VIVIAN CUNHA GALLETTA KERN

Leucoplasia oral:
tratamento cirúrgico com *laser* de CO_2 e de diodo
e análise por imuno-histoquímica da expressão de proteínas
relacionadas à carcinogênese (p53, COX-2 e EGFR)

São Paulo
2010

VIVIAN CUNHA GALLETTA KERN

Leucoplasia oral:

tratamento cirúrgico com *laser* de CO_2 e de diodo

e análise por imuno-histoquímica da expressão de proteínas

relacionadas à carcinogênese (p53, COX-2 e EGFR)

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Odontologia

Área de Concentração: Diagnóstico Bucal

Orientador: Prof. Dr. Dante Antonio Migliari

São Paulo

2010

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catalogação da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Kern, Vivian Cunha Galletta

Leucoplasia oral: tratamento cirúrgico com *laser* de CO_2 e de diodo e análise por imuno-histoquímica da expressão de proteínas relacionadas à carcinogênese (p53, COX-2 e EGFR) / Vivian Cunha Galletta Kern; orientador Dante Antonio Migliari. -- São Paulo, 2010.

89p. : fig., tab.; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Diagnóstico Bucal -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Leucoplasia bucal – Tratamento cirúrgico – Lasers. 2. Carcinogênese bucal. 3. Marcadores biológicos de tumor. I. Migliari, Dante Antonio. II. Título.

CDD 617.63

BLACK D65

FOLHA DE APROVAÇÃO

Kern VCG. Leucoplasia oral: tratamento cirúrgico com *laser* de CO_2 e de diodo e análise por imuno-histoquímica da expressão de proteínas relacionadas à carcinogênese (p53, COX-2 e EGFR). Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Odontologia.

Aprovado em: / /

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a)._____Instituição: _____

Julgamento: _____Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a)._____Instituição: _____

Julgamento: _____Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a)._____Instituição: _____

Julgamento: _____Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a)._____Instituição: _____

Julgamento: _____Assinatura: _____

Prof(a). Dr(a)._____Instituição: _____

Julgamento: _____Assinatura: _____

Aos meus pais, **Silvia** e **Paulo Galletta**, pelo exemplo de dedicação ao estudo e ao trabalho, e pelo permantente estímulo e apoio às minhas atividades acadêmicas.

Aos meus avôs **Liete** e **José Meinberg**, **Leonor** e **Domingos Galletta**, por terem sido ao longo de suas vidas pessoas verdadeiramente altruístas, modelos que tento seguir.

A meu marido, **Jorge Kern**, pelo amor, compreensão, paciência e o apoio durante este período em que muitas vezes preteri nossa vida particular para poder concluir este trabalho.

Ao meu irmão **Gilberto Galletta** e à **Inês Dias**, por compartilharem este e outros momentos importantes de minha formação pessoal e profissional.

Aos meus **pacientes**, pelo carinho e por permitirem o meu aprendizado, científico e humano.

AGRADECIMENTOS

Aos colegas da disciplina de Estomatologia Clínica, em especial, Alessandra Rodrigues de Camargo, Ana Cláudia Luiz, Ana Paula Candido dos Santos, Ângela Miura, Anna Torrezani, Bianca Freo, Camila de Barros Gallo, Carina Domaneschi, Erica Fernanda Patrício da Silva, Gabriela Artico, Ingrid Schneider, Silvio Hirota, Vivian Pellegrini, pela amizade e pelo companheirismo durante os anos que trabalhamos juntos.

Aos professores da disciplina de Estomatologia Clínica, Andréa Lusvarghi Witzel, Celso Augusto Lemos Jr., Fábio Abreu Alves, Fernando Xavier Silveira, Ester Goldenberg Birman e Norberto Nobuo Sugaya, por compartilhar conhecimento, e contribuir para meu desenvolvimento como clínica e aspirante a pesquisadora.

Às funcionárias do departamento de Estomatologia, em especial, à Cecília Muniz, Cida Andrade, Iracema Mascarenhas, Néia dos Santos e Zilda, pela convivência e pelo trabalho dedicado à pós-graduação.

Aos colegas da disciplina de Patologia Bucal, em especial a Alexandra Fontes da Costa, Brunno Santos de Freitas Silva e Renata Acay, pela orientação e apoio durante as atividades laboratoriais e à Flávia Caló pela contribuição expressiva na análise das reações deste trabalho.

Às técnicas do laboratório de Patologia Bucal, Elisa Santos e Beatriz (Bia) Costa, por me acompanharem pacientemente durante a realização dos procedimentos laboratoriais necessários para o desenvolvimento deste estudo, desde a silanização das lâminas, inclusão dos blocos, corte dos espécimes até as reações de imuno-histoquímica.

Aos professores da disciplina de Patologia Oral, em especial, a Prof.ª Suzana Castanhede Orsini Machado de Sousa por permitir a realização da investigação laboratorial deste trabalho.

Às colegas de pós-graduação, Tatiana Toporcov e Kazue Kanegani, pela realização dos testes estatísticos e pela contribuição na interpretação dos resultados do trabalho.

Às funcionárias do Laboratório Especial de *Lasers* em Odontologia (LELO), Liliane Souza e Eugênia (Gê) Pereira Brandão, pela dedicação com a qual contribuíram para o desenvolvimento de nosso trabalho no LELO.

Às professoras da disciplina de Dentística, Ana Cecília Aranha e Patrícia Freitas, por me receberem no LELO há 6 anos, e pela colaboração com o desenvolvimento do protocolo de *lasers* em Estomatologia.

Ao professor Carlos de Paula Eduardo por ter me concedido a oportunidade de fazer parte da equipe do LELO, uma experiência essencial em minha formação profissional, e por estar disponível a investir em novas idéias e conceitos, contribuindo para a renovação da prática na clínica odontológica.

À professora da disciplina de Cirurgia Maria Cristina Zindel Delboni, por abrir as portas da clínica de pós-graduação, possibilitando a coleta de material dos pacientes atendidos naquele ambulatório, e pela conduta ética com a qual me recebeu.

À professora da disciplina de Patologia Geral, Luciana Corrêa, pela cooperação neste e em outros trabalhos, por meio de um diálogo aberto, elucidativo, contribuindo com meu crescimento acadêmico.

À professora do Mestrado Profissionalizante de *Lasers* em Odontologia e amiga Luciane Hiramatsu Azevedo, minha eterna gratidão pela convivência clínica e científica, pelo incentivo permanente com o qual me estimulou a buscar aperfeiçoamento profissional e pessoal.

Ao professor Fábio Daumas Nunes, por concordar com a realização deste trabalho em cooperação com a disciplina de Patologia Bucal e por ter acompanhando de perto minhas atividades clínicas, participando ativamente do trabalho.

