



UNIVERSIDADE FEDERAL DO CEARÁ
CAMPUS SOBRAL-CE
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM BIOTECNOLOGIA

JOSÉ SÉRGIO PONTE

ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DO TRANSPORTADOR DE GLICOSE-1
EM HIPERPLASIA FIBROSA INFLAMATÓRIA E CARCINOMA
EPIDERMÓIDE ORAL

SOBRAL-CE

2013

JOSÉ SÉRGIO PONTE

ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DO TRANSPORTADOR DE
GLICOSE-1 EM HIPERPLASIA FIBROSA INFLAMATÓRIA E
CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia *Campus* Sobral, da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Macromoléculas.

Orientadora: Prof^ª. Dr^ª. Karuza Maria Alves Pereira.

SOBRAL-CE

2013

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação
Universidade Federal do Ceará
Biblioteca do Curso de Medicina – *Campus* de Sobral

P857a

Ponte, José Sérgio.

Análise imuno-histoquímica do transportador de glicose-1 em hiperplasia fibrosa inflamatória e carcinoma epidermoide oral. / José Sérgio Ponte. – 2013.

75 f. : il. color., enc. ; 30 cm.

Dissertação (mestrado) – Universidade Federal do Ceará, Curso de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, Sobral, 2014.

Área de Concentração: Macromoléculas.

Orientação: Prof^ª. Dr^ª. Karuza Maria Alves Pereira.

1. Neoplasias bucais 2. Carcinoma epidermoide. I. Título.

CDD 572

JOSÉ SÉRGIO PONTE

ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DO TRANSPORTADOR DE
GLICOSE-1 EM HIPERPLASIA FIBROSA INFLAMATÓRIA E
CARCINOMA EPIDERMÓIDE ORAL

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia *Campus* Sobral, da Universidade Federal do Ceará, como requisito para obtenção do Título de Mestre em Biotecnologia.

Área de Concentração: Macromoléculas.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Karuza Maria Alves Pereira

Aprovada em: 18 / 12 / 2013

BANCA EXAMINADORA

Prof^a. Dr^a. Karuza Maria Alves Pereira (Orientadora)
Universidade Federal do Ceará *Campus* Sobral

Prof^a. Dr^a. Hellíada Vasconcelos Chaves
Universidade Federal do Ceará *Campus* Sobral

Prof^a. Dr^a. Lissiana Magna Vasconcelos Aguiar
Universidade Federal do Ceará *Campus* Sobral

Dedico à finalização deste trabalho:

À **DEUS**, que em pequenas e profundas intervenções das quais definimos como sorte ou a escolha certo, e que no seu tempo me faz mais humano, proporciona mais equilíbrio e tem sempre me auxiliado a ser útil.

Aos meus pais, *Maria do Socorro Freitas* e em especial a *Francisco Amaury Vasconcelos Ponte (in memorium)*, fonte de experiência, tolerante e amigo, responsável pela minha formação moral, a quem guardo recordação e sinto sua falta.

Eterno obrigado por me educar, ajudar a viver e acreditar em ideais.

Aos meus irmãos e minha família, pela contribuição, apoio e cumplicidade na realização deste sonho.

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora:

Profª. Drª. Karuza Maria Alves Pereira, ética, e sobretudo amor pela profissão; agradeço a sua contribuição, aos seus ensinamentos, por todo seu entusiasmo, por todo o tempo a mim despendido, pela tolerância e paciência. A minha homenagem e admiração.

À Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia Campus Sobral, da Universidade Federal do Ceará (UFC) - PPGE:

Profª. Drª. Lissiana Magna V. Aguiar, toda minha sincera gratidão por repartir seus conhecimentos, princípios e experiência na minha formação. A seu jeito simples e pela dedicação á esta entidade de ensino.

Meus sinceros agradecimentos.

Aos professores:

Aos senhores e senhoras, verdadeiros mestres, transmitindo além de seus, uma experiência de vida. Pela acolhida fraterna e aos ensinamentos transmitidos durante o curso. São mestres, e quando mestres, são amigos, e em sua amizade, compreendem e incentivam a trilhar melhores caminhos. Expresso meus sinceros agradecimentos, respeito e admiração.

Louvor

Á equipe do Laboratório de Farmacologia e a Equipe do Laboratório de Fisiologia:

Agradeço todos vocês ao tempo de convivência e aprendizado.

Á equipe do Laboratório de Histologia

Agradeço ao tempo dedicado as práticas imuno-histológica e presteza na colaboração ao bom andamento dos experimentos

Aos prezados colegas de Mestrado em Biotecnologia Campus Sobral -Universidade Federal do Ceará.

Sem nominá-los, meus prezados amigos, a vivência juntos em alguns momentos, troca de idéias e opiniões pessoais se traduzem em marcas e experiências que devemos levar. Pelo carinho e parceria de todos vocês, deposito meus agradecimentos e que estes momentos jamais serão esquecidos.

É uma honra.

Abraço a todos.

Aos funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia-UFC-CE:

Agradeço ao apoio, a paciência, presteza e disponibilidade que a mim prestaram durante esta caminhada. Sou grato a todos vocês.

Ao conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnologia – CNPq:

Agradeço a viabilidade do curso, proporcionando a elaboração deste ensaio científico.

RESUMO

O câncer continua sendo grande alvo de estudos e investigações científicas, por ser importante causa de morbidade e mortalidade em todo mundo. O carcinoma epidermoide oral (CEO) é a forma mais prevalente de câncer em boca, e apesar dos grandes avanços e descobertas, o prognóstico desse tipo de câncer ainda é pobre, principalmente se descoberto em estágios avançados. A carcinogênese oral é um processo complexo e vários genes podem estar alterados neste processo. Várias proteínas estão alteradas nesses tumores, destacando-se mais recentemente, as proteínas do metabolismo celular, especialmente os Transportadores de Glicose (GLUT). O objetivo da presente pesquisa foi avaliar a expressão imuno-histoquímica de GLUT-1 em CEO comparando com Hiperplasia Fibrosa Inflamatória (HFI), uma lesão proliferativa não-neoplásica. A amostra foi constituída por 30 casos de lesões orais, sendo 15 casos de CEO e 15 HFI. Utilizou-se a técnica imuno-histoquímica da Estreptoavitina-Biotina com o anticorpo GLUT-1 (marca Genetex, diluição 1:300, 60 minutos, recuperação antigênica com citrato pH6), analisando 05 campos de cada caso no aumento de 100X, contando-se o percentual de células positivas. Como resultado obteve-se que a média do percentual de células epiteliais positivas para GLUT-1 no grupo de HFI foi $85.6 \pm 0.9\%$ (mediana = 85.6%, mínima = 81.0%, máxima = 90.1%). A média do percentual de células epiteliais positivas para GLUT-1 no grupo de CEO foi $89.6 \pm 2.7\%$ (mediana = 92.2%, mínima = 72.2%, máxima = 98.0%). Pôde-se observar diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos de estudo ($p=0.033$, teste Mann-Whitney). O percentual de células imunomarcadas quanto à localização nos casos de CEO mostra um percentual maior de 93,4% no rebordo alveolar quando comparado com a língua (64.7%). Com base nos resultados desta pesquisa, observou-se que há uma maior expressão da GLUT-1 nas lesões nos carcinomas do que nas hiperplasias, e isso, pode provavelmente refletir a participação da GLUT em algum mecanismo oncogênico. Contudo, mais estudos são necessários para elucidar melhor a participação desta proteína na carcinogênese oral.

PALAVRAS-CHAVES: Câncer oral. Hiperplasia Fibrosa Inflamatória; Transportadores de Glicose; Carcinoma epidermoide; GLUT-1.

ABSTRACT

Cancer is still a big target of scientific studies and research, to be an important cause of morbidity and mortality worldwide. Oral squamous cell carcinoma (CEO) is the most prevalent form of cancer in the mouth, and despite the great advances and discoveries, the prognosis of this cancer is still poor, mainly discovered in advanced stages. Oral carcinogenesis is a complex and multiple genes can be altered in this process. Several proteins are altered in these tumors, highlighting more recently, proteins of cellular metabolism, especially glucose transporters (GLUT). The objective of this research was to evaluate the immunohistochemical expression of GLUT-1 in comparison with CEO inflammatory fibrous hyperplasia (HFI), a non-neoplastic proliferative lesion. The sample consisted of 30 cases of oral lesions, 15 cases of HFI CEO and 15. We used immunohistochemical technique Estreptoavitina-Biotin with GLUT-1 antibody (Genetex, dilution 1:300, 60 minutes, antigen retrieval with citrate pH 6), analyzing 05 fields in each case 100X, telling the percentage of positive cells. As a result it was found that the mean percentage of epithelial cells positive for GLUT-1 in inflammatory fibrous hyperplasia group was $85.6 \pm 0.9\%$ (median = 85.6% = 81.0% minimum, maximum = 90.1%). The mean percentage of epithelial cells positive for GLUT-1 in the group of squamous cell carcinoma was $89.6 \pm 2.7\%$ (median = 92.2% = 72.2% minimum, maximum = 98.0%). Could observe a statistically significant difference between the two study groups ($p = 0.033$, Mann-Whitney test). The percentage of immune cells marked as to the location where the CEO shows a higher percentage of 93.4% in the alveolar ridge compared to the tongue (64.7%). Based on the results of this research, it was observed that there is an increased expression of GLUT-1 in lesions in carcinomas than in hyperplastic, and this may probably reflect the involvement of GLUT in some oncogenic mechanism. However, more studies are needed to further elucidate the involvement of this protein in oral carcinogenesis.

KEYWORDS: Oral Cancer; Inflammatory Fibrous Hyperplasia; Glucose transporters; Squamous cell carcinoma; GLUT-1.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1.	Provável curso clínico do câncer de boca. Fonte: BRASIL/INCA, 2002.....	23
Quadro 2.	Categoria de estadiamento clínico TNM para CEO. Fonte: MS\INCA (2006).....	27
Quadro 3.	Gradação histopatológica de malignidade (SGHM). Fonte: MS\INCA (2006).....	28
Quadro 4.	Especificidade, clone, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação do anticorpo primário a ser utilizado no estudo.....	44
Figura 1.	Aspectos clínicos do Carcinoma de boca. Fonte: INCA, 2006	25
Figura 2.	Estrutura molecular bidimensional da GLUT. Fonte :Adaptado de Machado; Schaan; Seraphim, (2006).....	34
Figura 3.	Sequência de aminoácidos e de membrana de topologia GLUT1 humano. Os resíduos de aminoácidos são designados pelo código de letra única. Os segmentos transmembranar são numerados 1-12. A ligação do oligossacárido ligado a N é mostrado em N45. Resíduos que parecem ser fundamentais para a atividade de transporte são mostrados em amarelo. Adaptado de Mueckler e Makepeace (2009).....	35
Figura 4.	Campo com apresentação de contagem no <i>ImageJ</i> . Área de HFI.....	46
Figura 5:	Fotomicrografia de HFI evidenciando tecido conjuntivo fibroso bem colagenizado, infiltrado inflamatório mononuclear e epitélio hiperplásico (H/E 100X).....	51

Figura 6:	Fotomicrografia de CEO demonstrando ninhos de células neoplásicas com pérolas córneas (H/E 100X).....	51
Figura 7:	Fotomicrografia demonstrando ausência de imunopressão para GLUT-1- controle negativo em HFI (LSAB 400X).....	52
Figura 8:	Fotomicrografia demonstrando ausência de imunomarcção para GLUT-1- controle negativo em CEO (LSAB 100X).....	52
Figura 9:	Fotomicrografia do controle positivo- intensa imunomarcção em eritrócitos (LSAB 200X).....	53
Figura 10:	Fotomicrografia evidenciando imunopressão de GLUT-1 em HFI principalmente nas camadas basal e espinhosa (LSAB 100X).....	53
Figura11:	Fotomicrografia destacando intensa imunomarcção membranar e citoplasmática de GLUT-1 em HFI (LSAB 400X).....	54
Figura 12:	Fotomicrografia evidenciando a imunomarcção de GLUT-1 nas células neoplásicas em CEO (LSAB 100X).....	54
Figura 13:	Destaca-se a intensa imunopressão citoplasmática de GLUT-1 em CEO (LSAB 400X).....	55
Figura 14:	Média do Percentual de Células Imunopositivas em amostras de hiperplasias fibrosas inflamatórias e carcinomas epidermóides levantados no Setor de Métodos de Diagnóstico do Curso de Odontologia, Universidade Federal do Ceará, Campus Sobral, 2013.....	57
Figura 15:	Média do Percentual de Células Imunopositivas em amostras de carcinomas epidermóides em homens e mulheres levantados no Setor de Métodos de Diagnóstico do Curso de Odontologia, Universidade Federal do Ceará, <i>Campus</i> Sobral, 2013.....	58

Figura 16: Média do Percentual de Células Imunopositivas em amostras de carcinomas epidermoides mediante localização topográfica levantados Setor de Métodos de Diagnóstico do Curso de Odontologia, Universidade Federal do Ceará, *Campus* Sobra, 2013..... 59

LISTA DE TABELAS

- Tabela 1.** Família GLUT. Fonte: Adaptado de M. Mueckler, B. Thorens \Molecular Aspects Medicine (2013) 37
- Tabela 2.** Distribuição dos casos clínicos de HFI considerando sexo, idade e localização anatômica da lesão primária. Fonte: Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFC-Sobral, 2013..... 49
- Tabela 3.** Distribuição dos casos clínicos de CEO considerando sexo, idade, localização anatômica da lesão primária e raça. Fonte: Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFC-Sobral, 2013..... 50
- Tabela 4:** Média do Percentual de Células Imunopositivas em amostras de hiperplasias fibroepiteliais e carcinomas epidermóides levantados Setor de Métodos de Diagnóstico do Curso de Odontologia, Universidade Federal do Ceará, *Campus Sobral*..... 56
- Tabela 5:** Média do Percentual de Células Imunopositivas em amostras de carcinomas epidermóides em homens e mulheres levantados Setor de Métodos de Diagnóstico do Curso de Odontologia, Universidade Federal do Ceará, *Campus Sobral*..... 57
- Tabela 6:** Média do Percentual de Células Imunopositivas em amostras de carcinomas epidermóides mediante localização topográfica levantada no Setor de Métodos de Diagnóstico do Curso de Odontologia, Universidade Federal do Ceará, *Campus Sobral*, 2013..... 59

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Do inglês, <i>bovin serum albumin</i> , traduzido como albumina de soro bovino.
ADH	Enzima álcool desidrogenase.
ALDH	Enzima aldeído desidrogenase.
E6	Do inglês <i>protein E6</i> , refere-se ao gene E6 ou à proteína E6.
E7	Do inglês <i>protein E7</i> , refere-se ao gene E7 ou à proteína E7.
ERO	Do inglês <i>oxigen reactive species</i> , traduzido como espécie reativa de oxigênio.
CEO	Carcinoma Epidermoide Oral
COOH	Refere-se à extremidade carboxi-terminal.
CYP1A1	Refere-se uma subfamília do citocromo p450 (CYP).
CYP1B1	Refere-se uma subfamília do citocromo p450 (CYP).
GLUT	Do inglês <i>glucose transportert</i> , traduzido como transportador de glicose.
GLUT-1	Do inglês <i>glucose transporter-1</i> , traduzido como transportador de glicose-1.
H&E	Refere-se a técnica de coloração hematoxilina e eosina
HFI	Hiperplasia Fibrosa Inflamatória.
HMIT	Do inglês <i>H⁺/myo-inositol co-transporter</i> , traduzido como transportador H ⁺ /ligado ao mio-inositol.

HPV	Do inglês <i>human papillomavirus</i> , traduzido como papilomavírus humano.
INCA	Instituto Nacional do Câncer.
kDa	Do inglês <i>kilodalton</i> , traduzido como quilodálton.
LSAB	Do inglês <i>labeled streptavidin biotin</i> , traduzido como conjugado estreptoavidina-biotina.
NH2	Refere-se à extremidade amino terminal.
SGHM	Sistema de Gradação Histopatológica de Malignidade.
SLC2A1	Refere-se ao gene da GLUT-1
TBC1DA	Do inglês <i>TBC1 domain family member 4</i> , traduzido como TBC1 membro da família de domínio 4.
TNM	Do inglês <i>tumor-node-metastasis</i> , refere-se ao sistema de estadiamento clínico que avalia o tamanho do tumor, envolvimento de linfonodo regional e envolvimento por metástase à distância.
TRIS-HCL	Tris-hidroximetil-aminometano.
UICC	Do inglês <i>International Unios Againsts Cancer</i> , traduzido como união internacional contra o câncer.
UV	Ultra Violeta.
WNK1	Do inglês <i>lysine deficient protein kinase</i> , traduzido como proteína quinase lisina deficiente 1.
VEGF	Do inglês <i>vascular endotelial growth factor</i> traduzido como fator de crescimento do endotélial vascular.

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA	18
2.1	Carcinoma epidermoide oral.....	18
2.1.1	Etiologia do carcinoma epidermoide oral.....	19
2.1.2	Características clínicas do carcinoma epidermoide oral.....	22
2.1.3	Características histológicas do carcinoma epidermoide oral	25
2.1.4	Tratamento do carcinoma epidermoide oral.....	29
2.2	Hiperplasia fibrosa inflamatória.....	31
2.3	Transportadores de Glicose – GLUT.....	33
3	OBJETIVO	40
4	MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1	Caracterização do Estudo.....	41
4.2	População e Amostra.....	41
4.2.1	Critérios de inclusão da amostra.....	42
4.2.2	Critérios de exclusão da amostra.....	42
4.3	Estudo morfológico.....	42
4.4	Estudo Imuno-histoquímico.....	43
4.4.1	Método Imuno-histoquímico.....	43
4.4.2	Análise da marcação Imuno-histoquímica.....	44
4.5	Análise estatística.....	47
4.6	Implicações éticas.....	47

5	RESULTADOS	48
5.1	Caracterização da amostra.....	48
5.2	Resultado da análise da imunexpressão da GLUT-1.....	56
6	DISCUSSÃO	60
7	CONCLUSÃO	67
8	REFERÊNCIAS	68

1 INTRODUÇÃO

O câncer constitui-se como uma das principais causas de óbito em todo mundo sendo superado apenas pelas doenças cardiovasculares nos países desenvolvidos, com diagnóstico anual de 12,7 milhões de pessoas e 7,6 milhões morrem vítimas desta enfermidade. Se nada for feito em 2030 teremos 26 milhões de novos casos e 17 milhões de óbitos por ano, aumentando principalmente em indivíduos dos países em desenvolvimento (INCA, 2013).

A neoplasia maligna da cavidade oral é o sétimo câncer mais prevalente no Brasil, com estimativa de 14.170 novos casos sendo 9.990 em homens e 4.180 em mulheres, destes representando 4.891 óbitos, sendo 3.882 entre homens e 1.009 em mulheres (INCA, 2013).

A maior frequência das neoplasias malignas da cavidade oral é constituída pelo carcinoma epidermoide oral (CEO), também denominado como carcinoma de células escamosas ou carcinoma espinocelular, perfazendo cerca de 90% das neoplasias malignas da cavidade oral (NEVILLE *et al.*, 2009). Dentre regiões anatômicas mais afetadas estão: a língua, assoalho oral e o lábio inferior (GERVASIO *et al.*, 2001; RIBEIRO *et al.*, 2009).

O carcinoma epidermoide oral surge a partir da camada espinhosa do epitélio de revestimento e apresentam variações histológicas, entretanto são caracterizadas pela formação de ilhas e cordões celulares atípicos que lembra a morfologia das células da camada espinhosa do epitélio. Esta neoplasia tem incidência maior em pacientes acima dos 50 anos, apresenta etiologia multifatorial, sendo o fumo um dos principais fatores etiológicos associado ou não ao álcool, porém outros fatores como: ação da luz solar, microorganismos patogênicos, deficiências nutricionais, e hereditariedade também têm sido descritos como fatores decisivos na oncogênese tumoral (AGUIAR. *et al.*, 2011).

O carcinoma epidermoide não segue um modelo molecular necessário a sua progressão tornando-o uma doença heterogênea na sua etiologia (KUMAR, ABBAS, FAUSTO, 2010), parâmetros clínicos e histológicos são portanto exíguos na determinação do comportamento biológico do tumor, pois pacientes com o mesmo estadiamento e grau de diferenciação da neoplasia, apresentam distorções no curso clínico da doença e no tempo de sobrevida (WANG *et al.*, 2006).

Quando diagnosticado precocemente, o índice de sobrevida em cinco anos é de 80%, entretanto comumente o diagnóstico da doença é determinado em estágio avançado que determina uma sobrevida de 50% em cinco anos (KOWALSKI, 2005).

Deve-se ressaltar atualmente que a avaliação prognóstica do carcinoma epidermoide oral não deve basear-se em informações isoladas, ou seja, feita unicamente através do SGHM (Sistema de Gradação Histológica de Malignidade) ou sistema de estadiamento TNM (T;tamanho do tumor; N: presença de nódulo; M: metástase) (COSTA *et al.*, 2005), visto que o carcinoma epidermoide oral pode apresentar variantes e ressaltando que neste cenário o uso da imuno-histoquímica faz-se necessário no auxílio do diagnóstico bem como no estadiamento destas lesões (CALY *et al.*, 2013).

Já a hiperplasia fibrosa inflamatória (HIF) trata-se de uma lesão reacional hiperplásica do tecido conjuntivo fibroso em resposta a uma injúria crônica e de baixa intensidade (SANTOS *et al.*, 2004; FALCÃO *et al.*, 2009). É uma lesão que acomete a 4ª e 5ª década de vida, principalmente rebordo alveolar superior com maior predileção pelo sexo feminino.

Várias proteínas estão alteradas nas neoplasias malignas, destacando-se mais recentemente, as proteínas do metabolismo celular. As células tumorais têm importante propriedade de substituição da fosforilação oxidativa pela glicólise como fonte predominante de produção de energia (DEMASI *et al.*, 2010).

Transportadores de glicose (GLUT) medeiam a movimentação da glicose via membrana celular nas células tumorais, facilitando a manutenção do metabolismo energético glicolítico nos casos de substrato limitado e em regiões pobremente vascularizada. (AYALA *et al.*, 2010). O GLUT-1, o qual é um dos 14 membros de uma superfamília de transportadores de glicose está expresso em várias linhagem de células cancerosas, sendo responsável pela captação de glicose durante o estágio de hipóxia tumoral . Vale ressaltar que a expressão de GLUT-1 é um potente marcador de prognóstico para carcinoma epidermoide oral (AYLA, 2010).

A expressão dos GLUTs em câncer têm sido estudado com objetivo de avaliar e elucidar o papel dos marcadores de hipóxia na biologia dos tumores no auxílio ao tratamento, prognóstico e sobrevida dos pacientes (TANAKA *et al.*, 2008).

