

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

**FABIANO DE AZEVEDO RIBEIRO**

**CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO MOLECULAR DA  
PODOPLANINA E DO KI-67 NAS DISPLASIAS EPITELIAIS E  
CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAIS: ANÁLISE DA  
TRANSFORMAÇÃO MALIGNA**

Vitória

2015

FABIANO DE AZEVEDO RIBEIRO

**CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO MOLECULAR DA  
PODOPLANINA E DO KI-67 NAS DISPLASIAS EPITELIAIS E  
CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAIS: ANÁLISE DA  
TRANSFORMAÇÃO MALIGNA**

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

**Área de concentração:** Patologia Bucal

**Orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Liliana Aparecida Pimenta de Barros.

**Co-orientadora:** Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Leticia Nogueira da Gama de Souza

Vitória

2015

FABIANO DE AZEVEDO RIBEIRO

**CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO MOLECULAR DA  
PODOPLANINA E DO KI-67 NAS DISPLASIAS EPITELIAIS E  
CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAIS: ANÁLISE DA  
TRANSFORMAÇÃO MALIGNA**

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

**COMISSÃO EXAMINADORA**

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Liliana Aparecida Pimenta de Barros**  
**Universidade Federal do Espírito Santo**  
**Orientadora**

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Letícia Nogueira da Gama de Souza**  
**Universidade Federal do Espírito Santo**  
**Co-Orientadora**

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Danielle Resende Camisasca Barroso**  
**Universidade Federal do Espírito Santo**

---

**Prof.<sup>a</sup> Dr.<sup>a</sup> Simone de Queiroz Chaves Lourenço**  
**Universidade Federal Fluminense**

"A gratidão é o único tesouro dos humildes"

**Willian Shakespeare**

## DEDICATÓRIA

À **DEUS**, para quem eu devo tudo o que sou e o que tenho.

Aos meus pais, **Mario Roberto Ribeiro e Aparecida de Fátima Ribeiro**, por terem me ensinado o valor dos estudos. Por serem exemplos de honestidade, humildade, integridade e tantas outras qualidades que nem mesmo as maiores intempéries da vida podem apagar do meu coração nem do meu caráter. Pelo amor que ultrapassa barreiras e que apesar de estarem distantes fisicamente, encontram-se presentes espiritualmente.

À minha amada esposa, **Vanessa**, pelo companheirismo, amizade e confiança. Você vibrou comigo diante de cada pequena conquista. Obrigado por tornar meus dias difíceis mais amenos e por nunca reclamar da minha ausência em função dos meus estudos. **TE AMO!!!**

Ao meu querido irmão, **Fernando**, minha cunhada **Aline** e o meu amado sobrinho **Matheus** por sempre me trazerem alegrias.

Ao meu tio, **Antônio Wilson Azevedo** (*in memoriam*), sei que estaria muito feliz por me ver chegar até aqui.

Aos meus sogros **Valdir** e **Regina**, exemplos de fé, de amor a **DEUS** e ao próximo. Por não me deixar desistir dos meus sonhos e me estimular a seguir adiante quando eu mais precisei.

## AGRADECIMENTOS

Tenho muito a agradecer as muitas pessoas que de alguma forma me ajudaram nesta caminhada.... Espero lembrar de cada um enquanto escrevo estes agradecimentos....

A toda minha família, amigos e colegas de Tupaciguara/MG que apesar da distância sempre estão na torcida por mim.

Ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Espírito Santo, na pessoa da **Profª Drª Selva Gonçalves Guerra**.

À **Profª Drª Liliana Aparecida Pimenta de Barros**, que tive a honra de ter como Orientadora. Com o passar do tempo, as suas orientações ultrapassaram as paredes da Faculdade e me acompanharam pelas várias decisões e experiências profissionais. Agradeço não só pela orientação, mas também pela confiança, pelas cobranças e oportunidade a mim oferecida, pelo exemplo de dedicação, doação, profissionalismo, que me mostrou um mundo novo e guiou meus passos para que eu pudesse iniciar mais essa caminhada. Muito obrigado!

À minha co-orientadora, **Profª Drª Letícia Nogueira da Gama de Souza**, por todos seus valiosos conhecimentos compartilhados e pela disponibilidade sempre presente nos momentos de dúvida.

Ao amigo **Profº Dr. Marcos da Silva Pacheco**, pela confiança depositada durante a realização das minhas atividades na disciplina de Histologia e pela simpatia nos momentos de descontração.

À **Profª Drª Tânia Regina Grão Velloso**, por toda competência demonstrada na condução da Clínica de Estomatologia. Por ser uma pessoa atenciosa, calma, humilde e paciente para ensinar.

À **Profª Drª Rosa Maria Lourenço Carlos Maia**, pelo seu exemplo de dedicação, exemplo de integridade e seriedade naquilo que faz, além de proporcionar valiosos momentos de descontração.

A **Profª Drª Danielle Resende Camisasca Barroso**, por fazer parte da banca examinadora, e pela tranquilidade e simplicidade que a torna especial e pelo apoio através de palavras.

A **Profª Drª Simone de Queiroz Chaves Lourenço** por fazer parte como membro externo da banca examinadora. Na busca literária deste trabalho, vários momentos me deparei com artigos científicos em que você estava inserida. Isso mostra um pouco da sua competência e dedicação.

A todos os professores, colegas, profissionais técnicos do Departamento de Diagnóstico Oral da Faculdade de Odontologia de Piracicaba (FOP/Unicamp), em especial ao **Prof. Dr. Osley Paes de Almeida** e **Prof. Dr. Alan Roger dos Santos Silva**, agradeço imensamente ao acolhimento caloroso, gentileza na doação dos anticorpos para esta pesquisa e atenção durante minha visita acadêmica.

Aos professores vinculados ao Programa de Pós-Graduação em Clínica Odontológica da Universidade Federal do Espírito Santo, que contribuíram imensamente para o meu crescimento intelectual.

Aos demais professores que conheci, em especial: **Teresa, Sérgio, Daniela**, que me ajudaram e apoiaram nessa caminhada.

À querida **Lucienne Bessoni**, do Laboratório Multiusuário de Histotécnicas da Universidade Federal do Espírito Santo, pela inestimável ajuda, paciência e presteza inesgotáveis.

Aos professores e técnicos do Laboratório de Ultraestrutura Celular Carlos Alberto Redins da Universidade Federal do Espírito Santo, Prof. Dr. Breno, Prof. Dr. Marcos, Prof. Dr. Afrânio.

À estimada secretária do Programa de Pós-Graduação, **Regina Lucia Sales**, pela competência e paciência que muito facilitaram o meu caminho.

À **Fabiana Facco Casarotti**, por sua ajuda no laboratório de imunohistoquímica (FOP/Unicamp) onde tudo aconteceu.

Aos colegas e agora amigos da FOP/Unicamp, **Felipe Fonseca, Celeste**, do Laboratório de Patologia Oral da Faculdade de Odontologia de Piracicaba, pela

ajuda e disponibilidade imprescindível na organização e preparação do material para análise. Em especial ao amigo **Profº Drº Marcelo Rocha Marques**, sempre generoso, atencioso e disponível em me ajudar, além de sua extrema competência no que faz.

Ao "pai-amigo", **Profº Drº Luiz Merli**, pela amizade e por se fazer presente, me aconselhando e incentivando.

Aos todos meus amigos fora da Faculdade de Odontologia que compartilharam comigo cada passo que dei nessa jornada, e que direta ou indiretamente me ajudaram na realização deste trabalho, em especial a **Rianne, Selma, Isabela Binotti e Virgílio Faé**.

A todos os pacientes do Programa de Prevenção e Diagnóstico Precoce de Câncer de Boca do Curso de Odontologia e ao Serviço de Anatomia Patológica da Universidade Federal do Espírito Santo, pois possibilitaram a realização deste estudo.

A todos os colegas da "minha" turma de mestrado pela boa convivência e conhecimentos compartilhados.

Aos funcionários das Disciplinas de Estomatologia e Patologia Oral da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Espírito Santo pela ótima convivência e gentileza sempre presentes.

À **FAPES**, pelo incentivo financeiro que me permitiu realizar esse trabalho.

**A TODOS O MEU MUITO OBRIGADO!**

## RESUMO

**Introdução:** O carcinoma de células escamosas oral (CCEO) é a lesão maligna mais comum na cavidade oral e o seu desenvolvimento envolve uma série de mecanismos moleculares, podendo ser precedido clinicamente pelas desordens orais com potencial de malignização (DOPM). Biomarcadores expressos na fase de proliferação celular e envolvidos na invasividade pode levar a um melhor entendimento do processo da carcinogênese. **Objetivos:** Caracterizar a expressão do ki-67 e D2-40 em DOPM e CCEO e suas respectivas margens clinicamente saudáveis e confrontar com os graus histopatológicos e os dados clinicopatológicos dessas lesões. **Materiais e métodos:** Neste estudo seccional, foram avaliadas 25 DOPM, 10 CCEO e seus respectivos tecidos perilesionais, entre Maio/2013 a Julho/2014, no Núcleo de Diagnóstico Bucal. As alterações histomorfológicas foram avaliadas nas DOPM e CCEO em hematoxilina-eosina e a expressão do Ki-67 e Podoplanina, qualitativa e quantitativamente, pela técnica de imunohistoquímica. **Resultados:** Para o grupo das DOPM, a maioria das lesões não apresentaram alterações displásicas em suas margens, já no CCEO, 50% apresentaram DEO severa e 20% DEO moderada e 30%, DEO leve. Na avaliação imunohistoquímica, comparando as lesões e seus tecidos perilesionais, o Ki-67 mostrou diferença nas DOPM ( $p=0,016$ ), entre as lesões de DOPM e CCEO ( $p=0,006$ ) e entre tecido perilesional e tecido peritumoral ( $p=0,001$ ). Houve uma relação direta entre maior grau de DEO e maior expressão do ki-67 nas DOPM ( $p=0,010$ ) e seus tecidos peritumorais ( $p=0,022$ ). A podoplanina mostrou índice de expressão maior nas lesões propriamente ditas do que em seus tecidos perilesionais e peritumorais, embora não apresentou diferença significativa. Houve uma relação direta ( $p=0,001$ ) entre severidade de DEO e expressão da podoplanina nas lesões de DOPM e correlação positiva entre expressão de ki-67 e podoplanina nas lesões de CCEO ( $p=0,000$ ). **Conclusões:** Constatou-se um aumento gradual e em ordem crescente da expressão dos marcadores moleculares estudados nos tecidos perilesionais, DOPM, tecidos peritumorais e CCEO. Além da correlação significativa entre a proliferação celular e o grau de displasia epitelial oral e o grau de diferenciação do CCEO, sugerindo o Ki-67 como critério adicional para determinar a gravidade da DOPM. A correlação positiva entre Ki-67 e D2-40 no CCEO aponta-os como biomarcadores de prognóstico e terapias alvo contra o câncer. Mais estudos podem revelar uma melhor participação da podoplanina na carcinogênese.

**Palavras-chave:** Carcinogênese, Marcadores biológicos, Carcinoma de células escamosas oral.

## ABSTRACT

**Introduction:** Oral squamous cell carcinoma (OSCC) is the most common malignancy in the oral cavity and its development involves a series of molecular mechanisms and may be preceded by oral potentially malignant disorders (OPMDs). Biomarkers expressed on the cell proliferation phase and involved in the invasiveness may lead to a better understanding of the carcinogenesis process.

**Objectives:** To characterize the Ki-67 expression and D2-40 in OPDM and OSCC and their clinically healthy margins and confront the histopathological degrees and clinicopathological data from these lesions. **Methods:** In this cross-sectional study, we evaluated 25 OPDM, 10 OSCC and their perilesional tissues from May-2013 to July-2014 in the Oral Diagnosis Center. The morphometric alterations were evaluated in OPDM and OSCC by hematoxylin-eosin method and the expression of Ki-67 and podoplanin, qualitatively and quantitatively, by immunohistochemistry.

**Results:** For the group of OPDM, most lesions showed no dysplastic changes on its margins, already in OSCC, 50% had severe OED and 20% moderate and 30% mild OED. In immunohistochemical analysis, compared the lesions and their perilesional tissues, Ki-67 showed a difference in OPDM ( $p = 0.016$ ) between lesions OPDM and OSCC ( $p=0.006$ ) and between perilesional tissue and peritumoral tissue ( $p=0.001$ ). There was a direct relationship between higher degree of OED and greater expression of Ki-67 in OPDM ( $p=0.010$ ) and its peritumoral tissues ( $p=0.022$ ). The podoplanin showed higher expression rate in the lesions themselves than in their perilesional and peritumoral tissues, although not significantly different. There was a direct relationship ( $p=0.001$ ) between severity of OED and expression of podoplanin in OPDM lesions and positive correlation between expression of Ki-67 and podoplanin in OSCC lesions ( $p=0.000$ ). **Conclusions:** It was found a gradual increase in ascending order of the expression of molecular markers studied in perilesional tissue, OPDM, peritumoral tissues and OSCC. Besides the significant correlation between cell proliferation and the degree of oral epithelial dysplasia, and the degree of differentiation of OSCC, suggesting Ki-67 as an additional criterion for determine the severity of OPDM. The positive correlation between Ki-67 and D2-40 in OSCC points them as prognostic biomarkers and therapies targeted against cancer. Further studies may reveal a better participation of podoplanin in carcinogenesis.

**Keywords:** Carcinogenesis, Biological markers, Oral squamous cell carcinoma.

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

AJCC	do inglês <i>American Joint Committee on Cancer</i>
BSA	do inglês <i>Bovine Serum Albumin</i>
Ca 2+	íon Cálcio
CCE	Carcinoma de Células Escamosas
CCEO	Carcinoma de Células Escamosas Oral
CEA	do inglês <i>Carcinoembryonic antigen</i>
CEC	Carcinoma Escamoso Celular
CLEC-2	do inglês <i>C-type lectin-like receptor 2</i>
CEP/UFES	Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Espírito Santo
COX-2	enzima ciclooxigenase-2
DAB	do inglês <i>Diaminobenzidina</i>
DEO	Displasia Epitelial Oral
DNA	do inglês <i>Desoxyribonucleic acid</i>
DOPM	Desordens Oraís com Potencial de Malignização
EGFR	do inglês <i>Epidermal Growth Factor Receptor</i>
ERM	do inglês <i>Ezrin, Radixin, Moesin</i>
H&E	Hematoxilina-Eosina
HPV	do inglês <i>Human Papiloma Virus</i>
HPV-16	do inglês <i>Human Papiloma Virus type 16</i>
IFN- $\gamma$	do inglês <i>Interferon Gamma</i>
IHQ	Imunohistoquímica
IL	Interleucina
INCA	Instituto Nacional de Câncer
LSAB	do inglês <i>Labelled Streptavidin Biotin</i>
mRNA	do inglês <i>Messenger RNA</i>
Mcm2	do inglês <i>Minichromosome maintenance 2</i>
NDB	Núcleo de Diagnóstico Bucal
OMS	Organização Mundial da Saúde
PBS	do inglês <i>Phosphate Buffer Saline</i>
PDPN	Podoplanina

PSA	do inglês <i>Prostate-specific antigen</i>
RNA	do inglês <i>Ribonucleic acid</i>
TGF- $\beta$	do inglês <i>Transforming growth factor beta</i>
TGF- $\beta$ 1	do inglês <i>Transforming growth factor beta 1</i>
TIFF	do inglês <i>Tagged Image File Format</i>
TNM	T (tamanho do Tumor); N (Nódulo); M (Metástase)
UFES	Universidade Federal do Espírito Santo
UICC	do inglês <i>Union of International Cancer Control</i>
WHO	do inglês <i>World Health Organization</i>

## LISTA DE SÍMBOLOS

mm	milímetros
%	porcentagem
kDa	unidade de massa atômica ou kiloDalton
°C	graus Celsius
HCl	ácido clorídrico
Kw	do inglês Kilowatt
Mg	miligrama
Nm	nanômetro

## LISTA DE QUADROS

<b>Quadro 1:</b>	Características microscópicas associadas com a DEO.....	5
<b>Quadro 2:</b>	Gradação histopatológica da DEO segundo Kujan.....	8
<b>Quadro 3:</b>	Classificação histopatológica do CCEO recomendada pela OMS....	15
<b>Quadro 4:</b>	Critérios utilizados para o diagnóstico da DEO segundo OMS.....	40
<b>Quadro 5:</b>	Gradação da DEO segundo OMS.....	40
<b>Quadro 6:</b>	Critérios para classificação de malignidade tumoral proposto por Bryne	41
<b>Quadro 7:</b>	Classificação histopatológica do CCEO segundo Bryne.....	42
<b>Quadro 8:</b>	Detalhes dos anticorpos utilizados no estudo.....	43

## LISTA DE TABELAS

<b>Tabela 1:</b>	Scoring segundo Smith e Pindborg para gradação da DEO..	7
<b>Tabela 2:</b>	Dados clínico-patológicos dos pacientes com DOPMs.....	51
<b>Tabela 3:</b>	Diagnóstico histopatológico das DOPMs e tecidos perilesionais.	52
<b>Tabela 4:</b>	Dados clínico-patológicos dos pacientes com CCEO.....	54
<b>Tabela 5:</b>	Valores de cada parâmetro para a classificação do CCEO...	55
<b>Tabela 6:</b>	Classificação histopatológica dos CCEOs e seus tecidos peritumorais	55
<b>Tabela 7:</b>	Análise semi-quantitativa do Ki-67 e PDPN.....	64
<b>Tabela 8:</b>	Comparação da expressão do Ki-67 nas lesões e suas margens	65
<b>Tabela 9:</b>	Comparação da expressão do Ki-67 entre G1 e G2.....	65
<b>Tabela 10:</b>	Correlação entre expressão do Ki-67 com os graus histopatológicos das lesões	66
<b>Tabela 11:</b>	Correlação do Ki-67 com os graus histopatológicos perilesionais e peritumorais.	66
<b>Tabela 12:</b>	Comparação da PDPN nas DOPMs e CCEOs.....	67
<b>Tabela 13:</b>	Comparação da PDPN entre G1 e G2.....	67
<b>Tabela 14:</b>	Correlação da PDPN com os graus histopatológicos das lesões	68
<b>Tabela 15:</b>	Correlação da PDPN com os graus histopatológicos dos tecidos perilesionais e peritumorais	68

## LISTA DE FIGURAS

<b>Figura 1:</b>	Campo de cancerização no CCEO.....	<b>18</b>
<b>Figura 2:</b>	Mudanças moleculares em diferentes estágios da carcinogênese oral.	<b>21</b>
<b>Figura 3:</b>	Oportunidade de identificar biomarcadores na carcinogênese.	<b>23</b>
<b>Figura 4:</b>	Ação da podoplanina na tumorigênese e metástase.....	<b>31</b>
<b>Figura 5:</b>	Seleção dos campos para análise quantitativa da IHQ.....	<b>46</b>
<b>Figura 6:</b>	Fotomicrografias em H&E das DOPM e seus tecidos perilesionais	<b>53</b>
<b>Figura 7:</b>	Fotomicrografia em H&E do CCEO e seu tecido peritumoral...	<b>56</b>
<b>Figura 8:</b>	Imunomarcação do Ki-67 em DOPM e tecido perilesional.....	<b>58</b>
<b>Figura 9:</b>	Imunomarcação do Ki-67 no CCEO e seu tecido peritumoral..	<b>59</b>
<b>Figura 10:</b>	Imunomarcação do D2-40 nas camadas epiteliais das DOPMs	<b>60</b>
<b>Figura 11:</b>	Imunomarcação do D2-40 no front tumoral do CCEO.....	<b>61</b>
<b>Figura 12:</b>	Detalhe do padrão de expressão membranosa do D2-40.....	<b>61</b>
<b>Figura 13:</b>	Painel do CCEO e seu tecido peritumoral em H&E e IHQ.....	<b>62</b>
<b>Figura 14:</b>	Painel da DOPM e seu tecido perilesional em H&E e IHQ.....	<b>63</b>

## SUMÁRIO

<b>1</b>	<b>INTRODUÇÃO</b> .....	<b>1</b>
<b>2</b>	<b>REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	<b>3</b>
2.1	DESORDENS ORAIS COM POTENCIAL DE MALIGNIZAÇÃO .....	3
2.2	DISPLASIAS EPITELIAIS ORAIS .....	5
2.3	CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAL .....	11
2.4	MARGENS CLÍNICAS .....	16
2.5	CARCINOGENESE .....	19
2.6	BIOMARCADORES MOLECULARES .....	21
<b>3</b>	<b>OBJETIVOS</b> .....	<b>35</b>
3.1	Objetivo geral .....	35
3.2	Objetivo específico .....	35
<b>4</b>	<b>MATERIAIS E MÉTODOS</b> .....	<b>36</b>
4.1	CONSIDERAÇÕES ÉTICAS .....	36
4.2	OBTENÇÃO, SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA ...	36
4.3	ESTUDO MORFOLÓGICO .....	38
4.4	ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA .....	39
4.5	ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO .....	43
4.6	ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA .....	45
<b>5</b>	<b>RESULTADOS</b> .....	<b>51</b>
5.1	ANÁLISE CLÍNICA E MORFOLÓGICA .....	51
5.2	ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA .....	57
<b>6</b>	<b>DISCUSSÃO</b> .....	<b>69</b>
<b>7</b>	<b>CONCLUSÃO</b> .....	<b>80</b>
<b>8</b>	<b>REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS</b> .....	<b>81</b>
	<b>APÊNDICES</b> .....	<b>98</b>
	<b>ANEXOS</b> .....	<b>103</b>

## 1 - INTRODUÇÃO

As doenças crônicas não transmissíveis vêm contribuindo de forma crescente para a mortalidade no Brasil. O câncer ocupa o segundo lugar no *ranking* de casos de óbito, perdendo apenas para as doenças cardiovasculares. Esses resultados são atribuídos, pelos oncologistas, à exposição de supostos fatores de risco associados ao modo de vida moderno (ROOK & DALGLEISH, 2011; INCA, 2014). Se medidas não forem tomadas, o câncer passará a ser a primeira causa de morte em países em desenvolvimento até 2030, que ainda lutam para solucionar problemas como saneamento básico, desnutrição e doenças infecciosas, sobrecarregando ainda mais o sistema de saúde (OMS, 2012).

A estimativa de câncer na cavidade oral no Brasil, segundo Instituto Nacional de Câncer (INCA), em 2014, foi de aproximadamente 15.290 novos casos, com 4.891 óbitos e uma taxa de risco estimada em 11,54 novos casos para cada 100 mil homens e 3,92 novos casos para cada 100 mil mulheres (INCA, 2014).

Especificamente na região de cabeça e pescoço, o carcinoma de células escamosas oral (CCEO), tem uma participação importante, porque representa mais de 90% dos casos que acometem a cavidade bucal. Apesar das últimas décadas terem proporcionado avanços com relação a conduta clínica e diagnóstico precoce com programas de conscientização através da participação direta e indireta do governo federal, das secretarias estaduais e municipais de saúde, universidades, centros de pesquisas, dentre outros, o INCA reconhece o câncer de boca como um problema de saúde pública.

A formação do CCEO é um processo multifatorial altamente complexo, envolvendo alterações histológicas com a destruição da membrana basal e a invasão de células fenotipicamente alteradas para o estroma subjacente (SCANLON *et al.*, 2012).

O câncer da mucosa oral é geralmente precedido por um grupo de lesões que apresentam alterações morfológicas e que podem ter um potencial para a transformação maligna, sendo denominadas de desordens orais com potencial de malignização (DOPM) (WARNAKULASURYA *et al.*, 2007).

O espectro da carcinogênese oral apresenta em suas extremidades as lesões com potencial de malignização e o CCEO, porém clinicamente, regiões perilesionais sadias podem apresentar alterações celulares, morfológicas, moleculares e o seu conhecimento pode contribuir para estabelecer protocolos terapêuticos e tratamentos mais direcionados como formas de promoção e prevenção do câncer de boca e suas recidivas (van der WAAL *et al.*, 2010).

Os métodos de análise destas regiões perilesionais podem ser feitas por meios morfológicos, mas a utilização de biomarcadores moleculares tem tornado de grande importância para uma melhor compreensão das lesões propriamente ditas e de todo processo de carcinogênese (CANKOVIC *et al.*, 2013).

Em virtude da escassez de trabalhos publicados enfatizando as alterações morfológicas e moleculares nos tecidos perilesionais, principalmente nas desordens orais com potencial de malignização, justifica avaliar a correlação dessas alterações nas DOPM, no CCEO e em suas respectivas regiões perilesionais e peritumorais, clinicamente sadias, o que poderá contribuir para um melhor entendimento do processo de carcinogênese, no diagnóstico mais preciso, na elaboração de protocolos clínicos, bem como medidas preventivas e instituição de tratamentos precoces mais efetivos para as DOPM e o CCEO.

## 2 - REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 - DESORDENS ORAIS COM POTENCIAL DE MALIGNIZAÇÃO

O conceito de "pré-câncer" começa em 1805 como sugestão dada por um grupo de médicos europeus de que existem doenças benignas que sempre se desenvolverão em uma malignidade invasiva se forem acompanhadas por um longo tempo (BAILLIE *et al.*, 1806 apud SARODE *et al.*, 2014). Em 1870, James Paget descreve a primeira transformação maligna de uma lesão oral, denominada por ele de leucoqueratose, em CCEO de língua (MORTAZAVI *et al.*, 2014).

Posteriormente, várias terminologias apareceram como, "pré-maligna", "neoplasia intra-epitelial", e "lesão precursora", sendo usadas para descrever apresentações clínicas que podem ter um potencial para se tornar câncer. Todas elas transmitem um conceito de processo de dois passos no desenvolvimento do câncer, mas é pouco provável, que exista uma uniformidade no comportamento tecidual (WARNAKULASURIYA *et al.*, 2007).

A partir de 1978, a Organização Mundial da Saúde (OMS) reconheceu e classificou o termo "pré-câncer" em "lesões pré-cancerígenas" e "condições pré-cancerígenas" (AMAGASA, 2011), da seguinte forma: "Lesão pré-cancerígena", todo tecido morfológicamente alterado onde o câncer tem maior probabilidade de ocorrer em comparação com a sua contraparte aparentemente normal. Leucoplasia, eritroplasia, lesões palatinas em fumantes com cigarro invertido são exemplos dessas lesões. "Condição pré-cancerígena", estado generalizado associado com um aumento significativo do risco de câncer; podendo ser citado, fibrose submucosa, queilite actínica, líquen plano e lúpus eritematoso discóide.

Por causa das contínuas mudanças e confusões em torno do conceito de câncer oral, em um *Workshop* coordenado pela OMS em Londres, em maio de 2005, discutiu-se amplamente sobre as mudanças na nomenclatura, definição e classificação do termo "pré-câncer" e várias lesões pré-cancerígenas. O consenso do *Workshop* recomendou o termo "desordens potencialmente

malignas", referindo a todas apresentações clínicas que implicam em um risco de se transformarem em câncer. Além disso, discutiu-se a ideia de que nem todas lesões e condições descritas sobre este termo transformarão em câncer (BARNES *et al.*, 2005).

Eritroplasia, leucoplasia, líquen plano erosivo, fibrose submucosa e queilite actínica, são as desordens orais com potencial de malignização (DOPM) mais importantes em evoluir para CCEO (WARNAKULASURIYA *et al.*, 2007), sendo a leucoplasia, a forma mais comum.

Os fatores de risco para as DOPM são semelhantes aos fatores de risco para o CCEO. No entanto, uma grande proporção de casos de DOPM e CCEO ocorrem na ausência completa de qualquer fator de risco identificável, particularmente em jovens afetados por estas doenças. O Papiloma Vírus Humano (HPV) é a principal causa do câncer de colo de útero e também tem sido associado às lesões orais malignas e potencialmente malignas (FURRER *et al.*, 2006). SYRJÄNEN *et al.* (2011) realizaram uma revisão sistemática com o objetivo de calcular as estimativas da associação do HPV com o CCEO e as DOPM. Foi encontrada uma significativa associação entre Papiloma Vírus Humano tipo 16 (HPV-16) com o CCEO, com prevalência de 33,7% para os casos com CCEO, e entre o HPV com a leucoplasia, líquen plano e displasia epitelial, sugerindo o HPV como um importante fator causal das DOPM e do CCEO. Uma limitação dessa revisão sistemática foi avaliar a localização anatômica e as variações histológicas das lesões orais com HPV, devido a falta de dados nos artigos originais, além de dados incompletos sobre tabaco, bebida, hábitos sexuais, idade e outros fatores de risco.

A metodologia padrão para o diagnóstico das DOPM é baseada no exame clínico convencional e na biópsia das lesões consideradas clinicamente suspeitas. O tecido removido é submetido ao exame microscópico para avaliar possíveis alterações histológicas como hiperqueratose epitelial, hiperplasia, atrofia, displasia epitelial nas lesões clinicamente visíveis (BARNES *et al.*, 2005). A detecção clínica pode ser auxiliada por medidas adjuvantes de autofluorescência, quimioluminescência ou coloração com azul de toluidina (AWAN *et al.*, 2015), porém nenhum deles pode ser recomendado como

substituto para a biópsia e a análise histopatológica, que é considerado atualmente como padrão ouro (MACEY *et al.*, 2015).

## 2.2 - DISPLASIAS EPITELIAIS ORAIS

Displasia é uma palavra de origem grega que significa proliferação atípica de tecidos. O termo displasia foi introduzido por Reagon em 1958 em relação às células exfoliadas do colo do útero. No passado, displasia epitelial, atipia epitelial e disqueratose eram usadas como sinônimos. Pindborg, em 1977, definiu displasia epitelial como um termo usado para uma lesão em que parte da espessura do epitélio é substituído por células apresentando vários graus de atipias (GOYAL *et al.*, 2012).

Displasia epitelial oral (DEO) é um termo diagnóstico usado para descrever as alterações histopatológicas vistas nas DOPM da mucosa oral. Ela não está associada com nenhum aspecto clínico específico, embora, a leucoplasia e eritroplasia sejam as lesões classicamente associadas com alterações displásicas, encontrando-se de 5 a 25% de epitélio displásico nas biópsias de leucoplasia (NEVILLE *et al.*, 2009). Além disso, a DEO é vista consistentemente na mucosa adjacente dos tumores em pacientes com CCEO (JABER *et al.*, 2003).

Histologicamente, a DEO apresenta como mudanças arquiteturais no estrato epitelial, combinado com atipia celular devido a uma diferenciação celular imatura e/ou inapropriada (WARNAKULASUSIYA *et al.*, 2008). As características histológicas e citológicas da DEO recomendadas pela OMS são(Quadro 1):

**Quadro 1:** Características microscópicas associadas com a displasia epitelial oral

CARACTERÍSTICAS MICROSCÓPICAS ASSOCIADAS COM A DEO	
ALTERAÇÕES CITOLÓGICAS	ALTERAÇÕES ARQUITETURAS
Varição anormal do tamanho nuclear (anisonucleose)	Estratificação epitelial irregular
Varição anormal do formato nuclear (pleomorfismo nuclear)	Perda de polaridade das células basais
Varição anormal do tamanho celular (anisocitose)	Formações gotiformes

Varição anormal do formato celular (pleomorfismo celular)	Elevado número de figuras de mitose
Aumento do tamanho nuclear	Mitoses superficiais anormais
Figuras mitóticas atípicas	Queratinização prematura de células individuais (disceratose)
Aumento do número e tamanho de nucléolos	Pérolas córneas
Hipercromatismo	

Fonte: Barnes et al., 2005

O diagnóstico e a gradação da DEO não é uma ciência exata, e passa por uma avaliação subjetiva dos critérios histológicos, com possíveis variações inter e intra observadores (SPEIGHT *et al.*, 2007).

Para o seu diagnóstico, é necessária uma considerável experiência por parte do profissional antes mesmo que as características clínicas se tornem aparentes (GOYAL *et al.*, 2012). Além disso, deve-se entender que muitos desses critérios isolados não são patognômicos para a displasia, mas a presença de vários dessas características é que levam ao seu diagnóstico (WATANABE *et al.*, 2015).

Uma variedade de sistemas de classificação para a DEO é descrita na literatura. Muitos destes sistemas baseiam-se na classificação das lesões precursoras de outros epitélios, incluindo neoplasia intraepitelial escamosa do colo do útero (KUFFER *et al.*, 2002) e a classificação de *Ljubljana* para a laringe (HELLQUIST *et al.*, 1999).