Ao meu orientador, Prof. Dante Antonio Migliari, pela dedicação à minha orientação na prática clínica e na redação de artigos científicos, desde meu ingresso como estagiária na disciplina de Estomatologia Clínica até a conclusão deste trabalho e por haver transmitido os valores éticos de conduta clínica e acadêmica que tento seguir em minha vida profissional.

“*Any intelligent fool can make things bigger, more complex, and more violent.*

It takes a touch of genius -- and a lot of courage -- to move in the opposite direction”

Albert Einstein

Kern VCG. Leucoplasia oral: tratamento cirúrgico com *laser* de CO_2 e de diodo e análise por imuno-histoquímica da expressão de proteínas relacionadas à carcinogênese (p53, COX-2 e EGFR). [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2010.

RESUMO

Leucoplasia oral (LO) é uma lesão potencialmente maligna, definida como uma placa branca que não pode ser caracterizada como outra doença da mucosa oral. Dentro de certo consenso, as LOs devem ser tratadas, mas nenhum tratamento disponível tem a capacidade de prevenir a transformação maligna. Este trabalho teve como objetivo avaliar a eficácia do tratamento cirúrgico das LOs por *lasers* de CO_2 e diodo e verificar a ocorrência de desfechos clínicos de recidivas, desenvolvimento de novas lesões ou transformação maligna após o tratamento. Adicionalmente foi realizado estudo imunohistoquímico em material biopsiado das lesões e em tecido normal gengival (grupo controle). Fatores reconhecidamente de risco como hábitos nocivos (álcool e tabagismo), características clínicas das lesões, grau de displasia, bem como a expressão dos anticorpos investigados, foram analisados e relacionados com a ocorrência de desfechos clínicos em 40 pacientes atendidos no ambulatório de Estomatologia Clínica. Os cortes histológicos das lesões foram classificados de acordo com o grau de displasia e com um sistema binário, e subsequentemente foram testados para os anticorpos anti-p53, anti-COX-2 e anti-EGFR através de reação imuno-histoquímica. Análise de Kaplan-Meier, seguida do teste de log-rank e análise de regressão de Cox avaliaram a ocorrência de recorrência, desenvolvimento de novas lesões e transformação maligna e possíveis fatores relacionados com esses desfechos clínicos. Teste de *odds ratio* e de x^2 avaliaram a expressão dos anticorpos investigados em LOs e grupo controle. Pacientes com LO apresentaram idade média de 60,5 anos e a relação homem/mulher foi de 1,35:1. Hábitos de tabagismo e etilismo foram prevalentes em homens. A maior parte das lesões era < 2 cm (57,1%), tinha aspecto homogêneo (67,3%) e displasia epitelial (61,2%); apenas 7 lesões eram de “alto risco” (sistema binário). Desfechos clínicos de recorrência, desenvolvimento de novas lesões ou transformação maligna foram observados em 37,5% dos pacientes; 2 pacientes

desenvolveram malignidade em sítios distintos da LO inicial. Análise estatística mostrou associação entre desfecho de recorrência e lesões de alto risco, e entre desfecho de desenvolvimento de novas lesões e mulheres acima de 60 anos. Os anticorpos p53 e COX-2 foram mais expressos em LOs que no grupo controle, mas a expressão de nenhum anticorpo foi relacionada com os desfechos clínicos avaliados. O tratamento por *lasers* de alta potência (CO_2 e diodo) mostrou-se eficiente na remoção das lesões, embora não tenha evitado desfechos clínicos de recorrência, desenvolvimento de novas lesões e transformação maligna. Lesões de alto risco e mulheres acima de 60 anos constituíram fatores de risco aos desfechos clínicos, enquanto os anticorpos analisados não foram eficientes para prognosticar a evolução das LOs.

Palavras-Chave: Leucoplasia bucal. Marcadores biológicos. Ciclooxigenase 2. Receptor do fator de crescimento epidérmico. Proteína supressora de tumor p53. Análise de sobrevida.

Kern VCG. Oral leukoplakia: surgical treatment with CO_2 and diode lasers and analysis of the expression of proteins related to carcinogenesis (p53, COX-2 e EGFR) by immunohistochemistry [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2010.

ABSTRACT

Oral leukoplakia (OL) is a potentially malignant lesion, defined as a white patch that cannot be characterized as any other disease of the oral mucosa. In general, OL should be treated; however no treatment available has been able to prevent malignant transformation. The aim of this study was to evaluate the efficacy of surgical treatment with CO_2 and diode lasers in 40 patients with OL and the occurrence of clinical outcomes of recurrence, development of new lesions or malignant transformation, after treatment. Additionally, an immunohistochemistry study was performed in OL biopsy-specimen and in gingival normal tissue (control group). Recognized risk factors such as habits (alcohol and tobacco), clinical characteristics of lesions, grade of dysplasia, as well as the expression of immunohistochemistry reaction were analyzed. Histological slides of lesions were classified according to the grade of dysplasia and a binary system, and subsequently tested for the anti-p53, anti-COX-2 and anti-EGFR antibodies by immunohistochemistry assay. Kaplan-Meier analysis along with log-rank test and Cox regression analysis were used to assess the occurrence of clinical outcomes and the association with risk factors. Odds ratio and x^2 tests evaluated the expression of the investigated antibodies in OLs and in the control group. Patients with OL had a mean age of 60.5 years and the men/women ratio was of 1.35:1. Smoking and alcohol habits were more prevalent among men than in women. Lesions were clinically characterized as measuring less than 2 cm (57.1%), with a homogenous aspect (67.3%) and histologically with epithelial dysplasia (61.2%); only 7 lesions were classified as of high-risk (binary system). Clinical outcomes (recurrence, development of new lesions and malignant transformation) were observed in 37.5% patients; 2 patients developed malignancy in areas distant from the initial OL site. Statistical analysis showed association between recurrence and high-risk lesions, and between development of new lesions and women over 60 years old. Anti-P53 and anti-COX-2

antibodies were more expressed among OL than in the control group, but no antibody expression was related to the clinical outcomes analyzed. Surgical treatment with high-power lasers (CO_2 and diode) showed to be efficient in the removal of OL lesions, but it did not avoid clinical outcomes of recurrence, development of new lesions and malignant transformation. High-risk lesions and women over 60 years old constituted risk factors for the clinical outcomes, while the analized antibodies were not usefull markers to characterize OL lesions with higher risk of malignancy.

Keywords: Oral leukoplakia. Biological markers. Ciclooxygenase 2. Epidermal growth factor receptor. Tumor suppressor protein p53. Survival analysis.

