UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO

CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA

SUSY CARMELITA PEREIRA DO NASCIMENTO

LEUCOPLASIA E CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAIS: ESTUDO CLÍNICO, HISTOPATOLÓGICO E IMUNO-HISTOQUÍMICO

VITÓRIA

2012

SUSY CARMELITA PEREIRA DO NASCIMENTO

LEUCOPLASIA E CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAIS: ESTUDO CLÍNICO, HISTOPATOLÓGICO E IMUNO-HISTOQUÍMICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Clínica Odontológica.

Orientadora: Profa. Dra. Liliana Aparecida Pimenta de Barros.
Co-orientadora: Profa. Dra. Letícia Nogueira da Gama de Souza Bautz

VITÓRIA

2012

Nascimento, Susy Carmelita Pereira do.

Leucoplasia e Carcinoma de Células Escamosas Orais: estudo clínico, histopatológico e imuno-histoquímico / Susy Carmelita Pereira do Nascimento. - 2012.

137 f.

Orientadora: Liliana Aparecida Pimenta de Barros.

Co-orientadora: Letícia Nogueira da Gama de Souza Bautz.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Leucoplasia. 2. Carcinoma I. Nascimento, Susy Carmelita Pereira do. II Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde.

SUSY CARMELITA PEREIRA DO NASCIMENTO

LEUCOPLASIA E CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAIS: ESTUDO CLÍNICO, HISTOPATOLÓGICO E IMUNO-HISTOQUÍMICO

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica da Universidade Federal do Espírito Santo, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Clínica Odontológica.

Submetida à qualificação em 12 de julho de 2012.

COMISSÃO EXAMINADORA

_____

Profa. Dra. Liliana Aparecida Pimenta de Barros
Universidade Federal do Espírito Santo - UFES
Orientadora

_____

Profa. Dra. Letícia Nogueira da Gama de Souza Bautz
Universidade Federal do Espírito Santo - UFES

_____

Profa. Dra. Danielle Resende Camisasca Barroso
Universidade Federal Fluminense - UFF

A Lucas e João Pedro, presentes de Deus,
que enchem minha vida de alegria.
A Joelson Márcio, companheiro incondicional.

AGRADECIMENTOS

A Deus, por me dar forças diariamente para acreditar que suportaria todos os obstáculos.

Aos meus filhos, Lucas e João Pedro, por terem aceitado minha ausência durante essa tarefa, que parecia infinita.

A Joelson Márcio, por seu amor, companheirismo e cumplicidade, que se alegra com minhas conquistas e me apoia nos momentos difíceis.

A minha mãezinha, pelo carinho e preocupação.

As minhas irmãs, pelo apoio; a união e a presença que me proporcionaram tranquilidade.

A cada um dos meus colegas de turma do mestrado, em suas individualidades, que me proporcionaram compreender e aceitar as diferenças como qualidades.

A todos os colegas que tive oportunidade de conviver e aprender, especialmente Lívia e Wanessa.

Aos amigos de turma Christina, Katiane, Luciana, Priscila, Flávia e Enzo, pelos momentos de convivência.

A amiga Ana Paula pelos momentos agradáveis.

As amigas Bruna Pereira e Rosangela pela atenção, companheirismo e incentivo.

A amiga Regina pelo desprendimento e disponibilidade em ajudar; por suas valiosas contribuições.

A professora de inglês e também amiga, Giany, que me ajudou nas traduções.

A Cristie, Luciene e Viviane, técnicos de laboratório, que sempre tão receptivos me auxiliaram durante a etapa laboratorial.

A professora Vanessa Freitas por ceder os reagentes necessários para a execução da imuno-histoquímica.

A Basílio Smuczek pela contribuição na etapa laboratorial.

Aos professores do programa de pós-graduação (mestrado): Alfredo, Ana Maria, Ana Paula, Angelo Gil, Anuar, Daniela, Aristeo, Edson, Elizabeth, Flavia, Jackeline, Juliana, Karina, Karla Corrêa, Karla Loureiro, Liliana, Maria Christina, Maria José, Raquel, Rogério, Rosana, Rossiene, Selva Guerra e Stefânia pela dedicação e pela contribuição para a melhoria do curso.

Ao Serviço de Anatomia Patológica Bucal (SAPB/UFES), as disciplinas de Estomatologia e Cirurgia Bucomaxiofacial II pelo material proveniente dos seus pacientes, bem como ao Programa de Prevenção e Diagnóstico Precoce de Câncer de Boca e Lesões de Boca.

As professoras, Karla Barcelos, Karla Loureiro, Rosa Maria e Tânia Regina que me receberam em suas disciplinas.

As professoras Karla Loureiro e Tânia Regina que participaram da minha qualificação deixando sua valiosa contribuição por meio de sugestões e críticas.

A professora Danielle Camisasca que aceitou fazer parte da comissão examinadora.

A professora Letícia, minha co-orientadora, pela acolhida, disponibilidade e indispensável colaboração no desenvolvimento da técnica laboratorial, execução da imuno-histoquímica e orientação na interpretação de resultados. Obrigada!

A professora Liliana, minha orientadora, quero externar minha gratidão, respeito, admiração e reconhecimento, pela compreensão, paciência e por partilha, de maneira tão generosa seu conhecimento; por nortear meu trabalho e por ser referência profissional para mim. Muito obrigada!

Agradecimento institucional:

A FAPES, pelo apoio financeiro concedido através de bolsa ao longo do curso.

Aos laboratórios de Biologia da matriz extacelular (USP), Laboratório das neoplasias (USP), Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins (LUCCAR/UFES) e Laboratório de Histologia Molecular e Imunoistoquímica (LHMI/UFES) por permitirem a utilização de seus equipamentos.

É graça divina começar bem.

Graça maior persistir na caminhada certa.

Mas a graça das graças é não desistir nunca.

Dom Hélder Câmara

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Quadro 1 – Critérios usados para diagnóstico dos fatores displásicos 41

Figura 1 – Fotomicrografias de alterações teciduais e citológicas empregadas na gradação da displasia epitelial de leucoplasia e no grau de diferenciação de CCE 42

Quadro 2 – Graus de displasia 43

Tabela 1 – Caracterização da amostra de leucoplasia quanto aos dados sócio-demográficos dos pacientes, hábitos apresentados, localização e grau displásico das lesões 46

Tabela 2 – Estatísticas descritivas e resultados da ANOVA da idade segundo grau de displasia da leucoplasia 47

Tabela 3 – Correlação dos dados clínicos com o grau de displasia da leucoplasia 47

Figura 2 – Fotomicrografias de leucoplasias 48

Tabela 4 – Caracterização da amostra de leucoplasia em relação aos fatores displásicos da leucoplasia 50

Tabela 5 – Correlação dos dados clínicos com Formações em gota dos casos de leucoplasia..... 51

Tabela 6 – Correlação dos dados clínicos com Mitoses superficiais dos casos de leucoplaisa 52

Tabela 7 – Correlação dos fatores displásicos e grau de displasia dos casos de leucoplasia 53

Tabela 8 – Caracterização da amostra de CCE quanto aos dados sócio-demográficos dos pacientes, hábitos apresentados, localização e grau de

diferenciação das lesões 55

Tabela 9 – Correlação dos dados clínicos com o grau de diferenciação do CCE 56

Tabela 10 – Estatísticas descritivas da idade segundo grau de diferenciação do CCE 56

Tabela 11 – Estatísticas descritivas e resultados da ANOVA da idade segundo grau de diferenciação do CCE 56

Figura 3 – Fotomicrografias de CCE orais 57

Tabela 12 – Caracterização microscópica da amostra de carcinoma de células escamosas..... 58

Tabela 13 – Correlação dos dados clínicos com estratificação epitelial irregular dos casos de carcinoma de células escamosas 59

Tabela 14 – Correlação dos fatores displásicos e grau de diferenciação dos casos de carcinoma de células escamosas 60

Gráfico 1 – Número de mitoses típicas nos diferentes graus de diferenciação do CCE 61

Gráfico 2 – Número de mitoses atípicas nos diferentes graus de diferenciação do CCE 62

Figura 1 – Fotomicrografias de imunomarcação para TIMP-1 em Leucoplasias. 87

Figura 2 – Fotomicrografias de imunomarcação para TIMP-1 em CCE Grau I 89

Figura 3 – Fotomicrografias de imunomarcação de TIMP-1 em CCE Grau II 91

Figura 4 – Fotomicrografias de Leucoplasias e de CCEs orais em coloração HE e imunomarcadas para TIMP-1 93

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

ANOVA – Análise de Variância

CAC - Carcinoma Adenóide Cístico

CCE – Carcinoma de Células Escamosas

CIS – Carcinoma *in situ*

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

DPM – Desordens Potencialmente Malignas

HE – Hematoxilina Eosina

HPV – Papilomavirus Humano

INCA – Instituto Nacional de Câncer

LVP – Leucoplasia Verrucosa Proliferativa

MMPs – Metaloproteases de Matriz

MS – Ministério da Saúde

OMS – Organização Mundial de Saúde

PROEX – Pró Reitoria de Extensão

SAPB – Serviço de Anatomia Patológica Bucal

SIEX – Sistema de Informações de Extensão

TIMP – Inibidores Teciduais de Metaloproteases

TNM – Tumor Nodo Metastase

UFES – Universidade Federal do Espírito Santo

WHO – World Health Organization

SUMÁRIO

LISTA DE ILUSTRAÇÕES 06

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS 08

RESUMO GERAL 11

ABSTRACT 12

1 INTRODUÇÃO 15

2 REVISÃO DE LITERATURA 18

2.1 Lesões cancerizáveis e potencial de malignização 18

2.2 Leucoplasia 19

2.3 Carcinoma de Células Escamosas Oral 24

2.4 Inibidores Teciduais de Metaloproteases de Matriz (TIMP) 29

3 OBJETIVOS 33

APRESENTAÇÃO DA METODOLOGIA E RESULTADOS 34

4 CAPITULO 35

4.1 Artigo 1 – Leucoplasia e Carcinoma de Células Escamosas Orais: estudo clínico e histopatológico 35

4.2 Artigo 2 – Análise da expressão de TIMP-1 em Leucoplasia e Carcinoma de Células Escamosas Orais e correlação com aspectos displásicos 77

5 REFERÊNCIAS.....70

5.1 Artigo 1.....70

5.1 Artigo 2.....101

APÊNDICE I 105

APÊNDICE II 136

ANEXO 137

RESUMO GERAL

A leucoplasia oral e o Carcinoma de Células Escamosas (CCE), neoplasia maligna mais comum na região maxilo-facial são as principais lesões no entendimento da carcinogênese oral. O estudo da transição da displasia epitelial oral para o carcinoma de células escamosas envolve não somente aspectos histopatológicos como também a presença de biomarcadores que complementam os parâmetros prognósticos dos serviços de patologia. OBJETIVO: descrever dados sócio-demográficos, exposição a fatores de risco e local da lesão nas diferentes lesões; determinar o grau de displasia e de diferenciação de leucoplasias e CCE; correlacionar aspectos displásicos com dados clínicos; avaliar o perfil da expressão de TIMP-1 nas lesões e correlacionar com fatores displásicos. MATERIAL E MÉTODOS: foram resgatados prontuários e blocos parafinados com diagnóstico de leucoplasia e CCE do Serviço de Anatomia Patológica Bucal, Curso de Odontologia da Universidade Federal do Espírito Santo (SAPB-UFES) entre 2004-2010. Para o estudo histopatológico, lâminas de HE foram analisadas para determinar o grau de displasia das leucoplasias e o grau de diferenciação dos CCEs.; foram realizados ensaio imuno-histoquímico para TIMP-1, com análise do parênquima e estroma, e as diferentes camadas do epitélio. RESULTADOS: Foram encontrados 32 casos de leucoplasia e 23 casos de CCE; a idade dos pacientes variou de 26 a 89 anos; a mucosa jugal foi o local mais acometido para leucoplasia, já para o CCE foi a língua. Nas leucoplasias, 6 casos apresentaram displasia epitelial leve, 17 displasia moderada e 9 displasia severa. Os casos de CCE, 7 foram classificados como grau I, 14 grau II e 2 grau III. Na análise histopatológica correlações representativas entre dados clínicos e microscópicos foram encontradas tanto para leucoplasias quanto para CCE. Avaliação imuno-histoquímica detectou presença de TIMP-1 em todos os casos. Na leucoplasia leve a camada basal e com hiperplasia apresentou imunomarcação intensa; na leucoplasia moderada todas as camadas do epitélio, exceto a córnea apresentaram marcação e a leucoplasia severa teve a camada espinhosa mais intensamente marcada. O CCE grau I apresentou marcação intensa em células com pleomorfismo e mitoses e menor marcação em células menos diferenciadas. No CCE grau II houve marcação em células basais com hiperplasia e na camada espinhosa, a camada parabasal não foi marcada; células menos diferenciadas não expressaram a proteína. CONCLUSÃO: para melhor entendimento da malignização e comportamento agressivo do CCE, é importante a busca por correlações entre dados clínicos, histopatológicos e moleculares. A displasia epitelial é um importante aspecto a ser analisado, enquanto que TIMP-1 pode ser uma valiosa ferramenta no estudo da carcinogênese da mucosa oral.

*PALAVRAS CHAVES: leucoplasia oral, carcinoma de células escamosas, câncer oral e inibidor tecidual de metaloproteinase-1

ABSTRACT

The oral leukoplakia, which is a potentially malignant disorder commonly found in the oral cavity and the Squamous Cell Carcinoma (SCC), the most common neoplasm in the maxillofacial region, are the main lesions in the understanding of oral carcinogenesis. The study of the transition from oral epithelial dysplasia for SCC involves not only histopathological aspects, but also the presence of biomarkers that complement the prognostic parameters of pathology services. OBJECTIVE: Describe the socio-demographic data), exposure to risk factors and site of injury in different lesions and determine the degree of dysplasia and differentiation for leukoplakia and SCC, respectively; correlate dysplastic features with clinical data; evaluate the profile of TIMP-1 expression and correlate with dysplasia. MATERIAL AND METHODS: Files of patients with the clinical and histological diagnosis of leukoplakia and SCC from 2004 to 2010 were reviewed retrospectively in the Oral Pathology Lab, Dentistry College, Federal University of Espírito Santo, Brazil. All clinical history data were obtained from those files. For histopathological study, HE slides were analyzed to determine epithelial dysplasia degree to leukoplakia and carcinoma degree. New slides were obtained and submitted to immunohistochemical assay to determine expression profile of TIMP-1. Parenchyma and stroma were evaluated, and different layers of the epithelium. RESULTS: There were 32 cases of leukoplakia and 23 cases of SCC. Patients ranged 26-77 and 42-89 years were diagnosed with leukoplakia and SCC respectively. The jugal mucosa was the most frequently site in leukoplakia, although tongue represent the main site to SCC. According to dysplasia grade, 6 cases of leukoplakia were diagnosed with mild-grade, 17 with moderate and 9 with severe-grade. In SCC cases, 7 were level I, 14 level II and 2 level III. Some representative correlation were achieved between clinical and microscopic data. In all cases was detected presence of TIMP-1 in the stroma and parenchyma. In mild leukoplakia the basal layer with hyperplasia showed intense immunostaining, on the other hand, cells with loss of polarity had lower expression. In moderate leukoplakia all epithelium layers, except the cornea, presented labeling. Spinous layer of severe leukoplakia was the most intensely marked. In SCC grade I, the deeper layer showed intense cells labeling in areas of pleomorphism and mitoses, and tumor islands the less differentiated cells were pour marked. In SCC grade II labeling was observed in basal cell and in spinous layer, however, parabasal layer was not marked. Also less differentiated cells did not express the protein. CONCLUSION: For better understanding of malignant and aggressive behavior of SCC, it is important to search for correlations between clinical, histopathological and molecular features. Epithelial dysplasia is an important aspect that sould be analyzed, whereas TIMP-1 could represent a valuable tool in other to sstudy oral mucosa carcinogenesis.

KEY WORDS: oral leukoplakia, squamous cell carcinoma, oral cancer and tissue inhibitor of metalloproteinase-1.
*Fonte: Descritores em Ciências da Saúde (DeCS)

Ficha catalográfica disponibilizada pelo Sistema Integrado de
Bibliotecas - SIBI/UFES e elaborada pelo autor

Nascimento, Susy Carmelita Pereira do, 1976-
N244l LEUCOPLASIA E CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAIS : ESTUDO CLÍNICO, HISTOPATOLÓGICO E IMUNO-HISTOQUÍMICO / Susy Carmelita Pereira do Nascimento. - 2012.
137 f. : il.

Orientadora: Liliana Aparecida Pimenta de Barros.
Coorientadora: Letícia Nogueira da Gama de Souza Bautz.
Dissertação (Mestrado em Clínica Odontológica) - Universidade Federal do Espírito Santo, Centro de Ciências da Saúde.

1. Carcinoma de células escamosas. 2. Leucoplasia. I. Barros, Liliana Aparecida Pimenta de. II. Bautz, Letícia Nogueira da Gama de Souza. III. Universidade Federal do Espírito Santo. Centro de Ciências da Saúde. IV. Título.

CDU: 616.314

---

1 INTRODUÇÃO

O câncer já foi considerado como uma doença dos países desenvolvidos, mas há quatro décadas, essa concepção mudou, e a maior parte do ônus global do câncer pode ser observada em países em desenvolvimento. A economia, segundo o INCA – Instituto Nacional de Câncer – determina sua natureza. Em países com maior recurso financeiro, predominam diferentes tipos de cânceres como o de pulmão, mama, próstata e cólon; enquanto em países de baixo e médio recurso, predominam os cânceres de estômago, fígado, cavidade oral e colo do útero (INCA, 2012).

O termo câncer é empregado para designar mais de uma centena de diferentes doenças; porém dentre as localizações selecionadas que representam a magnitude da doença e o impacto sobre a população, o câncer de boca no Brasil ocupa a 5ª posição dentre as neoplasias malignas mais frequentes em homens e a 7ª entre as mulheres, seguindo a tendência mundial. Estima-se para o ano de 2012 a ocorrência de 14.170 casos novos de câncer da cavidade oral, sendo 9.990 para o sexo masculino e 4.180 para o sexo feminino (INCA, 2012).

Esses valores são extremamente elevados e impulsionam numerosos estudos que visam ao entendimento do processo de carcinogênese, bem como à busca de mecanismos preventivos ou tratamento mais efetivos para o câncer (PEREIRA et al., 2006).

As células neoplásicas originam-se de células normais que sofreram a ação de agentes cancerígenos e que provocaram alterações permanentes no DNA – Ácido Desoxirribonucléico. A partir dessa agressão, as células que estão no ciclo celular, ou que são capazes de entrar, darão origem a clones de células transformadas (BRASILEIRO FILHO, 2004).

O câncer inicia-se por estímulos físicos, químicos ou biológicos capazes de causar um acúmulo de múltiplas mutações ao DNA celular. As mutações no desenvolvimento do câncer produzem células alteradas que não respondem aos sinais regulatórios extracelulares e/ou intracelulares normais que controlam a proliferação, diferenciação e morte celular (THOMPSON, 2012).

Os estágios clássicos do desenvolvimento do câncer são iniciação, promoção, progressão e metástase. A iniciação caracteriza-se pelo processo irreversível de mutação do DNA induzido por carcinógeno, ativação de protooncogenes em oncogenes e inibição de genes supressores de tumor, sendo dose dependente, embora sem limiar mensurável (KIGNEL et al., 2007). Na promoção, os carcinógenos secundários ou oncopromotores atuam sobre a célula induzida, incrementam a proliferação celular, podendo alterar outros mecanismos de função celular como diferenciação. A progressão refere-se à multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas. A crescente autonomia faz com que o tumor infiltre progressivamente sem reconhecer os limites anatômicos. Na metástase, as células do tumor se disseminam por vias linfáticas ou sanguíneas (THOMPSON, 2012).

Contrapondo-se à agressões, existem mecanismos naturais de defesa que variam de indivíduo para indivíduo como: integridade do sistema imunológico, a capacidade de reparo do DNA danificado por carcinógenos e a ação de enzimas responsáveis pela transformação e eliminação de substâncias cancerígenas (KIGNEL et al., 2007).

Na carcinogênese oral, esses fatores estão envolvidos, associados aos aspectos genéticos, aos fatores de risco e a avaliação microscópica das lesões precursoras do câncer bucal.

Nas desordens com potencial de malignização da mucosa oral, como leucoplasias e eritroplasias, têm sido avaliadas as alterações teciduais e citológicas que representam a presença e a severidade do grau de displasia epitelial, conforme critérios estabelecidos pela OMS – Organização Mundial de Saúde. A displasia epitelial tipicamente progride por uma sequência de lesões histopatológicas, graduadas em leve, moderada e severa, além do carcinoma *in situ*, para finalmente, um câncer invasivo (GALES et al., 2005).

Porém, a classificação recomendada pela OMS para a displasia epitelial oral apresenta limitações e inconsistências com níveis de variações inter e intra-observadores (SHIMAMAURA et al., 2011). Para Tilakaratne e colaboradores (2011), a avaliação da displasia epitelial para predizer a transformação maligna de lesões permanece problemática em muitos tecidos, por causa dos sistemas de gradação que são pobremente estruturados com características individuais pouco

definidas. Características histológicas individuais são requeridas para aumentar o valor de prognóstico das lesões com potencial de malignização devendo ser correlacionadas com características clínicas e etiopatogenéticas.

Apesar do enorme progresso no campo da biologia molecular, não há ainda um marcador único que possa, de forma confiável, prever a transformação de uma desordem potencialmente maligna da mucosa oral para um câncer, conforme Van Der Wall (2010).

A análise do valor prognóstico da expressão de proteínas no processo de carcinogênese desponta continuamente na literatura e promete complementar os parâmetros prognósticos convencionais utilizados atualmente, podendo oferecer maior acurácia propedêutica, melhor eficácia terapêutica e expectativas prognósticas mais realistas.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Lesões cancerizáveis e potencial de malignização

A OMS em 1978 propôs que a apresentação clínica da cavidade oral reconhecida como pré-câncer fosse classificada em dois grandes grupos de lesões e condições cancerizáveis. Sendo consideradas lesões cancerizáveis as alterações do tecido em que o câncer oral é mais provável de ocorrer do que na contraparte aparentemente normal, representada pela leucoplasia, eritroplasia e lesão palatal de fumo reverso; e, as condições cancerizáveis, um estado generalizado com significativo aumento de risco de câncer, representada pela fibrose submucosa, queratose actínica, líquen plano e lúpus eritematoso discóide (WARNAKULASURYIA et al, 2007).

No entanto, recentemente foram publicados diversos artigos expressando a opinião de um grupo de especialistas reunido no ano de 2005 pelo WHO – World Health Organization - Collaborating Centre for Oral Cancer and Precancer, no Reino Unido, sobre questões relacionadas à terminologia, definição e classificação das lesões pré-malignas de boca. Definiu-se que a nomenclatura mais adequada seria desordens potencialmente malignas (DPM) e que não haveria mais distinção entre lesões e condições (NAPIER e SPEIGHT, 2008; WARNAKULASURIYA et al., 2007).

Dentre as principais lesões orais consideradas como lesões epiteliais precursoras (ou desordens potencialmente malignas) do câncer de boca estão as leucoplasias, as eritroplasias ou uma associação desses dois tipos de lesão, conhecida como eritroleucoplasia ou leucoplasia salpicada, além de queilite actínica e da leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP) (VAN DER WALL, 2009; WARNAKULASURIYA et al., 2007).

O diagnóstico das DPM consiste na identificação clínica e avaliação microscópica a partir da remoção cirúrgica de parte (biópsia incisional) ou toda a lesão (excisional), com a definição do grau de displasia. (PARISE JR, 2000; WARNAKULASURIYA et al., 2008).

O risco de transformação maligna das lesões com algum grau de displasia epitelial tem sido registrado entre 6,6% e 36,4%, embora Mehanna e colaboradores (2009),

numa recente meta-análise apresentaram uma taxa média de 12,1% e o grau histológico afetou significantemente essa média.

Na discussão dos fatores de risco associados com aumento da transformação maligna das DPM para carcinoma de células escamosas (CCE) Van Der Wall (2010) relaciona gênero feminino, longa duração da lesão, leucoplasia idiopática, subáreas da língua e soalho de boca, tamanho, aparência não homogênea, alto grau de displasia, subtipo verrucoso e a presença de múltiplas lesões como fatores estatisticamente reconhecidos no processo da carcinogênese oral. Dentre esses fatores, destaca que a presença da displasia epitelial, frequentemente correlacionado com a forma clínica não-homogênea é o mais importante indicador de potencial de malignização.

Ho e colaboradores (2012) recrutaram pacientes com displasia epitelial oral para um estudo longitudinal observacional com registros clínicos, histopatológicos e fatores de risco; 91 pacientes foram incluídos, com acompanhamento médio de 48 meses, 22% dos pacientes sofreram transformação maligna dentro dos 5 anos com fortes preditivos de acordo com análise univariável: não fumante, aparência clínica, subárea e alto grau da displasia. Gênero, idade, número de lesões e histórico de álcool não foram predictores significantes de transformação maligna nesse estudo.

2. 2 Leucoplasia

Segundo Grinspan (1973), o termo “leucoplasia” foi utilizado pela primeira vez por Schwimmer, em 1877, para caracterizar lesões brancas da mucosa bucal sem causa definida. Desde então, esta denominação foi ampla e irrestritamente adotada, causando controvérsias. Em 1978, a OMS definiu-a como uma mancha ou placa branca da mucosa bucal, não removível à raspagem, que não pode ser caracterizada clínica ou patologicamente como outra enfermidade (RODRIGUES et al., 2000). De acordo com Warnakulasuriya e colaboradores (2007), o termo leucoplasia deve ser usado para identificar placa branca de risco questionável após excluir outras doenças conhecidas ou desordens que não apresentam risco para o câncer.

A leucoplasia é a lesão cancerizável mais frequente da cavidade oral, afetando 0,2%, a 4,9% da população mundial (VAN DER WALL et al., 1997), entretanto esses valores podem variar de uma localidade para outra, dependendo da cultura e hábitos de cada população.

A taxa de prevalência mundial varia entre 1% e 5%, dependendo do país de origem, da natureza da população investigada, do padrão do uso de tabaco e da definição da leucoplasia, considerando a variação dos critérios clínicos adotados (NAPIER e SPEIGHT, 2008).

Embora certa proporção seja de natureza idiopática, a leucoplasia apresenta de forma geral fatores etiogênicos bem conhecidos, estando fortemente relacionada ao uso do tabaco (NAPIER e SPEIGHT, 2008) à associação do tabaco com o álcool, exposição à radiação ultravioleta, microorganismos e traumas (VAN DER WALL et at., 1997). O risco de leucoplasia é de 4-5 vezes maior em fumantes do que em não fumantes (FREITAS et al., 2006).

A relação do tabaco com a etiologia da leucoplasia encontra suporte nos estudos de acompanhamento a pacientes em abstinência quando foram observados o desaparecimento ou regressão das lesões (NAPIER e SPEIGHT, 2008).

Warnakulasuriya e colaboradores (2007) citam um diagrama esquemático com os passos para o diagnóstico da leucoplasia oral, tornando a biópsia um procedimento obrigatório, a fim de que outras lesões não sejam classificadas erroneamente como leucoplasia.

O processo de diagnóstico da leucoplasia é um tanto complexo, não só pela diversidade de seu aspecto clínico, mas também pela ausência de sintomatologia (RODRIGUES et al., 2000). Torna-se necessário a exclusão de outras lesões como queimaduras, líquen plano, candidíase pseudomembranosa, linha alba, candidíase hiperplásica, hiperceratose focal, lesão por galvanismo, leucoedema, reações liquenóides, lupus eritematoso, *morsicatio buccarum*, trauma crônico, papiloma, carcinoma espinocelular, placa mucosa sifilítica, carcinoma verrucoso e nevo branco esponjoso (VAN DER WAAL et al., 1997; WARNAKULASURIYA et al., 2007) que também apresentam aspecto esbranquiçado.

Clinicamente a leucoplasia apresenta-se dividida em dois tipos: homogênea e não-homogênea (eritroleucoplasias); tendo alguma influência sobre o prognóstico. Lesões homogêneas possuem risco de transformação maligna relativamente baixa; enquanto as lesões não homogêneas apresentam um risco maior de transformação maligna e frequentemente revelam displasia avançada (WARNAKULASURIYA et al*.,* 2007*).* Valores de prevalência de eritroplasia estão disponíveis a partir de estudos realizados no sul e sudeste da Ásia e variam entre 0,02% e 0,83% (VAN DER WALL, 2009). Para Van Der Wall (2010), estima-se uma taxa de transformação maligna anual de aproximadamente 1% para todos os tipos de leucoplasias.

A leucoplasia verrucosa é um tipo de leucoplasia não-homogênea, que geralmente exibe uma aparência uniforme branco, de textura verrucosa e uma alta taxa de transformação maligna, de acordo com Van Der Wall (2010).

Leucoplasia é um termo clínico e a lesão não tem histologia específica, pode apresentar atrofia ou hiperplasia do epitélio e pode ou não demonstrar displasia epitelial, (WARNAKULASURIYA et al., 2007) em graus de severidades diferenciados (RODRIGUES et al., 2000). O padrão comportamental é variável, mas com considerável tendência para transformação maligna (WARNAKULASURIYA et al., 2007).

As lesões leucoplásicas são microscopicamente caracterizadas por uma camada de ceratina mais espessa no epitélio superficial (hiperceratose), com ou sem camada espinhosa mais espessa (acantose), apresentando ou não displasia (NEVILLE et al., 2008).