O sistema de gradação histológica deve atender dois requisitos básicos. Em primeiro lugar, deve ser facilmente aplicável na prática da rotina diária, com baixa variabilidade inter e intra-observador. Segundo lugar, deve permitir uma clara separação entre os pacientes que necessitam de tratamento para prevenir a malignização e aqueles que não precisam de tratamento (SADIQ *et al.*, 2015).

Smith e Pindborg, em 1969, descreveram o primeiro sistema de classificação da displasia para a mucosa oral utilizando 13 características histológicas. Para cada característica era atribuída uma pontuação e a soma dos escores fornecia um índice de atipia epitelial que variava entre 0 a 75, possibilitando graduar a DEO como ausente, leve, moderada ou severa (Tabela

1). Como desvantagens, os escores eram determinados subjetivamente, sem nenhuma evidência científica; além de ser um sistema "demorado" sendo desfavorável na rotina clínica. O ponto que merece mérito é ele produzir um resultado na escala ordinal o que favorece a análise estatística (WARNAKULASURIYA *et al.*, 2008).

**Tabela 1:** Escore segundo Smith e Pindborg para gradação da displasia epitelial oral

0 - 10	<b>Ausência de displasia</b>
11 - 25	Displasia leve
26 - 45	Displasia moderada
Acima de 45	Displasia severa

Fonte:Warnakulasuriya *et al.*, (2008)

A classificação desenvolvida pela OMS categoriza a DEO em leve, moderada, severa, levando em consideração os níveis de alterações citológicas e arquiteturais identificadas microscopicamente no compartimento epitelial (BARNES *et al.*, 2005).

Resumidamente, a displasia leve é definida como um distúrbio arquitetural limitado ao terço inferior do epitélio com mínima atipia citológica; a displasia moderada é caracterizada como distúrbio arquitetural estendendo ao terço médio do epitélio, e a displasia severa apresenta distúrbio arquitetural superior a 2/3 do epitélio com atipia citológica associada (WARNAKULASURIYA *et al.*, 2008).

Numa avaliação mais quantitativa do que qualitativa, o sistema binário desenvolvido por Kujan *et al.* (2006), baseado também nas alterações microscópicas preconizadas pela OMS (2005) categorizou DEO em 02 níveis; baixo e alto risco de sofrer transformação maligna, em uma tentativa de tornar a análise histopatológica mais prática para o clínico. O grupo de baixo risco apresentava menos de 04 alterações citológicas e arquiteturais; enquanto que o grupo de alto risco exibia pelo menos 05 alterações citológicas e 04 arquiteturais (Quadro 2).

**Quadro 2:** Gradação histopatológica da displasia epitelial oral segundo *Kujan et al.*

Gradação histopatológica da DEO segundo Kujan	
<b>Alto risco</b>	Presença de 05 alterações citológicas e 04 arquiteturais. Lesões com potencial de transformação maligna
<b>Baixo risco</b>	Exibe menos de 4 alterações citológicas e arquiteturais. Não mostra potencial de malignização

Fonte: Sadiq *et al.*, (2015)

Esse agrupamento binário pode reduzir o efeito indesejado da variabilidade inter e intra-observadores, porém, necessita de um número maior da amostra para sua validação. Os mesmos autores, porém, em 2007, analisaram quais características microscópicas contribuiriam com maior ou menor variabilidade interobservador, e encontraram que a maior concordância foi para: aumento do número de figuras de mitose, projeções gotiformes do epitélio, aumento do tamanho nuclear e variação anormal da célula. As maiores discordâncias foram com: estratificação epitelial irregular, perda da polaridade das células basais, variação anormal do tamanho nuclear, figuras de mitose atípica e hiperchromatismo (KUJAN *et al.*, 2007).

A gradação da DEO, embora subjetiva, é atualmente o método de referência para prever sua transformação maligna (TILAKARATNE *et al.*, 2011). O aumento do grau de displasia tem sido associado com uma alta taxa de transformação maligna, embora, as taxas de progressão variem de 6 a 36%.

Esta ampla variação é atribuída às diferenças no diagnóstico, características do paciente, influência de características demográficas, infecção pelo HPV, hábitos de tabaco, genética, tratamento e intervalos de acompanhamento (MEHANNA *et al.*, 2009; WARNAKULASURIYA *et al.*, 2011; HO *et al.*, 2012), enquanto outros autores não encontraram associação entre transformação maligna e a severidade da displasia (HSUE *et al.*, 2007; ARDUINO *et al.*, 2009; HO *et al.*, 2012).

HO *et al.* (2012) relataram quais os parâmetros clínicos são fatores de risco para a malignização em 91 pacientes com diagnóstico histopatológico de DEO e em acompanhamento por 02 anos. Foram considerados fatores de

risco: gênero, idade, tabagismo, etilismo, aparência clínica e tamanho da lesão. A natureza de alto risco das lesões em não-fumantes mostrou uma particular importância, sugerindo que possa haver predisposição hereditária ou adquirida e devem ser tratadas de forma mais agressiva. Entre os fatores clínicos determinantes para o risco de malignização da DEO, como gênero, idade, localização da lesão displásica, tamanho da lesão, diagnóstico da primeira biópsia, número de lesões, aparência clínica, consumo de álcool, história de tabagismo e antecedente de CCEO, a aparência da lesão talvez seja a variável mais subjetiva inter-observadores.

Além disso, a análise histopatológica da DEO, também é utilizada como uma ferramenta clínica para prever o risco de transformação maligna e orientar na conduta clínica e tratamento dos pacientes, com o monitoramento nos casos de DEO leve e no tratamento ativo através de excisão cirúrgica daquelas consideradas severas (BOUQUOT *et al.*, 2006; SPEIGHT *et al.*, 2007;).

Apesar dos esforços em reduzir a subjetividade da graduação da DEO, os esquemas atuais de classificação não diferenciam com precisão a verdadeira natureza das lesões com potencial de malignização das lesões que não apresentam esse potencial de progressão maligna. Por essas razões, muitos pesquisadores têm procurado definir marcadores moleculares/celulares ou alterações cromossômicas para prever o risco de câncer das DOPM (DIONNE *et al.*, 2015).

### **2.2.1 - TRATAMENTO DAS DISPLASIAS EPITELIAIS ORAIS**

Opções de tratamento não-cirúrgico para as lesões com evidência de DEO incluem acompanhamento regular, redução de fatores de risco como fumo e álcool, e terapia medicamentosa, por exemplo, retinóicos e antimicóticos (REDDI *et al.*, 2006). Lodi *et al.* (2008), em uma revisão sistemática, avaliaram o tratamento não-cirúrgico da leucoplasia, utilizando vitamina A, retinóides, beta caroteno, licopeno e concluíram que nenhum dos tratamentos investigados são efetivos em prevenir a transformação maligna da leucoplasia oral.

Pacientes com DOPM e com hábitos de risco, devem ser orientados para eliminar tais hábitos e acompanhados em intervalos regulares. Estes intervalos não são baseados em evidências e sim na avaliação clínica subjetiva e na displasia relatada nos espécimes. No entanto, os pacientes devem permanecer em acompanhamento regular e áreas clinicamente suspeitas devem ser re-biopsiadas se houver necessidade (SILVERMAN *et al.*, 1984; van der WAAL *et al.*, 2010). Segundo Ho *et al.* (2013) é fundamental um acompanhamento do paciente por um longo período, pois o intervalo médio para a evolução para uma neoplasia é de mais de 3 anos e as taxas de recorrência local ou de aparecimento de segundos tumores primários são altas (76% em 5 anos). Pacientes com DEO severa devem ser acompanhados a cada 03 meses e para os outros graus, DEO leve e moderada, o acompanhamento pode ser feito a cada 06 meses (ARDUINO *et al.*, 2009).

Os métodos cirúrgicos de tratamento DOPM incluem laser, criocirurgia ou a completa excisão (REDDI *et al.*, 2006). Entretanto, deve-se pensar em retirar todas lesões com DEO para garantir um correto diagnóstico bem como o seu tratamento?

Arduino *et al.* (2009) avaliaram e acompanharam por um período mínimo de 12 meses, 133 pacientes com DEO que receberam tratamento cirúrgico (cirurgia convencional, laser e criocirurgia) e 74 pacientes que não receberam tratamento. Os resultados evidenciaram que mesmo a cirurgia sendo geralmente a primeira escolha para o tratamento das DOPM, não demonstrou qualquer benefício na prevenção do aparecimento ou prevenção de recidivas. A única diferença significativa que encontraram foi a maior propensão de recidiva em pacientes que mantiveram fatores de risco com álcool e tabaco.

Nos casos de displasia leve, a decisão de observar ou de tratar definitivamente a lesão pode ser influenciada pela localização e subtipo clínico da leucoplasia, filosofia de tratamento e dos riscos potenciais da cirurgia e da facilidade de remover a lesão (REDDI *et al.*, 2006; EDWARDS *et al.*, 2014).

Em lesões que exibem carcinoma *in situ* ou com início de invasão, a excisão cirúrgica é mandatória e com poucos questionamentos na literatura. Esta abordagem baseia-se no princípio de que o epitélio com DEO moderada

ou severa, apresenta-se mais desordenado e acumula um maior número de alterações moleculares, requerendo poucas mudanças adicionais antes de tornar-se invasivo (EDWARDS *et al.*, 2014). Para lesões que demonstram DEO moderada ou severa e displasia leve em locais de alto risco, as opções de tratamento são variadas e parece não haver consenso a respeito da modalidade de tratamento definitivo (REDDI *et al.*, 2006).

Até que se tenha evidências robustas detalhando o melhor método de identificar lesões da mucosa bucal em risco de desenvolver malignidade, é sensato supor que todas lesões potencialmente malignas devam ser tratadas por remoção cirúrgica (BALASUNDARAM *et al.*, 2014), ao invés de limitar esta abordagem para casos severos, e conseqüentemente interromper a atual abordagem do “esperar e ver” para os casos mais leves. Embora a excisão completa das DOPM possa ser considerada como um sobretratamento, o monitoramento ao longo prazo da displasia pode colocar os pacientes em risco, dada a incerteza de medir as mudanças na aparência clínica de tais lesões (DOST *et al.*, 2014).

As incertezas em determinar a verdadeira natureza das lesões displásicas e a variação subjetiva no diagnóstico patológico usando métodos tradicionais tem pavimentado o caminho para o uso dos biomarcadores (BAJRACHARYA *et al.*, 2014), que pode levar a um melhor entendimento da fisiopatologia da progressão da doença e do mecanismo molecular implicado na transformação maligna das lesões orais com displasia (BALASUNDARAM *et al.*, 2014). Tudo isso se traduz em estratégias terapêuticas e de prevenção mais eficazes e em um eventual alívio para os serviços de saúde pública.

### **2.3 - CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAL**

Também chamado de carcinoma epidermóide, escamocelular ou carcinoma espinocelular (CEC), é o tipo de câncer de boca mais comum, correspondendo entre 90 a 95% dos casos diagnosticados neste sítio anatômico (WOLFF *et al.*, 2012; RODRIGUES *et al.*, 2014).

Caracteriza-se por ser uma neoplasia invasiva, de caráter agressivo, com altas taxas de invasão local e metástase, afetando principalmente homens acima dos 50 anos de idade, sendo os principais fatores de risco o tabagismo e o etilismo, além de infecções pelos subtipos 16 e 18 do Papiloma Vírus Humano (HPV) e fatores genéticos (BARNES *et al.*, 2005; GALBIATTI *et al.*, 2013).

A etiologia do câncer é determinada por diversos fatores, podendo ser tanto intrínsecos ou extrínsecos ao organismo, assim como podem estar inter-relacionados. Os fatores extrínsecos referem-se ao meio ambiente, aos hábitos ou costumes próprios de uma sociedade. Exemplos de fatores extrínsecos que são reconhecidos como agentes carcinogênicos e que atuam mudando a estrutura genética das células são o cigarro, a exposição excessiva ao sol, os vírus e o álcool. Os fatores intrínsecos são aqueles relacionados diretamente ao indivíduo, como suas características genéticas e o seu perfil imunológico (INCA, 2014). Outros fatores de risco podem influenciar e explicar sua etiologia, dentre eles: deficiências nutricionais, história familiar, atividade profissional, radiação (WOLFF *et al.*, 2012).

Quando o hábito de fumar está associado à ingestão de álcool, existe uma sinergia e o risco de desenvolver o câncer de cabeça e pescoço aumenta em 40 vezes (MARUR *et al.*, 2008). O aumento no risco também está associado com intensidade e duração do hábito de fumar e a frequência de ingestão de álcool (GALBIATTI *et al.*, 2013).

Clinicamente, o CCEO pode apresentar-se como uma lesão exofítica ou endofítica; leucoplásica, eritroplásica ou eritroleucoplásica em estágios mais iniciais. Porém, há evidências clínicas que auxiliam no diagnóstico do CCEO, tais como: lesões de início indolor, que não cicatrizam espontaneamente em 15 dias, lesões ulceradas de bordas endurecidas e evertidas e com ausência de halo eritematoso (GAETTI *et al.*, 2010).

Os sítios anatômicos mais acometidos por esta neoplasia são os dois terços anteriores da língua, assoalho bucal, palato duro, mucosa jugal, região retromolar e gengiva, nesta ordem (BARNES *et al.*, 2005; FRONIE *et al.*, 2013).

Sendo a boca uma área de fácil acesso para o paciente, permite uma visualização direta das alterações suspeitas principalmente nos estágios iniciais, o que deveria resultar em um diagnóstico precoce. Entretanto, o diagnóstico do câncer bucal ocorre de forma tardia quando a lesão já se encontra em estágio avançado. Isso ocorre por fatores variados desde a ausência de sintomatologia dolorosa em estágios iniciais, sua apresentação clínica variada (van der WAAL *et al.*, 2013), até a formação acadêmica do cirurgião-dentista, voltada para a área cirúrgica restauradora ou curativa em detrimento à promoção e prevenção da saúde (TEIXEIRA *et al.*, 2009).

Histologicamente, uma das características do CCEO é a proliferação desordenada de células epiteliais malignas e a capacidade de invadir o tecido conjuntivo. Estas células podem estar dispersas, isoladamente ou em grupos, podendo formar ninhos ou cordões invasivos de células escamosas epiteliais, por vezes crescendo como entidades independentes através da membrana basal para o interior do tecido conjuntivo subepitelial. Alterações morfológicas teciduais e/ou celulares, tais como pleomorfismo celular e nuclear, disqueratose, perda da adesão celular, hiperchromatismo nuclear, aumento do número de mitoses típicas ou atípicas, pérolas córneas (NEVILLE *et al.*, 2009), podem ser visualizadas em função do grau de maturidade das células tumorais.

O sistema de estadiamento clínico dos tumores (TNM), desenvolvido por Pierre Denoix na França, entre os anos de 1943 e 1952, e recomendado pela União Internacional de Controle do Câncer (UICC) e pela *American Joint Committee on Cancer* (AJCC) em 2002 (INCA, 2004), avalia a extensão do tumor primário (T), a presença de linfonodos regionais acometidos pelo tumor (N) e a presença ou não de metástases distantes (M), e é considerado o padrão internacional para classificar tumores malignos em estágios e estimar a resposta clínica à terapêutica e a sobrevida dos pacientes (LINDENBLATT *et al.*, 2012). No entanto, alguns casos de CCEO apresentam recidivas locais e disseminação metastática mesmo quando são diagnosticados em estágios iniciais e tratados corretamente, levando eventualmente o paciente a óbito. Esta observação tem levado à busca de outros fatores de prognóstico para complementar o sistema TNM (VERED *et al.*, 2010; LINDENBLATT *et al.*, 2012).

Os sistemas de gradação histológica de malignidade para o CCEO foram desenvolvidos com o intuito de fornecer subsídios para tentar explicar o discrepante comportamento biológico dos tumores com características clínicas aparentemente similares (LINDENBLAT *et al.*, 2012). Vários autores propuseram novos sistemas de gradação do CCE de cabeça e pescoço em um esforço de prever o seu comportamento clínico de forma mais confiável. (BRODERS *et al.*, 1941; ANNEROTH *et al.*, 1987; BRYNE *et al.*, 1989; BARNES *et al.*, 2005).

Em 1920, Broders, propôs a gradação histológica do CCEO baseada no grau de diferenciação celular e queratinização das células tumorais. Os CCEO foram divididos em quatro graus, variando de 1 a 4. Carcinoma grau 1: bem diferenciado com 75 a 100% de células diferenciadas; grau 2: moderadamente diferenciado, com 50 a 75% das células diferenciadas; grau 3: pobremente diferenciado, com 25 a 50% de células diferenciadas e grau 4: tumor anaplásico, com 0 a 25% de células diferenciadas (DOSHI *et al.*, 2011).

Em 1992, o sistema proposto por Bryne, removeu os parâmetros de mitose e padrão de invasão, que haviam sido proposto por Anneroth *et al.* (1987), já que em muitos casos, as amostras eram provenientes de biópsias incisionais, impedindo a avaliação do front invasivo do tecido conjuntivo. Desta forma, utilizaram os seguintes marcadores histológicos: grau de queratinização; pleomorfismo nuclear; modo de invasão e infiltrado linfoplasmocitário. Esse novo sistema melhorou a reprodutibilidade e concordância entre observadores, manteve um alto valor prognóstico e tornou-se mais rápido de ser realizado, pois apenas as áreas de invasão eram utilizadas para a gradação, e não toda espessura do tumor. Era necessário, um tamanho mínimo de 15 mm x 5 mm x 5 mm, para que este sistema pudesse ser aplicado (LOURENÇO *et al.*, 2007, DOSHI *et al.*, 2011).

O sistema de classificação da OMS revisado em 2005 foi baseado na classificação de Broders e avalia as diferenças microscópicas entre o epitélio normal e o tecido tumoral devido a uma falta de diferenciação celular. Ele leva em consideração a avaliação subjetiva do grau de queratinização celular, o pleomorfismo nuclear e a atividade mitótica, agrupando o CCEO em 03

categorias: tumores bem, moderadamente e pouco diferenciados (BARNES *et al.*, 2005) (Quadro 3). De acordo com esse sistema, os tumores bem diferenciados assemelham ao epitélio escamoso normal, ao passo que os tumores moderadamente diferenciados exibem pleomorfismo nuclear distinto e atividade mitótica, incluindo mitoses atípicas, bem como reduzida queratinização. Nos carcinomas pobremente diferenciados, predominam células imaturas, acompanhados por numerosas mitoses típicas e atípicas e mínima queratinização. Um tumor mostrando diferentes graus, o grau superior determina a categorização final.

**Quadro 2: Classificação histopatológica do carcinoma de células escamosas oral recomendada pela OMS (2005)**

<b>GRADAÇÃO HISTOPATOLÓGICA</b>	
<b>PARÂMETROS</b>	<b>CARACTERÍSTICAS</b>
<b>Pouco diferenciado</b>	Predomínio de células imaturas Numerosas mitoses típicas e atípicas Mínima ceratinização
<b>Moderadamente diferenciado</b>	Certo Grau de pleomorfismo nuclear e atividade mitótica Pouca ceratinização
<b>Bem diferenciado</b>	Arquitetura tecidual semelhante ao padrão normal do epitélio escamoso

**Fonte:** Barnes *et al.*, (2005)

Convém ressaltar que esse sistema de classificação apresenta como limitações sua natureza subjetiva; o fato de que pequenos fragmentos biopsiados podem revelar heterogeneidade histológica e falta de representatividade (WOOLGAR *et al.*, 2006).

Melhorar a reprodutibilidade inclui simplificação das categorias, clarificação da definição e omissão de recursos menos reprodutíveis. Além disso, elementos como a heterogeneidade histológica tumoral e diferenças nas experiências dos avaliadores, podem afetar a qualidade da avaliação (SAWAIR *et al.*, 2003) e conseqüentemente limitar a validade e o valor preditivo da gradação do *front* invasivo no contexto clínico ( WOOLGAR *et al.*, 2006).

### 2.3.1 - TRATAMENTO

A estratégia de tratamento é determinada por vários fatores tais como o tamanho e localização do tumor primário, estado dos linfonodos, a presença ou ausência de metástases à distância, a capacidade do paciente em tolerar o tratamento, e próprio desejo do paciente. O tratamento do CCEO inclui: cirurgia, radioterapia e quimioterapia, mas o tratamento mais comum é a combinação da cirurgia com a radioterapia, que é mais frequentemente usado para estágios avançados da doença (NEVILLE *et al.*, 2009).

### 2.4 - MARGENS CLÍNICAS

O conceito de campo de cancerização, descrito pela primeira vez por Slaughter *et al.* (1953), partia originalmente do princípio de que a mucosa clinicamente normal, adjacente ao tumor, já havia sofrido certas alterações histopatológicas que poderiam ser a causa para o desenvolvimento de múltiplas lesões com potencial de malignização. A partir da descoberta do DNA e do desenvolvimento das técnicas de biologia molecular, este conceito evoluiu, passando a incorporar alterações moleculares em sua definição.

O mesmo conceito pode ser extrapolado para as DOPMs quando aplicamos os conhecimentos da carcinogênese oral. Do ponto de vista clínico, parece fácil a determinação e diferenciação entre a apresentação clínica de uma DOPM e a mucosa clinicamente sadia adjacente a lesão. No entanto, há uma escassez na literatura, de trabalhos avaliando e comparando especificamente as DOPM e suas respectivas margens cirúrgicas, até porque muitas vezes as biópsias não contemplam peças cirúrgicas com quantidade adequada de tecido removido. A interpretação histológica e molecular das margens cirúrgicas das DOPM poderá fornecer informações importantes como comportamento da lesão, risco de recidiva e formas de tratamento mais específicas (DIAJIL *et al.*, 2013).

A ressecção completa com margens cirúrgicas negativas é uma das modalidades de tratamento curativo para o CCEO. Essa adequada margem

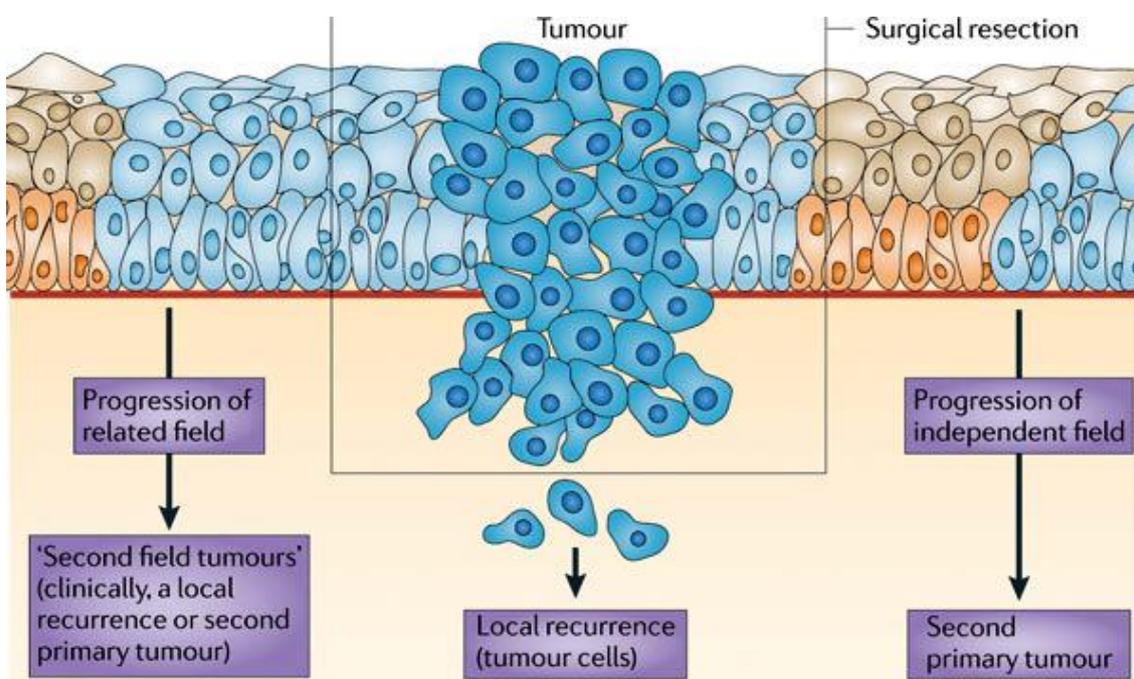
cirúrgica não pode ser confirmada até que o tecido possa ser avaliado histologicamente, desta forma, na prática clínica existem 02 margens: a do cirurgião (*in situ*) e a margem do patologista (LAWAETZ *et al.*, 2014).

Muitas vezes, a avaliação que o patologista faz em cortes de rotina, diz respeito apenas ao montante da área efetivamente examinada, sem registrar as margens cirúrgicas da lesão. O termo "margem positiva" deve ser reservado aos pacientes com tumor microscópico nas margens da ressecção (NASON *et al.*, 2009). Duas explicações para o fenômeno da "margem positiva" podem ser discutidas. A primeira é que o tumor microscópico pode estender além do tumor clínico visível e palpável. Ou então, a retração dos tecidos que ocorre após a ressecção e processamento patológico do espécime pode fazer com que a margem diminua de tamanho (CHENG *et al.*, 2008). A fixação dos espécimes de carcinoma de cabeça e pescoço em formol pode levar a uma contração no comprimento, largura e profundidade em 4,4%, 6,18% e 4,1% respectivamente (CHEN *et al.*, 2012). Independente das causas de sua positividade, a implicação oncológica da presença ou ausência de epitélio displásico na margem cirúrgica de um CCEO é de fundamental importância para o estabelecimento de um prognóstico, podendo fornecer informações importantes como risco locoregional de recidiva, o desenvolvimento de múltiplas lesões malignas e na orientação de uma terapia adjuvante (WOOLGAR, 2006).

Weijers *et al.* (2002) avaliaram a relevância clínica da DEO nas margens de 37 casos de CCEO de assoalho de boca e língua tratados cirurgicamente em relação ao desenvolvimento de recidivas locais, em um período mínimo de acompanhamento de 5 anos. Não foram incluídos pacientes nos quais a DEO severa e carcinoma *in situ* foram encontradas nas margens cirúrgicas. Concluíram que na ausência de DEO nas margens cirúrgicas e na ausência de célula tumorais em 0,5 cm de outras margens cirúrgicas, a recidiva local do CCEO após o tratamento era menor que 7% no período de acompanhamento de 5 anos. Quando havia DEO leve ou moderada nas margens cirúrgicas, a chance de recidiva era maior que 50%, devendo considerar uma nova intervenção cirúrgica.

Devido a necessidade de preservação de estruturas anatômicas, as tentativas dos cirurgiões em remover 10 mm de margem de tecido aparentemente normal ao redor do tumor durante a sua excisão cirúrgica para evitar novas intervenções cirúrgicas, nem sempre é possível (PRIYA *et al.*, 2012).

O importante papel do campo de cancerização na patogênese do CCEO está representado na Figura 1, ressaltando a sua presença nas margens cirúrgicas, mesmo após a excisão do tumor (TABOR *et al.*, 2001); além de ser fonte de recidivas locais e do segundo tumor primário em lesões não ressectadas completamente (TABOR *et al.*, 2004).



**Figura 1:** Campo de cancerização no carcinoma de células escamosas oral e os tipos de recidivas. Uma implicação clínica importante é que esse campo pode ser fonte de recidivas locais e segundos tumores de campo, mesmo após a ressecção cirúrgica do CCEO. O segundo tumor primário, mostra sua origem de células que originou o tumor primário, porém a uma distância superior a 2 cm.

**Fonte:** Leemans *et al.*

(2011)

Cancovic *et al.* (2013) determinaram as características histológicas da mucosa clinicamente normal em diferentes distâncias do CCEO. Foram

realizadas biópsias de mucosa bucal a uma distância de 10 mm e 20 mm das margens de 30 pacientes com CCEO e então comparados com a mucosa oral de 30 pacientes com lesões orais benignas. Encontraram um número significativamente maior de alterações histológicas no epitélio a 10 mm do que 20 mm da lesão tumoral. No grupo dos pacientes com CCEO, 70% apresentaram anormalidades histológicas. A uma distância de 10 mm, 20% apresentaram DEO leve e 10% CCEO. A uma distância de 20 mm do tumor, 10% mostraram alterações reativas e 3% DEO leve. As mudanças das alterações histopatológicas em mucosa aparentemente normal tomadas em diferentes distâncias indicam a existência de um campo subclínico que representa um importante parâmetro para avaliação das margens do CCEO. Somente o exame clínico e histológico convencional não são suficientes para a avaliação do comportamento do epitélio adjacente ao tumor, sendo necessário dar importância ao campo de cancerização nos pacientes com CCEO para o sucesso do tratamento e prevenção de recidivas.

A presença de células morfológicamente intactas, mas geneticamente alteradas nas margens histologicamente normais, poderia explicar certos padrões de comportamento do CCEO tais como recidivas após "completa" remoção cirúrgica com margens "negativas". Isso tem acelerado a busca de marcadores moleculares no reconhecimento e tratamento do CCEO, particularmente na avaliação das margens cirúrgicas, embora esta análise não seja ainda usada amplamente na prática clínica (HINNI *et al.*, 2013).

## **2.5 - CARCINOGENESE**

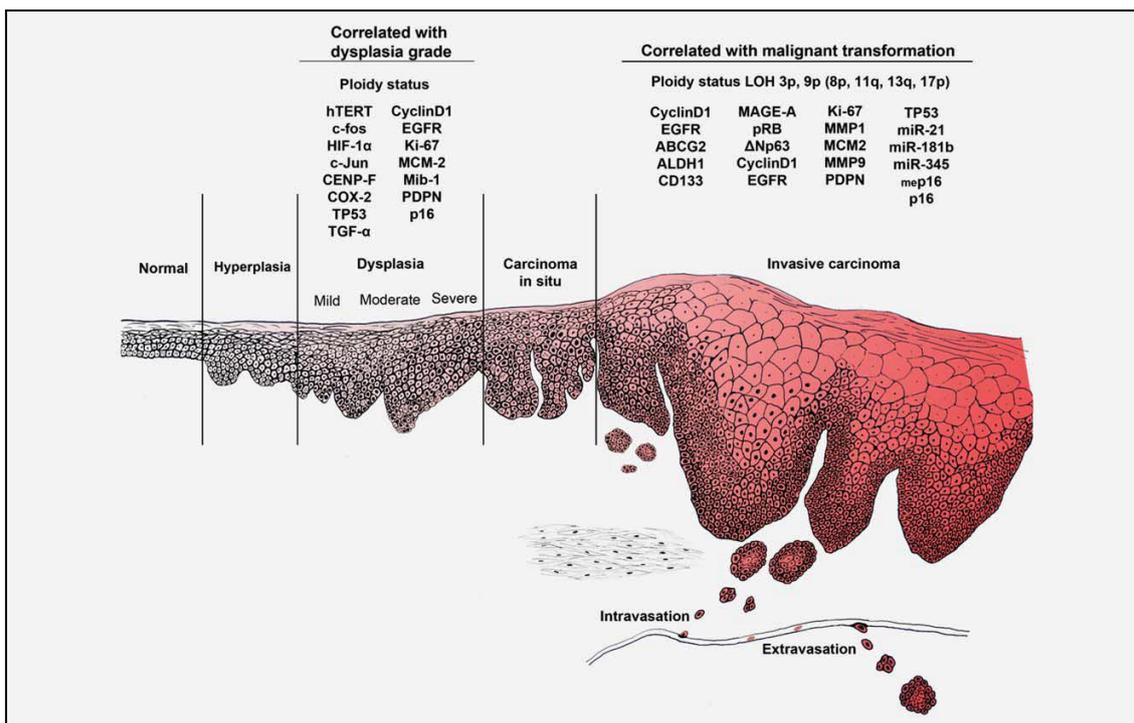
O câncer é uma doença que surge a partir de uma célula normal que sofreu acúmulo progressivo de mutações em seu material genético, as quais acarretam em importantes alterações essenciais na fisiologia celular e que coletivamente contribuem para o crescimento de malignidades. Segundo Hanahan e Weinberg (2011), oito alterações na fisiologia celular estão implicadas na indução de transformações celulares malignas, tais como, evasão da apoptose, potencial replicativo ilimitado, insensibilidade à inibição de

fatores de crescimento, angiogênese contínua, mecanismos de invasão e metástase celular, autossuficiência dos fatores de crescimento, reorganização do metabolismo energético e evasão da destruição celular pelo sistema imune.

A carcinogênese oral é um complexo processo histológico e molecular multipassos com marcadores genéticos e fenotípicos para cada etapa, que envolve uma função exacerbada de vários oncogenes, os quais controlam os processos de crescimento, divisão e sobrevivência celular e/ou a desativação de genes supressores tumorais, resultando na perda de determinados pontos do ciclo celular e na ativação de vias de reparo do DNA (LEE *et al*, 2010).

