHILLIPS, G.D.; STONE, A.M. PDGF-BB induced chemotaxis is impaired in aged capillary endothelial cells. *Mech. Ageing Dev.*, Limerick, v. 73, n. 3, p. 189-196, Mar. 1994.

PILI, R. et. al. Altered angiogenesis underlying age-dependent changes in tumor growth. *J. Natl. Cancer Inst.*, Bethesda, v. 7, v. 86, n. 17, p. 1303-1314, Sep. 1994.

PITMAN, K.T. et. al. Cancer of the tongue in patients less than forty. *Head & Neck.*, Chicago, v. 22, n. 3, p. 297-302, May. 2000.

PLASS, C. Cancer epigenomics. *Hum. Mol. Genet.*, Oxford, v. 11, n. 20, p. 2479-2488, Oct. 2002.

PLOWDEN, J. et al. Impaired antigen-induced CD8+ T cell clonal expansion in aging is due to defects in antigen presenting cell function. *Cell. Immunol.*, Orlando, v. 229, n. 2, p. 86-92, Jun. 2004.

POLVERINI, P.J. Angiogenesis in health and disease: insights into basic mechanisms and therapeutic opportunities - Review. *J. Dent. Educ.*, Washington, v. 66, n. 8, p. 962-975, Aug. 2002.

POPOVTZER A, et al. Squamous cell carcinoma of the oral tongue in young patients. *Laryngoscope*, St. Louis, v. 114, n. 5, p. 915-917, May. 2004.

PURI, S.K. et al. Aberrant promoter hypermethylation of multiple genes in head and neck squamous cell carcinoma. *Am. J. Otolaryngol.*, Cherry Hill, v. 26, n. 1, p. 12-17, Jan-Feb. 2005.

REED, M.J. et al. Neovascularization in aged mice: delayed angiogenesis is coincident with decreased levels of transforming growth factor beta1 and type I collagen. *Am. J. Pathol.*, Bethesda, v. 152, n.1, p. 113-123, Jan. 1998.

REGEZI, J.A. et al. p53, p21, Rb, and MDM2 proteins in tongue carcinoma from patients < 35 versus > 75 years. *Oral Oncol.*, Oxford, v. 35, n. 4, p. 379-383, Jul. 1999.

RICHARDSON, B. Impact of aging on DNA methylation- Review. *Ageing Res. Rev.*, Oxford, v. 2, n. 3, p. 245-261, Jul. 2003.

RIVARD, A. et al. Age-dependent impairment of angiogenesis. *Circulation*, Dallas, v. 99, n. 1, p. 111-120, Jan. 1999.

RUKAVINA, D. et al. Age-related decline of perforin expression in human cytotoxic T lymphocytes and natural killer cells. *Blood*. Washington, v. 92, n. 7, p. 2410-2420, Oct. 1998.

SADOUN, E.; REED, M.J. Impaired angiogenesis in aging is associated with alterations in vessel density, matrix composition, inflammatory response, and growth factor expression. *J. Histochem. Cytochem.*, New York, v. 51, n. 9, p. 1119-1130, Sep. 2003.

SANCHEZ, M.J. Oral and oropharyngeal cancer in Spain: influence of dietary patterns. *Eur. J. Cancer Prev.* London, v. 12, n. 1, p. 49-56, Feb 2003

SASAKI, T. et al. Clinico-pathological features of squamous cell carcinoma of the oral cavity in patients <40 years of age. *J. Oral Pathol. Med.*, Copenhagen, v. 34, n. 3, p.129-33, Mar. 2005.

SCULLY, C. Oral cancer; the evidence for sexual transmission. *Br. Dent. J.*, London, v. 199, n. 4, p. 203-207, Aug. 2005.

SAWAIR, F.A. et. al. Invasive front grading: reliability and usefulness in the management of oral squamous cell carcinoma. *J. Oral Pathol. Med.*, Copenhagen, v. 32, n. 1, p. 1-9, Jan. 2003.

SHIMADA, T. et. al. Angiogenesis and vasculogenesis are impaired in the recocious-aging klotho mouse. *Circulation*, Dallas, v. 31, n. 110, p. 1148-1155, Aug. 2004.

SMITH, E.M. et al. Age, sexual behavior and human papillomavirus infection in oral cavity and oropharyngeal cancers. *Int. J. Cancer*. New York, v. 20, n. 5, p. 766-772, Feb. 2004.

SIEGELMANN-DANIELI, N. et. al. Oral tongue cancer in patients less than 45 years old: institutional experience and comparison with older patients. *J. Clin. Oncol.*, Alexandria, v. 16, n. 2, p. 745-753, Feb. 1998.

SCHIMMING, R.; MARME, D. Endoglin (CD105) expression in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Head & Neck*, Chicago, v. 24, n. 2, p. 151-156, Feb. 2002.

SCHIMMING, R. et. al. Angiogenic factors in squamous cell carcinoma of the oral cavity: do they have prognostic relevance? *J. Craniomaxillofac. Surg.*, Edinburgh, v. 32, n. 3, p. 176-181, Jun. 2004.

SCHWARTSBURD, P.M. Age-promoted creation of a pro-cancer microenvironment by inflammation: pathogenesis of dyscoordinated feedback control. *Mech. Ageing Dev.*, Limerick, v. 125, n. 9, p. 581-590, Sep. 2004.