Com relação aos aspectos histopatológicos, diferentes características podem ser observadas na leucoplasia. A presença de áreas displásicas no epitélio oral está associada à provável evolução para um carcinoma de células escamosas. (WARNAKULASURIYA et al*.,* 2008). O termo displasia pode ser aplicado para as alterações da arquitetura tecidual e atipia celular; histologicamente, uma distinção pode ser feita entre epitélio displásico e não displásico (VAN DER WALL, 2010). A classificação da displasia epitelial, portanto, depende da avaliação dessas alterações.

A graduação da displasia tem sido o método padrão para determinação da presença das desordens potencialmente malignas e o risco para desenvolver o câncer. Porém essa graduação é subjetiva e de difícil reprodutibilidade. Sendo assim, recentemente tem sido apresentados marcadores moleculares promissores na avaliação do risco de desenvolver o câncer (TABOR et al., 2003; SHARMA; HOSMANI; TIWARI, 2010).

As lesões epiteliais precursoras do carcinoma de células escamosas, especialmente as leucoplasias, são classificadas pela OMS segundo a presença e a severidade da displasia epitelial baseada nas características arquiteturais teciduais e citológicas em: hiperceratose e acantose, displasia leve, moderada e severa e carcinoma *in situ* (CIS) (GALE et al., 2005; NEVILLE et al., 2008).

A avaliação histopatológica baseada na morfologia permanece o método de rotina para o diagnóstico e graduação da displasia. Novas propostas de classificações histopatológicas têm sido sugeridas, recentemente uma classificação binária foi apresentada com intuito de diminuir a subjetividade e aumentar a concordância entre patologistas (KUJAN et al., 2007).

Kujan e colaboradores (2006) propuseram um novo sistema de graduação baseado nos critérios usados pela classificação da OMS de 2005 (alterações arquiteturais e citológicas) com base na pontuação dos critérios. A classificação de lesões em de alto risco foi baseada na observação de no mínimo 4 mudanças arquiteturais e 5 citológicas; as lesões em baixo risco foram associadas a menos que 4 alterações arquiteturais ou menos do que 5 alterações citológicas. O sistema binário demonstrou especificidade e sensibilidade, sendo que a classificação em apenas duas classes(alto e baixo risco) pode aumentar a probabilidade de concordância entre avaliações.

Liu e colaboradores (2011) avaliaram 138 pacientes com diagnóstico histológico de displasia oral, sendo 115 casos de leucoplasia displásica e 23 líquen plano displásico, com acompanhamento médio de 5,1 anos, utilizando o sistema binário de graduação da displasia proposto por Kujan e colaboradores (2006), e observaram que 37 casos de displasia (26,8%) desenvolveram para o câncer num período de 4,6 anos, revelando que em lesões com alto grau de displasia o risco de transformação foi 2,78 vezes maior quando comparado com lesões com baixo grau de displasia. No entanto,

a significância biológica desse sistema ainda precisa ser investigada para se explorar o valor preditivo para o risco de transformação maligna.

Pereira e colaboradores (2011), num estudo retrospectivo, avaliaram a correlação entre as características clínicas e histológicas de 173 casos de displasia epitelial oral; 62,4% apresentaram grau de displasia leve, 28,9% moderada e apenas 8,7% severa; quanto às características clínicas, 57,9% eram do sexo feminino; 64,8% da raça branca e mais da metade dos pacientes eram fumantes (54,1%) e o uso do tabaco foi relacionado com todos os graus de displasias. O rebordo alveolar/gengiva foi o local mais acometido (24,4%); a displasia epitelial severa ocorreu mais em lesões localizadas na língua (26,7%) e assoalho de boca (20%), porém não houve associação estatisticamente significante ($p>0.05$) entre o local da lesão e o grau de displasia.

Quanto a idade, sexo e localização da lesão, as desordens potencialmente malignas dependem da etnia, do hábito de uso do tabaco e das vias de seleção da amostra estudada. Nos países desenvolvidos leucoplasias são usualmente encontradas na meia-idade e idosos, a maioria ocorrendo entre a quarta e a sétima década de vida; nos países em desenvolvimento pode acontecer de 5 a 10 anos antes. Homens são predominantemente afetados, mas as mulheres não estão isentas (NAPIER e SPEIGHT, 2008).

As DPM podem ser localizadas em qualquer parte da mucosa oral e geralmente o local da leucoplasia está relacionado ao tipo de uso do tabaco. O tipo de tabaco usado influencia na distribuição das lesões: o uso reverso de cigarro causa lesões no palato duro, enquanto tabaco mascado e charutos estão associados com leucoplasias do assoalho da boca (NAPIER e SPEIGHT, 2008).

Apesar da incontestável importância no carcinoma de células escamosas, há incerteza quanto ao papel do álcool na etiologia das DPM; tendo relação positiva com a frequência e duração do consumo de álcool, independente do tabaco, mas com efeito sinérgico (NAPIER e SPEIGHT, 2008).

2.3 Carcinoma de Células Escamosas Oral

O câncer de boca é o câncer mais comum da região de cabeça e pescoço excluindo-se o câncer de pele (Condutas do INCA/MS, 2001).

O Carcinoma de Células Escamosas representa o tipo mais frequente de neoplasia maligna da cavidade oral e orofaringe, sendo responsável por 90% de todos os tumores malignos da cavidade oral (BARNES et al., 2005).

O CCE, também denominado de carcinoma epidermóide ou carcinoma espinocelular, apresenta causa multifatorial; ou seja, não há um agente ou fator causador isolado, mas fatores extrínsecos como fumo, álcool, sífilis, exposição solar e fatores intrínsecos incluindo estados sistêmicos como desnutrição geral (NEVILLE et al., 2008; SCULLY e BAGAN, 2009).

Muitas doenças observadas na senescência têm patogênese associada com o declínio da resposta imunológica e da capacidade de reparo a danos do DNA, sendo um fator observado na carcinogênese. O DNA é uma molécula complexa de estabilidade limitada que requer a integridade para sua correta funcionalidade; porém, sofre continuamente danos endógenos e exógenos, tanto por atividades metabólicas normais quanto por fatores ambientais. A quantidade de danos de DNA acumula-se de tal forma que se sobrepõe a capacidade de reparo. Esses danos acumulados ao longo da vida podem alterar sua estrutura e podem alterar o resultado da transcrição gênica (DORIA e FRASCA, 2001).

Embora muitos indivíduos estejam expostos a fatores como consumo combinado de álcool e fumo, somente parte desenvolve câncer, sugerindo que diferenças genéticas individuais influenciam a carcinogênese (COLOMBO e RAHAL, 2009).

Estudos citogenéticos moleculares têm evidenciado várias regiões cromossômicas alteradas nos tumores de cabeça e pescoço, tais como: perdas, ganhos cromossômicos, alterações estruturais como isocromossomos, deleções, ativação de oncogenes e inativação de genes supressores de tumor (COLOMBO e RAHAL, 2009) que poderão alterar o perfil de expressão gênica.

O papel do tabaco e do álcool na etiopatogenia do câncer oral tem sido exaustivamente pesquisado em inúmeros trabalhos que mostram o aumento de risco para a doença com os hábitos de beber e/ou fumar (ABDO et al., 2002).

No Brasil, país considerado em desenvolvimento, principalmente, na área da saúde pública, é comum o uso do tabaco com filtro; a fumaça do tabaco contém mais de 4.000 componentes já identificados sendo que há mais de 70 carcinógenos conhecidos. As principais classes de carcinógenos na fumaça do tabaco são os hidrocarbonos policíclicos (como benzopireno), as nitrosaminas e as aminas aromáticas (THOMSON, 2012). Além de substâncias químicas utilizadas durante a lavoura e processamento, como pesticidas e elementos radioativos, agrotóxicos considerados carcinogênicos.

É indiscutível a ação irritativa local do etanol e seus metabólitos pelo contato direto com a mucosa oral, estimulando a proliferação celular, o poder desidratante e solvente do álcool facilitando a entrada e a ação agressora de outras substâncias como aquelas provenientes do tabaco (KIGNEL et al., 2007).

Segundo Carrard e colaboradores (2008), diante do consumo crônico de álcool há um aumento da proliferação celular nas camadas mais profundas do tecido epitelial em resposta adaptativa e de maneira compensatória ao aumento da morte celular nas camadas mais externas, a fim de que seja mantida a homeostase e a integridade do tecido epitelial, porém essa proliferação poderia favorecer uma maior ocorrência de mutações e danos cumulativos, levando ao desenvolvimento do câncer.

Além disso, os efeitos indiretos provocados pelo álcool, em especial o imunossupressor e o nutricional, consequente da cirrose hepática e subnutrição, se refletem na constitucionalidade dos tecidos deixando-os mais frágeis e vulneráveis às ações dos carcinógenos (KIGNEL et al., 2007).

Quanto à localização das lesões, a cavidade oral está anatomicamente dividida nas seguintes áreas: lábio, 2/3 anteriores da língua, assoalho de boca, mucosa jugal, gengiva inferior, gengiva superior, área retromolar e palato duro (Condutas do INCA/MS, 2001). Porém, os tumores podem surgir em qualquer parte da cavidade

oral e os locais mais comuns variam geograficamente refletindo fatores de risco diferentes (BARNES et al., 2005), podendo acometer mais de um sítio.

Tem sido reconhecido que pacientes com câncer oral estão em risco de desenvolverem segundo tumor no trato aerodigestivo superior; tem sido relatada a ocorrência em 10-35% dos casos. Estes podem ser sincrômicos com o tumor índice ou, se ocorrendo após um intervalo de mais de seis meses são descritos como metacrômicos (BARNES et al., 2005).

O conceito de campo de cancerização foi proposto por Slaughter e colaboradores em 1953 para referir-se à lesões multifocais devido a exposição da mucosa aos carcinógenos. Esses pacientes podem representar um grupo distinto em relação à suscetibilidade genética e à apresentação da doença (ANGADI, 2012; GE, 2010; THOMSON e HAMADAH, 2007).

A apresentação clínica varia de lesão exofítica, endofítica, leucoplásica, eritroplásica e leucoeritroplásica. Segundo Neville e colaboradores (2008), o local mais acometido por esta lesão é a língua, seguido de assoalho de boca, palato mole, gengiva e mucosa jugal. Todavia, para Gutman e colaboradores (2004), a língua é o segundo local mais comum de câncer da cavidade oral.

Microscopicamente, observam-se alterações teciduais e citológicas do epitélio como perda da estratificação, pleomorfismo celular e nuclear, mitoses atípicas, perólas córneas, perda da adesão celular, além de ilhas e cordões invasivos de células escamosas epiteliais através da membrana basal para o interior do tecido conjuntivo subepitelial (NEVILLE et al., 2008).

O CCE é uma neoplasia epitelial invasiva com vários graus de diferenciação escamosa e propensão para precoce e extensa metástase linfonodal (BARNES et al., 2005).

A literatura apresenta diversas classificações histopatológicas para os CCEs da cavidade oral que surgiram na tentativa de explicar o comportamento biológico discrepante de tumores com características clínicas semelhantes (LOURENÇO et al., 2007).

A classificação do grau de diferenciação dos carcinomas de células escamosos baseada no Sistema de Classificação Histopatológica preconizado pela OMS, segundo Wahi (1971):

Grau 1 – Bem diferenciado: características citológicas e histológicas semelhantes ao revestimento epitelial escamoso da mucosa oral. Numerosas pérolas córneas, importante ceratinização celular com pontes intercelulares, menos de 2 mitoses por campo histológico, observando-se em maior aumento, raras mitoses atípicas e escassas células gigantes multinucleadas, pleomorfismo celular e nuclear muito reduzido.

Grau 2 – Moderadamente diferenciado: neoplasma com características intermediárias entre o grau bem diferenciado (1) e o grau pouco diferenciado (3). Pérolas córneas escassas ou ausentes, ceratinização celular e pontes intercelulares aparentes, 2-4 mitoses por campo histológico, algumas mitoses atípicas, moderado pleomorfismo celular e nuclear, escassas células gigantes multinucleadas.

Grau 3 – Pouco diferenciado ou indiferenciado: histologicamente e citologicamente há apenas uma mínima semelhança com o epitélio escamoso estratificado normal da mucosa oral. Raras pérolas córneas, ceratinização celular quase inexistente e ausência de pontes intercelulares, mais de 4 mitoses por campo histológico, frequentes mitoses atípicas, pleomorfismo celular e nuclear pronunciado, frequentes células gigantes multinucleadas.

Porém, não há na literatura consenso sobre a classificação histopatológica que possua maior poder preditivo. A validação dessas graduações deve ser buscada, através da aplicação dessas classificações histopatológicas do CCE da cavidade oral em diferentes centros hospitalares (LOURENÇO et al., 2007).

Costa e colaboradores em 2005 realizaram um estudo retrospectivo de 38 casos de carcinoma de células escamosas orais e correlacionaram a classificação clínica Tumor Nodo Metástase (TNM) com as características histopatológicas (grau de queratinização, pleomorfismo nuclear, padrão de invasão e infiltrado linfoplasmocitário e os escores histológicos de malignidade nas margens mais profundas da lesão) e encontraram correlação estatisticamente significante do

estadiamento clínico TNM com os escores histológicos de malignidade e com os parâmetros histológicos isolados como pleomorfismo nuclear, e ainda entre infiltrado linfoplasmocitário e pleomorfismo nuclear.

Coaracy e colaboradores (2008), numa análise retrospectiva de 90 casos com diagnóstico histopatológico de CCE oral, investigaram a existência de relação entre a classificação clínica TNM e a graduação histológica de malignidade desenvolvida por Wahi (1971) e revelou não haver correlação entre a classificação clinica TNM e grau histológico de malignidade. No entanto houve correlação significativa entre o parâmetro clínico T (tamanho do tumor).

Além de fatores de risco clássicos do câncer bucal, ou seja, álcool e tabaco, outros fatores, tanto infecciosos e ambientais são ponderados por estar associados ao desenvolvimento de malignidade oral. A má higiene oral, doença periodontal, candidíase crônica, papilomavírus humano (HPV) parecem estar associados com o câncer, porém os mecanismos envolvidos são desconhecidos (MEURMAN, 2010).

As infecções podem desencadear proliferação celular, apoptose, interferir com o mecanismo de sinalização, ativando oncogenes. Além disso, vários microrganismos orais metabolizam o álcool, convertendo-o em acetaldeído, o qual é cancerígeno, explicando a associação entre má higiene, consumo de álcool e carcinogênese (MEURMAN, 2010).

Infecção por HPV especialmente os genótipos de conhecido elevado potencial oncogênico HPV 16 e 18 são encontrados em proporção variável, sendo pequena na cavidade oral e até 50% em CCE da orofaringe, tonsilas e amígdala. Estudos recentes sugerem que o HPV pode ser responsável por uma pequena fração de câncer oral e até 40% de orofaringe (BARNES et al., 2005). A ação do HPV 16 e 18 está associada às oncoproteínas E6 e E7 que agem sequestrando, degradando e inativando proteínas supressoras do tumor como p53 e a pRb, respectivamente (KIGNEL et al., 2007).

Quanto a fatores dietéticos acredita-se que a dieta do mediterrâneo, rica em frutas e vegetais, possa reduzir o risco de câncer oral, mas a evidência é fraca, visto que o efeito dos componentes individuais de alimentos permanece desconhecido. Este conceito baseia-se em estudos epidemiológicos. Por outro lado, tem sido sugerido

que a ausência ou deficiência de ácido fólico e ferro possa aumentar o risco de câncer oral (MEURMAN, 2010).

Marchioni e colaboradores (2007) verificaram associações inversas entre o câncer oral e o consumo mais elevado de feijão, vegetais crus, arroz e massas, alimentos básicos da dieta brasileira que emergiram como fatores de proteção para o câncer, independente de outros fatores de risco; enquanto associações diretas foram observadas para o elevado consumo de ovos, batata e leite.

O efeito protetor de dietas ricas em elementos e vitaminas antioxidantes é bem demonstrado em muitos países, especialmente, estudos italianos (BARNES et al., 2005). As vitaminas A, C e betacaroteno são substâncias capazes de quebrar radicais livres, por isso é recomendado o consumo de verduras e frutas cítricas na prevenção do câncer (KIGNEL et al., 2007).

O excesso, a falta ou defeito no metabolismo de qualquer nutriente pode levar a alterações constitucionais dos tecidos deixando-os mais suscetíveis à ação dos carcinógenos (KIGNEL et al., 2007).

2.4 Inibidores Teciduais de Metaloproteases de Matriz (TIMP)

As metaloproteases de matriz (MMPs) formam a subfamíla das matrixinas, que possui mais de 20 endopeptidases dependentes de Zn^{2+} e capazes de degradar diversos componentes da matriz extracelular (PAGE-MCCAW et al., 2007; RUNDHAUG, 2005; STAMENKOVIC, 2003). Elas são subdivididas em matrilisinas, colagenases, gelatinases, estromelisinas e metaloprotease de matriz tipo membrana (MT-MMPs) (LYNCH e MATRISIAN, 2002; MCCAWLEY e MATRISIAN, 2001).

A subclasse de MMPs com estrutura mais simples é a matrilisina com sítio para ligação com o zinco (LYNCH e MATRISIAN, 2002; MCCAWLEY e MATRISIAN, 2001; RUNDHAUG, 2005; STAMENKOVIC, 2003). Nas colagenases existe um domínio que forma uma estrutura a qual permite clivagem, distorção ou abertura dos colágenos fibrilares para que então, o domínio catalítico da enzima possa clivar a molécula (RUNDHAUG, 2005). Essas enzimas degradam colágeno tipo I, II, III (colágenos intersticiais) e outras fibrilas de colágeno (MADSEN et al., 2007;

NYBERG et al., 2003). Já as estromelisinas possuem um amplo espectro de substratos específicos, sendo capazes de degradar proteoglicanos, fibronectina e laminina (NAGASE e WOESSNER, 1999; RUNDHAUG, 2005).

As gelatinases interagem com colágeno tipo IV (presente na membrana basal), V, VII e X, além de fibronectina, elastina e laminina. Há dois tipos pertencentes a essa família: gelatinase A (MMP-2) e gelatinase B (MMP-9). A MMP-9 é secretada por células epiteliais e estocada em grânulos secretórios de neutrófilos e eosinófilos, sendo induzida e controlada por fatores de crescimento, quimiocinas e outros estimuladores. Já a MMP-2 é expressa por vários tipos celulares, especialmente pelos fibroblastos e sua secreção é constitutiva (BJORKLUND e KOIVUNEN, 2005; MCCAWLEY e MATRISIAN, 2001; NAGASE e WOESSNER, 1999; RUNDHAUG, 2005).

O quinto principal subgrupo de MMPs é formado por MMPs tipo membrana (MT-MMPs). Estão ligadas à superfície celular através do domínio transmembrana e degradam gelatina, fibronectina e agrecan, além de outros substratos da matriz extracelular (LEE e MURPHY, 2004; RUNDHAUG, 2005; VIHINEN e KAHARI, 2002).

A atividade das MMPs deve ser controlada justamente para se evitar danos teciduais indesejáveis. Esse controle acontece ao menos em três níveis: transcrição, ativação proteolítica, e inibição da atividade enzimática por inibidores naturais. Os maiores inibidores fisiológicos das MMPs são a α2 macroglobulina, e a família das inibidoras teciduais de metaloproteinases, conhecidas como TIMPs (WOESSNER, 2001; 2002). Estas se ligam de forma não covalente às MMPs ativas para inibi-las. Existem 4 tipos de TIMPS: TIMP-1, TIMP-2, TIMP-3 e TIMP-4, sendo a última a mais recentemente descoberta. As TIMPs são produzidas por uma variedade de tipos celulares tais como fibroblastos, queratinócitos, células endoteliais e osteoblastos (WOESSNER, 2001; 2002). Essas enzimas são consideradas proteínas multifuncionais, pois atuam inibindo desde a invasão celular *in vitro,* quanto a supressão de angiogênese, tumorigênese, invasão tumoral e metástase *in vivo* (VICENTE et al., 2005).

Apesar de cada TIMP ser capaz de inibir diversas MMPs, já foi observado que existe uma capacidade inibitória preferencial. Dessa forma, TIMP-1 inibe preferencialmente

a MMP-7, MMP-9, MMP-1 e MMP-3; enquanto que TIMP-2 é inibidor eficaz de MMP-2. TIMP-3 pode inibir a MMP-2 e MMP-9, enquanto que TIMP-4 inibe a MT1-MMP e MMP-2 atividade catalítica (BOURBOULIA; STETLER-STEVENSON, 2010).

Fator relevante é que atividades de MMPs têm sido implicadas no crescimento do tumor, invasão e metástase. Entre as várias MMPs envolvidas na tumorigênese, a MMP-2 e a MMP-9 têm se destacado. Suas expressões aumentadas já foram observadas em várias neoplasias, como de mama, colo do útero, pulmão, pele, ovário e próstata (EGEBLAD e WERB, 2002). Essas enzimas foram relacionadas com espraiamento celular e mudanças no citoesqueleto durante a migração, além disso, o aumento na expressão parece desestabilizar as adesões focais (BJORKLUND e KOIVUNEN, 2005). Já foi demonstrado também que células derivadas de carcinoma adenóide cístico humano (CAC2), quando cultivadas na presença de componentes da matriz extracelular, tiveram aumento na secreção de MMP-2 e MMP-9, e esse aumento foi relacionado com atividade invasiva (FREITAS et al., 2007; GAMA-DE-SOUZA et al., 2008).

Com relação ao CCE, pesquisas anteriores também ressaltaram o papel de diferentes MMPs na tumorigênese. Nessa lesão, presença de MMP-9 já foi relacionada com o prognóstico. Pacientes que apresentaram imunomarcação negativa para essa enzima estavam livre de recidiva após 5 anos de acompanhamento (RUOKOLAINEN, PÄÄKKÖ, TURPENNIEMI-HUJANEM 2004).
Outro aspecto foi associação significante entre MMP-9 e o grau de diferenciação, estágio do tumor, e ingestão de álcool (VICENTE et al., 2005). Por fim, a presença dessa enzima parece sofrer variação de acordo com o sítio acometido, sendo mais expressa em lesões localizadas na língua quando em comparação com lábio inferior (BARROS et al., 2011).

Se por um lado as MMPs já foram bastante descritas quanto ao papel relevante em diferentes neoplasias, em particular a MMP-9, suas enzimas reguladoras, TIMPs-1 e 3, ainda são alvos de muitas discussões. Isso se deve principalmente por ainda não existir um consenso sobre suas reais ações nos tumores. Dentro desse contexto, Baker e colaboradores (2006) compararam as concentrações de MMPs e TIMPs em 38 amostras pareadas de tecido epitelial normal e CCEs por 3 diferentes técnicas (ELISA para MMPs 1, 3 e TIMPs 1, 2); atividade de gelatinase total e

endógena (para MMPs 2, 9) e fluorescência (MMPs). Em relação às expressões de TIMPs os autores encontraram correlação entre as concentrações de TIMPs 1 e 2 e o estágio TNM, sendo maior a concentração de TIMP-1 em tumores sem metástase regional. Portanto, o estudo concluiu que concentrações elevadas de TIMPs tiveram uma ação protetora contra a agressão de CCEs.

Já Guttman e colaboradores (2004) avaliaram a expressão de MMPs, seus inibidores e fatores angiogênicos (fator-8 e CD-34) em células derivadas de CCEs. Na análise, os pesquisadores correlacionaram os achados com as características clinicopatológicas e evolução da doença em 23 pacientes com lesão na língua. Foi observado que expressões elevadas, tanto de MMP-9 quanto de TIMP-1, foram detectadas em 60,9% e 65,2% dos casos, respectivamente. Em outro estudo, Singh e colaboradores (2010) examinaram as formas pró ativa e total de MMP-2 e MMP-9 em 50 pacientes controle e 75 pacientes com diagnóstico de CCE. Também fez parte da análise a detecção dos inibidores teciduais, TIMP-1 e TIMP-2. Os resultados mostraram que tanto os níveis de proMMP-9 e MMP-9 ativa, quanto os de TIMP-1 e TIMP-2 estavam significativamente mais elevados em pacientes com CCE quando em comparação com os casos controles. Em uma análise de série de casos, Vicente e colaboradores (2005) estudaram a expressão de TIMP-1 e TIMP-2 em 68 lesões de CCE por imunohistoquímica e detectaram a expressão de TIMP-1 em 66,2% tanto no parênquima, quanto no estroma tumoral.

Os dados apresentados sugerem a ocorrência de um aumento na expressão de TIMP-1 em lesões de CCE, contudo esse aumento vem acompanhado de elevação também nos níveis da MMP-9. Outro aspecto importante é a falta de dados sobre o perfil e a topografia da expressão de TIMP-1 nessas lesões, principalmente na interface entre o parênquima-estroma tumorais e no *front invasivo*. Portanto, análises mais detalhadas da imunomarcação de TIMP-1 com o estabelecimento de correlações com fatores clínicos e histopatológicos poderão elucidar questões que ainda persistem sobre o real papel dessa importante enzima reguladora das MMPs.

3 OBJETIVOS

Geral:

- Determinar o grau de displasia das leucoplasias e de diferenciação dos CCEs, analisar a expressão de TIMP-1 dessas lesões e correlacionar dados clínicos e histopatológicos.

Específicos:

- Descrever os dados sócio-demográficos (idade, gênero, raça), exposição a fatores de risco (tabagismo e alcoolismo) e local da lesão;
- Correlacionar os dados clínicos com os aspectos histopatológicos (grau de displasia e diferenciação) das lesões leucoplásicas e dos CCEs;
- Avaliar o perfil da expressão de TIMP-1 em casos de leucoplasias e CCEs classificados em diferentes graus de displasia e de diferenciação, respectivamente.

APRESENTAÇÃO DA METODOLOGIA E RESULTADOS

Artigo 1. “Leucoplasia e Carcinoma de Células Escamosas Orais: estudo clínico e histopatológico”

Artigo 2. “Análise da expressão de TIMP-1 em Leucoplasia e Carcinoma de Células Escamosas Orais e correlação com aspectos displásicos”

4 CAPÍTULO

4.1 ARTIGO 1

Leucoplasia e Carcinoma de Células Escamosas Orais: estudo clínico e histopatológico

RESUMO

A leucoplasia oral, desordem potencialmente maligna mais frequente na boca, e o Carcinoma de Células Escamosas (CCE), neoplasia maligna mais comum na região maxilo-facial, são as principais lesões no entendimento da carcinogênese oral. Apesar de certas características clínicas e histopatológicas compartilhadas, existem aspectos importantes e particulares na malignização da leucoplasia. OBJETIVO: determinar o grau de displasia e de diferenciação de leucoplasias e CCE, respectivamente. Correlacionar fatores displásicos com dados clínicos dos pacientes e das lesões. MATERIAL E MÉTODOS: foram resgatados prontuários com diagnóstico de leucoplasia e CCE do Serviço de Anatomia Patológica Bucal, Curso de Odontologia da Universidade Federal do Espírito Santo (SAPB-UFES) entre 2004-2010. Os dados clínicos foram levantados e para o estudo histopatológico, lâminas de HE foram analisadas para determinar o grau de displasia das leucoplasias e o grau de diferenciação dos CCEs. RESULTADOS: foram encontrados 32 casos de leucoplasia e 23 casos de CCE. A idade dos pacientes variou de 26 a 77 e, 42 a 89 anos para leucoplasia e CCE, respectivamente. A mucosa jugal foi o local mais acometido para leucoplasia, já para o CCE foi a língua. Dos 32 pacientes, 17 eram tabagistas e o consumo de álcool foi relatado por 15,6%. Nas leucoplasias, 6 casos apresentaram displasia epitelial leve, 17 displasia moderada e 9 displasia severa. Nos casos de CCE, 7 foram grau I, 14 grau II e 2 grau III. Algumas correlações representativas foram encontradas, como entre alcoolismo e formação em gota; gênero e mitoses superficiais anormais; grau de displasia e formação em gota e outros para a leucoplasia. Nos casos de CCE, houve significância entre raça e estratificação epitelial irregular; grau de diferenciação e estratificação epitelial irregular; pérolas córneas e grau de diferenciação. CONCLUSÃO: para melhor entendimento da malignização e comportamento

agressivo do CCE, é importante a busca por correlações entre dados clínicos e histopatológicos. Ainda, o estudo da displasia epitelial representa importante ferramenta para um melhor diagnóstico e definição do prognóstico.

*__PALAVRAS CHAVES:__ leucoplasia oral; carcinoma de células escamosas; câncer oral.

*Fonte: Descritores em Ciências da Saúde (DeCS)

ABSTRACT

The oral leukoplakia, which is a potentially malignant disorder commonly found in the oral cavity and the Squamous Cell Carcinoma (SCC), the most common neoplasm in the maxillofacial region, are the main lesions in the understanding of oral carcinogenesis. Despite some clinical and histopathological features shared by both lesions, there are important and particular aspects involved in leukoplakia malignization. OBJECTIVE: determine dysplasia and differentiation degrees of leukoplakia and SCC respectively. Correlate the dysplastic factor with clinical data of the patients. MATERIAL AND METHODS: Files of patients with the clinical and histological diagnosis of leukoplakia and SCC from 2004 to 2010 were reviewed retrospectively in the Oral Pathology Lab, Dentistry College, Federal University of Espírito Santo, Brazil. All clinical history data were obtained from those files. For histopathological study, HE slides were analyzed to determine epithelial dysplasia degree of the leukoplakia and differentiation degree of the SCC. RESULTS: There were 32 cases of leukoplakia and 23 cases of SCC. Patients ranged 26-77 and 42-89 years were diagnosed with leukoplakia and SCC respectively. The jugal mucosa was the most frequently site in leukoplakia, although tongue represent the main site to SCC. Of the 32 patients, 17 were smokers and 15.6% reported alcohol consumption. According to dysplasia grade, 6 cases of leukoplakia were diagnosed with mild-grade, 17 with moderate-grade and 9 with severe-grade. In SCC cases, 7 were level I, 14 level II and 2 level III. Some representative correlation was achieved, such as, alcohol consumption and drop shaped rete ridges; gender and abnormal superficial mitoses; level of dysplasia and drop shaped rete ridges and others in leukoplakia cases. For SCC cases significance correlation was observed between race and irregular epithelial stratification; carcinoma degree and irregular epithelial stratification; cornea pearls and carcinoma degree. CONCLUSION: to a better understanding of leukoplakia malignization and aggressive behavior of SCCs, is important to establish correlation between clinical and histopathological data. These kind of analysis, especially dysplasia degree, represent an important tool in order to provide a better diagnose.