A progressão para a malignidade inclui alterações histopatológicas sequenciais no epitélio oral que variam de hiperplasia, displasia, carcinoma *in situ* até o carcinoma invasivo, que são determinadas pelo acúmulo de uma série de acontecimentos genéticos. Na carcinogênese celular, vários genes interagem uns com os outros, levando assim a várias alterações que ocorrem de uma forma bastante complexa e em diferentes fases da progressão da doença (YE *et al.*, 2008).

Vários genes/proteínas surgiram como potenciais marcadores para as DOPM e/ou CCEO e são ilustrados na Figura 2.



**Figura 2** - Resumo das mudanças moleculares que são observadas e estão associadas com os diferentes estágios da carcinogênese oral

**Fonte:** Dione et al. (2015)

Várias vias de transdução de sinalização tem sido relatadas por estarem alteradas no câncer levando a mudanças dramáticas na sobrevivência da célula, proliferação celular, morfologia, angiogênese, longevidade e outras propriedades que caracterizam a célula cancerígena (NAGATSUKA *et al.*, 2001).

A utilização de técnicas moleculares para compreender a progressão das lesões com potencial de malignização é de extrema importância. O entendimento das alterações moleculares que antecede a apresentação de um fenótipo neoplásico podem ser usado para melhorar sensivelmente a detecção precoce das alterações que são invisíveis à microscopia e para a avaliação do risco e de terapias direcionadas (MENDES, 2012).

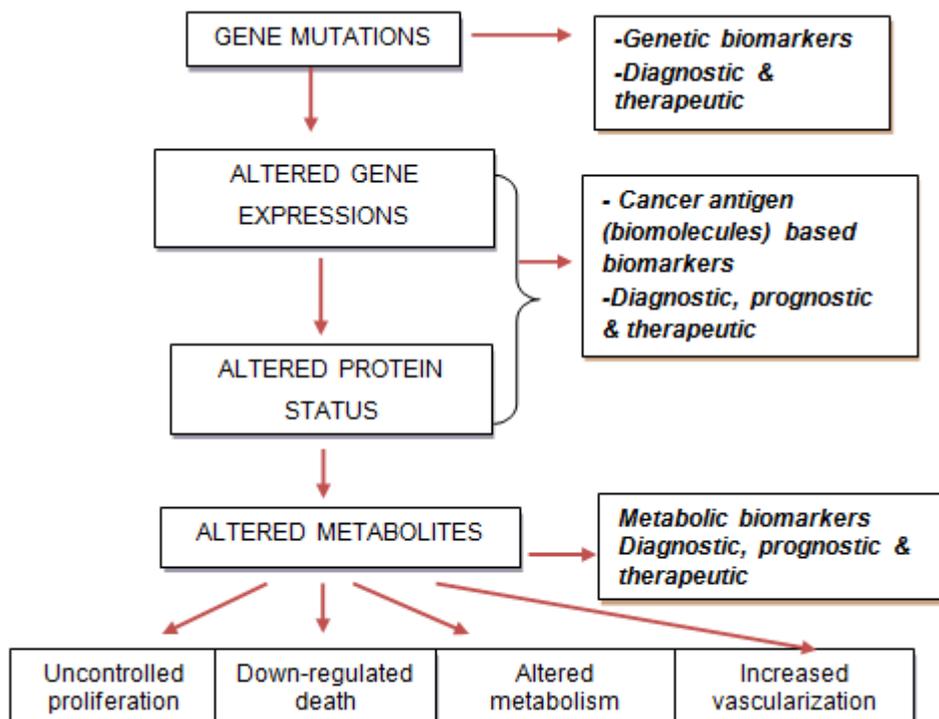
## 2.6 - BIOMARCADORES MOLECULARES

A OMS define um biomarcador como qualquer substância, estrutura ou processo que pode ser mensurado no corpo ou seus produtos e influencia ou prediz a incidência de resultados ou doença. (MISHRA *et al.*, 2010).

Talvez um dos exemplos mais antigos de biomarcadores de câncer sejam a proteína urinária *Bence Jones* e antígeno específico carcinoembrionário (CEA) em carcinomas de colo de útero (GOLD *et al.*, 1965). Outro biomarcador que é muito utilizado atualmente em ambiente clínico é o antígeno prostático específico (PSA) (LIPPI *et al.*, 2009), para o rastreamento de neoplasia prostática.

Biomarcadores do câncer podem ser biomoléculas de ácido desoxiribonucleico (DNA), ácido ribonucleico mensageiro (mRNA), proteínas, metabólitos, ou processos tais como apoptose, angiogênese ou proliferação. Os marcadores são produzidos tanto pelo próprio tumor ou por outros tecidos em resposta à presença do câncer ou outras condições associadas, tais como inflamação. Tais biomarcadores podem ser encontrados em uma variedade de fluidos, tecidos e linhagem de células. (KULASINGAM *et al.*, 2008).

A Figura 3 mostra uma visão geral de biomarcadores moleculares e seu potencial uso no diagnóstico precoce, prognóstico e terapêutica para as DOPM e CCEO.



**Figura 3** - Processo de carcinogênese, mostrando a oportunidade de identificar biomarcadores  
 Fonte: Bhatt et al. (2010)

Há uma ampla aplicabilidade dos biomarcadores para o câncer oral como: ajudar avaliar as medidas preventivas ou terapêuticas e a detecção dos estágios precoces de transformação maligna da mucosa oral; revelar as mudanças genéticas e moleculares relacionadas aos pontos precoces, intermediários, e tardios no processo da carcinogênese oral; refinar a capacidade de melhorar o prognóstico, diagnóstico e tratamento dos carcinomas orais – monitorar a progressão / recidiva, adesão ao tratamento; no desenvolvimento de drogas para os estágios precoces do câncer; determinar a eficácia e segurança de agentes quimiopreventivos (TANAKA *et al.*, 2011). Desta forma, os biomarcadores moleculares podem ajudar a responder a perguntas fundamentais sobre o comportamento biológico dos tumores, a resistência à terapia, a sensibilidade e individualização da terapia, além de identificar e tratar indivíduos predispostos ao câncer (BHATT *et al.*, 2014).

### 2.6.1 - Ki-67

A proliferação celular é considerada um processo biológico fundamental devido ao papel que desempenha no crescimento e manutenção da homeostase dos tecidos. É bem entendido que a transição do epitélio oral normal à displasia para a malignidade é caracterizada por um aumento da proliferação celular. A descoberta de vários marcadores de proliferação permitiu a detecção do estado hiperativo do epitélio e sugere ter significância no prognóstico (PITIYAGE *et al.*, 2009). Somente a camada basal é o compartimento proliferativo do epitélio oral normal, enquanto que no resto das camadas, a maturação celular é realizada sem qualquer atividade proliferativa. Assim, qualquer sinal de atividade celular proliferativa além da camada basal deve ser considerado como um sinal de alerta (DWIVEDI *et al.*, 2013).

O Ki-67 é um marcador específico de proliferação e a sua expressão é estritamente associada com a proliferação celular e usado amplamente na pesquisa do câncer, para mensurar o índice de crescimento das células em tumores humanos (SCHLÜTER *et al.*, 1993; AHMED *et al.*, 2014). Também conhecido como MKI67, este marcador é uma proteína nuclear não-histona, de meia-vida curta, com peso molecular aparente de 345 a 349 kDa, codificada pelo gene MKI67 em humanos, necessária para a proliferação celular e também associada com a transcrição do RNA ribossômico (SCHLÜTER *et al.*, 1993). A inativação do antígeno Ki-67 leva a inibição da síntese de RNA ribossômico (BROWN *et al.*, 2002).

Originalmente definido pelo protótipo do anticorpo monoclonal Ki-67 que foi gerado pela imunização de camundongos com núcleo de células de linhagem L428 de linfoma de Hodgking. O nome é derivado da cidade de origem (Kiel, Alemanha) e o número do clone original identificado na 67ª placa de cultura tecidual (BROWN *et al.*, 2002).

Ele é expresso durante todas as fases ativas do ciclo celular (G1, S, G2 e mitose) mas está ausente na fase G0, em que a célula está em repouso (SCHOLZEN *et al.*, 2000). Durante a interfase, pode ser detectado

exclusivamente no núcleo celular, enquanto em mitose é relocada para a superfície dos cromossomos. (BROWN *et al.*, 2002).

O uso do Ki-67 está restrito ao tecido fresco, pois o epítipo não sobrevive à fixação histológica de rotina. O MIB-1, é um anticorpo monoclonal, que reconhece o epítipo do Ki-67 e que foi desenvolvido para marcar esta proteína em tecidos fixados em formol e incluídos em parafina e em tecidos rotineiramente processados com recuperação antigênica (CATTORRETTI *et al.*, 1992).

Vários estudos têm mostrado uma correlação entre a expressão do ki-67 com a agressividade tumoral, metástases e valor prognóstico de uma variedade de tumores malignos, como câncer de mama (PAKSOY *et al.*, 2012), pancreático (McCALL *et al.*, 2013) e CCEO (NADERI *et al.*, 2014, PATEL *et al.*, 2014).

Naderi *et al.* (2014) investigaram a relação entre expressão do Ki-67 e a infiltração eosinofílica com as características clínicas do CCEO, por meio de 24 blocos parafinados. Os resultados mostraram que não houve nenhuma relação significativa entre idade, gênero, diferenciação histopatológica, o número de eosinófilos e a expressão do Ki-67. Uma relação positiva foi encontrada entre o número de células positivas para o Ki-67 e o número de eosinófilos e também uma relação positiva entre o comprometimento de linfonodos com as células eosinofílicas e as células positivas para o Ki-67.

Patel *et al.* (2014) investigaram a expressão da proteína p53 e do antígeno ki-67 nas DOPM e no CCEO, utilizando 30 casos de CCEO, 03 de DEO leve, 03 de DEO moderada, 03 de DEO severa e 05 com mucosa normal para controle. Em CCEO, demonstraram uma co-expressão e correlação entre p53 e Ki-67, sugerindo que a alteração do p53 leva a um aumento da proliferação celular. A forte correlação encontrada entre a expressão do p53 e Ki-67 e as DOPM e o CCEO, sugere que podem ser utilizados como úteis marcadores na transformação maligna de lesões displásicas.

Uma forte associação da proliferação celular é evidenciada pela expressão do imunomarcador Ki-67 em DOPM e CCEO em comparação à

mucosa normal. Sua expressão está aumentada em displasias e CCEO quando comparado com a mucosa normal (AHMED *et al.*, 2014). Vários autores mostraram que o ki-67 está sobre-expresso na camada suprabasal do epitélio e um aumento de sua expressão com a severidade da displasia (GONZALEZ *et al.*, 2000; DWIVEDI *et al.*, 2013; BIRAJDAR *et al.* 2014).

Gonzalez *et al.* (2000) avaliaram a expressão suprabasal do ki67 no epitélio adjacente de 74 casos de CCEO. Encontraram epitélio normal em 19 casos, 38 casos hiperplásicos e 37 displásicos (20 DEO leve, 12 moderada e 5 severa). No epitélio normal, a expressão do Ki-67 estava presente em 9 casos e ausente em 10. No epitélio hiperplásico, 18 casos estavam presentes e ausente em 20. O epitélio displásico, esteve presente em 27 casos, sempre na camada basal e suprabasal e ausente em 10 casos. Todos os casos de displasia moderada e severa expressaram ki-67 na camada basal e suprabasal. Os resultados mostraram uma significativa associação entre a expressão suprabasal do Ki-67 com a presença e gravidade da displasia.

Dwivedi *et al.* (2013) avaliaram a expressão do Ki-67 na DEO e no CCEO, utilizando 30 casos de DEO, 15 de CCEO e 05 de mucosa oral normal. Os resultados mostraram que a expressão do Ki-67 nas camadas suprabasais aumentou de acordo com o aumento da graduação da DEO e do CCEO. Isso evidencia que o ki-67 pode fornecer critérios objetivos para determinar a gravidade da DEO e a graduação histológica do CCEO e que a camada basal e suprabasal parecem ser o compartimento do epitélio mais adequado pra investigar a possibilidade de modulação da proliferação de células em lesões precursoras.

Birajdar *et al.* (2014) utilizaram o Ki-67 para tentar demonstrar a presença, localização e o padrão de proliferação celular em diferentes graus histológicos de DEO, CCEO e em epitélio oral normal. Foram analisados 20 casos de CCEO, 60 casos de DEO (30 de baixo risco e 30 de alto risco) e 20 casos de mucosa oral normal. A expressão do Ki-67 foi vista na camada basal e parabasal em epitélio de mucosa oral normal, se estendendo para a camada espinhosa nas DEO, propondo que pode ser usado no seu diagnóstico. O índice de marcação aumentou dos casos de DEO de baixo risco para alto risco.

Nos casos de CCEO, foi expresso mais na periferia dos ninhos tumorais, onde são observadas células indiferenciadas e frequentes mitoses, do que nas células centrais, que apresentam uma capacidade de queratinização. Essa correlação e a variação na quantidade de expressão, indica que a expressão do Ki-67 pode ser útil no diagnóstico e prognóstico do CCEO.

Ahmed *et al.* (2014) avaliaram a expressão do Ki-67 e do EMMPRIN e sua correlação com os parâmetros clínico-patológicos em 35 casos de CCEO. Foi encontrada uma alta expressão do ki-67 no *front* invasivo, onde ocorre uma série de características moleculares (ganho ou perda de moléculas de adesão, secreção de enzimas proteolíticas, aumento da proliferação celular e iniciação da angiogênese) e morfológicas que irão refletir em uma melhor progressão tumoral do que em outras partes do tumor. Além disso, houve uma relação estatisticamente significativa entre a expressão do Ki-67 e a graduação histológica do CCEO. Os resultados sugerem que a sua expressão em CCEO é significativa e útil em prever o grau histológico de diferenciação, o prognóstico da lesão e a determinação das taxas de sobrevida.

Dragomir *et al.* (2012) analisaram 34 casos de CCEO, sendo que 11 casos apresentavam DEO adjacente à lesão. A imunexpressão do p53 e p16 não revelou diferença estatisticamente significativa entre os parâmetros clínicos (idade, hábitos, localização da lesão) ou histopatológicos (graduação da DEO e do CCEO). Somente o Ki-67 teve maior expressão com a diminuição do grau de diferenciação tumoral e com o elevado grau da DEO. O estudo evidenciou a importância da imunomarcagem do p16 para identificar lesões displásicas e o valor preditivo do p53 e Ki-67 para reconhecer as formas mais agressivas de CCEO.

Há uma necessidade de incorporar biomarcadores preditivos no atual estadiamento tumoral para identificar pacientes com maior risco de recidivas e pobre sobrevida ou que necessitem de tratamento mais agressivo e um monitoramento mais próximo (YU *et al.*, 2015).

O entendimento das proteínas expressas na fase de proliferação, avaliadas em lesões precursoras do CCEO pode esclarecer as fases iniciais, tornando foco de ação na prevenção do câncer de boca, identificando

pacientes com maior risco de recidivas e pobre sobrevida ou que necessitem de tratamento mais agressivo e um monitoramento mais próximo (YU *et al.*, 2015). Além disso, pode prever a resposta a terapia, ajudando a otimizar o tratamento, melhorando os resultados e evitando exposições desnecessárias à potenciais toxicidades (TANAKA *et al.*, 2011).

Atualmente, não há uma única proteína que funcione de forma eficaz como um marcador de transformação maligna em leucoplasia. Isso se deve à natureza do desenvolvimento do CCEO, que acontece em eventos multipassos. Por isso, parece necessária a busca simultânea de múltiplas expressões em amostras clínicas para encontrar marcadores que podem melhor prever o risco de transformação maligna da leucoplasia (LAMEIRA *et al.*, 2014).

## **2.6.2      PODOPLANINA**

Uma característica proeminente do comportamento maligno é a capacidade das células tumorais em metastatizar para outros órgãos. As metástases de vários carcinomas humanos, incluindo o CCEO, ocorrem principalmente através do sistema linfático (WARNAKULASURIYA *et al.*, 2008). O estado do linfonodo em vários tipos de câncer mostra um impacto direto sobre o prognóstico e a estratégia terapêutica. Há aproximadamente 15 anos, havia uma lacuna com relação ao entendimento do sistema linfático em nível molecular, devido a falta de marcadores epiteliais linfáticos. A introdução de marcadores como a podoplanina (PDPN) explorou os vasos linfáticos presentes em áreas tumorais e peritumorais, e o prognóstico de diversas doenças malignas, tais como o melanoma maligno, carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, câncer de mama e adenocarcinoma gástrico (RAICA *et al.*, 2008).

A podoplanina (também conhecida como Aggrus, M2A, E11, GP38) é uma sialoglicoproteína transmembrana do tipo I, de 38 kDa, constituída por 162 aminoácidos (KAWAGUCHI *et al.*, 2008; BARTULI *et al.*, 2012). Apresenta um domínio extracelular rico em resíduos de Serina e Treonina, um único domínio

que atravessa a membrana hidrofóbica e um curto domínio intracelular, composto por apenas 09 aminoácidos, que será local de recrutamento das proteínas da família ezrina, radixina e moesina (KANeko *et al.*, 2006, KANEKO *et al.*, 2007).

O D2-40 é um anticorpo monoclonal que detecta o epítipo de fixação na podoplanina e que tem sido muito utilizado para a marcação específica do endotélio linfático, em materiais fixados (DUMOFF *et al.*, 2006).

Fisiologicamente, a podoplanina parece ter um papel multifacetado no desenvolvimento embriogênico e crescimento de vários órgãos como os do sistema linfático, pulmões e coração em seres humanos. Na vasculogênese, tem um papel crucial na separação do sistema linfático do circulatório sanguíneo (SWAIN *et al.*, 2014).

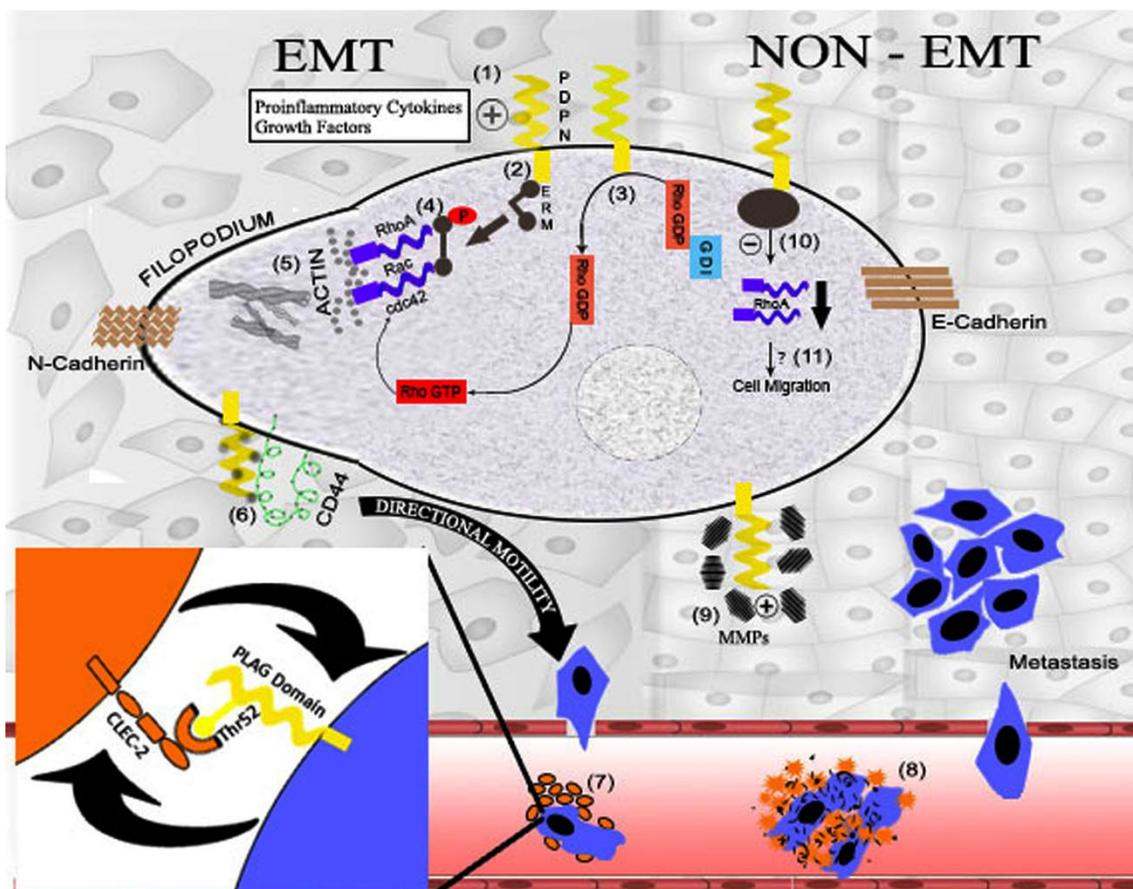
Uma variedade de citocinas pró-inflamatórias (IL-1 $\beta$ , IL-6, IL-22) e fatores de crescimento (TGF- $\beta$ , TGF- $\beta$ 1, IFN- $\gamma$ ) estão associados com a regulação da expressão da PDPN (HONMA *et al.*, 2012).

O único receptor conhecido para PDPN é o CLEC-2, uma lectina tipo C expressa pelas plaquetas, neutrófilos e células dendríticas (ACTON *et al.*, 2012). A agregação plaquetária é proposta como um dos mecanismos com potencial de influenciar a metástase tumoral devido a proteção das células tumorais durante seu trânsito pela corrente sanguínea, mediar a adesão ao endotélio vascular, evasão da imunovigilância e liberação de várias moléculas bioativas para facilitar o extravasamento de células tumorais e crescimento em locais metastáticos (SWAIN *et al.*, 2014). No entanto, o efeito desta interação ainda não foi completamente estabelecido, necessitando de mais pesquisas dado que *in vivo*, muitas células PDPN+ são expostas a sinais CLEC-2. (ASTARITA *et al.*, 2012).

Embora o seu papel exato na iniciação do câncer permanece aberto a discussões, o mecanismo intrínseco como ativação de vias de sinalização pode contribuir tanto na iniciação quanto progressão tumoral. Em queratinócitos humanos, a podoplanina não interage diretamente com a actina, mas via proteínas ERM tais como ezrina, radixina e moesina, que funcionam como

conectores entre as proteínas da membrana e a actina do citoesqueleto (FEHON *et al.*, 2010). Devido ao curto domínio intracelular, é difícil imaginar que existam muitas vias de sinalização para a PDPN, que não seja pelas proteínas ERM, simplesmente devido as restrições espaciais (ASTARITA *et al.*, 2012).

Estudos tem mostrado (Figura 4) que a super expressão da podoplanina pode levar ao aumento da fosforilação de ezrina ou ativação de GTPases, principalmente RhoA, que estimula a polimerização e remodelamento da actina do citoesqueleto, levando à formação de um fenótipo pró-migratório observado nas células cancerígenas (MARTÍN-VILLAR *et al.*, 2005; RAICA *et al.*, 2008). Assim, tem sido postulado a sua capacidade de induzir a invasão e migração celular pelo remodelamento da actina do citoesqueleto, mesmo na presença da E-caderina (WICKI and CHRISTOFORI, 2007; INOUE *et al.*, 2012).



**Figura 4:** Ação da podoplanina na tumorigênese e metástase. Citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento agem como reguladores positivos da transcrição da PDPN. A superexpressão da PDPN pode induzir a fosforilação da proteína ERM ou a ativação da Rho GDP/GTP pela Rho GTP quinase. O efeito sobre Rac-1, Rho-A e cdc-42 estimula a polimerização da actina levando a formação de filopodia. Através da indução de metaloproteases da matrix, a PDPN também acelera o processo de metástase.

**Fonte:** Swain, Niharika, et al. (2014).

A podoplanina é expressa em células normais, tais como células mesoteliais, plexo coróide, osteócitos, células dendríticas foliculares e células escamosas da pele, esôfago e colo do útero. Na cavidade oral, é expressa somente em células endoteliais linfáticas (SCHACHT *et al.*, 2003) ou células mioepiteliais de glândulas salivares normais (TSUNEKI *et al.*, 2013).

Esta molécula transmembrana também é expressa em várias neoplasias tais como linfangioma, angiosarcoma, carcinoma do ovário, carcinoma testicular, mesotelioma, astrocitoma, e CECs da pele, pulmão, colo uterino, do esôfago, e da laringe (INOUE *et al.*, 2012). No entanto, a ligação da sua expressão com o prognóstico clínico em CCEs não tem sido consistente e a sua função biológica pode variar entre os diferentes tipos de câncer. Em CCEs da pele, cavidade oral, esôfago e em estágio inicial do carcinoma de laringe, a

sobre-expressão da podoplanina tem sido correlacionada com um pobre resultado clínico, enquanto que entre os pacientes com CEC do pulmão, aqueles com tumores podoplanina-positiva mostram uma melhor sobrevida global (SHIMADA *et al.*, 2009). Em pacientes com carcinoma epidermóide de colo uterino (DUMOFF *et al.*, 2006) e carcinoma avançado de laringe (RODRIGO *et al.*, 2010), baixos níveis de podoplanina estão associados com a presença de invasão linfática.

Estudos mostraram a expressão da podoplanina em lesões hiperplásicas e displásicas adjacentes aos carcinomas de células escamosas orais primários, levantando a questão de que a sua expressão pode ocorrer na tumorigênese oral e desempenhar uma função biológica na transformação maligna (YUAN *et al.*, 2006; RAICA *et al.*, 2008; KAWAGUCHI *et al.*, 2008).

Em ameloblastomas, tumores queratocísticos odontogênicos, e adenoma pleomórfico de glândula salivar humana, que são todos caracterizados como lesões benignas, mas localmente invasivos, foi demonstrado um aumento da expressão da podoplanina (GONZÁLEZ-ALVA *et al.*, 2010, OKAMOTO *et al.*, 2010; TSUNEKI *et al.*, 2013).

Recentemente, estudos reportaram a sobre-expressão da podoplanina em lesões orais com potencial de malignização como leucoplasia oral, eritroleucoplasia oral, carcinoma *in situ*, e líquen plano (SHI *et al.*, 2010; FUNAYAMA *et al.*, 2011; KREPPEL *et al.* 2012; FENG *et al.*, 2012; de VICENTE *et al.*, 2013). Essas evidências sugerem o uso da podoplanina como um promissor biomarcador para o risco de câncer oral em pacientes com lesões com potencial de malignização.

Kawaguchi *et al.* (2008) em um estudo prospectivo de 7,5 anos de acompanhamento relataram forte associação entre a alta expressão da podoplanina e o desenvolvimento de câncer oral em leucoplasias orais. Um estudo retrospectivo conduzido por Kreppel *et al.* (2012) também detectou resultados semelhantes ao estudo anterior. Os autores avaliaram se a expressão da podoplanina em biópsias poderia servir como um biomarcador para prever o risco de transformação maligna em 60 pacientes com leucoplasia oral e sem nenhum tratamento prévio da lesão. A alta expressão foi associada

com a transformação maligna e com o aumento da gradação histopatológica da DEO. Para o CCEO, a taxa de sobrevivência de 5 anos diminuiu de 100% com nenhuma expressão para 41,7% em pacientes com altos níveis de expressão. Porém, a localização da lesão e os hábitos dos pacientes como consumo de álcool e o tabaco não mostraram associação significativa com a expressão da podoplanina.

Martín-Villar *et al.* (2005) notaram pela primeira vez a expressão heterogênea de PDPN restrita no *front* tumoral de uma amostra de tecido de CCEO com sub-regulação de E-caderina induzindo a redistribuição de ezrina para as bordas da célula, formação de protruções na superfície celular e reduzida adesividade célula-célula dependente de  $Ca^{2+}$ .

Yuan *et al.* (2006) relataram significativa correlação entre a alta expressão de PDPN, metástase em linfonodos e taxa de sobrevivência exclusivamente em CCEO. Um estudo semelhante realizado por Kreppel *et al.* (2010) também encontrou forte associação entre as variáveis acima mencionadas. A sobrevivência global em 5 anos (31%) para os pacientes com tumores com altos níveis de expressão PDPN foi significativamente menor do que os pacientes com baixa e moderada expressão de PDPN (93 e 65%, respectivamente).

Prasad *et al.* (2015), em um estudo retrospectivo de 30 casos de CCEO, avaliaram a expressão da PDPN em diferentes gradações histológicas e correlacionaram com parâmetros clínicos como idade, sexo, localização e hábitos dos pacientes. A alta expressão da PDPN nos CCEO sugere uma alta frequência de metástases e um *status* imaturo na diferenciação do CCEO.

Desta forma, a caracterização da expressão da podoplanina e do Ki-67 nas DOPM, nos CCEOs e em seus respectivos tecidos perilesionais e peritumorais, é uma tentativa de traçar um espectro, buscando um melhor entendimento do processo de carcinogênese oral. Para as DOPM, levanta a possibilidade em prever o verdadeiro risco de malignização, pelo aumento dos parâmetros clínicos e histológicos estabelecidos, podendo ser útil no diagnóstico, prognóstico, no direcionamento do tratamento e acompanhamento. No CCEO, poderá delinear de forma mais precisa o diagnóstico, prognóstico,

progressão tumoral, as possíveis metástases, além de poder também direcionar o tratamento e o acompanhamento.

### **3 - OBJETIVOS**

#### **3.1 - Objetivo geral**

- Caracterizar a expressão molecular do ki-67 e da podoplanina nas DOPM e seus tecidos perilesionais e nos CCEOs e seus tecidos peritumorais.

#### **3.2 Objetivos específicos**

- Verificar a gradação histopatológica das DOPM e da sua margem perilesional clinicamente sadia;
- Verificar a gradação histopatológica dos CCEO e da sua margem peritumoral clinicamente sadia;
- Analisar qualitativamente e quantitativamente as expressões das proteínas Ki-67 e podoplanina nas DOPMs e CCEOs e suas margens livres;
- Comparar a expressão do Ki-67 e da podoplanina entre as DOPM e seus tecidos perilesionais;
- Comparar a expressões do Ki-67 e da podoplanina entre os tecidos tumorais e peritumorais dos carcinomas de células escamosas orais;
- Comparar a expressão do Ki-67 e da podoplanina entre as DOPM e os seus tecidos perilesionais e os CCEO e seus tecidos peritumorais.
- Correlacionar as características clinicopatológicas dos pacientes com os graus histopatológicos da DOPM e CCEO e a expressão imuno-histoquímica do Ki-67 e da podoplanina.

## **4 - MATERIAIS E MÉTODOS**

### **4.1 - CONSIDERAÇÕES ÉTICAS**

O presente estudo foi realizado após aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Espírito Santo (CEP/UFES) sendo a pesquisa conduzida de acordo com as Resoluções 196/96 e 411/2011 do Conselho Nacional de Saúde (CNS).

### **4.2 - OBTENÇÃO, SELEÇÃO E CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA**

O delineamento do estudo consistiu em um estudo seccional, descritivo-analítico, observacional, quantitativo, cego, de cunho clínico e histopatológico dos casos encaminhados ao Núcleo de Diagnóstico Bucal – NDB/UFES, com suspeitas de diagnósticos clínicos de leucoplasias, eritroplasias orais, queilites actínicas e carcinomas de células escamosas orais, atendidas no período de Maio de 2013 e Julho de 2014. Pacientes maiores de 18 anos e que tenham assinado o TCLE (APÊNDICE A), foram incluídos no estudo. O critério de exclusão da amostra foram lesões com diagnósticos microscópicos diferentes de leucoplasia, eritroplasia, queilite actínica e CCEO.

Os pacientes com as lesões suspeitas clínicas incluídas no estudo foram biopsiados no NDB por um mesmo cirurgião-dentista, habilitado para tal procedimento, sob anestesia local, respeitando os princípios cirúrgicos básicos.

As lesões suspeitas de DOPM acima de 1,0 cm foram submetidas à biópsia incisional, com remoção da parte clinicamente mais representativa da lesão e uma parte da margem perilesional clinicamente sadia. As lesões com até 1,0 cm foram submetidas a uma biópsia excisional, incluindo também uma parte de margem perilesional clinicamente sadia. Nos casos que apresentaram quadro clínico compatível com CCEO foram realizadas biópsias incisoriais removendo uma parte da lesão suspeita e uma parte perilesional de margem clinicamente normal.

Os espécimes cirúrgicos foram fixados em formol tamponado a 10% por 24 horas, registrados e codificados no Serviço de Anatomia Patológica Bucal da UFES para posterior macroscopia e processamento histotécnico no Laboratório Multiusuário do Departamento de Morfologia da UFES.