Diante do exposto, o propósito da presente pesquisa é analisar por meio de imuno-histoquímica a expressão da GLUT-1 em casos de hiperplasia fibrosa inflamatória (HFI) e carcinoma epidermoide oral (CEO) comparando sua expressão nestas lesões.

PALAVRAS-CHAVES: Câncer oral. Hiperplasia Fibrosa Inflamatória. Transportadores de Glicose. Carcinoma epidermoide. GLUT-1.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Carcinoma epidermoide oral

As doenças crônicas de caráter degenerativo não transmissíveis vêm mostrando uma ascensão progressiva no tocante a mortalidade, e destacando-se entre elas as neoplasias malignas entre a segunda causa de morte no Brasil. No mundo em 2005, foram registrados um total de 50 milhões de morte, o câncer foi responsável por 7,6 milhões, representando 13% de todas as mortes, e do total de óbitos 70% esta associado a países de média ou baixa renda (WHO, 2005).

O termo Câncer de Cabeça e Pescoço é definido com bases anatômicas e topográficas para descrever tumores malignos do trato aero digestivo superior, incluindo a cavidade oral, faringe e laringe. Patologias malignas das glândulas salivares, tonsilas e orofaringe, portanto são áreas anatômicas associadas ao câncer de boca (INCA, 2013). Por ser uma região de origem embriológica complexa, originada dos três folhetos embrionários (ectoderma não queratinizado; endoderma rico em componente glandular salivar; mesoderma que varia de tecido ósseo a linfoide), os tipos de neoplasias malignas podem variar desde tumores mesenquimais até tumores de glândulas salivares, sendo o mais comum o carcinoma epidermoide (ASCO, 2009). Devido a este espectro múltiplo, temos uma grande variação da incidência de tumores benignos e malignos para cada área, o mesmo ocorrendo com a forma de tratamento ou abordagem cirúrgica devido à localização dos mesmos (BOYLE, 2003). As características clínicas e de prognóstico de lesão e resposta ao tratamento são distintas, todavia a maioria dos estudos não distingue as referidas regiões anatômicas (HA; CALIFANO, 2004; ORD, 2006).

Segundo INCA (2012), estima-se 14.170 novos casos de carcinoma de boca sendo, 9.990 em homens e 4.180 em mulheres com cerca de 4.891 óbitos.

A maior parte dos tumores da cavidade oral é constituída pelo carcinoma epidermoide totalizando cerca de 90% dos casos de neoplasia orais, com menor incidência para os neoplasmas salivares, os sarcomas, os melanomas de mucosa e os tumores odontogênicos. O carcinoma epidermoide oral apresenta-se também como o mais comum da região da cabeça e

pescoço, predomina no sexo masculino e incidência relevante na faixa etária acima dos 50 anos (COSTA *et al.*, 2002; PARKIN *et al.*, 2005).

2.1.1. Etiologia do carcinoma epidermoide oral

O CEO é uma doença multifatorial, nas quais vários fatores estão envolvidos, como uso do fumo, consumo do álcool e outros agentes agressores externos levados à cavidade oral, agindo de forma isolada ou em conjunto, podem originar essa neoplasia. Apesar de não haver uma clara compreensão sobre a etiologia dos cânceres, estes fatores citados têm sido detectados e são conhecidos como fatores de risco e compõem a base para uma prevenção efetiva contra estas lesões. (MANSOUR *et al.*, 2003; BALARAM *et al.*, 2002)

A etiologia do CEO é complexa, de caráter multifatorial envolvendo fatores extrínsecos e intrínsecos na sua etiopatogênese (MASSANO *et al.*, 2006). Não há um agente ou fator isolado aceito no caso do CEO, sendo provável dois ou mais fatores indutores da malignidade causando alterações genéticas que são a base da progressão do carcinoma epidermoide. O principal fator de risco é o fumo. A exposição a raios solares (UV) é considerado um fator etiológico evidente no processo da carcinogênese de CEO de lábio inferior (MANSOUR *et al.*, 2003; GREENWOOD, 2003).

Cânceres orais podem desenvolver-se em indivíduos sem história de exposição ao fumo, álcool ou raios UV (DAHLSTROM *et al.*, 2003), podendo outros fatores como HPV (Papiloma Vírus Humano) e hereditariedade estarem fortemente envolvidos.

Os cânceres da cavidade oral nos estágios iniciais da doença podem apresentar-se como placas elevadas firmes, como áreas irregulares ou como áreas verrucosas. Algumas alterações genéticas explicariam um modelo molecular para a progressão dos neoplasmas orais. Uma das primeiras alterações seria a perda de regiões do cromossomo 3q e 9p21 que resultaria na inativação do *gen p16*, esta alteração está associada a uma transição hiperplásica e hiperqueratótica. A perda dos cromossomos 17p com supressão do *p53* estaria definindo um grau de progressão displásica do tumor; e, portanto alterações mais severas como deleções. Alterações nos cromossomos 4q, 6p, 8p, 11q, 13q e 14q podem induzir o grau de malignidade. Elevada expressão no gene da ciclina D1 localizado no cromossomo 11q13 estaria associada a invasão de uma certa fração de crescimento tumoral (KUMAR, ABBAS, FAUSTO, 2010).

Aproximadamente 90% dos pacientes que desenvolveram câncer de boca usaram alguma forma de fumo, pois sabe-se que inúmeras substâncias carcinogênicas são encontradas em sua composição química. O risco de morrer pelo câncer oral é quatro vezes maior para o fumante de cigarro do que aquele que se priva do fumo. Observou-se que em um grupo de indivíduos exposto a um determinado nível de carcinógeno apenas uma fração deste grupo desenvolveu câncer, sugerindo que parte desta substância requer metabolização para ser efetivamente carcinogênica, portanto crê-se que a susceptibilidade ao câncer parece depender de uma forma mais específica das características genéticas e da capacidade de metabolizar estas substâncias e eliminá-las com eficiência (KOSOMARA *et al.*, 2001).

Muitas evidências clínicas indiretas implicam o hábito de fumar tabaco no desenvolvimento de câncer de boca. A proporção de tabagistas entre os pacientes com carcinoma oral é duas vezes maior do que na população geral. Estudos têm mostrado que o fumo de cachimbo ou charuto agrega um risco maior para o câncer oral do que o fumo de cigarros (NEVILLE *et al.*, 2009).

Outros fatores têm sido relatados na etiologia do carcinoma epidermoide oral, como hereditariedade, desnutrição e associação com agentes biológicos, o estado sistêmico do indivíduo a atrofia da mucosa oral e a Síndrome de Plummer-Vinson.

Atualmente tem sido citado a possibilidade do papel do HPV (PapilomaVírus Humano) como agente com potencial carcinogênico bem definido no carcinoma de colo de útero, porém seu papel no câncer de boca ainda não está esclarecido. Subtipos de alto risco como 16,18,31 e 33 do HPV, com potencial carcinogênico, estão provavelmente relacionados as displasias e ao carcinoma epidermoide. Seu mecanismo envolve basicamente a produção de duas proteínas codificadas pelo vírus, a E6 e E7 sendo que promove degradação do gene supressor dos tumores, o p53 guardião celular e a proteína E7 inibindo o gene do Rb. Respectivamente estas proteínas controlam parcialmente o ciclo celular (NEVILLE *et al.*, 2009; SCULLY, 2005).

No Brasil, o carcinoma epidermoide oral é mais associado ao tabaco sob a forma de cachimbo, cigarro, charuto, enquanto na Índia há uma relação com o fumo mascado e em outros países ao fumo invertido (BRENER *et al.*, 2007). Forma de cigarro, cachimbo ou charuto tem uma relação direta com a leucoplasia, entretanto o uso de rapé ou o ato de mascar determinam a lesão em uma localização anatômica da boca em que mantido aparecerá neste local uma lesão leucoplásica revelando causa efeito. A grande maioria dos componentes do tabaco relacionados à carcinogênese são hidrocarbonetos aromáticos policíclicos como o benzo(α)pireno, sofrem bioativação prévia das enzimas do citocromo P450 (CYP1A1 e

CYP1B1) que se ligam covalentemente ao DNA formando adutos na célula e não são reparados e podendo assim acarretar mutação em genes relacionados a proliferação, diferenciação e apoptose celular (KUMAR;ABBAS; FAUSTO, 2010). O risco para um segundo carcinoma primário do trato aerodigestivo superior é duas a seis vezes maior para pacientes tratados do câncer oral que continuam a fumar do que para os que cessam o hábito após o diagnóstico (NEVILLE *et al.*, 2009).

Na carcinogênese oral, o álcool por si só não é um agente iniciador, mas promotor, e a quantidade total de álcool ingerida, e tempo de duração do hábito são mais importantes do que o tipo de bebida alcoólica ingerida. *In vitro*, foi demonstrado que o álcool modifica a permeabilidade da mucosa oral, e isto parece ter um sinergismo entre consumo de álcool e fumo no desenvolvimento do câncer de boca. Consumo de bebida alcoólica facilitaria a ação de substâncias cancerígenas do fumo (HOWIE, 2001). Risco do álcool no desenvolvimento do carcinoma epidermoide é dose-dependente e tempo dependente e a combinação do uso excessivo do tabaco por período prolongado pode aumentar o risco individual para o câncer oral para um risco relativo de 15 vezes ou mais (NEVILLE *et al.*, 2009).

A mucosa oral não é local preferencial para a degradação do álcool, mas alguma quantidade é absorvida e metabolizada em nível tecidual durante a deglutição. O álcool sofre degradação hepática, principal pela via da enzima ADH (desidrogenase alcoólica) convertido em acetaldeído, e este em acetato pela enzima ALDH (aldeído desidrogenase), em seguida o acetato chega a diferentes partes do corpo onde pode ser aproveitado para produzir energia. Todavia a atividade da ALDH é baixa na boca, podendo haver acúmulo de acetaldeído na cavidade oral (DONG, 1996).

No Nordeste parece haver uma tendência maior do câncer de lábio, uma vez que grande parte dos pacientes provém do meio rural e está exposta cronicamente ao tabaco e luz solar. A radiação solar é a principal causa do carcinoma de lábio inferior, comumente em indivíduos de pele clara expostos a bronzamento e bem mais comum em indivíduos que trabalham expostos aos raios UV (LUNA-ORTIZ *et al.*, 2004).

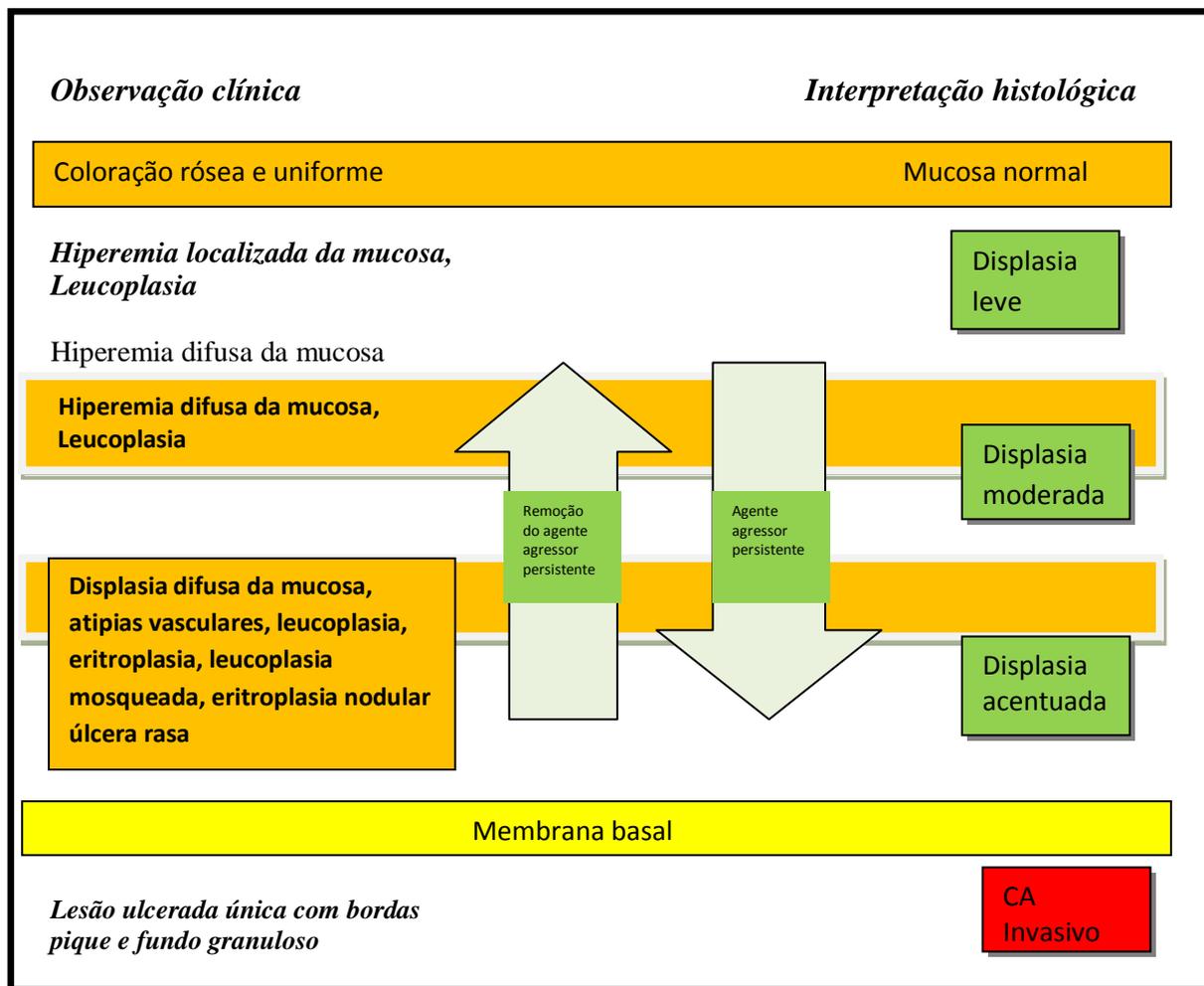
O grau de risco está relacionado com tipo de radiação UV, tempo de exposição ao agente agressor e capacidade de proteção melânica natural da pele como resposta a agressão. Sabe-se que a radiação solar não é ionizante, pois não tem capacidade suficiente de deslocar eletros durante sua passagem pelos tecidos, contudo com o tempo ela é capaz de produzir lesões significativas de importância biológica como lesão do DNA pelo acúmulo de dímeros de piridina sem reparo oportuno, inativação de enzimas do ciclo celular, induzir a mutações e morte celular (KUMAR, ABBAS, FAUSTO, 2010).

2.1.2 Características clínicas do carcinoma epidermoide oral

O carcinoma epidermoide oral tem origem no epitélio de revestimento da mucosa oral, apresentando evolução rápida, provavelmente a partir de ulceração persistente e com caráter invasivo eminente. Suspeitar do câncer de boca em estágio avançado é relativamente fácil, contudo a dificuldade é diagnosticar uma lesão aparentemente inofensiva especialmente na fase inicial que não apresenta sintomas consideráveis. Indivíduos com CEO geralmente buscam o serviço profissional após oito meses em média do início da lesão, chegando até dois anos em grupos sócio-econômicos mais baixos (SOUZA, 2001).

Na realidade diversas lesões podem manifestar-se clinicamente como placas brancas na superfície da cavidade oral cujo diagnóstico definitivo pode ser feito pelo exame histopatológico. O carcinoma epidermoide oral exhibe várias apresentações clínicas (Figura 1) como as formas leucoplásicas (placas brancas), eritroplásicas (placas vermelhas), eritroleucoplásicas (placas brancas e vermelhas) ou ulceradas, envolvendo três padrões de crescimento: exofítico (formação de aumento de volume), endofítico (invasivo, ulcerado) e verrucoso (NEVILLE *et al.*, 2009).

O carcinoma epidermoide oral (Quadro 1) pode evoluir iniciando com uma lesão hiperkeratótica sem displasia a carcinoma invasivo. O CEO envolve alterações no equilíbrio homeostático do epitélio da mucosa oral que pode evoluir de lesões potencialmente malignas, como uma displasia epitelial oral, progredindo para uma neoplasia epitelial. A transição do epitélio da mucosa oral normal para carcinoma epidermoide é um processo multifatorial extremamente complexo e que pode demorar anos, e divergências na aparência clínicas destas lesões podem representar passos diferentes no processo da carcinogênese (LONGSHORE, 2002). O carcinoma epidermoide oral pode acometer qualquer parte da mucosa oral, porém a língua, assoalho da boca e lábio inferior são os locais de maior prevalência (GERVÁSIO *et al.*, 2001). Segundo Larsen *et al.* (2009), as lesões da língua e do assoalho da boca correspondem de 41% a 74% dos carcinomas epidermoides de boca, respectivamente.



Quadro1. Provável curso clínico do câncer de boca. Fonte: BRASIL/INCA, 2002.

A OMS define leucoplasia (Figura 1) como tecido morfológicamente alterado com maior susceptibilidade de ocorrência de câncer. A leucoplasia tem sido usado para designar uma mancha ou placa esbranquiçada na superfície de uma mucosa, não só da cavidade oral, sendo a lesão potencialmente maligna mais comumente encontrada na cavidade oral (WARNAKULASURIYA, 2001).

Aproximadamente 70% das leucoplasias orais são encontradas no vermelhão do lábio inferior, na mucosa jugal e na gengiva. Entretanto, as lesões na língua, vermelhão dos lábios e assoalho da boca somam mais de 90% daquelas que indicam displasia ou carcinoma. A leucoplasia que não apresenta displasia frequentemente não é removida, mas a avaliação clínica a cada seis meses é recomendada por causa da possibilidade de progressão para a displasia epitelial. De forma geral, 4% das leucoplasias bucais tornam-se carcinomas de células escamosas, de acordo com os exames de acompanhamentos (NEVILLE *et al.*, 2009).

A eritroplasia foi descrita em 1911 por Queyrat, definida como uma lesão de glânde

em indivíduos idosos sífilíticos. Atualmente entende-se que a eritroplasia é uma entidade clínica de mucosa que histologicamente mostra alterações que vão de displasia leve ao carcinoma *in situ* chegando até mesmo ao carcinoma invasivo. A eritroplasia é definida como mácula ou placa eritematosa demarcada com textura macia e aveludada na mucosa (CASIGLIA; WOO, 2001). Entretanto verificou-se também haver outras lesões orais indistinguíveis de lesões displásicas, justificando-se a importância do histopatológico em todas as lesões avermelhadas. A eritroplasia oral é uma lesão rara, entretanto suas taxas de transformação maligna são consideradas as mais elevadas entre todas as lesões potencialmente malignas da mucosa oral (REICHART, 2005).

A eritroplasia (Figura 1) pode apresentar três manifestações clínicas na cavidade oral. A forma homogênea que parece uma lesão vermelho brilhante, amolecida com margens retilíneas frequentemente de grande extensão encontrada principalmente na mucosa jugal e às vezes no palato mole; a eritroplasia intercalada com áreas de leucoplasia, que são áreas eritematosas irregulares e não tão vermelhas, encontradas frequentemente na língua e assoalho da boca; e eritroplasia mosqueada, que são lesões vermelhas moles de contorno irregular e superfície granular mosqueada por minúsculas placas brancas. A lesão eritroplásica assintomática era o sinal visível mais precoce do carcinoma epidermoide invasivo ou *in situ*. A eritroplasia ao contrário da leucoplasia é uma lesão pouco comum. (NEVILLE, 2009).

O diagnóstico clínico das lesões de leucoplasia e eritroplasia decorre de um diagnóstico por exclusão, devendo o profissional excluir outras patologias, como candidíase, líquen plano, leucoedema, lesões vasculares e queimaduras (REGEZI, 2012; SCIUBBA; 2001; NEVILLE *et al.*, 2009).

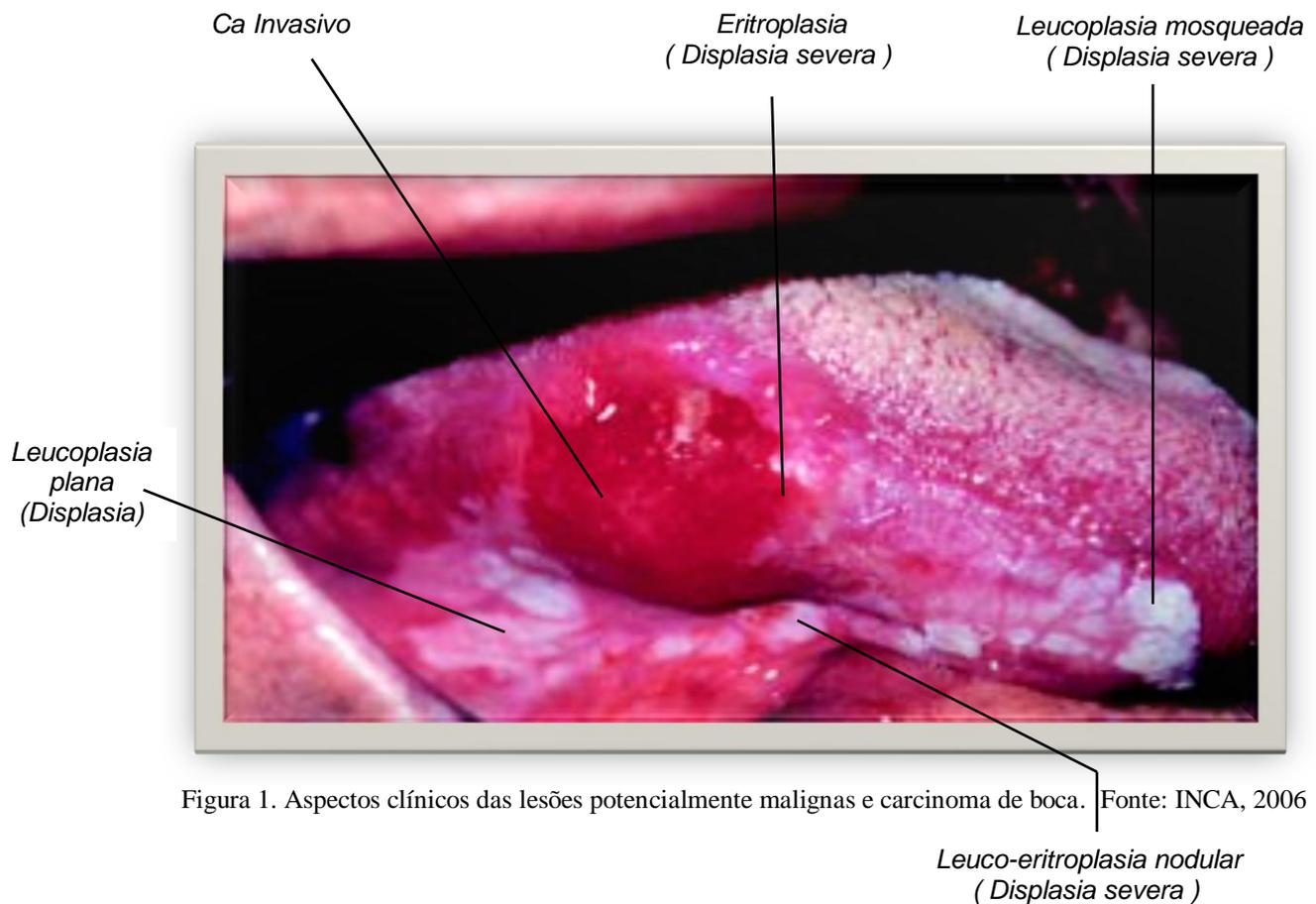


Figura 1. Aspectos clínicos das lesões potencialmente malignas e carcinoma de boca. Fonte: INCA, 2006

O CEO exibe um prognóstico bastante reservado e o diagnóstico precoce revela-se um dos grandes fatores favoráveis ao aumento na sobrevivência dos pacientes acometidos (LÓPEZ-JORNET; CAMACHO-ALONSO, 2006).