LISTA DE FIGURAS

Figura 5.1 - Curva de Kaplan-Meier para os desfechos em conjunto (recorrência, nova lesão ou transformação maligna) 50

Figura 5.2 - Curva de Kaplan-Meier para o desfecho de recorrência.....50

Figura 5.3 - Curva de Kaplan-Meier para o desfecho de novas lesões.....51

Figura 5.4 - Curva de Kaplan-Meier dos grupos de pacientes apresentando lesões iniciais de alto ou baixo risco, para os desfechos em conjunto (recorrência, desenvolvimento de novas lesões ou transformação maligna) (A) e para o desfecho de recorrência isoladamente (B) 52

Figura 5.5 - Curva de Kaplan-Meier dos grupos de pacientes para o desfecho de desenvolvimento de novas lesões de acordo com o gênero (A) e a idade (B) 53

Figura 5.6 - Padrão de marcação do anticorpo anti-p53 nas LOs (A) e no grupo controle (B) (aumento de 100 x) 57

Figura 5.7 - Padrão de marcação do anticorpo anti-COX-2 nas LOs (A) e no grupo controle (B) (aumento de 100 x); em detalhe pode-se observar marcação citoplasmática de células epiteliais na camada basal, parabasal e espinhosa (aumento de 400 x) 57

Figura 5.8 - Padrão de marcação do anticorpo anti-EGFR S (A) e anti-EGFR SM (B) no grupo controle (aumento de 100 x); nota-se a expressão dos dois clones nos mesmos estratos do epitélio (camada basal) 58

Figura 5.9 - Padrão de marcação do anticorpo anti-EGFR S e anti-EGFR SM no grupo de LOs (aumento de 100 x); nota-se a expressão do anti-EGFR S restrito à camada basal (A), enquanto a expressão do anti-EGFR SM se estende até camada espinhosa (B) 58

LISTA DE TABELAS

Tabela 4.1 - Critérios citológicos e arquiteturais utilizados para a classificação binária 39

Tabela 4.2 - Fatores considerados para análise estatística 43

Tabela 5.1 - Idade e hábitos de risco (fumo e álcool) de acordo com o gênero de pacientes com LO, atendidos na Clínica de Estomatologia de 2003 a 2009 45

Tabela 5.2 - Características clínicas (tipo e tamanho) de acordo com a localização das LO (n=49) 46

Tabela 5.3 - Detalhamento de características clínicas e histológicas de pacientes com LO que tiveram desfechos de recorrência, desenvolvimento de novas lesões ou transformação maligna 49

Tabela 5.4 - Análise de regressão univariada de Cox para desfechos clínicos em conjunto (recorrência, desenvolvimento de novas lesões e transformação maligna) 54

Tabela 5.5 - Análise de regressão multivariada de Cox para desfechos clínicos em conjunto (recorrência, desenvolvimento de novas lesões e transformação maligna) 54

Tabela 5.6 - Análise de regressão univariada de Cox para o desfecho clínico de recorrência 55

Tabela 5.7 - Análise de regressão univariada de Cox para o desfecho clínico de desenvolvimento de novas lesões 56

Tabela 5.8 - Análise de regressão multivariada de Cox para o desfecho clínico de desenvolvimento de novas lesões 56

Tabela 5.9 - Distribuição da marcação dos anticorpos nos grupos de pacientes com LO e grupo controle 60

Tabela 5.10 -Distribuição da marcação dos anticorpos nos grupos de pacientes de LO com desfecho clínico e sem desfecho clínico.....60

Tabela 5.11 -Distribuição da marcação dos anticorpos de acordo com a classificação binária 61

Tabela 5.12 -Distribuição da marcação dos anticorpos de acordo com a classificação da displasia (OMS, 2005).....61

Tabela 5.13 -Distribuição da marcação das proteínas EGRF S e EGFR SM entre as lesões leucoplásicas 62

Tabela 5.14 -Distribuição da marcação das proteínas EGRF S e EGFR SM entre espécimes do grupo controle 62

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

AgNOR	silver-stainable nucleolar organizer region (região organizadora nucleolar corada por prata)
COX-2	ciclo-oxigenase 2
EGFR	epidermal growth factor receptor (receptor do fator de crescimento epidérmico)
HPV	human papilloma virus (papiloma vírus humano)
IC	intervalo de confiança
LO	leucoplasia oral
Mm	milímetro
Ml	mililitro
nm	nanômetro
OMS	Organização Mundial da Saúde
PAS	periodic acid shiff
PG	prostraglandina
p53	proteína supressora de tumor p53
S	tipo selvagem
SIL	squamous intraepithelial lesions (lesões escamosas intra-epiteliais)
SIN	squamous intraepithelial neoplasia (neoplasia escamosa intra-epitelial)
SM	tipo selvagem e mutante

SUMÁRIO

p.

1 INTRODUÇÃO 17
2 REVISÃO DA LITERATURA 21
2.1 LEUCOPLASIA ORAL: PREVALÊNCIA E FATORES ASSOCIADOS A SUA ETIOLOGIA 21
2.2 FATORES ASSOCIADOS À TRANSFORMAÇÃO MALIGNA DAS LEUCOPLASIAS ORAIS 24
2.3 PROCEDIMENTO DE BIÓPSIA E AZUL DE TOLUIDINA 27
2.4 TRATAMENTO DA LEUCOPLASIA ORAL 27
2.4.1 Modalidades terapêuticas 27
2.4.2 Tratamento cirúrgico com *lasers* de CO_2 e de diodo 28
2.5 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA LEUCOPLASIA ORAL E USO DE MARCADORES MOLECULARES 30
2.5.1 Grau de displasia e classificação binária 30
2.5.2 Marcadores moleculares p53, COX-2 e EGFR 31
2.5.3 Justificativa deste estudo 34
3 PROPOSIÇÃO 36
4 CASUÍSTICA - MATERIAL E MÉTODOS 37
4.1 CASUÍSTICA 37
4.2 MÉTODO 37
4.2.1 Critérios de diagnóstico da LO 37
4.2.2 Anamnese, exame clínico e procedimento de biópsia 38
4.2.3 Análise histopatológica, grau de displasia e classificação binária 38
4.2.4 Expressão de marcadores imuno-histoquímicos 39
4.2.4.1 Reações de imuno-histoquímica 39
4.2.4.2 Análise da expressão dos anticorpos 41
4.2.5 Tratamento cirúrgico com *laser* de alta potência 42
4.2.6 Desfechos clínicos pós-tratamento cirúrgico dos pacientes 42
4.2.7 Análise estatística 43

4.2.7.1 Curva de Kaplan-Meier, log-rank e análise de regressão de Cox para análise de desfechos clínicos 43
4.2.7.2 *Odds ratio* e x^2 para análise da expressão dos marcadores imuno-histoquímicos 44
5 RESULTADOS 45
5.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E HÁBITOS 45
5.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DAS LOS 46
5.3 TRATAMENTO CIRÚRGICO COM *LASER* DE ALTA POTÊNCIA 46
5.4 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA 47
5.5 DESFECHOS CLÍNICOS OBSERVADOS (RECORRÊNCIAS, DESENVOLVIMENTO DE NOVAS LESÕES E TRANSFORMAÇÃO MALIGNA)... 48
5.5.1 Curva de Kaplan-Meier (análise de sobrevida), log-rank e análise de regressão de Cox 48
5.6 EXPRESSÃO DOS ANTICORPOS ANTI-P53, ANTI-COX-2, ANTI-EGFR S E ANTI-EGFR SM 56
5.6.1 Análise da expressão dos anticorpos 59
6 DISCUSSÃO 63
7 CONCLUSÕES 70
REFERÊNCIAS 71
ANEXOS 81