***KEYWORDS:** oral leukoplakia, squamous cell carcinoma, oral cancer.

*Fonte: Descritores em Ciências da Saúde (DeCS)

INTRODUÇÃO

A leucoplasia oral, desordem potencialmente maligna mais frequente na cavidade oral (VAN DER WALL, 1997) e o Carcinoma de Células Escamosas (CCE), neoplasia maligna mais comum na região maxilo-facial são as principais lesões no entendimento da carcinogênese oral.

Destacam-se por apresentarem algumas características clínicas e microscópicas similares e ao mesmo tempo, diferentes e próprias que as distanciam, quanto a sua repercussão na saúde do indivíduo e na forma de abordagem profissional.

A leucoplasia está fortemente relacionada ao uso do tabaco (NAPIER & SPEIGHT, 2008) à associação do tabaco com o álcool, exposição à radiação ultravioleta, microorganismos e traumas (VAN DER WALL, 1997), embora certa proporção seja de natureza idiopática.

Com relação aos aspectos histopatológicos, diferentes características podem ser observadas na leucoplasia. A presença de áreas displásicas no epitélio oral está associada à provável evolução da lesão para um carcinoma de células escamosas. Contudo, não se pode afirmar que lesões cancerizáveis estão comprometidas à malignização (WARNAKULASURIYA et al., 2008). A classificação da displasia epitelial varia de leve a severa e depende da avaliação de diversas alterações na citologia e na arquitetura tecidual da lesão.

O diagnóstico de displasias epiteliais encontradas em desordens potencialmente malignas, como a leucoplasia, em lesões de carcinomas *in situ* e o próprio CCE é fundamental para a determinação do prognóstico e tratamento a ser estabelecido. O grau de displasia epitelial pode não ser proporcional ao risco de potencial maligno e as características clínicas devem ser avaliadas para complementar as decisões que serão direcionadas a cada caso (WARNAKULASURIYA, 2007).

Vários fatores de risco estão implicados na etiologia do CCE da cavidade oral, com papel de destaque para o uso de tabaco e consumo excessivo de álcool (NEVILLE et al., 2008).

O carcinoma de células escamosas da cavidade oral pode ocorrer em qualquer localização da boca, podendo apresentar comportamentos diferenciados de acordo com a localização (BARROS et al., 2011) sendo os locais mais acometidos a língua, o lábio inferior e o assoalho bucal. Possui maior incidência no sexo masculino e, na maioria dos casos, ocorre na faixa etária dos 60 anos (COSTA et al., 2005).

As classificações histopatológicas para o CCE oral surgiram na tentativa de explicar o comportamento biológico discrepante dos tumores com características clínicas semelhantes. Assim, a gradação histopatológica tem sido utilizada na tentativa de prever a agressividade do CCE e, portanto, estabelecer um prognóstico para o paciente ou um indicador para um tratamento mais eficaz (LOURENÇO et al., 2007).

A determinação de pontos comuns como fatores de risco, locais de acometimento, características clínicas, reforçada pelo conhecimento dos aspectos microscópicos, numa análise dos fatores displásicos, de uma amostra dessas duas lesões, leucoplasias e CCE, tenta elucidar passos da carcinogênese oral e contribui para conhecimento das particularidades de ambas e apontar os principais fatores da malignização.

Assim, o objetivo desse estudo foi avaliar o grau de displasia das leucoplasias e de diferenciação dos CCEs e correlacionar com os dados clínicos (idade, gênero, raça, tabagismo, etilismo e local da lesão) e correlacionar esses dados com os aspectos histopatológicos para a elucidação dos fatores displásicos relevantes no processo da carcinogênese.

MATERIAIS E MÉTODOS

Estudo retrospectivo fundamentado na análise dos prontuários e das lâminas histopatológicas dos pacientes registrados no Serviço de Anatomia Patológica Bucal do Curso de Odontologia da Universidade Federal do Espírito Santo (SAPB-UFES) com diagnóstico histopatológico confirmado de leucoplasia e de carcinoma de células escamosas no período compreendido entre 2004 – 2010. O SAPB-UFES tem arquivado em seu acervo: laudo(s) microscópico(s) + lâmina(s) + bloco(s)

parafinado(s) de cada paciente devidamente codificado por número e ano, seguindo a ordem de registro.

Os critérios de inclusão para a composição da amostra foram: todos os casos com os seus respectivos laudos, lâminas histopatológicas e blocos de parafina com material suficiente para obtenção de novas lâminas.

Critérios de exclusão: foram excluídos os casos em que havia laudos repetidos de um mesmo paciente e com a mesma lesão.

O presente estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa em humanos – Centro de Ciências da Saúde/UFES e aprovado com protocolo e registro número 70/10 (ANEXO).

DADOS CLÍNICOS

Os dados de identificação, sócio demográficos (faixa etária, gênero, raça), exposição à fatores de risco (consumo de tabaco e álcool) e referentes à localização das lesões foram obtidos dos laudos microscópicos e dos prontuários dos pacientes e registrados em um formulário de coleta de dados elaborado para essa pesquisa (APÊNDICE I).

AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA

Foram avaliadas lâminas histopatológicas obtidas a partir de biópsias das lesões alvos da investigação de diferentes locais da cavidade oral pertencentes ao arquivo do Serviço de Anatomia Patológica do Curso de Odontologia da Universidade Federal do Espírito Santo entre os anos e 2004 e 2010. Essas lâminas com diagnóstico microscópico de leucoplasias e carcinoma de células escamosas são provenientes de pacientes referenciados ao Programa de Prevenção e Diagnóstico Precoce de Câncer de Boca e Lesões de Boca – SIEX/PROEX, desenvolvido pelas disciplinas de Estomatologia e Cirurgia Bucomaxilofacial II do Departamento de Clínica Odontológica da UFES.

O processamento das lâminas foi realizado da seguinte maneira: os espécimes foram fixados em formaldeído a 10%, incluídos em parafina, submetidos a cortes

seriados com 5µm de espessura em micrótomo rotatório manual Leica RM2125 RT, montados em lâminas histológicas e corados pelo método Hematoxilina Eosina (HE).

ANÁLISE QUALITATIVA

A análise morfológica para identificação da presença ou ausência dos fatores displásicos e a obtenção do grau de displasia e diferenciação dos casos de leucoplasia e carcinoma, respectivamente, foi feita por um único avaliador, previamente calibrado, kappa de 0,8 utilizando microscópio óptico Olympus PROVIS AX70 (Olympus America Inc., USA) com câmera digital acoplada Zeiss AxioCam ERc5s e programa de aquisição de imagens Axio Vision Release 4.8 para registro dos achados histopatológicos. As lâminas foram previamente codificadas e a análise foi realizada à cega para o respectivo caso clínico.

Os fatores displásicos foram norteados pelos critérios adotados pela OMS (2005), que considera: 8 critérios da arquitetura tecidual e 9 das alterações citológicas (Quadro 1) ilustrados na figura 1.

Quadro 1 – Critérios usados para diagnóstico dos fatores displásicos

Arquitetura tecidual	Citológica
Formações em gota	Variação anormal do tamanho do núcleo (anisonucleose)
Estratificação epitelial irregular	Variação anormal da forma do núcleo (pleomorfismo nuclear)
Ceratinização prematura de células individuais (disceratose)	Variação anormal do tamanho da célula (anisocitose)
Pérolas córneas	Variação anormal da forma da célula (pleomorfismo celular)
Perda de polaridade das células basais	Aumento da relação núcleo-citoplasma
Hiperplasia de células basais	Células com mitoses atípicas
Aumento do número de figuras mitóticas	Aumento do número e tamanho dos nucléolos
Mitoses superficiais anormais	Hipercromatismo

Fonte: Warnakulassuriya et al., 2007

Figura 1

A classificação do grau de displasia epitelial das leucoplasias proposta para este estudo foi adaptada do sistema binário (KUJAN et al., 2006), utilizando os mesmos critérios da OMS, distribuídos numericamente e classificadas em leve, moderada e severa conforme o Quadro 2, pela quantificação dos critérios identificados na avaliação microscópica:

Quadro 2 – Graus de displasia

Grau de displasia epithelial			
	Leve	**Moderada**	**Severa**
Arquitetura tecidual	0-2	3-5	6-8
Alterações citológicas	0-3	4-5	6-9

Quando os achados numéricos dos critérios da arquitetura e das alterações citológicas avaliados posicionavam entre os graus de displasias, foi considerado o de maior grau.

A classificação do grau de diferenciação dos carcinomas de células escamosas foi baseada no Sistema de Classificação Histopatológica preconizado pela OMS, segundo Wahi (1971) que difere:

Grau 1 – Bem diferenciado: características citológicas e histológicas semelhantes ao revestimento epitelial escamoso da mucosa oral. Numerosas pérolas córneas, importante ceratinização celular com pontes intercelulares, menos de 2 mitoses por campo histológico, observando-se em maior aumento, raras mitoses atípicas e escassas células gigantes multinucleadas, pleomorfismo celular e nuclear muito reduzido.

Grau 2 – Moderadamente diferenciado: neoplasma com características intermediárias entre o grau bem diferenciado (1) e o grau pouco diferenciado (3). Pérolas córneas escassas ou ausentes, ceratinização celular e pontes intercelulares aparentes, 2-4 mitoses por campo histológico, algumas mitoses atípicas, moderado pleomorfismo celular e nuclear, escassas células gigantes multinucleadas.

Grau 3 – Pouco diferenciado ou indiferenciado: histologicamente e citologicamente há apenas uma mínima semelhança com o epitélio escamoso estratificado normal

da mucosa oral. Raras pérolas córneas, ceratinização celular quase inexistente e ausência de pontes intercelulares, mais de quatro mitoses por campo histológico, frequentes mitoses atípicas, pleomorfismo celular e nuclear pronunciado, frequentes células gigantes multinucleadas.

ANÁLISE QUANTITATIVA

Para a determinação da taxa de mitoses típicas e atípicas dos casos de CCE foi escolhido o melhor corte das lâminas coradas em HE para definição dos campos a serem fotografados para contagem; a aquisição das imagens foi feita em 5 pontos aleatórios na objetiva de 40X com câmera AxioCam ERc5s (Carl Zeiss Vision GmbH. Alemanha) e programa Axion Vision Release 4.8.2, salvas no formato TIF (Tagged Image File). As imagens foram montadas em programa Power Point (Microsoft Ins, 2010) com grade de 12 campos sobreposta à imagem.

O resultado da quantificação das alterações teciduais e citológicas registradas durante a análise microscópica de cada paciente foi correlacionado com os respectivos dados clínicos.

ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os registros das informações clínicas e microscópicas foram armazenados em banco de dados elaborado em planilha do Microsoft Excel. A descrição estatística das variáveis estudadas foi realizada por meio de frequência absoluta e relativa exibida em tabelas.

A análise estatística utilizou o software SPSS *(Statistic Package for Social Sciences)* versão 19.0. O teste qui-quadrado (x^2) foi utilizado para comparar proporções em categorias distintas, para investigar a associação entre variáveis categóricas. Para testes com variável idade (contínua) foram aplicados os testes t para médias e Análise de Variância (ANOVA). As decisões estatísticas foram tomadas ao nível de significância de 0,05.

RESULTADOS

Do total de 797 laudos microscópicos emitidos pelo Serviço de Anatomia Patológica Bucal (SAPB-UFES), no período de 2004 a 2010, 34 (4,27%) casos corresponderam a leucoplasia e 28 (3,51%) casos corresponderam a carcinoma de células escamosas.

A amostra inicial da pesquisa foi constituída de 62 casos com diagnóstico histopatológico de leucoplasia e carcinoma de células escamosas. Entretanto, apenas 55 casos fizeram parte da amostra, sendo 32 casos de leucoplasia e 23 casos de CCE. Foram excluídos 07 casos devido à emissão de laudos duplicados de alguns pacientes.

A Tabela 1 apresenta os dados referentes às características clínicas dos pacientes com leucoplasia.

Baseado na análise dos dados clinico-patológicos referente aos casos de leucoplasia, pode-se observar que a amostra apresentou uma relação de 1:1 quanto ao gênero. A idade dos pacientes que compuseram esta amostra variou de 26 a 77 anos, com média de 52,58 anos (Desvio Padrão= +/_13,87) (Tabela 2). O local mais acometido pela leucoplasia foi a mucosa jugal com 25% dos casos. Dos 32 pacientes, 17 eram tabagistas. O consumo de álcool foi relatado por 15,6% dos pacientes. Quanto ao grau de displasia epitelial, 17 casos (53,1%) apresentaram displasia epitelial moderada, conforme compilado na tabela 1 e exemplificados na figura 2.

Os dados clínicos das leucoplasias foram confrontados com o grau de displasia epitelial e não houve significância estatística (Tabela 3).

Tabela 1 – Caracterização da amostra de leucoplasia quanto aos dados sócio-demográficos dos pacientes, hábitos apresentados, localização e grau displásico das lesões

Variáveis	N	%
Faixa etária		
21 a 30 anos	1	3,1
31 a 40 anos	4	12,5
41 a 50 anos	11	34,4
51 a 60 anos	5	15,6
61 a 70 anos	5	15,6
71 a 80 anos	4	12,5
Sem informação	2	6,3
Raça/cor		
Branco	19	59,4
Negro	3	9,4
Pardo	8	25,0
Sem informação	2	6,3
Gênero		
Masculino	16	50,0
Feminino	16	50,0
Tabagismo		
Sim	17	53,1
Não	9	28,1
Semi nformação	6	18,8
Etilismo		
Sim	5	15,6
Não	16	50,0
Sem informação	11	34,4
Local da lesão		
Área retromolar	5	15,6
Assoalho	2	6,3
Gengiva	3	9,4
Lábio	3	9,4
Língua	5	15,6
Mucosa jugal	8	25,0
Palato	4	12,5
Múltipla lesão	2	6,3
Grau de displasia		
Leve	6	18,8
Moderada	17	53,1
Severa	9	28,1
Total	**32**	**100,0**

Tabela 2 – Estatísticas descritivas e resultados da ANOVA da idade segundo grau de displasia da leucoplasia

Grau de displasia	Idade				p-valor
	n	Mediana	Média	Desvio-padrão	
Leve	6	53,50	52,00	11,87	0,172
Moderada	16	46,00	48,50	13,22	
Severa	8	63,50	59,75	14,72	

Tabela 3 – Correlação dos dados clínicos com o grau de displasia da leucoplasia

Variáveis	Grau de displasia			p-valor
	Leve	Moderada	Severa	
Faixa etária				
Até 50 anos	3 (50,0%)	10 (62,5%)	3 (37,5%)	0,501
Mais de 50 anos	3 (50,0%)	6 (37,5%)	5 (62,5%)	
Raça/cor				
Branco	3 (50,0%)	11 (73,3%)	5 (55,6%)	0,509
Negro / Pardo	3 (50,0%)	4 (26,7%)	4 (44,4%)	
Gênero				
Masculino	4 (66,7%)	8 (47,1%)	4 (44,4%)	0,654
Feminino	2 (33,3%)	9 (52,9%)	5 (55,6%)	
Tabagismo				
Sim	3 (100,0%)	11 (68,8%)	3 (42,9%)	0,128
Não	0 (0,0%)	5 (31,3%)	4 (57,1%)	
Alcoolismo				
Sim	1 (25,0%)	4 (33,3%)	0 (0,0%)	0,194
Não	3 (75,0%)	8 (66,7%)	5 (100,0%)	
Local da lesão				
Área retromolar	2 (40,0%)	3 (33,3%)	0 (0,0%)	0,162
Língua	0 (0,0%)	3 (33,3%)	2 (50,0%)	
Mucosa jugal	3 (60,0%)	3 (33,3%)	2 (50,0%)	

Fig 2 HE

Inicialmente, foram identificadas as alterações teciduais e citológicas das leucoplasias estudadas, em número absoluto e relativo da presença e ausência de cada um dos fatores displásicos (Tabela 4). Após essa caracterização, os fatores displásicos e os fatores clínicos dessa amostra foram tratados estatisticamente.

Na análise das correlações dos fatores clínicos e fatores displásicos, foram registrados estatisticamente significantes: etilismo e formação em gota (Tabela 5); gênero e mitoses superficiais para as leucoplasias (Tabela 6).

Quando a associação foi feita entre cada um desses fatores displásicos e grau de displasia da lesão houve correlação: formação em gota, estratificação epitelial irregular, hiperplasia de células basais, variação anormal do tamanho do núcleo, variação anormal da forma do núcleo, variação anormal do tamanho da célula, aumento da relação núcleo-citoplasma e aumento do tamanho nuclear (Tabela 7).

Os fatores para displasia epitelial que não apresentaram correlações com significância estatística com os dados clínicos estão dispostos em tabelas que compõem o apêndice II.

Tabela 4 – Caracterização da amostra de leucoplasia com relação aos fatores displásicos da leucoplasia

Variáveis	n	%
Formações em gota		
Sim	18	56,3
Não	14	43,8
Estratificação epitelial irregular		
Sim	12	37,5
Não	20	62,5
Ceratinização prematura de células individuais (disceratose)		
Sim	5	15,6
Não	27	84,4
Pérolas corneas		
Sim	2	6,3
Não	30	93,8
Perda de polaridade das células basais		
Sim	16	50,0
Não	16	50,0
Hiperplasia de células basais		
Sim	23	71,9
Não	9	28,1
Aumento do número de figuras mitóticas		
Sim	26	81,3
Não	6	18,8
Mitoses superficiais		
Sim	20	62,5
Não	12	37,5
Variação anormal do tamanho do núcleo (anisonucleose)		
Sim	16	50,0
Não	16	50,0
Variação anormal da forma do núcleo (pleomorfismo nuclear)		
Sim	7	21,9
Não	25	78,1
Variação anormal do tamanho da célula (anisocitose)		
Sim	8	25,0
Não	24	75,0
Variação anormal da forma da célula (pleomorfismo celular)		
Sim	2	6,3
Não	30	93,8
Aumento da relação núcleo-citoplasma		
Sim	14	43,8
Não	18	56,3
Aumento do tamanho nuclear		
Sim	15	46,9
Não	17	53,1
Mitoses atípicas		
Sim	1	3,1
Não	31	96,9
Aumento do número e tamanho dos nucléolos		
Sim	10	31,3
Não	22	68,8
Hipercromatismo		
Sim	13	40,6
Não	19	59,4
Total	**32**	**100,0**

Tabela 5 – Correlação dos dados clínicos com formações em gota dos casos de leucoplasia

Variáveis	Formações em gota				p-valor
	Sim		Não		
	n	%	n	%	
Faixa etária					
Até 50 anos	7	41,2	9	69,2	0,127
Mais de 50 anos	10	58,8	4	30,8	
Raça/cor					
Branco	12	70,6	7	53,8	0,454
Negro / Pardo	5	29,4	6	46,2	
Gênero					
Masculino	10	55,6	6	42,9	0,476
Feminino	8	44,4	8	57,1	
Tabagismo					
Sim	8	53,3	9	81,8	0,217
Não	7	46,7	2	18,2	
Alcoolismo					
Sim	0	0,0	5	50,0	**0,012**
Não	11	100,0	5	50,0	
Local da lesão					
Área retromolar	2	11,1	3	21,4	
Assoalho	-	-	2	14,3	
Gengiva	1	5,6	2	14,3	
Lábio	3	16,7	-	-	-
Língua	2	11,1	3	21,4	
Mucosa jugal	5	27,8	3	21,4	
Palato	4	22,2	-	-	
Múltipla lesão	1	5,6	1	7,1	

Tabela 6 – Correlação dos dados clínicos com mitoses superficiais dos casos de leucoplasia

Variáveis	Mitoses superficiais				p-valor
	Sim		Não		
	n	%	n	%	
Faixa etária					
Até 50 anos	10	50,0	6	60,0	0,709
Mais de 50 anos	10	50,0	4	40,0	
Raça/cor					
Branco	13	68,4	6	54,5	0,696
Negro / Pardo	6	31,6	5	45,5	
Gênero					
Masculino	13	65,0	3	25,0	0,028
Feminino	7	35,0	9	75,0	
Tabagismo					
Sim	10	62,5	7	70,0	1,000
Não	6	37,5	3	30,0	
Etilismo					
Sim	3	21,4	2	28,6	1,000
Não	11	78,6	5	71,4	
Local da lesão					
Área retromolar	4	20,0	1	8,3	
Assoalho	1	5,0	1	8,3	
Gengiva	2	10,0	1	8,3	
Lábio	-	-	3	25,0	-
Língua	4	20,0	1	8,3	
Mucosa jugal	6	30,0	2	16,7	
Palato	3	15,0	1	8,3	
Múltipla lesão	-	-	2	16,7	

Tabela 7 – Correlação dos fatores displásicos e grau de displasia dos casos de leucoplasia

Variáveis	Grau de displasia			
	Leve	Moderada	Severa	
Formações em gota				
Sim	-	10 (55,6%)	8 (44,4%)	0,001
Não	6 (42,9%)	7 (50,0%)	1 (7,1%)	
Estratificação epitelial irregular				
Sim	-	6 (50%)	6 (50%)	0,012
Não	6 (30,0%)	11 (55,0%)	3 (15%)	
Ceratinização prematura de células individuais (disceratose)				
Sim	-	2 (40,0%)	3 (60,0%)	0,138
Não	6 (22,2%)	15 (55,6%)	6 (22,2%)	
Pérolas córneas				
Sim	-	1 (50,0%)	1 (50,0%)	0,584
Não	6 (20,0%)	16 (53,3%)	8 (26,7%)	
Perda de polaridade das células basais				
Sim	-	7 (43,8%)	9 (56,3%)	-
Não	6 (37,5%)	10 (62,5%)	-	
Hiperplasia de células basais				
Sim	2 (8,7%)	12 (52,2%)	9 (39,1%)	0,007
Não	4 (44,4%)	5 (55,6%)	-	
Aumento do número de figuras mitóticas				
Sim	5 (19,2%)	14 (53,8%)	7 (26,9%)	0,951
Não	1 (16,7%)	3 (50,0%)	2 (33,3%)	
Mitoses superficiais				
Sim	4 (20,0%)	9 (45,0%)	7 (35,0%)	0,436
Não	2 (16,7%)	8 (66,7%)	2 (16,7%)	
Variação anormal do tamanho do núcleo (anisonucleose)				
Sim	-	8 (50,0%)	8 (50,0%)	0,001
Não	6 (37,5%)	9 (56,3%)	1 (6,3%)	
Variação anormal da forma do núcleo (pleomorfismo nuclear)				
Sim	-	1 (14,3%)	6 (85,7%)	0,001
Não	6 (24,0%)	16 (64,0%)	3 (12,0%)	
Variação anormal do tamanho da célula (anisocitose)				
Sim	-	3 (37,5%)	5 (62,5%)	0,020
Não	6 (25,0%)	14 (58,3%)	4 (16,7%)	
Variação anormal da forma da célula (pleomorfismo celular)				
Sim	-	-	2 (100,0%)	-
Não	6 (20,0%)	17 (56,7%)	7 (23,3%)	
Aumento da relação núcleo-citoplasma				
Sim	-	6 (42,9%)	8 (57,1%)	0,000
Não	6 (33,3%)	11 (61,1%)	1 (5,6%)	
Aumento do tamanho nuclear				
Sim	-	7 (46,7%)	8 (53,3%)	0,001
Não	6 (35,3%)	10 (58,8%)	1 (5,9%)	
Mitoses atípicas				
Sim	-	-	1 (100,0%)	-
Não	6 (19,4%)	17 (54,8%)	8 (25,8%)	
Aumento do número e tamanho dos nucléolos				
Sim	1 (10,0%)	5 (50,0%)	4 (40,0%)	0,501
Não	5 (22,7%)	12 (54,5%)	5 (22,7%)	
Hipercromatismo				
Sim	2 (15,4%)	6 (46,2%)	5 (38,5%)	0,562
Não	4 (21,1%)	11 (57,9%)	4 (21,1%)	
Total	**32**	**100,0**		

A tabela 8 caracteriza a amostra deste estudo com informações sobre o número absoluto e relativo de casos de CCE, segundo características clínicas. Constatou-se que dos 23 casos analisados 19 (82,6%) eram do gênero masculino, demonstrando predileção por indivíduos masculinos numa proporção de 4,75:1. A idade variou entre 42 e 89 anos, sendo a média de 58,95 anos; a faixa etária compreendida entre 51-60 anos foi a mais prevalente, com 30,4% dos casos. A raça branca foi a mais afetada com 10 casos (43,5%); nenhum paciente de cor amarela e indígena foi diagnosticado.

Quanto à localização anatômica da lesão, observou-se que a língua foi a região mais acometida com 26,1% da amostra (seis casos), seguida pelo assoalho de boca 21.7% (cinco casos) e palato 17,4% (quatro casos). Outras regiões como gengiva, área retromolar, lábio e mucosa jugal somaram cinco casos e três casos de lesão em mais de um sítio anatômico.

Tabela 8 – Caracterização da amostra de CCE quanto aos dados sócio-demográficos dos pacientes, hábitos apresentados, localização e grau de diferenciação das lesões

Variáveis	n	%
Faixa etária		
21 a 30 anos	-	-
31 a 40 anos	-	-
41 a 50 anos	6	26,1
51 a 60 anos	7	30,4
61 a 70 anos	5	21,7
71 a 80 anos	4	17,4
80 anos ou mais	1	4,3
Sem informação	-	-
Raça/cor		
Branco	10	43,5
Negro	3	13,0
Pardo	10	43,5
Gênero		
Masculino	19	82,6
Feminino	4	17,4
Tabagismo		
Sim	16	69,6
Não	5	21,7
Sem informação	2	8,7
Alcoolismo		
Sim	11	47,8
Não	10	43,5
Sem informação	2	8,7
Local da lesão		
Área retromolar	1	4,3
Assoalho	5	21,7
Gengiva	2	8,7
Lábio	1	4,3
Língua	6	26,1
Mucosa jugal	1	4,3
Palato	4	17,4
Múltipla lesão	3	13,0
Grau de diferenciação		
Bem diferenciado	7	30,4
Moderadamente	14	60,9
Indiferenciado	2	8,7
Total	**23**	**100,0**

De acordo com o resultado da análise estatística (Tabela 9), não se pode dizer que há relação entre os dados clínicos com o grau de diferenciação dos CCEs.

Tabela 9 – Correlação dos dados clínicos com o grau de diferenciação do CCE

Variáveis	Grau de diferenciação		p-valor
	Bem diferenciado	Moderadamente	
Faixa etária			
Até 50 anos	2 (28,6%)	4 (28,6%)	1,000
Mais de 50 anos	5 (71,4%)	10 (71,4%)	
Raça/cor			
Branco	4 (57,1%)	6 (42,9%)	0,536
Negro / Pardo	3 (42,9%)	8 (57,1%)	
Gênero			
Masculino	4 (57,1%)	13 (92,9%)	0,055
Feminino	3 (42,9%)	1 (7,1%)	
Tabagismo			
Sim	4 (57,1%)	11 (91,7%)	0,078
Não	3 (42,9%)	1 (8,3%)	
Etilismo			
Sim	2 (33,3%)	8 (61,5%)	0,250
Não	4 (66,7%)	5 (38,5%)	
Local da lesão			
Assoalho	3 (75,0%)	2 (28,6%)	0,131
Língua	1 (25,0%)	5 (71,4%)	

Os casos de CCE bem diferenciado, moderadamente e pouco diferenciado/indiferenciado apresentaram média de idade de 58,43 anos (DP=15,34), 57 anos (DP=11,54) e 74, 5 anos (DP=0,71) (Tabela 10)

Tabela 10 – Estatísticas descritivas da idade segundo grau de diferenciação do CCE

Grau de diferenciação	Idade			
	n	Mediana	Média	Desvio-padrão
Bem diferenciado	7	53,00	58,43	15,34
Moderadamente	14	52,50	57,00	11,54
Indiferenciado	2	74,50	74,50	0,71

De acordo com a tabela 11 pode-se observar que não houve correlação estatística entre a média de idade e o grau de diferenciação do CCE.

Tabela 11 – Estatísticas descritivas e resultados da ANOVA da idade segundo grau de diferenciação do CCE

Grau de diferenciação	Idade				p-valor
	N	Mediana	Média	Desvio-padrão	
Bem diferenciado	7	53,00	58,43	15,34	0,813
Moderadamente	14	52,50	57,00	11,54	

Fig 3 HE

A tabela 12 descreve o número absoluto e relativo da presença e ausência de cada um dos fatores displásicos para os casos de CCE.