De uma forma geral esses neoplasmas tendem a se infiltrar localmente antes de se disseminarem. As metástases do carcinoma oral são relativamente comuns. As metástases se localizam especialmente nos linfonodos submandibulares jugulares superior interno, podendo disseminar para regiões mais distantes. Os órgãos mais comumente atingidos nas metástases a distância são o fígado, pulmão, ossos e linfonodos mediastinais. (OKADA et al. 2004).

2.1.3. Características histológicas do carcinoma epidermoide oral

O carcinoma de células epidermóides oral é um câncer do epitélio escamoso estratificado, sendo caracterizado pela invasão do tecido conjuntivo de sustentação e estruturas adjacentes por células epiteliais malignas, com capacidade de invadir as vias

linfáticas e vasculares, bem como produzir metástase em linfonodos e órgãos distantes. (NEVILLE *et al.*, 2009).

O carcinoma epidermoide oral se apresenta histologicamente por ilhas e cordões de células epiteliais malignas que invadem tecido conjuntivo e estruturas adjacentes. Células apresentam núcleo volumoso com pleomorfismo celular e nuclear, podem-se observar em alguns casos pérolas córneas e células isoladas que também podem sofrer ceratinização celular individual (discratose). No estroma observa-se um infiltrado de células epiteliais inflamatórias e formação de novos vasos. Existem variações entre as lesões que estão relacionados ao número de mitoses, ao pleomorfismo nuclear e a quantidade de queratinização. Na coloração por H&E (Hematoxilina&Eosina) das lesões pouco diferenciadas observa-se ausência de queratina ou uma pequena quantidade desta. (REGEZI, SCIUBBA, 2012; NEVILLE *et al.*, 2009).

A invasão é representada pela extensão irregular do epitélio lesional através da membrana basal para o interior do tecido conjuntivo subepitelial. As células escamosas individuais ou os cordões de células são observados como entidades independentes no interior do tecido conjuntivo, sem adesão ao epitélio da superfície (NEVILLE *et al.*, 2009).

Na complementação do quadro histológico observa-se infiltrado inflamatório com células inflamatórias mononucleares, podendo apresentar área de necrose e fibrose densa (CARVALHO, 2003). Os carcinomas pouco diferenciados perdem características morfológicas e suas células têm pouca semelhança com suas células de origem, contudo apresentam maior número de mitoses e uma variação acentuada quanto à forma, tamanho e grau de hiper cromasia, e na incapacidade de executar a função de uma célula pavimentosa. Nas lesões pouco diferenciadas podem apresentar inúmeras figuras de mitose. Uma das características do carcinoma bem diferenciado é a presença de ceratina individual das células e formação de pérolas epiteliais de ceratina de tamanho variado (NEVILLE, 2009).

A maioria dos carcinomas orais de células escamosas são lesões moderadas e bem diferenciadas. As pérolas de queratina e a queratinização individual das células são comuns. A invasão para as estruturas subadjacentes na forma de pequenos ninhos de células hiper cromáticas é uma característica típica.

No critério macroscópico a avaliação do crescimento do tipo infiltrativo, delimitação das lesões, presença de cápsula, áreas de necrose e hemorragias são importantes, contudo na avaliação microscópica é fundamental avaliar do padrão de celularidade e critérios anaplásicos (CALY, 2013).

O sistema TNM (T:Tamanho; N:Nódulo; M:Metástase) da *International Union Against Cancer (UICC)* apresenta-se como a forma mais difundida na avaliação histológica dos tumores malignos. O tamanho do tumor e a extensão da disseminação metastática são os melhores indicadores de prognóstico. No sistema TNM, o “T” refere-se ao tamanho em centímetro do tumor primário; o “N” indica a presença ou ausência de metástase tumoral em linfonodos regionais; o “M” refere-se a presença ou ausência de metástase a distância. A avaliação destes três parâmetros permite classificar as neoplasias orais em quatro estágios de I a IV (Quadro 2). Quanto maior o estágio pior o prognóstico (NEVILLE *et al.*, 2009).

Grupamento por Estádios			
ESTÁGIO	CLASSIFICAÇÃO	TNM	TAXA DE SOBREVIVÊNCIA RELATIVA EM 5 ANOS
Estádio 0	Tis	N0	M0
Estádio I	T1	N0	M0 68%
Estádio II	T2	N0	M0 53%
Estádio III	T1, T2 T3	N1 N1	M0 41% M0
Estádio IVA	T1, T2, T3 T4a	N2 N0, N1, N2	M0 27% M0
Estádio IVB	T4b Qualquer T	Qualquer N N3	M0 M0
Estádio IVC	Qualquer T	Qualquer N	M1

Quadro 2. Categoria de estadiamento clínico TNM para CEO. Fonte: MS\INCA (2006).

Neoplasias invasivas com tamanho do tumor menor que 2,0 cm são classificados como T1 e os tumores que medem de 2,0 a 4,0 cm são classificados como T2. Tumores acima de 4,0 cm são T3, e tumores independentes do tamanho, mas com invasão de estruturas adjacentes são T4 com critérios de malignidade e mal prognóstico. Na prática clínica o plano de tratamento e o prognóstico do carcinoma oral é baseado principalmente no sistema TNM (PERUSSI, 2002; MOIIA *et al.*, 2008).

A tentativa de relacionar células neoplásicas com células do epitélio normal e comparar o grau de diferenciação das células tumorais com o prognóstico foi proposta por Broders (1920). Um outro sistema proposto por Wahi (1971) para avaliar o prognóstico do tumor primário sempre considerando a gradação histológica baseava-se na presença de

pérolas córneas, ceratinização individual, figuras de mitoses, pleomorfismo e células grandes multinucleadas.

Em 1973, Jakobsson *et al.* idealizaram um sistema de gradação multifatorial para CEO baseado nas características morfológica das células e na relação tumor-hospedeiro aplicando escores de 1 a 4 pontos. Dantas *et al.* (2003) avaliaram 16 casos de carcinoma epidermoide de língua e encontraram uma relação do sistema TNM e prognóstico e afirmaram que o padrão de invasão, espessura do tumor e infiltrado inflamatório presentes nas lesões podem ser fatores indicativos de malignidade. Na análise de 32 casos, Costa e Ramos (2005) encontraram uma relação entre estadiamento clínico TNM e parâmetros histológico encontrado. Kademani *et al.* (2005) analisando 215 casos de CEO observaram que após 5 anos 56% dos pacientes estavam vivos e 58% estavam livres da doença, fato influenciado pela relação prévia do estadiamento clínico e gradação histológica.

Tumores com o mesmo estadiamento clínico demonstram diferentes padrões de crescimento (Quadro 3), sendo necessário outras técnicas de avaliação como o sistema de gradação histopatológico de malignidade, e uso de marcadores tumorais. O sistema SGHM (Sistema de Gradação Histopatológica e Malignidade) visa classificar as lesões de acordo com grau de diferenciação e fortalecer a interpretação da agressão tumoral (WOOLGAR, 2005).

G - Gradação Histopatológica	
GX	O grau de diferenciação não pode ser avaliado.
G1	Bem diferenciado
G2	Moderadamente diferenciado
G3	Pouco diferenciado
G4	Indiferenciado

Quadro 3. TNM histopatológica de malignidade (SGHM). Fonte: MS\INCA (2006).

O grau de diferenciação do tumor, profundidade de invasão e metástases são parâmetros importantes na identificação, tratamento e prognóstico, contudo os CEO apresentam comportamento histológico variado de acordo com localização anatômica das células neoplásicas com conseqüente resposta terapêutica também variável, assim vários eventos moleculares envolvidos na progressão tumoral podem ser avaliados como ocorre na relação tumor-hospedeiro (*front* de invasão) (BRYNE, 1998). Desde modo o acompanhamento do tumor não deve ser baseado tão somente nos critérios histopatológicos,

mas no potencial e progressão do tumor envolvendo a expressão de proteínas adjuvantes do seu próprio metabolismo. Os carcinomas epidermoide baseado no sistema de graduação histopatológica de malignidade (SGHM), publicado pela OMS em 1971, podem ser bem diferenciados ou queratinizantes, grau histológico I; ou podem ser moderadamente diferenciados grau histológico II e pouco diferenciados (indiferenciados) com grau histológico III (COSTA, 2005).

Estudos multicêntricos confirmam que margens cirúrgicas comprometidas são indicativos de prognóstico ruim em carcinoma epidermoide oral. Liao *et.al.* (2008) analisaram 827 pacientes submetidos a cirurgia devido à carcinoma epidermoide oral e observaram que dentre estes 344 eram lesões de língua e assoalho da boca, e mostraram uma relação do tamanho do tumor, margens livres e controle da doença. A taxa de margens livres de neoplasia é inversamente proporcional ao diâmetro e espessura do tumor (LARSEN *et al.*, 2009).

2.1.4. Tratamento do carcinoma epidermoide oral

Para Robertson *et al.* (2001), a modalidade terapêutica mais indicada para o carcinoma epidermoide de boca é cirurgia. A localização da lesão pode influenciar o plano de tratamento, onde as lesões orofaríngeas geralmente recebem radioterapia. Outras indicações para a radioterapia incluem presença de margens cirúrgicas exíguas ou comprometidas, metástases regional, características patológicas de alto grau e invasão perineural ou angiolinfática. A quimioterapia pode ser administrada em conjunto com a radiação, como quimioterapia de indução seguida por quimioradioterapia concomitante ou como terapia paliativa (NEVILLE *et al.*, 2009; ALVES *et al.*, 2011), porém esta modalidade é pouco utilizada para o carcinoma oral.

O tratamento e prognóstico do câncer oral estão vinculados ao estágio clínico da doença, sendo que as lesões iniciais apresentam melhor índice de sobrevida e cura (FREITAS *et al.*, 2005). Segundo Neville *et al.* (2009), de certo modo a gradação histológica do carcinoma epidermoide é um processo subjetivo, dependendo da área do tumor escolhida na macroscopia da peça ou na biópsia e do critério individual de avaliação do patologista, além disso o estadiamento clínico parece estar melhor relacionado com o prognóstico do que com a gradação microscópica.

Para carcinomas intraorais de pequenas dimensões, uma única modalidade de tratamento é geralmente escolhida. Pacientes com lesões maiores ou que apresentem linfonodo clinicamente palpáveis requerem terapia combinada. Além disso, pacientes com carcinoma epidermoide de língua no estágio inicial, mas profundamente invasivo com espessura maior que 3mm ou 4 mm, são de risco aumentado para metástases subclínica para linfonodo e, dessa forma, devem receber irradiação pós-operatória em pescoço e dissecação cervical eletiva (NEVILLE *et al.*, 2009).

O tratamento do carcinoma epidermoide oral visa remover a lesão completamente, preservar e restaurar função e prevenir desenvolvimento de novo tumor primário. As modalidades de tratamento disponíveis atualmente são cirurgia, radioterapia, quimioterapia, tratamento combinados e estratégias de prevenção incluindo estilo de vida e quimioprofilaxia.

São várias as formas de tratamento para o carcinoma epidermoide oral. O estadiamento clínico da doença conduz à terapêutica adotada no câncer oral, que consiste na excisão cirúrgica ampla, radioterapia ou na combinação de cirurgia e radioterapia.

As recidivas são as causas mais comuns de falha no tratamento inicial e ocorrem em torno de 40% a 50% dos pacientes tratados inicialmente com cirurgia com intenção curativa quando dos estágios clínicos mais avançados (AMAR, 2003). Sciubba (2001) relata que 40% a 45% dos pacientes com lesão em fase III ou IV, consideradas passíveis de remoção pela cirurgia, apresentariam recidiva loco-regional ou à distância.

A sobrevida de paciente com carcinoma epidermoide varia principalmente conforme a localização topográfica primária do tumor sendo que as recidivas ocorrem principalmente após 2 ou 3 anos (CHANDU, 2005; MASSANO, 2006).

Adicionalmente, Choi *et al.* (2006) relatam que a taxa de sobrevida de 5 anos é de somente de 35% a 50% para pacientes acometidos de carcinoma epidermoide oral, afirmando que isto pode estar correlacionado com tratamento não responsivo, apresentação tardia das lesões e falta de marcadores fieis para detecção precoces, tornando esta neoplasia uma das mais difíceis de se estabelecer um controle adequado. A maioria dos pacientes portadores de carcinoma epidermoide é diagnosticado com a doença em estágio avançado comprometendo a taxa de sobrevida mesmo com recursos de diagnóstico e terapêutico mais avançados, afirma Choi *et al.* (2006).

Apesar dos avanços terapêuticos, a sobrevida dos pacientes tratados não tem aumentado significativamente nas últimas duas décadas, configurando-se como as principais razões para este fato os altos índices de recorrência e metástases observadas nos pacientes com tumores não responsivos às alternativas terapêuticas utilizadas (CARVALHO, 2003).

2.2. Hiperplasia fibrosa inflamatória.

A mucosa oral é revestida por um epitélio pavimentoso estratificado de origem ectodérmica constituído de células justapostas e firmemente aderidas em camadas contínuas cuja integridade estrutural é mantida através de um sistema homeostático de renovação constante no qual as células são produzidas por divisão mitótica. (JUNQUEIRA, 2004; OKAZAKI *et al.*, 2002).

O processo normal de migração e diferenciação celular desde a camada basal até as camadas mais superficiais ocorre em um constante equilíbrio homeostático garantindo a renovação epitelial adequada. Distúrbios podem ocorrer e alterar esta harmonia por agentes agressores, como resposta as células podem adaptar-se progressivamente a uma nova situação e modificando sua estrutura morfológica e bioquímica ou sofrer alguma alteração dependendo da persistência do agressor e culminar em morte celular. A hiperplasia constitui-se como o aumento de tamanho de um tecido ou órgão como consequência do número aumentado de células, processo presente em células com capacidade mitótica, comprometendo células biologicamente normais capazes de responder a estímulos sem perder seu padrão morfológico. (KUMAR, ABBAS, FAUSTO, 2010).

A epúlide fissurada é uma hiperplasia do tecido conjuntivo fibroso, semelhante a um tumor, que se desenvolve em associação com as bordas de uma prótese total ou parcial mal adaptada. O simples termo *epúlide*, algumas vezes, usado como sinônimo de epúlide fissurada é na verdade um termo genérico que pode ser aplicado a qualquer tumor da gengiva ou do rebordo alveolar. Deste modo, alguns autores defendem a não utilização deste termo preferindo denominar a lesão de hiperplasia fibrosa inflamatória (NEVILLE *et al.*, 2009).

A hiperplasia fibrosa inflamatória, que tem como sinonímia hiperplasia fibrosa, também pode ser denominada de hiperplasia fibroepitelial, representa um amplo espectro de alterações histológicas caracterizadas por alterações celulares e estruturais, porém com preservação da membrana basal (ZERDONER, 2003). As hiperplasias reacionais compreendem um grupo de lesões do tecido conjuntivo fibroso que comumente ocorrem na mucosa oral como resultado de um trauma. Estas lesões são derivadas das células mesenquimais e são representadas por hiperplasia do tecido conjuntivo. (REGEZI, 2012).

A hiperplasia fibrosa inflamatória é um processo proliferativo, não neoplásico da cavidade oral muito frequente na clínica odontológica que se comporta como uma resposta do epitélio oral a uma agressão, com formação excessiva de epitélio e tecido conjuntivo fibroso

que se projeta de forma pediculada ou sésil. O crescimento tecidual é firme e fibroso podendo apresentar-se como lesão eritematosa ou ulcerada atingindo dimensões variadas. (REGEZI, SCIUBBA, 2012, NEVILLE *et.al.*, 2009).

A hiperplasia fibrosa inflamatória está associada com fatores irritantes locais crônicos de baixa intensidade. Clinicamente se apresentam como única prega ou múltiplas pregas de tecido hiperplásico no vestíbulo alveolar. O tecido é firme e fibroso, embora algumas lesões se apresentam eritematosas e ulceradas; o tamanho da lesão pode variar de hiperplasia localizada menores que 1 cm a grandes lesões. É mais freqüente em pacientes na idade adulta, entre 41 a 50 anos, e com predileção pelo sexo feminino e raça branca (NEVILLE *et al.*, 2009).

Clinicamente se apresentam como única prega ou múltiplas pregas de tecido hiperplásico no vestíbulo alveolar. O tecido é firme e fibroso, embora algumas lesões se apresentam eritematosas e ulceradas; o tamanho da lesão pode variar de hiperplasia localizada menores que 1 cm a grandes lesões. É mais frequente na idade adulta, entre 41 a 50 anos, e com predileção pelo sexo feminino e raça branca (NEVILLE *et al.*, 2009).

A cor da lesão pode variar de coloração da mucosa normal até avermelhada. Como o tecido nervoso não prolifera, estas lesões são normalmente indolores (REGEZI, SCIUBBA, 2012). A característica histológica marcante é tecido conjuntivo fibroso bem colagenizado, com infiltrado inflamatório crônico variável. O epitélio de revestimento frequentemente é hiperparaceratinizado e demonstra hiperplasia irregular das cristas epiteliais (NEVILLE *et.al.*, 2009).

O procedimento terapêutico indicado para o tratamento da hiperplasia fibrosa inflamatória é a remoção cirúrgica da lesão (SANTOS; COSTA; SILVA NETO, 2004), associado com eliminação do fator traumático (NEVILLE *et al.*, 2009). Próteses mal adaptadas devem ser corrigidas ou confeccionar uma nova prótese para evitar a recorrência da lesão (SANTOS *et al.*, 2004; PEDRON *et al.*, 2007; FALCÃO, *et al.*, 2009). Outras modalidades terapêuticas podem ser adotadas em determinados casos, como a utilização do laser, microabrasão ou a crioterapia (SANTOS *et al.*, 2004). A biópsia é de fundamental importância para confirmar o diagnóstico de HFI, já que esta faz diagnóstico diferencial com outras lesões (FALCÃO, *et al.*, 2009).

2.3. Transportadores de Glicose – GLUT

O metabolismo oxidativo da glicose coloca-se como a principal fonte de energia entre os mamíferos. A membrana plasmática com sua camada lipoproteica comporta-se de maneira impermeável a moléculas polares como a glicose necessitando, portanto de proteínas facilitadoras para transportar este substrato para o meio intracelular. Uma forma de transporte passivo, a difusão facilitada induzida por uma família de proteínas transportadoras específicas – GLUTs carregam moléculas de glicose para o citosol sem a dependência de energia. Transportadores de glicose têm capacidade de realizar fluxo bidirecional de glicose determinado pelo gradiente do substrato direcionando ao meio intra ou extracelular (BROWN, 2001; PARENTE, 2008).

Os transportadores de glicose (GLUTs) fazem parte de uma família de proteínas que medeiam o transporte de glicose através da membrana, sem depender de energia. Segundo Macheda et al.(2005), diferentes isoformas de GLUT têm sido descritas e a expressão destas é sujeita a um controle de células específicas presentes no meio extracelular. Funcionalmente, os GLUTs regulam o movimento de glicose entre o meio extracelular e os compartimentos intracelulares, mantendo o suprimento de glicose disponível para o metabolismo celular. De acordo com Wood *et al.*(2003), a família foi originalmente composta de 12 membros, no entanto, novas formas de GLUTs foram descritas, resultando num total de 14 GLUTs conhecidos, atualmente apresentando diferentes afinidades para a glicose e outras hexoses.

Uma ou mais proteína GLUT é expressa praticamente em todos os tipos de células do corpo. As 14 proteínas GLUT (Tabela 1) são compostas por aproximadamente de 500 resíduos de aminoácidos e podem ser classificadas em classe I (GLUTs 1 a 4 e 14); classe II (GLUTs 5,7, 9 e 11): classe III (GLUTs 6,8,10,12 e HMIT) (THORENS, 2010). Estas proteínas diferem entre si na expressão tecidual, na função, especificidade do substrato, nos mecanismos cinéticos e apresentam regulações diferentes (ZHAO; KEATING, 2007). Embora 14 isoformas de GLUT já tenham sido caracterizadas, as cinco primeiras têm sido foco de estudos que buscam caracterizar os fluxos de glicose em situações fisiopatológicas (MACHADO, 2006).

Todas as proteínas GLUT (Figura 2) apresentam 12 segmentos de transmembrana hidrofóbicos inseridos na porção lipídica da membrana plasmática. Os segmentos transmembrana estão ligados por alça de conexão e as terminações amino (NH₂) e carboxi-terminal (COOH) localizam-se no meio intracelular (Figura 4). As sequências de transmembranas nos GLUTs são homólogas enquanto as alças de conexão e as terminações

são heterólogas determinando a especificidade de cada isoforma (WU; FREEZE, 2002; MACHADO, 2006).

A família das proteínas transmembranas transportadoras de glicose são expressas em todas as células normais e parecem ser reguladas por proto-oncogenes e fatores do crescimento. A expressão da GLUT-1(Figura 3) na superfície celular pode ser mediada pela porção NH₂-terminal de uma proteína kinase, WNK1, a qual é responsável pela interação com a fosfoproteína TBC1D4 (MENDES, 2010).

A GLUT-1 é codificada pelo gene *SLC2A1*, sendo uma das primeiras proteínas a ser purificada e clonada e provavelmente uma das mais extensivamente estudadas de todo sistema de transporte de membrana . A GLUT 1 é uma proteína de 45-55 kD que localiza-se no cromossomo 1 (1p35-p31.3) (Tabela 1) com modelo conformacional de doze segmentos transmembrana α -hélice, um amino e carboxi-terminal intracelular, um grande “loop” intracelular e um sítio N-glicosilação no primeiro “loop” extracelular (KLEPPER; VOIT, 2002).