Os dados clínicopatológicos dos pacientes foram coletados durante o exame clínico e, posteriormente, transferidos para uma ficha estruturada especificamente para a pesquisa (APÊNDICE B). Foram incluídos: idade, gênero, cor/raça, tabagismo (tipo/tempo/frequência), etilismo (tipo/tempo/frequência) e a localização da lesão. Foram considerados tabagistas os indivíduos que relataram o consumo de tabaco, em qualquer forma de apresentação, pelo menos uma vez ao dia, e etilistas os pacientes que relataram fazer uso de qualquer tipo de bebida alcoólica diariamente. Aqueles que não ingeriam bebida alcoólica e/ou não fumavam há pelo menos 01 ano foram considerados ex-etilistas e ex-tabagistas, respectivamente (CINTRA *et al.*, 2013).

Após avaliação e emissão do laudo histopatológico, os pacientes com diagnóstico microscópicos de lesões benignas foram tratados e acompanhados no Núcleo de Diagnóstico Bucal ou nas Clínicas de Estomatologia e Cirurgia Bucomaxilofacial II, atividade prevista no conteúdo programático dessas disciplinas. Os pacientes com diagnóstico final de lesões malignas foram encaminhados ao Hospital Santa Rita (Vitória/ES). Além disso, outros encaminhamentos foram realizados quando a doença envolvia uma equipe multidisciplinar.

Considerando-se os critérios de inclusão e exclusão acima descritos, um total de 35 espécimes se enquadraram no presente estudo, com 25 casos de DOPM e 10 casos de CCEO.

### 4.3 - ESTUDO MORFOLÓGICO

Após o processamento histotécnico, os espécimes foram emblocados em parafina para posterior obtenção dos cortes histológicos; montagem em lâminas de vidro; coloração em Hematoxilina-Eosina (H&E) e análise microscópica.

#### 4.3.1 - Técnica de rotina (Hematoxilina & Eosina)

Os blocos de parafina foram submetidos a microtomia com micrótomo rotativo Leica RM 212 RT (*Leica Biosystems Nussioch GmbH, Munique, Alemanha*) para obtenção de cortes seriados uniformes de 5µm de espessura.

Após microtomia, os cortes passaram por uma solução de álcool 30% com a finalidade de esticá-los; depois foram imersos em banho-maria a 45°C (Lupetec BH 05) e pescados com lâminas não silanizadas (Global Glass - *Global Trade Technology*) que foram previamente limpas com álcool 70%, e devidamente identificadas. As lâminas foram mantidas em estufa (FANEM 900 kw, modelo 310, Brasil) por 24 horas, a 40°C para secagem.

Em seguida, as lâminas foram desparafinizadas em estufa a 60°C por 40 minutos, colocadas em berços apropriados e passaram pela sequência de soluções descritas no protocolo da Hematoxilina-Eosina (H&E) adotado pelo Grupo de Estudos em Patologia Bucal da UFES, descrito a seguir:

- Desparafinização em Xilol Puro (3 banhos de 3 minutos cada um);
- Imersão em solução de Álcool/Xilol (proporção 1:1, durante 3 minutos);
- Hidratação em banhos com concentração decrescente de álcool: álcool absoluto (2 banhos de 3 minutos cada um) e álcool 96% (3 minutos);
- Lavagem em água corrente por 3 minutos;
- Imersão por 6 minutos em Hematoxilina de Harris (previamente filtrada) seguida de lavagem rápida em água e logo após, mergulho

rápido em álcool ácido (1% de HCl e 99% de etanol);

- Enxague em água corrente por 10 minutos e imersão em Eosina por 3 minutos;
- Lavagem rápida para retirada do excesso de corante;
- Desidratação das lâminas em álcool: álcool 96% (1 minuto) e álcool absoluto (2 banhos de 2 minutos cada);
- 1 banho de Álcool/Xilol (proporção 1:1) de 2 minutos;
- 3 banhos de Xilol puro, com imersão de 2 minutos cada.
- Montagem das lâminas em meio de montagem *Permount (Fisher Scientific)*. Os excessos deste foram removidos e as lâminas foram etiquetadas e guardadas para secagem completa.

#### 4.3.1.1 - FORMAÇÃO DOS GRUPOS

Após análise histopatológica das lesões, dois grupos experimentais foram compostos: DOPMs (leucoplasia, eritroplasia e queilite actínica) e CCEOs. As lâminas foram previamente cegas de forma aleatória, por um examinador, e identificadas pelo grupo e pelo caso, para que não houvesse interferência na análise dos dados:

**Grupo G1:** Desordens orais com potencial de malignização(DOPM)

**Grupo G2:** Carcinoma de células escamosas oral(CCEO)

## 4.4 - ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

### 4.4.1 - Critérios para diagnóstico e classificação das DOPMs

A análise descritiva dos aspectos histopatológicos dos cortes das DOPM foi realizada, por um observador previamente calibrado, em um microscópio óptico (Olympus AX70, Olympus America Inc.,NY, USA), para avaliar a presença e o grau de DEO. O índice Kappa intra-examinador obtido foi de 0,8.

Foram avaliadas, a área da lesão propriamente dita e área perilesional.

Os casos conflitantes foram revistos e acordados com um outro observador. As lâminas foram avaliadas microscopicamente seguindo os critérios citológicos e arquiteturais preconizados pela OMS (2005) (Quadro 4) e a classificação da DEO foi estabelecida utilizando-se o sistema de gradação da OMS (2005), conforme descrito no Quadro 5.

**Quadro 4 - Critérios morfológicos e citológicos utilizados para o diagnóstico da DEO segundo OMS**

<b>Alterações teciduais e da arquitetura epitelial</b>	<b>Alterações citológicas</b>
Estratificação epitelial irregular	Anisonucleose
Perda da polaridade das células basais	Pleomorfismo nuclear
Hiperplasia das células basais	Anisocitose
Cristas epiteliais em forma de gota	Pleomorfismo celular
Aumento do número de mitoses	Relação núcleo/citoplasma aumentado
Mitoses anormais	Núcleo aumentado
Disqueratose	Figuras atípicas de mitose
Pérolas de queratina nas cristas epiteliais	Nucléolos aumentados em número e tamanho
	Hipercromatismo

Fonte: Warnakulasuriya *et al.* (2008) – Adaptado

**Quadro 5 - Gradação da DEO segundo OMS (2005)**

<b>Classificação do grau de displasia epitelial oral preconizado pela OMS</b>	
<b>Leve</b>	Alterações na arquitetura epitelial limitada ao terço inferior do epitélio
<b>Moderada</b>	Alterações na arquitetura epitelial estendem-se até o terço médio do epitélio.
<b>Severa</b>	Alterações na arquitetura epitelial observada em mais de dois terços do epitélio.

Fonte: Barnes *et al.* (2005).

#### **4.4.2 - Critérios para diagnóstico e gradação de malignidade tumoral para o CCEO**

A avaliação e interpretação histomorfológica dos CCEOs foi realizada de acordo com o sistema de gradação histológica de malignidade (SGHM) proposto por Bryne *et al.* (1992), baseado nos critérios como grau de queratinização, pleomorfismo nuclear, número de mitoses, padrão de invasão e infiltrado inflamatório.

Entre os aspectos microscópicos do CCEO propostos pelo sistema de gradação histológica de malignidade tumoral de Bryne (1992), foram adotados os seguintes critérios: queratinização celular (disceratose), formação de pérolas córneas, mitoses atípicas, pleomorfismo celular e nuclear, associados aos parâmetros numéricos e de percentual, resultando em critérios que permitiram uma análise semi-quantitativa. Em virtude do material em estudo ser oriundo de biópsias incisionais, os parâmetros fundamentados com relação à resposta do hospedeiro frente ao tumor, como invasão tumoral e infiltrado inflamatório linfoplasmocitário foram excluídos com a finalidade de não comprometer a análise. Os critérios e os escores adotados para realizar a gradação histopatológica dos casos da amostra são mostrados no Quadro 6.

**Quadro - 6: Critérios para classificação de malignidade tumoral do CCEO proposto por Bryne et al. (1992).**

<b>Classificação de malignidade tumoral proposto por Bryne</b>				
<b>PARÂMETROS MORFOLÓGICOS</b>	<b>ESCORES ATRIBUÍDOS</b>			
	<b>1</b>	<b>2</b>	<b>3</b>	<b>4</b>
	<b>Intensa</b>	<b>Moderada</b>	<b>Mínima</b>	<b>Ausente</b>
Disceratose	>50% das células	20-50% das células	5-20% das células	0-5% das células
	<b>Pouco</b>	<b>Moderado</b>	<b>Abundante</b>	<b>Extremo</b>
Pleomorfismo nuclear e celular	>75% das células maduras	50-75% das células maduras	25-50% das células maduras	0 – 25% das células maduras
Mitoses atípicas	0 a 1	2 a 3	4 a 5	>5
	<b>Numerosas</b>	<b>Moderadas</b>	<b>Mínimas</b>	<b>Ausentes</b>
Perolas córneas	>5	4 – 5	2 - 3	0 - 1

Fonte: Bryne *et al.*, (1992) - Adaptado

Os escores de cada parâmetro foram somados para obter uma pontuação final de malignidade de cada caso, que variou de 4 a 16 pontos. Os espécimes tumorais foram então classificados como bem diferenciados (escore entre 4 e 6), moderadamente diferenciado (escore entre 7 e 10), pobremente

diferenciado (escore entre 11 e 14) e indiferenciado (escore entre 15 e 16), conforme apresentado na Quadro 7.

**Quadro 7 - Classificação histopatológica do CCEO segundo Bryne *et al.*, (1992)**

<b>Classificação do CCEO segundo a somatória dos escores</b>	
<b>VALORES</b>	<b>GRADUAÇÃO HISTOLÓGICA</b>
Somatório entre 4 e 6	<b>Bem diferenciado</b>
Somatório entre 7 e 10	<b>Moderadamente diferenciado</b>
Somatório entre 11 e 14	<b>Pouco diferenciado</b>
Somatório entre 15 e 16	<b>Indiferenciado</b>

**Fonte:** Bryne *et al.* (1992) - Adaptado

Esta classificação consiste numa adaptação realizada a partir da metodologia proposta por Bryne *et al.* (1992) e Barnes *et al.* (2005), representando uma tentativa de reduzir as variáveis que induzem a uma maior subjetividade, menor reprodutividade e erros de amostragem no presente trabalho.

#### **4.4.3 - Identificação da zona de transição entre lesão propriamente dita e tecido perilesional**

A padronização das zonas a serem avaliadas do CCEO (lesão propriamente dita e margem clinicamente sadia) foi realizada com o auxílio de um microscópio binocular Olympus AX70, Olympus America Inc., NY, USA, em objetiva de 10x e 20x, marcando o ponto do início da invasão tumoral com uma linha imaginária traçada perpendicular à superfície epitelial. Quando havia epitélio clinicamente sadio em ambos os lados da lesão, foi considerado apenas o lado com maior número de atipias epiteliais.

Para as DOPMs, devido aos insuficientes critérios para definir com clareza a zona de transição, considerou-se uma extremidade como o tecido perilesional e a outra parte como a lesão propriamente dita, para os casos de biópsias incisionais. Quando se tratava de biópsias excisionais, uma das extremidades foi desconsiderada, por se tratar de margem de tecido clinicamente sadio e uma região central foi considerada como a lesão propriamente dita.

As lâminas coradas em H&E foram examinadas em um microscópio óptico binocular (Axioskop 2 plus (Zeiss, Jena, Alemanha) em objetiva de 20x e 40x e as fotomicrografias representativas foram tiradas com uma câmera digital (AxioCam ERc5s (Carl Zeiss Vision GmgH, Alemanha) acoplada ao microscópio. As imagens foram capturadas para um microcomputador através de um software de aquisição e análise de imagens (AxioVision Release 4.8.2 - Carl Zeiss Vision GmgH, Alemanha) e salvas no formato TIFF (*Tagged Image File Format*) para posterior análise.

#### 4.5 - ESTUDO IMUNO - HISTOQUÍMICO

Todos os blocos de parafina selecionados foram cortados com micrótomo rotativo Leica RM 212 RT (*Leica Biosystems Nussioch GmbH, Munique, Alemanha*) na espessura de 3µm no Laboratório de Biologia do Desenvolvimento e Tumorigênese do Departamento de Morfologia/UFES e o material obtido foi colocado sobre lâminas silanizadas (*Starfrost® - Waldemar Knittel, Alemanha*).

As reações de imuno-histoquímica foram realizadas no Laboratório de Patologia Oral do Departamento de Anatomia Patológica da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas (FOP/UNICAMP, Piracicaba/SP, Brasil). Os anticorpos primários, as especificações, os sistemas de recuperação antigênica e o sistema de amplificação de cada anticorpo encontram-se descritos no Quadro 8.

**Quadro 8** - Detalhes sobre os anticorpos fabricantes, clones, diluições e os sistemas de recuperação antigênica e de amplificação utilizados no estudo imuno-histoquímico

Anticorpo	Fabricante	Clone	Diluição	Recuperação antigênica	Amplificação
Ki-67	Dako	MIB-1	1:100	PPE 15'/ac. citr./pH6.0	Advance (DAKO)
D2-40	Dako	D2-40	1:100	PP 3'/ac. citr./pH6.0	LSAB (DAKO)

PPE 15'/ac. citr./pH6.0 = Panela de pressão elétrica 15 minutos em ácido cítrico pH 6.0.

PP 3'/ac. citr./pH6.0 = Panela de pressão 3 minutos em ácido cítrico pH 6.0.

Inicialmente, os cortes foram desparafinizados com 2 sequências de xilol por 10 minutos cada em temperatura ambiente, hidratados em solução de

concentrações decrescentes de etanol (100%, 90%, 70% e 50%) e posteriormente foram lavados em água corrente por 5 minutos. A recuperação antigênica foi realizada de acordo com protocolos previamente estabelecidos no Laboratório de Patologia Oral da FOP-UNICAMP para cada anticorpo (Quadro 8).

Após a recuperação antigênica os cortes ficaram em repouso durante 20 minutos em temperatura ambiente; foram lavados em água corrente e água destilada, por 5 minutos, cada e a atividade da peroxidase endógena foi bloqueada utilizando peróxido de hidrogênio (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>) 20 volumes em 5 incubações de 5 minutos cada. Após a inativação da peroxidase endógena, os cortes foram lavados em água corrente (5 minutos) e água destilada (5 minutos) e colocados em solução salina tamponada com fosfato (*phosphate-buffered saline*: PBS pH 7,4) por 5 minutos. Os cortes foram então incubados com os anticorpos primários, diluídos em albumina sérica bovina (BSA) a 1%, em câmara úmida por 16 horas a 4°C. Após a incubação os cortes foram lavados em PBS com 03 trocas de 01 minuto cada.

O processo de incubação com o anticorpo secundário foi diferente entre o Ki-67 e o D2-40:

**Ki-67:** Incubação com o anticorpo secundário ADVANCE (Dako) por 30 minutos a 35°C e em seguida lavados 03 vezes em PBS por 01 minuto cada. Posteriormente os cortes foram incubados com o complexo ADVANCE-HRP (Dako) por mais 30 minutos a 35°C.

**D2-40:** Incubação com o anticorpo secundário LSAB (*Labelled Streptavidin Biotin* – Dako) por 30 minutos a 35°C em seguida lavados 03 vezes em PBS por 01 minuto cada. Posteriormente os cortes foram incubados com o complexo Streptoavidina - Biotina - HRP - Dako) por mais 30 minutos a 35°C.

Terminada esta etapa, as lâminas foram lavadas em 03 banhos de PBS (01 minuto cada) e as reações foram evidenciadas com diaminobenzidina (DAB) a 35°C por 5 minutos. Posteriormente, foram passadas em água destilada (02 vezes); lavadas em água corrente por 5 minutos; contra-coradas

com Hematoxilina de Carazzi durante 3 minutos; lavadas em água corrente por 8 minutos para eliminar os excessos do corante; desidratadas por meio de 4 banhos em álcool absoluto, 90%, 70%, 50% (02 minutos cada); diafanizadas em xilol I e II com 2 trocas de 10 minutos cada e montadas em bálsamo do Canadá.

Os controles positivos específicos para cada anticorpo foram utilizados em todas as reações deste estudo, em tecidos sabidamente positivos, linfoma para o Ki-67 e sarcoma de Kaposi para o D2-40.

#### **4.6 - ANÁLISE IMUNO-HISTOQUÍMICA DA LESÃO PROPRIAMENTE DITA E DOS TECIDOS PERILESIONAIS E PERITUMORAIS**

Após a reação de imuno-histoquímica, as lâminas histológicas de cada caso foram escaneadas através do digitalizador histológico ScanScope CS (Aperio *Solutions ePathology*, CA, EUA), no Departamento de Anatomia Patológica da FOP/UNICAMP, obtendo-se imagens digitais de alta resolução dos cortes histológicos e salvas em formato TIFF. As imagens foram projetadas na tela do monitor, utilizando-se o *software* livre *Image Scope* (Aperio Software, CA, EUA). Por meio de uma ferramenta de marcação digital, no aumento de 10x foram delimitados 02 campos mais representativos (*hot spot*) tanto para a lesão propriamente dita das DOPMs e CCEOs respectivamente quanto para os seus tecidos perilesionais e peritumorais (Figura 5).

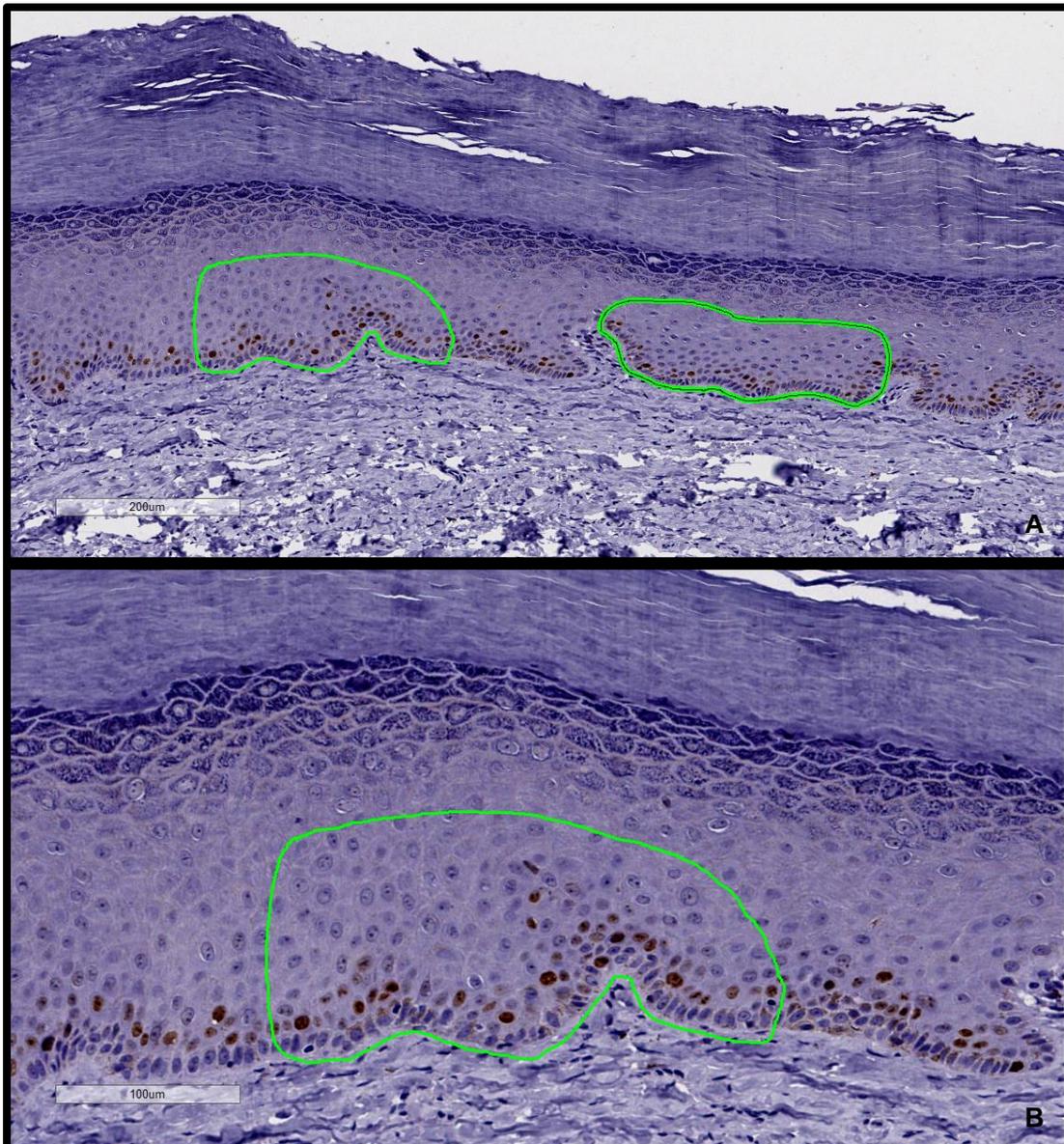


Figura 5: A: Fotomicrografia exibindo os 02 campos demarcados para a análise imunohistoquímica do Ki-67, em aumento de 10x. B: Detalhe em aumento de 20x. G1-16

#### 4.6.1 - Avaliação qualitativa da expressão do Ki-67 e da Podoplanina

Para o Ki-67, foram consideradas células positivas aquelas que apresentaram coloração marrom ou acastanhada nuclear, independente da intensidade da coloração (KUROKAWA *et al.*; 2005).

A expressão nuclear do Ki-67 foi mensurada qualitativamente de acordo com os 04 compartimentos epiteliais segundo DWIVEDI *et al.* (2013).

- camada basal: núcleos positivos apenas sobre a membrana basal;
- camada parabasal: núcleos positivos em duas camadas acima e próximo da membrana;
- camada suprabasal: núcleos positivos acima da camada parabasal.

As células que exibiram marcação membranar e/ou citoplasmática para a podoplanina foram consideradas como positivas. Para a avaliação qualitativa da expressão do D2-40 toda a extensão da DOPM, do tecido perilesional e do tecido peritumoral, foi analisada seguindo os critérios estabelecidos por Kawaguchi *et al.* (2008), conforme descrito a seguir:

0 = nenhuma expressão observada em qualquer parte do epitélio;

1 = expressão restrita na camada basal do epitélio;

2 = expressão observada na camada basal e na suprabasal em apenas uma área;

3 – expressão na camada suprabasal observada em 02 ou mais áreas;

4 – expressão na camada suprabasal observada em mais de 3 áreas.

Para os CCEOs, a análise topográfica foi excluída tanto para o Ki-67 quanto para a podoplanina por causa da impossibilidade de observar uma estratificação epitelial nestas lesões. Esta avaliação qualitativa foi realizada observando a expressão dos marcadores moleculares em células epiteliais neoplásicas isoladas ou agrupadas em ninhos ou cordões celulares no estroma tumoral.

#### **4.6.2 - Avaliação semi-quantitativa da expressão do Ki-67 e da Podoplanina**

Com o auxílio do programa *Imaging Processing and Analysis in Java* (ImageJ®, Nation Mental Health, Bethesda, Maryland, USA) foram contadas aproximadamente 500 células de cada campo microscópico delineado e os dados gerados foram automaticamente transferidos para uma planilha do

programa Excel. Em seguida, foi utilizada a seguinte fórmula para calcular a proporção de células imunomarcadas: células positivas/número total de células x 100.

A análise semi-quantitativa do Ki-67, tanto para as DOPMs, CCEOs e seus respectivos tecidos perilesionais e peritumorais, foi realizada considerando os mesmos escores utilizados por Mahima *et al.*(2015), com o intuito de reduzir possíveis distorções relacionadas com a heterogeneidade das amostras.

- 1 - Baixa proliferação - < 30% de células positivas;
- 2 - Moderada proliferação - 30-50% de células positivas;
- 3 - Alta proliferação - > 50% de células positivas.

A expressão imuno-histoquímica da Podoplanina foi avaliada pelo método semi-quantitativo de escores, baseado na soma da proporção e da intensidade das células tumorais com imunomarcção positiva, conforme Yuan *et al.* (2006), descrito a seguir:

Para cada campo microscópico adquirido, a porcentagem de células com imunomarcção positiva foi avaliada e classificada em um dos cinco escores abaixo:

- 0 = ausência de células tumorais imunopositivas;
- 1 = 1 a 10% de células tumorais imunopositivas;
- 2 = 11 a 30% de células tumorais imunopositivas;
- 3 = 31 a 50% de células tumorais imunopositivas;
- 4 = 51 a 80% de células tumorais imunopositivas;
- 5 = 81 a 100% de células tumorais imunopositivas.

Posteriormente, a intensidade da imunomarcção foi avaliada e classificada em um dos três escores abaixo:

- 0 – ausência de imunomarcção;
- 1 – imunomarcção fraca;

- 2 – imunomarcção moderada;
- 3 – imunomarcção forte.

Por fim, os dados brutos foram então convertidos a um escore de imunoreatividade alemão (IRS), multiplicando os escores de quantidade e de intensidade.

Esse escore final pode variar de 0 a 15 e foi adotada dicotomização proposta por

PATIL *et al.*, 2015:

- 1 - Escore 0 a 6 = fraca reatividade
- 2 - Escore igual ou maior que 7 = alta reatividade

#### **4.7 - ANÁLISE ESTATÍSTICA**

Os dados clinicopatológicos dos pacientes e os resultados obtidos com a análise histomorfológica e imunohistoquímica foram digitalizados em uma planilha eletrônica Excel (*Microsoft Office 2010*) e posteriormente exportados para um programa computacional estatístico IBM SPSS *Statistics version 21*.

A análise estatística foi iniciada pela caracterização do perfil social e clínico dos pacientes através da frequência observada e porcentagem.

Para verificar se os escores do ki-67 lesão e margem e D2-40 lesão e margem do grupo de carcinoma de células escamosas orais (CCEO) e desordens orais com potencial de malignização (DOPM) diferem-se entre os fatores (sexo, faixa etária, raça, tabagismo, etilismo e exposição solar), requereu-se dos testes de *Mann-Whitney* e de *Kruskal-Wallis*. Para verificação das diferenças entre o par(es) encontrado(s) no teste de *Kruskal-Wallis*, utilizou-se o teste de comparações múltiplas de *Tukey*.

A comparação entre o ki-67 lesão com o ki-67 margem e D2-40 lesão com o D2-40 margem do grupo CCEO foi realizada pelo teste de *Wilcoxon* para amostras pareadas. As mesmas comparações foram realizadas para o grupo DOPM.

O teste Mann-Whitney também comparou o ki-67 lesão, ki-67 margem, D2-40 lesão e D2-40 margem entre os grupos CCEO e DOPM.

Para verificar se a displasia oral na DOPM e o grau de agressão do CCEO são diretamente proporcionais ao aumento da expressão do ki-67 e D2-40, realizou-se a correlação de *Spearman*.

O nível de significância utilizado em todas as análises foi de 5% e intervalo de confiança de 95%.

## 5 - RESULTADOS

### 5.1 - ANÁLISE CLÍNICA E MORFOLÓGICA

Após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão foram selecionados 25 casos de DOPM e 10 casos de CCEO para compor o estudo.

#### 5.1.1 - DOPM

Entre os 25 casos de DOPM, constatou que 09 (26%) eram do gênero masculino e 16 (64%) do feminino, estabelecendo uma proporção mulher: homem de 1,7:1, com idades variando entre 31 e 93 anos, sendo a média de idade para os casos em homens de 47 anos e a média de idade para os casos em mulheres de 64,3 anos. A maior parte das lesões ocorreu em pacientes da raça parda (48%). Quanto à localização das lesões, o sítio anatômico com maior prevalência foi a língua (n=6; 24%), seguido pela mucosa jugal (n=5; 20%). A região de lábio, mucosa labial e palato mostraram uma frequência menor de ocorrência. Com relação aos fatores de risco, observou-se que (56%) não eram tabagistas e 80% não eram etilistas(Tabela 2) (ANEXO B).

**Tabela 2** - Dados clinicopatológicos dos 25 pacientes com DOPM (continua)

Variável		Nº de pacientes	%
Sexo	Masculino	9	36.0
	Feminino	16	64.0
Faixa etária	≤ 50 anos	4	16.0
	> 50 anos	21	84.0
Raça	Branca	10	40.0
	Negra	3	12.0
	Parda	12	48.0
Localização	Lábio	1	4.0
	Língua	06	24.0
	Mucosa alveolar	3	12.0
	Mucosa jugal	5	20.0
	Mucosa labial	1	4.0
	Palato duro	1	4.0
	Rebordo alveolar	3	12.0
	Trígono retromolar	3	12.0
Tuberosidade maxilar	2	8.0	
Tabagismo	Sim	10	40.0
	Não	14	56.0
	Não informado	1	4.0

Etilismo	Sim	4	16.0
	Não	20	80.0
	Não informado	1	4.0
Exposição solar	Sim	8	32.0
	Não	13	52.0
	Não informado	4	16.0

**Legenda:** Nº: número de pacientes.

Clinicamente, 24 (96%) casos apresentaram-se como leucoplasia oral e 01 (4%) caso como queilite actínica.

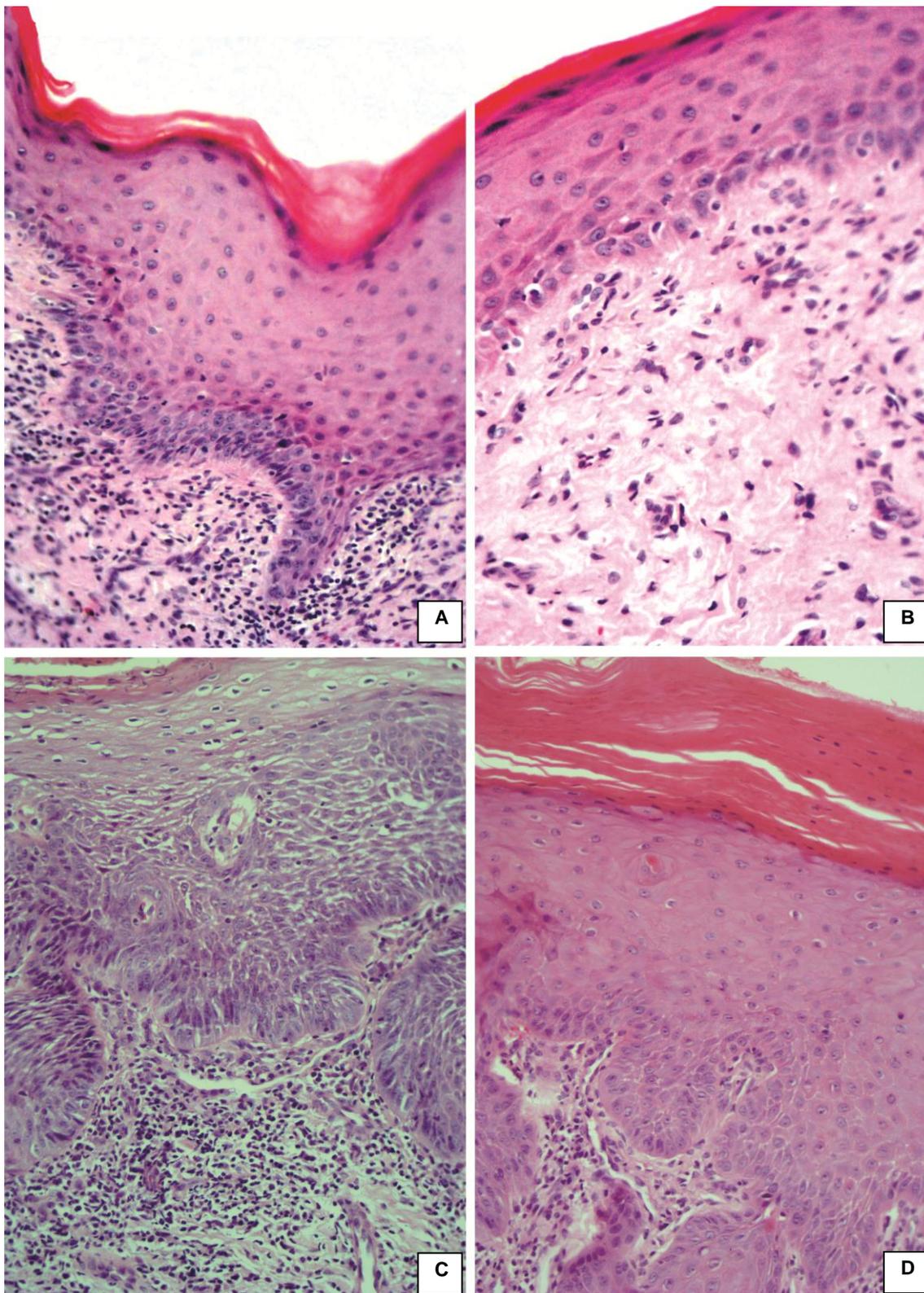
Considerando a classificação da OMS (2005), dentre as 25 amostras, 08 lesões (32%) foram graduadas como DEO leve, 5 (20%) DEO moderada, 2 (8%) DEO severa e 10 (40%) sem nenhum grau de displasia epitelial oral. Quando avaliadas as margens perilesionais das DOPMs, a maioria das lesões (76%) não apresentou nenhum grau de displasia epitelial oral em suas margens clinicamente sadias (Tabela 3) (ANEXO C).