1 INTRODUÇÃO

Leucoplasia é uma lesão com potencial de malignização, caracterizada por placas ou manchas brancas, que pode ocorrer na mucosa oral, faringe e laringe (Slaughter et al., 1953; Axéll et al., 1996). Em reunião coordenada pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em Londres, Reino Unido, em Maio de 2005, atualizou-se o conceito de leucoplasia oral (LO), segundo o qual o "termo leucoplasia deve ser usado para identificar placas brancas de risco incerto, tendo excluído (outras) doenças ou condições conhecidas que não possuem potencial aumentado de transformação maligna" (Warnakulasuriya et al., 2007).

O diagnóstico da LO é feito por exclusão de fatores etiológicos, com exceção do consumo de tabaco, e pelo exame histopatológico para exclusão de outras doenças específicas. A LO de etiologia desconhecida é denominada *idiopática,* e a associada ao tabagismo de LO *tabaco-associada* (Axéll et al., 1996; Reibel, 2003). Outros fatores que podem estar associados à LO, e que também não excluem seu diagnóstico, são o consumo habitual de álcool, a presença de *Candida* sobreposta à LO e a presença do papilomavírus humano (HPV). Esses fatores também têm sido relacionados ao risco de transformação maligna (Napier; Speight, 2008; van der Waal, 2009).

O consumo crônico de álcool permanece controverso na etiologia das LOs e é descrito na literatura mais frequentemente como um fator sinérgico ao tabaco do que como um fator de risco independente para o surgimento das leucoplasias (Dietrich et al., 2004; Napier; Speight, 2008).

Outro fator controverso é a associação de *Candida ssp* à LO. Ainda não se sabe se a *Candida ssp* causa lesões brancas não removíveis à raspagem, ou se é uma infecção superposta às leucoplasias pré-existentes, já que esse microrganismo está presente particularmente em LO localizadas em dorso de língua ou em mucosa jugal (van der Waal, 2009).

A presença do HPV em algumas lesões de LO e em espécimes de carcinoma epidermoide oral indica que esse vírus pode desempenhar algum papel na evolução da carcinogênese oral. Entretanto, ainda não há evidências consistentes entre a relação do HPV e o prognóstico das LO (Napier; Speight 2008).

De acordo com a literatura, a taxa de transformação maligna das LOs varia de 4% a 6%, porém pode chegar a 18%, dependendo da população e dos hábitos prevalentes em determinadas áreas geográficas (Reibel, 2003).

Características clínicas, localização das lesões e presença de displasias epiteliais constituem fatores importantes para a análise do potencial de transformação maligna. Aspecto clínico não homogêneo (vegetações e áreas eritematosas coexistentes) associado à localização anatômica (assoalho bucal e ventre de língua) e tipo de mucosa (não queratinizada) são características que implicam maior grau de suscetibilidade de transformação maligna (van der Waal; Axéll, 2002; Bánóczy et al., 2003; Jaber et al., 2003; Reibel, 2003). Alterações displásicas do epitélio estão associadas à atipia celular, perda da maturação normal e da sua estratificação (Pindborg et al., 1997). Quanto mais proeminentes e numerosas elas são, mais severa é a displasia, que pode ser classificada em leve, moderada ou intensa (Pindborg et al., 1997).

De forma geral, por apresentarem risco de malignização, as LOs devem ser tratadas. No entanto, o tratamento não assegura a eliminação de risco do desenvolvimento do carcinoma epidermoide e tampouco elimina a ocorrência de recidivas da lesão (van der Wall; Axéll, 2002; Reibel, 2003; Lodi et al., 2007). Dois aspectos se mostram relevantes para as leucoplasias: o tratamento e uso de marcadores para associar o potencial de malignização.

O tratamento das LOs é cirúrgico, embora medicamentos tópicos, como o ácido retinoico, também sejam utilizados, com indicação restrita a alguns casos (Lodi et al., 2002). A remoção das lesões pode ser realizada por cirurgia convencional, cirurgia por *laser* de alta potência, crioterapia, eletrobisturi e terapia fotodinâmica (Laskaris, 2000).

A crioterapia apresenta eficácia limitada devido à falta de precisão da profundidade de tecido congelado, enquanto a eletrocauterização promove um pós-operatório desfavorável devido ao dano térmico nos tecidos manipulados, em geral maior que o dano térmico causado pelo *laser* (Laskaris, 2000; Yeh, 2000).

Terapia fotodinâmica pode ser uma terapia de eficiência semelhante ao tratamento cirúrgico, mas certamente possui o custo mais alto entre os métodos, pois além do *laser* (não cirúrgico ou de baixa potência), requer substância fotossensível, que encarece o procedimento (Sieron et al., 2003).

O tratamento cirúrgico com *laser* de alta potência mostra-se vantajoso em relação à técnica cirúrgica convencional, permitindo controle de sangramento transoperatório, melhor visibilidade da área cirúrgica e intervenção em lesões extensas. Os comprimentos de onda de 10.600 nm do *laser* de CO_2, e de 808 nm do *laser* de diodo são frequentemente utilizados em tecidos moles, sendo o primeiro absorvido intensamente pela água e o segundo pela hemoglobina (Ishii et al., 2003; D'Arcangelo et al., 2007). A alta absorção de energia do *laser* pelos tecidos caracteriza o corte preciso e superficial do feixe, minimizando o dano térmico aos tecidos adjacentes, além da diminuição de bacteremia. O reparo tecidual é caracterizado pela redução da contração da ferida cirúrgica, uma vez que a quantidade de miofibroblastos observada em incisões por *laser* é menor do que a observada em incisões por bisturi (Luomanen et al., 1988; Zeinoun et al., 2001). No entanto, o tempo de reparação nas cirurgias a *laser* é prolongado em relação à cirurgia convencional (Fisher; Frame, 1984; Luomanen et al., 1988; Luomanen, 1992).

Sendo a LO uma doença potencialmente maligna, o exame histopatológico convencional é útil para identificar alterações displásicas, porém nem sempre suficiente para determinar o potencial de malignidade (van der Waal et al., 1997). Características clínicas também podem não ser suficientes para caracterizar o potencial das lesões (van der Waal; Axéll, 2002; Jaber et al., 2003; Reibel, 2003). A introdução de marcadores biológicos pode ampliar a identificação de lesões de maior risco, auxiliar no planejamento do tratamento e reduzir taxas de transformação maligna das lesões (Scully; Sudbø; Speight, 2003; Tsantoulis et al., 2006; Mithani et al., 2007).