Tabela 12 – Caracterização microscópica da amostra de carcinoma de células escamosas

Variáveis	n	%
Formações em gota		
Sim	12	52,2
Não	11	47,8
Estratificação epitelial irregular		
Sim	17	73,9
Não	6	26,1
Ceratinização prematura de células individuais (disceratose)		
Sim	20	87,0
Não	3	13,0
Pérolas córneas		
Sim	19	82,6
Não	4	17,4
Perda de polaridade das células basais		
Sim	8	34,8
Não	15	65,2
Hiperplasia de células basais		
Sim	13	56,5
Não	10	43,5
Aumento do número de figuras mitóticas		
Sim	16	69,6
Não	7	30,4
Mitoses superficiais anormais		
Sim	12	52,2
Não	11	47,8
Variação anormal do tamanho do núcleo (anisonucleose)		
Sim	22	95,7
Não	1	4,3
Variação anormal da forma do núcleo (pleomorfismo nuclear)		
Sim	22	95,7
Não	1	4,3
Variação anormal do tamanho da célula (anisocitose)		
Sim	16	69,6
Não	7	30,4
Variação anormal da forma da célula (pleomorfismo celular)		
Sim	17	73,9
Não	6	26,1
Aumento da relação núcleo-citoplasma		
Sim	21	91,3
Não	2	8,7
Aumento do tamanho nuclear		
Sim	20	87,0
Não	3	13,0
Células com mitoses atípicas		
Sim	10	43,5
Não	13	56,5
Aumento do número e tamanho dos nucléolos		
Sim	9	39,1
Não	14	60,9
Hipercromatismo		
Sim	15	65,2
Não	8	34,8
Total	**23**	**100,0**

Para os carcinomas de células escamosas, as correlações clínicas e microscópicas, estatisticamente significativas, foram registradas: estratificação epitelial irregular com a Raça/Cor, conforme pode ser observado na tabela 13 e entre estratificação epitelial irregular, pérolas córneas e o grau de diferenciação (Tabela 14).

Os fatores displásicos que não apresentaram correlações com significância estatística com os dados clínicos estão dispostos em tabelas que compõem o apêndice II.

Tabela 13 – Correlação dos dados clínicos com estratificação epitelial irregular dos casos de carcinoma de células escamosas

Variáveis	Estratificação epitelial irregular				p-valor
	Sim		Não		
	n	%	n	%	
Faixa etária					
Até 50 anos	6	35,3	-	-	0,144
Mais de 50 anos	11	64,7	6	100,0	
Raça/cor					
Branco	10	58,8	0	0,0	0,019
Negro / Pardo	7	41,2	6	100,0	
Gênero					
Masculino	14	82,4	5	83,3	1,000
Feminino	3	17,6	1	16,7	
Tabagismo					
Sim	12	75,0	4	80,0	1,000
Não	4	25,0	1	20,0	
Alcoolismo					
Sim	6	40,0	5	83,3	0,149
Não	9	60,0	1	16,7	
Local da lesão					
Área retromolar	1	5,9	-	-	
Assoalho	5	29,4	-	-	
Gengiva	-	-	2	33,3	
Lábio	1	5,9	-	-	-
Língua	4	23,5	2	33,3	
Mucosa jugal	-	-	1	16,7	
Palato	4	23,5	-	-	
Múltipla lesão	2	11,8	1	16,7	

Tabela 14 – Correlação dos fatores displásicos e grau de diferenciação dos casos de carcinoma de células escamosas

Variáveis	Grau de diferenciação			
	Bem diferenciado	Moderadamente diferenciado	Indiferenciado	
Formações em gota				
Sim	2 (16,7%)	9 (75,0%)	1 (8,3%)	0,295
Não	5 (45,5%)	5 (45,5%)	1 (9,1%)	
Estratificação epitelial irregular				
Sim	7 (41,2%)	9 (52,9%)	1 (5,9%)	0,068
Não	-	5 (83,3%)	1 (16,7%)	
Ceratinização prematura de células individuais (disceratose)				
Sim	7 (35,0%)	12 (60,0%)	1 (5,0%)	0,169
Não	-	2 (66,7%)	1 (33,3%)	
Pérolas córneas				
Sim	6 (31,6%)	13 (68,4%)	0 (0,0%)	0,016
Não	1 (25,0%)	1 (25,0%)	2 (50,0%)	
Perda de polaridade das células basais				
Sim	3 (37,5%)	4 (50,0%)	1 (12,5%)	0,728
Não	4 (26,7%)	10 (66,7%)	1 (6,7%)	
Hiperplasia de células basais				
Sim	4 (30,8%)	8 (61,5%)	1 (7,7%)	0,981
Não	3 (30,0%)	6 (60,0%)	1 (10,0%)	
Aumento do número de figuras mitóticas				
Sim	5 (31,3%)	10 (62,5%)	1 (6,3%)	0,832
Não	2 (28,6%)	4 (57,1%)	1 (14,3%)	
Mitoses superficiais				
Sim	4 (33,3%)	8 (66,7%)	-	0,206
Não	3 ((27,3%)	6 (54,5%)	2 (18,2%)	
Variação anormal do tamanho do núcleo (anisonucleose)				
Sim	6 (27,3%)	14 (63,5%)	2 (9,1%)	-
Não	1 (100,0%)	-	-	
Variação anormal da forma do núcleo (pleomorfismo nuclear)				
Sim	6 (27,3%)	14 (63,5%)	2 (9,1%)	-
Não	1 (100,0%)	-	-	
Variação anormal do tamanho da célula (anisocitose)				
Sim	5 (31,3%)	10 (62,5%)	1 (6,3%)	0,832
Não	2 (28,6%)	4 (57,1%)	1 (14,3%)	
Variação anormal da forma da célula (pleomorfismo celular)				
Sim	5 ((29,4%)	11 (64,7%)	1 (5,9%)	0,703
Não	2 (33,3%)	3 (50,0%)	1 (16,7%)	
Aumento da relação núcleo-citoplasma				
Sim	6 (28,6%)	13 (61,9%)	2 (9,5%)	0,725
Não	1 (50,0%)	1 (50,0%)	0 (0%)	
Aumento do tamanho nuclear				
Sim	6 (30,0%)	12 (60,0%)	2 (10,0%)	0,746
Não	1 (33,3%)	2 (66,7%)	-	
Mitoses atípicas				
Sim	1 (10,0%)	8 (80,0%)	1 (10,0%)	0,145
Não	6 (46,2%)	6 (46,2%)	1 (7,7%)	
Aumento do número e tamanho dos nucléolos				
Sim	3 (33,3%)	5 (55,6%)	1 (11,1%)	0,902
Não	4 (28,6%)	9 (62,3%)	1 (7,1%)	
Hipercromatismo				
Sim	5 (33,3%)	9 (60,0%)	1 (6,7%)	0,851
Não	2 (25,0%)	5 (62,5%)	1 (12,5%)	
Total	**23**	**100,0**		

Na análise quantitativa das mitoses típicas e atípicas, os carcinomas de células escamosas apresentaram diferentes números de mitoses típicas e atípicas em relação ao grau de diferenciação.

No CCE grau I observou-se uma média de 3,85 mitoses típicas por lesão (DP= +/- 2,07), o CCE grau II apresentou média de 5,35 (DP= +/-0,74) (Gráfico 1).

Com relação às mitoses atípicas foi encontrado para o CCE grau I média de 5,14 mitoses atípicas por lesão (DP= +/-1,84) e CCE graus II e III 4,64 e 8,50 mitoses atípicas por lesão (Gráfico 2) e DP= +/- 0,60 e 6,50, respectivamente.

Os resultados encontrados para a contagem de mitoses típicas e atípicas no CCE estão descritos nos gráficos abaixo:

Gráfico 1 – Número de mitoses típicas nos diferentes graus de diferenciação do CCE

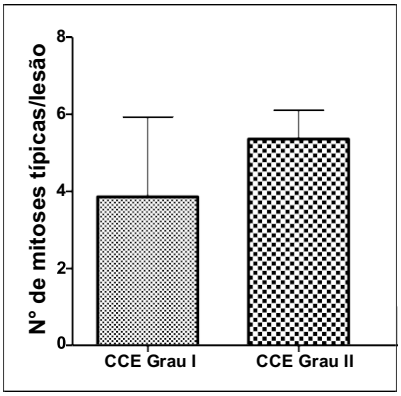
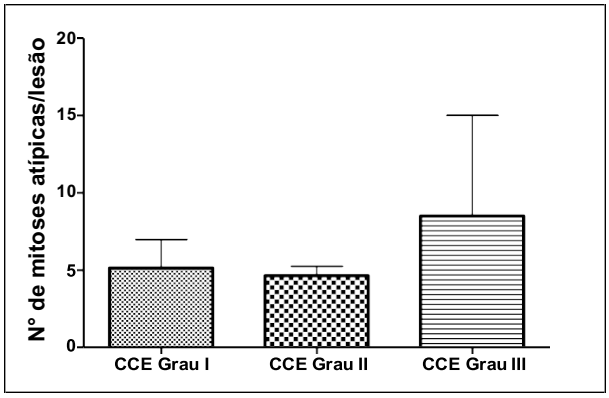


Gráfico 2 – Número de mitoses atípicas nos diferentes graus de diferenciação do CCE



DISCUSSÃO

Apesar dos fatores clínicos envolvidos na carcinogênese oral serem evidentes em estudos de leucoplasias e CCE (ABDO et al., 2002; COSTA; ARAÚJO JÚNIOR; RAMOS, 2005; COARACY et al., 2008; PEREIRA et al., 2011), a avaliação microscópica das alterações teciduais e citológicas em espectros desde a displasia epitelial oral leve, moderada a severa até o carcinoma de células escamosas indiferenciado, passando pelo bem e moderadamente diferenciado, possibilitando um aprofundamento da grande questão: o potencial de malignização das desordens da mucosa oral.

No estudo proposto iniciou-se a caracterização dos pacientes com laudos emitidos de leucoplasia e CCE como ponto de partida para obter um perfil sociodemográfico dos pacientes. A partir dessa caracterização, procedeu-se a correlação entre os aspectos clínicos e os achados microscópicos. Porém não considerou apenas o grau de displasia e diferenciação dos casos de leucoplasia e CCE, respectivamente, mas analisou distintivamente, os fatores displásicos (alterações teciduais e citológicas), ferramentas de trabalho para a classificação desse espectro de lesões, com intuito de pontuar e tabelar o fator de maior peso até o de menor impacto na transição entre leucoplasias e CCEs, num aprofundamento da carcinogênese oral.

A graduação da displasia epitelial (WARNAKULASURIYA et al., 2007) nas desordens com potencial de malignização da mucosa oral vem sendo recomendada pela OMS, apesar da subjetividade com interpretações controversas entre patologistas (KUJAN et al., 2007) dificulta prever o potencial de malignização, pois, geralmente, essa análise estar dissociada dos dados clínicos.

Quando os graus de displasia epitelial da nossa amostra de leucoplasia foram correlacionados com os dados clínicos relevantes na carcinogênese oral como consumo de tabaco e localização da lesão não houve significância, porém quando foram analisados por características microscópicas individuais ou fatores displásicos, os critérios formação em gota, estratificação epitelial irregular, hiperplasia de células basais, variação anormal do tamanho e forma do núcleo, tamanho da célula e aumento da relação núcleo/citoplasma apresentaram significância estatística.

Essa análise das características individuais da displasia foi realizada por Tilakaratne e colaboradores (2011) em 86 lesões displásicas da cavidade oral e correlacionada com fatores clínicos e observaram que, dentre os fatores displásicos individuais avaliados, a formação em gota identificada nas lesões displásicas apresentaram significância correlação com os fumantes.

No presente estudo, foi observada associação positiva entre o grau de displasia e a presença de hiperplasia de células basais, que pode representar o aumento da proliferação de tais células, porém pode haver também possível relação com erros inerentes à técnica de confecção da lâmina, relacionado à artefato devido à secção diagonal do espécime influenciando na interpretação, levando a um falso positivo.

Kujan e colaboradores (2007) em recente estudo avaliaram as características histológicas que contribuem para a variação interobservador; a alta concordância foi encontrada para aumento do número de mitoses, aumento do tamanho do núcleo e formação em gotas. Por outro lado, estratificação epitelial, perda de polaridade das células basais, variação anormal do tamanho do núcleo, número de mitoses atípicas e hipercromatismo tem alta discordância entre os observadores.

Apesar da recomendação dos critérios para classificação dos graus de displasia pela OMS, constantemente reavaliados e discutidos, deve-se levar em consideração as limitações e as variações entre os inter e intra-observadores, dificultando a reprodutibilidade dos dados (SHIMAMAURA et al., 2011), bem como as comparações entre amostras. No nosso estudo, a variação intraobservadora foi mínima, em função da preparação para a análise e a calibração Kappa que atingiu níveis superiores.

Os principais achados microscópicos que representariam uma possível invasividade como são observados nas formações em gotas, podem sinalizar um potencial de malignização, essa correlação foi registrada em nossos achados em que houve também associação estatisticamente significante direta entre o grau de displasia e o critério formação em gota, sendo os casos que apresentaram formação em gota representado por 10 casos (55,6%) de leucoplasia moderada e 8 casos (44,4%) de leucoplasia severa, já os casos que não apresentaram formação em gota foram representados por 6 casos de leucoplasia leve (42,9%), 7 casos de leucoplasia moderada (50,0%) e 1 caso de leucoplasia severa (7,1%) p= 0,001.

Os dados clínicos não devem ser observados separadamente, pelo contrário, devem ser os indicadores, tanto com relação à idade, gênero, exposição ao tabaco e localização, de maior ou menor risco de malignização das leucoplasias.

Quanto à localização da leucoplasia nesse estudo pode-se destacar como maior acometimento a mucosa jugal, seguida da língua e área retromolar. A leucoplasia pode afetar qualquer sítio da cavidade oral e orofaríngea, podendo ser subdividida em homogênea e não homogênea, sendo que, geralmente, na mucosa jugal são homogêneas, com menor potencial de malignização (VAN DER WAAL, 2009). A maior frequência de transformação maligna dos diferentes tipos está intimamente relacionada ao grau de displasia. No entanto, quando localizada na língua possui apresentação clínica heterogênea, sinalizando uma maior alteração tecidual com presença de fatores displásicos. A eritroleucoplasia tem uma média de potencial de transformação de 28% variando de 18 a 47% em diferentes investigações (NEVILLE et al., 2008).

Os fatores clínicos associados ao aumento da transformação maligna são controversos, porém HO e colaboradores (2012) avaliaram histopatologicamente pacientes com graus diferentes de displasia epitelial e determinaram predictores fortes como fumo, aparência clínica, subárea e severidade da displasia. Gênero, idade, número de lesões e histórico de álcool não foram predictores significantes de transformação. Tais resultados despertam para a valorização de determinantes clínicos de transformação maligna agregados aos fatores displásicos presentes nas lesões, auxiliando na avaliação, diagnóstico, prognóstico e a condução dos pacientes portadores dessas desordens com potencial de malignização.

Do outro lado do espectro, no estudo da carcinogênese oral está o carcinoma de células escamosas. O grau de diferenciação baseado nos mesmos critérios utilizados na gradação da displasia epitelial continua contribuindo no esclarecimento dessa transformação que as células epiteliais sofrem na carcinogênese, uma vez que, segundo a OMS, pela classificação do Wahi (1971), quanto mais alterações teciduais e citológicas, maior o grau de indiferenciação e seu distanciamento a sua morfologia original, sendo diretamente associado ao seu comportamento biológico, com característica de agressividade. Costa e colaboradores (2005) encontraram

correlação entre o estadiamento clínico TNM e o grau de queratinização, pleomorfismo nuclear e infiltrado inflamatório linfoplasmocitário.

Nesse estudo, os resultados corroboram com os registros da literatura quando pontua sobre o CCE ser mais frequente no homem branco da 5ª a 6ª década de vida (NEVILLE et al, 2008; SCULLY e BAGAN, 2009); foram encontrados 07 casos, que representam 30,4% da amostra na faixa etária de 51-60. A faixa etária entre 41-50 também apresentou um número representativo de 06 casos, correspondente a 26,1% da amostra. Todavia, alguns estudos têm mostrado um aumento da incidência de CCE em pacientes jovens com menos de 40 anos de idade (SHIBOSKI et al, 2005).

O fator idade é fundamental no estudo do câncer bucal, uma vez que aumenta o tempo de exposição aos agentes carcinogênicos à medida que o indivíduo avança a idade; além de que as deficiências do sistema imunológico (imunosenescência) deixam os indivíduos idosos vulneráveis a várias doenças, inclusive o câncer.

A idade do paciente consiste numa variável que pode estar relacionada ao grau de malignidade do tumor. Pacientes jovens são acometidos por neoplasias malignas mais agressivas, quando comparados aos idosos, nos quais normalmente, pode-se observar um caráter mais brando dos tumores. Contudo pouco se entende porque indivíduos de mesma idade podem apresentar carcinomas com graus de malignidade bastante distintos (LOURENÇO et al., 2007).

Existem diferenças marcantes na incidência do câncer bucal segundo o gênero, sendo o sexo masculino mais afetado. Atualmente verifica-se um estreitamento dessa relação, devido provavelmente à incorporação de certos hábitos pelas mulheres.

Em relação a variável gênero observou-se a predominância do sexo masculino com 82,6%, correspondente a 19 casos da amostra. Assim, é possível afirmar que esse estudo acompanha os dados expressos em diversos estudos (ABDO et al., 2002; COSTA et al., 2005; COARACY et al., 2008) demonstrando a predileção pelo sexo masculino.

Quanto à variável raça/cor, o resultado da amostra apresentou tanto para leucoplasia (59,5%) quanto para o carcinoma (43,5%) a predominância de brancos;

porém deve-se considerar o fato de que a classificação étnica da população brasileira se baseia na autodeclaração e que a miscigenação é um traço marcante na sociedade brasileira, segundo o IBGE (Instituto Brasileiro de Geografia e Estatística).

Em relação à amostra de CCE nesse estudo quando classificado pelos graus de diferenciação, o subgrupo indiferenciado não permitiu tratamento estatístico, devido à quantidade de categorias na variável localização da lesão. Apenas o assoalho de boca e a língua permitiram correlacionar a localização com grau de diferenciação. No entanto, esses locais não apresentaram associação estatisticamente significante.

As diferenças entre as localizações das leucoplasias e dos CCE estão relacionadas ao hábito cultural de diferentes populações. Segundo Napier & Seipght (2008), o tipo de utilização do tabaco influencia a distribuição da localização das lesões: fumar cigarro reverso provoca lesões no palato duro, mastigação do tabaco provoca lesões no local de acúmulo e o consumo de cigarro está associado com a localização da lesão no assoalho da boca.

Os locais mais acometidos foram a língua (26,1%) e o assoalho de boca (21,7%), porém as múltiplas lesões, notavelmente correspondem à extensão dessas áreas próximas, tais como borda de língua e soalho de boca e com as mesmas características histológicas.

A predominância do CCE no assoalho de boca e ventre de língua tem sido sugerida pela falta de uma camada de queratina protetora e pelo aumento da permeabilidade da mucosa que contribui para tornar esses locais mais suscetíveis à ação dos carcinógenos solúveis do tabaco e do álcool. A alta atividade proliferativa intrínseca do assoalho de boca e ventre de língua pode representar uma importante predisposição endógena para as chances de malignização (THOMSON, 2012).

Áreas de menor queratinização da mucosa oral, maior atividade proliferativa e os locais de retenção de saliva proporcionam o aumento do tempo de contato da mucosa com os fatores carcinogênicos provenientes do tabaco. Além disso, a ingestão associada do álcool aumenta a permeabilidade da mucosa, sendo considerado um efeito sinérgico do tabaco e álcool.

O CCE de lábio possui comportamento biológico e prognóstico diferentes dos carcinomas intrabucais e, assim, são divididos pela OMS. Enquanto os fatores principais para os sítios intrabucais são o uso de tabaco e álcool, a radiação solar ultravioleta representa o principal fator etiológico do carcinoma de lábio inferior (LOURENÇO et al., 2007). Foi observado apenas 01 caso de CCE no lábio, provavelmente devido à existência de um projeto que percorre o interior do estado composto por uma equipe de dermatologistas que fazem mutirão de consultas e cirurgias nos municípios com etnia pomerana, da zona rural, geralmente agricultores que sofre com o alto índice de câncer de pele e lábio.

Quanto à variável alcoolismo, apesar de pesquisada na história clínica, pode haver falha devido à omissão de informações; a anamnese é pouco sensível ou confiável na determinação do alcoolismo, e embora sem dados específicos quanto à quantificação, observa-se na prática assistencial que as pessoas têm dificuldade de declarar abusos alcoólicos, o que permitiria ter classificado mais pessoas no grupo não etilista.

Na análise microscópica qualitativa e quantitativa, o grau de diferenciação dos CCEs analisados não correlacionou estatisticamente com os dados clínicos do paciente e a localização da doença, sendo a correlação mais próxima de $p<0,05$, o gênero masculino; tal resultado pode estar vinculado ao tamanho da amostra. Porém, na análise das alterações teciduais e citológicas distintivamente, as correlações raça/ estratificação epitelial irregular e pérolas córneas/grau de diferenciação, foram estatisticamente significantes.

A contagem de mitoses contribui na determinação do grau de diferenciação dos CCEs, considerando o número de mitoses por campo, juntamente com outros critérios morfológicos. A avaliação quantitativa diminui a subjetividade inerente entre os patologistas e auxiliou a pesquisadora na classificação do tumor estudado.

Tumores indiferenciados geralmente exibem grande número de mitoses em comparação com os tumores bem diferenciados, refletindo a maior atividade de proliferação das células parenquimatosas. Entretanto, mais importante como característica morfológica dos tumores malignos são as figuras mitóticas bizarras e atípicas que algumas vezes produzem fusos tripolares, quadripolares ou

multipolares (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2006). Em nosso estudo as mitoses atípicas apresentaram em maior número nos casos de CCE grau III, numa média de 8,50 mitoses atípicas por lesão. Em mitoses atípicas é comum haver perda de partes de cromossomos levando à poliploidia, aneuploidia ou anomalias mais complexas, isto pode ser letal às células causando necrose ou apoptose, mas pode também ocasionar aparecimento de clones celulares mais agressivos, por deleção de outros genes reguladores do crescimento celular (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2006).

Na busca incessante pelo entendimento dos fatores que participam na carcinogênese oral, alguns se tornam elucidados, principalmente por levantamentos epidemiológicos e a correlação de fatores externos como o tabaco, juntamente com ação sinérgica do álcool e a radiação solar, outros fatores tornam-se mais claros com o detalhamento e correlação entre os dados clínicos e os microscópicos.

CONCLUSÃO

A avaliação de parâmetros arquiteturais do tecido e citológicos foram capazes de correlacionar clínica e microscópica nas leucoplasias entre fator de risco: alcoolismo, gênero e o grau de displasia.

Para os casos de CCE, a correlação significante entre os dados clínicos e a avaliação histopatológica ocorreu entre a raça e estratificação epitelial irregular; pérolas córneas e grau de diferenciação.

Assim, concluímos que a avaliação do potencial de malignização das leucoplasias e a gravidade do comportamento agressivo dos CCEs, não devem ser baseadas separadamente pelos dados clínicos e histopatológicos; estudos adicionais utilizando a investigação imuno-histoquímica com marcadores específicos poderão auxiliar na identificação de eventos moleculares envolvidos na carcinogênese.

REFERÊNCIAS*

ABDO, E. N. et al. Perfil do paciente portador de carcinoma epidermóide da cavidade bucal, em tratamento no Hospital Mário Penna em Belo Horizonte. **Revista Brasileira de Cancerologia.** v. 48, n.3, p. 357-362, 2002.

ALBERTS, B. et al. **Biologia Molecular da Célula**. 4. ed. Porto Alegre: Artmed, 2004. p.1463.

ANGADI, P. V. et al. Oral Field cancerization: current evidence and future perspectives. **Oral Maxillofac Surg.** DOI 10.1007/s10006-012-02317-x. 2012.

BAKER, E. A. et al. The matrix metalloproteinase system in oral squamous cell carcinoma. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 44. p. 482-486, 2006.

BARNES et al., 2005. **Pathology & Genetics Head and Neck Tumours.** World Health Organization Classification or Tumours. Lyon, 2005.

BARROS, S. S. L. et al. Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinases in squamous cell carcinoma of the tongue and lower lip. **Arquives of Oral Biology**, 56. p. 752-760, 2011.

BJORKLUND, M.; KOIVUNEN, E. Gelatinase-mediated migration and invasion of cancer cells. **Biochim. Biophys. Acta**, v. 1755, n. 1, p. 37-69, 2005.

BOURBOULIA, D; STETLER-STEVENSON, W. G. Matrix MetalloProteinases (MMPs) andTissue Inhibitors of MetalloProteinases (TIMPs): positive and negative regulators intumor cell adhesion. **National Institute of Health – NIH Public Access – Author Manuscript, Semin Cancer Biol.** p. 161-168, 2010.

BRASILEIRO FILHO, G. Distúrbios do crescimento e da difenciação celular. In: BRASILEIRO FILHO, G. **Bogliolo Patologia Geral.** 3 ed. Rio de Janeiro: Guanabara-koogan; p.173-234, 2004.

CARRARD, C. V. et al. Álcool e Câncer Bucal: Considerações sobre os Mecanismos Relacionados. **Revista Brasileira de Cancerologia.** v.54, n.1, p. 49-56. 2008.

*** Correspondente a Introdução, Revisão de Literatura e o Artigo 1 da dissertação, conforme as normas da ABNT**

COARACY, A. E. V. et al. Correlação entre os dados clínicos e histopatológicos dos casos de carcinoma espinocelular oral do Instituto Maranhense de Oncologia Aldenora Bello, em São Luís, MA. **J Bras Patol Med Lab** v.44, n.1, p.31-35, 2008.

COLOMBO, J. RAHAL, P. Alterações Genéticas em Câncer de Cabeça e Pescoço. **Revista Brasileira de Cancerologia.** v.55 p.2, p.165-174, 2009.

COSTA A.L.L et al. Correlação entre a classificação TNM, gradação histológica e classificação anatômica em carcinoma epidermóide oral. **Pesqui Odontol Bras** v.16, p.216-220, 2002.

COSTA, A.L.L. et al. Correlação entre a classificação clínica TNM e as características histológicas de malignidade do carcinoma epidermóide oral. **Rev. bras. otorrinolaringol.** São Paulo, v. 71, n. 2, 2005.

DORIA, G; FRASCA, D. Age-related changes of DNA damage recognition and repair capacity in cells of the imune system. **Mechanisms of ageing and development**. 122, p. 985-998, 2001.

EGEBLAD, M.; WERB, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nat. Rev. Cancer,** v. 2, n. 3, p. 161-74, 2002.

Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro: INCA, 2011.

FREITAS, M.D. et al. Clinicopathologic aspects of oral leukoplakia in smokers and nonsmokers. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod,** v.102, n.2, p.199-203, 2006.

FREITAS, V. M. et al. SIKVAV, a laminin alpha1-derived peptide, interacts with integrins and increases protease activity of a human salivary gland adenoid cystic carcinoma cell line through the ERK 1/2 signaling pathway. **Am. J. Pathol.,** v. 171, n. 1, p. 124-38, 2007.

GALE, N et al. Epithelial precursor lesions. In: WHO, B. L. et al. **Pathology & Genetics Head and Neck Tumours. World Health Organization Classification or Tumours.** Lyon, 2005.

GAMA-DE-SOUZA, L. N. et al. Adhesion and protease activity in cell lines from human salivary gland tumors are regulated by the laminin-derived peptide AG73, syndecan-1 and beta1 integrin. **Matrix Biol.,** v. 27, n. 5, p. 402-19, 2008.

GE, LIN; et al. Could stroma contribute to field cancerization? **Medical Hypotheses.** v.75. p.26-31, 2010.

GRINSPAN, D. Enfermidades de la boca, Tomo II, Patología. **Clínica y terapéutica de la mucosa bucal**, Mundi,Buenos Aires, 1973.

GUTTMAN, D. et al. Expression of MMP-9, TIMP-1, CD-34 and factor-8 as prognostic markers for squamous cell carcinoma of the tongue. **Oral Oncology,** v. 40. p.798-803, 2004.

HO, M.V. et al.The clinical determinants of malignant transformation in oral epithelial dysplasia. Article in press**: Oral Oncology, (2012)**

INCA/MS. Carcinoma epidermóide da Cabeça e Pescoço – Condutas do INCA/MS. **Revista Brasileira de Cancerologia**. v.47, n.4, p.361-376, 2001.

IZUMO, T. Oral premalignant lesions: from the pathological viewpoint. **Int J Clin Oncol.** v.16; p.15-26, 2011.

KIGNEL, S. et al. **Estomatologia base do diagnóstico para o clínico geral.** 1 ed. São Paulo: Robe, p. 450, 2007.

KUJAN, O. et al. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. **Oral Oncology.** v. 42. 987-993, 2006.

KUJAN, O. et al. Why oral histopathology suffers inter-observer variability on grading oral epithelial dysplasia: An attempt to understand the sources of variation. **Oral Oncology**. v. 43. 224-231, 2007.

LEE, M. H.; MURPHY, G. Matrix metalloproteinases at a glance. **J. Cell Sci.,** v. 117, n. 18, p. 4015-4016, 2004.

LIU, W. et al. Malignant transformation of oral epithelial dysplasia: clinicopathological risk factors and outcome analysis in a retrospective cohort of 138 cases. **Histopathology.** v.59, p.733-740, 2011.

LOURENÇO, S. Q. C. et al. Classificações Histopatológicas para o Carcinoma de Células Escamosas da Cavidade Oral: Revisão de Sistemas Propostos. **Revista Brasileira de Cancerologia.** v. 53, n.3, p.325-333, 2007.

LYNCH, C. C.; MATRISIAN, L. M. Matrix metalloproteinases in tumor-host cell communication. **Differentiation,** v. 70, n. 9-10, p. 561-73, 2002.