**Tabela 3** - Diagnóstico histopatológico das DOPMs e de seus tecidos perilesionais

		<b>Gradação</b>	
		<b>histopatológica</b>	
		<b>n</b>	<b>%</b>
<b>Lesão</b>	Sem displasia	10	40.0
	Leve	8	32.0
	Moderada	5	20.0
	Severa	2	8.0
<b>Tecido Perilesional</b>	Sem displasia	19	76.0
	Leve	5	20.0
	Moderada	1	4.0
	Severa	0	0.0

**Legenda:** n: número de pacientes; DOPMs: desordens orais com potencial de malignização

A figura 6 exemplifica microscopicamente a classificação da DEO na lesão propriamente dita das DOPM e em seus tecidos perilesionados.



**Figura 6** - Alterações histopatológicas entre DOPM e tecido perilesional: A - Lesão propriamente dita com displasia epitelial oral leve; B - Tecido perilesional com ausência de DEO (20x) (G1-1) C - Lesão propriamente dita com displasia epitelial oral severa; D - Tecido perilesional com DEO moderada (20x) (G1 - 13) (DOPMs em H&E, Escala 50  $\mu$ m)

### 5.1.2 - CCEO

Dentro dos 10 casos de CCEO selecionados para a pesquisa, 07 (70%) eram do gênero masculino e 03 (30%) do feminino, sendo a idade média dos homens de 62,4 anos e das mulheres de 67,7 anos. O local mais acometido foi a lateral de língua, com 06 (60%) dos casos, seguido pelo mucosa jugal, assoalho de boca, lábio inferior e rebordo alveolar, ambos com 1% cada (Tabela 4). Além disso, dos 10 casos, 06 (60%) não eram tabagistas, 09 (90%) não eram etilistas e 03 (30%) expunham à radiação solar. A raça branca foi mais frequente em 70% dos casos (ANEXO D).

**Tabela 4** - Dados clinicopatológicos dos 10 pacientes portadores de CCEO

Variável		n	%
<b>Sexo</b>	Masculino	7	70.0
	Feminino	3	30.0
<b>Faixa etária</b>	≤ 50 anos	1	10.0
	> 50 anos	9	90.0
<b>Raça</b>	Branca	7	70.0
	Negra	2	20.0
	Parda	1	10.0
<b>Localização</b>	Assoalho de boca	1	10.0
	Lábio	1	10.0
	Língua	6	60.0
	Mucosa jugal	1	10.0
	Rebordo alveolar	1	10.0
<b>Tabagismo</b>	Sim	3	30.0
	Não	6	60.0
	Não informado	1	10.0
<b>Etilismo</b>	Sim	0	0.0
	Não	9	90.0
	Não informado	1	10.0
<b>Exposição solar</b>	Sim	3	30.0
	Não	3	30.0
	Não informado	4	40.0

Legenda: n: número de pacientes

De acordo com a metodologia de graduação histológica de malignidade do CCEO, estabelecida neste estudo, a tabela 5 demonstra que a categoria "moderadamente diferenciada" foi a predominante, representando 07 casos (70%) do G2.

**Tabela 5** - Valores atribuídos para cada um dos parâmetros avaliados para a classificação histológica de malignidade do CCEO.

CASOS	DISCERATOSE	PLEOMORFISMO NUCLEAR E CELULAR	MITOSSES ATÍPICAS	PÉROLAS CÔRNEAS	TOTAL DE ESCORES	CLASSIFICAÇÃO HISTOLÓGICA DO CCEO
G2-1	3	2	1	4	10	BD
G2-2	2	2	2	1	7	MD
G2-3	1	1	1	3	6	BD
G2-4	2	3	1	4	10	MD
G2-5	2	3	2	2	9	MD
G2-6	1	1	1	1	4	BD
G2-7	2	2	2	4	10	MD
G2-8	2	3	1	3	9	MD
G2-9	2	3	2	2	9	MD
G2-10	3	1	1	4	9	MD

Legenda: MD: moderadamente diferenciado; BD: bem diferenciado

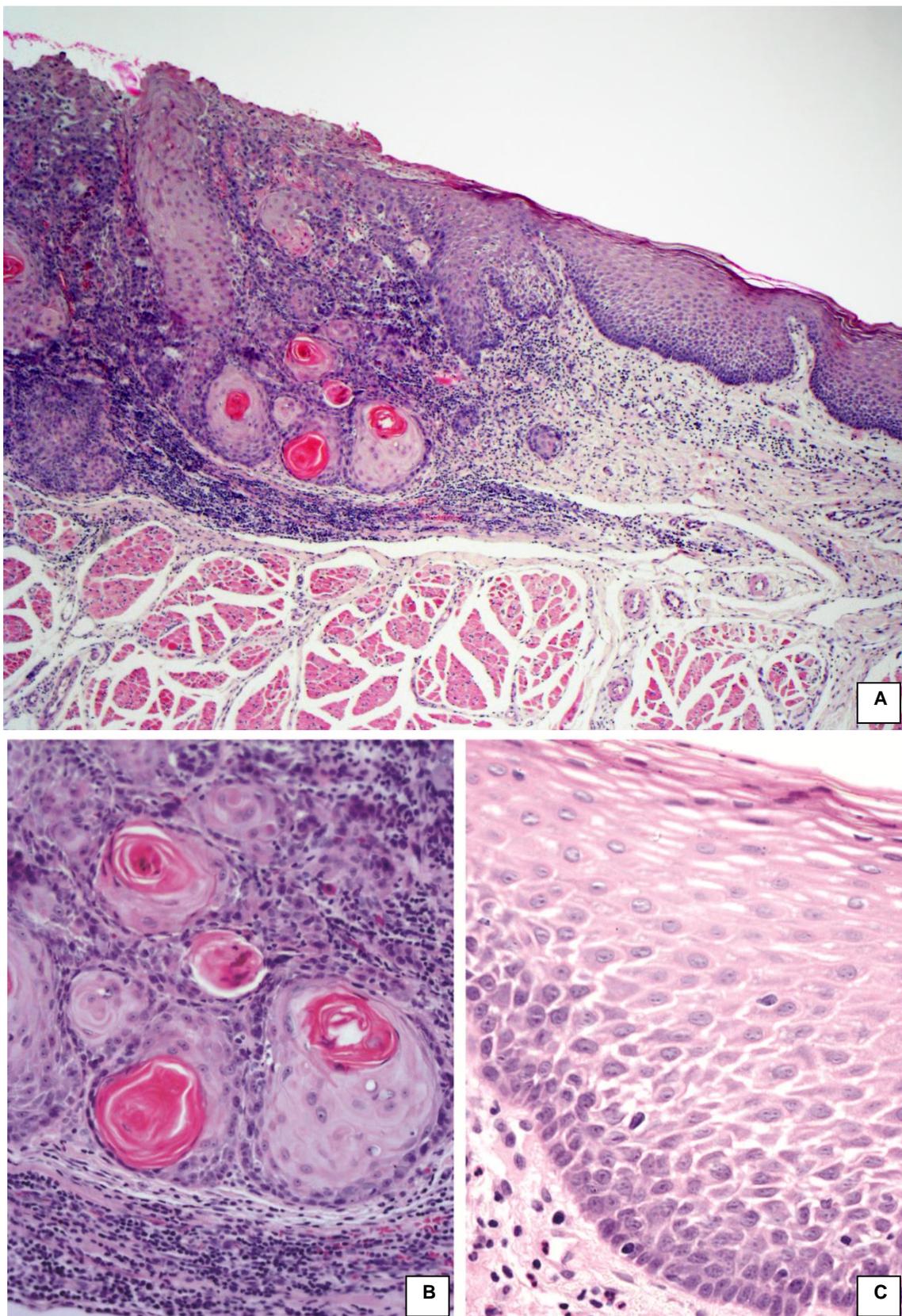
Bryne *et al* (1992) – Adaptado

A graduação da displasia epitelial oral no epitélio adjacente ao CCEO de acordo com o sistema de classificação da OMS mostrou que entre os 10 casos analisados, 03 (30%) exibiram displasia epitelial leve; 02 (20%) displasia epitelial moderada e 05 (50%) apresentaram displasia epitelial severa. Dos CCEOs moderadamente diferenciado, houve uma predominância da displasia epitelial severa a moderada, com 04 (57,14%) e 03 (42,86%) casos respectivamente (Tabela 6).

**Tabela 6** - Classificação histopatológica do CCEO respectivo tecido peritumoral

CASOS	DIAGNÓSTICO	TECIDO PERITUMORAL
G2-1	Bem diferenciado	DEO moderada
G2-2	Moderadamente diferenciado	DEO leve
G2-3	Bem diferenciado	DE severa
G2-4	Moderadamente diferenciado	DEO Severa
G2-5	Moderadamente diferenciado	DEO severa
G2-6	Bem diferenciado	DEO moderada
G2-7	Moderadamente diferenciado	DEO leve
G2-8	Moderadamente diferenciado	DEO severa
G2-9	Moderadamente diferenciado	DEO severa
G2-10	Moderadamente diferenciado	DEO leve

Aspectos morfológicos do CCEO e do tecido peritumoral podem ser visualizados na figura 7.



**Figura 7** - Fotomicrografia em H&E do CCEO e seu tecido peritumoral: A - Aspecto microscópico do CCEO moderadamente diferenciado, exibindo áreas de invasão tumoral em forma de ninhos com pérolas cornoas e seu tecido peritumoral (10x). B - Detalhe da figura anterior mostrando área de invasão tumoral (20x); C - Tecido peritumoral com DEO moderada (20x) (G2-6). (CCEO em H&E, Escala 50 $\mu$ m)

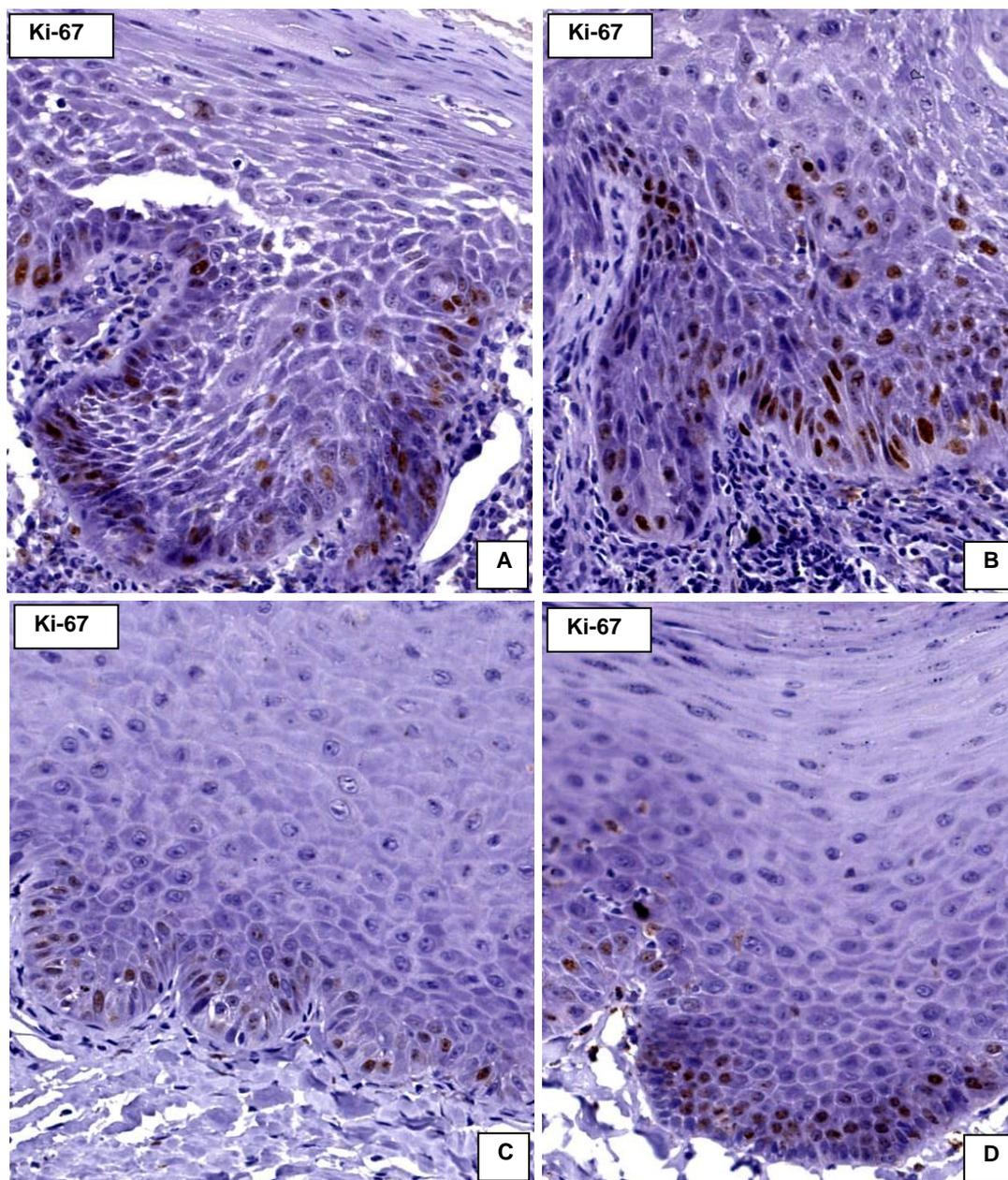
## 5.2 - ANÁLISE DESCRITIVA DA IMUNO-HISTOQUÍMICA

Os dados descritivos da análise qualitativa detalhada das DOPMs e dos CCEOs, incluindo localização e distribuição da positividade de cada marcador imuno-histoquímico estão organizados nos ANEXOS E e F.

### 5.2.1 - Ki-67

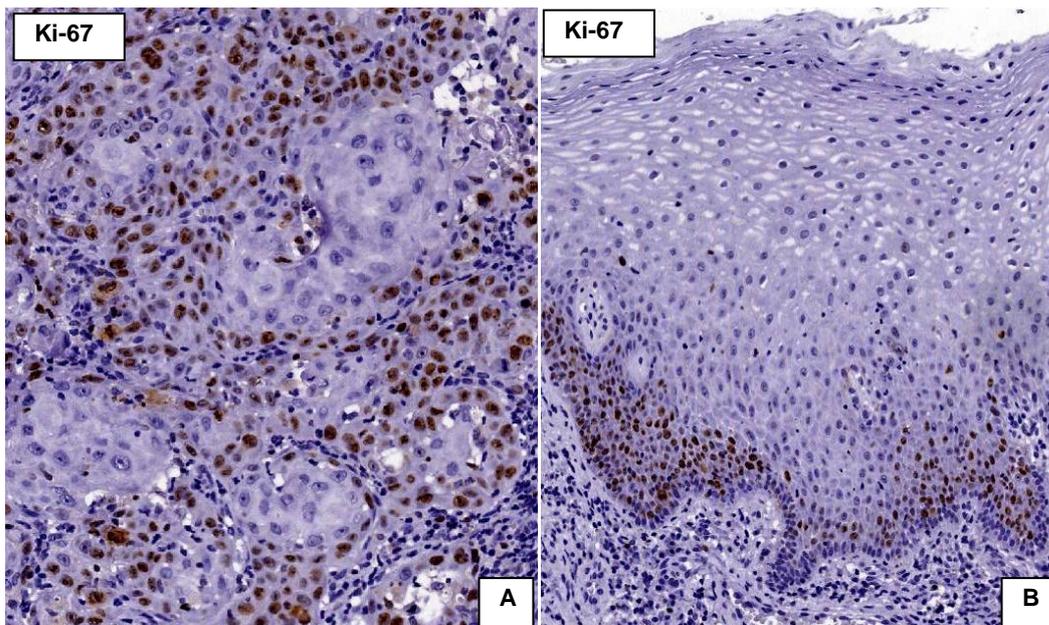
A análise da imunoexpressão do Ki-67 nas DOPM esteve presente em 02 casos (8% do total de casos) apenas na camada basal, 14 (56%) apenas na parabasal e 09 (36%) se estendiam desde a basal até a camada suprabasal do epitélio. Nas margens clinicamente sadias das DOPM, a maior marcação foi na camada parabasal, com 40%, seguido pela suprabasal com 32% e basal com 28%. Na análise comparativa entre as DOPM e os CCEOS e seus tecidos perilesionais, a expressão nas camadas do revestimento epitelial mostrou associação com o grau de displasia epitelial oral nas DOPM ( $p=0,001$ ) e no tecido perilesional ( $p=0,000$ )(ANEXO G).

A figura 8 mostra a presença e localização do Ki-67 nos compartimentos basal, parabasal e suprabasal do estrato epitelial. As imagens A e B mostram respectivamente uma DOPM e seu tecido perilesional com DEO moderada e imunomarcação do Ki-67 na camada suprabasal do epitélio. As imagens B e C, mostram respectivamente uma DOPM e seu tecido perilesional sem DEO e imunomarcação restrita nas camadas basal e parabasal do epitélio.



**Figura 8** - Imunomarcção do Ki-67 em DOPM e tecido perilesional: A - DOPM e imunomarcção do Ki-67 na camada basal, parabasal e suprabasal. B - Tecido perilesional do caso A com imunoexpressão do ki-67 na camada suprabasal. C - DOPM com expressão somente na camada basal e parabasal. D - Tecido perilesional do caso C com imunoexpressão restrita à camada basal e parabasal (20x).(DOPM em IHQ, Escala 100µm).

No CCEO, a marcação foi identificada em todos casos analisados, especialmente, na periferia (70%) dos ninhos de células epiteliais tumorais e nas pérolas córneas (Figura 9).

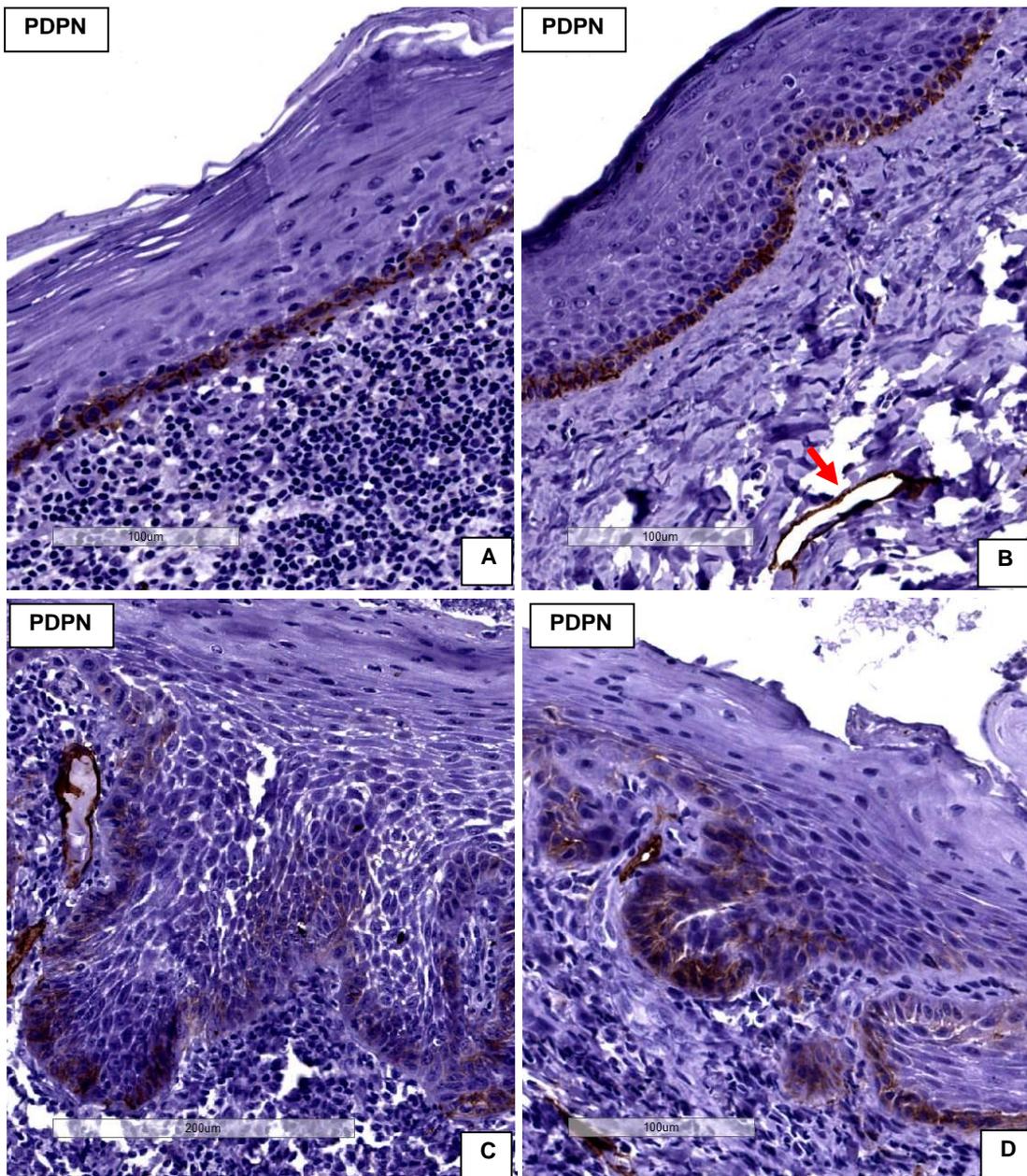


**Figura 9 - Imunomarcaco do Ki-67 no CCEO e no seu tecido peritumoral:** CCEO moderadamente diferenciado. A - Imunoexpressão do ki-67 na periferia dos ninhos tumorais(20x) (Escala 100µm); B - Imunoexpressão no tecido peritumoral, confinada nas camadas basal e parabasal do epitelo(DEO leve (10x) (G2-10) (CCEO em IHQ, Escala 200µm)

### 5.2.2 - PODOPLANINA

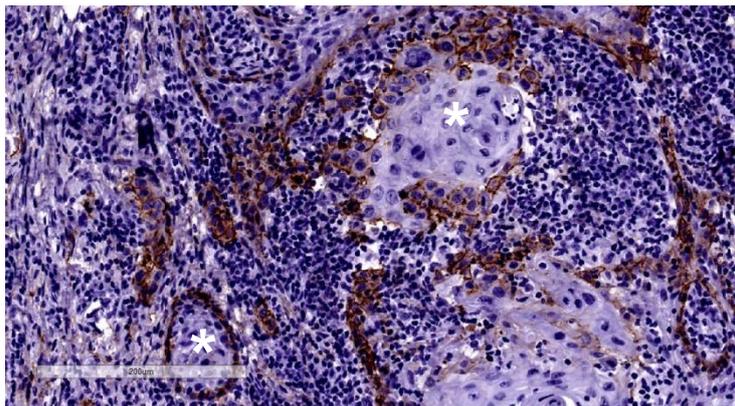
Na análise qualitativa da podoplanina, sua expressão mostrou-se positiva em 21 casos e negativa em 04 casos das DOPMs, sendo 11 casos somente na camada basal, 03 na camada basal e parabasal e 07 casos com imunomarcaco se estendendo até a camada espinhosa, ainda que focalmente. Lesões com maior grau de displasia epitelial oral apresentaram maior tendência  expressão nas camadas basal e parabasal. Esteve confinada em 50% na camada basal para os casos sem displasia; 75% na camada basal para a DEO leve, 71,42%% na suprabasal do epitelo para as DEO moderadas e severas. Na análise comparativa entre as DOPM e os CCEOs e seus tecidos perilesionais, a expressão nas camadas do revestimento epitelial mostrou associao com o grau de displasia epitelial oral somente na lesão DOPM ( $p=0,000$ ) (ANEXO G).

A figura 10 mostra lesões do G1 com seus respectivos tecidos perilesionais e o padrão de expressão da podoplanina variando entre a camada basal e parabasal.

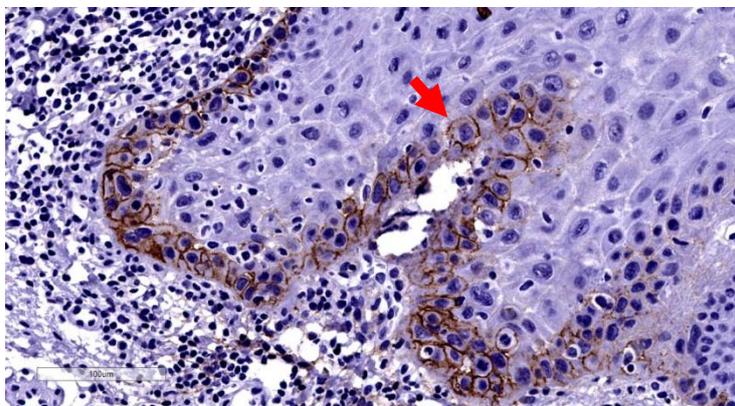


**Figura 10 - Imunomarcaco da podoplanina nas camadas epiteliais das DOPMs:** - A - DOPM com imunoexpressão do D2-40 restrita na camada basal. B - Tecido perilesional do caso A com imunoexpressão na camada basal. Observa vaso linfático marcado fortemente para a podoplanina (seta vermelha). C - DOPM com expressão da podoplanina mais intensa em determinadas áreas das camadas basal e parabasal). D - Tecido perilesional do caso C com imunoexpressão mais intensa da podoplanina em determinados pontos da camada basal e parabasal do epitélio

Considerando apenas as margens clinicamente saudáveis das DOPM, 13 (52%) apresentaram marcação para podoplanina. Nos casos sem DEO, 57,89% não apresentaram marcação; enquanto nos casos com displasia epitelial leve 80% mostraram marcação basal (ANEXO E). No CCEO, a expressão foi predominantemente na periferia dos ninhos de células tumorais com 70% dos casos (Figura 11). A expressão da podoplanina apresentou um padrão predominantemente membranoso (Figura 12).

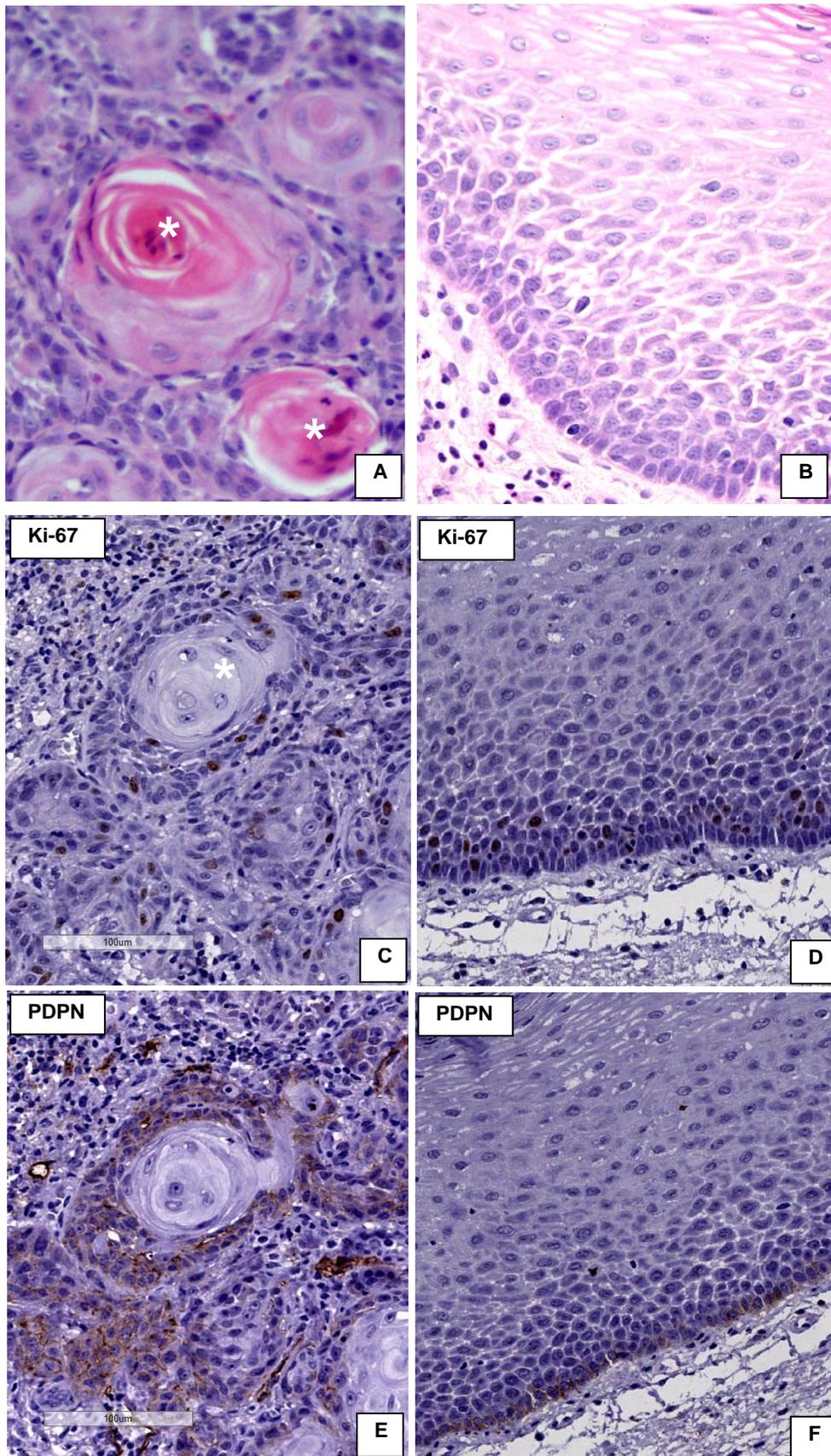


**Figura 11** - *Front* tumoral com padrão de expressão na periferia dos ninhos de células epiteliais (asteriscos) (10x) (Escala 200 μm).

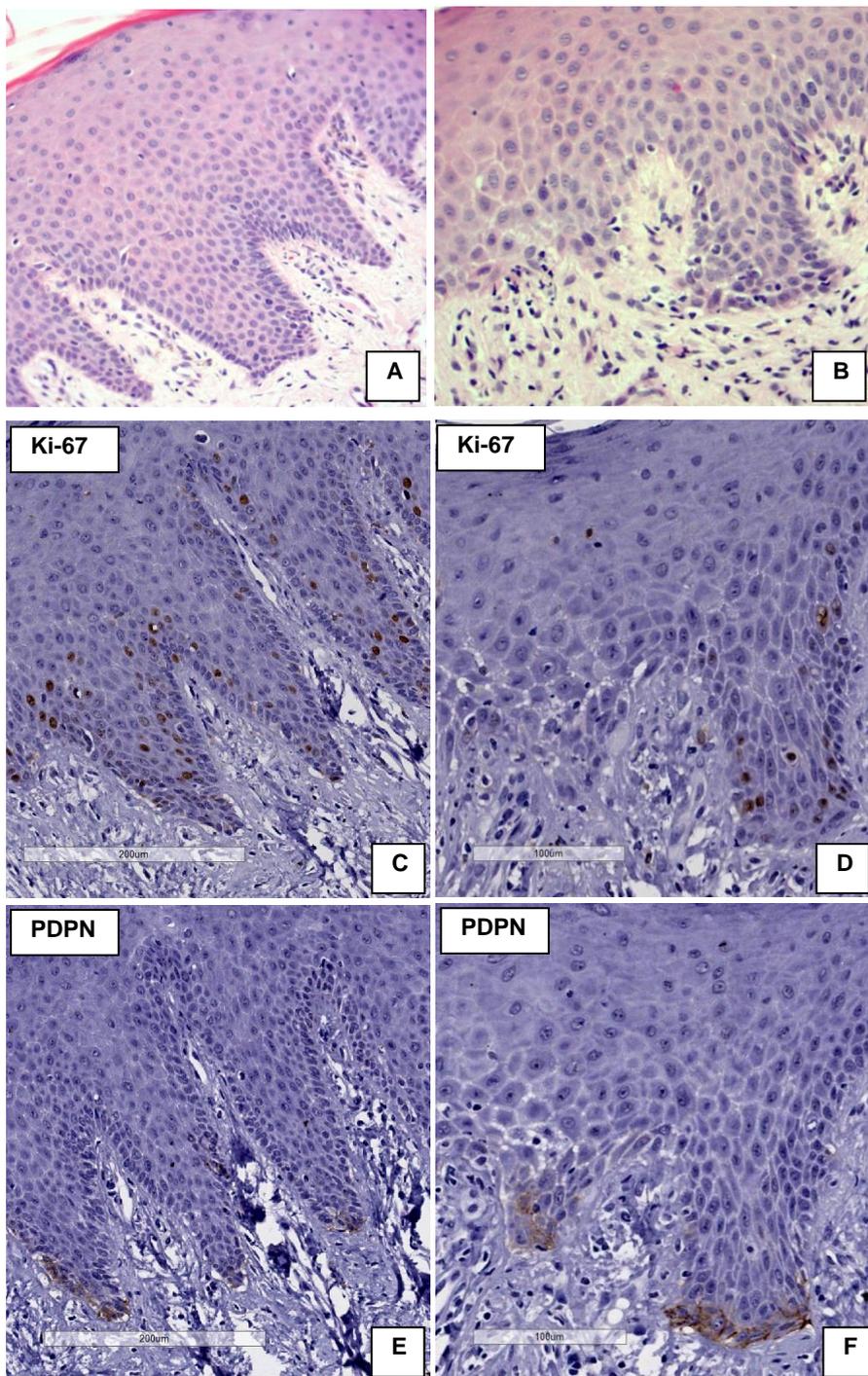


**Figura 12** - Expressão membranosa da podoplanina na margem do tecido peritumoral (seta vermelha) (20x) (Escala 100 μm)

Características morfológicas e imuno-histoquímicas são mostradas na figura 13 para CCEO moderadamente diferenciado que foi identificado no estudo como o mais prevalente (70%) comparando com seu respectivo tecido peritumoral. Na figura 14, representa as características nas DOPMs e tecido perilesional, ambos sem DEO, presente em 40% e 76%, respectivamente.