O objetivo do uso de marcadores moleculares é possibilitar a identificação de alterações na expressão de proteínas codificadas por oncogenes ou por genes supressores de tumores e relacioná-los ao potencial de malignização das LOs (Warnakulasuriya, 2000).

O evento genético mais comum na carcinogênese oral é a mutação do gene supressor de tumor p53. O p53 protege a integridade do genoma através da apoptose ou da cessação do ciclo celular quando ocorre dano ao DNA celular (Giaccia; Kastan, 1998; Smith et al., 2001). Outros genes estudados, mais recentemente, o EGFR e o COX-2 foram relacionados com a promoção da proliferação celular, entre outros processos da carcinogênese oral (Smith et al.,

2001; Atula et al., 2006; Tsantoulis et al., 2006; Harari et al., 2007). Estudos mostram o aumento da expressão de proteínas codificadas pelos genes p53, EGFR e COX-2 em displasia oral (Shin et al., 1994; Cruz et al., 2002; Renkonen et al., 2002). De acordo com um modelo elaborado por Lippman et al. (2005), esses três genes estão relacionados com a progressão da carcinogênese oral, a partir da ativação do EGFR, e subsequentemente, com eventos moleculares envolvendo o COX-2, aumentando a frequência de mutações (possivelmente do p53), levando então à proliferação desregulada do epitélio (Lippman et al., 2005).

O ambulatório de Estomatologia atende pacientes procedentes da comunidade local e referenciados à FO-USP para o tratamento de diversas doenças, incluindo as lesões brancas, principalmente a LO. Embora não temos uma prevalência exata da LO em nosso ambulatório, o número de atendimento registrados varia entre 5 e 6 casos anuais.

O propósito deste presente estudo foi inicialmente estabelecer um protocolo de tratamento das LOs. Adicionalmente, investigar os benefícios clínicos do uso de marcadores imuno-histoquímicos nessas lesões para melhor monitoramento dos pacientes.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 LEUCOPLASIA ORAL: PREVALÊNCIA E FATORES ASSOCIADOS A SUA ETIOLOGIA

Desde 1994, a partir do Simpósio de Uppsala, a definição das LOs tem sido modificada com o objetivo de uniformizar critérios de diagnóstico, com base no conceito atual sobre a biologia de doenças orais potencialmente malignas. O novo consenso estabeleceu que a leucoplasia é uma “lesão predominantemente branca que não pode ser caracterizada como outra lesão definível: algumas leucoplasias se transformarão em câncer”, considerando ainda a associação da LO com o tabaco (Axéll et al., 1996; Warnakulasuriya et al., 2007).

Estima-se que a prevalência mundial da LO varia entre 1% e 5%; os resultados dos estudos epidemiológicos diferem de acordo com a etnia e hábitos da população avaliada, além dos critérios clínicos utilizados no diagnóstico das lesões (Roosaar et al., 2007; Napier; Speight, 2008). A maior parte dos estudos é realizada em países onde a população avaliada é de “alto risco” em virtude de seus hábitos intensos de alcoolismo ou tabagismo, como a Índia, ou em países desenvolvidos onde comumente populações procedentes de hospitais são avaliadas, o que poderia superestimar os valores reais (Lim et al., 2003; Fisher et al., 2005; Napier; Speight, 2008). Uma revisão sistemática de trabalhos publicados desde 1986, que utilizou critérios de diagnóstico definidos pelo Simpósio de Uppsala, estimou a prevalência global da leucoplasia entre 1,7% e 2,7%. No entanto, ressaltaram a limitação dessa revisão, pois os estudos utilizados para a avaliação nem sempre consideraram populações representativas da população adulta (Petti, 2003).

Consumo crônico do tabaco e do álcool, infecção por *Candida sp*, características clínicas e grau de displasia, são alguns fatores associados à incidência da LO e a sua taxa de transformação maligna. O uso do tabaco é fortemente associado à incidência da leucoplasia em países em que o hábito é prevalente na população em diversas formas de consumo (*nuts*, *quids*, *areca*), assim como nos países desenvolvidos, em que o cigarro é a forma mais frequente. O hábito de fumar mais de 20 cigarros por dia foi associado à ocorrência da LO,

aumentando o risco de aparecimento dessa lesão em 2,4 a 15 vezes (Dietrich et al., 2004). Paradoxalmente, LOs em indivíduos não tabagistas parecem ter maior risco para o desenvolvimento de malignização das lesões (Napier; Speight, 2008). Hamadah e Thomson (2009), observou que pacientes não fumantes e que não consumiam álcool regularmente tiveram piores taxas de sobrevivência após 5 anos do tratamento cirúrgico (Hamadah; Thomson, 2009). Outros estudos apontam maior risco de transformação maligna das LOs entre as mulheres que não possuem o hábito de tabagismo, sugerindo que LOs idiopáticas teriam maior risco de cancerização entre este gênero (Silverman et al., 1984; Schepman et al., 1998).

O papel do álcool na etiologia da LO ainda é controverso, mas o consumo regular de bebidas alcóolicas em quantidade além do recomendado é comum entre pacientes com lesões potencialmente malignas e malignas (Napier; Speight, 2008). O consumo excessivo do álcool pode ter efeito sinérgico ao cigarro, pois fumantes que também são etilistas possuem maior risco a neoplasias malignas orais que somente fumantes. Esse efeito ocorre possivelmente porque a ingestão crônica de álcool causa o aumento da penetração de carcinógenos na mucosa oral, seja através do aumento da solubilidade dos carcinógenos ou através do aumento da permeabilidade da mucosa oral a estas substâncias nocivas presentes no tabaco (Wight; Ogden, 1998; Reichart, 2001).

Lim et al. (2003) detectou o aumento do risco de lesões malignas ou potencialmente malignas em 350% para fumantes de mais de 20 cigarros por dia, tanto em homens quanto em mulheres. Homens que relatavam beber mais de 20 unidades de álcool por semana tinham risco 3 vezes maior de desenvolver neoplasia maligna ou LO (Lim et al., 2003). Um estudo epidemiológico na Suécia acompanhou a evolução de LO e constatou que após 10 anos todos os indivíduos que desenvolveram neoplasia maligna eram fumantes e alcoólicos moderados (Roosar et al., 2007). Em outro estudo, realizado na Itália, a LO foi encontrada em 13,8% dos casos de um grupo de homens adultos (> 40 anos) considerado de alto risco por causa da prevalência dos hábitos de tabagismo e etilismo, ainda que a associação estatística para os hábitos e a LO tenha sido negativa (Campisi; Margiotta, 2000). Jaber et al. (1999) observou em seu estudo que o desenvolvimento de displasia epitelial oral foi influenciado sinergicamente pelo tabaco e pelo álcool (Jaber et al., 1999).