MADSEN, D. H. et al. Extracellular collagenases and the endocytic receptor, urokinase plasminogen activator receptor-associated protein/Endo180, cooperate in fibroblast-mediated collagen degradation. **J. Biol. Chem.,** v. 282, n. 37, p. 27037-45, 2007.

MARCHIONI, D. M. L. et al. Fatores dietéticos e câncer oral: estudo caso-controle na Região Metropolitana de São Paulo, Brasil. **Cad. Saúde Pública**, Rio de Janeiro, v.23, n.3, p.553-564. Mar 2007.

MCCAWLEY, L. J.; MATRISIAN, L. M. Matrix metalloproteinases: they're not just for matrix anymore! **Curr. Opin. Cell Biol.,** v. 13, n. 5, p. 534-40, 2001.

MEHANNA, H.M. et al.Treatment and follow-up of oral dysplasia — a systematic review and meta-analysis. **Head & Neck,** —DOI 10.1002/hed December 2009.

MEURMAN, J.H. Infectious and dietary risk factors of oral cancer. **Oral oncology.** v.46, 411-413, 2010.

NAGASE, Hideaki e WOESSNER Jr, J. Frederick. Matrix Metalloproteinases. **The Journal of Biological Chemistry.** v. 274, n.31, 21491-21494, 1999.

NAPIER, S.S.; SPEIGHT, P.M. Natural history of potentially malignant oral lesions and conditions: an overview of the literature**. J Oral Pathol Med**. v.37, p. 1-10, 2008.

NEVILLE, B. D. et al. **Patologia Oral & Maxilofacial.** 4.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008.

NYBERG, P. *et al.* Endostatin inhibits human tongue carcinoma cell invasion and intravasation and blocks the activation of matrix metalloprotease-2, -9, and -13. **J. Biol. Chem.,** v. 278, n. 25, p. 22404-11, 2003.

PAGE-MCCAW, A. *et al.* Matrix metalloproteinases and the regulation of tissue remodelling. **Nat. Rev. Mol. Cell Biol.,** v. 8, n. 3, p. 221-33, 2007.

PARISE, JR.O. **Câncer de boca: aspectos básicos e terapêuticos / Oral cancer: basic and therapeutical aspects**. Säo Paulo: Sarvier. p. 256, 2000.

PEREIRA, A. C. et al. O papel das MMP-2 e -9 no desenvolvimento do carcinoma epidermóide. **Revista Brasileira de Cancerologia.** v.52, n.3, 257-262, 2006.

PEREIRA, J. S. et al. Epidemiology and correlation of the clinicopathological features in oral epithelial dysplasia: analysis of 173 cases. **Annals of Diagnostic Pathology.** p.98-102, 2011.

PINDBORG, J. J., et al. Histological Typing of Cancer and Precancer of the oral Mucosa. **World Health Organization International Histological Classification of Tumours.** Springer, v. 1, ed. 2, p. 11-13, 1997.

RODRIGUES, T. L. C. et al. Leucoplasias bucais relação clínico-histopatológica. **Pesqui Odontol Bras**, v. 14, n. 4, p. 357-361, out./dez. 2000.

RUNDHAUG, J. E. Matrix metalloproteinases and angiogenesis. **J. Cell Mol. Med.,** v. 9, n. 2, p. 267-85, 2005.

RUOKOLAINEN, H.; PÄÄKKÖ, P.; TURPENNIEMI-HUJANEM, T. Expression of Matrix Metalloproteinase-9 in Head and Neck Squamous Cell Carcinoma: A Potential Marker. **Clinical Cancer Research.** v. 10, p.3110-3116, May 2004.

SCULLY, C.; BAGAN, J. Oral squamous cell carcinoma overview. **Oral Oncology.** v.45, 301-308, 2009.

SHARMA, N.; HOSMANI, J. V.; TIWARI, V**.** Epithelial Dysplasia: different grading system and its applications. **Journal of International Oral Health,** 2010.

SHIBOSKI, C.H.; SCHMIDT, B.L.; JORDAN, R.C. Tongue and tonsil carcinoma: increasing trends in the US population ages 20-44 years. **Cancer.** v. 103, n. 9, p. 1843-1849, 2005.

SHIMAMAURA et al. Immunohistochemical analysis of oral dysplasia: diagnostic assessment by fascin and podoplanin expression. **Acta Histochem. Cytochem**. v. 44, n. 6, p. 239–245, 2011.

SINGH, R. D.; et al. Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors: Correlation with Invasion and Metastasis in Oral Cancer. **Ind J Clin Biochem.** v.25. 250-259, 2010.

STAMENKOVIC, I. Extracellular matrix remodeling: the role of matrix metalloproteinases. **Journal of Pathology.** v.200, p.448-464, 2003.

STERNLICHT, M. D., WERB, Z. How matrix metalloproteinases regulate cell behavior. **Annu. Rev. Cell Dev. Biol.,** v. 17, p. 463-516, 2001.

TABOR, M.P.; et al. Comparative molecular and histological grading of epithelial dysplasia of the oral cavity and the oropharynx. **Journal of Pathology.** p.354-360, 2003.

THOMSON, P. J. **Oral precancer: diagnosis and management of potentially malignant disorders.** Ed. Wiley-Blackwell. 2012.

THOMSON, P. J., HAMADAH, O. Cancerisation within the oral cavity: the use of 'field mapping biopsies' in clinical management. **Oral Oncology.** v.43. p.20-26, 2007.

TILAKARATNE, W. M. et al. Grading oral epithelial dysplasia: analysis of individual features. **J Oral Pathol Med**. v.40: 533-540, 2011.

VAN DER WAAL, I. Potentially malignant disorders of the oral oropharyngeal mucosa; present concepts of management. **Oral oncology.** v. 46, p. 423-425, 2010.

VAN DER WAAL, I. et al. Oral leukoplakia: a clinicopathological review. **Oral Oncol**, v. 33, n. 5, p. 291-301, Oct. 1997.

VAN DER WAAL, I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. **Oral Oncology.** v.45, p. 317-323, 2009.

VICENTE, J. C.; et al. Expression and clinical significance of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**. v.41. p.283-293, 2005.

VICENTE, J. C.; et al. Immunoexpression and prognostic significance of TIMP-1 and -2 in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**. v. 41, p.568-579, 2005.

VIHINEN, P.; KAHARI, V. M. Matrix metalloproteinases in cancer: prognostic markers and therapeutic targets. **Int. J. Cancer,** v. 99, n. 2, p. 157-66, 2002.

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

WARNAKULASURIYA, S., et al. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. **J Oral Pathol Med**, v.36, n.10, p.575-580, 2007.

WARNAKULASURIYA, S. et al**.** Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. **J Oral Pathol Med.** v.37, p.127-133, 2008.

WOESSNER Jr, J. F. MMPs and TIMPs-An Historical Perspective. In: **Molecular Biotechnology.** v. 22. 33-49, 2002.

WOESSNER, J. F., JR. MMPs and TIMPs. An historical perspective. **Methods Mol. Biol.,** v. 151, p. 1-23, 2001.

4.2 ARTIGO 2

Análise da expressão de TIMP-1 em Leucoplasia e Carcinoma de Células Escamosas Orais e correlação com aspectos displásicos

RESUMO

O estudo atual da transição da displasia epitelial oral, presente em lesões como a leucoplasia, para o carcinoma de células escamosas envolve não somente aspectos histopatológicos, como também a análise da presença de biomarcadores os quais influenciam o microambiente no qual as células estão inseridas. OBJETIVO: avaliar o perfil da expressão de TIMP-1 em casos de leucoplasias e CCE classificados em diferentes graus de displasia e graus histopatológicos, respectivamente. Confrontar os achados imuno-histoquímicos com os aspectos microscópicos adotados na classificação das lesões. MATERIAIS E MÉTODOS: foram resgatados casos de leucoplasia e CCE do Serviço de Anatomia Patológica Bucal do Curso de Odontologia da Universidade Federal do Espírito Santo (SAPB-UFES), entre os anos 2004-2010 e submetidos a ensaio imuno-histoquímico para determinação do perfil de expressão de TIMP-1. Foram avaliados parênquima, bem como as diferentes camadas do epitélio e estroma. RESULTADOS: Em todos os casos foi detectada presença de TIMP-1 no estroma e no parênquima. Na leucoplasia leve a camada basal e com hiperplasia apresentou imunomarcação intensa, já as células com perda de polaridade tiveram expressão menor. Na leucoplasia moderada todas as camadas do epitélio, exceto a córnea apresentaram marcação. A leucoplasia severa teve a camada espinhosa mais intensamente marcada, sem variação em áreas com pleomorfismo. O CCE grau I apresentou as ilhas mais profundas com marcação intensa em células com pleomorfismo e mitoses. Nas ilhas tumorais, células menos diferenciadas tiveram marcação menor e em pérolas córneas a marcação foi fraca ou ausente nas células centrais. No CCE grau II foi observada marcação em células basais com hiperplasia e células da camada espinhosa, a camada parabasal não foi marcada. Também nas ilhas, células menos diferenciadas não expressaram a proteína e não houve marcação em pérolas córneas. CONCLUSÃO: foi possível detectar imunomarcação para TIMP-1 em todos os espécimes, com variação em intensidade e localização. A ausência de expressão em células menos diferenciadas sugere que lesões mais agressivas possuem redução da enzima. O microambiente é importante para as diversas atividades celulares, e TIMP é uma enzima que participa da remodelação da matriz, portanto, alteração na sua expressão pode ser uma valiosa ferramenta no melhor entendimento da carcinogênese da mucosa oral.

***PALAVRAS CHAVES:** leucoplasia oral, carcinoma de células escamosas, câncer oral, inibidor tecidual de metaloproteinase-1.

*Fonte: Descritores em Ciências da Saúde (DeCS)

ABSTRACT

The current study about transition of oral epithelial dysplasia, a feature present in lesions such as leukoplakia, for squamous cell carcinoma involves not only histopathological aspects, but also the analyze of biomarkers presence which influence the microenviroment where cells are embedded. OBJETIVE: Evaluate TIMP-1 profile in cases of leukoplakia and SCC classified into different grades of dysplasia and histological grades, respectively. The immunohistochemical findings were confronted with microscopic features adoted in classification of each injury. MATERIALS AND METHODS: Cases of leukoplakia and SCC were rescued from files of Oral Pathology Service of Dentistry School of Federal University of Espirito Santo (SAPB-UFES), between 2004-2010. New slides were obtained and submitted to immunohistochemical assay to determine expression profile of TIMP-1. Parenchyma and stroma were evaluated, and different layers of the epithelium. RESULTS: In all cases were detected presence of TIMP-1 in the stroma and parenchyma. In light leukoplakia the basal layer with hyperplasia showed intense immunostaining, on the other hand, cells with loss of polarity had lower expression. In moderate leukoplakia all epithelium layers, except the cornea, presented labeling. Spinous layer of severe leukoplakia was the most intensely marked, without variation in areas with pleomorfism. In SCC grade I, the deeper islands showed intense cells labeling in areas of pleomorphism and mitoses. Tumor islands the less differentiated cells were pour marked and central cells of keratin pearl showed a weak or absent TIMP-1 expression. In SCC grade II labeling was observed in basal cell and in spinous layer, however, parabasal layer was not marked. Also on tumor islands, less differentiated cells did not express the protein and keratin pearls were not marked. CONCLUSION: It was possible to detect TIMP-1 immunostaining in all specimens, ranging in intensity and location. The absence of expression in less differentiated cell suggest that in more aggressive lesions expression enzyme is reduced. The microambient is important for diverse cellular activities, and TIMP is an enzyme that participates in matrix remodeling, thus changes in its expression can be a valuable tool in understanding oral carcinogenesis.

***KEYWORDS:** oral leukoplakia, squamous cell carcinoma, oral cancer and tissue inhibitor of metalloproteinase-1.

*Fonte: Descritores em Ciências da Saúde (DeCS)

INTRODUÇÃO

A leucoplasia oral, desordem potencialmente maligna mais frequente na cavidade oral (VAN DER WAAL et al., 1997) e o Carcinoma de Células Escamosas (CCE), neoplasia maligna mais comum na região maxilo-facial figuram entre as lesões de maior interesse para o entendimento da carcinogênese oral. Essas lesões compartilham características clínicas e microscópicas similares e ao mesmo tempo diferentes e próprias (SPEIGHT, 2007) que as distanciam, quanto a sua repercussão na saúde do indivíduo e na forma de abordagem profissional (KADEMANI, 2007).

A carcinogênese é descrita como um processo complexo multipasso e multifatorial, através do qual uma série de eventos resulta em perda do equilíbrio entre proto-oncogenes ativados e genes supressores, que conduzem à transformação celular, autonomia e crescimento descontrolado. Todos esses eventos podem ocorrer devido a influências de exposição à carcinógenos e/ou fatores inerentes ao hospedeiro ao longo da vida e em sucessivos passos, levando a transformação de múltiplos genes (COTRAN; KUMAR; COLLINS, 2006). A perda de regulação desses genes, portanto é a base molecular para mudanças fenotípicas que envolvem desenvolvimento de imortalidade celular, habilidade de invadir tecidos, gerar metástase e induzir angiogênese (HASINA e LINGEN, 2001).

O conceito do desenvolvimento do câncer na mucosa oral envolve as alterações mencionadas, como também de maneira bem estabelecida, a presença inicial de uma lesão precursora. Dentro desse contexto, a lesão mais conhecida é a leucoplasia (REIBEL, 2003).

Contudo, entre as alterações fenótipas da mucosa oral, é importante dar destaque a displasia epitelial, um campo de estudo fundamental para o entendimento da transformação maligna das desordens com potencial de malignização, como ocorre com a leucoplasia (WANARKULASURYIA et al., 2008). A análise dos aspectos teciduais e citológicos preconizada pela OMS (2005) norteia a graduação das lesões precursoras em leve, moderada e severa, carcinoma *in situ* e propriamente o carcinoma invasivo.

Apesar da identificação do grau de displasia epitelial oral ser amplamente aceita e considerada a mais importante ferramenta para predizer o risco de transformação maligna, ainda é subjetiva e controversa (TILAKARTNE et al., 2009).

Reibel (2003) lista 3 grandes problemas nessa associação de lesões com displasia epitelial oral e a sua transformação: 1- diagnóstico subjetivo; 2 – nem todas lesões que exibem displasia epitelial, tornam malignas e algumas até regridem; 3 – carcinomas podem desenvolver de lesões sem diagnóstico prévio de displasia epitelial nas biópsias.

Diante do exposto, fica evidente a necessidade de outras ferramentas que possam auxiliar os profissionais na determinação do risco de transformação maligna na cavidade oral. Assim, a utilização de marcadores biológicos e genômicos se tornaram bons candidatos no aprimoramento da avaliação prognóstica das lesões precursoras do câncer de boca.

Os biomarcadores podem auxiliar num diagnóstico mais preciso para a displasia epitelial. Nesse contexto, com objetivo de avaliar a associação dos aspectos histopatológicos da displasia epitelial oral com biomarcadores, Shimamaura e colaboradores (2011) compararam a marcação da fascina e da podoplanina, em lesões com diferentes graus de displasia, em carcinomas *in situ* e carcinomas invasivos, considerando-as ferramentas chaves para o diagnóstico preciso deste grupo de lesões com potencial de malignização.

Outros estudos, utilizando diferentes biomarcadores, como perlecan, MMPs e TIMPs, para esclarecer a carcinogênese oral tem sido publicados (IKARASHI et al., 2004, BAKER et al., 2006; TILAKARATNE et al., 2009; SINGH et al., 2010; BARROS et al., 2011).

Ikarashi e colaboradores, em 2004, demonstraram que as células epiteliais displásicas ou do carcinoma *in situ* são capazes de produzir e depositar moléculas da MEC, antes de adquirem a natureza invasiva. Com 82 biópsias de epitélio normal, hiperplásico, displásico e do carcinoma, avaliaram perlecan e proteoglicano de heparam sulfato, imunohistoquimicamente e mostraram diferenças topográficas

na expressão, sendo superexpressadas nas células epiteliais displásicas com a redução da adesão celular.

Baseados nesses achados, o mesmo grupo de pesquisadores avaliou as diferenças de expressão entre as MMPs no progresso da displasia epitelial oral para CCE na tentativa de reconhecer centros de proliferação bem como confirmar a remodelação da MEC intraepitelial. Examinaram MMP-1, -2 e -7 em 20 casos de displasia oral, carcinoma *in situ* e CCE e sugeriram que o aumento da MMP-7, teria um papel importante na proliferação celular e na transformação maligna, tornando um instrumento valioso nessa identificação (TILAKARATNE et al., 2009).

As metaloproteases de matriz (MMPs) estão envolvidas em diversos processos, alguns fisiológicos e também patológicos, como o câncer (NAGASE e WOESSNER, 1999). A atividade das MMPs é controlada em ao menos em três níveis: transcrição, ativação proteolítica, e inibição da atividade enzimática por inibidores naturais, enzimas conhecidas como TIMPs (inibidores teciduais de metaloproteinases) (WOESSNER, 2001; 2002). A atividade da rede de MMPs é resultado do balanço entre os níveis da enzima ativa e níveis de TIMPs, que juntas formam um sistema biológico complexo que controla estritamente a degradação da MEC. TIMPs também tem habilidade de formar um complexo com proMMPs regulando o processo de ativação de MMP. Se por um lado já foi demonstrado que as TIMPs bloqueiam atividade de MMPs, aspecto importante na inibição da tumorigênese e consequente progressão da doença, por outro lado, foi demonstrado que essas enzimas podem participar da tumorigênese (JIANG; GOLDBERG; SHI, 2002).

Portanto, TIMPs na tumorigênese são consideradas moléculas multifuncionais, uma vez que atuam regulando proliferação celular, apoptose, atividade de pro-MMP-2 e angiogênese; e paradoxalmente podem com essas ações também facilitar a progressão da doença. O efeito inibitório de TIMP no crescimento tumoral e na metástase foi sugerido pela superexpressão do gene dentro das células neoplásicas, porém, foi demonstrado que TIMP tem efeito estimulatório de crescimento e efeito anti-apoptótico (LAMBERT et al., 2004).

Dessa forma, acredita-se que a função anti-MMP de TIMP pode desempenhar papel inibitório importante durante a fase tardia da progressão do tumor, mas devido as

suas atividades de promoção do crescimento e efeito anti-apoptótico, pode atuar estimulando a formação na fase inicial da lesão (JIANG; GOLDBERG; SHI, 2002).

Dentre as moléculas que fazem parte da família das TIMPs, a mais conhecida é TIMP-1. Sua produção é induzida por estímulos externos, tais como fatores de crescimento (b-FGF, PDGF, EGF) e citocinas (IL-6, IL-1 e IL-1β). É expressa por uma variedade de células incluindo fibroblastos, células endoteliais e epiteliais, osteoblastos, condrócitos, células do músculo liso e muitas células do tumor além de fluido corporal (LAMBERT et al., 2004).

O efeito estimulatório para o crescimento celular de TIMP-1 foi inicialmente reconhecido na atividade eritróide, porém, sabe-se que tal efeito não se limita a esse tipo celular. Em queratinócitos normais, fibroblastos, células do adenocarcinoma de pulmão e células do melanoma também já foi demonstrado efeito mitogênico (JIANG; GOLDBERG; SHI, 2002).

O aumento da expressão foi relatado como um aspecto paradoxalmente associado a prognóstico negativo em muitos tumores sólidos, como em câncer de mama, câncer colo retal, câncer de estômago e de pulmão (JIANG; GOLDBERG; SHI, 2002). Também foi relacionado com metástase loco regional e a distância. Vale ressaltar ainda que, o alto nível de TIMP-1 no plasma de pacientes com câncer sugere que a molécula é um marcador da progressão do câncer (PALIKHE et al., 2010).

A partir do exposto, fica evidenciado que a aplicação de técnicas de biologia celular e molecular, as quais permitem melhor entendimento dos eventos que contribuem para o surgimento, crescimento tumoral, invasão e metástases, sejam aplicadas para o estudo da carcinogênese oral. Algumas pesquisas demonstraram que a análise da expressão, regulação e localização da proteína TIMP-1 pode ser utilizada como possível marcador do prognóstico da invasividade em tumores de origem epitelial, como o CCE oral.

Assim, o presente trabalho avaliou o perfil da expressão de TIMP-1 na leucoplasia, lesão considerada como precursora do CCE, bem como no próprio tumor em diferentes graus de displasia e graus de diferenciação, respectivamente. Com intuito traçar o perfil dessa importante proteína e suas mudanças conforme a gravidade da lesão. Por fim, os achados imuno-histoquímicos foram confrontados com os

aspectos histopatológicos adotados na classificação de cada lesão para o estabelecimento de possíveis associações entre a expressão de TIMP-1 e as alterações teciduais e celulares.

MATERIAIS E MÉTODOS

A amostra foi constituída pelos casos de leucoplasia e de CCE, registrados no Serviço de Anatomia Patológica Bucal do Curso de Odontologia da Universidade Federal do Espírito Santo (SAPB-UFES), entre os anos de 2004-2010. Para os estudos histopatológico e imuno-histoquímico foram resgatados os blocos parafinados do acervo do SAPB-UFES.

Foi considerado como critério de inclusão a presença de material suficiente nos blocos de parafina para obtenção das novas lâminas. Os espécimes de leucoplasia e CCE parafinizados, foram obtidos por biópsia incisional ou excisional, de pacientes referenciados ao Programa de Prevenção e Diagnóstico Precoce de Câncer de Boca e Lesões de Boca – SIEX/PROEX, desenvolvido pelas disciplinas de Estomatologia e Cirurgia Bucomaxilofacial II do Departamento de Clínica Odontológica da UFES. O estudo foi submetido ao Comitê de Ética em Pesquisa em humanos – Centro de Ciências da Saúde/UFES e aprovado com protocolo e registro número 70/10 (ANEXO).

PROCESSAMENTO IMUNO-HISTOQUÍMICO PARA TIMP-1

Para o ensaio imuno-histoquímico, os blocos de parafina foram submetidos à microtomia manual para obtenção de cortes de 3 µm de espessura (micrótomo Leica RM212 RT, Leica Biosystems Nussioch GmbH, Alemanha). Os cortes passaram por uma solução de álcool a 30% com a finalidade de esticá-los e depois imersos em banho maria a 45°C (Lupetec BH 05), e pescados com lâminas silanizadas (Immunoslide, EasyPath, Brasil) devidamente identificadas.

Os cortes histológicos foram desparafinizados em estufa (FANEM 900Kw, modelo 310, Brasil) a 60º C durante 120 minutos, e diafanizados em três banhos de xilol: xilol II; xilol I e álcool/xilol, tendo cada banho a duração de 05 minutos. Em seguida foram reidratados em concentrações decrescentes de etanol (100%, 90% e 80%) e

água, cada banho com duração de 5 minutos. A remoção do pigmento formólico foi feita com solução de hidróxido de amônio (10%) em etanol (95%) por 10 minutos.

Os cortes foram lavados com TBS-Tween (TBST) por 3 vezes, sendo 5 minutos cada banho, e em seguida foram submetidos à recuperação antigênica, utilizando uma solução tampão citrato (ácido cítrico a 10mM e 0,05% de Tween 20 com pH 6), aquecida entre 95 e 100°C, por 30 minutos. O sistema de detecção por polímeros foi o NovoLink Novocastra (Leica Microsystems, Nussioch GmbH, Alemanha). Para neutralizar a peroxidase endógena foi utilizado Peroxidase Block por 5 minutos seguido de lavagem em TBST 2 vezes de 5minutos. As seções foram incubadas com Protein Block por 5 minutos e novamente lavadas em TBST 2 vezes de 5 minutos. O anticorpo primário utilizado foi o monoclonal anti TIMP-1 (Ms mAb to TIMP-1 [102D1], Abcam) diluído em TBS 1:100 por 60 minutos, em temperatura ambiente e câmara úmida. Os cortes foram novamente lavados em TBST 2 vezes de 5 minutos e incubados com Post Primary Block durante 30 minutos, seguidos de lavagem em TBST 2 vezes de 5 minutos. A seguir os cortes foram incubados com Polymer por 30 minutos e lavados em tampão TBST 2 vezes de 5 minutos. Foi adicionado 50 µl de DAB Chromogen a 1ml de DAB Substrate Buffer (Polymer) para desenvolver a atividade de peroxidase por 5 minutos.

As lâminas foram lavadas em água corrente durante 10 minutos e em seguida enxaguadas em TBST por 3 minutos e submetidas à contra coloração com hematoxilina de Mayer. Procedeu-se a lavagem em água e hidróxido de amônio por 5 minutos; seguidas de nova lavagem em água corrente por 10 minutos. A etapa final do protocolo foi a desidratação em série crescente de álcool 70%, 85%, 90%, absoluto e xilol durante 5 minutos cada e montagem das lâminas com Ervmount (EasyPath, Brasil). O controle negativo foi feito pela omissão do anticorpo primário (dado não ilustrado).

AVALIAÇÃO MICROSCÓPICA DO PERFIL DA EXPRESSÃO DE TIMP-1

A análise da reatividade imuno-histoquímica para TIMP-1 foi realizada por um único examinador, previamente calibrado. As lâminas foram examinadas no Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins (LUCCAR) que dispõe de microscópio óptico (Olympus AX70, Olympus America Inc.,NY, USA).

Para avaliação da imunomarcação foram determinados os seguintes parâmetros:

- ✓ Para leucoplasia: presença ou ausência de coloração acastanhada citoplasmática nos queratinócitos nas diferentes camadas do tecido epitelial da mucosa oral, considerando células em duas áreas das lesões, parênquima e estroma;
- ✓ Para CCE: presença ou ausência de coloração acastanhada citoplasmática nas células neoplásicas, nas ilhas tumorais e no estroma.

Durante toda a etapa de estudo e descrição do perfil de expressão de TIMP-1, conforme os critérios mencionados acima, as lâminas foram examinadas diretamente no microscópio. Dessa forma, objetivas de diferentes aumentos foram utilizadas permitindo uma análise inicial panorâmica, com observação subsequente dos detalhes de marcação nas camadas, ilhas e células. Os achados microscópicos foram compilados e serão apresentados de maneira descritiva.

RESULTADOS

A amostra para análise imuno-histoquímica foi representada pelos espécimes cirúrgicos emblocados com quantidade de material suficiente para obtenção das novas lâminas e composta por 2 casos de cada grau de leucoplasia(leve, moderada e severa) e de 2 casos de cada tipo de CCEs(grau I e grau II).

A imunomarcação para TIMP-1 foi observada em todos os espécimes, com intensidade e localização variando entre as lesões e em locais diferentes em uma mesma lesão.

Expressão de TIMP-1 em lesões de Leucoplasia

Nos cortes de leucoplasia leve, a expressão de TIMP-1 foi detectada em diferentes tecidos e células analisados, incluindo o epitélio de revestimento, fibroblastos e células endoteliais no tecido conjuntivo subjacente, células musculares estriadas esqueléticas e citoplasma de ductos de glândulas mucosas. Com relação ao tecido

epitelial, a marcação foi observada em toda a sua espessura, contudo, quando se analisou as camadas, foi possível identificar que queratinócitos da camada basal apresentaram imunomarcação mais intensa e com aspecto citoplasmático de presença de grânulos contendo a proteína estudada, destacada nas regiões com hiperplasia das células basais. Não foi possível estabelecer padrão de marcação nuclear, algumas células epiteliais apresentaram núcleo corado em azul, enquanto outras, aspecto de imunomarcação, com núcleo acastanhado. Essa variação foi mais evidente nas células com perda de polaridade (Figura 1, A e B).

Na leucoplasia moderada foi detectada imunomarcação em todas as camadas do tecido epitelial de revestimento, com exceção da córnea. Contudo, diferente do observado na leucoplasia leve, não foi identificada variação na intensidade da expressão entre as camadas do epitélio, assim como, não houve predominância de TIMP-1 em relação a qualquer fator displásico (Figura 1, C e D).

Fig.1

Na leucoplasia severa, todas as camadas do tecido epitelial apresentaram expressão de TIMP-1, porém de maneira heterogênea. As células da camada espinhosa foram as que apresentaram imunomarcação mais intensa quando comparadas aos demais estratos do epitélio. Contudo, os queratinócitos dessa camada também apresentaram variação na expressão da proteína, estando entre bem e pouco marcados. Apesar da presença de áreas extensas com pleomorfismo celular e nuclear, nessas regiões não houve variação na expressão de TIMP-1 (Figura 1, E e F).

Expressão de TIMP-1 em lesões de CCE

Ao analisar o CCE grau I foi possível observar expressão de TIMP-1 tanto no parênquima quanto no estroma tumoral, contudo, as células estromais apresentaram intensidade de marcação menor quando em comparação com as células epiteliais (Figura 2, A). No parênquima, a marcação não foi uniforme. As camadas mais profundas da lesão apresentaram marcação intensa em células com pleomorfismo, e em áreas com mitoses (setas), já as células com perda de polaridade apresentaram marcação mais fraca (*) (Figura 2, B). Em regiões invasivas, como as ilhas tumorais, houve variação na imunomarcação, sendo que as células menos diferenciadas tiveram marcação menor (Figura 2, C-seta), enquanto que queratinócitos com aumento de nucléolos e alterações na relação núcleo-citoplasma, a expressão foi maior. Em locais com presença de pérolas córneas bem organizadas foi observada expressão intensa nos queratinócitos periféricos e marcação fraca ou ausente nas células centrais (Figuras 2, D-F).