**Figura 53 - Pannel do CCEO e seu tecido peritumoral em H&E e IHQ:**A - Aspecto microscópico com detalhes de pérolas córneas (asteriscos) em um CCEO moderadamente diferenciado (20x) (H&E - Escala 50 µm); B - Tecido peritumoral com DEO moderada apresentando acantólise e hiperchromatismo (20x) (H&E - Escala 50 µm) C - Imunoexpressão do Ki-67 na periferia da pérola córnea (asterisco branco) e dos ninhos de células tumorais (20x) (Escala 100µm); D - Discreta imunoexpressão do Ki-67 na camada suprabasal no tecido peritumoral do caso C, (20x) (Escala 100µm); E - Expressão da podoplanina na periferia dos ninhos tumorais (20x) (Escala 100µm); F - Imunoexpressão da podoplanina restrita na camada basal do tecido peritumoral do caso E (20x) (Escala 100µm)



**Figura 14 - Painele da DOPM e seu tecido perilesional em H&E e IHQ:**A - Aspecto microscópico da DOPM sem displasia (20x) (H&E - Escala 50  $\mu$ m). B - Tecido perilesional do caso A sem DEO (20x) (H&E - Escala 50  $\mu$ m); C - Imunoexpressão do Ki-67 na DOPM com discreta expressão na camada parabasal (20x) (Escala 200 $\mu$ m); D - Imunoexpressão no tecido perilesional do caso C com discreta expressão na camada basal do epitélio (20x) (Escala 200 $\mu$ m); E - Discreta imunoexpressão da podoplanina em regiões pontuais da camada basal sem DEO (20x) (Escala 200 $\mu$ m); F - Discreta imunoexpressão da podoplanina restrita na camada basal do tecido perilesional sem DEO (Escala 100 $\mu$ m) (G1-16)

### 5.3 - ANÁLISE QUANTITATIVA DA IMUNO-HISTOQUÍMICA

Os resultados das análises imuno-histoquímicas do Ki-67 e da podoplanina nas DOPMs, CCEOs, seus respectivos tecidos perilesionais e peritumorais e os graus da DEO e da diferenciação dos CCEOs foram sumarizados na tabela 7. Os registros quantitativos dos escores da expressão do Ki-67 e podoplanina nas DOPMs e os tecidos perilesionais e nos CCEOs e os tecidos peritumorais detalhados são apresentados nos Anexos J e K, respectivamente.

**Tabela 7** - Análise semi-quantitativa do Ki-67 e PDPN no grupo das DOPM e CCEO e seus respectivos tecidos perilesionais e peritumorais

		DPOM		CCEO		Total	
		n	%	n	%	n	%
<b>Lesão</b>	Sem displasia	10	40.0	0	0.0	10	28.6
	Leve	8	32.0	0	0.0	8	22.9
	Moderada	5	20.0	0	0.0	5	14.3
	Moderadamente diferenciada	0	0.0	7	70.0	7	20.0
	Bem diferenciado	0	0.0	3	30.0	3	8.6
	Severa	2	8.0	0	0.0	2	5.7
<b>Tecido Perilesional</b>	Sem displasia	19	76.0	0	0.0	19	54.3
	Leve	5	20.0	3	30.0	8	22.9
	Moderada	1	4.0	2	20.0	3	8.6
	Severa	0	0.0	5	50.0	5	14.3
<b>Ki 67 lesão</b>	Baixa proliferação	17	68.0	3	30.0	20	57.1
	Moderada proliferação	8	32.0	2	20.0	10	28.6
	Alta proliferação	0	0.0	5	50.0	5	14.3
<b>PDPN lesão</b>	Fraca reatividade	20	80.0	6	60.0	26	74.3
	Alta reatividade	5	20.0	4	40.0	9	25.7
<b>Ki 67 margem</b>	Baixa proliferação	24	96.0	4	40.0	28	80.0
	Moderada proliferação	1	4.0	6	60.0	7	20.0
	Alta proliferação	0	0.0	0	0.0	0	0.0
<b>PDPN peritumoral</b>	Fraca reatividade	24	96.0	9	90.0	33	94.3
	Alta reatividade	1	4.0	1	10.0	2	5.7

n: número de pacientes

Após o registro dos escores da imunomarcagem do Ki-67 e PDPN, tanto das DOPMs e CCEOs e seus respectivos tecidos perilesionais e peritumorais, foram analisadas a correlação dos escores da imunomarcagem com os dados

clinicopatológicos levantados (sexo, faixa etária, raça, localização, tabagismo, etilismo e exposição solar) e a única variável que se mostrou estatisticamente significativa foi o gênero feminino ( $p=0,022$ ) (ANEXOS H e I).

### 5.3.1 - Ki-67

Na análise das lesões estudadas e tecidos perilesionais do G1 e G2, a expressão do Ki-67 foi maior nas lesões DOPM do que nas margens clinicamente sadias e esta diferença foi estatisticamente significativa ( $p=0,016$ ). No CCEO, não houve diferença significativa ao comparar a positividade do Ki-67 e seus tecidos peritumorais (Tabela 8).

**Tabela 8** - Comparação entre a expressão do Ki-67 nas lesões e os tecidos perilesionais dos DOPM e CCEO

	Diferença entre lesão e margem	Valor p*
<b>DOPM</b>	Ki-67 margem - Ki-67 lesão	<b>0.016</b>
<b>CCEO</b>	Ki-67 margem - Ki-67 lesão	0.172

\*. Teste de Wilcoxon.

Quando comparado a expressão do Ki-67 entre as DOPM e CCEOs e seus respectivos tecidos perilesionais, houve uma diferença estatisticamente significativa tanto nas lesões propriamente ditas ( $p=0,006$ ) quanto em suas respectivas margens ( $p=0,001$ ) (Tabela 9).

**Tabela 9** - Comparação entre a expressão do Ki-67 nos dois grupos estudados

		Valor p*
Ki-67 lesão	DOPM CCEO	<b>0.006</b>
Ki-67 margem	DOPM CCEO	<b>0.001</b>

\*. Teste de Mann-Whitney.

Com relação as características microscópicas, verificou-se que a displasia epitelial oral na DOPM e o grau de diferenciação do CCEO tem correlação com a imunomarcção do Ki-67. Assim, nas DOPMs ocorreram uma correlação positiva para o ki-67, ou seja, ao aumentar a severidade da displasia epitelial oral nas DOPM, aumenta a imunomarcção Ki-67 na lesão ( $p = 0,010$ ) e sua margem ( $p = 0,022$ ). No CCEO, ao aumentar a graduação histopatológica aumenta o Ki-67 ( $p = 0,001$ ) (Tabela 10 e 11).

**Tabela 10** - Correlação da imunoexpressão do Ki-67 nas DOPM e CCEO e os graus histopatológicos

Escore	Histológico	
	DOPM Lesão (Valor p)	CCEO Lesão (Valor p)
Ki-67 (lesão)	0.010	0.001

Correlação de Spearman

**Tabela 11** - Correlação da imunoexpressão do Ki-67 e os graus histopatológicos nos tecidos perilesionais e tecidos peritumorais

Escore	Histológico	
	DOPM Perilesional (Valor p)	CCEO Peritumoral (Valor p)
Ki-67 (margem)	0.022	0.222

Correlação de Spearman

Com base nos resultados analisados da expressão do Ki-67, constatou que nas DOPMs, o índice de proliferação aumenta da margem para a lesão e está correlacionado com o grau de displasia epitelial oral. Nos carcinomas de células escamosas, foi verificado um aumento da taxa de proliferação da margem para o tumor, além de estar relacionado com o seu grau de diferenciação.

### 5.3.2 - PODOPLANINA

Na análise comparativa da imunomarcção da PDPN no G1 e G2, embora não foi registrado diferença estatisticamente significativa entre DOPM e tecido perilesional ( $p=0,219$ ) e CCEO e tecido peritumoral ( $p=0,250$ ) (Tabela 12), observa uma maior expressão nas lesões propriamente ditas do que em suas respectivas margens clinicamente sadias.

**Tabela 12** - Comparação entre a expressão da PDPN nas lesões e os tecidos perilesionais das DOPMs e CCEOs

	Diferença entre margem e lesão	Valor p*
<b>DOPM</b>	PDPN margem - PDPN lesão	0.219
<b>CCEO</b>	PDPN margem - PDPN lesão	0.250

\*Teste de Wilcoxon

Quando comparadas as imunomarcções das DOPMs e CCEOs, houve maior expressão da podoplanina no CCEO em comparação às DOPM, porém, sem diferença estatisticamente significativa. Entre as DOPM e o tecido perilesional essa diferença também não foi estatisticamente significativa (Tabela 13).

**Tabela 13** - Comparação entre a expressão da PDPN nos dois grupos estudados

		Valor p*
PDPN lesão	DOPM CCEO	0.393
PDPN margem	DOPM CCEO	0.999

\*. Teste de Mann-Whitney.

Com base nas características microscópicas analisadas em H&E, nas DOPM ocorreu uma relação positiva entre o grau de displasia epitelial oral e a podoplanina, ou seja, ao aumentar a DEO, aumentou a expressão ( $p=0,001$ ) (Tabela 14). Por outro lado, nos CCEOs, entre o tumor e tecido peritumoral, não observou essa relação positiva (Tabela 15)

**Tabela 14** - Correlação da imunoexpressão da PDPN nas DOPMs , CCEOs e os graus histopatológicos

Escore	Histológico	
	DOPM	CCEO
	Lesão (Valor p)	Lesão (Valor p)
PDPN (lesão)	0.001	0.807

Correlação de Spearman.

**Tabela 15** - Correlação da imunoexpressão da PDPN e os graus histopatológicos nos tecidos perilesionais e tecidos peritumorais

Escore	Histológico	
	DOPM	CCEO
	Perilesional (Valor p)	Peritumoral (Valor p)
PDPN (margem)	-0.587	-0.729

Correlação de Spearman.

A podoplanina apresentou maior marcação na lesão tumoral seguido pelos tecidos peritumorais, pelas lesões de DOPM e por último, nas margens clínicas das DOPM, podendo ser relacionada com o grau de displasia epitelial oral nas DOPMs.

## 6 - DISCUSSÃO

O processo de diagnóstico das DOPMs e CCEOs é feito mediante exame clínico e biópsia da lesão indicada após a exclusão clínico-patológica de outras lesões que apresentem similaridades. Nesta conduta, apenas a lesão é avaliada, sem a avaliação das áreas adjacentes, consideradas clinicamente saudias, mesmo ressaltando a possibilidade de alterações morfológicas e moleculares, como presume a cancerização (SAUGHETER *et al.*, 1953; WEIJER *et al.*, 2002; CANCOVIC *et al.*, 2013; HINNI *et al.*, 2013), tais questionamentos motiva a investigação destas regiões associadas aos demais fatores envolvidos na carcinogênese oral.

Para Brandwein-Gensler *et al.* (2005), os achados nas margens dos CCEOs, não possuem valor real no seu prognóstico, sendo importante apenas parâmetros como padrão de invasão, invasão perineural e infiltrado linfocitário. Porém, o presente estudo busca evidências da importância em analisar não somente as lesões propriamente ditas mas também seus tecidos marginais, acreditando que alterações histológicas e/ou moleculares possam estar presentes mesmo em regiões clinicamente saudáveis, e que seu melhor conhecimento pode favorecer o diagnóstico precoce, tipo de tratamento, prognóstico da doença e os riscos de recidivas. Até porque, acredita-se que as estratégias de tratamento devem atingir a ponta esquerda do processo, referente às etapas iniciais da carcinogênese, e não a ponta direita do processo, no final das etapas da carcinogênese.

A compreensão das variáveis do processo da carcinogênese oral merece ser aprofundada, dessa forma, o escopo desta discussão será norteada pelos pontos-chaves trabalhados no presente estudo.

### 6.1 VARIÁVEIS CLINICOPATOLÓGICAS

Neste estudo, evidenciou-se maior predileção do CCEO pelo gênero masculino, sendo este acometido em 70% dos casos. Achados semelhantes são descritos em outras pesquisas (BARNES *et al.*, 2005; FRONIE *et al.*, 2013; PATEL *et al.*, 2014), a qual pode estar associado ao maior contato com os

fatores de risco mais importantes como álcool e tabaco. O que não foi registrado no perfil da amostra selecionada, já que a maioria dos pacientes não eram tabagistas e/ou ex-tabagistas (60%) nem etilistas (90%).

Com relação à idade, a média de idade dos pacientes do G1 foi de 64,3 anos para as mulheres e 47,0 anos para os homens, enquanto que no G2 foi de 67,7 anos para as mulheres e 62,4 para os homens. Os pacientes com CCEO apresentou mais de 50 anos, enquanto que no grupo das DOPM, a maioria dos pacientes possuía menos de 50 anos. Essas observações sugerem uma tendência temporal e uma multicausalidade na carcinogênese, onde exposições contínuas a agentes ou fatores carcinogênicos podem levar a uma perda dos mecanismos de controle normal e a transformação celular para o chamado fenótipo neoplásico (HANAHAN; WEINBERG, 2011).

Dos 25 casos de DOPM, 24 eram leucoplasias e envolveram em sua maioria as mulheres (70%). Esses dados contradizem com a maioria das séries publicadas na literatura (DIETRICH *et al.*, 2004; NAPIER & SPEIGHT, 2008; NEVILLE *et al.*, 2009), exceto para os casos de leucoplasia verrucosa proliferativa com prevalência maior em mulheres jovens (van der WAAL *et al.*, 2010). Vale ressaltar que o aumento do número de pacientes com DOPM no gênero feminino pode ser pelo fato das mulheres estarem adotando alguns costumes antes mais preponderantes no gênero masculino, como por exemplo, o fumo e o álcool (GAITÁN-CAPEDA *et al.*, 2011). Outra causa levantada é que a maioria das pacientes com DOPM apresentavam idade superior a 51 anos, devendo ser investigado a relação entre o estrógeno e a prevalência das DOPMs. Dietrich *et al.* (2004) sugerem um efeito modulador protetor do estrógeno sobre a leucoplasia. Entretanto, para Arduino *et al.* (2009), o gênero não parece estar relacionado como risco de displasia epitelial oral.

No que diz respeito a etnia dos pacientes com DOPM, a raça parda foi prevalente (48%) seguida pela branca (40%). Para o CCEO, foi constatada a prevalência de indivíduos brancos (70%), concordando com os achados de Neville *et al.* (2009). Este achado poderia ser explicado em parte pela adoção de duas hipóteses: existe um maior contingente populacional da raça branca ou os indivíduos desta etnia são mais suscetíveis à ocorrência devido a fatores

genéticos ou ambientais. Por fim, uma terceira hipótese, uma vez que, é extremamente difícil classificar a raça de um indivíduo, principalmente, em países onde a miscigenação é grande, como o Brasil. O CCEO de lábio inferior confirmadamente registra associação com a cor do indivíduo e exposição contínua à radiação solar (NEVILLE *et al.*, 2009). Entretanto, o presente estudo não registrou caso de câncer de lábio.

No tocante à localização mais comum das DOPM, tem-se a língua (24%) e a mucosa jugal (20%), assemelhando aos achados de AMAGASA *et al.* (2011). Para o CCEO, o sítio intrabucal mais acometido foi a língua (60%), concordando com as características demográficas encontradas em outros estudos (BARNES *et al.*, 2005; KREPPEL *et al.*, 2012).

Quanto aos fatores de risco, o consumo simultâneo de tabaco e álcool não foi observado na maioria dos pacientes de ambos os grupos, não constatando, efeito sinérgico dos fatores de risco para o CCEO e DOPM (NEVILLE *et al.*, 2009; DIONNE *et al.*, 2015). Um número significativo de leucoplasias não tem associação concreta com esses fatores etiológicos ou outra causa atribuída como apresenta em série de estudos da revisão de Napier & Speight(2008): 17,3%(Suécia), 4,2%(Hungria), 11,6%(veteranos americanos), 27%(Noruega). Evidências do papel do HPV em DOPM é contraditório, apesar de estudos identificarem em técnicas sensíveis, o DNA HPV em 12 de 68 amostras de leucoplasias orais. Por outro lado, é interessante observar que a maioria dos tecidos perilesionais (76%) das DOPM não apresentaram nenhum grau de displasia epitelial oral, talvez em decorrência da falta de sinergismo entre os hábitos deletérios.

Embora os critérios para a determinar a gradação histopatológica da DEO e do CCEO pareçam estar bem definidos, existem dificuldades práticas e divergências sobre quais critérios analisar e como usá-los de forma objetiva (BRYNE *et al.*, 1992; BRANDWEIN-GENSLER *et al.*, 2005). Parâmetros como invasão tumoral e infiltrado inflamatório linfoplasmocitário, propostos por Bryne *et al.* (1992), foram omitidos no presente estudo em virtude do material selecionado ser oriundo de biópsias incisionais, a exemplo dos estudos de

Pinto Jr. (1991). Entretanto, biópsias com maior material lesionado e margem clínica podem auxiliar numa análise morfológica contributória.

O padrão ouro que ainda prevalece na avaliação das DOPMs é o perfil morfológico, por meio da identificação da presença ou não de displasia epitelial e o grau de severidade, servindo como ferramenta para prever o risco de transformação maligna (TILAKARATNE *et al.*, 2011) na orientação, acompanhamento e tratamento dos pacientes com DOPM (WARNAKULASURIYA *et al.*, 2008; van der WAAL *et al.*, 2010). Entretanto, as incertezas em determinar a verdadeira natureza das lesões displásicas através dos métodos tradicionais pavimentam o caminho para o uso de biomarcadores (BAJRACHARYA *et al.*, 2014) que pode levar a um melhor entendimento da fisiopatologia da progressão da doença e do mecanismo molecular implicado na transformação maligna das lesões orais com displasia (BALASUNDARAM *et al.*, 2014). Além disso, possibilita a diferenciação com mais precisão da verdadeira natureza das lesões que apresentem ou não um maior potencial de malignização (DIONNE *et al.*, 2015).

Muitas vezes, o marcador biológico está presente tanto em tecidos benignos quanto malignos, sem possuir um valor de corte claro que permita a distinção entre os dois processos. Os diversos estudos utilizando técnica de imunohistoquímica tem sugerido que os testes moleculares podem ser usados como um complemento à histopatologia tradicional, podendo em um futuro, tornar o "*gold standard*" tanto no diagnóstico, prognóstico do CCEO e em condutas e terapias mais específicas para aquelas DOPMs em que a imunoposição de determinados marcadores moleculares caracterizam as lesões com alto risco de malignização (GONZÁLEZ-MOLES *et al.*, 2010; BARTULI *et al.*, 2012; de VICENTE *et al.*, 2013; DWIVEDI *et al.*, 2013).

## **6.2 - Ki-67**

A positividade do Ki-67 em células epiteliais tanto em epitélio adjacente as DOPMs e ao CCEO, tem sido usado como instrumento para estimar o potencial de transformação maligna, crescimento e progressão tumoral

(MAHESHWARI *et al.*, 2013). O Ki-67 é um entre vários marcadores de proliferação celular, mas se destaca por ter um preço acessível, sua técnica é facilmente avaliada e reproduzida, além de poder ser avaliado em amostras de tecido parafinado (MARIE *et al.*, 2010). Além disso, a expressão do PCNA pode ser induzida por fatores de crescimento ou em situações de não-proliferação, como no reparo do DNA, determinando resultado falso-positivo (STRZALKA *et al.*, 2011) além de uma menor especificidade para proliferação celular (BOLOGNA-MOLINA *et al.*, 2013). Desta forma, para o melhor entendimento do papel da proliferação celular na progressão de uma DOPM para um CCEO, seria interessante a associação do Ki-67 com outro marcador de proliferação celular que atue em fase diferente do ciclo celular do Ki-67 e no processo de diferenciação celular.

Diversos estudos relacionam a expressão de K-i67 com o comportamento clínico das neoplasias, prognóstico e com a sobrevida dos pacientes. Nas neoplasias de cabeça e pescoço, altas expressões de ki67 estão relacionadas a prognósticos ruins e baixas taxas de sobrevida (DRAGOMIR *et al.*, 2012).

Para este estudo, a análise da imunorreação para o Ki-67 foi avaliada de forma semi-quantitativa (MAHIMA *et al.*, 2015), através do índice de proliferação (IP) e qualitativa (DWIVEDI *et al.* 2013) observando a extensão das células imunomarcadas pelos estratos epiteliais. A avaliação do índice de proliferação na margem clinicamente sadia comparada a lesão propriamente dita amplia o entendimento da transição nas DOPMs e CCEOs, podendo clarear etapas moleculares da carcinogênese.

Em 09 (36%) casos das DOPM, o Ki-67 foi expresso em mais estratos epiteliais do que em seus tecidos perilesionais, e em 3 (12%) casos, as margens expressaram Ki-67 na camada suprabasal e as lesões na camada parabasal. Cabe a ressalva de que os 3 pacientes apresentavam um ou mais fatores de risco.

Os resultados mostraram que a expressão do Ki-67 aumentou nos estratos epiteliais de acordo com o aumento da gradação das DOPM ( $p=0,001$ ) e do CCEO, ( $p=0,008$ ), corroborando com os achados de DWIVEDI *et*

*al.*(2013), o que sugere que as camadas suprabasal parecem ser o compartimento do epitélio mais adequado pra investigar a possibilidade de modulação da proliferação de células em lesões precursoras. Esta linha de pensamento compartilha com os estudos de GONZÁLES-MOLES *et al.* (2010), que sugerem que as células em proliferação da camada parabasal podem ser alvos de eventos oncogênicos para gerar subclones de células com capacidade invasiva.

A imunoexpressão do Ki-67 mostrou diferença estatisticamente significativa entre as DOPM e seus tecidos perilesionais ( $p=0,016$ ). Quando correlacionadas as DOPMs com os CCEOs, houve aumento estatístico significativo ( $p=0,006$ ), estando em consonância com os resultados encontrados por Patel *et al.* (2014)., relatando que a expressão do Ki-67 aumenta de acordo com o aumento da atividade proliferativa e o grau de DEO, sugerindo que o Ki-67 pode ser um útil marcador da presença e severidade de DEO.

O aumento da expressão do Ki-67 com o aumento progressivo da graduação histopatológica das DEO nos tecidos perilesionais ( $p=0,022$ ) e DOPM ( $p=0,001$ ) e do CCEO ( $p=0,001$ ) pode sugerir que o processo de diferenciação celular influencia de alguma forma no controle do ciclo celular. No CCEO, quanto menos diferenciada a lesão, maior a expressão do Ki-67 ( $p=0,001$ ), mostrando uma relação semelhante ao grau de DEO nas DOPM.

A maior expressão do Ki-67 foi observada no CCEO, seguido pelos tecidos peritumorais, DOPM e tecidos perilesionais, indicando que este marcador de proliferação pode ser um preditor de transformação maligna. O gradual aumento na expressão do Ki-67 das DOPM para os CCEO, foi significativo estatisticamente ( $p=0,006$ ).

### **6.3 - PODOPLANINA**

Estudos confirmam uma participação bem estabelecida da podoplanina, uma proteína transmembrana (SWAIN *et al.*, 2014) em vários tipos tumorais, como nos carcinomas pulmonares, hepáticos e pancreáticos inclusive no CCEO (YUAN *et al.*, 2006; BARTULLI *et al.*, 2012). No entanto, estudos que

analisaram sua expressão em epitélio de tecido peritumoral e de DOPM são escassos (KAWAGUCHI *et al.*, 2008; PATIL *et al.*, 2015).

Uma variedade de citocinas pró-inflamatórias e fatores de crescimento estão associados com a regulação da expressão da PDPN (HONNA *et al.*, 2012). No processo de malignização, a sua ativação leva a uma fosforilação da ezrina, estimulando a remodelação da actina do citoesqueleto e a subregulação de moléculas de adesão, como a E-caderina (FEHON *et al.*, 2010), entretanto para Wicki and Christofori (2007), a PDPN é capaz de induzir a invasão e migração celular mesmo na presença da E-caderina, talvez explicado pela sua interação com 02 proteínas de membrana, CD44 (MARTÍN-VILLAR *et al.*, 2010) e CD9 (NAKAZAWA *et al.*, 2008). Essas alterações conduzem à perda de adesão intercelular e ao ganho de motilidade, indispensáveis para a invasão tumoral (RAICA *et al.*, 2008; INOUE *et al.*, 2011). Além disso, pode participar do processo de metastatização, através de sua ligação com o receptor CLEC-2 (ACTON *et al.*, 2012), podendo modular a adesão de células endoteliais linfáticas com implicações interessantes no tráfico de linfócitos (TURLEY *et al.*, 2010).

O seu padrão de expressão no CCEO não foi associado, significativamente, com as características como gênero, idade, raça, localização e fatores de risco como tabagismo e etilismo corroborando com outros estudos (YUAN *et al.*, 2006; KREPPEL *et al.*, 2010; INOUE *et al.*, 2012).

A análise qualitativa da expressão da podoplanina no epitélio seguiu os critérios estabelecidos por Kawaguchi *et al.* (2008), através de escores que servem para referenciar o risco de desenvolvimento de câncer. Escores entre 0 e 1, apresentam baixo risco e escores maiores ou igual a 2, possuem alto risco de malignização, sugerindo que lesões com extensas expressões de podoplanina acima da camada basal podem refletir numa expansão clonal e serem mais propensas a progressão tumoral (YUAN *et al.*, 2006; KAWAGUCHI *et al.*, 2008). Os resultados no presente estudo, a maioria das DOPMs (80%), tecidos perilesionais (96%) e tecidos peritumorais (90%) mostrou baixo risco de malignização, contradizendo os resultados de Vincente *et al.* (2013) onde

houve uma super-expressão em leucoplasias (escores  $\geq 2$ ), relacionando com um maior risco de malignização.

No CCEO, nossos resultados demonstraram uma intensa marcação nas células periféricas dos ninhos tumorais e ausência nas células centrais, concordando com os resultados encontrados na literatura (KREPPEL *et al.*, 2010; BARTULLI *et al.*, 2012).

A maior expressão membranosa e eventualmente citoplasmática tanto no CCEO quanto nos seus respectivos tecidos peritumorais foi predominante, sendo este padrão de imunomarcação encontrado em DOPM com displasia epitelial oral (KAWAGUCHI *et al.*, 2008; DE VICENTE *et al.*, 2013).

Não foi encontrada nenhuma metodologia semi ou quantitativa para avaliar a expressão do PDPN nas DOPM, tecidos perilesionais e tecidos peritumorais, pois nessas análises consideramos a estratificação do epitélio e o grau de displasia epitelial oral. Desta forma, usamos a metodologia para o CCEO seguida por Yuan *et al.* (2006) e modificada por Patil *et al.* (2015) com o intuito de dicotomizar o escore final (*IRS*). Os resultados foram semelhantes entre análise qualitativa e quantitativa, apontando para a adoção desta metodologia para DOPMs. De acordo com esta metodologia, para a análise da intensidade de imunomarcação, os vasos linfáticos fortemente marcados, foram utilizados como controle interno positivo. Assim, poderíamos especular que a metodologia usada para quantificação da podoplanina no CCEO poderia ser utilizada para as DOPM, apesar de reconhecer que a amostra para o CCEO deveria ser maior.

O presente estudo mostra uma expressão crescente da podoplanina a medida que aumenta o grau de severidade da DEO na DOPM ( $p=0.001$ ), de acordo com os estudos de KREPPEL *et al.* (2012); de VICENTE *et al.*(2013) e em desacordo com ABDULMAJEED *et al.*(2013), onde sua expressão diminui com o aumento da graduação histopatológica. No CCEO, não houve uma relação direta entre expressão da podoplanina com a graduação histológica. Quanto maior a graduação do CCEO, maior a expressão do D2-40 (PATIL *et al.*, 2015 ; PRASAD *et al.*, 2015), sugere uma expressão regulada

negativamente pela diferenciação escamosa tanto *in vitro* como *in vivo* através da desacetilação de histonas (OHTA *et al.*, 2013). Estes achados contradizem os estudos de Rodrigo *et al.* (2010) e Bartulli *et al.* (2014), acreditando que a podoplanina tem papel na iniciação mas não na progressão tumoral. A imunexpressão pelas células cancerígenas no *front* invasivo do tumor, foi significativamente diferente nas células periféricas quando comparada com as células centrais do tumor ( $p < 0,001$ ), corroborando com o estudo de Inoue *et al.* (2012).

Ao avaliarmos a expressão da podoplanina nos tecidos perilesionais, nas DOPM, nos tecidos peritumorais e CCEOs, observamos uma expressão crescente. Estes resultados sugerem que a sua expressão está presente desde as fases iniciais da tumorigênese oral, corroborando com os achados de Yuan *et al.* (2006) e Kawaguchi *et al.* (2008). Isso pode indicar o seu papel em prever a evolução das DOPM na carcinogênese oral. Além disso, sua dupla marcação nas células epiteliais e vasos linfáticos nas DOPM poderia ser outro fator de prognóstico confiável para tais lesões. Para o CCEO, este comportamento e as propriedades moleculares desempenhadas pela podoplanina pode representar várias estratégias terapêuticas baseadas em anticorpos monoclonais específicos contra câncer (CasMab), podendo ser útil na terapia em pacientes com CCEO expressando podoplanina, melhorando desta forma o prognóstico dos pacientes (KATO *et al.*, 2014). Mediante ao conhecimento da expressão da podoplanina nas DOPMs, bem como nos tecidos perilesionais, a terapia aplicada nos pacientes com CCEO podem ser extrapolada para a etapa inicial, fortalecendo a promoção e prevenção do câncer de boca.

#### **6.4 - RELAÇÃO ki-67 E PODOPLANINA**

O aumento da proliferação celular (KUROKAWA *et al.*, 2005) e a perda de adesão celular (INOUE *et al.*, 2012) são aspectos geralmente observados na progressão da displasia epitelial para o CCEO.

Um dos objetivos do nosso trabalho foi analisar, a presença de relação entre a expressão do Ki-67 e da podoplanina, com o objetivo de analisar a utilização dessas proteínas como indicador da aquisição do fenótipo maligno

das DOPM. Embora, tais proteínas tenham sido estudadas isoladamente através de métodos imunohistoquímicos (KAWAGUCHI *et al.*, 2008; GONZÁLEZ-MOLES *et al.*, 2010; KREPPEL *et al.*, 2010; BIRAJDAR *et al.*, 2014), o presente estudo é pioneiro a estudar estes biomarcadores juntos no processo de carcinogênese oral. Todos os outros estudos avaliam os marcadores acima mencionados de forma isolada ou associados com outros marcadores, sem considerar os tecidos perilesionais das principais lesões para o entendimento do processo.