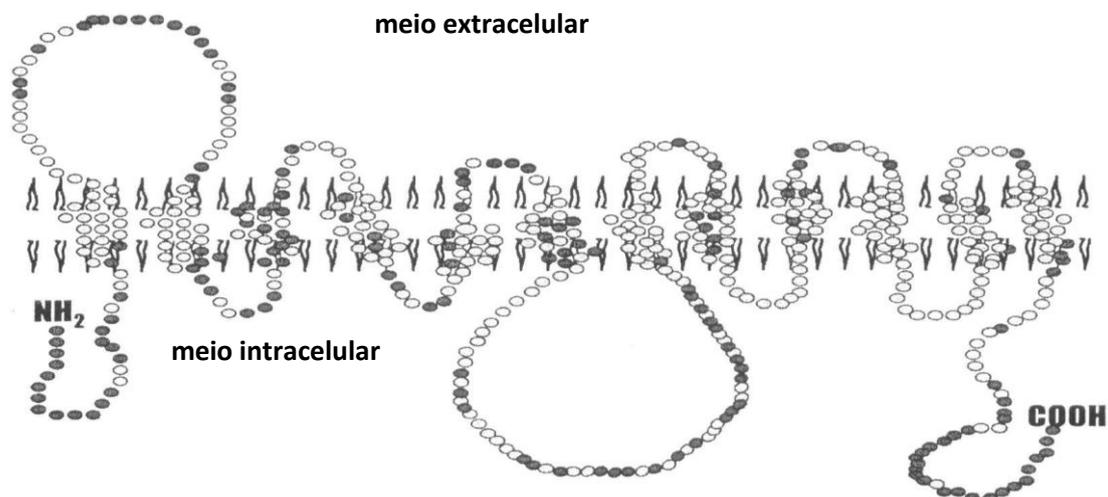


Figura 2. Estrutura molecular bidimensional da GLUT. Fonte :Adaptado de Machado; Schaan; Seraphim, (2006).

A GLUT-1 é expressa principalmente nos eritrócitos, tecidos vasculares e particularmente no cérebro. Uma redução no conteúdo de GLUT-1 dos eritrócitos refletiu uma diminuição destas células de transportar glicose, observado pela primeira vez por De Vivo (1991) em duas crianças de 2 meses. A GLUT-2 é expressa em células do fígado, pâncreas, rins e intestino; GLUT-3 foi identificada em células inflamatórias e células do cérebro; GLUT-4, transportador insulino dependente, é presente no tecido muscular e gordura.

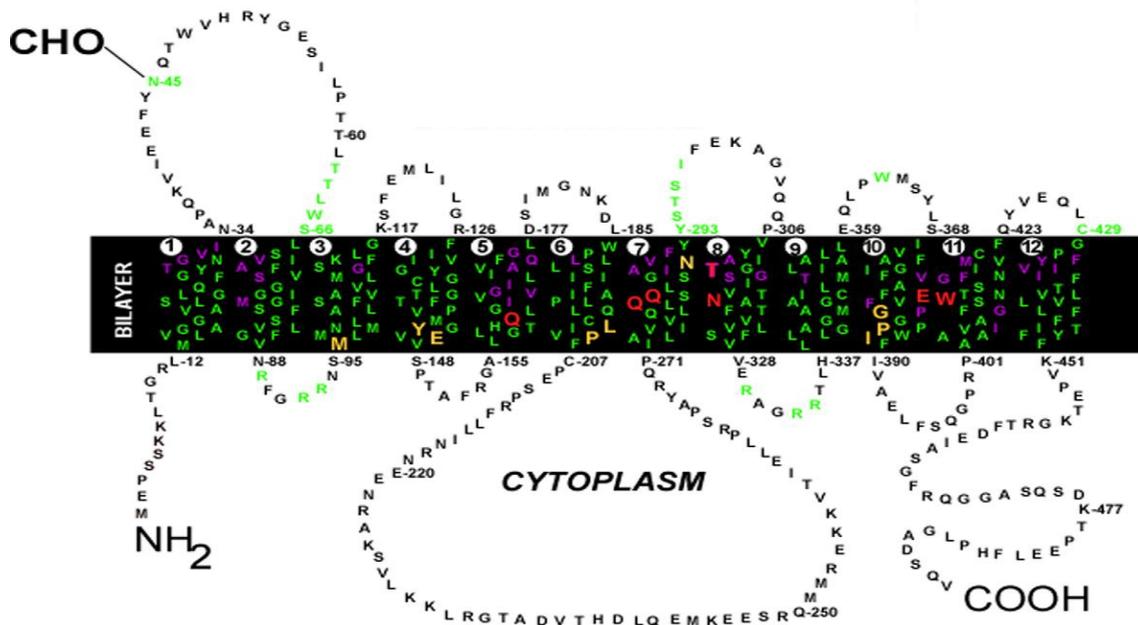


Figura 3. Sequência de aminoácidos e de membrana de topologia GLUT1 humano. Os resíduos de aminoácidos são designados pelo código de letra única. Os segmentos transmembranar são numerados 1-12. A ligação do oligossacárido ligado a N é mostrado em N45. Resíduos que parecem ser fundamentais para a atividade de transporte são mostrados em amarelo. Adaptado de Mueckler e Makepeace (2009).

A célula tumoral mantém a sua energia metabólica pela via glicolítica resultando como produto alta concentração de lactato e baixas taxas de ATP. A neoplasia mantém-se em ambiente de hipóxia, deste modo a hipóxia tumoral induz uma superexpressão de genes específicos associados ao crescimento e progressão tumoral, como a GLUT-1, anidrase carbônica e VEGF, os quais são controlados pelo Fator Induzido por Hipóxia-1 (HIF-1) (KUNKEL *et al.*, 2003; OHBA *et al.*, 2010). Altas taxas de hipóxia em tumores sólidos é um fator de prognóstico adverso para pacientes em tratamento por câncer (ISA, 2006). Neoplasmas em hipóxia são conhecidos por serem mais agressivos, com propensão a metastizar e por ter prognóstico ruim. Muitos são também radio-químico resistentes (AIRLEY, 2007).

A melhoria de captação de glicose pelo neoplasma pode ser facilitada pelo aumento da expressão de transportadores de glicose observado no tecido tumoral. Diversos estudos descrevem elevados níveis de GLUT-1 em vários tumores incluindo os cânceres de pulmão, cérebro, pâncreas, mama, cutâneo, cólon retal renal e carcinoma cervical. Tem descrito que a expressão da GLUT-1 é frequentemente expressa em vários tipos de tecidos durante a oncogênese (GANAPATHY *et al.*, 2009).

Rudlowski *et al.* (2003) demonstraram a correlação da expressão da GLUT-1 em cultura de células no carcinoma escamoso induzidas por papilomavírus (HPV), sugerindo que a expressão da GLUT-1 é um evento precoce neste tipo de tumor. Em carcinoma de pulmão, col retal, ovário, laringe e mama, elevada expressão de GLUT-1 e GLUT-3 foram indícios significativos na redução da sobrevida (KANG *et al.*, 2002).

Buscando correlacionar o metabolismo da glicose através da expressão da GLUT-1 com crescimento e progressão tumoral em carcinoma de cabeça e pescoço, Kunkel *et al.* (2003) observaram uma redução na expressão dessa proteína transportadora em indivíduos com taxa de sobrevida superior a 138 meses quando comparados com pacientes com 60 meses. Além disso verificaram que pacientes com resposta negativa a radiação apresentavam elevada expressão da GLUT-1, logo uma alta taxa glicolítica nestas lesões.

Mineta *et al.* (2002) analisando 99 casos de carcinoma hipofaríngeal evidenciou a forte expressão da GLUT-1 em 46% da amostra analisada a qual estava correlacionada com uma taxa de sobrevida de 5 anos em lesões que se encontravam em estágios II e IV, entretanto não foi possível estabelecer uma correlação estatística significativa com gênero, gradação histológica, tamanho do tumor e estágio linfonodal.

Ohba *et al.* (2010) encontraram a imunexpressão da GLUT-1 em toda amostra analisada (n=24) com carcinoma epidermoide oral, com expressão predominante em áreas periféricas do tumor do que em áreas centrais, observando positividade localizada no citoplasma das células tumorais. Da amostra avaliada 11 casos (45,8%) foram classificados com intensa marcação (6-12 pontos) e 13 amostras (54,25%) classificadas como fraca imunomarcção (1-5 pontos).

Li *et al.* (2008) evidenciaram a importância da expressão da GLUT-1 em tumores de cabeça e pescoço como marcador de prognóstico. A imuno-histoquímica revelou menor expressão da GLUT-1 nas lesões primárias e bem diferenciadas quando comparado com tumores recorrentes e indiferenciados. Choi *et al.* (2007) observaram uma forte expressão da GLUT-1 associada à localização anatômica em carcinoma de língua e sugere a expressão da GLUT-1 seja adicionado a critérios de diagnóstico e estratégias de tratamento.

Buscando entendimento do metabolismo energético celular em 26 casos de carcinoma mucoepidermoide através de imunomarcadores associados a glicose e a fosforilação oxidativa; Demasi *et al.* (2010) encontraram a expressão da peroxiredoxina I na maioria dos casos independente do padrão histológico, todavia a expressão da GLUT-1 foi significativamente maior intensidade nas neoplasias com comportamento mais agressivo. Os resultados sugerem que a glicose anaeróbica atua no crescimento tumoral e que a

peroxiredoxina I poderia proteger as células malignas contra a ação das espécies reativas derivadas do oxigênio (ERO), as quais provém da fosforilação oxidativa e do ciclo hipóxia-reoxigenação. Os autores acreditam que a GLUT-1 e a peroxiredoxina I constituem estratégias bioquímicas para o crescimento e progressão tumoral em ambiente com grande instabilidade de oxigênio.

Tabela 1. Família GLUT.

Isoforma	Gene	Localização no tecido	Transporte	Gene-loc
GLUT-1	SLC2A1	Eritrócitos,cérebro	Glicose	1p35-31.3
GLUT-2	SLC2A2	Fígado,pâncreas,intestino	Glicose Frutose	3q26.1-q26.2
GLUT-3	SLC2A3	Cérebro (neurônios)	Glicose	12p13.3
GLUT-4	SLC2A4	Tecido adiposo, muscular e cardíaco	Glicose	17p13
GLUT-5	SLC2A5	Intestino e rim	Glicose Frutose	1p36.2
GLUT-6	SLC2A6	Cérebro,baco e leucócitos	Glicose	9q34
GLUT-7	SLC2A7	Próstata, colo e Intestino delgado	Glicose	1p36.2
GLUT-8	SLC2A8	Cérebro,fígado,baço e outros tecidos	Glicose Frutose	9q33.3
GLUT-9	SLC2A9	Rim,fígado,pulmão placenta e leucócitos	Glicose	4p16-15.3
GLUT-10	SLC2A10	Coração,fígado,pulmão pâncreas,placenta e rim	Glicose Galactose	20q13.1
GLUT-11	SLC2A11	Coração e músculo	Glicose Frutose	22q11.2
GLUT-12	SLC2A12	Coração,próstata e músculo esquelético	Glicose Frutose	6q23.2
GLUT-13	SLC2A13	Cérebro e tecido adiposo	myo-inositol	12q12
GLUT-14	SLC2A14	Testículo		12p13.31

Fonte: Adaptado de M.Mueckler,B.Thorens\Molecular Aspects Medicine (2013)

Ayala *et al.* (2010) em amplo estudo avaliando 142 casos de carcinoma epidermoide oral, constituído de 112 homens e 30 mulheres com média de 57 anos, encontraram o local primário dos tumores na sua totalidade era localizado na língua (45 casos - 38%) seguido do assoalho da boca (42 casos - 29,6%). O comportamento do grupo em relação ao estágio tumoral apresentava estágio tumoral I \ II (n=37 - 26,1%, estágio III \ IV (n=105 - 73,9%. Em setenta pacientes havia afirmação envolvimento com vasos linfáticos. A análise imuno-histoquímica mostrou positividade em 135 casos (n=142) padrão forte e intenso em tecido neoplásico em relação a hiperplasia epitelial adjacente. O padrão de proteína GLUT-1 expresso em membrana foi visto em 68 casos (n=135) e a expressão nuclear aparecem em 67 casos (n=135). A relação do padrão de expressão da GLUT-1 nuclear estava associada a pior prognóstico, assim isso sugerindo pode ser uma pista adicional no entendimento desta proteína.

A regulação positiva da expressão da proteína GLUT-1 é observada em uma ampla variedade de tumores sugerindo ser um elemento essencial na progressão do tumor. A forte expressão da GLUT-1 em neoplasia é observada em condições de hipóxia, portanto a hipóxia tumoral induz uma superexpressão de genes específicos associados ao crescimento tumoral, como CA-IX e o VEGF os quais podem ser controlados pelo HIF-1 (AIRLEY *et al.*, 2003; OHBA *et al.*, 2010).

A elevada expressão da GLUT-1 em 54 casos de CEO, estudados por Oliveira *et al.* (2006), tratados cirurgicamente estava associada a alta taxa de recidiva ($p=0,032$) e metástase ($p=0,005$) bem como o números de óbitos relacionados a doença. Os autores acreditam que a marcação da GLUT-1 pode ser utilizada para predizer a necessidade de quimioterapia nos pacientes com carcinoma epidermoide oral tratados cirurgicamente..

Elevada expressão da GLUT-1 em carcinoma epidermoide oral é um evento importante na progressão da doença. Fatores que regulam a atividade e expressão dos transportadores GLUT nas células malignas do carcinoma epidermoide devem ser identificados, e os efeitos destes fatores devem estar associados ao diagnóstico e tratamento considerando as características multifatoriais da doença (FUKUZUMI *et al.*, 2000).

Eckert *et al.* (2011) estudaram o Transportador de Glicose (GLUT-1) e HIF-1 em carcinoma epidermoides, através da imuno-histoquímica, e evidenciaram elevada expressão das proteínas supracitadas, e que estas superexpressões estavam associadas com pior prognóstico dos pacientes analisados, sugerindo que a coexpressão de GLUT-1 e HIF-1 pode ser usada como marcador de prognóstico.

Tem sido descrito na literatura que a elevada expressão de GLUT-1 está associada a um fenótipo maligno mais agressivo. Assim, a presente pesquisa busca avaliar a imunoexpressão dessa proteína em casos de carcinoma epidermoide oral.

3 OBJETIVO

Objetivo geral

O propósito deste estudo foi analisar a imunexpressão da GLUT-1 em vários casos de Hiperplasia Fibrosa Inflamatória (HFI) e de Carcinoma Epidermoide Oral (CEO).

Objetivos específicos

- Avaliar se havia imuno marcação da GLUT-1 em HFI e CEO.
- Estabelecer uma correlação comparativa entre a expressão da GLUT-1 na Hiperplasia Fibrosa Inflamatória (HFI) e Carcinoma Epidermoide Oral (CEO).
- Analisar a possibilidade da GLUT-1 como provável marcador a ser utilizado como ferramenta de prognóstico do Carcinoma Epidermoide Oral.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Caracterização do Estudo

O estudo caracteriza-se como uma pesquisa descritiva constando de análise, registro, quantificação das expressões e investigação comparativa das células imunomarcadas pelo anticorpo anti-GLUT-1 em uma série de casos aleatórios constituído de hiperplasia fibrosa inflamatória oral (HFI) e carcinoma epidermoide oral (CEO) previamente diagnosticadas avaliação histopatológica com posterior seleção.

4.2 População e Amostra

A população da pesquisa foi constituída por casos de hiperplasia fibrosa inflamatória e carcinoma epidermoide oral diagnosticados em pacientes atendidos no Ambulatório de Estomatologia da Universidade Federal do Ceará *Campus* Sobral (UFC-Sobral) , compreendida no período de Agosto de 2011 até Setembro de 2013.

As amostras em estudo tem caráter intencional e dentre os casos investigados no Serviço de Estomatologia da UFC - Sobral, foram selecionados 30 casos dos quais 15 foram de HFI (Hiperplasia Fibrosa Inflamatória) e 15 de CEO (Carcinoma Epidermoide Oral) diagnosticados por avaliação histopatológica. Os dados dos pacientes foram coletados em prontuários apropriados. As amostras foram emblocadas em parafina e identificadas por numeração.

4.2.1 Critérios de inclusão da amostra

Foram incluídos na pesquisa somente os casos de hiperplasia fibrosa inflamatória e carcinoma epidermoide oral, cujos blocos parafinados foram selecionados e apresentaram condições de corte em micrótomo (*Leica*) e que continham material biológico adequado e significativo para processamento do estudo imuno-histoquímico. Para cada caso foram confeccionados quadro lâminas, uma lâmina para controle positivo, uma lâmina para controle negativo, uma lâmina para HE e uma outra lâmina para imuno-histoquímica.

4.2.2 Critérios de exclusão da amostra

Foram excluídas as amostra em blocos parafinados que não apresentavam material suficiente ou significativo, e ou que apresentaram interferências na fixação do material para posterior análise imuno-histoquímica.

4.3 Estudo morfológico

As análises histomorfológica foram realizadas em microscopia binocular de luz (NIKON E200; ZEISS Axiostar) em aumentos de 100x e 400x, em cortes de 5 μ m de espessura, fixados e corados pelo método de Hematoxilina & Eosina (H&E). A análise de cada caso (n=30) estava apenas identificada pelo diagnóstico com padrão anátomo histomorfológico de forma individual e compatível com cada lesão em estudo, no caso a HFI (n=15) e CEO (n=15).

4.4 Estudo Imuno-histoquímico

4.4.1 Método Imuno-histoquímico

Para realização da técnica imunohistoquímica, os espécimes foram novamente submetidos a cortes de 5 µm de espessura e montados em lâminas de vidro previamente preparadas com adesivo à base de organosilano (3-aminopropyltriethoxi-silano, Sigma Chemical Co[®], St Luis, MO, EUA). Posteriormente o material examinado foi submetido ao método de estreptavidina-biotina (LSAB[®] Labelled Streptavidin-biotin) - pela técnica de detecção indireta simples de moléculas através do uso de anticorpos específicos, fabricante Dako Kit LSAB[®] utilizando anticorpo policlonal anti-GLUT-1 (Quadro 4).

A técnica adotada segue o protocolo abaixo:

1. Cortes montados em lâminas silanizadas
2. Desparafinização sequencial em 3 banhos por 5 minutos em xilol, posteriormente 4 banhos em etanol absoluto por 1 minuto. A seguir os cortes imersos em água corrente e água destilada entre 1 a 2 minutos.
3. Recuperação antigênica em Panela Pascal (pressurizada), onde as secções foram submetidas a temperatura de até 125-126°C, por 30 segundos em solução de recuperação antigênica Citrato pH 6,0 (ácido cítrico).
4. Lavagem pós-recuperação com P.B.S/Tween.
5. Bloqueio de Peroxidase Endógena em solução de peróxido de hidrogênio a 3% por 20 minutos com troca de solução a cada 10 minutos.
6. Lavagem pós-bloqueio endógeno com P.B.S/Tween – 3 lavagens de 3min cada.
7. Bloqueio de Proteinase com Serum Bovino a 0.3% por 20 minutos seguidamente.
8. Incubação Primária nas secções com Anti-GLUT-1 por 60 minutos.
9. Lavagem pós-incubação Primária com P.B.S/Tween.
10. Incubação Secundária Kit Dako LSAB Biotina por 10 minutos.
11. Lavagem pós-incubação secundária com P.B.S/Tween – 3 lavagens de 3min cada.
12. Incubação Terciária Kit Dako LSAB Streptavidina por 10 minutos.

13. Lavagem pós-incubação terciária com P.B.S/Tween – 3 lavagens de 3min cada.
14. Revelação utilizando Kit Dako Liquid Dab-Chromogen(Ref: K3468) por 5 minutos.
15. Lavagem pós-revelação com P.B.S/Tween – 3 lavagens de 3 minutos cada.
16. Lavagem água corrente e água destilada, sequencialmente.
17. Contra-coloração com Hematoxilina de Harris por 1 minuto.
18. Lavagem em água corrente em três banhos de 1 a 2 minutos, passagens em sequencias de álcool etanol absoluto (1 minuto) e xilol (1 minuto) respectivamente.
19. Montagem em Ever-Mount.

Especificidade	Clone	Fabricante	Diluição	Recuperação Antigênica	Incubação
GLUT-1	GTX 15309 Policlonal	Gene Tex (USA)	1:300	Citrato,pH 6,0 Pascal, 30s	60 min

Quadro 4. Especificidade, clone, fabricante, diluição, recuperação antigênica e tempo de incubação do anticorpo primário a ser utilizado no estudo.

4.4.2 Análise da Marcação Imuno-Histoquímica

Após processamento a realização da técnica imuno-histoquímica, as amostras foram analisadas por microscopia binocular de luz halógena (ZEISS - Axiostar).

*** GLUT-1**

Foram realizadas análises de forma descritiva e quantitativa sendo os resultados obtidos disposto em gráficos e tabelas tanto em valores relativos como em absolutos.

Na imunomarcação da proteína GLUT-1, tanto na HFI (hiperplasia fibrosa inflamatória) como no CEO (carcinoma epidermoide oral), adaptado da metodologia de King-Tung (2007) e Johann (2006), sob aumento de 100x, 05 campos de maior imuno reatividade foram selecionados e fotomicrografados com auxílio de câmera - MEM1300 Digital Eyepiece for Microscope Installation Instructions acoplada em microscopia binocular de luz halógena – ZEISS (Axiostar). Assim para cada caso foram analisados 05 campos.

Com auxílio do programa Imaging Processing and Analysis in Java (Figura 5) (ImageJ®, National Institute of Mental Health, Bethesda, Maryland, USA), dois observadores padronizados em momentos diferentes através de microscopia de luz (ZEISS – modelo Axiostar) com aumento final de 200x, realizaram contagem em cada um dos cinco campos de todos os casos (Figura 5); HFI (n=15) e CEO (n=15). Os observadores desconheciam os dados clínicos ou informações aditivas dos casos. Na avaliação da quantidade de imuno marcação foi considerada marcação positiva para GLUT-1 quando a membrana das células do epitélio estratificado em hiperplasia fibrosa inflamatória (HFI) ou no carcinoma epidermoide oral (CEO) apresentaram coloração acastanhada, e considerada condição negativa a ausência de expressão da GLUT-1, isto é, quando completamente ausente de coloração.

No caso de divergência de contagem entre os dois observadores, um terceiro observador realizou contagem para dirimir discordâncias e chegar a um consenso. Foi empregado como controle positivo, eritrócitos humano, e como controle negativo o anticorpo foi substituído por albumina de soro bovino a 1% (*BSA-bovine serum albumin*).