Fig 2 imuno

No CCE grau II, estroma e parênquima apresentaram marcação heterogênea (Figura 3, A). No estroma, foi observada marcação em fibroblastos (Figura 3, B) (*). Já para o parênquima tumoral, houve variação na expressão da molécula conforme a camada. Células basais com hiperplasia apresentaram marcação intensa, assim como as células da camada espinhosa. Contudo, entre essas duas regiões, foi detectada uma faixa de queratinócitos, correspondente a camada parabasal, com queratinócitos não marcados (Figura 3, B-D). Assim como descrito para CCE grau I, nas ilhas tumorais, houve variação na marcação. Células com nucléolos proeminentes possuíam marcação citoplasmática intensa, enquanto aquelas menos diferenciadas deixaram de expressar a proteína (Figura 3, E). Outro aspecto observado foi a não marcação em pérolas córneas, estando essas em menor número e tamanho quando comparadas as pérolas em lesões de CCE grau I (dado não ilustrado). Foi observada a inversão na expressão da molécula em áreas da lesão nas quais a estrutura do epitélio estava mantida, sendo detectada presença de células da camada espinhosa bem marcadas, enquanto que queratinócitos da camada basal e com perda de polaridade, fracamente marcados (Figura 3, F).

Fig 3 imuno

A figura 4 apresenta as lesões avaliadas no estudo, permitindo uma observação panorâmica tanto dos aspectos histopatológicos (A-E), quanto do perfil da imunomarcação (F-J). É possível observar que TIMP-1 foi expressa em todos os casos analisados e de forma heterogênea.

Fig 4 imuno

DISCUSSÃO

O presente estudo teve como objetivo descrever a expressão e distribuição da TIMP-1 em leucoplasia e CCE provenientes de biópsias incisionais e excisionais do SAPB-UFES. A imuno-histoquímica foi utilizada, pois permite a visualização da localização e a correlação com a morfologia, especialmente com eventos celulares na interface estroma/tumor.

Já se sabe que o processo de proteólise é importante em todos os estágios do desenvolvimento e progressão do câncer. Dentro desse contexto, Chambers e Matrisian em revisão (1997), mostraram evidências que sugerem papel complexo de MMPs nas etapas anteriores e após a degradação da MEC. Tanto as enzimas, quanto os seus inibidores, como as TIMPs, se mostraram importantes reguladores de crescimento tumoral, atuando sobre os sítios primários e metastáticos das neoplasias.

O desequilíbrio entre MMPs e TIMPs é aspecto reconhecido que favorece a degradação da MEC, facilitando a invasão e metástase tumoral. Entre as várias MMPs envolvidas na tumorigênese, estudos vêm mostrando que a MMP-2 e a MMP-9 desempenham papel relevante na progressão tumoral. Suas expressões aumentadas já foram observadas em várias neoplasias, e esse aumento quase sempre vem acompanhado de atividades invasiva e metastática maiores, que levam a uma diminuição da sobrevida do paciente (EGEBLAD e WERB, 2002; FREITAS et al., 2007; GAMA-DE-SOUZA et al., 2008).

Embora todos os membros da família TIMP possuem capacidade de inibir atividade de MMPs, já foi descrita que essa inibição é seletiva. Em relação a TIMP-1, alvo desse estudo, Baker et al. (2002) e Lambert et al. (2004) descrevem como inibidor de todas as MMPs, exceto a MMP do tipo membrana e MMP-19 (SURLIN; IOANA e PLESEA, 2011). Ainda, seus alvos preferencias são as MMPs 7, 9, 1 e 3 (BORBOULIA; STETLER-STEVENSON, 2010).

Porém, a literatura também demonstrou que as TIMPs estão envolvidas em várias atividades biológicas, incluindo diferenciação celular, crescimento, migração, invasão, angiogênese, e apoptose, e todos esses efeitos celulares são mediados

independentemente de sua capacidade de inibir atividade de MMPs (BREW; NAGASE, 2010).

Ainda, outro aspecto importante a se destacar é a diversidade de atividades dessa família de moléculas. Embora sejam proteínas secretadas e com funcionamento extracelular, já tiveram identificados receptores de superfície, sugerindo, portanto um controle do comportamento celular com sinalização conhecida como “de fora para dentro da célula” (BORBOULIA; STETLER-STEVENSON, 2010).

Ao demonstramos que lesões de leucoplasia e de CCE orais expressam a molécula TIMP-1, torna-se possível buscar correlações entre o perfil da expressão com aspectos histopatológicos os quais são relevantes na determinação da gravidade de cada lesão, seja ela o carcinoma propriamente dito ou sua lesão precursora.

O perfil da imunomarcação não somente sofreu variação entre as lesões (leucoplasias e CCEs), como também dentro de cada lesão. Nos casos de leucoplasias, independente do grau de displasia, todas expressaram TIMP-1 nos tecidos epitelial, conjuntivo e muscular estriado esquelético. Para a leucoplasia classificada com grau de displasia leve a expressão de TIMP-1 foi mais evidente na camada basal e em áreas de hiperplasia basal. De maneira diferente, as células da camada basal que apresentaram perda de polaridade tiveram expressão menor da molécula quando em comparação com as demais células. Sendo TIMP-1 uma molécula sintetizada e secretada, sugere-se que a desorganização do citoplasma e da maquinaria envolvida na síntese, em função da perda de polaridade, pode ter resultado em diminuição da produção e acúmulo da proteína.

Para a leucoplasia moderada, não foi estabelecida nenhuma correlação entre fatores displásicos e expressam de TIMP-1, enquanto que para leucoplasia severa todas as camadas do tecido epitelial apresentaram expressão de TIMP-1, porém de maneira heterogênea. As células da camada espinhosa foram as que apresentaram imunomarcação mais intensa e os queratinócitos dessa camada também apresentaram variação na expressão da proteína, estando entre muito e pouco marcados, independente do pleomorfismo celular e nuclear.

Apesar das moléculas de TIMP terem uma função reguladora da remodelação de MEC, é importante ressaltar que já foram encontrados sítios de ligação para TIMP-1 na superfície celular de queratinócitos, fibroblastos e células tumorais, como

no câncer de mama. Embora esse grupo de receptores ainda necessite de mais estudos, acredita-se que possam participar da transdução de sinais intracelulares (BERTAUX et al., 1991; CORCORAN, STETLER-STEVENSON, 1995).

Embora o padrão de distribuição de TIMP-1 tenha variado entre as leucoplasias, conforme mencionado, e que tenha sido possível correlacionar alguns aspectos celulares da displasia com presença maior ou menor da molécula, ainda restam lacunas que precisam ser preenchidas para que se possa definir a relação entre expressão da enzima e assim como de outras TIMPs e a gradação da displasia nessa importante lesão precursora do CCE oral.

Algumas dessas lacunas vem sendo preenchidas com estudos em desordens com potencial de malignização, como é o caso das leucoplasias, e os diferentes graus displásicos de lesões e condições. Chen e colaboradores em 2008 avaliaram MMPs-2 e -9 e TIMP-2 no espectro de liquens planos: não atrófico, atrófico e em carcinomas originados de líquen plano, na tentativa de elucidar o balanceio entre essas proteínas na progressão para o CCE. Nas lesões sem a presença de fatores displásicos, a expressão da TIMP-2 foi de moderada a forte, principalmente, no citoplasma das células basais e espinhosas, contrariamente a imunomarcação da MMPs. Apesar do aumento da TIMP-2 durante a cancerização do líquen plano, sua expressão foi menor que a das MMPs,

Poucos estudos relacionam a expressão do TIMP-1 com as leucoplasias e seus graus de displasias. Esse fato se tornou um desafio durante a análise, mas ao mesmo tempo foi motivador, no entendimento do seu papel na carcinogênese, vastamente descrito em outros tipos de câncer. Sutinen e colaboradores (1998) compararam a expressão de TIMP-1mRNA em lesões com displasia epitelial oral (leve, moderada e severa), líquen plano oral, CCE e linfonodos com metástase. Os resultados não foram notáveis para as displasias epiteliais e líquen plano, porém foi observada imunomarcação positiva e fraca no estroma do CCEs orais e nos linfonodos, sugerindo uma menor ativação nas áreas do carcinoma propriamente estabelecido.

Nossas análises mostraram que nas lesões de CCE foi possível identificação da proteína tanto no estroma quanto no parênquima tumoral, com os fibroblastos do CCE grau II apresentando marcação mais evidente. Vicente et al. (2005) em estudo

da imunorreatividade de TIMP-1 em 45 casos de CCE, relataram 19 casos (28%) em que a molécula também era expressa no estroma e ao redor das células tumorais. Vale ressaltar que o microambiente, antes considerado apenas como estrutura de suporte passivo, foi reconhecido como fator dinâmico efetivo na progressão tumoral. Além das células estromais, esse ambiente contém MEC, proteínas e seus inibidores, vasos, nervos e células do sistema imune, as quais são importantes participantes do processo.

Contudo, foi no parênquima tumoral em que as variações de marcação apresentaram alguns aspectos importantes e que devem ser considerados e pontuados, principalmente no que se refere a presença ou ausência de TIMP-1 em áreas invasivas, como as ilhas tumorais, e células menos diferenciadas.

Para o CCE grau I foi detectada presença de TIMP-1 em todas as camadas do epitélio, o mesmo não ocorrendo no CCE grau II. Nesse último, células basais com hiperplasia apresentaram marcação intensa, assim como as células da camada espinhosa. Porém, entre essas duas regiões foi detectada uma faixa de queratinócitos, correspondente a camada parabasal, não marcados.

Vicente et al (2005) também detectaram presença da proteína em CCE com expressão heterogênea. Os autores descreveram que 45 (66,2%) de 68 casos de CCE apresentaram marcação, sendo 11 (16,2%) fortemente expressa, 16 (23,5%) com imunomarcação entre 10% e 50% das células do tumor e 18 (26,5%) expressaram menos do que 10% de células positivas e 23 casos foram negativos.

A análise realizada nesse trabalho permitiu ainda caracterizar as camadas mais profundas dos CCEs como as com marcação intensa em células com pleomorfismo e em áreas com mitoses, sejam elas típicas ou atípicas. Já as células com perda de polaridade estavam com menor expressão. Esse último aspecto foi semelhante ao descrito para leucoplasias leve e severa.

Devemos destacar o perfil da imunomarcação em regiões invasivas, como as ilhas tumorais. Nesses locais, tanto para CCE grau I quanto grau II houve variação na imunomarcação, sendo que as células menos diferenciadas tiveram marcação

menor, enquanto que queratinócitos com aumento de nucléolos e alterações na relação núcleo-citoplasma, a expressão foi maior. As células que mantinham aspectos microscópicos que caracterizam o epitélio, como justaposição e alguma polaridade, eram as que ainda expressavam TIMP-1. Porém, o CCE grau II apresentava suas ilhas com maior proporção de células indiferenciadas e portanto, menos marcadas quando em comparação ao grau I. Esses dados corroboram com Vicente et al. (2005), que observaram a presença de TIMP-1 em ninhos e cordões epiteliais em três padrões distintos, sendo homogênea somente na parte central do ninho de células tumorais e disperso ou irregular.

A literatura, ainda é controversa quanto à expressão de TIMP-1 e seu papel na tumorigênese. Já foi demonstrado que sobreexpressão de TIMP-1 inibe crescimento e metástase de melanoma (KHOKHA, 1994), suprime a capacidade metastática das células do câncer gástrico humano (WATANABE et al., 1996) e de células de carcinoma escamoso oral (NII et al., 2000).

Por outro lado, também houve relatos associando TIMP-1 com potencial de invasão e metástase. Palikhe e colaboradores (2010), em estudo com pacientes com câncer de cabeça e pescoço avaliou o nível de TIMP no plasma e encontraram associação entre a concentração de TIMP e maior sobrevida; como TIMP inibe MMP e também funciona como fator de crescimento, pode influenciar diretamente na progressão do câncer.

Nossos achados sugerem que áreas invasivas, como ilhas tumorais, em que é possível detectar células que estão perdendo suas características de epitélio e que como consequência possuem comportamento mais agressivo, a expressão de TIMP-1 está reduzida. No entanto, para melhor avaliação, seria necessário estudo com análise semi-quantitativa ou quantitativa, além da descritiva.

Em locais com presença de pérolas córneas bem organizadas foi observada expressão intensa nos queratinócitos periféricos e marcação fraca ou ausente nas células centrais. As pérolas são áreas de queratinização que remetem ao evento normal de formação da camada córnea, mas que nos CCEs ocorrem de maneira intraepitelial e não na superfície do tecido (NEVILLE et al., 2008). A imunomarcação negativa nessas estruturas, que são características de CCE, sugere que as células achatadas, eosinófilas e translúcidas, cujos núcleos e organelas citoplasmáticas foram digeridas por enzimas lisossomais e cujo citoplasma repleto de numerosos

tonofilamentos de queratina, impossibilitaram a marcação por TIMP-1 (JUNQUEIRA e CARNEIRO, 2006).

Devemos ressaltar que, no estudo da carcinogênese e da doença estabelecida, invasão e a metástase são aspectos que podem ser avaliadas microscopicamente e clinicamente, já a expressão de TIMP-1 pode ser uma valiosa ferramenta de auxílio diagnóstico, sendo possível sua análise por meio de imuno-histoquímica. Apesar das marcações com anticorpos monoclonais serem bastante específicas e evidenciarem o comportamento biológico das células, a quantificação visual nem sempre é precisa. Portanto, é importante ressaltar que um desafio significativo dessa técnica é a determinação da intensidade da marcação, pois a mesma pode apresentar grande variabilidade.

Sendo assim, o estudo do padrão da expressão de TIMP-1 tem apresentado, em sua grande maioria, análises subjetivas ou semiquantitativas, atribuindo escores aos diferentes níveis de imunomarcação. Nesse estudo, a análise da expressão da proteína em questão se restringiu à comparação de intensidade entre os diferentes tecidos em um mesmo corte impossibilitando comparações com outros estudos que atribui escores.

Todavia, a realização de estudos que buscam justamente identificar biomarcadores que possam inibir a atividade das MMPs, e com isso uma possível redução na progressão da doença ou até mesmo na malignização de lesões precursoras, tem seu valor como ferramenta auxiliar não somente no prognóstico, como também para o estabelecimento de futuros candidatos a agentes terapêuticos. Dentre esses medicamentos pode-se citar os peptideomiméticos, os não-peptideomiméticos, os derivados da tetraciclina e os bisfosfonatos, sendo que todos interferem na expressão e ativação das MMPs, reduzindo a função dessas enzimas e consequente degradação da MEC, dessa maneira inibindo a função das MMPs como forma alternativa de terapia anti-câncer (CHAUDHARY et al., 2010).

CONCLUSÃO

Baseado nos experimentos e análises realizados, concluímos que:

- ✓ O padrão de expressão de TIMP-1 teve associação com aspectos celulares displásicos, como hiperplasia da camada basal e perda de polaridade nas leucoplasias e CCEs, independente dos graus de displasia e diferenciação, respectivamente;
- ✓ Nos CCEs, nas áreas do parênquima tumoral povoadas por células que sofreram o processo de desdiferenciação tiveram expressão menor ou até mesmo ausente de TIMP-1;
- ✓ No CCE grau II as áreas de ilhas tumorais com perda de aspectos microscópicos de tecido epitelial e menor expressão de TIMP-1, foram mais frequentes do que no CCE grau I.

6 REFERÊNCIAS

BAKER, E. A., et al. **The matrix metalloproteinase system in oral squamous cell carcinoma**. In: British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery v. 44. p. 482-486, 2006.

BARROS, Simone Souza Lobão; et al. **Immunohistochemical expression of matrix metalloproteinases in squamous cell carcinoma of the tongue and lower lip**. In: Arquives of oral Biology, 56. p. 752-760, 2011.

BOURBOULIA, Dimitra e STETLER-STEVENSON, William G.. **Matrix MetalloProteinases (MMPs) andTissue Inhibitors of MetalloProteinases (TIMPs): positive and negative regulators intumor cell adhesion**. In: National Institute of Health – NIH Public Access – Author Manuscript, Semin Cancer Biol. p. 161-168, 2010.

CARRARD, C. V. et al. Álcool e Câncer Bucal: Considerações sobre os Mecanismos Relacionados. **Revista Brasileira de Cancerologia.** 54. (1). 49-56. 2008.

EGEBLAD, M.; WERB, Z. New functions for the matrix metalloproteinases in cancer progression. **Nat. Rev. Cancer,** v. 2, n. 3, p. 161-74, 2002.

Estimativa 2012: incidência de câncer no Brasil / Instituto Nacional de Câncer. – Rio de Janeiro: INCA, 2009.

FREITAS, V. M. *et al*. SIKVAV, a laminin alpha alpha1-derived peptide, interacts with integrins and increases protease activity of a human salivary gland adenoid cystic carcinoma cell line through the ERK 1/2 signaling pathway. **Am. J. Pathol.,** v. 171, n. 1, p. 124-38, 2007.

GAMA-DE-SOUZA, L. N. *et al.* Adhesion and protease activity in cell lines from human salivary gland tumors are regulated by the laminin-derived peptide AG73, syndecan-1 and beta1 integrin. **Matrix Biol.,** v. 27, n. 5, p. 402-19, 2008.

INCA/MS. Carcinoma epidermóide da Cabeça e Pescoço – Condutas do INCA/MS. Revista Brasileira de Cancerologia. v.47, n.4, p.361-376, 2001.

KUJAN, O. et al. Why oral histopathology suffers inter-observer variability on grading oral epithelial dysplasia: An attempt to understand the sources of variation. **Oral Oncology**. v. 43. 224-231, 2007.

NAGASE, Hideaki e WOESSNER Jr, J. Frederick. Matrix Metalloproteinases. **The Journal of Biological Chemistry.** v. 274, n.31, 21491-21494, 1999.

NEVILLE, B. D. et al. **Patologia Oral & Maxilofacial.** Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2008. p.314-352.

PEREIRA, A. C. et al. O papel das MMP-2 e -9 no desenvolvimento do carcinoma epidermóide. **Revista Brasileira de Cancerologia.** v.52, n.3, 257-262, 2006.

PEREIRA, Joabe dos Santos; et al. Epidemiology and correlation of the clinicopathological features in oral epithelial dysplasia: analysis of 173 cases. **Annals of Diagnostic Pathology.** p.98-102, 2011.

SHIMAMAURA et al. Immunohistochemical analysis of oral dysplasia: diagnostic assessment by fascin and podoplanin expression. **Acta Histochem. Cytochem**. v. 44, n. 6, p. 239–245, 2011.

SINGH, Ragini D.; et al. Matrix Metalloproteinases and Their Inhibitors: Correlation with Invasion and Metastasis in Oral Cancer. **Ind J Clin Biochem.** v.25. 250-259, 2010.

TILAKARATNE, W. M. et al. Grading oral epithelial dysplasia: analysis of individual features. **J Oral Pathol Med**. v.40: 533-540, 2011.

VICENTE, J. C.; et al. Expression and clinical significance of matrix metalloproteinase-2 and matrix metalloproteinase-9 in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**. v.41. p.283-293, 2005.

VICENTE, J. C.; et al. Immunoexpression and prognostic significance of TIMP-1 and -2 in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**. v. 41, p.568-579, 2005.

WARNAKULASURIYA, S., *et al.* Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. **J Oral Pathol Med**, v.36, n.10, p.575-580, 2007.

WARNAKULASURIYA, S.; et al**.** Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. **J Oral Pathol Med.** v.37, p.127-133, 2008.

WOESSNER Jr, J. Frederick. MMPs and TIMPs-An Historical Perspective. In: **Molecular Biotechnology.** v. 22. 33-49, 2002.

WOESSNER, J. F., JR. MMPs and TIMPs. An historical perspective. **Methods Mol. Biol.,** v. 151, p. 1-23, 2001.

APÊNDICE I

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE
ROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM CLÍNICA ODONTOLÓGICA

Formulário de coleta de dados clínicos

FORMULÁRIO |___|___|_|_|

1. Nome:	
2. Data de nascimento: |__|__|/|__|__|/|__|__|	3. Ano de atendimento: |__|__|__|__|
4. Idade: |__|__| anos	
5. Raça/cor: **0.** Branco **1.** Negro **2.** Pardo **3.** Amarelo **99.** Sem registro	|__|__|
6. Sexo: **0.** Masculino **1.** Feminino **99.** Sem registro	|__|__|
7. Laudo: _____	
8. Tabagismo: **0.** Sim **1.** Não **99.** Sem registro	|__|__|
9. Etilismo: **0.** Sim **1.** Não **99.** Sem registro	|__|__|

Para todo o formulário preencher com **(99)** as questões **que não estão registrados** no prontuário.

I. DADOS CLÍNICOS

10. Diagnóstico histopatológico da lesão: **1.** Leucoplasia **2.** Carcinoma de célula escamosa |__|
11. Local da lesão: **1.** Assoalho **3.** Língua **5.** Palato **2.** Lábio **4.** Mucosa jugal **6.** Gengiva |__|

II. IDENTIFICAÇÃO DA LESÃO

OBSERVAÇÕES:

APÊNDICE II

Tabela I – Correlação dos dados clínicos com Estratificação epitelial irregular dos casos de leucoplasia

Variáveis	Estratificação epitelial irregular				p-valor
	Sim		Não		
	n	%	n	%	
Faixa etária					
Até 50 anos	6	54,5	10	52,6	0,919
Mais de 50 anos	5	45,5	9	47,4	
Raça/cor					
Branco	7	58,3	12	66,7	0,712
Negro / Pardo	5	41,7	6	33,3	
Gênero					
Masculino	5	41,7	11	55,0	0,465
Feminino	7	58,3	9	45,0	
Tabagismo					
Sim	6	66,7	11	64,7	1,000
Não	3	33,3	6	35,3	
Etilismo					
Sim	1	16,7	4	26,7	1,000
Não	5	83,3	11	73,3	
Local da lesão					
Área retromolar	1	8,3	4	20,0	
Assoalho	1	8,3	1	5,0	
Gengiva	1	8,3	2	10,0	
Lábio	1	8,3	2	10,0	-
Língua	2	16,7	3	15,0	
Mucosa jugal	4	33,3	4	20,0	
Palato	2	16,7	2	10,0	
Múltipla lesão	-	-	2	10,0	

Tabela II – Correlação dos dados clínicos com Hiperplasia de células basais dos casos de leucoplasia

Variáveis	Hiperplasia de células basais				p-valor
	Sim		Não		
	n	%	n	%	
Faixa etária					
Até 50 anos	12	54,5	4	50,0	1,000
Mais de 50 anos	10	45,5	4	50,0	
Raça/cor					
Branco	13	61,9	6	66,7	1,000
Negro / Pardo	8	38,1	3	33,3	
Gênero					
Masculino	11	47,8	5	55,6	1,000
Feminino	12	52,2	4	44,4	
Tabagismo					
Sim	13	68,4	4	57,1	0,661
Não	6	31,6	3	42,9	
Etilismo					
Sim	2	14,3	3	42,9	0,280
Não	12	85,7	4	57,1	
Local da lesão					
Área retromolar	2	8,7	3	33,3	
Assoalho	1	4,3	1	11,1	
Gengiva	3	13,0	-	-	
Lábio	2	8,7	1	11,1	-
Língua	3	13,0	2	22,2	
Mucosa jugal	7	30,4	1	11,1	
Palato	4	17,4	-	-	
Múltipla lesão	1	4,3	1	11,1	

Tabela III – Correlação dos dados clínicos com Variação anormal do tamanho do núcleo (anisonucleose) dos casos de leucoplasia

Variáveis	Variação anormal do tamanho do núcleo				p-valor
	Sim		Não		
	n	%	n	%	
Faixa etária					
Até 50 anos	6	42,9	10	62,5	0,282
Mais de 50 anos	8	57,1	6	37,5	
Raça/cor					
Branco	11	73,3	8	53,3	0,256
Negro / Pardo	4	26,7	7	46,7	
Gênero					
Masculino	9	56,3	7	43,8	0,480
Feminino	7	43,8	9	56,3	
Tabagismo					
Sim	7	53,8	10	76,9	0,411
Não	6	46,2	3	23,1	
Etilismo					
Sim	1	11,1	4	33,3	0,338
Não	8	88,9	8	66,7	
Local da lesão					
Área retromolar	3	18,8	2	12,5	
Assoalho	1	6,3	1	6,3	
Gengiva	1	6,3	2	12,5	
Lábio	2	12,5	1	6,3	0,119
Língua	3	18,8	2	12,5	
Mucosa jugal	2	12,5	6	37,5	
Palato	4	25,0	-	-	
Múltipla lesão	-	-	2	12,5	

Tabela IV – Correlação dos dados clínicos com Variação anormal da forma do núcleo (pleomorfismo nuclear) dos casos de leucoplasia

Variáveis	Variação anormal da forma do núcleo				p-valor
	Sim		Não		
	n	%	n	%	
Faixa etária					
Até 50 anos	1	16,7	15	62,5	0,072
Mais de 50 anos	5	83,3	9	37,5	
Raça/cor					
Branco	5	71,4	14	60,9	1,000
Negro / Pardo	2	28,6	9	39,1	
Gênero					
Masculino	5	71,4	11	44,0	0,394
Feminino	2	28,6	14	56,0	
Tabagismo					
Sim	2	40,0	15	71,4	0,302
Não	3	60,0	6	28,6	
Etilismo					
Sim	-	-	5	29,4	0,532
Não	4	100,0	12	70,6	
Local da lesão					
Área retromolar	1	14,3	4	16,0	
Assoalho	-	-	2	8,0	
Gengiva	-	-	3	12,0	
Lábio	1	14,3	2	8,0	-
Língua	1	14,3	4	16,0	
Mucosa jugal	-	-	8	32,0	
Palato	4	57,1	-	-	
Múltipla lesão	-	-	2	8,0	

Tabela V – Correlação dos dados clínicos com Variação anormal do tamanho da célula (anisocitose) dos casos de leucoplasia

Variáveis	Variação anormal do tamanho da célula				p-valor
	Sim		Não		
	n	%	n	%	
Faixa etária					
Até 50 anos	3	42,9	13	56,5	0,675
Mais de 50 anos	4	57,1	10	43,5	
Raça/cor					
Branco	4	50,0	15	68,2	0,417
Negro / Pardo	4	50,0	7	31,8	
Gênero					
Masculino	4	50,0	12	50,0	1,000
Feminino	4	50,0	12	50,0	
Tabagismo					
Sim	3	50,0	14	70,0	0,628
Não	3	50,0	6	30,0	
Etilismo					
Sim	1	20,0	4	25,0	1,000
Não	4	80,0	12	75,0	
Local da lesão					
Área retromolar	1	12,5	4	16,7	
Assoalho	1	12,5	1	4,2	
Gengiva	1	12,5	2	8,3	
Lábio	1	12,5	2	8,3	0,780
Língua	1	12,5	4	16,7	
Mucosa jugal	1	12,5	7	29,2	
Palato	2	25,0	2	8,3	
Múltipla lesão	-	-	2	8,3	

Tabela VI – Correlação dos dados clínicos com Aumento da relação núcleo-citoplasma dos casos de leucoplasia

Variáveis	Aumento da relação núcleo-citoplasma				p-valor
	Sim		Não		
	n	%	n	%	
Faixa etária					
Até 50 anos	6	46,2	10	58,8	0,491
Mais de 50 anos	7	53,8	7	41,2	
Raça/cor					
Branco	9	69,2	10	58,8	0,708
Negro / Pardo	4	30,8	7	41,2	
Gênero					
Masculino	8	57,1	8	44,4	0,476
Feminino	6	42,9	10	55,6	
Tabagismo					
Sim	6	54,5	11	73,3	0,419
Não	5	45,5	4	26,7	
Etilismo					
Sim	1	12,5	4	30,8	0,606
Não	7	87,5	9	69,2	
Local da lesão					
Área retromolar	1	7,1	4	22,2	
Assoalho	1	7,1	1	5,6	
Gengiva	1	7,1	2	11,1	
Lábio	2	14,3	1	5,6	0,079
Língua	3	21,4	2	11,1	
Mucosa jugal	2	14,3	6	33,3	
Palato	4	28,6	-	-	
Múltipla lesão	-	-	2	11,1	

Tabela VII – Correlação dos dados clínicos com Aumento do tamanho nuclear dos casos de leucoplasia

Variáveis	Aumento do tamanho nuclear				p-valor
	Sim		Não		
	n	%	n	%	
Faixa etária					
Até 50 anos	6	42,9	10	62,5	0,282
Mais de 50 anos	8	57,1	6	37,5	
Raça/cor					
Branco	10	71,4	9	56,3	0,389
Negro / Pardo	4	28,6	7	43,8	
Gênero					
Masculino	9	60,0	7	41,2	0,288
Feminino	6	40,0	10	58,8	
Tabagismo					
Sim	6	50,0	11	78,6	0,218
Não	6	50,0	3	21,4	
Etilismo					
Sim	1	11,1	4	33,3	0,338
Não	8	88,9	8	66,7	
Local da lesão					
Área retromolar	2	13,3	3	17,6	
Assoalho	1	6,7	1	5,9	
Gengiva	1	6,7	2	11,8	
Lábio	2	13,3	1	5,9	0,123
Língua	3	20,0	2	11,8	
Mucosa jugal	2	13,3	6	35,3	
Palato	4	26,7	-	-	
Múltipla lesão	-	-	2	11,8	

Tabela VIII – Cruzamentos dos dados clínicos com Ceratinização prematura de células individuais (disceratose) dos casos da leucoplasia