A falta de correlação entre os marcadores estudados, exceto para o CCEO ( $p=0.000$ ) (ANEXO I) pode sugerir um efeito independente no comportamento tanto das DOPM quanto do CCEO, ou ainda a necessidade de uma amostra populacional maior.

Um resultado interessante do nosso estudo e que abre perspectivas para novas investigações, foi a detecção de uma maior expressão do Ki-67 e a Podoplanina em nas lesões propriamente ditas do que em seus tecidos perilesionais, mesmo quando estes não apresentavam DEO. Este resultado, sugere a presença de alterações genéticas em células da mucosa próxima ao sítio tumoral, mesmo que estas não reflitam em alterações arquiteturais do epitélio, corroborando com a teoria "*field cancerization*" (SLAUGHTER *et al.*, 1953). Se realmente há um substancial efeito de "campo" no processo de malignização, as estratégias de intervenções e controle das DOPMs devem considerar as alterações moleculares nos tecidos adjacentes.

Com relação à localização da imunomarcagem da podoplanina nas camadas epiteliais, tanto nas DOPM, quanto nos tecidos perilesionais e peritumorais, a camada basal foi a que apresentou mais comumente imunomarcada. Sabendo que é nesta camada que há o maior potencial proliferativo, nossos resultados indicam que a podoplanina está sendo produzida pelas células epiteliais não só visando estímulos proliferativos, mas também outros estímulos para o processo de malignização como a perda de adesão celular (INOUE *et al.*, 2012).

Observou-se uma correlação positiva entre o Ki-67 e a Podoplanina ( $p=0,000$ ), ou seja, quanto maior a graduação histopatológica dos CCEOs

maior a expressão de ambos marcadores. Estes achados estão de acordo com KADOTA *et al.* (2010), onde encontraram um alto índice de proliferação e uma alta imunoreatividade do D2-40 em tumores de pulmão. Isso mostra que podem ser úteis na identificação de tipos de lesões mais agressivas e de seu potencial de metástase. Tais resultados parecem fornecer evidências da relação entre podoplanina e atividade proliferativa; em que quando estas células estabilizam ou se diferenciam, há uma redução ou ausência de imunoreatividade da podoplanina. Esta hipótese pode ser reforçada pelos nossos resultados, onde não houve expressão da podoplanina na região central dos ninhos ou cordões tumorais, locais onde há uma maior grau de diferenciação celular. Resultados estes corroborados com os de (MARTIN-VILLAR *et al.*, 2005; YUAN *et al.*, 2006; KAWAGUCHI *et al.*, 2008).

Embora neste estudo não tenha sido possível determinar uma associação significativa entre a expressão do Ki-67 e da podoplanina nas DOPMs, espera-se que essa associação seja importante para identificar lesões com maior agressividade, assim como pode ser feito no CCEO.

Diante do presente estudo, acredita-se que o perfil imuno-histoquímico da lesão e do tecido perilesional apresentem alterações moleculares com diferentes níveis de expressão do Ki-67 e da podoplanina, imunomarcadores da taxa de proliferação e da invasividade, características estas, marcantes no processo da carcinogênese, auxiliando no desenho esquemático do espectro entre as DOPMs, considerado estágio inicial do câncer de boca e o CCEO, extrapolando a investigação para as áreas adjacentes clinicamente sadia, que trará dados de como devemos avaliar o paciente individualizado, considerando a potencialidade de alterações genéticas associadas a outros fatores envolvidos. Dessa forma, traçar esquemas terapêuticos, de tratamento e acompanhamentos para o diagnóstico precoce e prognóstico do CCEO, além de um maior entendimento da carcinogênese oral.

## 7 - CONCLUSÃO

No final do nosso estudo, verificamos por meio da análise histopatológica das DOPM, CCEO e seus respectivos tecidos perilesionais que há um aumento gradual e em ordem crescente da expressão do Ki-67 e do D2-40 nos tecidos perilesionais, DOPM, tecidos peritumorais e CCEO.

Há correlação significativa entre a proliferação celular e o grau de displasia epitelial oral e o grau de diferenciação do CCEO.

A expressão do Ki67 pode ser usada como critério adicional para determinar a gravidade da displasia epitelial oral.

A correlação significativa entre a proliferação celular e aumento da expressão da podoplanina no CCEO sugerem que estes podem ser úteis como biomarcadores de prognóstico do CCEO e podem servir como pontos de intervenção para terapias do câncer. Anticorpos monoclonais anti-podoplanina surgiram recentemente como potenciais meios valiosos no tratamento oncológico, que, mesmo necessitando de mais estudos poderia ser útil para aliviar a morbidade e mortalidade do câncer de boca.

No entanto, um estudo em maior escala pode revelar de forma mais específica a participação da podoplanina no processo de transformação maligna.

## 8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS<sup>1</sup>

ACTON, S. E. et al. Podoplanin-rich stromal networks induce dendritic cell motility via activation of the C-type lectin receptor CLEC-2. **Immunity**, v.37, n.2, p.276-289, 2012.

AHMED, E. M.; FARAG, A. S. Expression of EMMPRIN/CD147 and Ki-67 in oral squamous cell carcinoma: An immunohistochemical study. **J Am Sci**, v.10, n.12, p. 241-249, 2014.

AMAGASSA, TERUO. Oral premalignant lesions. **Int J Clin Oncol**, v.16, n.1, p.1-4, 2011.

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

ARDUINO, P. G. et al. Outcome of oral dysplasia: a retrospective hospital-based study of 207 patients with a long follow-up. **J Oral Pathol Med**, v. 38, n. 6, p. 540–4, 2009.

ASTARITA, J. L. et al. Podoplanin: emerging functions in development, the immune system, and cancer. **Front Immunol**, v.3, 2012.

AWAN, K. H.; MORGAN, P. R. e WARNAKULASURIYA, S. Assessing the accuracy of autofluorescence, chemiluminescence and toluidine blue as diagnostic tools for oral potentially malignant disorders-a clinicopathological evaluation. **Clin Oral Investig**, 2015.

BABJI, D. V. et al. Histomorphometric study to compare histological changes between oral squamous cell carcinoma and apparently normal adjacent oral mucosa. **Indian J Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 67, n. Suppl 1, p. 21–8, 2015.

---

<sup>1</sup> Guia para Normalização de Referências: NBR 6032:2002/ Universidade Federal do Espírito Santo, Biblioteca Central. 2.ed – Vitória: A Biblioteca, 2002.

BAJRACHARYA, D. et al. Immunohistochemical correlation of matrix metalloproteinase-2 and tissue inhibitors of metalloproteinase-2 in tobacco associated epithelial dysplasia. **Disease markers**, v. 2014, p.1-9, 2014.

BALASUNDARAM, I. et al. Is there any benefit in surgery for potentially malignant disorders of the oral cavity? **J Oral Pathol Med**, v. 43, n. 4, p. 239–44, 2014.

BARNES, L. et al. World Health Organization Classification of tumours - Pathology & Genetics. **Head Neck Tumours**. Lyon, IARC Press, 2005.

BARTULI, F. N. et al. Podoplanin in the development and progression of oral cavity cancer: A preliminary study. **Oral Implantol**, v. 5, n. (2-3), p.33-41, 2012.

BHATT, A. N. et al. Cancer biomarkers - Current perspectives. **Indian J Med Res**, v. 132, n.2, p. 129–149, 2010.

BIRAJDAR, S. S. et al. Expression of Ki-67 in normal oral epithelium, leukoplakic oral epithelium and oral squamous cell carcinoma. **J Oral Maxillofac Pathol**, v.18, n. 2, p. 169, 2014.

BOLOGNA-MOLINA, RONELL, et al. Comparison of the value of PCNA and Ki-67 as markers of cell proliferation in ameloblastic tumor. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v.18, n.2, p.e174-e179, 2013.

BOUQUOT, J. E.; SPEIGHT, P. M. e FARTHING, P. M. Epithelial dysplasia of the oral mucosa—Diagnostic problems and prognostic features. **Current Diagnostic Pathol**, v. 12, n. 1, p. 11–21, 2006.

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

BRASIL. Ministério da Saúde. INCA: Instituto Nacional do Câncer. Disponível em: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2014/estimativa-24042014.pdf>. Acesso em: 05 fev. 2014.

BRODERS, A.C. The microscopic grading of cancer. **Surg Clin North Am**, v.21, p.947-62, 1941.

BROWN, D. C.; GATTER, K. C. Ki67 protein: the immaculate deception?. **Histopathology**, v. 40, n. 1, p.2-11, 2002.

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

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

CATTORETTI, G, et al. Monoclonal antibodies against recombinant parts of the Ki-67 antigen (MIB 1 and MIB 3) detect proliferating cells in microwave-processed formalin-fixed paraffin sections. **J Path**, v. 168, n. 4, p. 357-363, 1992.

CANKOVIC, M. *et al.* The histological characteristics of clinically normal mucosa adjacent to oral cancer. **J Cancer Res Ther**, v. 9, n. 2, p. 240–4, 2013.

CHENG, A.; COX, D.; SCHMIDT, B. L. Oral squamous cell carcinoma margin discrepancy after resection and pathologic processing. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 66, n. 3, p. 523–9, 2008.

CHEN, C. H. et al. Shrinkage of head and neck cancer specimens after formalin fixation. **J Chinese Med Assoc** , v. 75, n. 3, p. 109–13, 2012.

CHOE, M. S. *et al.* Interaction between epidermal growth factor receptor- and cyclooxygenase 2-mediated pathways and its implications for the

chemoprevention of head and neck cancer. **Mol Cancer Ther**, v. 4, n. 9, p. 1448–55, 2005.

CINTRA, J. S. et al. Queilite Actínica: Estudo epidemiológico entre trabalhadores rurais do município de Piracaia - SP. **Rev Assoc Paul Cir Dent**, v. 67, n. 2, p. 118–121, 2013.

DIAJIL, A. et al. Clinical outcome following oral potentially malignant disorder treatment: a 100 patient cohort study. **Int J Dent**, v. 2013 p.1-8, 2013.

DIETRICH, T.; REICHART, P.A.; SCHEIFELE, C. Clinical risk factors of oral leukoplakia in a representative sample of the US population. **Oral Oncol**, v. 40, n.2, p. 158-63, 2004.

DIONNE, K. R. et al. Potentially malignant disorders of the oral cavity: current practice and future directions in the clinic and laboratory. **Int J Cancer**, v. 136, n. 3, p. 503–15, 2015.

DOSHI, N. P. et al. Histological grading of oral cancer: A comparison of different systems and their relation to lymph node metastasis. **Nat J Community Med**, v. 2, n. 1, p.136-142, 2011.

DOST, F. et al. Malignant transformation of oral epithelial dysplasia : a real-world evaluation of histopathologic grading. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, v. 117, n. 3, p. 343-352, 2014.

DRAGOMIR, L. P. et al. p53, p16 and Ki67 immunoexpression in oral squamous carcinomas. **Rom J Morphol Embryol**, v. 53, n. 1, p. 89-93, 2012.

DUMOFF, K. L. et al. Low podoplanin expression in pretreatment biopsy material predicts poor prognosis in advanced-stage squamous cell carcinoma of the uterine cervix treated by primary radiation. **Mod Pathol**, v. 19, n. 5, p. 708–16, 2006.

DWIVEDI, N. et al. Suprabasal expression of Ki-67 as a marker for the severity of oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma. **Contemp Clin Dent**, v. 4, n. 1, p.7-12, 2013.

EDWARDS, P. C. The natural history of oral epithelial dysplasia: perspective on Dost et al. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, v. 117, n. 3, p. 263–6, 2014.

EINHORN, J.; WERSÄLL, J. Incidence of oral carcinoma in patients with leukoplakia of the oral mucosa. **Cancer**, V. 20, n. 12, p.2189-2193, 1967.

FENG, J. Q. et al. Expression of podoplanin and ABCG2 in oral erythroplakia correlate with oral cancer development. **Oral Oncol**, v. 48, n. 9, p. 848–52, 2012.

FEHON, R. G.; MCCLATCHEY, A. I.; BRETSCHER, A. Organizing the cell cortex: the role of ERM proteins. **Nat Rev Mol Cell Biol**, v.11, n.4, p.276-287, 2010.

FRONIE, A. et al. Squamous cell carcinoma of the oral cavity: clinical and pathological aspects. **Rom J Morphol Embryol**, v. 54, n. 2, p.343-8, 2013

FUNAYAMA, A. et al. Enhanced expression of podoplanin in oral carcinomas in situ and squamous cell carcinomas. **Pathobiology**, v. 78, n. 3, p. 171–80, 2011.

FURRER, V. E. et al. Biopsy vs. superficial scraping: detection of human papillomavirus 6, 11, 16, and 18 in potentially malignant and malignant oral lesions. **J Oral Pathol Med**, v. 35, n. 6, p. 338-44, 2006.

GAETTI-JARDIM, E. C. et al. Carcinoma de células escamosas de grandes dimensões. **Rev Odontol Araçatuba**, v. 31, n.2, p. 9-13, 2010.

GAITÁN-CEPEDA, L. A. et al. Trends in frequency and prevalence of oral cancer and oral squamous cell carcinoma in Mexicans. A 20 years retrospective study. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v.16, n.1, p.1-5, 2011.

GALBIATTI, A. L. S. et al. Head and neck cancer: causes, prevention and treatment. **Brazi J Otorhinolaryngol**, v. 79, n. 2, p. 239–247, 2013.

GOLD, B. Y. P.; FREEDMAN, S. O. Demonstration of tumor-specific antigens in human colonic carcinomata by immunological tolerance and absorption techniques. **J Exp Med**, v. 121, n. 3, p.439-462, 1965.

GONZALEZ-MOLES, M. A. et al. Suprabasal expression of ki-67 antigen as a marker for the presence and severity of oral epithelial dysplasia. **Head Neck**, v. 22, n. 7, p. 658–661, 2000.

GONZÁLEZ-MOLES, M. A. et al. Ki-67 expression in non-tumour epithelium adjacent to oral cancer as risk marker for multiple oral tumours. **Oral Dis**, v. 16, n. 1, p. 68–75, 2010.

GOYAL, PARDEEP. Oral epithelial dysplasia. **J Dent Sci Oral Rehab**, v.23, 2012.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v.144, n. 5, p.646-674, 2011.

HELLQUIST, H. et al. Criteria for grading in the Ljubljana classification of epithelial hyperplastic laryngeal lesions . A study by members of the Working Group on Epithelial Hyperplastic Laryngeal Lesions of the European Society of Pathology. **Histopathology**, v. 34, n. 3, p. 226–233, 1999.

HINNI, M. L. et al. Surgical margins in head and neck cancer: A contemporary review. **Head Neck**, v. 35, n. 9, p.1362-1370, 2013.

HO, M. W. *et al.* The clinical determinants of malignant transformation in oral epithelial dysplasia. **Oral Oncol**, v. 48, n. 10, p. 969–76, 2012.

HO, M. W. et al. Outcomes of oral squamous cell carcinoma arising from oral epithelial dysplasia: rationale for monitoring premalignant oral lesions in a multidisciplinary clinic. **Br J Oral Maxillofac Surg**, v 51, n . 7, p.594-599, 2013.

HONMA M, Minami-Hori M, Takahashi H, Iizuka H. Podoplanin expression in wound and hyperproliferative psoriatic epidermis: regulation by TGF- $\beta$  and STAT-3 activating cytokines, IFN- $\gamma$ , IL-6, and IL-22. **J Dermat Sci**, v.65, n.2, p.134-40, 2012.

HSUE, S. S. et al. Malignant transformation in 1458 patients with potentially malignant oral mucosal disorders: a follow-up study based in a Taiwanese hospital. **J Oral Pathol Med**, v. 36, n. 1, p.25-29, 2007.

INCA. TNM classificação de tumores malignos. 6<sup>a</sup> ed. Rio de Janeiro; 2004.

INOUE, H. et al. Podoplanin expression during dysplasia-carcinoma sequence in the oral cavity. **Tumour Biol**, v. 33, n. 1, p. 183–94, 2012.

JABER, M. A. et al. Oral epithelial dysplasia: clinical characteristics of western European residents. **Oral Oncol**, v. 39, n. 6, p.589-596, 2003.

KADOTA, K. et al. The clinical significance of the tumor cell D2-40 immunoreactivity in non-small cell lung cancer. **Lung Cancer**, v. 70, n. 1, p. 88-93, 2010.

KANEKO, M. K. et al. Conservation of a platelet activating domain of Aggrus/podoplanin as a platelet aggregation-inducing factor. **Gene**, v. 378, p. 52–7, 2006.

KANEKO, M. K. et al. Functional glycosylation of human podoplanin: glycan structure of platelet aggregation-inducing factor. **FEBS Lett**, v. 581, n. 2, p. 331–6, 2007.

KATO, Y., & KANEKO, M. K. A cancer-specific monoclonal antibody recognizes the aberrantly glycosylated podoplanin. **Scientific Reports**, 4., 2014.

KAWAGUCHI, H. et al. Podoplanin: a novel marker for oral cancer risk in patients with oral premalignancy. **J Clin Oncol**, v. 26, n. 3, p. 354–60, 2008.

KREPPEL, M. *et al.* Podoplanin expression in oral leukoplakia: prognostic value and clinicopathological implications. **Oral Dis**, v. 18, n. 7, p. 692–9, 2012.

KREPPEL, M. *et al.* Impact of podoplanin expression in oral squamous cell carcinoma: clinical and histopathologic correlations. **Virchows Arch : an Int J Pathol**, v. 456, n. 5, p. 473–82, 2010.

KÜFFER, R. e LOMBARDI, T. Premalignant lesions of the oral mucosa. A discussion about the place of oral intraepithelial neoplasia (OIN). **Oral Oncol**, v. 38, n. 2, p. 125–130, 2002.

KUJAN, O. *et al.* Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. **Oral Oncol**, v. 42, n. 10, p. 987–93, 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 Oncol**, v. 43, n. 3, p. 224–31, 2007.

KULASINGAM, V. e DIAMANDIS, E. P. Strategies for discovering novel cancer biomarkers through utilization of emerging technologies. **Nat Clin Pract Oncol**, v. 5, n. 10, p. 588–99, 2008.

KUROKAWA, H. *et al.* The relationship of the histologic grade at the deep invasive front and the expression of Ki-67 antigen and p53 protein in oral squamous cell carcinoma. **J Oral Pathol Med**, v. 34, n. 10, p.602-607,2005.

LAMEIRA, A. G. *et al.* MCM3 could be a better marker than Ki-67 for evaluation of dysplastic oral lesions: an immunohistochemical study. **J Oral Pathol Med**, v. 43, n. 6, p. 427–34, 2014.

LAWAETZ, M. e HOMØE, P. Risk factors for and consequences of inadequate surgical margins in oral squamous cell carcinoma. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, v. 118, n. 6, p. 642–6, 2014.

LEE, E. Y.; MULLER. W.J. Oncogenes and tumor suppressor genes. **Cold Spring Harbor perspectives in biology**, v. 2, n. 10, p.1-18, 2010.

LEEMANS, C. R.; BRAAKHUIS, B. J. M.; BRAKENHOFF, R.H. The molecular biology of head and neck cancer. **Nat Rev Cancer**, v. 11, n. 1, p. 9-22, 2011.

LINDENBLATT, R. D. C. R. et al. Oral squamous cell carcinoma grading systems--analysis of the best survival predictor. **J Oral Pathol Med**, v. 41, n. 1, p. 34–9, 2012.

LIPPI, G. et al. Prostate-specific antigen, prostate cancer, and disorders of hemostasis. **Semin Thromb Hemost**, vol. 35, n. 7, p. 654-664. 2009

LODI, G.; PORTER, S. Management of potentially malignant disorders: evidence and critique. **J Oral Pathol Med**, v. 37, n. 2, p. 63–9, 2008.

LOURENÇO, S. D. Q. C., SCHUELER, A. F., CAMISASCA, D. R., LINDENBLATT, R. D. C., & BERNARDO, V. G. Classificações Histopatológicas para o Carcinoma de Células Escamosas da Cavidade Oral : Revisão de Sistemas Propostos.**Rev Bras Cancerol**, v. 53, n. 3, p. 325–333, 2007.

McCall, C. M. et al. Grading of welldifferentiated pancreatic neuroendocrine tumors is improved by the inclusion of both Ki67 proliferative index and mitotic rate. **Am J Surg Pathol**, v. 37, n. 11, p.1671-7, 2013.

MACEY, R. et al. Diagnostic tests for oral cancer and potentially malignant disorders in patients presenting with clinically evident lesions. **The Cochrane Library**, 2012.

MAHESHWARI, V. et al. Prognostic and Predictive Impact of Ki-67 in Premalignant and Malignant Squamous Cell Lesions of Oral Cavity. **Int J Head Neck Surg**, v. 4, n. 2, p. 61–65, 2013.

MAHIMA, R., PRATYUSH, S., SHERGILL, A. K., VASUDEVA, G., & SOLOMON, M. C. Assessment of proliferative potential of tumor cells using KI-67 expression and morphometrical analysis for prognostication of oral squamous cell carcinomas. **Int J Med Res Health Sci**, v.4, n.4, p.820-826, 2015.

MARODIN, G. et al. Diretrizes nacionais para biorrepositório e biobanco de material biológico humano. **Rev Assoc Med Bras**, v. 59, n. 1, p. 72–77, 2013.

MARTÍN-VILLAR, E. et al. Characterization of human PA2.26 antigen (T1alpha-2, podoplanin), a small membrane mucin induced in oral squamous cell carcinomas. **Int J Cancer**, v. 113, n. 6, p. 899–910, 2005.

MARTÍN-VILLAR, E. et al. Podoplanin associates with CD44 to promote directional cell migration. **Mol Biol Cell**, v. 21, p.4387–4399, 2010.

MEHANNA, H. M. et al. Treatment and follow-up of oral dysplasia — a systematic review and meta-analysis. **Head Neck**, v. 31, n. 12, p. 1600–1609, 2009.

MENDES, RUI AMARAL. Oncogenic Pathways in the Development of Oral Cancer. **J Carcinogene Mutagene**, v. 3, n. 2, p.1-2, 2012.

MISHRA, A. e VERMA, M. Cancer biomarkers: are we ready for the prime time? **Cancers**, v. 2, n. 1, p. 190–208, 2010.

MORTAZAVI, H.; MARYAM, B.; AND MASOUMEH M. Oral potentially malignant disorders: an overview of more than 20 entities. **J Dent Res Dental Clin Dent Prospects**, v. 8, n. 1, p.6, 2014.

NADERI, N. J, et al. A study on the relationship between clinical features with Ki67 expression and eosinophil cells infiltration in oral squamous cell carcinoma. **Med J Islam Repub Iran**, v. 28, p.1-7, 2014.

NAGATSUKA, H. et al. Quantitation of epidermal growth factor receptor gene amplification by competitive polymerase chain reaction in pre-

malignant and malignant oral epithelial lesions. **Oral Oncol**, v. 37, n. 7, p. 599–604, 2001.

NAKAZAWA, S. S. et al. Tetraspanin family member CD9 inhibits Aggrus/podoplanin-induced platelet aggregation and suppresses pulmonary metastasis. **Blood**, v.112, p.1730–1739, 2008.

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

NASON, R. W. et al. What is the adequate margin of surgical resection in oral cancer? **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v. 107, n. 5, p. 625–9, 2009.

NEVILLE B. W. et al. **Patologia oral & Maxilofacial**. 3ª Ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 972, 2009.

OHTA M, ABE A, OHNO F, HASEGAWA Y, TANAKA H, MASEKI S. Positive and negative regulation of podoplanin expression by TGF- $\beta$  and histone deacetylase inhibitors in oral and pharyngeal squamous cell carcinoma cell lines. **Oral Oncol**, v. 49, p.20–6, 2013.

OKAMOTO, E. et al. Significance of podoplanin expression in keratocystic odontogenic tumor. **J Oral Pathol Med**, v. 39, n. 1, p. 110–4, 2010.

PAGET, J. Cancer following ichthyosis of the tongue. **Trans Clin Soc London**, v.3, n. 88, 1870.

PAKSOY, S. E., et al. A comparison of Ki 67 proliferative index in primary tumor and axillary metastatic lymph nodes with length of survival in patients with breast cancer. **Bratisl Lek Listy**, v. 114, n. 11, p.645-649, 2012.

PATEL, S. et al. Expression of p53 and Ki-67 in oral dysplasia and Squamous cell carcinoma: An immunohistochemical study. **Int J Med Sci Public Health**, v. 3, n. 10, p. 1201, 2014.

PATIL, A., et al. Evaluation of Podoplanin in Oral Leukoplakia and Oral Squamous Cell Carcinoma. **Scientifica**, 2015.

PINTO Jr D. S. Critérios de avaliação do prognóstico – Tipo histológico, marcadores imuno-histoquímicos – em biópsias de carcinoma epidermóide de boca [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 1991.

PITIYAGE, G.; TILAKARATNE W. M.; TAVASSOLI, M.; WARNAKULASURIYA S. Molecular markers in oral epithelial dysplasia: Review. **J Oral Pathol Med**, v.38, n. 10, p. 737-752, 2009.

PRASAD, B. et al. Expression of podoplanin in different grades of oral squamous cell carcinoma. **Ann Medical Health Sci Res**, v. 5, n.4, p: 299, 2015.

PRIYA, S. R.; D'CRUZ, A. K.; PAI, P. S. Cut margins and disease control in oral cancers. **J Cancer Res Ther**, v. 8, n. 1, p. 74–9, 2012.

PURICELLI, E., et al. Técnica Anestésica, Exodontia e Cirurgia Dentoalveolar. **Grupo A Educação**, 2014.

RAICA, M. et al. The role of podoplanin in tumor progression and metastasis. **Anticancer Res**, v.28, n. 5B, 3006, p. 2997–3006, 2008.

REDDI, S. P.; SHAFER A. T. Oral premalignant lesions: management considerations. **Oral Maxillofac Surg Clin North Am**, v.18, p.425-33, 2006.

REICHART, P. A.; LANGFORD-KUNTZ, A.; POHLE, H.D. Epidemic oro-facial Kaposi's sarcoma (eKS)—Report on 124 cases. **Eur J Cancer B Oral Oncol**, v. 29, n. 3, p. 187–189, 1993.

RITTÁ, MASSIMO. et al. Cell cycle and viral and immunologic profiles of head and neck squamous cell carcinoma as predictable variables of tumor progression. **Head Neck**, v.31, n.3, p.318-327, 2009.

RODRIGO, J. P. et al. Podoplanin expression in the development and progression of laryngeal squamous cell carcinomas. **Mol Cancer**, v. 9, n. 1, p. 1–9, 2010.

RODRIGUES, P. C. et al. Clinicopathological prognostic factors of oral tongue squamous cell carcinoma: a retrospective study of 202 cases. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v. 43, n. 7, p. 795–801, 2014.

ROOK, G. A. W.; DALGLEISH, A. Infection, immunoregulation, and cancer. **Immunol Rev**, v. 240, n. 1, p.141–159, 2011.

SABA, N. F. et al. Chemoprevention of head and neck cancer with celecoxib and erlotinib: results of a phase Ib and pharmacokinetic study. **Cancer Prev Res**, v. 7, n. 3, p. 283–91, 2014.

SADIQ, H. et al. Various Grading Systems of the Oral Epithelial Dysplasia: A Review. **Int J Advanced Health Sci**, v. 1, n.11, p. 20-26, 2015.

SARODE, Sachin C.; SARODE, Gargi S.; TUPKARI, Jagdish V. Oral potentially malignant disorders: A proposal for terminology and definition with review of literature. **J Oral Maxillofac Pathol**, v. 18, n. Suppl 1, p. S77-S80, 2014.

SCANLON, C. S. et al. Biomarkers of epithelial-mesenchymal transition in squamous cell carcinoma. **J Dental Res**, v. 92, n. 2, p.114-121, 2012.

SCHACHT, V. et al. T1 a / podoplanin deficiency disrupts normal lymphatic vasculature formation and causes lymphedema. **EMBO J**, v. 22, n. 14, p.3546-3556, 2003.

SCHLÜTER, C. et al. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. **J Cell Biol**, v. 123, n. 3, p.513-522, 1993.

SCULLY, C. Challenges in predicting which oral mucosal potentially malignant disease will progress to neoplasia. **Oral Dis**, v. 20, n. 1, p. 1–5, 2014.

SCHOLZEN, T.; GERDES, J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. **J Cell Physiol**, v. 182, n.3, p.311-322, 2000.

SLAUGHTER, D. P. et al. “Field cancerization” in oral stratified squamous epithelium. Clinical implications of multicentric origin. **Cancer**, v.6, n. 5, p.963-968, 1953.

SHI, P. et al. Podoplanin and ABCG2: malignant transformation risk markers for oral lichen planus. **Cancer Epidemiol Biomarkers Prev**, v. 19, n. 3, p. 844–9, 2010.

SHIMADA, Y. et al. Expression of podoplanin, CD44, and p63 in squamous cell carcinoma of the lung. **Cancer Sci**, v. 100, n. 11, p. 2054–9, 2009.

SILVERMAN, S. Jr. et al. Oral leukoplakia and malignant transformation- a follow-up study of 257 patientes. **Cancer**, v. 52, p.563-568, 1984.

SPEIGHT, P. M. Update on oral epithelial dysplasia and progression to cancer. **Head Neck Pathol**, v. 1, n. 1, p. 61–6, 2007.

STRZALKA, WOJCIECH, and ALICJA ZIEMIENOWICZ. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA): a key factor in DNA replication and cell cycle regulation. **Annals of Botany**: v. 107, n.7, p.1127-1140, 2011.

SWAIN, N. et al. Podoplanin-a novel marker in oral carcinogenesis. **Tumour Biol**, v. 35, n. 9, p. 8407–13, 2014.

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

SYRJÄNEN, S. et al. Human papillomaviruses in oral carcinoma and oral potentially malignant disorders: a systematic review. **Oral Dis**, v. 17 Suppl 1, n. s1, p. 58–72, 2011.

TABOR, M. P. et al. Persistence of genetically altered fields in head and neck cancer patients: Biological and clinical implications. **Clin Cancer Res**, v. 7, n. 6, p.1523–1532, 2001.

TABOR, M. P. et al. Genetically altered fields as origin of locally recurrent head and neck cancer: a retrospective study. **Clin Cancer Res**, v. 10, p. 3607–3613, 2004.

TANAKA, T.; TANAKA, M.; TANAKA, T. Oral carcinogenesis and oral cancer chemoprevention: a review. **Pathol Res Int**, p. 1-10, 2011.

TEIXEIRA, A. K. M. et al. Carcinoma espinocelular da cavidade bucal: um estudo epidemiológico na Santa Casa de Misericórdia de Fortaleza. **Rev Bras Cancerol**, v. 55, n. 3, p. 229-36, 2009.

THOMAS, VALSA, et al. Mucosal Disorders with Oral Epithelial Dysplasia risk–Development of a simple screening tool for general health care setting. **Oral Oncol**, v. 48, n.8, p.671-677, 2012.

TILAKARATNE, W. M. et al. Grading oral epithelial dysplasia: analysis of individual features. **J Oral Pathol Med**, v. 40, n. 7, p. 533–40, 2011.

TORRES-RENDON, A. et al. Expression of Mcm2, geminin and Ki67 in normal oral mucosa, oral epithelial dysplasias and their corresponding squamous-cell carcinomas. **Brit J Cancer**, v. 100, n. 7, p. 1128–34, 2009.

TSUNEKI, M. ET AL. Podoplanin is a novel myoepithelial cell marker in pleomorphic adenoma and other salivary gland tumors with myoepithelial differentiation. **Virchows Arch**, v. 462, n.3, p.297-305, 2013.

TURLEY, S. J, et al. The stromal and haematopoietic antigen-presenting cells that reside in secondary lymphoid organs. **Nature Rev Immunol**, v.10, p.813–825, 2010.

VAN der WAAL, I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; present concepts of management. **Oral Oncol**, v. 46, n. 6, p.423-425, 2010.

Van der WAAL, I. Are we able to reduce the mortality and morbidity of oral cancer; some considerations. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 18, n. 1, p.33-37, 2013.

VAN der WAAL, I. Oral potentially malignant disorders: Is malignant transformation predictable and preventable? **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**, v. 19, n. 4, p. e386–e390, 2014.