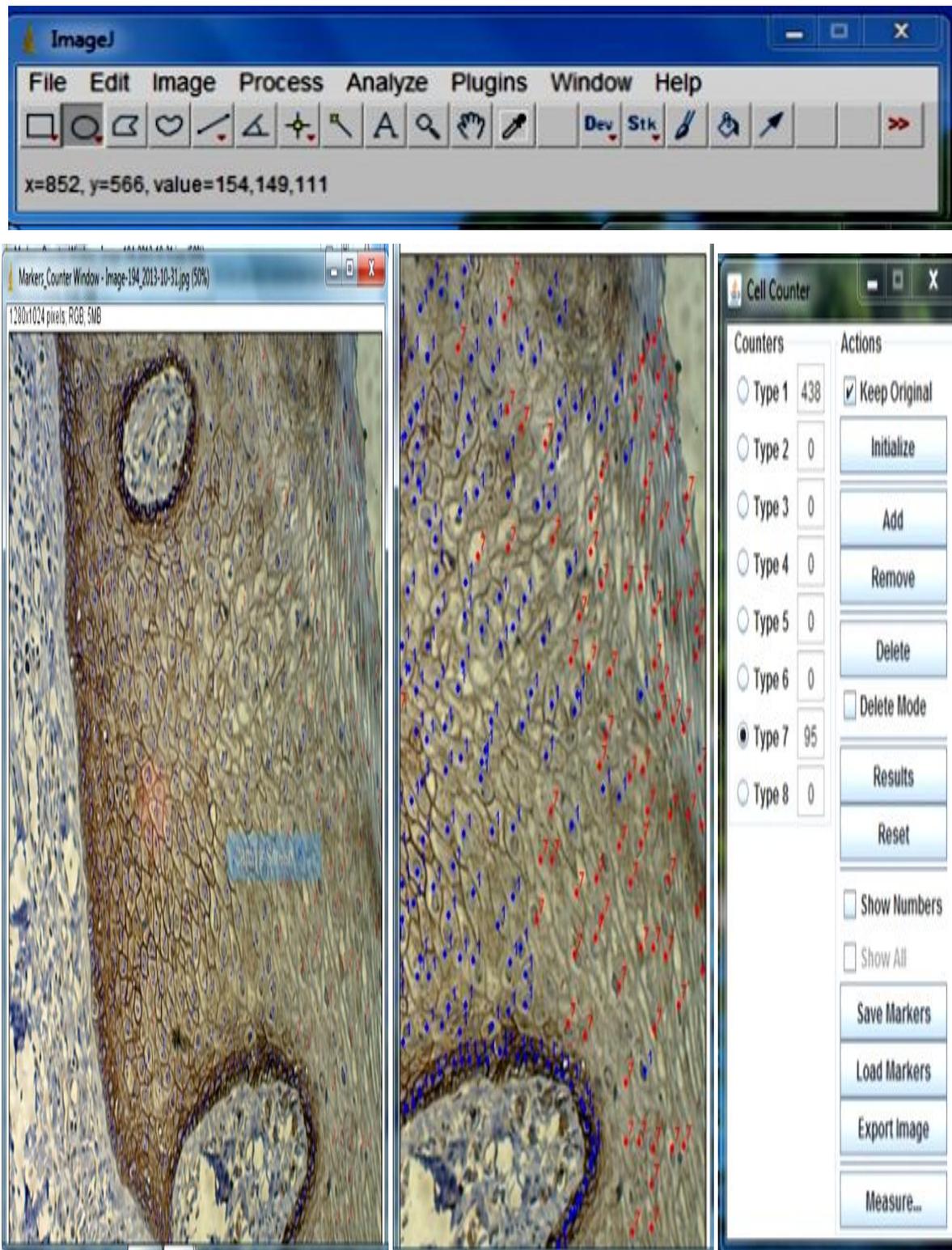


Figura 4. Campo com apresentação de contagem no *ImageJ*. Área de HFI.

4.5 Análise estatística

Após realizada análise morfológica e imuno-histoquímica das amostras, os dados foram submetidos a testes estatísticos adequados com a proposta de avaliar as hipóteses de correlação e expressão da GLUT-1 das lesões em estudo. No que concerne ao delineamento das amostras e variáveis estudadas, os dados obtidos foram digitados em uma planilha eletrônica de Programa Excel (*Microsoft® Office XP Professional*) em seguida exportado para formato DBF (*Data Basic Format*), analisados e tratados de forma estatística em programa Prisma versão *Graphpad Prism 6*. Para todos os testes estatísticos utilizados no estudo o nível de significância foi estabelecido em 5% ($p < 0,05$).

4.6 Implicações éticas

A pesquisa foi aprovada pelo CEPE da Academia Cearense de Odontologia (ACO\CEC) e obteve parecer favorável em 2010 sob protocolo nº 126.

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização da amostra

A amostra do presente estudo foi constituída de 30 casos de lesões orais, obtidas do Ambulatório de Estomatologia da Universidade Federal do Ceará *Campus* Sobral-Ce, emblocadas em parafina e numeradas de acordo com tipo de lesão.

As amostras qualificadas por avaliação histopatológica denominadas de HFI (hiperplasia fibrosa inflamatória) evidenciavam tecido conjuntivo fibroso bem colagenizado, infiltrado inflamatório mononuclear e epitélio hiperplásico (Figura 5) consistindo de 15 casos com essas características, e os espécimes de CEO (carcinoma epidermoide oral) demonstravam ninhos ou lençóis de células neoplásicas, exibindo pleomorfismo nuclear e celular, hiper cromatismo, alterações da relação núcleo citoplasma, diskeratose e algumas pérolas córneas. (Figura 6) também constitui-se de 15 casos emblocados em parafina e corados em H&E.

Todos os casos da amostra foram submetidos ao método da imuno-histoquímica pela técnica Estreptoavidina-Biotina (LSAB – Dako), apresentando imunomarcção positiva para GLUT-1 e sendo avaliada na presença de controle negativo confirmando ausência de imunomarcção para GLUT-1 tanto em HFI (Figura 7) como em CEO (Figura 8), e controle positivo exibindo intensa imunomarcção em eritrócitos (Figura 9).

Para análise da amostra, cabe ressaltar que as lesões obtidas da cavidade oral foram também identificadas pelo seu sítio anatômico específico com informações aditivas relacionadas ao sexo e idade para os casos de HFI (Tabela 2) e CEO (Tabela 3).

Da amostra analisada, as lesões de HFI provieram de pacientes com idade média de $52,86 \pm 17,9$ anos, tendo como idade mínima 18 anos e máxima de 82 anos. Dessa amostra, houve uma predominância de pacientes do sexo feminino com 13 casos (Tabela 2). Com relação à localização anatômica, houve predileção pelo fundo de sulco, perfazendo 53,33% dos casos (n=08).

Dos 15 espécimes de carcinoma epidermoide oral analisados, 07 destes apresentavam localização de língua e assoalho (46,67%), 05 de rebordo (33,33%), 01 caso de lábio inferior e os demais de outros sítios da cavidade oral. Os casos selecionados acometeram

principalmente indivíduos do gênero masculino (n=8), perfazendo 60% da amostra, sendo a quinta e a sexta década de vida as faixas etárias mais prevalentes, com média de idade de 63,13 anos tendo como idade mínima 34 anos e máxima 82 anos.

Tabela 2. Distribuição dos casos clínicos de HFI considerando sexo, idade e localização anatômica da lesão primária.

CASOS	SEXO	IDADE (anos)	LOCALIZAÇÃO ANATÔMICA
01	FEMININO	52	<i>Fundo de sulco vestibular</i>
02	FEMININO	47	<i>Mucosa alveolar</i>
03	FEMININO	58	<i>Fundo de sulco superior</i>
04	FEMININO	67	<i>Fundo de sulco vestibular</i>
05	FEMININO	48	<i>Rebordo alveolar superior</i>
06	FEMININO	53	<i>Fundo de vestibulo esquerdo</i>
07	FEMININO	82	<i>Fundo de sulco vestibular</i>
08	FEMININO	57	<i>Fundo de sulco vestibular</i>
09	FEMININO	18	<i>Gengiva anterior superior</i>
10	FEMININO	39	<i>Rebordo mandibular anterior</i>
11	MASCULINO	61	<i>Fundo de sulco lábio superior</i>
12	FEMININO	46	<i>Fundo de sulco vestibular</i>
13	FEMININO	50	<i>Mucosa jugal inferior anterior</i>
14	FEMININO	53	<i>Rebordo alveolar inferior</i>
15	MASCULINO	62	<i>Palato duro</i>

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFC-Sobral, 2013.

Tabela 3. Distribuição dos casos clínicos de CEO considerando sexo, idade, localização anatômica da lesão primária.

CASOS	SEXO	IDADE	LOCALIZAÇÃO ANATÔMICA
1	FEMININO	82	Mandíbula
2	MASCULINO	63	Rebordo alveolar
3	MASCULINO	63	Assoalho da boca borda lateral da língua
4	FEMININO	82	Ventre da língua
05	FEMININO	57	Região de assoalho e ventre da língua
06	MASCULINO	69	Língua Assoalho da boca
07	FEMININO	72	Borda lateral E da língua
08	MASCULINO	63	Rebordo alveolar posterior inferior
09	MASCULINO	58	Rebordo
10	MASCULINO	34	Rebordo alveolar superior anterior
11	FEMININO	78	Rebordo alveolar superior esquerdo
12	FEMININO	50	Palato mole
13	MASCULINO	43	Borda lateral da língua
14	MASCULINO	53	Lábio inferior
15	FEMININO	58	Borda lateral esquerda da língua

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFC-Sobral, 2013.

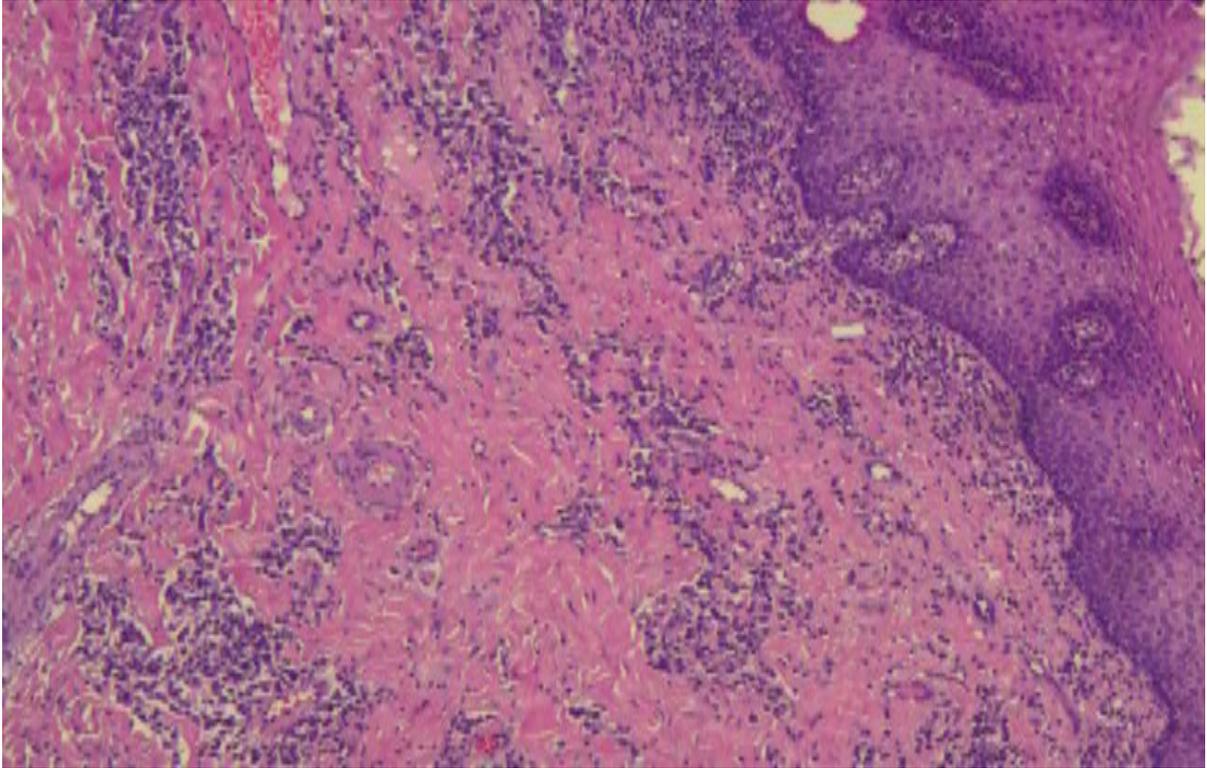


FIGURA 5: Fotomicrografia de HFI evidenciando tecido conjuntivo fibroso bem colagenizado, infiltrado inflamatório mononuclear e epitélio hiperplásico (H/E 100X).

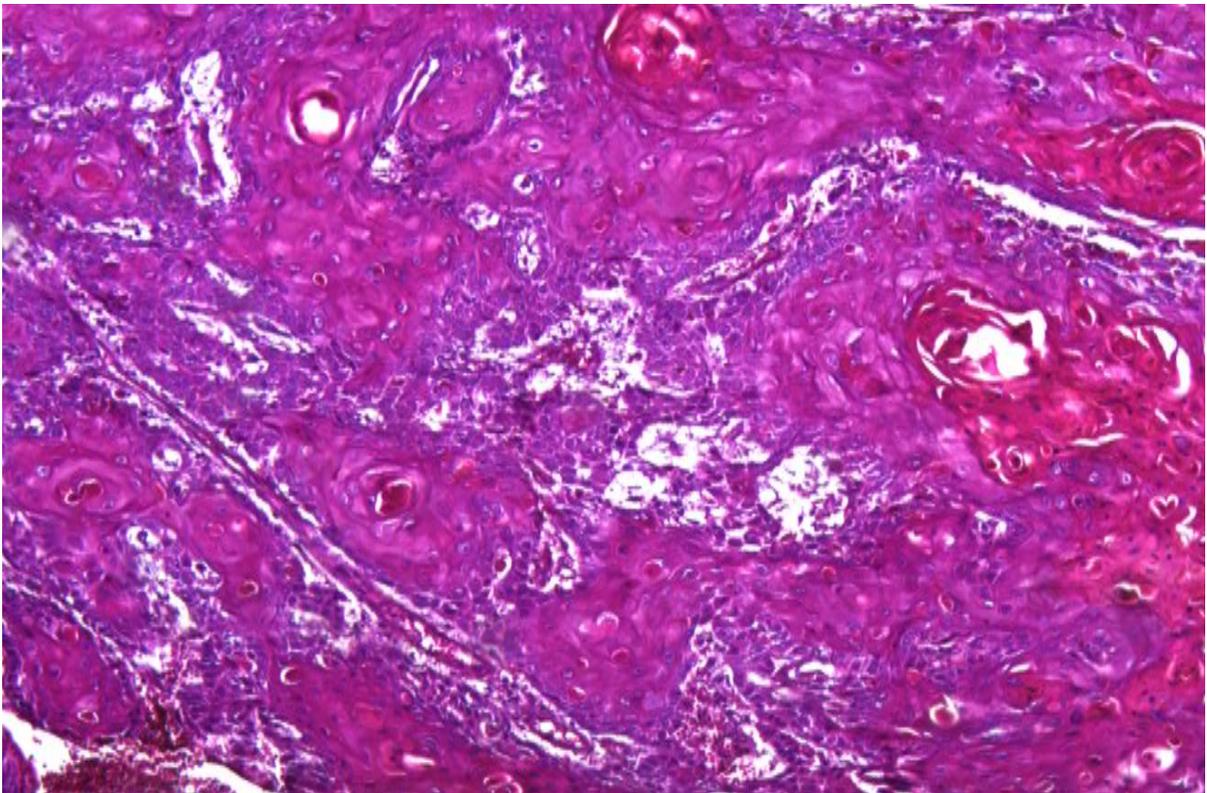


FIGURA 6: Fotomicrografia de CEO demonstrando ninhos de células neoplásicas com pérolas córneas (H/E 100X).

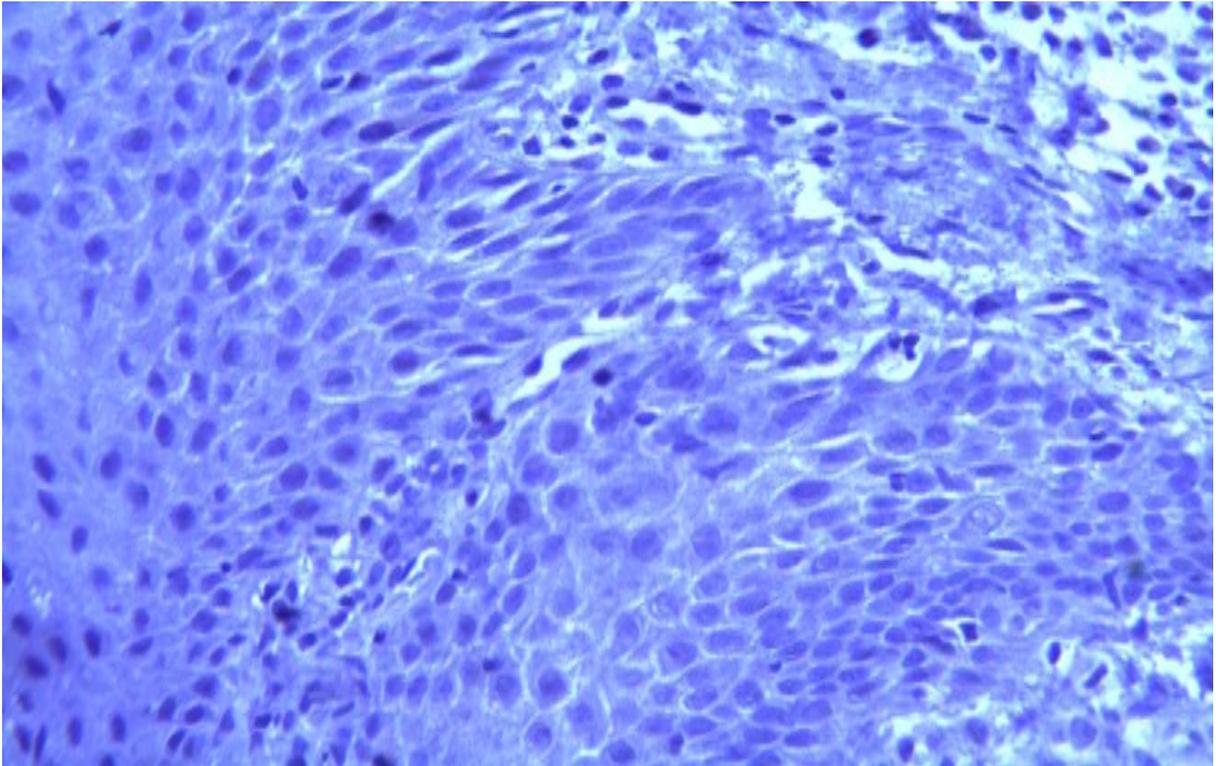


FIGURA 7: Fotomicrografia demonstrando ausência de imunoexpressão para GLUT-1- controle negativo em HFI (LSAB 100x)

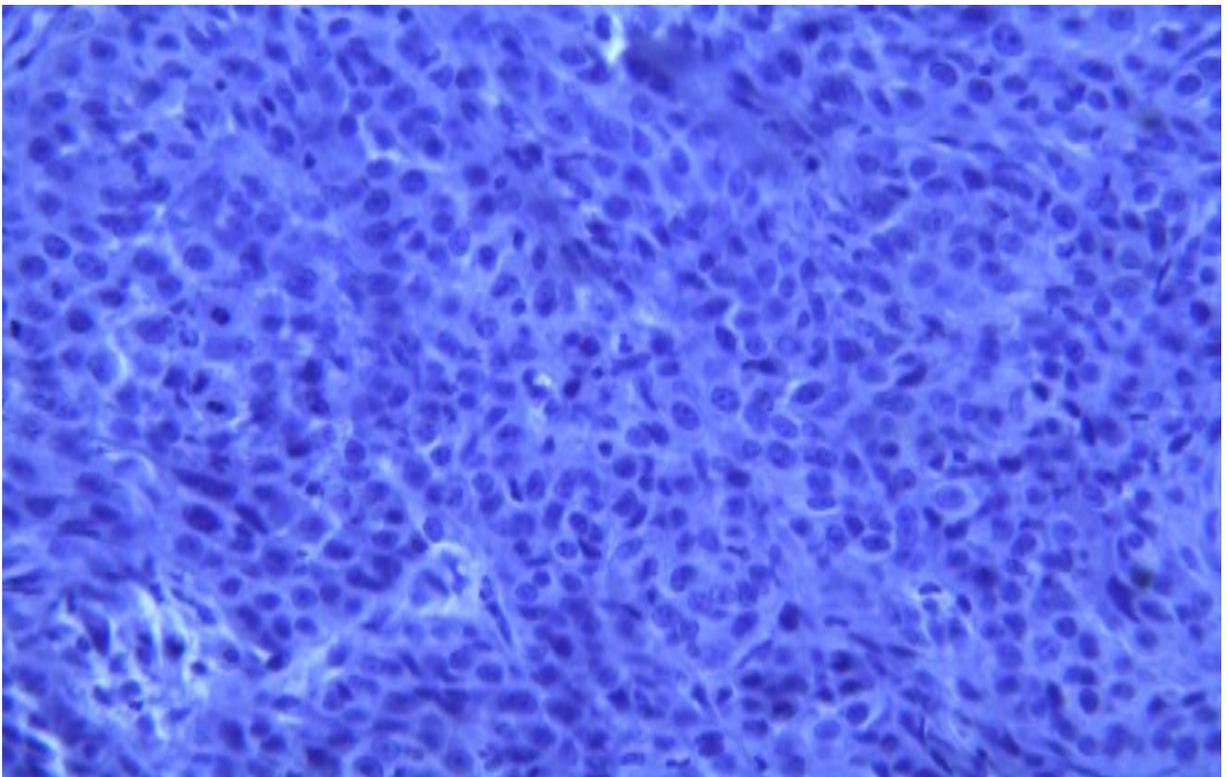


FIGURA 8: Fotomicrografia demonstrando ausência de imunomarcção para GLUT-1 controle negativo em CEO (LSAB 100x)