A maior parte dos estudos confirma a prevalência da LO em homens (Lumerman et al., 1995; Saito et al., 2001; Jaber et al., 2003; Lim et al., 2003; Petti, 2003; Lee et al., 2006), possivelmente por serem mais frequentes hábitos de tabagismo e consumo de álcool entre este gênero (Napier; Speight, 2008). No entanto, como mencionado anteriormente, mulheres portadoras de LO sem hábitos podem ter maior taxa de malignização das lesões (Schepman et al., 1998; Saito et al., 2001; Napier; Speight, 2008).

Associação entre o fungo *Candida ssp* e carcinogênese oral é questionável. Não se sabe se a *Candida ssp* está relacionada à etiologia da LO, ou se é uma infecção superposta às lesões leucoplásicas. Na literatura há relatos do aumento da transformação maligna em LOs infectadas por *Candida ssp*, e estudos em animais revelam que o fungo tem alto potencial de produção endógena de nitrosaminas, substâncias carcinogênicas na mucosa oral (Reibel, 2003). Porém clinicamente, essa associação nem sempre é verificada. Silverman et al. (1984) indentificou LOs superpostas à *Candida ssp*, porém não enontraram relação com casos de transformação maligna (Silverman et al., 1984). Ainda assim, lesões com identificação do fungo *Candida ssp* por citologia esfoliativa ou por PAS de biópsia incisional devem ser tratadas com antifúngico, e o exame citológico deve ser repetido para verificação da efetividade da terapia, a fim de eliminar possível superposição das lesões por *Candida ssp* (van der Wall et al., 1997; Holmstrup et al., 2006).

A citologia esfoliativa é um método de diagnóstico de rotina para lesões potencialmente malignas em colo de útero, que também pode ser utilizado em mucosa oral. Trata-se de um teste minimamente invasivo, sem a necessidade de anestesia local, para a coleta de amostra do epitélio estratificado de mucosa. Células provenientes de raspagem da mucosa, e visualizadas em microscópio óptico representariam a presença ou não de displasia, identificada inicialmente em células provenientes da camada basal. Embora falso negativos ou falso positivos possam ocorrer, a técnica tem sido aprimorada, como na citologia esfoliativa de base líquida, para permitir resultados mais fidedignos (Epstein et al., 2002).

Outro fator relacionado à etiologia das LOs, a presença do papilomavírus humano (HPV), especialmente dos subtipos 16 e 18, foi observada em LOs e em neoplasias malignas orais, mas seu papel na carcinogênese oral permanece contraditório (Napier; Speight, 2008). Um trabalho recente realizou teste para

identificação do HPV em 167 pacientes com LO que foram acompanhados clinicamente para verificação de transformação maligna. Os autores não encontraram associação entre a presença do HPV e a transformação maligna, sugerindo que a identificação do HPV em LOs não é indicador do prognóstico das lesões (Yang et al., 2009).

2.2 FATORES ASSOCIADOS À TRANSFORMAÇÃO MALIGNA DAS LEUCOPLASIAS ORAIS

Na mucosa oral, a LO pode ocorrer antes do surgimento do carcinoma de células escamosas, com taxas variáveis descritas na literatura, dependendo da população estudada e o tempo de estudo (Schepman et al., 1998). De fato, quanto maior o período de acompanhamento das leucoplasias, maior é a taxa de malignização das lesões (Silverman et al., 1984; Schepman et al., 1998; Napier; Speight, 2008). Em seu estudo, Schepman et al. avaliou 166 pacientes por 29 meses em média, e detectou 2,9% de transformação maligna ao ano. Esta taxa aumentou em 50% quando o tempo de acompanhamento foi prolongado para 200,8 meses (Schepman et al., 1998). Lee et al. (2000) reportou 31,4% de transformação maligna das leucoplasias no período de 10 anos (Lee et al., 2000), Lumerman et al. obteve taxa de 16% durante uma média de 18.4 meses (Lumerman et al., 1995), e Holmstrup relatou 12% em 7,5 anos (Holmstrup et al., 2006). No entanto, um cálculo da taxa global de transformação maligna mostrou que apenas 1,36% das LO desenvolvem malignidade por ano (Petti, 2003). Scheifele e Reichart (2003) sugerem a padronização de uma taxa de transformação anual para comparar resultados, já que as taxas descritas nos diversos trabalhos da literatura variam com o período de acompanhamento (Scheifele; Reichart, 2003).

Em nações desenvolvidas, a maior parte dos indivíduos é acometida pela LO entre a 6ª e 7ª década de vida, já nos países em desenvolvimento ocorrem, em média, de 5 a 10 anos antes (Silverman et al., 1984; Lumerman et al., 1995; Jaber et al., 2003; Napier et al., 2003; Dietrich et al., 2004; Nagao et al., 2005; Napier; Speight, 2008). A taxa de transformação maligna parece não variar com a idade (Petti, 2003). Em estudo retrospectivo de 630 pacientes, divididos em grupos com

idade acima e abaixo de 35 anos, não foi identificada diferença significativa entre os grupos a taxa de transformação maligna, que foi de 5,0% para o grupo jovem, e de 5,6% para o grupo mais velho (Jaber et al., 2003).

Na tentativa de relacionar um “perfil clínico” da LO com seu potencial de cancerização, as lesões são classificadas por sua superfície em homogêneas (superfície plana branca) e não homogêneas (superfície eritroleucoplásica, nodular e exofítica), pelo tamanho (<2 cm, >2 cm a 4 cm, >4 cm) e localização (áreas com maior ou menor risco) (Axéll et al., 1996; van der Wall; Axéll, 2002). Alguns trabalhos reportam a mucosa jugal como o sítio de maior incidência da leucoplasia (Reichart, 2000; Napier; Speight, 2008), enquanto outros reportam assoalho e língua (Frame et al., 1984; Chu et al., 1988; Flynn et al., 1988; Roodenburg et al., 1991; Lumerman et al., 1995; Shepman et al., 1998; Thomson; Wylie, 2002; Napier et al., 2003; van der Hem et al., 2005; Hamadah; Thomson, 2009) ou gengiva/rebordo alveolar (Nagao et al., 2005).

O risco de transformação maligna e de displasia epitelial intensa tem sido relacionado com a localização em borda lateral de língua e assoalho bucal, e com característica de superfície não homogênea (Silverman et al., 1984; Holmstrup et al., 2006), mas essa associação nem sempre é verificada. Em amostra de LO predominante em língua e assoalho, Schepman et al. (1998) não encontrou maior taxa de malignização relacionada com a localização das lesões, mas sim com o aspecto clínico não homogêneo (Schepman et al., 1998). Outro trabalho extenso relatou não haver associação estatística entre as características clínicas de superfície ou localização da lesão e o grau de displasia epitelial em população do Oeste europeu (Jaber et al., 2003). Saito et al. (2001) descreveu maior taxa de transformação maligna em leucoplasia de língua, nenhum caso foi reportado em assoalho. O autor destacou a possibilidade da falha do tratamento utilizado ser responsável pela prevalência de casos de malignização em língua, já que a criocirurgia teve alta taxa de insucesso e foi utilizada na maior parte dos casos naquela localização (Saito et al., 2001).