SHIEH, D.B. et. al. Mitochondrial DNA 4,977-bp deletion in paired oral cancer and precancerous lesions revealed by laser microdissection and real-time quantitative PCR. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, New York, v. 101, n. 1, p. 154-67, Apr. 2004.

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

SOLANA, R.; MARIANI, E. NK and NK/T cells in human senescence - Review. *Vaccine*, Amsterdam, v. 18, n. 16, p. 1613-1620, Feb. 2000.

STAMPFER, M.R.; YASWEN, P. Human epithelial cell immortalization as a step in carcinogenesis. *Cancer Lett.*, Amsterdam, v. 194, n. 2, p. 199-208, May. 2003.

STOLL, B.R. et al. A mathematical model of the contribution of endothelial progenitor cells to angiogenesis in tumors: implications for antiangiogenic therapy. *Blood*, Washington, v. 102, n. 7, p. 2555-2561, Oct. 2003.

TAE, K. et. al. Expression of vascular endothelial growth factor and microvessel density in head and neck tumorigenesis. *Clin. Cancer Res.*, Denville, v. 6, n. 7, p. 2821-2828, Jul. 2000.

TAICHMAN, N.S. et al. Vascular endothelial growth factor in normal human salivary glands and saliva: a possible role in the maintenance of mucosal homeostasis. *Lab Invest. Hagerstown*, v. 78, n. 7, p. 869-875, Jul.1998.

TOYOTA, M.; ISSA, J.P. CpG island methylator phenotypes in aging and cancer - Review. *Semin. Cancer Biol.*, London, v. 9, n. 5, p. 349-57, Oct. 1999.

TUMULURI, V.; THOMAS, G. A.; FRASER, I. S. The relationship of proliferating cell density at the invasive tumour frontwith prognostic and risk factors in human oral squamous cell carcinoma. *J. Oral Pathol. Med.*, Copenhagen, v. 33, n. 4, p. 204-208, Apr. 2004.

UICC- International Union Against Cancer. TNM. Disponível em: <<http://www.Uicc.Org./index.php?id=508>>. Acesso em: 05 de Set. 2005.

URBAN, J.L.; SCHREIBER, H. Rescue of the tumor-specific immune response of aged mice in vitro. *J. Immunol.*, Baltimore, v. 133, n. 1, p. 527-534, Jul. 1984.

VARELLA, D. Planejamento familiar. Disponível em <www.drauziovarella.com.br/artigos/pfamiliar.asp>. Acesso em: 03 Dez. 2005.

VERMEULEN, P.B. et. al. Quantification of angiogenesis in solid human tumours: an international consensus on the methodology and criteria of evaluation - Review. *Eur. J. Cancer, New York*, v. 32A, n.14, p. 2474-2484, Dec. 1996.

VERMEULEN, P.B. et. al. Second international consensus on the methodology and criteria of evaluation of angiogenesis quantification in solid human tumours - Review. *Eur. J. Cancer, New York*, v. 38, n. 12, p. 1564-1579, Aug. 2002.

VERSCHUUR, H.P. et al. A matched control study of treatment outcome in young patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. *Laryngoscope*, St. Louis, v. 109, n. 2, p. 249-258, Feb. 1999.

VIJG, J. Somatic mutations and aging: a re-evaluation – Review. *Mutat. Res.*, Amsterdam, v. 17, n. 1, p.117-135, Jan. 2000.

WALLACE, P.K. Decreases in macrophage mediated antitumor activity with aging. *Mech Ageing Dev.*, Limerick, v. 77, n. 3, p.169-184, Jan. 1995.

WALMSLEY, J.G. et. al. Tumor vasculature in young and old hosts: scanning electron microscopy of microcorrosion casts with microangiography, light microscopy and transmission electron microscopy. *Scanning Microsc.*, Elk Grove Village, v. 1, n. 2, p. 823-830, Jun. 1987.

WEI, Y.H. et al. Oxidative damage and mutation to mitochondrial DNA and age-dependent decline of mitochondrial respiratory function. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, New York, v. 20, n. 8, p. 155-70, Nov. 1998.

WEIDNER, et al. Tumor angiogenesis and metastasis-correlation in invasive breast carcinoma. *N. Engl. J. Med.*, Melbourn, v. 324, n. 1, p. 1-8, Jan. 1991.

WHO – World Health Organization. Disponível em <<http://www.who.int/cancer>>. Acesso em: 03 Mar. 2005.

WIN, S.; UENAKA, A.; NAKAYAMA, E. Immune responses against allogeneic and syngeneic tumors in aged C57BL/6 mice. *Microbiol. Immunol.*, Tokyo, v. 46, n. 7, p. 513-519, 2002.

YAMAZAKI, H. et al. Age as a prognostic factor for late local recurrence of early tongue cancer treated with brachytherapy. *Anticancer Res.*, Athens, v. 7, n. 6D, p. 4709-4712, Nov-Dec. 1997.

ANEXO



Ofício nº 431/05-CEP

Porto Alegre, 27 de maio de 2005.

Senhor(a) Pesquisador(a)

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS, apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa intitulado: "Angiogênese tumoral como fator prognóstico em carcinomas epidermóide bucal de pacientes geriátricos".

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Prof. Délio José Kipper

COORDENADOR DO CEP-PUCRS

limo(a) Sr(a)
Dout Eder Abreu Hüttner
N/Universidade