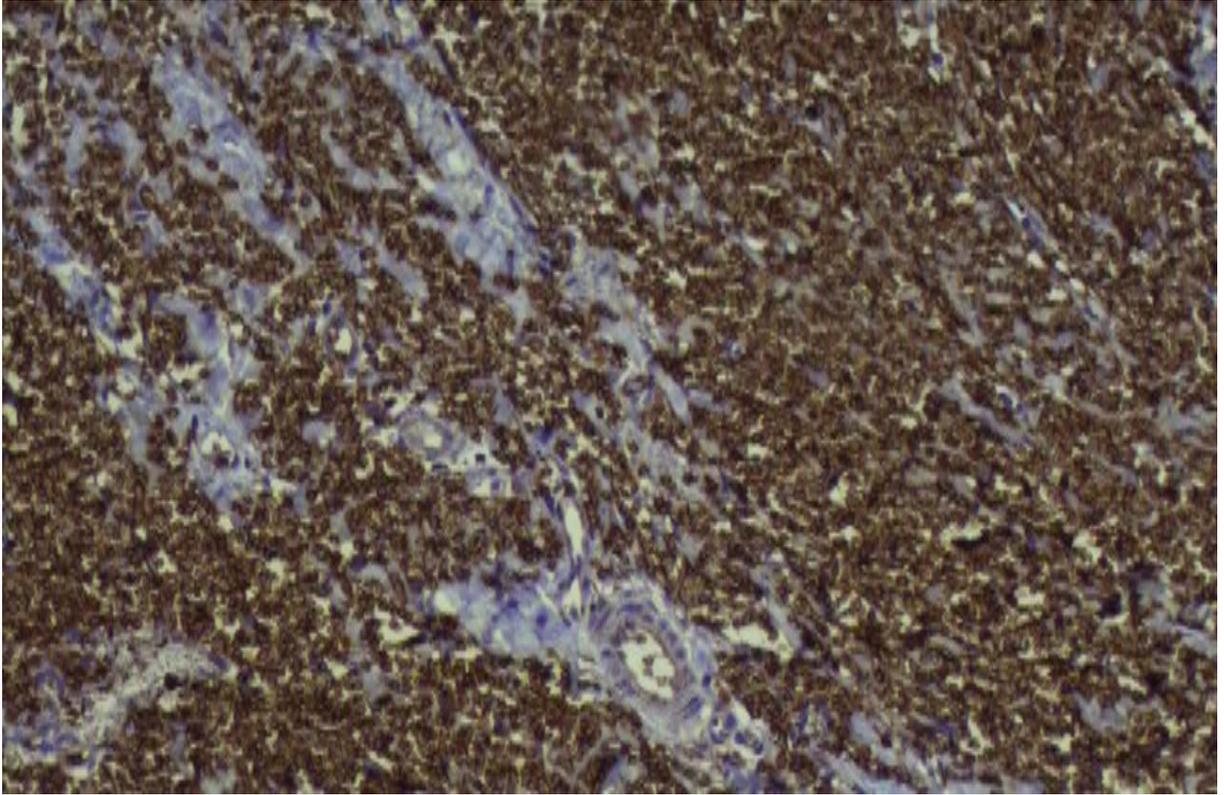


FIGURA 9: Fotomicrografia do controle positivo com intensa imunomarcção em eritrócitos (LSAB 200X)

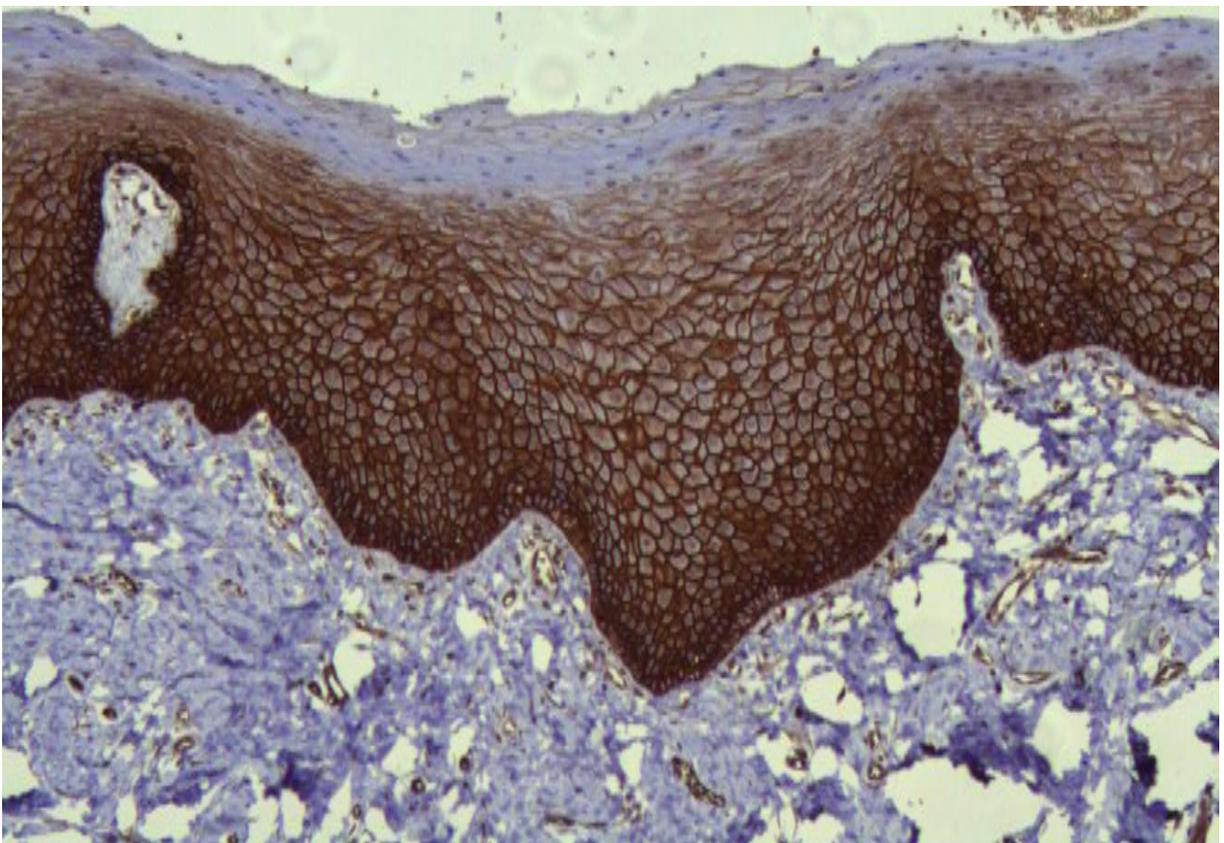


FIGURA 10: Fotomicrografia evidenciando imunoexpressão de GLUT-1 em HFI principalmente na camadas basal e espinhosa (LSAB 100x).

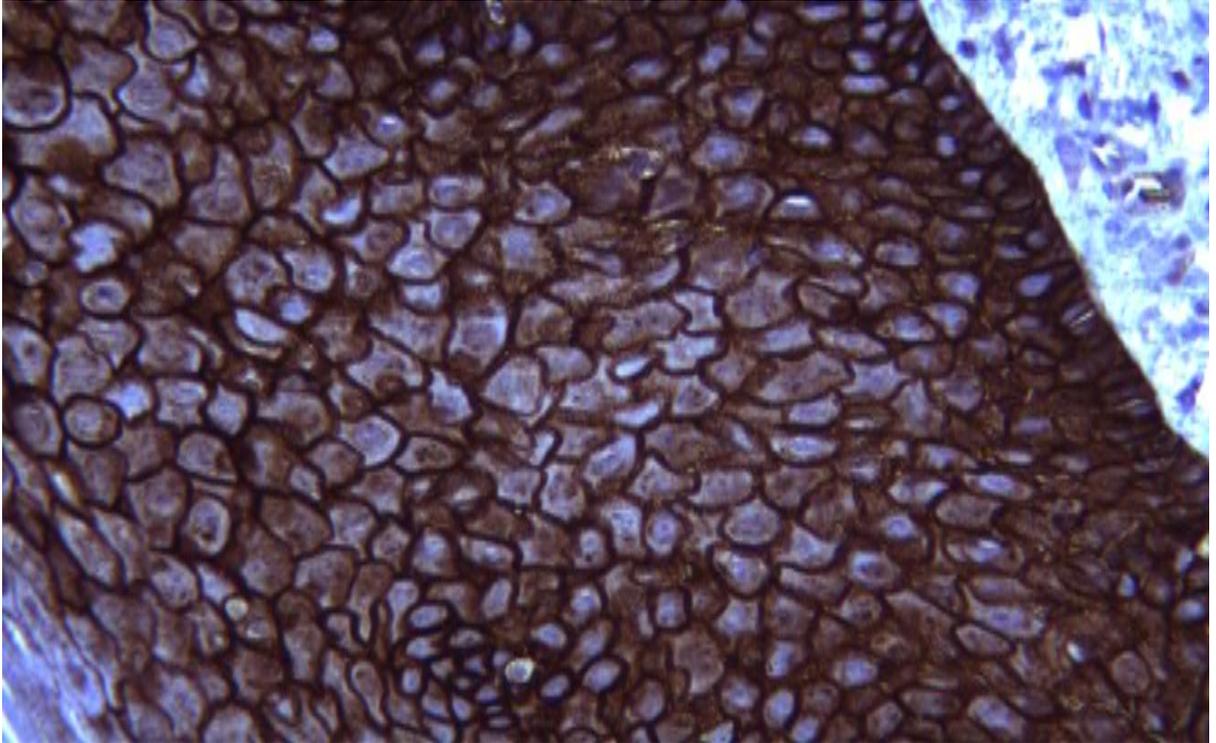


FIGURA 11: Fotomicrografia destacando intensa imunomarcção membranar e citoplasmática de GLUT-1 em HFI (LSAB 400x).

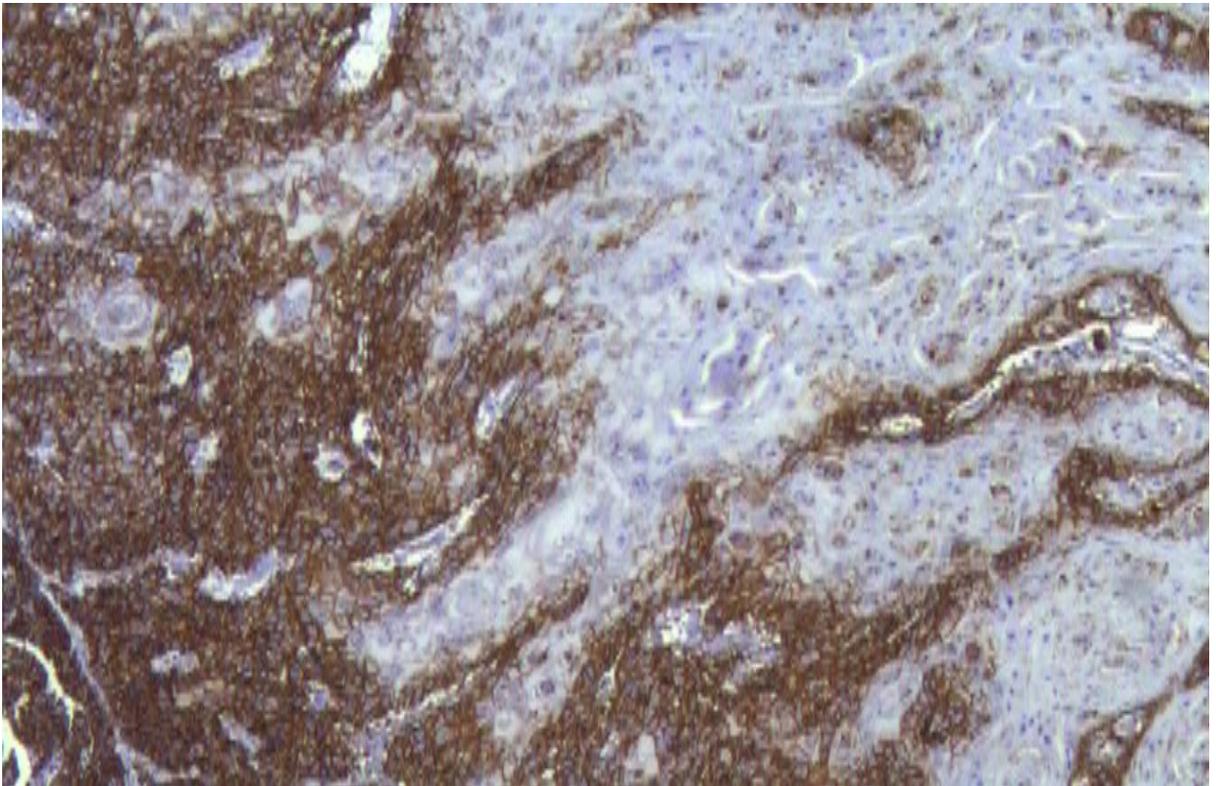


FIGURA 12: Fotomicrografia evidenciando a imunomarcção de GLUT-1 nas células neoplásicas em CEO (LSAB 100X).

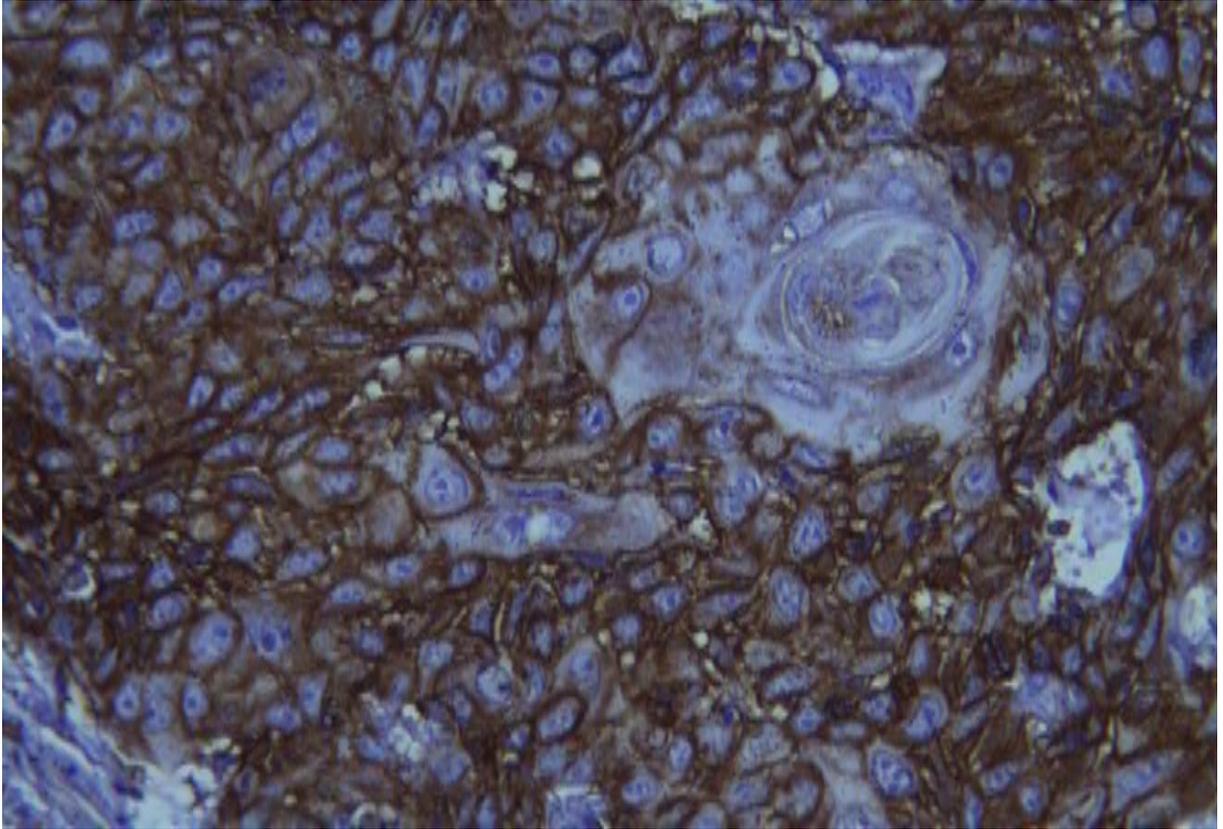


FIGURA 13: Destaca-se a intensa imunoreexpressão citoplasmática de GLUT-1 em CEO (LSAB 400x).

Todos os casos da amostra apresentaram imunomarcção para a proteína GLUT-1 em nos campos analisados. Nos casos de HFI se evidenciava imunoreexpressão de GLUT-1 principalmente nas camadas basal e espinhosa do epitélio de revestimento (Figura 10) e destacando intensa imunomarcção membranar e citoplasmática de GLUT-1 (Figura 11). A camada córnea do epitélio apresentava certo grau de ceratinização sem marcação da proteína. Evidenciava-se uma relação de distribuição de células imunomarcadas com a disposição das camadas que compõem o epitélio da cavidade oral hiperplásico.

Nos casos de CEO, nas ilhas tumorais observa-se imunomarcção nas células neoplásicas (Figura 12) destacando-se a intensa imunoreexpressão citoplasmática (Figura 13). Evidenciou-se marcação membranar, por vezes linear e focal, acompanhando o grau de invasão das células tumorais. Marcação nuclear não foi observada em nenhuma das lesões avaliadas.

5.2 Resultado da análise da imunexpressão da GLUT-1.

Análise Estatística

As médias do percentual de células imunopositivas para GLUT-1 dos cinco campos analisados de ambos os grupos foram submetidas ao teste de normalidade de Shapiro-Wilk e os dados foram analisados por meio do teste de Mann-Whitney. A análise foi realizada por meio do software de análise estatística GraphPadPrism 5.0 e adotou-se erro alfa tipo 1 de 0.05 ($p < 0.05$).

A média do percentual de células imunopositivas para GLUT-1 no grupo de hiperplasias fibrosas inflamatórias foi $85.6 \pm 0.9\%$ (mediana = 85.6%, mínima = 81.0%, máxima = 90.1%), ao passo que, a média do percentual de células imunomarcadas para GLUT-1 no grupo de carcinomas epidermóides foi $89.6 \pm 2.7\%$ (mediana = 92.2%, mínima = 72.2%, máxima = 98.0%). Pôde-se observar diferença estatisticamente significativa entre os dois grupos em estudo ($p=0.033$, teste Mann-Whitney) (Tabela 4, Figura 14).

Tabela 4: Média do Percentual de Células Imunopositivas em amostras de hiperplasias fibrosa inflamatória e carcinomas epidermóides orais do Ambulatório de Estomatologia do Curso de Odontologia, Universidade Federal do Ceará, Campus Sobral, 2013.

	HFI Média±EPM Mediana (Mín-Máx)	CEO Média±EPM Mediana (Mín-Máx)	p-Valor
Percentual Médio de Células Imunopositivas para GLUT-1	85.6±0.9 85.6 (81.0 - 90.1)	89.6±2.7 92.2 (72.2 - 98.0)	0.033*

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFC-Sobral, 2013.

* $p < 0.05$, Teste de Mann-Whitney.

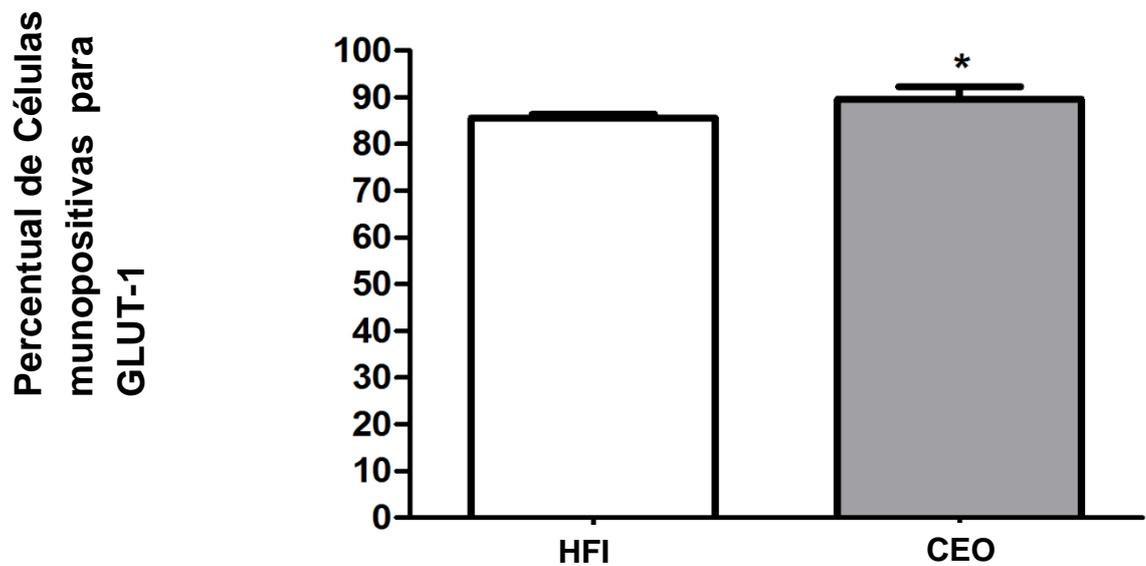


Figura 14: Média do Percentual de Células Imunopositivas em amostras de hiperplasias fibrosas inflamatórias e carcinomas epidermóides do Ambulatório de Estomatologia do Curso de Odontologia, Universidade Federal do Ceará, Campus Sobral, 2013.

* $p < 0.05$, Mann-Whitney (Média \pm EPM).

Com relação ao percentual de imunomarcção para GLUT-1 em CEOs no sexo masculino, pôde-se observar que, em média $87.4 \pm 7.8\%$ (mediana = 82.1% , mínima = 72.2% , máxima = 98.0%) das células neoplásicas nos CEO mostravam marcação positiva para GLUT-1 e $80.3 \pm 11.6\%$ (mediana = 90.6% , mínima = 57.2% , máxima = 93.1%) em células do CEO em pacientes do sexo feminino. Não houve diferença significativa entre o perfil de imunomarcção para GLUT-1 entre homens e mulheres ($p = 0.7$, teste Mann-Whitney) (Tabela 5, Figura 16).

Tabela 5: Média do Percentual de Células Imunopositivas em casos de CEO em pacientes do sexo masculino e feminino do Ambulatório de Estomatologia do Curso de Odontologia, Universidade Federal do Ceará, Campus Sobral, 2013.

	CEO (Homens) Média \pm EPM Mediana (Mín-Máx)	CEO (Mulheres) Média \pm EPM Mediana (Mín-Máx)	p-Valor
Percentual Médio de Células Imunopositivas em CEO para GLUT-1	87.4 ± 7.8 82.1 (72.2 - 98.0)	80.3 ± 11.6 90.6 (57.2-93.1)	0.7

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFC-Sobral, 2013.

* $p < 0.05$, Teste de Mann-Whitney.

Quando correlacionamos todas as células imunomarcadas para a proteína GLUT-1 nos casos de HFI (n=15) com todas as células imunopositivas para a mesma proteína nos casos de CEO (=15), considerando a descrição do perfil de localização das células imunomarcadas, em ambos os grupos de estudo pôde-se observar intensidade de imunomarcção membranar e citoplasmática. Entretanto, relacionando imunomarcção entre sexo nos casos de CEO, não encontramos diferenças significativas ($p=0,7$), assim, pode-se inferir que a imunoeexpressão dessa molécula independe do sexo, ou de possíveis alterações hormonais.