Variáveis	Ceratinização prematura de células individuais				p-valor
	Sim		Não		
	n	%	n	%	
Faixa etária					
Até 50 anos	2	40,0	14	56,0	0,642
Mais de 50 anos	3	60,0	11	44,0	
Raça/cor					
Branco	4	80,0	15	60,0	0,626
Negro / Pardo	1	20,0	10	40,0	
Gênero					
Masculino	3	60,0	13	48,1	1,000
Feminino	2	40,0	14	51,9	
Tabagismo					
Sim	2	40,0	15	71,4	0,302
Não	3	60,0	6	28,6	
Etilismo					
Sim	1	33,3	4	22,2	1,000
Não	2	66,7	14	77,8	
Local da lesão					
Área retromolar	-	-	5	18,5	
Assoalho	-	-	2	7,4	
Gengiva	-	-	3	11,1	
Lábio	-	-	3	11,1	-
Língua	1	20,0	4	14,8	
Mucosa jugal	3	60,0	5	18,5	
Palato	1	20,0	3	11,1	
Múltipla lesão	-	-	2	7,4	

Tabela IX – Cruzamentos dos dados clínicos com Pérolas córneas dos casos da leucoplasia

Variáveis	Pérolas córneas				p-valor
	Sim		Não		
	n	%	n	%	
Faixa etária					
Até 50 anos	-	-	16	55,2	0,467
Mais de 50 anos	1	100,0	13	44,8	
Raça/cor					
Branco	2	100,0	17	60,7	0,520
Negro / Pardo	-	-	11	39,3	
Gênero					
Masculino	-	-	16	53,3	0,484
Feminino	2	100,0	14	46,7	
Tabagismo					
Sim	1	50,0	16	66,7	1,000
Não	1	50,0	8	33,3	
Etilismo					
Sim	-	-	5	25,0	1,000
Não	1	100,0	15	75,0	
Local da lesão					
Área retromolar	1	50,0	4	13,3	
Assoalho	-	-	2	6,7	
Gengiva	-	-	3	10,0	
Lábio	-	-	3	10,0	-
Língua	-	-	5	16,7	
Mucosa jugal	1	50,0	7	23,3	
Palato	-	-	4	13,3	
Múltipla lesão	-	-	2	6,7	

Tabela X – Cruzamentos dos dados clínicos com Perda de polaridade das células basais dos casos da leucoplasia

Variáveis	Perda de polaridade das células basais				p-valor
	Sim		Não		
	n	%	n	%	
Faixa etária					
Até 50 anos	7	46,7	9	60,0	0,464
Mais de 50 anos	8	53,3	6	40,0	
Raça/cor					
Branco	8	53,3	11	73,3	0,256
Negro / Pardo	7	46,7	4	26,7	
Gênero					
Masculino	6	37,5	10	62,5	0,157
Feminino	10	62,5	6	37,5	
Tabagismo					
Sim	8	57,1	9	75,0	0,429
Não	6	42,9	3	25,0	
Etilismo					
Sim	2	18,2	3	30,0	0,635
Não	9	81,8	7	70,0	
Local da lesão					
Área retromolar	1	6,3	4	25,0	
Assoalho	1	6,3	1	6,3	
Gengiva	2	12,5	1	6,3	
Lábio	2	12,5	1	6,3	-
Língua	3	18,8	2	12,5	
Mucosa jugal	2	12,5	6	37,5	
Palato	4	25,0	-	-	
Múltipla lesão	1	6,3	1	6,3	

Tabela XI – Cruzamentos dos dados clínicos com Aumento do número de figuras mitóticas dos casos da leucoplasia

Variáveis	Aumento do número de figuras mitóticas				p-valor
	Sim		Não		
	n	%	n	%	
Faixa etária					
Até 50 anos	14	53,8	2	50,0	1,000
Mais de 50 anos	12	46,2	2	50,0	
Raça/cor					
Branco	15	62,5	4	66,7	1,000
Negro / Pardo	9	37,5	2	33,3	
Gênero					
Masculino	13	50,0	3	50,0	1,000
Feminino	13	50,0	3	50,0	
Tabagismo					
Sim	15	68,2	2	50,0	0,591
Não	7	31,8	2	50,0	
Etilismo					
Sim	4	22,2	1	33,3	1,000
Não	14	77,8	2	66,7	
Local da lesão					
Área retromolar	4	15,4	1	16,7	
Assoalho	2	7,7	-	-	
Gengiva	3	11,5	-	-	
Lábio	1	3,8	2	33,3	-
Língua	5	19,2	-	-	
Mucosa jugal	7	26,9	1	16,7	
Palato	3	11,5	1	16,7	
Múltipla lesão	1	3,8	1	16,7	

Tabela XII – Cruzamentos dos dados clínicos com Variação anormal da forma da célula (pleomorfismo celular) dos casos de leucoplasia

Variáveis	Variação anormal da forma da célula				p-valor
	Sim		Não		
	n	%	n	%	
Faixa etária					
Até 50 anos	-	-	16	57,1	0,209
Mais de 50 anos	2	100,0	12	42,9	
Raça/cor					
Branco	1	50,0	18	64,3	1,000
Negro / Pardo	1	50,0	10	35,7	
Gênero					
Masculino	2	100,0	14	46,7	0,484
Feminino	-	-	16	53,3	
Tabagismo					
Sim	1	100,0	16	64,0	1,000
Não	-	-	9	36,0	
Etilismo					
Sim	-	-	5	23,8	-
Não	-	-	16	76,2	
Local da lesão					
Área retromolar	-	-	5	16,7	
Assoalho	-	-	2	6,7	
Gengiva	-	-	3	10,0	
Lábio	-	-	3	10,0	-
Língua	-	-	5	16,7	
Mucosa jugal	-	-	8	26,7	
Palato	2	100,0	2	6,7	
Múltipla lesão	-	-	2	6,7	

Tabela XIII – Cruzamentos dos dados clínicos com Células com mitoses atípicas dos casos de leucoplasia

Variáveis	Células com mitoses atípicas				p-valor
	Sim		Não		
	n	%	n	%	
Faixa etária					
Até 50 anos	-	-	16	55,2	0,467
Mais de 50 anos	1	100,0	13	44,8	
Raça/cor					
Branco	1	100,0	18	62,1	1,000
Negro / Pardo	-	-	11	37,9	
Gênero					
Masculino	1	100,0	15	48,4	1,000
Feminino	-	-	16	51,6	
Tabagismo					
Sim	1	100,0	16	64,0	1,000
Não	-	-	9	36,0	
Etilismo					
Sim	-	-	5	23,8	-
Não	-	-	16	76,2	
Local da lesão					
Área retromolar	-	-	5	16,1	
Assoalho	-	-	2	6,5	
Gengiva	-	-	3	9,7	
Lábio	-	-	3	9,7	-
Língua	-	-	5	16,1	
Mucosa jugal	-	-	8	25,8	
Palato	1	100,0	3	9,7	
Múltipla lesão	-	-	2	6,5	

Tabela XIV – Cruzamentos dos dados clínicos com Aumento do número e tamanho dos nucléolos dos casos de leucoplasia

Variáveis	Aumento do número e tamanho dos nucléolos				p-valor
	Sim		Não		
	n	%	n	%	
Faixa etária					
Até 50 anos	5	55,6	11	52,4	1,000
Mais de 50 anos	4	44,4	10	47,6	
Raça/cor					
Branco	6	60,0	13	65,0	1,000
Negro / Pardo	4	40,0	7	35,0	
Gênero					
Masculino	4	40,0	12	54,5	0,704
Feminino	6	60,0	10	45,5	
Tabagismo					
Sim	5	50,0	12	75,0	0,234
Não	5	50,0	4	25,0	
Etilismo					
Sim	2	25,0	3	23,1	1,000
Não	6	75,0	10	76,9	
Local da lesão					
Área retromolar	-	-	5	22,7	
Assoalho	1	10,0	1	4,5	
Gengiva	-	-	3	13,6	
Lábio	2	20,0	1	4,5	0,285
Língua	2	20,0	3	13,6	
Mucosa jugal	3	30,0	5	22,7	
Palato	1	10,0	3	13,6	
Múltipla lesão	1	10,0	1	4,5	

Tabela XV – Cruzamentos dos dados clínicos com Hipercromatismo dos casos de leucoplasia

Variáveis	Hipercromatismo				p-valor
	Sim		Não		
	n	%	n	%	
Faixa etária					
Até 50 anos	6	50,0	10	55,6	0,765
Mais de 50 anos	6	50,0	8	44,4	
Raça/cor					
Branco	8	66,7	11	61,1	1,000
Negro / Pardo	4	33,3	7	38,9	
Gênero					
Masculino	8	61,5	8	42,1	0,280
Feminino	5	38,5	11	57,9	
Tabagismo					
Sim	6	66,7	11	64,7	1,000
Não	3	33,3	6	35,3	
Etilismo					
Sim	1	16,7	4	26,7	1,000
Não	5	83,3	11	73,3	
Local da lesão					
Área retromolar	3	23,1	2	10,5	
Assoalho	-	-	2	10,5	
Gengiva	1	7,7	2	10,5	
Lábio	-	-	3	15,8	-
Língua	2	15,4	3	15,8	
Mucosa jugal	5	38,5	3	15,8	
Palato	2	15,4	2	10,5	
Múltipla lesão	-	-	2	10,5	

Dados do carcinoma de células escamosas

Tabela XVI – Cruzamentos dos dados clínicos com Formações em gota dos casos de carcinoma

Variáveis	Formações em gota				p-valor
	Sim		Não		
	n	%	n	%	
Faixa etária					
Até 50 anos	2	16,7	4	36,4	0,371
Mais de 50 anos	10	83,3	7	63,6	
Raça/cor					
Branco	6	50,0	4	36,4	0,680
Negro / Pardo	6	50,0	7	63,6	
Gênero					
Masculino	11	91,7	8	72,7	0,317
Feminino	1	8,3	3	27,3	
Tabagismo					
Sim	10	83,3	6	66,7	0,611
Não	2	16,7	3	33,3	
Etilismo					
Sim	5	45,5	6	60,0	0,670
Não	6	54,5	4	40,0	
Local da lesão					
Área retromolar	1	8,3	-	-	
Assoalho	2	16,7	3	27,3	
Gengiva	2	16,7	-	-	
Lábio	1	8,3	-	-	-
Língua	4	33,3	2	18,2	
Mucosa jugal	-	-	1	9,1	
Palato	1	8,3	3	27,3	
Múltipla lesão	1	8,3	2	18,2	

Tabela XVII – Cruzamentos dos dados clínicos com Ceratinização prematura de células individuais (disceratose) dos casos de carcinoma

Variáveis	Ceratinização prematura de células individuais				p-valor
	Sim		Não		
	n	%	n	%	
Faixa etária					
Até 50 anos	6	30,0	-	-	0,539
Mais de 50 anos	14	70,0	3	100,0	
Raça/cor					
Branco	9	45,0	1	33,3	1,000
Negro / Pardo	11	55,0	2	66,7	
Gênero					
Masculino	16	80,0	3	100,0	1,000
Feminino	4	20,0	-	-	
Tabagismo					
Sim	13	72,2	3	100,0	0,549
Não	5	27,8	-	-	
Etilismo					
Sim	8	44,4	3	100,0	0,214
Não	10	55,6	-	-	
Local da lesão					
Área retromolar	1	5,0	-	-	
Assoalho	5	25,0	-	-	
Gengiva	2	10,0	-	-	
Lábio	-	-	1	33,3	-
Língua	5	25,0	1	33,3	
Mucosa jugal	1	5,0	-	-	
Palato	4	20,0	-	-	
Múltipla lesão	2	10,0	1	33,3	

Tabela XVIII – Correlação dos dados clínicos com Pérolas córneas dos casos de carcinoma

Variáveis	Pérolas córneas				p-valor
	Sim		Não		
	n	%	n	%	
Faixa etária					
Até 50 anos	6	31,6	-	-	0,539
Mais de 50 anos	13	68,4	4	100,0	
Raça/cor					
Branco	9	47,4	1	25,0	0,604
Negro / Pardo	10	52,6	3	75,0	
Gênero					
Masculino	16	84,2	3	75,0	1,000
Feminino	3	15,8	1	25,0	
Tabagismo					
Sim	14	82,4	2	50,0	0,228
Não	3	17,6	2	50,0	
Etilismo					
Sim	9	52,9	2	50,0	1,000
Não	8	47,1	2	50,0	
Local da lesão					
Área retromolar	1	5,3	-	-	
Assoalho	5	26,3	-	-	
Gengiva	2	10,5	-	-	
Lábio	-	-	1	25,0	-
Língua	4	21,1	2	50,0	
Mucosa jugal	-	-	1	25,0	
Palato	4	21,1	-	-	
Múltipla lesão	3	15,8	-	-	

Tabela XIX – Cruzamentos dos dados clínicos com Perda de polaridade das células basais dos casos de carcinoma

Variáveis	Perda de polaridade das células basais				p-valor
	Sim		Não		
	n	%	n	%	
Faixa etária					
Até 50 anos	1	12,5	5	33,3	0,369
Mais de 50 anos	7	87,5	10	66,7	
Raça/cor					
Branco	5	62,5	5	33,3	0,221
Negro / Pardo	3	37,5	10	66,7	
Gênero					
Masculino	6	75,0	13	86,7	0,589
Feminino	2	25,0	2	13,3	
Tabagismo					
Sim	5	62,5	11	84,6	0,325
Não	3	37,5	2	15,4	
Etilismo					
Sim	4	50,0	7	53,8	1,000
Não	4	50,0	6	46,2	
Local da lesão					
Área retromolar	-	-	1	6,7	
Assoalho	1	12,5	4	26,7	
Gengiva	1	12,5	1	6,7	
Lábio	1	12,5	-	-	-
Língua	3	37,5	3	20,0	
Mucosa jugal	-	-	1	6,7	
Palato	-	-	4	26,7	
Múltipla lesão	2	25,0	1	6,7	

Tabela XX – Cruzamentos dos dados clínicos com Hiperplasia de células basais dos casos de carcinoma

Variáveis	Hiperplasia de células basais				p-valor
	Sim		Não		
	n	%	n	%	
Faixa etária					
Até 50 anos	2	15,4	4	40,0	0,341
Mais de 50 anos	11	84,6	6	60,0	
Raça/cor					
Branco	8	61,5	2	20,0	0,090
Negro / Pardo	5	38,5	8	80,0	
Gênero					
Masculino	11	84,6	8	80,0	1,000
Feminino	2	15,4	2	20,0	
Tabagismo					
Sim	10	76,9	6	75,0	1,000
Não	3	23,1	2	25,0	
Etilismo					
Sim	5	41,7	6	66,7	0,387
Não	7	58,3	3	33,3	
Local da lesão					
Área retromolar	1	7,7	-	-	
Assoalho	3	23,1	2	20,0	
Gengiva	1	7,7	1	10,0	
Lábio	1	7,7	-	-	-
Língua	4	30,8	2	20,0	
Mucosa jugal	-	-	1	10,0	
Palato	1	7,7	3	30,0	
Múltipla lesão	2	15,4	1	10,0	

Tabela XXI – Cruzamentos dos dados clínicos com Aumento do número de figuras mitóticas dos casos de carcinoma

Variáveis	Aumento do número de figuras mitóticas				p-valor
	Sim		Não		
	n	%	n	%	
Faixa etária					
Até 50 anos	3	18,8	3	42,9	0,318
Mais de 50 anos	13	81,3	4	57,1	
Raça/cor					
Branco	8	50,0	2	28,6	0,405
Negro / Pardo	8	50,0	5	71,4	
Gênero					
Masculino	13	81,3	6	85,7	1,000
Feminino	3	18,8	1	14,3	
Tabagismo					
Sim	11	73,3	5	83,3	1,000
Não	4	26,7	1	16,7	
Etilismo					
Sim	8	53,3	3	50,0	1,000
Não	7	46,7	3	50,0	
Local da lesão					
Área retromolar	1	6,3	-	-	
Assoalho	4	25,0	1	14,3	
Gengiva	2	12,5	-	-	
Lábio	-	-	1	14,3	-
Língua	6	37,5	-	-	
Mucosa jugal	1	6,3	-	-	
Palato	-	-	4	57,1	
Múltipla lesão	2	12,5	1	14,3	

Tabela XXII – Cruzamentos dos dados clínicos com Mitoses superficiais anormais dos casos de carcinoma

Variáveis	Mitoses superficiais anormais				p-valor
	Sim		Não		
	n	%	n	%	
Faixa etária					
Até 50 anos	2	16,7	4	36,4	0,371
Mais de 50 anos	10	83,3	7	63,6	
Raça/cor					
Branco	5	41,7	5	45,5	1,000
Negro / Pardo	7	58,3	6	54,5	
Gênero					
Masculino	9	75,0	10	90,9	0,590
Feminino	3	25,0	1	9,1	
Tabagismo					
Sim	8	72,7	8	80,0	1,000
Não	3	27,3	2	20,0	
Etilismo					
Sim	5	45,5	6	60,0	0,670
Não	6	54,5	4	40,0	
Local da lesão					
Área retromolar	1	8,3	-	-	
Assoalho	3	25,0	2	18,2	
Gengiva	2	16,7	-	-	
Lábio	-	-	1	9,1	-
Língua	5	41,7	1	9,1	
Mucosa jugal	-	-	1	9,1	
Palato	-	-	4	36,4	
Múltipla lesão	1	8,3	2	18,2	

Tabela XXIII – Cruzamentos dos dados clínicos com Variação anormal do tamanho do núcleo (anisonucleose) dos casos de carcinoma

Variáveis	Variação anormal do tamanho do núcleo				p-valor
	Sim		Não		
	n	%	n	%	
Faixa etária					
Até 50 anos	6	27,3	-	-	-
Mais de 50 anos	16	72,7	1	100,0	
Raça/cor					
Branco	9	40,9	1	100,0	-
Negro / Pardo	13	59,1	-	-	
Gênero					
Masculino	19	86,4	-	-	-
Feminino	3	13,6	1	100,0	
Tabagismo					
Sim	16	80,0	-	-	-
Não	4	20,0	1	100,0	
Etilismo					
Sim	11	55,0	-	-	-
Não	9	45,0	1	100,0	
Local da lesão					
Área retromolar	1	4,5	-	-	
Assoalho	5	22,7	-	-	
Gengiva	2	9,1	-	-	
Lábio	1	4,5	-	-	-
Língua	5	22,7	1	100,0	
Mucosa jugal	1	4,5	-	-	
Palato	4	18,2	-	-	
Múltipla lesão	3	13,6	-	-	

Tabela XXIV – Cruzamentos dos dados clínicos com Variação anormal da forma do núcleo (pleomorfismo nuclear) dos casos de carcinoma

Variáveis	Variação anormal da forma do núcleo				p-valor
	Sim		Não		
	n	%	n	%	
Faixa etária					
Até 50 anos	6	27,3	-	-	-
Mais de 50 anos	16	72,7	1	100,0	
Raça/cor					
Branco	9	40,9	1	100,0	-
Negro / Pardo	13	59,1	-	-	
Gênero					
Masculino	19	86,4	-	-	-
Feminino	3	13,6	1	100,0	
Tabagismo					
Sim	16	80,0	-	-	-
Não	4	20,0	1	100,0	
Etilismo					
Sim	11	55,0	-	-	-
Não	9	45,0	1	100,0	
Local da lesão					
Área retromolar	1	4,5	-	-	
Assoalho	5	22,7	-	-	
Gengiva	2	9,1	-	-	
Lábio	1	4,5	-	-	-
Língua	5	22,7	1	100,0	
Mucosa jugal	1	4,5	-	-	
Palato	4	18,2	-	-	
Múltipla lesão	3	13,6	-	-	

Tabela XXV – Cruzamentos dos dados clínicos com Variação anormal do tamanho da célula (anisocitose) dos casos de carcinoma

Variáveis	Variação anormal do tamanho da célula				p-valor
	Sim		Não		
	n	%	n	%	
Faixa etária					
Até 50 anos	5	31,3	1	14,3	0,621
Mais de 50 anos	11	68,8	6	85,7	
Raça/cor					
Branco	6	37,5	4	57,1	0,650
Negro / Pardo	10	62,5	3	42,9	
Gênero					
Masculino	13	81,3	6	85,7	1,000
Feminino	3	18,8	1	14,3	
Tabagismo					
Sim	10	71,4	6	85,7	0,624
Não	4	28,6	1	14,3	
Etilismo					
Sim	7	46,7	4	66,7	0,635
Não	8	53,3	2	33,3	
Local da lesão					
Área retromolar	-	-	1	14,3	
Assoalho	4	25,0	1	14,3	
Gengiva	1	6,3	1	14,3	
Lábio	-	-	1	14,3	-
Língua	4	25,0	2	28,6	
Mucosa jugal	1	6,3	-	-	
Palato	4	25,0	-	-	
Múltipla lesão	2	12,5	1	14,3	

Tabela XXVI – Cruzamentos dos dados clínicos com Variação anormal da forma da célula (pleomorfismo celular) dos casos de carcinoma

Variáveis	Variação anormal da forma da célula				p-valor
	Sim		Não		
	n	%	n	%	
Faixa etária					
Até 50 anos	5	29,4	1	16,7	1,000
Mais de 50 anos	12	70,6	5	83,3	
Raça/cor					
Branco	7	41,2	3	50,0	1,000
Negro / Pardo	10	58,8	3	50,0	
Gênero					
Masculino	14	82,4	5	83,3	1,000
Feminino	3	17,6	1	16,7	
Tabagismo					
Sim	11	73,3	5	83,3	1,000
Não	4	26,7	1	16,7	
Etilismo					
Sim	8	50,0	3	60,0	1,000
Não	8	50,0	2	40,0	
Local da lesão					
Área retromolar	-	-	1	16,7	
Assoalho	4	23,5	1	16,7	
Gengiva	1	5,9	1	16,7	
Lábio	-	-	1	16,7	-
Língua	4	23,5	2	33,3	
Mucosa jugal	1	5,9	-	-	
Palato	4	23,5	-	-	
Múltipla lesão	3	17,6	-	-	

Tabela XXVII – Cruzamentos dos dados clínicos com Aumento da relação núcleo-citoplasma dos casos de carcinoma

Variáveis	Aumento da relação núcleo-citoplasma				p-valor
	Sim		Não		
	n	%	n	%	
Faixa etária					
Até 50 anos	6	28,6	0	,0	1,000
Mais de 50 anos	15	71,4	2	100,0	
Raça/cor					
Branco	9	42,9	1	50,0	1,000
Negro / Pardo	12	57,1	1	50,0	
Gênero					
Masculino	18	85,7	1	50,0	0,324
Feminino	3	14,3	1	50,0	
Tabagismo					
Sim	15	78,9	1	50,0	0,429
Não	4	21,1	1	50,0	
Etilismo					
Sim	10	52,6	1	50,0	1,000
Não	9	47,4	1	50,0	
Local da lesão					
Área retromolar	1	4,8	-	-	
Assoalho	5	23,8	-	-	
Gengiva	2	9,5	-	-	
Lábio	1	4,8	-	-	-
Língua	5	23,8	1	50,0	
Mucosa jugal	1	4,8	-	-	
Palato	4	19,0	-	-	
Múltipla lesão	2	9,5	1	50,0	

Tabela XXVIII – Cruzamentos dos dados clínicos com Aumento do tamanho nuclear dos casos de carcinoma

Variáveis	Aumento do tamanho nuclear				p-valor
	Sim		Não		
	n	%	n	%	
Faixa etária					
Até 50 anos	6	30,0	-	-	0,539
Mais de 50 anos	14	70,0	3	100,0	
Raça/cor					
Branco	8	40,0	2	66,7	0,560
Negro / Pardo	12	60,0	1	33,3	
Gênero					
Masculino	17	85,0	2	66,7	0,453
Feminino	3	15,0	1	33,3	
Tabagismo					
Sim	15	78,9	1	50,0	0,429
Não	4	21,1	1	50,0	
Etilismo					
Sim	10	52,6	1	50,0	1,000
Não	9	47,4	1	50,0	
Local da lesão					
Área retromolar	1	5,0	-	-	
Assoalho	5	25,0	-	-	
Gengiva	2	10,0	-	-	
Lábio	1	5,0	-	-	-
Língua	5	25,0	1	33,3	
Mucosa jugal	1	5,0	-	-	
Palato	3	15,0	1	33,3	
Múltipla lesão	2	10,0	1	33,3	

Tabela XXIX – Cruzamentos dos dados clínicos com Células com mitoses atípicas dos casos de carcinoma

Variáveis	Células com mitoses atípicas				p-valor
	Sim		Não		
	n	%	n	%	
Faixa etária					
Até 50 anos	2	20,0	4	30,8	0,660
Mais de 50 anos	8	80,0	9	69,2	
Raça/cor					
Branco	2	20,0	8	61,5	0,090
Negro / Pardo	8	80,0	5	38,5	
Gênero					
Masculino	9	90,0	10	76,9	0,604
Feminino	1	10,0	3	23,1	
Tabagismo					
Sim	8	88,9	8	66,7	0,338
Não	1	11,1	4	33,3	
Etilismo					
Sim	7	70,0	4	36,4	0,198
Não	3	30,0	7	63,6	
Local da lesão					
Área retromolar	-	-	1	7,7	
Assoalho	2	20,0	3	23,1	
Gengiva	2	20,0	-	-	
Lábio	-	-	1	7,7	-
Língua	3	30,0	3	23,1	
Mucosa jugal	1	10,0	-	-	
Palato	1	10,0	3	23,1	
Múltipla lesão	1	10,0	2	15,4	

Tabela XXX – Cruzamentos dos dados clínicos com Aumento do número e tamanho dos nucléolos os casos de carcinoma

Variáveis	Aumento do número e tamanho dos nucléolos				p-valor
	Sim		Não		
	n	%	n	%	
Faixa etária					
Até 50 anos	2	22,2	4	28,6	1,000
Mais de 50 anos	7	77,8	10	71,4	
Raça/cor					
Branco	3	33,3	7	50,0	0,669
Negro / Pardo	6	66,7	7	50,0	
Gênero					
Masculino	6	66,7	13	92,9	0,260
Feminino	3	33,3	1	7,1	
Tabagismo					
Sim	6	66,7	10	83,3	0,611
Não	3	33,3	2	16,7	
Etilismo					
Sim	4	44,4	7	58,3	0,670
Não	5	55,6	5	41,7	
Local da lesão					
Área retromolar	-	-	1	7,1	
Assoalho	1	11,1	4	28,6	
Gengiva	1	11,1	1	7,1	
Lábio	1	11,1	-	-	-
Língua	2	22,2	4	28,6	
Mucosa jugal	-	-	1	7,1	
Palato	3	33,3	1	7,1	
Múltipla lesão	1	11,1	2	14,3	

Tabela XXXI – Cruzamentos dos dados clínicos com Hipercromatismo dos casos de carcinoma

Variáveis	Hipercromatismo				p-valor
	Sim		Não		
	n	%	n	%	
Faixa etária					
Até 50 anos	4	26,7	2	25,0	1,000
Mais de 50 anos	11	73,3	6	75,0	
Raça/cor					
Branco	7	46,7	3	37,5	1,000
Negro / Pardo	8	53,3	5	62,5	
Gênero					
Masculino	13	86,7	6	75,0	0,589
Feminino	2	13,3	2	25,0	
Tabagismo					
Sim	12	80,0	4	66,7	0,598
Não	3	20,0	2	33,3	
Etilismo					
Sim	6	42,9	5	71,4	0,361
Não	8	57,1	2	28,6	
Local da lesão					
Área retromolar	1	6,7	-	-	
Assoalho	4	26,7	1	12,5	
Gengiva	2	13,3	-	-	
Lábio	-	-	1	12,5	-
Língua	3	20,0	3	37,5	
Mucosa jugal	1	6,7	-	-	
Palato	2	13,3	2	25,0	
Múltipla lesão	2	13,3	1	12,5	

ANEXO

UNIVERSIDADE FEDERAL DO ESPÍRITO SANTO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA DO
CENTRO DE CIÊNCIAS DA SAÚDE

Vitória-ES, 07 de julho de 2010.

Da: Profa. Drª. Ethel Leonor Noia Maciel
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde

Para: Prof. (a) Liliana Aparecida Pimenta de Barros
Pesquisador (a) Responsável pelo Projeto de Pesquisa intitulado: **"Análise da displasia epitelial e dos aspectos clínicos de lesões cancerizáveis e do carcinoma de células escamosas orais: fatores envolvidos na malignização".**

Senhor (a) Pesquisador (a),

Informamos a Vossa Senhoria, que o Comitê de Ética em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde da Universidade Federal do Espírito Santo, após analisar o Projeto de Pesquisa **nº. 070/10** intitulado: **"Análise da displasia epitelial e dos aspectos clínicos de lesões cancerizáveis e do carcinoma de células escamosas orais: fatores envolvidos na malignização"** e o **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido,** cumprindo os procedimentos internos desta Instituição, bem como as exigências das Resoluções 196 de 10.10.96, 251 de 07.08.97 e 292 de 08.07.99, **APROVOU** o referido projeto, em Reunião Ordinária realizada em 23 de junho de 2010.

Gostaríamos de lembrar que cabe ao pesquisador responsável elaborar e apresentar os relatórios parciais e finais de acordo com a resolução do Conselho Nacional de Saúde nº 196 de 10/10/96, inciso IX.2. letra "c".