O tamanho da LO e o aspecto da superfície também parecem estar relacionados com o risco aumentado à transformação maligna. Napier et al. concluíram que lesões de grande extensão (que envolvem mais de um sítio anatômico) tinham aproximadamente 6 vezes mais risco de progressão para carcinoma epidermoide, enquanto outros fatores analisados (gênero, idade,

tabagismo, aspecto da superfície, localização e tamanho das lesões) não influenciaram a ocorrência de transformação maligna (Napier et al., 2003). Holmstrup et al. também observaram risco 5 vezes maior de lesões maiores que 200 mm^2 para a transformação maligna, e 7 vezes maior em lessões com aspecto não homogêneo (Holmstrup et al., 2006). Porém, nem sempre as características clínicas das LOs (tamanho, localização e a superfície da lesão) são relacionadas com maior riscos de cancerização (Saito et al., 2001; Thomson; Wylie, 2002; van der Hem et al., 2005).

Outra característica das LOs que pode indicar risco diferenciado a malignização é o número de lesões presentes na mucosa. LOs múltiplas devem ser analisadas de maneira distinta das LOs únicas, por possuírem outra suscetibilidade genética, ainda pouco estudada. Nesses casos, deve ser enfatizada a possibilidade do aumento do risco de cancerização das lesões orais e da mucosa do trato gastrointestinal como um todo (Lee et al., 2000). O acometimento da LO em múltiplos sítios sugere que o campo de cancerização abrange uma extensão maior da mucosa oral que em LOs únicas (Hamadah et al., 2009). Em estudo sobre leucoplasias de acometimento múltiplo, foram realizadas múltiplas biópsias incisionais a fim de determinar um “mapa” clínico-histológico das lesões espalhadas pela mucosa, com o objetivo de determinar um protocolo de tratamento cirúrgico por *laser* restrito às lesões em sítios de maior displasia. Todos os pacientes adultos avaliados eram fumantes e consumiam álcool. A maior parte das lesões (cerca de 70%) apresentava hiperplasia (sem displasia) ou displasia leve. Leucoplasias homogêneas ocorreram mais frequentemente em mucosa jugal, mucosa alveolar e borda lateral de língua. De maneira similar às LOs únicas/localizadas, as leucoplasias múltiplas apresentaram displasia moderada ou carcinoma *in situ* em regiões concideradas de alto risco (palato mole, região de fauces, ventre de língua e assoalho de boca), independente do aspecto clínico da lesão. Portanto, sugeriu-se a remoção cirúrgica de lesões localizadas nessas áreas de displasia intensa, ainda que os autores afirmem não ser possível prever o comportamento de LOs múltiplas, baseado apenas em aspectos clínicos e histopatológicos (Thomson; Hamadah, 2007). Outro estudo, de Saito et al., verificou maior taxa de transformação maligna em pacientes com múltiplas lesões do que em pacientes com lesões localizadas (Saito et al., 1999)

2.3 PROCEDIMENTO DE BIÓPSIA E AZUL DE TOLUIDINA

O diagnóstico da leucoplasia depende não somente da exclusão de fatores etiológicos conhecidos, mas também de um procedimento de biópsia incisional bem realizado. Espécime da biópsia deve ser representativo da lesão para definir a graduação da displasia epitelial presente no tecido (Lumerman et al., 1995). O azul de toluidina é um corante metacromático que pigmenta DNA mitocondrial em células que contêm volume aumentado de ácido nucleico, o qual sugere proliferação local anormal. Aplicação tópica do azul de toluidina tem sido utilizada como um procedimento clínico adjunto de baixo custo e fácil manipulação para o reconhecimento de lesões malignas e displasia epitelial de alto grau. A sensibilidade e a especificidade do corante para identificar lesões malignas são altas, em contraste com a dificuldade de interpretação do resultado em leucoplasias, onde o corante apresenta variações da intensidade do azul. Apesar da variação da sensibilidade do teste para lesões displásicas descrita na literatura, este corante pode auxiliar na seleção do sítio da biópsia incisional (Allen, 1998; Epstein et al., 2002; Meltzer, 2007).

2.4 TRATAMENTO DA LEUCOPLASIA ORAL

2.4.1 Modalidades terapêuticas

Poucos estudos compararam os índices de transformação maligna de LOs tratadas cirurgicamente com os de LOs sem tratamento (Saito et al., 2001; Homstrup et al., 2006; Arduino et al., 2009), porém nota-se nesses estudos uma tendência de indicação do tratamento para lesões com características clínicas e histológicas de maior risco. Além disso, não existe nenhum estudo randomizado controlado publicado na literatura (Lodi et al., 2002).

Tradicionalmente, o tratamento indicado para a LO é a excisão cirúrgica, independente da severidade de displasia epitelial ou das características clínicas das

lesões (Kademani; Dierks, 2007; van der Wall, 2009). Outros tipos de tratamento, como o ácido retinoico tópico, a crioterapia ou a terapia fotodinâmica, foram investigados, mas nenhum apresentou resultados que comprovadamente indicassem eficácia na prevenção da transformação maligna das LOs (Lodi et al., 2002).

Em revisão sistemática, Lodi et al. (2002) avaliou trabalhos que utilizaram bleomicina tópica, ácido retinoico tópico, vitamina A sistêmico e beta caroteno sistêmico como tratamento para a leucoplasia. Apesar da melhora clínica das lesões, nenhuma dessas terapias foi considerada eficiente para a prevenção da transformação maligna, e eventualmente houve efeitos adversos de várias severidades, não justificando o benefício dessas modalidades terapêuticas (Lodi et al., 2002).

O tratamento com crioterapia possui altos índices de recidiva, provavelmente pela falta de precisão do volume final de tecido congelado, além da desvantagem de apresentar longos períodos para reparação (Yeh, 2000; Saito et al., 2001).

A cirurgia convencional tem como vantagem a conservação das margens da lesão removida para exame histopatológico, mas requer procedimento adicional de enxerto para lesões extensas e pode causar cicatriz limitante de função para casos persistentes de recidiva (Kademani; Dierks, 2007).

2.4.2 Tratamento cirúrgico com *lasers* de CO_2 e de diodo

Atualmente, a remoção de LOs com *laser* de CO_2 (α = 10.600 nm) é a modalidade de tratamento mais comum (Lodi; Porter, 2008). Além do CO_2, outro *laser* amplamente utilizado para cirurgia em tecidos moles é o de diodo (α = 808 nm); o primeiro *laser* é intensamente absorvido pela água e o segundo pela hemoglobina (Ishii et al., 2003; D'arcangelo et al., 2007).