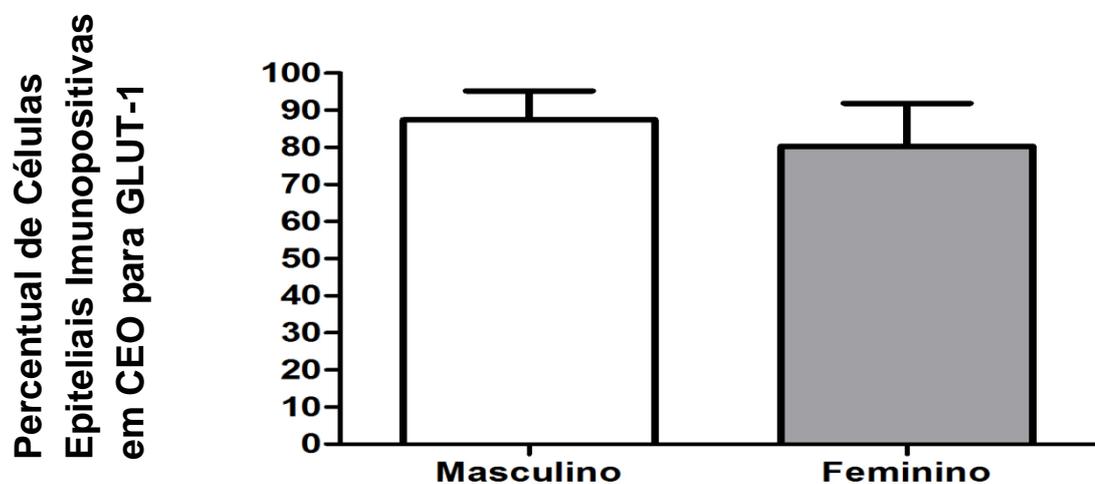


Figura 15: Média do Percentual de Células Imunopositivas em casos de carcinomas epidermóides orais em homens e mulheres levantados do Ambulatório de Estomatologia do Curso de Odontologia, Universidade Federal do Ceará, Campus Sobral, 2013.

* $p<0.05$, Mann-Whitney (Média±EPM).

Considerando a localização topográfica dos CEOs levantados nesta amostra, pôde-se perceber que os carcinomas localizados no rebordo alveolar ($93.4\pm 1.6\%$) (mediana = 92.6%, mínima = 90.6%, máxima = 98.0%) mostraram maior percentual de células imunopositivas para GLUT-1 que os CEO de língua ($64.7\pm 7.5\%$) (mediana = 64.7%, mínima = 57.2%, máxima = 72.2%) ($p=0.05$, teste de Mann-Whitney) (Tabela 6, Figura 16).

Tabela 6: Percentual Médio de Células Imunopositivas em casos de carcinomas epidermóides orais mediante localização topográfica levantados no Ambulatório de Estomatologia do Curso de Odontologia, Universidade Federal do Ceará, Campus Sobral, 2013.

	CEO (Língua) Média±EPM Mediana (Mín-Máx)	CEO (Rebordo Alveolar) Média±EPM Mediana (Mín-Máx)	p-Valor
Percentual Médio de Células Epiteliais Imunopositivas em CEO para GLUT-1	64.7±7.5 64.7 (57.2 - 72.2)	93.4±1.6 92.6 (90.6 - 98.0)	0.005*

Fonte: Programa de Pós-Graduação em Biotecnologia, UFC-Sobral, 2013.

*p<0.05, Teste de Mann-Whitney.

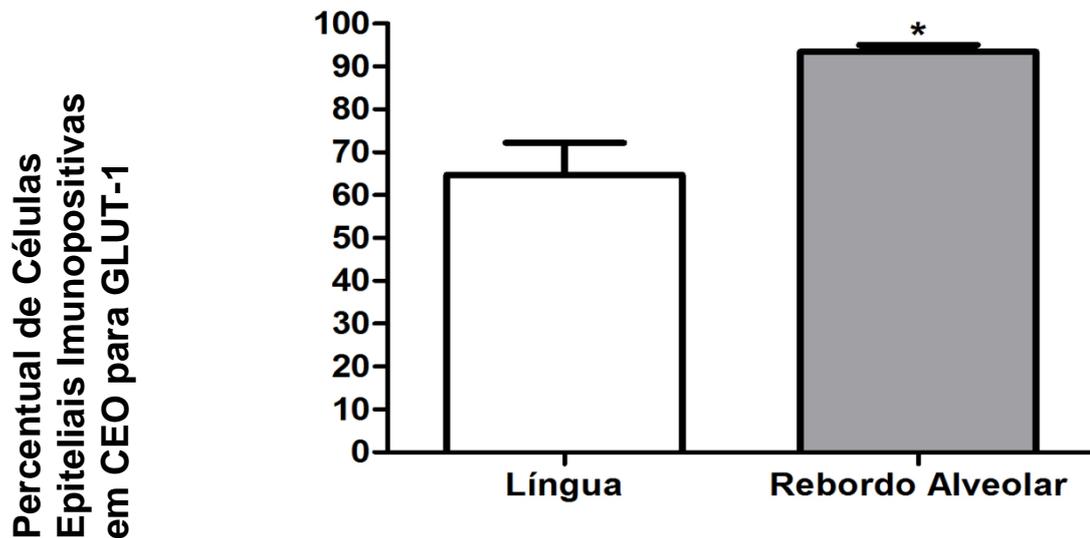


Figura 16: Média do Percentual de Células Imunopositivas em casos de carcinomas epidermóides orais mediante localização topográfica levantados no Ambulatório de Estomatologia do Curso de Odontologia, Universidade Federal do Ceará, Campus Sobral, 2013.

*p<0.05, Mann-Whitney (Média±EPM)

6 DISCUSSÃO

O processo normal de diferenciação e migração celular desde a camada basal até as camadas superficiais é mantido em um constante equilíbrio homeostático garantindo a renovação epitelial adequadamente, porém agentes agressores podem interromper este equilíbrio, e as células podem adaptar-se progressivamente modificando sua estrutura morfológica e bioquímica, ou ainda desencadear alterações adaptativas culminando com a morte celular.

As lesões do epitélio oral compreendem um número grande e diverso de entidades que variam de lesões reacionais a neoplasias. As lesões reacionais podem ser derivadas das células mesenquimais e são representadas por hiperplasia fibrosa ou proliferações exuberantes de tecido de granulação (REGEZI, SCIUBBA, 2012).

Para Zerdoner (2003) a hiperplasia epitelial representa um amplo espectro de alterações histológicas caracterizadas por anormalidades celulares e estruturais, porém com preservação na membrana basal.

A hiperplasia fibrosa inflamatória tem como característica histológica marcante, a hiperplasia do tecido conjuntivo fibroso, podendo apresentar também alterações no epitélio, fato que condiz com o padrão histológico dos casos analisados na presente pesquisa. Neste estudo, os casos revelam um predomínio marcante em pacientes do sexo feminino. A média de idade dos casos de HFI foi de 52,86 anos e sítio anatômico mais prevalente foi fundo de sulco vestibular com 53,33% dos casos. A hiperplasia fibrosa inflamatória pode ocorrer em qualquer idade, acometendo frequentemente adultos de meia-idade e com predileção pelo sexo feminino. Segundo Regezi e Sciubba (2012) a hiperplasia fibrosa induzida por prótese é uma lesão comum que ocorre na mucosa vestibular, onde a borda da prótese entra em contato com o tecido. Como o rebordo alveolar da mandíbula e da maxila é reabsorvido com o tempo em pacientes desdentados, associado ao uso da prótese durante longo tempo, as bordas gradualmente se estendem mais para o fundo de sulco vestibular (REGEZI, SCIUBBA, 2012).

A hiperplasia fibrosa inflamatória é categorizada separadamente de outras lesões orais não neoplásicas devido à constante associação da lesão com fatores irritantes locais crônicos de baixa intensidade como trauma por próteses mal adaptadas, dentes fraturados, restos dentários, dentre outros (ZERDONER, 2003).

O Carcinoma epidermoide oral é uma doença de características heterogêneas, com padrões distintos de apresentação e de comportamento biológico (COSTA *et al.*, 2005). É uma neoplasia maligna de origem epitelial que corresponde a mais de 90% dos cânceres em cavidade oral (GORSKY, 2004).

Lopes *et al.* (2006) analisaram 90 casos de carcinoma epidermoide oral no período de 1992 a 2004, subtraindo destes 18 casos com CEO metastático loco-regional, e observaram que a língua foi a localização anatômica do tumor primário mais comum com 33%(n=6), seguido do assoalho e mucosa jugal com 22%, ambas com 04 casos. Objetivando a correlacionar achados clínico-patológicos com envolvimento de margem cirúrgica em 117 pacientes com carcinoma epidermoide oral, Girardi (2013), encontraram que 68,3% dos tumores estavam localizados na língua. Corroborando com os autores descritos, na presente pesquisa foi observado que a língua é uma localização prevalente para o CEO.

No que se refere à idade, o CEO acomete principalmente pacientes na 5ª e 6ª décadas de vida. Neste estudo os pacientes apresentaram média de idade 63,13 anos, achado semelhante ao evidenciado por vários autores, como Lopez *et al.* (2006) que encontraram média de idade de $60,05 \pm 2,28$ anos no momento do diagnóstico do tumor primário, Ohaba *et al* (2010) que encontraram média de idade de 61 anos, e Girardi (2013) evidenciando a média de idade de 57,6 anos.

Como ocorre com outros carcinomas, o risco de câncer intraoral aumenta com o aumento da idade, especialmente para homens. A proporção global homem-mulher é de 3:1 (NEVILLE *et al.*, 2009). Entretanto, Regezi e Sciubba (2012) afirmam que com relação à incidência de todos os tipos de câncer, os carcinomas epidermóides da cavidade oral e orofaringe representam 3% dos casos de câncer em homens e 2% dos casos de câncer em mulheres, e que atualmente a proporção de casos em homens e mulheres é cerca de 2:1. Esta mudança pode ser atribuída ao aumento do tabagismo entre mulheres e aumento da sua expectativa de vida. Contudo, a maior prevalência continua no sexo masculino, com razão entre masculino:feminino variando de 1,25:1 (LOPEZ *et al.*, 2006) a 2,3:1 (GIRARDI, 2013). No presente estudo, 60% dos casos acometeram pacientes do sexo masculino, ratificado a literatura descrita.

Segundo Costa *et al.* (2005) o gênero masculino é provavelmente mais acometido pelo carcinoma epidermoide oral pela maior exposição aos conhecidos agentes carcinogênicos indutores ou promotores desta doença. O binômio gênero e idade associado à prevalência da doença revelam nítidas alterações moleculares que ocorrem após os 60 anos (PERUSSI *et al.*, 2002).

No contexto da manutenção da vitalidade celular, é importante ressaltar que a glicose é a maior fonte metabólica energética celular e importante substrato para a síntese de lipídios e proteínas celulares. Fornece energia na forma de ATP, a partir da glicólise. Quando os níveis plasmáticos de glicose estão dentro dos níveis de normalidade as células asseguram a glicose através de transporte passivo facilitado. A GLUT-1, uma proteínas transportadora de glicose, apresenta peso molecular de 45 kDa e o gene que a codifica está localizado no cromossomo 1. Sua expressão pode ser regulada por fatores de crescimento, estresse oxidativo, transformação neoplásica e por diminuição de oxigênio tecidual, dentre outros (ZHAO; KEATING, 2007).

Inúmeros estudos imuno-histoquímicos têm demonstrado imunoreatividade para a proteína transportadora de glicose, GLUT-1, no epitélio neoplásico correlacionando a sua expressão ao fenótipo tumoral. A GLUT-1 é a principal proteína transportadora de glicose encontrada em várias células de órgãos e tecidos. Contudo, acredita-se que a sua elevada expressão em algumas neoplasias possa ser considerado um indício de progressão e agressividade tumoral (CHOI, *et al.* 2007; THORENS; MUECKLER, 2010).

Na análise imuno-histoquímica de GLUT-1 na presente amostra de HFI, verificou-se expressão desta proteína em todos os casos, destacando-se que expressão da GLUT-1 era decrescente à medida que as células se afastam da camada basal para a superfície do epitélio, nos casos das HFI. A intensa expressão de GLUT-1 foi observada na camada basal e espinhosa e quase ausente na camada córnea, provavelmente devido a oferta de glicogênio nas camadas superiores e maturação celular.

Uma descrição dos achados imuno-histoquímicos da proteína GLUT-1 nos tecidos orais foi relatado por Vollstedlund; Dabelsteen (1997), comparando a expressão da GLUT-1 na mucosa oral normal com o epitélio neoplásico de células de carcinoma escamoso oral. Os autores relatam forte expressão nas células das camadas basais e parabasais do epitélio oral apresentando discretas variações nos subtipos ceratinizados e não-ceratinizados. Expressão semelhante pode ser evidenciado nas HFI do presente estudo, sugerindo que o epitélio das HFI assemelha-se ao epitélio da mucosa oral normal.

Chung, *et al.* (2004), estudando cento e onze linfonodos de 62 pacientes com carcinoma de não pequenas células de pulmão (NSCLC), submetido a estudo imuno-histoquímico para GLUT-1, observaram que todas as células na hiperplasia linfóide folicular mostravam forte positividade para a proteína ao longo da membrana celular. A análise da expressão da GLUT-1 nos 15 casos de hiperplasia fibrosa inflamatória estudados, também foi evidenciado imunopositividade para a proteína em todas as células com marcação membranar e citoplasmática, evidenciando assim, a principal localização celular desta proteína.

Discordando do nosso estudo, que identificou em 100% dos casos da amostra de 15 casos de hiperplasia fibrosa inflamatória, com um percentual médio de 85,6% de células epiteliais positivas para GLUT-1; Johann, *et al.* (2007) investigando a expressão da proteína transportadora de glicose-1 (GLUT-1) em 93 casos de lesões vasculares benignas de boca definidos por diagnóstico histológico, sendo 17 malformações vasculares (VM), 19 hemangiomas (HEM), 9 varizes (VAR) e 48 granulomas piogênicos (PG), não encontraram imunopositividade da referida proteína em nenhuma destas lesões.

Wang, *et al.* (2000) analisando a expressão imuno-histoquímica da GLUT-1 na hiperplasia benigna e nas células epiteliais malignas no endometrial, identificaram que nos casos de endométrio secretor ou proliferativo, não havia expressão da GLUT-1 e na atrofia endometrial a expressão da proteína também não era identificada. Na metaplasia tubária havia expressão da proteína, ao contrário da hiperplasia simples que não apresentava expressão da GLUT-1, entretanto na hiperplasia atípica havia imunomarcação positiva para GLUT-1 em todos os casos (n=8), o mesmo acontecendo para o adenocarcinoma endometrial (n=41), sendo presente a expressão membranar. Fato ressaltado por esses autores, o resultado indica que a hiperplasia endometrial revela uma expressão da GLUT-1 quando há atipias, sendo assim, neste caso a imunoreatividade para GLUT-1 do endométrio hiperplásico atípico parece ser um indicador a ser avaliado na suspeita de malignidade endometrial. Divergindo desses autores, na presente casuística, houve expressão da GLUT-1 nas células de todos os casos de hiperplasia fibrosa inflamatória, mesmo sem alterações epiteliais indicativas de malignidade.

Baer *et al.* (2002) analisando 48 biopsias de carcinoma de laringe, encontraram 100% de imunopositividade para GLUT-1. Em carcinoma oral, Ayala *et al.* (2010) estudaram a marcação imuno-histoquímica de GLUT-1 e GLUT-3 em CEO e detectaram uma elevada expressão de GLUT-1 em quase todos os casos, ao passo que a GLUT-3 só fora evidenciada em 21,1% da amostra estudada, porém estas proteínas não foram encontrada no epitélio oral normal. Corroborando com esses autores, na presente pesquisa encontrou-se resultado semelhante com relação à expressão de GLUT-1 nos casos de carcinoma epidermoide oral com 100% da amostra de CEO positiva para essa proteína.

No que se refere à expressão de marcação da GLUT-1 nas ilhas e cordões celulares do epitélio proliferante, observamos nesse estudo uma maior imunopositividade da proteína na periferia do tumor em relação ao centro, achados que condizem com o trabalho de Ohba *et al.* (2010) que investigando 24 pacientes com carcinoma epidermoide oral observaram o predomínio de marcação da GLUT-1 na periferia do tumor e menor marcação em áreas centrais. Isso sugere que as células neoplásicas nessa localização podem não necessitar de

tanta energia, sendo comum observar necrose nessas áreas, evidenciando menor expressão de GLUT-1. Ademais, acredita-se que as células periféricas tendem a invadir os tecidos adjacentes e assim, necessitam de maior consumo energético.

Ainda relatando a imunomarcção da GLUT-1 na periferia do tumor, pesquisas demonstram que a proteína GLUT-1 é predominantemente expressa na periferia do tumor, enquanto é quase que ausente no centro devido a uma maior presença de glicogênio e de células bem diferenciadas (OHBA *et al.*, 2010). Portanto acredita-se que a expressão de GLUT-1 constitui uma das estratégias adaptativas para o crescimento e progressão tumoral em um ambiente com grande instabilidade de oxigenação (AIRLEY *et al.*, 2003; KUNKEL *et al.*, 2003; DEMASI *et al.*, 2010).

Tais achados alicerçam as complexas alterações que ocorrem na via de metabolização da glicose, associados aos mecanismos de hipóxia tumoral em células potencialmente invasivas e que assim, determinam uma elevada expressão de GLUT-1. Uma disfunção bioenergética mitocondrial comprometendo a cadeia fosforilativa e conduzindo o metabolismo celular tumoral para uma intensa produção de lactato, independente da disponibilidade de oxigênio, sendo este fenômeno chamado de glicólise aeróbica ou efeito Warburg (VANDERHEIDEN *et al.*, 2009).

Segundo Gilles, Gatenby (2007), a persistência deste ambiente ácido mesmo em condições de normóxia indica que o metabolismo glicolítico confere vantagens significantes durante a evolução do carcinoma epidermoide devendo ser um componente importante no fenótipo maligno. Em um determinado estágio da progressão tumoral as células carcinogênicas são capazes de sobreviver em ambientes hipóxicos. A resposta celular a hipóxia se encontra regulada por HIF-1 α que em condições limitantes de oxigênio, estabiliza e induz a expressão dos transportadores de glicose GLUT-1 e outras diversas enzimas glicolíticas, assim como fatores que promovem angiogênese, crescimento e sobrevivência celular (ZHAO *et al.*, 2007).

Uma análise realizada por Carvalho *et al.* (2011) com objetivo de avaliar a expressão da GLUT-1 como um marcador para imunodiagnóstico de 1955 neoplasmas malignos de diferentes tipos histológicos, concluíram que a expressão da proteína é variável em diversos tipos cânceres. Observando que nos carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço a imunexpressão da GLUT-1 foi positiva em 36% de 172 casos imunomarcados, na proporção GLUT-1 positivo: GLUT-1 negativo (relação 62:110; 36% positivas). Havia expressão significativa em lesões displásicas e que mudanças na elevação da expressão da GLUT-1 estavam relacionadas com o comportamento biológico do tumor.

Li *et al.* (2010) verificaram uma predominância da expressão membranar em carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço, entretanto, Demasi *et al.* (2010), em carcinoma mucoepidermoide e Ohba *et al.* (2010), em carcinoma epidermoide oral, notificaram uma maior expressão de GLUT-1 no citoplasma das células neoplásicas. Na presente pesquisa foi observada imunexpressão da GLUT-1 em localizações semelhantes ao dos autores supracitados (membranar e citoplasmática). Contudo, diverge de Ayala *et al.* (2010) que observaram expressão nuclear em 67 (49,7%) casos.

Ayala *et al.* (2010) analisando 142 casos de carcinomas epidermóides orais, mostraram uma intensa imunexpressão da GLUT-1 em 135 casos. Dados semelhantes foram observados na pesquisa em sarcoma ósseos realizada por Endo *et al.* (2010), que dos 67 casos estudados, 56 (83%) exibiam uma superexpressão da GLUT-1. Ainda, Matsuzu *et al.* (2004) estudando tecidos normais e malignos de tireoide, demonstraram uma evidente expressão da referida proteína em tumores da tireoide quando comparada a tecidos normais. Na casuística encontramos diferenças estatisticamente significante ($p=0.033$) no percentual de células imunopositivas para GLUT-1 nos casos de carcinoma epidermoide quando comparadas com amostra de hiperplasia fibrosa inflamatória.

No nosso estudo, a imunexpressão da GLUT-1 em CEO demonstrou positividade em homens (87.4%) com maior marcação para proteína em comparação a expressão em mulheres com 80,3% ($p=0.7$), porém sem significância estatística.

Nos casos de CEO a localização anatômica do tumor primário condiz com os dados na literatura. Na casuística o sítio primário do tumor é preferencialmente na língua e assoalho da boca ($n=7$) com 53,34%, seguido de rebordo alveolar ($n=4$) com 26,66%, identificamos um caso em lábio inferior, um caso em palato mole e um caso em mandíbula.

Quando relacionamos a localização anatômica com percentual de células imuno marcadas para a proteína, a localização anatômica em rebordo alveolar apresenta-se com $93.4\pm 1.6\%$ (mediana = 92.6%, mínima = 90.6%, máxima = 98.0%) dos casos que mostraram maior percentual de células GLUT-1 positivas do que os carcinomas de língua ($64.7\pm 7.5\%$).

As hiperplasias reacionais que provêm de irritações crônicas, e que segundo REGEZI, SCIUBBA (2009) estas irritações são consideradas como um fator modificador e não um fator iniciador do câncer oral, não sendo fator diretamente envolvido no processo da carcinogênese oral. Sendo assim, a hiperplasia reativa inflamatória com padrão histológico sem alterações nenhuma de malignidade é utilizada na presente pesquisa para fins comparatórios com carcinoma epidermoide oral (CEO).

Embora haja escassez de trabalhos descritos na literatura pertinente, com base nestes achados é possível propor que existem diferenças significativas entre os dois grupos de lesões estudados, caracterizando potenciais alterações bioquímicas que podem ser reveladas nestas lesões, e assim, no comportamento clínico distinto destas.

Segundo Eckert (2010), outras investigações mostram que a expressão da GLUT-1 comporta-se como um fator de prognóstico independente para pacientes com carcinoma oral de células escamosas e que a imunoexpressão da GLUT-1 pode ser usada como marcador de informação de agressividade tumoral e prognóstico, bem como um marcador usual na triagem de neoplasias malignas.

A transição da mucosa normal oral para carcinoma epidermoide é um processo multifatorial extremamente complexo no que se justificam inúmeros estudos que tentam identificar as alterações na mucosa que precede critérios de malignização. O desenvolvimento de alguns tipos de lesões pode representar estágios diferentes neste processo (KUFFER, LOMBARDI, 2002).

O significado de expressão da GLUT-1 nas transformações neoplásicas de epitélio não está bem estabelecido, embora a sua expressão esteja marcadamente presente em uma variedade de neoplasmas malignos, fazendo acreditar que esta proteína constitui uma das estratégias adaptativas para o crescimento tumoral em ambiente com baixa tensão de oxigênio e depleção de ATP.

Esta variedade de expressão da GLUT-1 nos tumores tem sido descrita na literatura, necessitando além da investigação dos seus efeitos, uma maior avaliação no comportamento e biologia tumoral.

7 CONCLUSÃO

- Evidenciou-se imunomarcção em todos os casos da amostra analisada, tanto de hiperplasia fibrosa inflamatória como nos casos de carcinoma epidermoide oral.
- A expressão da GLUT-1 foi membranar e citoplasmática independente da localização da lesão, tanto nos casos de HFI como nos casos de CEO.
- Quanto a localização da imunoexpressão, nos casos de HFI a intensidade de marcação da GLUT-1 é decrescente em direção à camada superficial do epitélio; enquanto que nos casos de CEO a intensidade de marcação da proteína localizou-se principalmente nas células periféricas da lesão.
- Houve uma maior expressão da GLUT-1 no CEO, sugerindo um possível papel desta proteína no processo de carcinogênese oral. Assim, a imunoexpressão de GLUT-1 pode associar-se a outros marcadores de progressão e crescimento tumoral, adicionando como uma ferramenta importante no prognóstico de pacientes portadores desta neoplasia.