Atenciosamente,

Profª Drª Ethel Leonor Noia Maciel
COORDENADORA
Comitê de Ética em Pesquisa
Centro de Ciências da Saúde/UFES

Comitê de Etica em Pesquisa do Centro de Ciências da Saúde
Av. Marechal Campos, 1468 – Maruípe – Vitória – ES – CEP 29.040-091.
Telefax: (27) 3335 7504

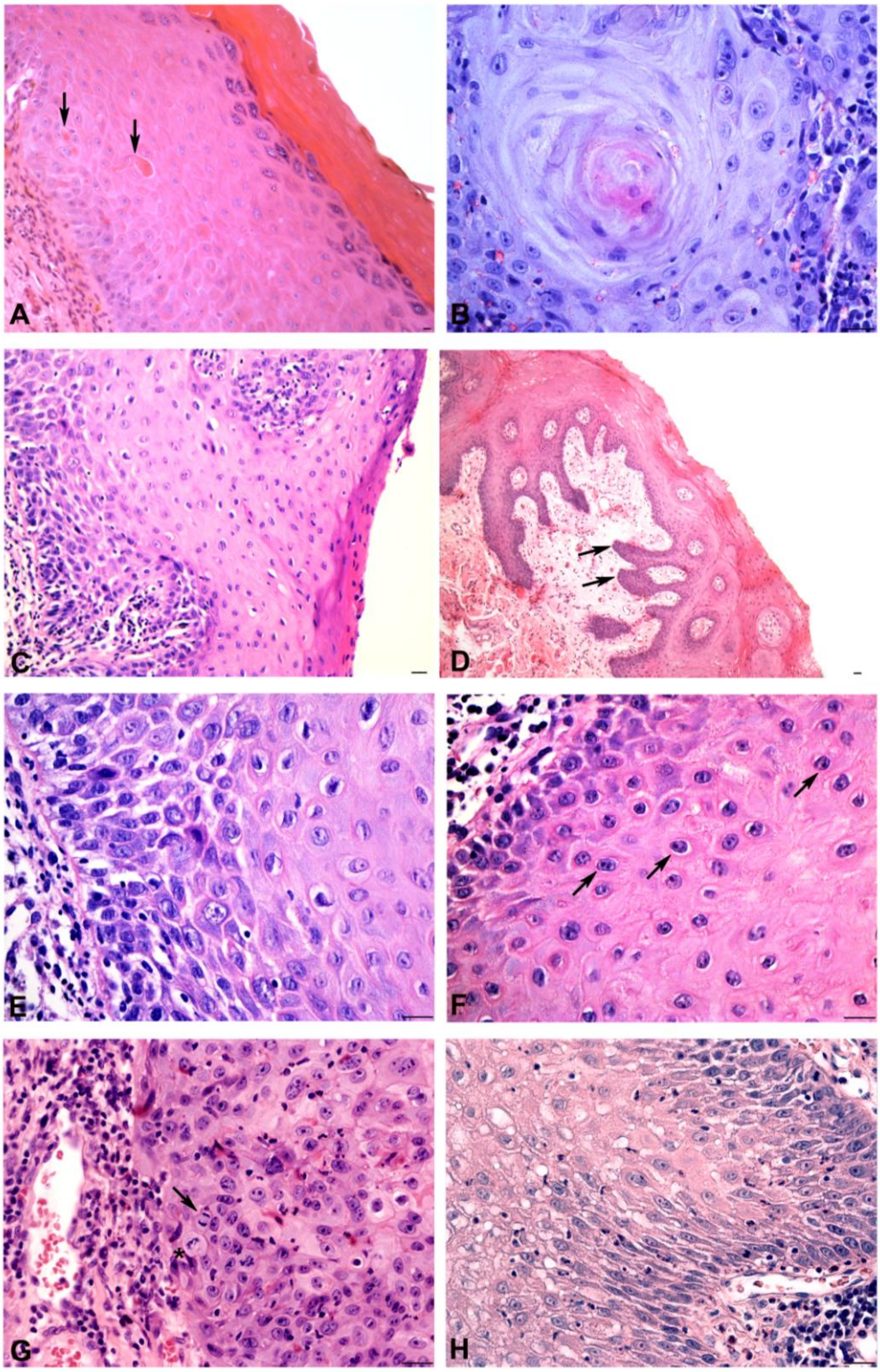


Figura 1: Fotomicrografias de alterações teciduais e citológicas empregadas na gradação da displasia epitelial de leucoplasia e no grau de diferenciação de CCE. (A) Presença de disceratoses (setas). (B) Pérola córnea. (C) Estratificação epitelial irregular. (D) Formações gotiformes (setas). (E) Pleomorfismos celular e nuclear. (F) Aumento do tamanho de nucléolos (setas). (G) Mitoses típica (seta) e atípica (*). (H) Hiperplasia da camada basal. Coloração HE, Barra de escala = 20μm.

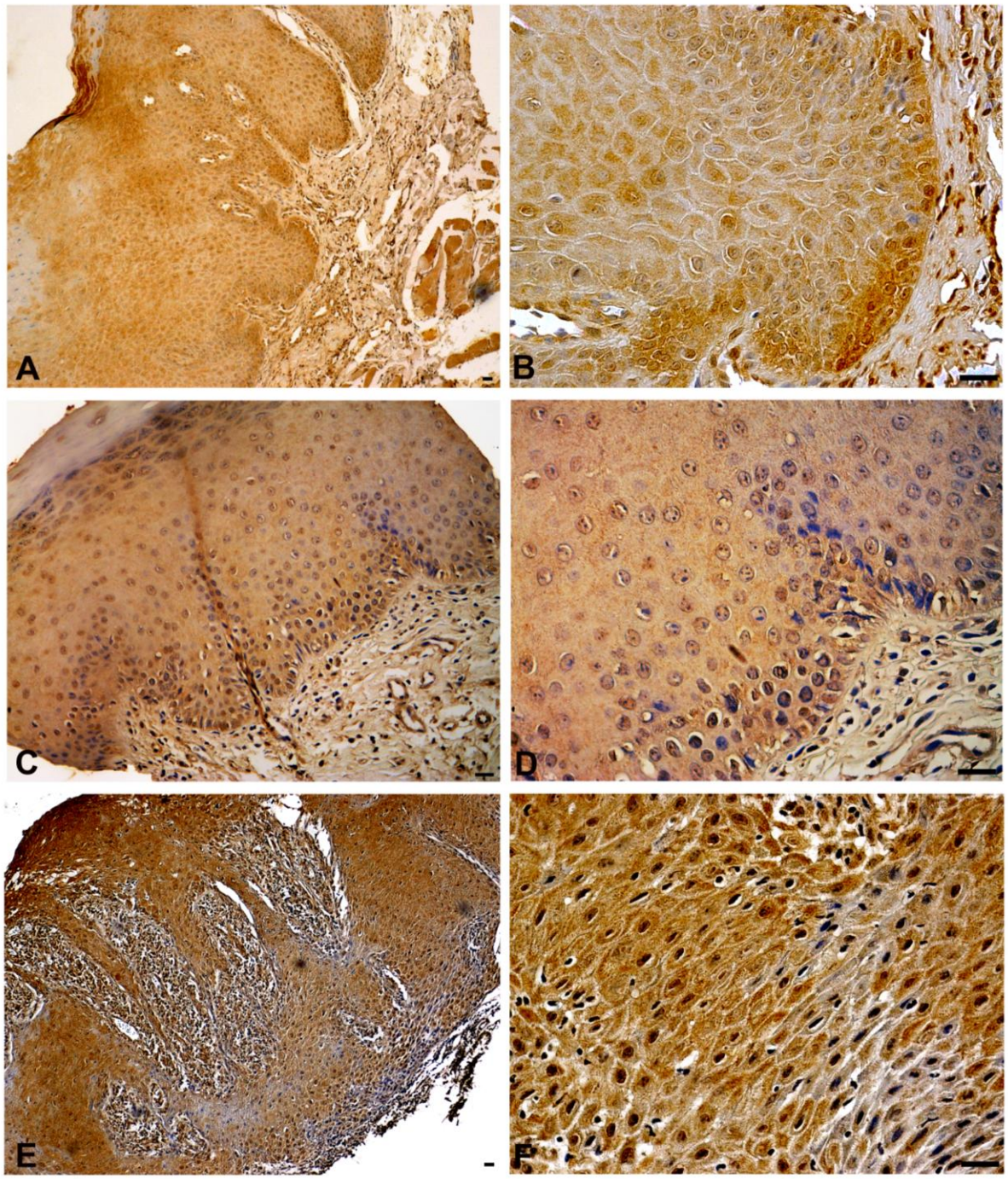


Figura 1: Fotomicrografias de imunomarcação para TIMP-1 em Leucoplasias. (A) Leucoplasia leve com expressão da proteína no epitélio, conjuntivo, vasos e músculo estriado esquelético, (B) imunomarcação em todas as camadas do epitélio, sendo mais intensa na camada basal e na área de hiperplasia. (C e D) Leucoplasia moderada com expressão de TIMP-1 em todas as camadas do epitélio, sem variação da intensidade entre os estratos. (E) Leucoplasia severa com imunomarcação heterogênea, presente em todas as camadas epiteliais, (F) intensidade maior na camada espinhosa, com queratinócitos pleomórficos e variação entre bem e pouco marcados. Barra de escala = 20μm.

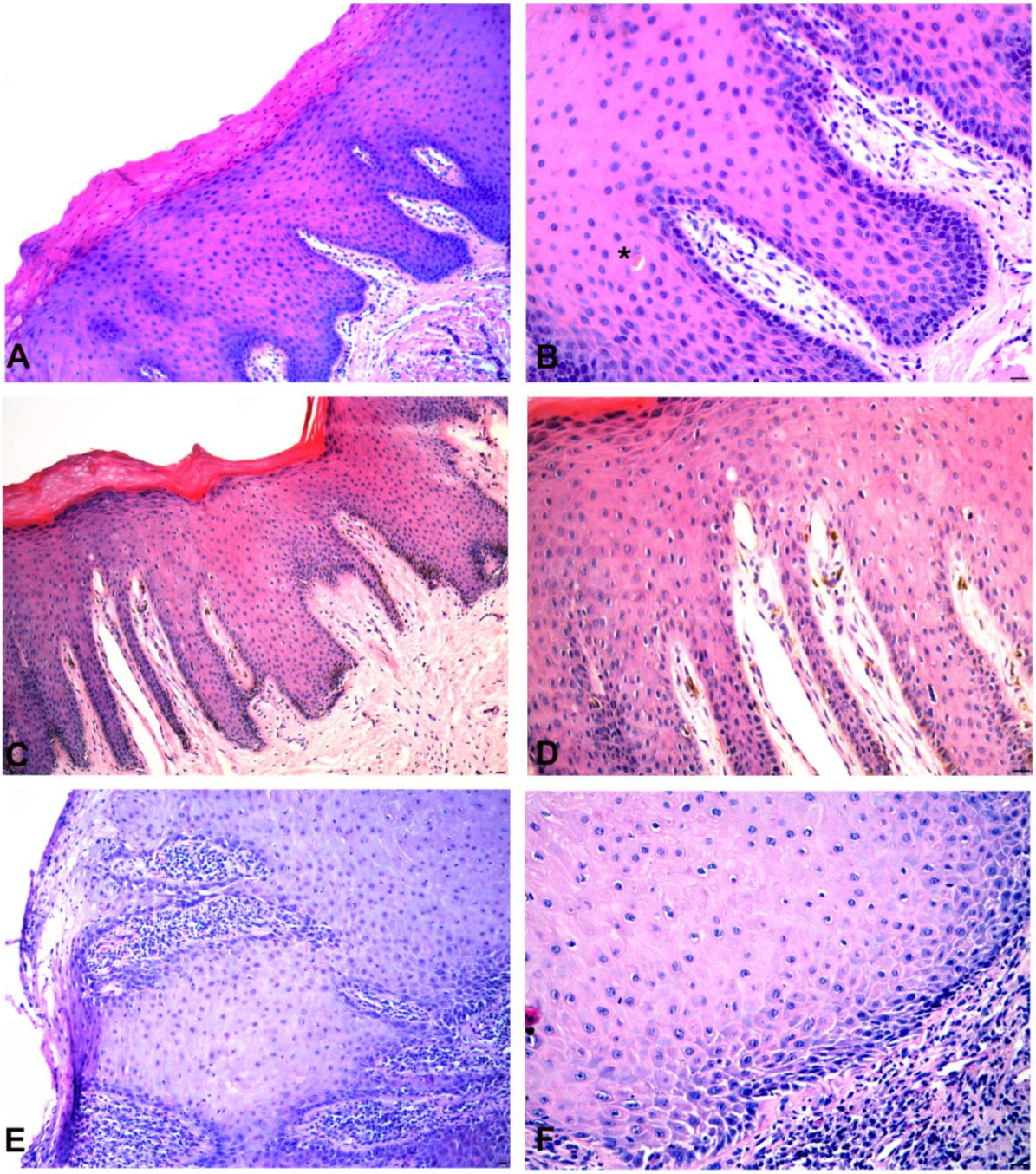


Figura 2: Fotomicrografias de leucoplasias. (A e B) Leucoplasia leve localizada em região retromolar, paciente fumante. Presença de hiperplasia na camada basal e disceratose (*) e espessamento na membrana basal. (C e D) Leucoplasia moderada localizada em região retromolar, paciente fumante. Presença de hiperplasia da camada basal e células com perda de polaridade e discreta perda de estratificação epitelial. (E e F) Leucoplasia severa localizada em mucosa jugal, paciente não fumante. Perda de estratificação epitelial, aumento no tamanho de nucléolos e pleomorfismo celular. Coloração HE, Barra de escala = 20μm.

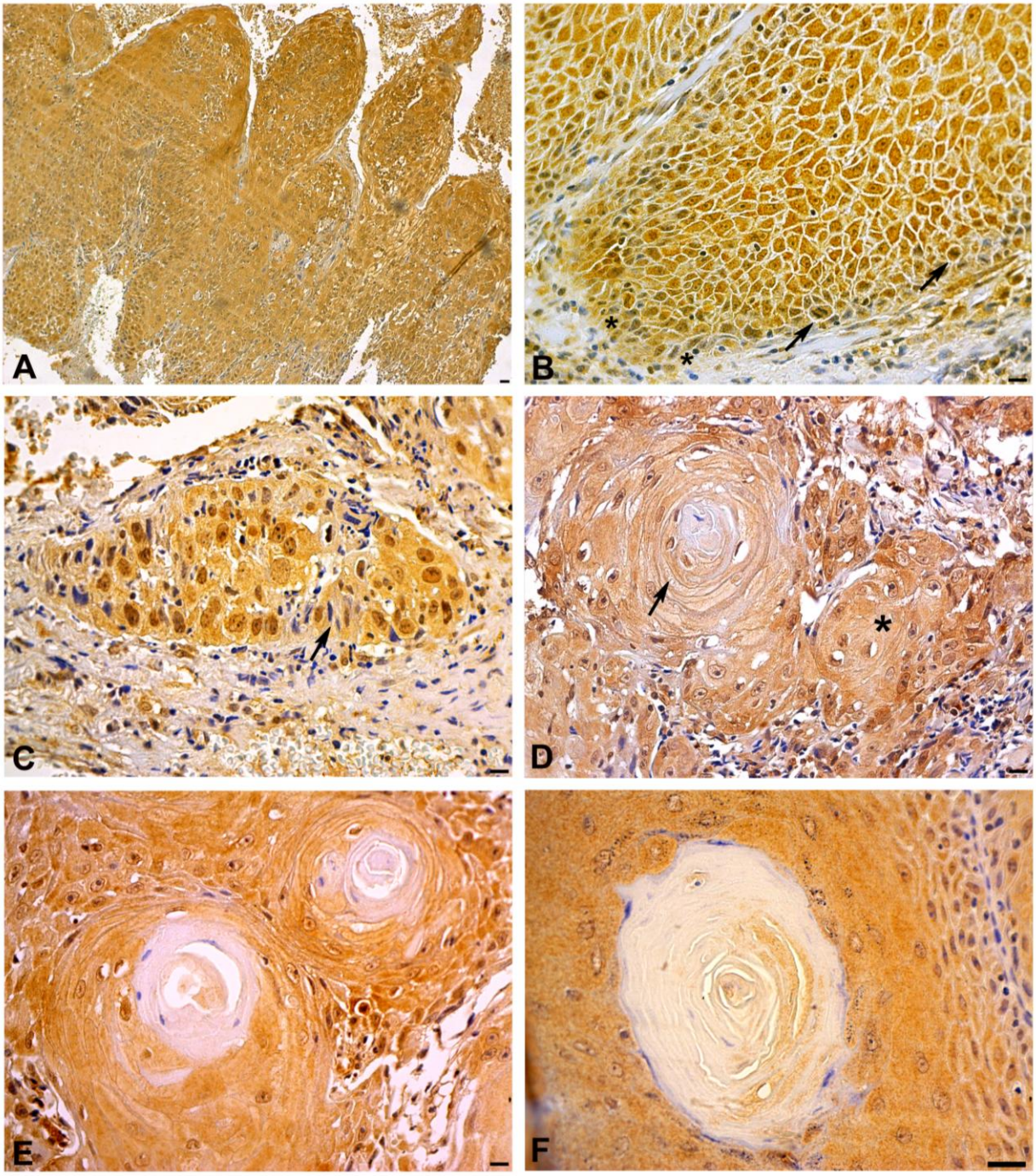


Figura 2: Fotomicrografias de imunomarcação para TIMP-1 em CCE Grau I. (A) Visão panorâmica com expressão da molécula no estroma e no parênquima, sendo nesse último mais intensa. (B) Camadas mais profundas da lesão com marcação intensa em células pleomórficas e em mitoses (setas), células com perda de polaridade apresentaram marcação mais fraca (*). (C) Ilha tumoral com células apresentando variação na expressão de TIMP-1, sendo que as menos diferenciadas tiveram marcação menor (seta). Células do estroma ao redor da ilha pouco marcadas. (D) Pérola córnea em formação (*) e a estrutura propriamente dita (seta), exibindo padrões de expressão de TIMP-1 diferentes. (E e F) Presença de pérolas córneas bem organizadas, com marcação intensa nos queratinócitos periféricos e marcação bem fraca ou ausente nas células centrais. Barra de escala = 20μm.

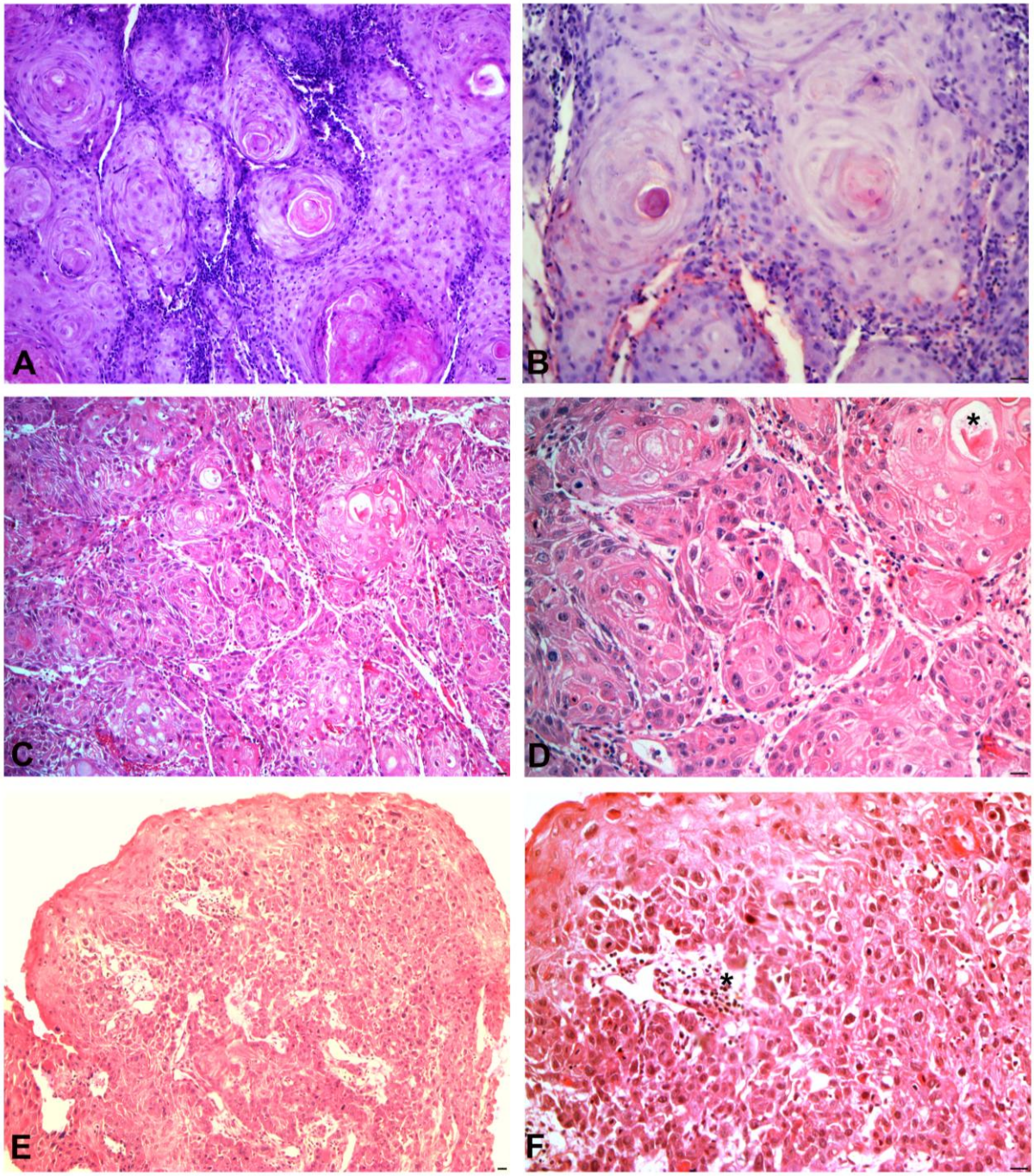


Figura 3: Fotomicrografias de CCE orais. (A e B) CCE Grau I, lesão múltipla localizada em gengiva e região retromolar, paciente não fumante. Estratificação epitelial irregular, pleomorfismo celular e nuclear e pérolas córneas. (C e D) CCE Grau II, localizado na língua, paciente não fumante. Ninhos e lençóis de epitélio irregular, células pleomórficas, pérolas córneas (*), disceratoses e mitoses atípicas. (E e F) CCE Grau III localizado em mucosa jugal, paciente não fumante. Perda de adesão celular, pleomorfismo celular e nuclear, mitoses atípicas, necrose (*) e ausência de pérolas córneas. Coloração HE, Barra de escala = 20μm.

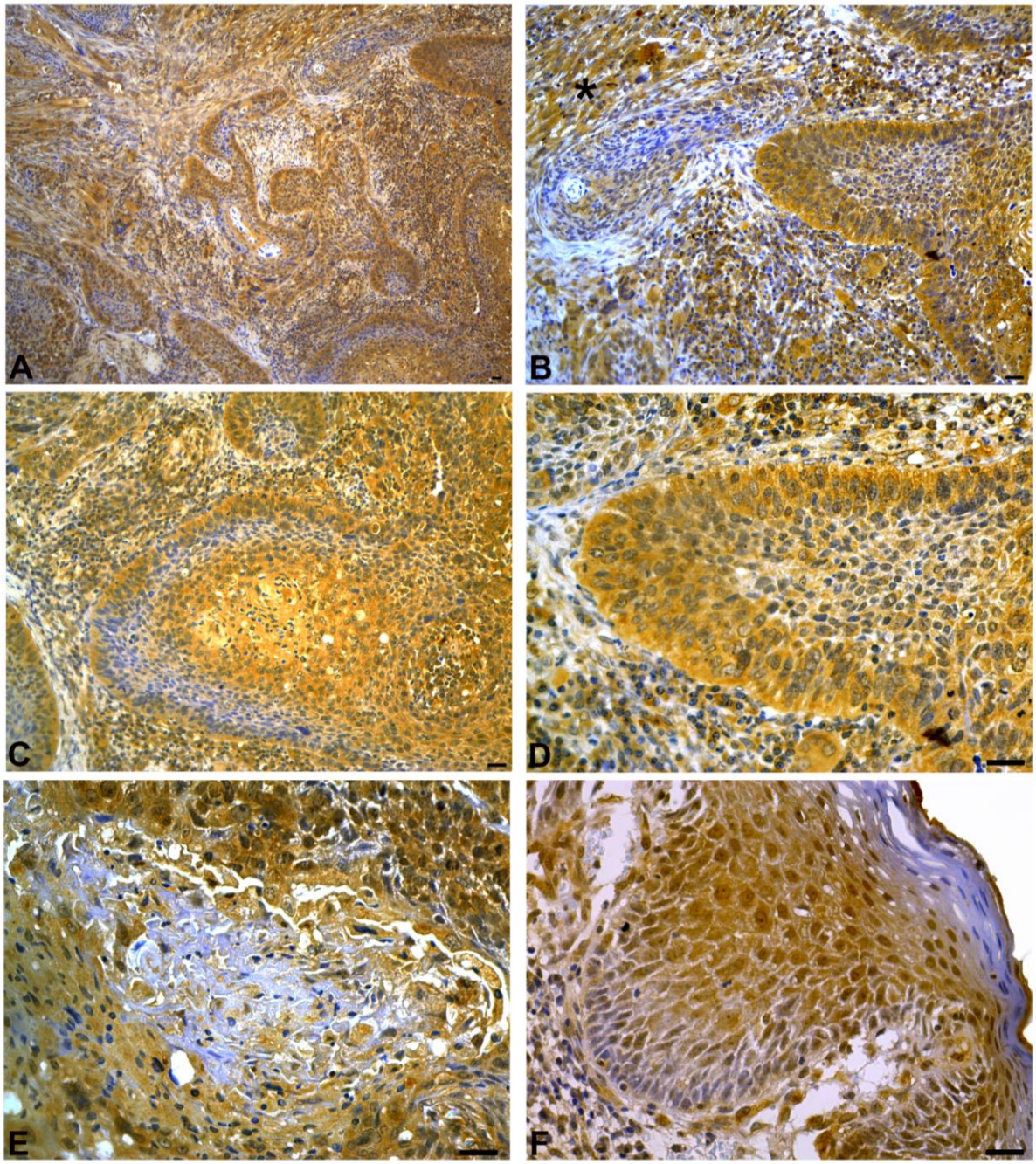


Figura 3: Fotomicrografias de imunomarcação de TIMP-1 em CCE Grau II. (A) Imagem panorâmica mostrando áreas invasivas e perda da arquitetura do epitélio. Marcação presente no parênquima e no estroma e de forma heterogênea. (B) Fibroblastos expressando TIMP-1 (*) e camada epitelial basal hiperplásica com intensa marcação. (C e D) Detalhe do epitélio mostrando variação na expressão da molécula entre os estratos, queratinócitos da camada basal e da camada espinhosa bem marcados e as células da camada parabasal não marcadas. (E) Ilha tumoral com variação na expressão de TIMP-1, sendo que a maior parte das células estão pouco diferenciadas e pouco marcadas. (F) Área da lesão em que a estrutura do epitélio está mantida, presença de células da camada espinhosa bem marcadas, enquanto que queratinócitos da camada basal e com perda de polaridade estão fracamente marcados. Barra de escala = 20μm.

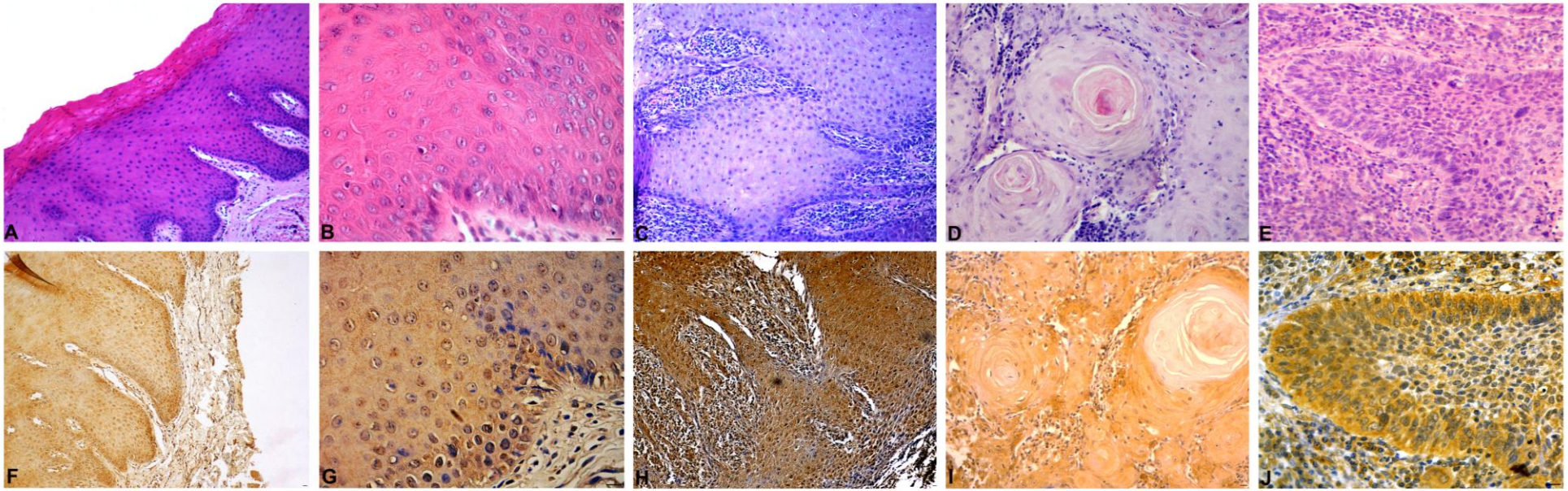


Figura 4: Fotomicrografias de Leucoplasias e de CCEs orais em coloração HE (A-E) e imunomarcadas para TIMP-1 (F-J). Leucoplasia leve (A e F). Leucoplasia moderada (B e G). Leucoplasia severa (C e H). CCE Grau I (D e I). CCE Grau II (E e J). Barra de escala = 20μm.