VERED, M. et al. Oral tongue squamous cell carcinoma: recurrent disease is associated with histopathologic risk score and young age. **J Cancer Res Clin Oncol**, v. 136, n. 7, p. 1039–48, 2010.

de VICENTE, J. C. et al. Podoplanin expression in oral leukoplakia: tumorigenic role. **Oral Oncol**, v. 49, n. 6, p. 598–603, 2013.

de VICENTE, J. C. et al. Expression of podoplanin in the invasion front of oral squamous cell carcinoma is not prognostic for survival. **Virchows Arch**, v. 466, n. 5, p. 549–58, 2015.

WARNAKULASURIYA, S.; JOHNSON, N. W.; VAN der WAAL. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. **J Oral Pathol Med**, v. 36, n. 10, p. 575–80, 2007.

WARNAKULASURIYA, S. et al. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. **J Oral Pathol Med**, v. 37, n. 3, p. 127–33, 2008.

WARNAKULASURIYA, S. Squamous cell carcinoma and precursor lesions: prevention. **Periodontol**, v. 57, n. 1, p.38-50, 2011.

WATANABE, NAOKI, et al. Preneoplasia and carcinogenesis of the oral cavity, **Oncol Discovery**, v.3, n. 1, p.1-12, 2015.

WEIJERS, M. et al. The clinical relevance of epithelial dysplasia in the surgical margins of tongue and floor of mouth squamous cell carcinoma: an analysis of 37 patients. **J Oral Pathol Med**, v. 31, n. 1, p. 11–15, 2002.

WICKI, A.; CHRISTOFORI, G. The potential role of podoplanin in tumour invasion. **Br J Cancer**, v. 96, n. 1, p. 1–5, 2007.

WOLFF, K. D.; FOLLMANN, M., NAST, A. The diagnosis and treatment of oral cavity cancer. **Dtsch Ärztebl Int**, v. 109, n. 48, p. 829–35, 2012.

WOOLGAR, J. A. Histopathological prognosticators in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Oral Oncol**, v. 42, n. 3, p. 229–39, 2006.

World Health Organization. "Report of a meeting of investigators on the histological definition of precancerous lesions." *Geneva: World Health Organization* 731, 1973.

YE, Y. et al. Genetic variations in cell-cycle pathway and the risk of oral premalignant lesions. **Cancer**, v. 113, n. 9, p. 2488–95, 2008.

YU, Y.H. et al. CD147 and Ki-67 overexpression confers poor prognosis in squamous cell carcinoma of oral tongue: a tissue microarray study. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol**, v. 119, n. 5, p. 553–65, 2015.

YUAN, P. et al. Overexpression of podoplanin in oral cancer and its association with poor clinical outcome. **Cancer**, v. 107, n. 3, p. 563–9, 2006.

ZHANG, X. et al. Tumor growth inhibition by simultaneously blocking epidermal growth factor receptor and cyclooxygenase-2 in a xenograft model. **Clin Cancer Res**, v. 11, n. 17, p. 6261–9, 2005.

## APÊNDICES

### APÊNDICE A - Termo de Consentimento Livre e Esclarecido



**Universidade Federal do Espírito Santo**  
**Centro de Ciências da Saúde**  
**Programa de Pós Graduação em Clínica Odontológica**  
***Programa de Prevenção e Detecção Precoce do Câncer de Boca***

### **Termo de Consentimento Livre e Esclarecido**

---

Título da Pesquisa:

**"Caracterização da expressão molecular da Podoplanina e do Ki-67 nas displasias epiteliais e carcinomas de células escamosas orais: análise da transformação maligna"**

---

---

O Senhor(a) está sendo convidado a participar de um projeto de pesquisa. Por favor, leia este documento com bastante atenção antes de assiná-lo. Caso haja alguma palavra ou frase que o senhor(a) não consiga entender, converse com o pesquisador responsável pela pesquisa ou com um membro da equipe para esclarecê-lo.

A proposta deste Termo de Consentimento Livre e Esclarecido (TCLE) é fornecer todas as informações sobre a pesquisa a ser realizada e solicitar a sua permissão para participar.

OBSERVAÇÃO: Caso o paciente não tenha condições de ler e/ou compreender este TCLE, o mesmo poderá ser assinado e datado por um membro da família ou responsável legal pelo paciente.

---

#### **Procedimento do Estudo**

Para que seja realizado o diagnóstico correto das lesões de boca primeiramente é feito um exame clínico, a partir desta avaliação, exames complementares podem ser

---

---

indicados, dentre eles, a biópsia.

A biópsia consiste na retirada de um pequeno fragmento da lesão para posterior avaliação microscópica. Este procedimento é de rotina no nosso ambulatório e será executado por um profissional capacitado sob a orientação dos professores pertencentes ao Curso de Odontologia/UFES.

O material biológico é acondicionado em solução de formol a 10% devidamente identificado e posteriormente encaminhado ao Laboratório de Histologia da UFES para o processamento histotécnico e confecção de lâminas histológicas que serão analisadas pelo estudo.

Devemos ressaltar que o procedimento de biópsia apenas será realizado a partir da sua autorização. A recusa será de sua responsabilidade e registrado em seu prontuário, pois para o estabelecimento de um tratamento adequado é necessário a remoção de uma parte da lesão para a avaliação e o diagnóstico final. Isso não o impede de realizar os procedimentos rotineiros no processo de diagnóstico.

O material fica armazenado em blocos de parafinas, separados por ano e em caixa, mantidos no Laboratório de Histologia e as lâminas, arquivadas em caixas próprias, bem como as requisições e cópias dos laudos microscópicos ficam em arquivos na sala pertencente as disciplinas e aos professores responsáveis pelo desenvolvimento do serviço. Todo material, bem como as informações pertinentes, poderão ser utilizadas na pesquisa e serão mantidas em total sigilo e acessadas apenas pelos responsáveis do serviço e do estudo.

---

### **Riscos Potenciais, Efeitos Colaterais e Desconforto**

A grande maioria dos procedimentos de biópsia é muito seguro e de fácil execução, tendo apenas um pequeno risco de sangramento local, controlado caso ocorra. Todos os passos da biópsia seguem os princípios cirúrgicos básicos: controle da infecção (asepsia e antisepsia), controle do sangramento, sutura e uso de medicamentos para dor, inchaço e infecção (antiinflamatório, analgésico e antibiótico) quando necessário.

---

### **Benefícios para o participante**

Para o estabelecimento de um tratamento adequado das lesões de boca, deve-se fazer o exame microscópico para o diagnóstico correto, já que, muitas lesões tem aparência

---

---

clínica semelhante, sendo obrigatório a realização da biópsia. O benefício está na certeza do diagnóstico para aplicação do tratamento próprio para o quadro clínico.

---

### **Compensação**

Não há despesas pessoais para o participante em qualquer fase do estudo, incluindo exames e consultas. Também não há compensação financeira relacionada à sua participação. Se existir qualquer despesa adicional, ela será absorvida pelo orçamento da pesquisa.

---

### **Participação Voluntária/Desistência da Pesquisa**

Sua participação nesta pesquisa é totalmente voluntária, ou seja, você somente participa se quiser.

A não participação na pesquisa não implicará em alterações nos procedimentos realizados dentro do Programa do qual o senhor(a) foi encaminhado, tão pouco mudará a relação da equipe profissional com o mesmo. Após assinar o consentimento, você terá total liberdade de retirá-lo a qualquer momento e deixar de participar da pesquisa se assim o desejar, sem quaisquer prejuízos à continuidade do seu atendimento, diagnóstico, tratamento e acompanhamento na Instituição.

---

### **Utilização de Registros Médicos e Confidencialidade**

Todas as informações colhidas e os resultados dos testes serão analisados em caráter estritamente científico, mantendo-se a confidencialidade (segredo) do paciente a todo o momento, ou seja, em nenhum momento os dados que o identifique serão divulgados, a menos que seja exigido por lei.

Os registros médicos que trazem a sua identificação e esse termo de consentimento assinado poderão ser inspecionados por agências reguladoras e pelo CEP.

Os resultados desta pesquisa poderão ser apresentados em reuniões ou publicações, contudo, sua identidade não será revelada nessas apresentações.

---

### **Quem Devo Entrar em Contato em Caso de Dúvida**

Em qualquer etapa do estudo você terá acesso aos profissionais responsáveis pela pesquisa para esclarecimento de eventuais dúvidas. Os responsáveis pelo estudo nesta instituição são: **Liliana Aparecida Pimenta de Barros e Fabiano de Azevedo Ribeiro** que poderão ser encontrados na **Av. Marechal Campos 1468, Ambulatório 4 do**

---

---

**Curso de Odontologia da Universidade Federal do Espírito Santo (UFES), ou nos telefones (27)33357239(Ambulatório 4)/(27) 33357232(Professores).**

“Caso você tenha dificuldade em entrar em contato com o pesquisador responsável, comunique o fato à Comissão de Ética em Pesquisa pelo telefone (27)33357446.”

---

### **Declaração de Consentimento**

Eu, \_\_\_\_\_, abaixo assinado, concordo em participar da pesquisa intitulada **”Caracterização da expressão molecular da podoplanina e do Ki-67 nas displasias epiteliais e carcinomas de células escamosas orais: análise da transformação maligna”**, como sujeito.

Li e entendi o documento de consentimento e o objetivo da pesquisa, bem como seus benefícios e possíveis riscos. Tive oportunidade de perguntar sobre a pesquisa e todas as minhas dúvidas foram esclarecidas. Entendo que estou livre para decidir não participar desta pesquisa.

Autorizo a utilização dos meus registros médicos (prontuários médicos) pelo pesquisador,

autoridades regulatórias e pelo Comitê de Ética em Pesquisa(CEP) da Instituição.

Vitória, \_\_\_\_ de \_\_\_\_\_ de \_\_\_\_\_.

---

Nome do Voluntário

**APÊNDICE B - Modelo de ficha para coleta de dados.**

Projeto de pesquisa:

**CARACTERIZAÇÃO DA EXPRESSÃO MOLECULAR DA PODOPLANINA E DO KI-67 NAS DISPLASIAS  
EPITELIAIS E CARCINOMAS DE CÉLULAS ESCAMOSAS ORAIS: ANÁLISE DA TRANSFORMAÇÃO MALIGNA**  
Fabiano de Azevedo Ribeiro (responsável), Profª Drª Liliana Aparecida Pimenta de Barros.

**FICHA PARA COLETA DE DADOS**

Nº Registro da Pesquisa: \_\_\_\_\_

**SEXO:** ( ) Masculino ( ) Feminino**IDADE:** \_\_\_\_\_ anos.**RAÇA:** ( ) Branca ( ) Parda ( ) Negra ( ) Indígena ( ) Outra: \_\_\_\_\_**LOCALIZAÇÃO:** \_\_\_\_\_**PROFISSÃO:** \_\_\_\_\_**HÁBITOS****-- TABACO** ( ) Sim ( ) Não ( ) Ex-fumante

Tipo: \_\_\_\_\_

Tempo: \_\_\_\_\_

Quantidade: \_\_\_\_\_

Frequência: \_\_\_\_\_

**-- ÁLCOOL** ( ) Sim ( ) Não ( ) Ex-fumante

Tipo: \_\_\_\_\_

Tempo: \_\_\_\_\_

Quantidade: \_\_\_\_\_

Frequência: \_\_\_\_\_

**-- OUTROS HÁBITOS :** \_\_\_\_\_**-- EXPOSIÇÃO AO SOL:** ( ) Sim ( ) Não

Frequência: \_\_\_\_\_

## ANEXOS

### ANEXO B - Descrição dos dados clínicos dos casos das DOPM de acordo com gênero, idade, cor de pele, localização e fatores de risco

Grupo	Sexo	Idade	Raça	Localização	Tabagismo	Etiolismo	Exposição solar
G1-1	M	46	Branca	Rebordo alveolar inferior direito	S	N	N
G1-2	M	56	Parda	Região mediana de palato duro	N	N	Ni
G1-3	M	31	Branca	Mucosa alveolar inferior esquerda	S	N	Ni
G1-4	M	46	Branca	Rebordo alveolar inferior esquerdo	S	N	Ni
G1-5	M	51	Branca	Labio inferior	Ni	Ni	S
G1-7	F	54	Parda	Trígono retromolar direito	S	N	S
G1-8	F	82	Negra	Tuberosidade maxilar direita	Ex	N	S
G1-9	F	69	Parda	Mucosa jugal direita	S	N	N
G1-10	M	51	Branca	Lateral direita da língua	N	S	N
G1-11	F	51	Branca	Mucosa jugal direita	S	S	N
G1-12	F	51	Parda	Mucosa labial inferior esquerda	Ex	N	N
G1-13	F	54	Parda	Lateral direita de língua	S	N	S
G1-14	M	51	Branca	Lateral esquerda da língua	N	S	N
G1-15	M	51	Branca	Mucosa jugal direita	Ex	S	S
G1-16	F	69	Negra	Região vestibular de tuber	N	N	N
G1-17	M	40	Parda	Região retromolar	S	N	S
G1-18	F	51	Parda	Mucosa jugal direita	Ex	N	N
G1-19	F	54	Parda	Dorso da língua	S	N	S
G1-20	F	54	Parda	Dorso de língua	S	N	S
G1-21	F	93	Parda	Rebordo alveolar superior esquerdo	N	N	N
G1-22	F	69	Negra	Fundo de vestibulo	N	N	N
G1-23	F	66	Branca	Lateral posterior de língua	N	N	N
G1-24	F	53	Parda	Mucosa jugal	Ex	N	N
G1-25	F	93	Parda	Trígono retromolar esquerdo	N	N	N
G1-26	F	66	Branca	Fundo de vestibulo esquerdo	N	N	Ni

Legenda: **Ex:** ex-fumante; **F:** feminino; **M:** masculino; **N:** não; **S:** sim; **Ni:** não informado

**ANEXO C - Diagnóstico clínico e histopatológico das DOPM e de seus tecidos perilesionais de acordo a DEO, segundo critérios da Organização Mundial da Saúde (2005)**

Grupo	Diagnóstico clínico	Histopatológico	
		Lesão	Perilesional
G1-1	Leucoplasia com displasia epitelial leve	DEO Leve	Sem displasia
G1-2	Leucoplasia sem displasia epitelial	Sem displasia	Sem displasia
G1-3	Leucoplasia com displasia epitelial leve	DEO Leve	Sem displasia
G1-4	Leucoplasia com displasia epitelial leve	DEO Leve	Sem displasia
G1-5	Queilite actínica com displasia epitelial leve	DEO Moderada	Sem displasia
G1-7	Leucoplasia com discreta displasia	DEO Leve	Sem displasia
G1-8	Leucoplasia sem displasia	Sem displasia	Sem displasia
G1-9	Leucoplasia sem displasia	Sem displasia	Sem displasia
G1-10	Leucoplasia com discreta displasia epitelial	DEO Leve	Sem displasia
G1-11	Leucoplasia sem displasia epitelial	Sem displasia	Sem displasia
G1-12	Leucoplasia verrucosa proliferativa	DEO Moderada	DEO Leve
G1-13	Leucoplasia com displasia severa	DEO Severa	DEO Moderada
G1-14	Leucoplasia sem displasia epitelial	Sem displasia	Sem displasia
G1-15	Leucoplasia com displasia epitelial leve	DEO Leve	DEO Leve
G1-16	Leucoplasia sem displasia	Sem displasia	Sem displasia
G1-17	Leucoplasia sem displasia epitelial	Sem displasia	Sem displasia
G1-18	Leucoplasia verrucosa proliferativa	DEO Moderada	DEO Leve
G1-19	Leucoplasia verrucosa proliferativa	DEO Moderada	DEO Leve
G1-20	Leucoplasia verrucosa proliferativa	DEO Leve	Sem displasia
G1-21	Leucoplasia verrucosa proliferativa	Sem displasia	Sem displasia
G1-22	Leucoplasia verrucosa proliferativa	Sem displasia	Sem displasia
G1-23	Leucoplasia verrucosa proliferativa	DEO Moderada	Sem displasia
G1-24	Leucoplasia verrucosa proliferativa	DEO Severa	DEO Leve
G1-25	Leucoplasia verrucosa proliferativa	DEO Leve	Sem displasia
G1-26	Leucoplasia verrucosa proliferativa	Sem displasia	Sem displasia

Legenda: **DEO**: displasia epitelial oral.

**ANEXO D - Descrição dos dados clínicos dos casos de CCEO de acordo com gênero, idade, cor de pele e localização**

<b>Grupo</b>	<b>Sexo</b>	<b>Idade</b>	<b>Raça</b>	<b>Localização</b>	<b>Tabagismo</b>	<b>Etiolismo</b>	<b>Exposição solar</b>
<b>G2-1</b>	F	60	Branca	Lateral direita de língua	N	N	Ni
<b>G2-2</b>	M	60	Negra	Mucosa jugal direita	Ex	N	Ni
<b>G2-3</b>	F	66	Branca	Lateral esquerda de língua	N	N	N
<b>G2-4</b>	F	77	Branca	Lateral esquerda de língua	N	N	N
<b>G2-5</b>	M	46	Branca	Assoalho de boca	S	N	S
<b>G2-6</b>	M	78	Branca	Ventre direito de língua	Ni	Ni	Ni
<b>G2-7</b>	M	77	Branca	Lábio inferior esquerdo	N	N	S
<b>G2-8</b>	M	58	Parda	Lateral esquerda de língua	Ex	N	Ni
<b>G2-9</b>	M		Branca	Rebordo anterior lingual	S	N	S
<b>G2-10</b>	M	60	Negra	Lateral esquerda de língua	S	N	N

Legenda: **Ex:** ex-fumante; **F:** feminino; **M:** masculino; **N:** não; **S:** sim; **Ni:** não informado

**ANEXO E - Análise descritiva da marcação imuno-histoquímica do Ki-67 e do D2-40 nas DOPM e tecidos perilesionais**

Grupo	Histológico			Topográfico			
	Diagnóstico	Lesão	Perilesional	Ki-67 lesão	D2-40 lesão	Ki-67 margem	D2-40 margem
G1-1	Leucoplasia com DEO leve	Leve	Sem displasia	PB	B	B	0
G1-2	Leucoplasia sem displasia epitelial	Sem displasia	Sem displasia	PB	0	B	0
G1-3	Leucoplasia com DEO leve	Leve	Sem displasia	SB	B	SB	0
G1-4	Leucoplasia com DEO leve	Leve	Sem displasia	SB	B	PB	B
G1-5	Queilite actínica com DEO leve	Moderada	Sem displasia	SB	PB	PB	0
G1-7	Leucoplasia com DEO leve	Leve	Sem displasia	PB	B	SB	B
G1-8	Leucoplasia sem displasia epitelial	Sem displasia	Sem displasia	PB	B	SB	B
G1-9	Leucoplasia sem displasia	Sem displasia	Sem displasia	PB	SB	SB	B
G1-10	Leucoplasia com DEO leve	Leve	Sem displasia	B	0	B	0
G1-11	Leucoplasia sem displasia epitelial	Sem displasia	Sem displasia	PB	0	B	B
G1-12	Leucoplasia verrucosa proliferativa	Moderada	Leve	SB	SB	B	0
G1-13	Leucoplasia com DEO severa	Severa	Moderada	SB	SB	SB	B
G1-14	Leucoplasia sem displasia epitelial	Sem displasia	Sem displasia	SB	0	SB	0
G1-15	Leucoplasia com DEO leve	Leve	Leve	PB	B	PB	B
G1-16	Leucoplasia sem displasia epitelial	Sem displasia	Sem displasia	SB	B	SB	B
G1-17	Leucoplasia sem displasia epitelial	Sem displasia	Sem displasia	PB	B	PB	0
G1-18	Leucoplasia verrucosa proliferativa	Moderada	Leve	SB	SB	SB	B
G1-19	Leucoplasia verrucosa proliferativa	Moderada	Leve	SB	SB	PB	B
G1-20	Leucoplasia verrucosa proliferativa	Leve	Sem displasia	PB	PB	PB	0

<b>G1-21</b>	<b>Leucoplasia verrucosa proliferativa</b>	<b>Sem displasia</b>	<b>Sem displasia</b>	<b>PB</b>	<b>B</b>	<b>B</b>	<b>0</b>
<b>G1-22</b>	<b>Leucoplasia verrucosa proliferativa</b>	<b>Sem displasia</b>	<b>Sem displasia</b>	<b>PB</b>	<b>SB</b>	<b>PB</b>	<b>B</b>
<b>G1-23</b>	<b>Leucoplasia verrucosa proliferativa</b>	<b>Moderada</b>	<b>Sem displasia</b>	<b>PB</b>	<b>PB</b>	<b>PB</b>	<b>B</b>
<b>G1-24</b>	<b>Leucoplasia verrucosa proliferativa</b>	<b>Severa</b>	<b>Leve</b>	<b>PB</b>	<b>SB</b>	<b>PB</b>	<b>B</b>
<b>G1-25</b>	<b>Leucoplasia verrucosa proliferativa</b>	<b>Leve</b>	<b>Sem displasia</b>	<b>B</b>	<b>B</b>	<b>PB</b>	<b>0</b>
<b>G1-26</b>	<b>Leucoplasia verrucosa proliferativa</b>	<b>Sem displasia</b>	<b>Sem displasia</b>	<b>PB</b>	<b>B</b>	<b>B</b>	<b>0</b>

Legenda: **DEO**: displasia epitelial oral; **0**: ausente; **B**: basal; **PB**: parabasal; **SP**: suprabasal.

**ANEXO F - Análise descritiva da marcação imuno-histoquímica do Ki-67 e D2-40 nos CCEO e seus tecidos peritumorais**

Grupo	Histológico			Topográfico			
	Diagnóstico	Lesão	Peri-lesional	Ki-67 lesão	D2-40 lesão	Ki-67 margem	D2-40 margem
G2-1	CCEO BD	BD	DEO moderada	Cordões	Cordões	SB	SB
G2-2	CCEO MD	MD	DEO leve	Periferia dos ninhos	Periferia dos ninhos	SB	B
G2-3	CCEO BD	BD	DE severa	Periferia dos ninhos	Periferia dos ninhos	SB	B
G2-4	CCEO MD	MD	DEO Severa	Células isoladas	Células isoladas	SB	B
G2-5	CCEO MD	MD	DEO severa	Periferia dos ninhos	Periferia dos ninhos	SB	B
G2-6	CCEO BD	BD	DEO moderada	Periferia dos ninhos	Periferia dos ninhos	SB	B
G2-7	CCEO MD	MD	DEO leve	Periferia dos ninhos	Periferia dos ninhos	PB	SB
G2-8	CCEO MD	MD	DEO severa	Cordões	Cordões	SB	B
G2-9	CCEO MD	MD	DEO severa	Periferia dos ninhos	Periferia dos ninhos	SB	B
G2-10	CCEO MD	MD	DEO leve	Periferia dos ninhos	Periferia dos ninhos	SB	B

Legenda: **CCEO**: carcinoma de células escamosas oral; **DEO**: displasia epitelial oral; **BD**: bem diferenciado; **MD**: moderadamente diferenciado; **A**: ausente; **B**: basal; **PB**: parabasal; **SP**: suprabaasal.

**ANEXO G - Análise dos graus de DEO e da malignidade do CCEO com as expressões qualitativas de Ki-67 e PDPN nas lesões e nos tecidos perilesionais**

**DPOM LESÃO**

		Valor p*
Ki 67 lesão	Sem displasia	
	Leve	<b>0.001</b>
	Moderada	
	Severa	
PDPN lesão	Sem displasia	
	Leve	<b>0.000</b>
	Moderada	
	Severa	
Ki-67 margem	Sem displasia	
	Leve	0.080
	Moderada	
	Severa	
PDPN margem	Sem displasia	
	Leve	0.999
	Moderada	
	Severa	

\*. Teste de Kruskal-Wallis.

**DPOM MARGEM**

		Valor p*
Ki 67 lesão	Sem displasia	
	Leve	<b>0.006</b>
	Moderada	
PDPN lesão	Sem displasia	
	Leve	<b>0.005</b>
	Moderada	
Ki-67 margem	Sem displasia	
	Leve	<b>0.000</b>
	Moderada	
PDPN margem	Sem displasia	
	Leve	0.854
	Moderada	

\*. Teste de Kruskal-Wallis.

**CCEO LESÃO**

		Valor p
Ki 67 lesão	Moderadamente diferenciada	<b>0.008</b>
	Bem diferenciado	
PDPN lesão	Moderadamente diferenciada	0.789
	Bem diferenciado	
Ki-67 margem	Moderadamente diferenciada	0.789
	Bem diferenciado	
PDPN margem	Moderadamente diferenciada	0.127
	Bem diferenciado	

\*. Teste de Mann-Whitney.

**CCEO MARGEM**

		Valor p*
Ki 67 lesão	Leve	<b>0.028</b>
	Moderada	
	Severa	
PDPN lesão	Leve	0.999
	Moderada	
	Severa	
Ki-67 margem	Leve	0.714
	Moderada	
	Severa	
PDPN margem	Leve	0.200
	Moderada	
	Severa	

\*. Teste de Kruskal-Wallis.

## ANEXO H - Análise entre os dados clínicos e a expressão qualitativa do Ki-67 e PDPN nas DOPM e os tecidos perilesionais

		Ki-67 lesão	PDPN lesão	Ki-67 margem	PDPN margem
		Valor p	Valor p	Valor p	Valor p
Sexo <sup>a</sup>	Masculino	<b>0.022</b>	0.123	0.999	0.999
	Feminino				
Faixa etária <sup>a</sup>	<= 50	0.269	0.549	0.999	0.999
	> 50				
Raça <sup>b</sup>	Branca	0.153	0.291	0.999	0.120
	Negra				
	Parda				
DOPM	Localização	0.764	0.269	0.923	0.867
	Lábio				
	Lingua				
	Mucosa alveolar				
	Mucosa jugal				
	Mucosa labial				
	Palato duro				
	Rebordo alveolar				
	Trigonoretromolar				
	Tuber				
Tabagismo <sup>b</sup>	Sim	0.340	0.584	0.999	0.583
	Não				
Ex-fumante	Sim	0.262	0.544	0.999	0.999
	Não				
Exposição solar <sup>a</sup>	Sim	0.656	0.999	0.381	0.999
	Não				

<sup>a</sup>. Teste de Mann-Whitney.

<sup>b</sup>. Teste de Kruskal-Wallis.

## ANEXO I - Análise entre os dados clínicos e a expressão qualitativa do Ki-67 e D2-40 nos CCEO e os tecidos peritumorais

		Ki-67 lesão	PDPN lesão	Ki-67 margem	PDPN margem	
		Valor p	Valor p	Valor p	Valor p	
CCEO	Sexo <sup>a</sup>	Masculino	0.292	0.500	0.200	0.300
		Feminino				
	Faixa etária <sup>a</sup>	<= 50	0.800	0.400	0.999	0.999
		> 50				
	Raça <sup>b</sup>	Branca	0.414	0.999	0.999	0.999
		Negra				
		Parda				
	Localização	Assoalho de boca				
		Lábio				
		Língua	0.595	0.497	0.119	0.955
		Mucosa jugal				
		Rebordo alveolar				
	Tabagismo <sup>b</sup>	Sim				
		Não	0.730	0.524	0.999	0.999
		Ex-fumante				
	Etilismo <sup>a</sup>	Sim	-	-	-	-
	Não					
Exposição solar <sup>a</sup>	Sim	0.999	0.999	0.400	0.999	
	Não					

<sup>a</sup>. Teste de Mann-Whitney.

<sup>b</sup>. Teste de Kruskal-Wallis.

**ANEXO J** - Registro dos escores do Ki-67 e D2-40 nas DOPM e tecido perilesional

Grupo	HISTOLÓGICO			SEMI-QUANTITATIVO			
	Diagnóstico	Lesão	Perilesional	Ki 67 lesão	PDPN lesão	Ki-67 margem	PDPN margem
G1-1	Leucoplasia com deo leve	Leve	Sem displasia	1	1	1	1
G1-2	Leucoplasia sem displasia epitelial	Sem displasia	Sem displasia	1	1	1	1
G1-3	Leucoplasia com DEO leve	Leve	Sem displasia	1	1	1	1
G1-4	Leucoplasia com DEO leve	Leve	Sem displasia	1	1	1	1
G1-5	Queilite actínica DEO leve	Moderada	Sem displasia	1	1	1	1
G1-7	Leucoplasia com DEO leve	Leve	Sem displasia	1	1	1	1
G1-8	Leucoplasia sem displasia	Sem displasia	Sem displasia	1	1	1	1
G1-9	Leucoplasia sem displasia	Sem displasia	Sem displasia	1	1	1	1
G1-10	Leucoplasia com DEO leve	Leve	Sem displasia	1	1	1	1
G1-11	Leucoplasia sem displasia epitelial	Sem displasia	Sem displasia	1	1	1	1
G1-12	Leucoplasia verrucosa proliferativa	Moderada	Leve	2	2	1	1
G1-13	Leucoplasia com DEO severa	Severa	Moderada	2	2	2	1
G1-14	Leucoplasia sem displasia epitelial	Sem displasia	Sem displasia	1	1	1	1
G1-15	Leucoplasia com DEO leve	Leve	Leve	1	1	1	1
G1-16	Leucoplasia sem displasia epitelial	Sem displasia	Sem displasia	1	1	1	1
G1-17	Leucoplasia sem displasia epitelial	Sem displasia	Sem displasia	1	1	1	1
G1-18	Leucoplasia verrucosa proliferativa	Moderada	Leve	2	2	1	1
G1-19	Leucoplasia verrucosa proliferativa	Moderada	Leve	2	2	1	1
G1-20	Leucoplasia verrucosa proliferativa	Leve	Sem displasia	1	1	1	1

<b>G1-21</b>	<b>Leucoplasia verrucosa proliferativa</b>	<b>Sem displasia</b>	<b>Sem displasia</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>G1-22</b>	<b>Leucoplasia verrucosa proliferativa</b>	<b>Sem displasia</b>	<b>Sem displasia</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>2</b>
<b>G1-23</b>	<b>Leucoplasia verrucosa proliferativa</b>	<b>Moderada</b>	<b>Sem displasia</b>	<b>2</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>G1-24</b>	<b>Leucoplasia verrucosa proliferativa</b>	<b>Severa</b>	<b>Leve</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>G1-25</b>	<b>Leucoplasia verrucosa proliferativa</b>	<b>Leve</b>	<b>Sem displasia</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>
<b>G1-26</b>	<b>Leucoplasia verrucosa proliferativa</b>	<b>Sem displasia</b>	<b>Sem displasia</b>	<b>2</b>	<b>1</b>	<b>1</b>	<b>1</b>

Legenda: **DEO**: displasia epitelial oral.

**ANEXO K** - Registro dos escores do Ki-67 e D2-40 nas CCEO e seus respectivos tecidos peritumorais

Grupo	HISTOLÓGICO			SEMI-QUANTITATIVO			
	Diagnóstico	Lesão	Peri-lesional	Ki 67 lesão	PDPN lesão	Ki-67 margem	PDPN margem
G2-1	CCEO Bem diferenciado	Bem diferenciado	DEO moderada	1	2	2	2
G2-2	CCEO Moderadamente diferenciado	Moderadamente diferenciado	DEO leve	3	1	1	1
G2-3	CCEO Bem diferenciado	Bem diferenciado	DE severa	1	1	2	1
G2-4	CCEO Moderadamente diferenciado	Moderadamente diferenciado	DEO Severa	3	2	2	1
G2-5	CCEO Moderadamente diferenciado	Moderadamente diferenciado	DEO severa	3	2	2	1
G2-6	CCEO Bem diferenciado	Bem diferenciado	DEO moderada	1	1	1	1
G2-7	CCEO Moderadamente diferenciado	Moderadamente diferenciado	DEO leve	3	1	1	1
G2-8	CCEO Moderadamente diferenciado	Moderadamente diferenciado	DEO severa	2	1	2	1
G2-9	CCEO Moderadamente diferenciado	Moderadamente diferenciado	DEO severa	2	1	1	1
G2-10	CCEO Moderadamente diferenciado	Moderadamente diferenciado	DEO leve	3	2	2	1

Legenda: **CCEO**: carcinoma de células escamosas oral; **DEO**: displasia epitelial oral.

**ANEXO L:** Correlação da expressão do Ki-67 e PDPN nas lesões e suas margens clinicamente sadias.

<b>DOPM</b>		
	PDPN (lesão)	PDPN (margem)
<b>Ki-67 (lesão)</b>	0.386	-
<b>Ki-67 (margem)</b>	-	0.447

(-) Não realizado.

Correlação de Spearman.

<b>CCEO</b>		
	PDPN (lesão)	PDPN (margem)
<b>Ki-67 (lesão)</b>	0.000	-
<b>Ki-67 (margem)</b>	-	0.843

(-) Não realizado.

Correlação de Spearman.