8 REFERÊNCIAS*

- AIRLEY, R. E. et al. GLUT-1 and CAIX as intrinsic markers of hypoxia in carcinoma of the cervix: relationship to pimonidazole binding. **Int J Cancer**, v. 104, n. 1, p. 85-91, 2003.
- AIRLEY, R.E., MOBASHERI, A. Hypoxic regulation of glucose transport, anaerobic metabolism and angiogenesis in cancer: novel pathways and targets for anticancer therapeutics, **Chemotherapy**. v. 53, p. 233-256, 2007.
- AGUIAR, R. C. M.; VIOLA, K. S.; ALCALA, M. H.; CASTRO, E. F. L.; TOLEDO, H. J. B.; CASTRO, A. L. Lip carcinoma with unfavorable prognostic due inadequate medical conduct. **Rev Odontol Aractub**. v.32, n. 2, p. 23-17, 2011.
- AMAR, A, Rapoport A. Recidivas regionais nos pacientes com carcinoma epidermóide das vias aerodigestivas superiores submetidos a esvaziamento cervical. **Rev Col Bras Cir**.v. 30, p. 128-33, 2003
- ASCO, American Society of Clinical Oncology (2009). <[htt: // www.cancer.net](http://www.cancer.net) > . Acesso novembro.13.
- AYALA, F. R.; ROCHA, R. M.; CARVALHO, K. C.; *et al*: GLUT-1 and GLUT-3 as potencial prognostic markers for Oral Squamous Cell Carcinoma. **Molecules**. v. 15, n. 4, p. 2374-2387, 2010.
- BAER, S. *et al*. GLUT-3 expression in biopsy specimens of laryngeal carcinoma in associated with poor survival. **Laryngoscope**. v. 112, p. 393-6, 2002.
- BALARAM, P.; SRIDHAR, H.; RAJKUMAR, T.; VACCARELLA, S.; HERRERO, R.; NANDAKUMAR, A. et al. Oral câncer in southern India: the influence os smoking, driking, paan-chewing and oral hygiene. **Int J Cancer**. v. 98, n. 3, p. 440-5, 2002.
- BRASIL. Ministério da Saúde. Instituto nacional de Câncer – INCA. Prevenção e controle de câncer: normas e recomendações do INCA. **Rev Bras Cancerol**. v. 48, n. 3, p. 317-32, 2002.
- BROWN, G. K. Glucose transporters: structure, function and consequences of deficiency. **J. Inherit. Metab. Dis.**, v. 294, n. 5545, p. 1337-40, 2001.
- BRYNE, M. Is the invasive front of on oral carcinoma the most important area for the prognostication ? **Oral Dis**. v. 4, n. 2, p. 70-7, 1998.
- BOYLE, J. P.; SNEHAL, S.; JATAN, P. Management of oral and oropharygel cancers. **Oral Disease**. V.9, n. 3, p. 109-111, 2003

CALY, N. D. *et al.*, Indications and pitfalls of immunohistochemistry in head and neck cancer. **Braz J Otorhinolaryngol.** v. 79, n. 1, p. 75-81, 2013.

CARVALHO, A. L.; SINGH, B.; SPIRO, R. H.; KOWALSKI, L. P.; SHAH, J.P. Cancer of the oral cavity: a comparison between institutions in a developing and a developed nation. **Head Neck.** v. 26, n 1, p. 31-8, 2004.

CARVALHO, C. Cresce incidência de câncer de boca no Brasil. **Rev Bras Odontol.** v. 60, n. 1, p. 36-39, 2003.

CARVALHO, K. C.; CUNHA, I. W.; ROCHA, R. M.; AYALA, F. R.; CAJAÍBA, M. M.; BEGNAMI, M. D. *et al.* GLUT1 expression in malignant tumors and its use as an immunodiagnostic marker. **Clinical Science.** v. 66, n. 6, p. 965-972, 2011.

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

CHANDU, A.; ADAMS, G.; SMITH, A. C. H. Factors affecting survival in patients with oral cancer: an Australian perspective. **Int J Oral Maxillofac Surg.** v. 34, p. 514-20, 2005.

CHOI, K. K. *et al.* Independent prognostic factors of 861 cases of oral squamous cell carcinoma in Korean adults. **Oral Oncol.** v. 42, n. 2, p. 208-17, 2006.

COELHO, C.M.; SOUSA, Y.T.; DARÉ, A.M. Denture-related oral mucosal lesions in a Brazilian school of dentistry. **J. Oral Rehabil.**, v.31, p.135-139, 2004.

COSTA, A. L. L.; PEREIRA, J. C.; NUNES, A. A. F.; ARRUDA, M. L. S. Correlação entre a classificação TNM, gradação histológica e localização anatômica em carcinoma epidermóide oral. **Pesq Odontol Bras.** v.16, n. 3, p. 216-20, 2002

COSTA, A. L. L.; ARAUJO JUNIOR, R. F.; RAMOS, C. C. F. Correlation between TNM classification and malignancy histological feature of oral squamous cell carcinoma. **Rev. Bras. Otorrinolaringol.**, v. 71, n. 2, p. 181-7, 2005.

DAHLSTROM, K. R.; ADLER-STORTHZ, K.; ETZEL, C. J.; LIU, Z.; DILLON, L.; EL-NAGGAR, A. K. *at al.* Human papillomavirus type 16 infection and squamous cell carcinoma of the head and neck in never-smokers: a matched pair analysis. **Clin Cancer Res.** v. 0, n. 7, p. 2620-6, 2003.

DEMASI, A. P.; COSTA, A. F.; ALTEMANI, A.; FURUSE, A.; ARAUJO, N.S.; ARAUJO, V. C. Glucose transporter protein 1 expression in mucoepidermoid carcinoma of salivary gland: correlation with grade of malignancy. **Int J Exp Pathol** 91: 107-113, 2010.

DANTAS, D. D. L. *et al.* Clinical-pathological parameters in squamous cell carcinoma of the tongue. **Braz. Dent. J.**, v. 14, n. 1, p. 22-5, 2003.

De VIVO, D. C; TRIFLETTI, R. R; JACOBSON, R. I.; RANEN, G. M; BEHAMAND, R. A; HARIK, S. I. Detective glucose transport across the blood-brain barrier as a cause of persistent hypoglycemia, seizures, and developmental delay. **N Eng J Med.**, v. 335, p. 703-709, 1991.

- DONG, Y. J.; PENG, T. K.; YIN, S. J. Expression and activities of class IV alcohol dehydrogenase and class III alcohol dehydrogenase in human mouth. **Alcohol**. v. 13, n. 3, p. 257- 62, 1996.
- ECKERT, A. W.; LAUTNER, M. H. W.; TAUBERT, H.; SCHUBERT, J.; BILKENROTH, U. Expression of GLUT-1 is a prognostic marker for oral squamous cell carcinoma patients. **Oncology Reports**.v.20, p. 1381-1385, 2008.
- ENDO, M. *et al.* Prognostic implications of glucose transporter protein-1 (Glut-1) overexpression in bone and soft-tissue sarcomas. **Jpn Clin Oncol**. v.37, n.12, p.955-960, 2007.
- FALCÃO, A. F.P *et al.*. Hiperplasia fibrosa inflamatória: relato de caso e revisão de literatura. **Rev. Cir. méd. biol.**, v.8, n.2, p. 230-236, 2009.
- FREITAS, H. S.; SCHAAN, B. D.; SERAPHIM, P. M.; NUNES, M. T.; MACHADO, U. F. Acute and short-term insulin-induced molecular adaptations of GLUT2 gene expression in the renal cortex of diabetic rats. **Mol Cell Endocrinol**. v.237, n.1-2, p. 29-57, 2005.
- FUKUZUMI, M.; HAMAKAWA, H.; ONISHI, A.; SUMIDA, T.; TANIOKA, H.; Gene expression of GLUT isoforms and VHL in oral squamous cell carcinoma. **Cancer Lett**. v. 161, p. 133-140, 2000.
- GANAPATHY, V.; THANGARJU, M.; PRASAD, P. D. Nutrients transporters in cancer: relevance to Warburg hypothesis and beyond. **Pharmacol Therapeut**. v. 121, p. 29-40, 2009.
- GERVÁSIO, O. L. A. S.; DUTRA R, A.; TARTAGLIA, S. M. A.; VASCONCELOS, W. A.; BARBOSA, A. A.; AGUIAR, M. C. F. Oral squamous cell carcinoma: A retrospective study of 740 cases in a Brazilian Population. **Braz Dent J**. v. 12, n. 1, p. 57-61, 2001.
- GIRARDI, M. F. *et al.* Correlation between clinical and pathological data and surgical margins in patients with squamous cell carcinoma of the oral cavity. **Braz J Otorhinolaryngol**. v. 79, n.2, p. 190-5, 2013.
- GILLIES, R. J.; GATENBY, R. A. Adaptive landscapes and emergent phenotypes: why do cancers have high glycolysis? **J Bioenerg Biomembr**. v. 39, n.3, p. 251-257, 2007.
- GORSKY, V. M. *et al.* Carcinoma of the tongue: a case series analysis of clinical presentation, risk factors, staging and outcome. **Oral Surg. Med. Oral Pathol. Oral Radiol. Endo.**, v.98, n.5, p.546-52, 2004.
- GREENWOOD, M. *et al.* Oral cancer: material deprivation unemployment and risk factor behaviour – and initial study. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v.32, p.74-77, 2003.
- HA, P. A.; CALIFANO, J. A. The role of human papillomavirus in oral carcinogenesis. **Crit Rev Oral Biol Med**. v. 15, n. 4, p.188-96, 2004.
- HOWIE, N. M. *et al.* Short-term exposure to alcohol increases the permeability of human oral mucosa. **Oral Dis**. v. 7, n. 6, p. 349-54, 2001.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER- INCA. **Câncer de boca: tratamento.**
Disponível em: <<http://www.inca.gov.br/2013>>. Acesso em nov.13.

INSTITUTO NACIONAL DO CÂNCER (INCA/MS) [homepage na internet]. **Estimativa de incidência e mortalidade por câncer no Brasil.** [acesso em nov 2013]. Disponível em:<http://www.inca.gov.br>.

ISA, A. Y.; WARD, T. H.; WEST, N. J.; SLEVIN, J.; HOMER, J. Hypoxia in head and neck cancer. **Br J Radiol.** V. 79, p. 791-798, 2006.

JOHANN, A. C. B. R. **Imuno-expressão da GLUT-1 em lesões vasculares benignas de boca.** Dissertação – Universidade Federal de Minas Gerais. 2006.

JAKOBSSON, P. A. *et al.* Histologic classification and grading of malignancy in carcinoma of the larynx. **Acta Radiol.** v. 12, n. 1, p. 1-8, 1973.

JUNQUEIRA, L. C. e CARNEIRO, J. H. Tecido epithelial. In: *Histologia Básica.* 10 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004, cap. 4, p. 47-68.

KADEMANI K, *et al:* Prognostic factors in intraoral squamous cell carcinoma: the influence of histologic grade. **J. Oral Maxillofac Surg** v. 63, n. 11, p. 1599-1605, 2005.

KANG, S.S.; CHUN, Y.K.; HUR, M. H.; LEE, H.K.; KIM, Y.J.; HONG, S.R.; LEE, J.H.; LEE, S.G.; PARK, Y.K. Clinical significance of glucose transporter 1 (GLUT1) expression in human breast carcinoma. **Jpn J Cancer Res.** v.93, n. 10, p. 1123-1128, 2002.

KING TUNG, N.G. **Expression of Hypoxia Inducible Factor-1 and its role in Chronic Inflammatory Periodontal Disease.** Tese – Universidade de Hong Kong. 2001.

KLEPPER, J.; VOIT, T. Facilitades glucose transporter protein type 1 (GLUT1) deficiency syndrome: impaired glucose transport into brain a review. **Eur. J. Pediatr.**, v. 161, n. 6, p. 295-304, 2002.

KOSOMORA R, *et al.* p53 mutation and human papillomavirus infection in oral squamous cell carcinomas: correlation with overall survival. **Braz. J. Craniomaxillofac. Surg.**, v.7,n.11 p 339-403, 2001.

KOWALSKI, L. P.; CARVALHO, L. P.; MARTINS PRIANTE, A.V.; MAGRIN, J. Predictive factors for distant metastasis from oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Oral Oncol.** v. 41, n. 5, p. 534-41, 2005.

HUFFER, R.; LOMBARDI, T. Premalignant lesions of the oral mucosa. A discussion about the place of oral intraepithelial neoplasia (OIN). **Oral Onc.** v.38, n. 2, p. 125-30, 2002.

KUMAR, V.; ABBAS, A. K.; FAUSTO.N. **Robbins e Cotran, Patologias: bases patológicas das doenças.** 8ªed. Rio de Janeiro: Saunders Elsevier, 2010.

KUNKEL M. *et al.* Over expression of Glut-1 and increased glucose metabolism in tumors are associated with a poor prognosis in patients with oral squamous cell carcinoma. **Cancer,** v. 3, n. 4, p. 1015-24, 2003.

LARSEN, S.R.; JOHANSEN, J.; SORENSEN, J. A.; KROGDAHL, A. The prognostic significance of histological features in oral squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med.** v.38, n. 8, p. 657-62, 2009.

LI, S. J. et al. Expression of Glut-1 in primary and recurrent head and neck squamous cell carcinomas and compares whit 2-[18F]fluoro-2-deoxy-D-glucose accumulation in positron emission tomography. **Br J Oral Maxillofac Surg.** v. 46, n. 3, p. 180-6, 2008.

LIAO, C. T.; CHANG, J. T.; WANG, H. M.; NG, S. H.; HSUEH, C.; LEE, L.Y. et al. Analysis of risk factors of predictive local tumor control in oral cavity cancer. **Ann Surg Oncol.** v.15, n. 3, p. 915-22, 2008.

LONGSHORE SJ, CAMISA C. Detection and management of premalignant oral leukoplakia. **Dermatologic Therapy.** V. 15(3):229-235, September 2002.

LUNA-ORTZ, K. *et al.* Lip cancer experience in México. An 11-year retrospective study. **Oral oncol.** v. 40, n. 10, p. 992-9, 2004.

LÓPEZ-JORNET, P; CAMACHO-ALONSO, F. New barriers in oral cancer: Patient accessibility to dental examination- A pilot study. **Oral Oncol**, v.42, p.1022-5, 2006.

MACHADO, U. F.; SCHAAN, B. D.; SERAPHIM, P. M. Glucose transporters in the metabolic syndrome. **Arq. Bras. Endocrinol. Metab.**, v. 50, p. 177-89, 2006.

MAIO, R.; DICHI, J. B.; BURINI, R. C. Implicações do alcoolismo e da doença hepática crônica sobre o metabolismo de micronutrientes. **Arq Gastroenterol.** v. 37, n. 2, p. 120-24, 2000).

MANSOUR, O. I.; SNYDERMAN, C. H.; D'AMICO, F. Association between tobacco use and metastatic neck disease. **Laryngoscope.** v. 113, n. 1, p. 161-6, 2003.

MASHBERG A, SAMIT A. Early diagnosis of asymptomatic oral and oropharyngeal squamous cancers. **CA Cancer J Clin.** v. 45, n. 6, p. 328-51,1995

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

MATSUZU, K. *et al.* Differential expression of glucose transporter in normal and pathologic thyroid tissue. **Thyroid.**v.14, n.10, p.806-812, 2004.

MINETA, H. et al. Prognostic value of glucose transporter 1 expression in patients with hypopharyngeal carcinoma. **Anticancer Res.**, v. 22, n. 6B, p. 3489-94, 2002.

MOIIA, R. R.; ZELLER, G. C.; CAMBRUZZI, E.; JOTZ, P. G.; BERNI, B. R. Ki and p53 correlation prognostic value in squamous cell carcinomas of the oral cavity and tongue. **Braz J Otorhinolaryngology.** v. 75, n. 4, p. 544-49, 2009.

MUECKLER, M.; THORENS, B. The SLC2 (GLUT) family of membrane transporters. **Molecular Aspects of Medicine**. v. 34, p. 121-138. Elsevier, 2013.

NEVILLE, BW et al. **Patologia oral e maxilofacial**. 3ªed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2009.
NEIA, A.P.M.L.; SHINIKE, F.K.; CHICARELLI, M. Hiperplasia inflamatória. **Revista da Universidade Estadual de Marigá**, v.1. http://www.uem.br/~urutagua/02_odonto.htm. 2001

OHBA, S. *et al.* Overexpression of GLUT-1 in the invasion front is associated with depth of oral squamous cell carcinoma and prognosis. **J Oral Pathol Med.**, v.39, n.1, p.74-9, 2010.

OKADA, Y. *et al.* An analysis of cervical lymph nodes metastasis in oral squamous cell carcinoma. Relationship between grade of histopathological malignancy and lymph nodes metastasis. **Int. J. Oral maxillofac. Surg.**, v. 32, n. 3, p. 284-8, 2003.

OKAZAKI, Y. *et al.* Investigation of environmental factors for diagnosing malignant potential in oral epithelial dysplasia. **Oral Oncol.**, v. 38, n. 6, p. 562-73, 2002.

OLIVEIRA L. R.; RIBEIRO-SILVA, A.; ZUCOLO S. Perfil da incidência e da sobrevivência de pacientes com carcinoma epidermóide oral em uma população brasileira. **J. Bras. Patol Med Lab.** v. 42, n. 5, p. 385-92, 2006.

PARKIN, D. M.; BRAY, F.; FERLAY, J.; PISANI, P. Global cancer statistics, 2002. **Cancer J Clin.**v.55, n. 2, p. 74-109, 2005.

PARENTE, P.; COLI, A.; MASSI, G.; MANGONI, A.; FABRIZI, M. M.; BIGOTTI, G. Immunohistochemical expression of the glucose transporters Glut-1 and Glut-3 in human malignant melanomas and benign melanocytic lesions. **J Exp Clin Cancer Res**, v. 27, p. 34, 2008.

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

PEDRON, I.G. *et al.* Hiperplasia Fibrosa causada por prótese: remoção cirúrgica com laser Nd:YAP. **Rev. Clín. Pesq. Odontol.**, v.3, n.1, p. 51-56, 2007.

REGEZI, J A, SCIUBBA J J. **Patologia Oral; correlações clínico patológicas**. Rio de Janeiro:Elsevier, 2012.

REICHART, P. A. & PHILIPSEN, H. P. Oral erythroplakia - a review. **Oral Oncol.**, v. 41, n. 6, p. 551-61, 2005.

RIBEIRO, ACP. *et al.* Clinical and histopathological analysis of oral squamous cell carcinoma young people a descriptive study in Brazilians. **Br. J. Oral Maxillofac. Surg.** v. 47, n.2, p. 95-8, 2009.

ROBERTSON, A. G.; ROBERTSON, C.; SOUTAR, D. S.; BURNS, H.; HOLE, D.; MCCARRON, P. Treatment of oral cancer: need for defined protocols and specialist centres. Variations in the treatment of oral cancer. **Clin Oncol.** v. 13, p. 409-15, 2001

RUDLOWSKI, C.; MOSER, M.; BECKER, Rudlowski C, Moser M, Becker A, et al. GLUT 1 mRNA and protein expression in ovarian borderline tumors and cancer. **Oncology**. v. 66, p. 404-10, 2004.

SANTOS, M. E. S. M.; COSTA, W. R. M.; SILVA NETO, J. C. Terapêutica cirúrgica da hiperplasia fibrosa inflamatória: relato de caso. **R. Cir. Traumatol. Buco-Maxilo-Fac.** v.4, n.4, p.241-245, 2004.

SCIUBBA, J. J. Oral cancer and its early detection: history-taking and the diagnostic phase management. **JADA**. v.132, p. 12-18, 2001.

SCULLY, C. Oral cancer; evidence for sexual transmission. **Br Dent Journal**, v. 199, n. 4, p. 203-207, aug.2005.

SOUSA, T. R. B. Papilomavírus humano e a detecção do DNA viral no carcinoma epidermoide da cavidade oral: revisão da literatura [Dissertação]. São Paulo: Faculdade de Ciências Médicas da Santa Casa de São Paulo, 2001.

SZABLEWSKI, L. Expression of glucose transporters in cancer. **Biochimica et Biophysical Acta**. p. 164-169. Editora Elsevier, 2012.

TANAKA, N. *et al.* Expression of carbonic anhydrase 9, a potencial intrinsic marker of hypoxia, is associated with poor prognosis in oesophageal squamous cell carcinoma. **Br. J. Cancer.**, v. 99, n. 9, p. 1468-75, 2008.

THORENS, B.; MUECKLER, M. Glucose transporter in the 21st Century. **Am. J Physiol Endocrinol Metab.** v. 298, n. 2, p. E141-E145, 2010.

VANDER HEIDEN , M. G., CANTLEY, L. C. y THOMPSON, C. B. Understanding the Warburg effect: the metabolic requirements of cell proliferation. **Science**. 324, 1029-1033, 2009.

VOLSTEDLUND, M.; DABELSTEEN, E. Expression of GLUT1 in stratified squamous epithelia and oral carcinoma from humans and rats. **APMIS**. v. 105, n. 7-12, p. 537-545, 1997.

WARNAKULASURYA, S. Histological grading of oral epithelial dysplasia: revisited. **J Pathol**. v. 194, n. 3, p. 294-7, 2001.

WAHI, P. M. Tipos histológicos de tumores orales y orofaríngeos. **Ginebra: Organización Mundial de La Salud**; 1971.

WANG, X. et al. Intratumor genomic heterogeneity correlates with histological grade of advanced oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncol.**, v. 42, n. 7, p. 740-44, 2006.

WOOLGAR, J. A.; TRIANTAFYLLOU, A. A histopathological appraisal of surgical margins in oral and oropharyngeal cancer resection specimens. **Oral Oncol.**, v. 41, n. 10, p. 1034-43, 2005.

WORLD HEALTH ORGANIZATION Classification of tumours. Pathology and genetics of head and neck cancer. Lyon: IARC Press; 2005.

WU, X.; FREEZE, H. H. GLUT14, a duplicon of GLUT3, is specifically expressed in testis as alternative splice forms. **Genomics**. v.80, p. 553-7, 2002.

ZERDONER D. The Ljubljana classification – its application to grading oral epithelial hyperplasia. **J Craniomaxillofac Surg**. v. 31. P. 75-9, 2003.

ZHAO, F. Q.; KEATING, A. F. Functional properties and genomics of glucose **Curr Genomics**. v. 8, n. 2, p. 113-28, 2007.