Entre as vantagens da cirugia com *lasers* de alta potência, estão o controle de sangramento, diminuição da bacteremia e melhor visualização do campo cirúrgico, a redução da formação de cicatriz favorecendo o manejo das LOs e preservando a mobilidade dos tecidos moles irradiados (Luomanen et al., 1988; Luomanen, 1992). Particularmente, a cirurgia com *laser* para LOs extensas é vantajosa, pois permite a

remoção de grandes áreas sem a necessidade de incisões auxiliares ou enxertos para fechamento da ferida cirúrgica (Meltzer, 2007). Como a reparação se dá pela migração do epitélio novo formado na periferia para o centro da lesão, alguns autores sugerem a vaporização das bordas da lesão, com a intenção de diminuir a possibilidade de recidiva (Ishii et al., 2003; van der Hem et al., 2005; Hamadah; Thomson, 2009).

A principal desvantagem da técnica com *laser* em relação a cirurgia com lâmina de bisturi é a cicatrização prolongada, de 4 semanas em média (Kademani; Dierks, 2007; Meltzer, 2007). As complicações após tratamento cirúrgico com *lasers* de alta potência compreendem o desenvolvimento de granulomas (Chu et al., 1988; Vivek et al., 2008), a sialodenite causada pela obstrução do ducto da glândula submandibular e parestesia de língua (Thomson; Wylie, 2002).

Apesar das vantagens do uso dos *lasers* de alta potência para a remoção das LOs, o tratamento não assegura a eliminação do risco de desenvolvimento do carcinoma de células escamosas e tampouco elimina recidivas da lesão (van der Wall; Axéll, 2002; Reibel, 2003; Lodi; Porter 2008).

Após a remoção cirúrgica das LOs por *laser* de alta potência, recorrências são frequentes nos locais adjacentes às lesões primárias, assim como o surgimento de novas lesões em sítios diferentes do sítio inicial, independentemente do tempo entre a excisão e a reaparição da lesão (Schepman et al., 1998; Laskaris, 2000; van der Waal; Axéll, 2002; Lodi; Porter, 2008). Na literatura, as taxas de recorrência compreendem entre 10% e 57% (Chu et al., 1988; Chiesa et al, 1990; Roodenburg et al., 1991; Schepman et al., 1998; Schoelch et al, 1999; Saito et al., 2001; Thomson; Wylie, 2002; Ishii et al., 2003; Chandu; Smith, 2005; van der Hem et al., 2005; Vivek et al., 2008; Hamadah; Thomson, 2009). Essa variação pode ser atribuída aos tipos de *lasers* utilizados, parâmetros de irradiação, critérios de inclusão, período de acompanhamento e etnia da população estudada (Lodi; Porter, 2008).

Autores que utilizaram microscópio associado ao *laser* de alta potência para melhor visualização das margens das lesões reportaram as menores taxas de recorrências, entre 10–38% (Frame et al., 1984; Chiesa et al. 1990; Roodenburg et al., 1991; Chu et al., 1988; van der Hem et al., 2005), enquanto trabalhos que não dispunham de tal equipamento relataram taxas entre 22–57% (Flynn et al., 1988; Schoelch et al., 1999; Thomson; Wylie, 2002; Chandu; Smith, 2005; Hamadah;

Thomson, 2009). Em relação aos critérios de inclusão e exclusão, é importante observar que estudos que incluíram pacientes com lesões em lábio apresentaram taxas menores de desfechos clínicos (Chiesa et al., 1990; Roodenburg et al., 1991; van der Hem et al., 2005).

Outro critério relativo à metodologia dos estudos é o grau de displasia das LOs tratadas. No trabalho de Vivek et al. (2008) pacientes com lesões que apresentaram displasia intensa foram excluídos e apenas 3 casos de transformação maligna e 3 casos de recorrência foram registrados após 3 anos de seguimento dos pacientes (Vivek et al., 2008). Holmstrup et al. avaliou retrospectivamente pacientes tratados e não tratados por cirurgia convencional para o desfecho de transformação maligna e constatou que a taxa de transformação maligna foi de 12% para o primeiro grupo e de 4% para o segundo, concluindo que o tratamento cirúrgico não foi eficiente na prevenção da transformação maligna. No entanto, o critério para seleção dos pacientes no grupo a ser tratado era presença de displasia epitelial ou localização da LO em borda ou ventre de língua e assoalho bucal. Dessa forma, 71% das lesões tratadas cirurgicamente apresentaram displasia epitelial, enquanto apenas 12% das lesões não tratadas apresentaram displasia na biópsia incisional (Holmstrup et al., 2006). Os critérios escolhidos pelo autor para determinar o tratamento das LOs correspondem a fatores de maior risco à transformação maligna e provavelmente influenciaram nos resultados do trabalho.

2.5 AVALIAÇÃO HISTOLÓGICA DA LEUCOPLASIA ORAL E USO DE MARCADORES MOLECULARES

2.5.1 Grau de displasia e classificação binária

O grau de displasia epitelial presente em leucoplasia ainda permanece o melhor método para avaliar lesões de maior risco de desenvolver carcinoma (Lee et al., 2000; Cowan et al., 2001; Reibel, 2003; van der Wall, 2009). Entretanto, a análise histopatológica é subjetiva, podendo ocorrer diferenças de atribuição da severidade de displasia entre examinadores (Abbey et al., 1995; Fisher et al., 2004).

Para um diagnóstico mais acurado, é sugerida a revisão da lâmina por outro avaliador que não seja o primeiro patologista, e entre duas regiões distintas do corte. A de maior severidade deve prevalecer como resultado com o objetivo de não subdiagnosticar uma lesão, pois espécimes de biópsia excisional mostram graus variáveis de displasia ao longo do epitélio (Pentenero et al., 2003).

O sistema de classificação mais utilizado para determinar o grau de displasia é o da OMS, que reconhece cinco estágios histopatológicos em lesões epiteliais precursoras (LOs) de acordo com atipias citológicas e mudanças arquiteturais observadas no epitélio: hiperplasia escamosa, displasia leve, displasia moderada, displasia intensa e carcinoma *in situ* (World Health Organization Classification of Tumours, 2005). Outros sistemas de classificação histológica das LOs foram sugeridos na literatura, como o ponto de corte AgNOR (Silver-stainable Nucleolar Organizer Region), que pode ser útil para distinguir entre displasia leve ou moderada, o SIN (Squamous Intra-epithelial Neoplasia), utilizado para a classificação de lesões cervicais pré-malignas e o SIL (Squamous Intraepithelial Lesions), utilizado entre patologistas laringologistas (Chattopadhyay; Ray, 2008; van der Waal, 2009). Em relação a esses sistemas, a OMS não indica o uso do SIN, pois esta nomenclatura considera a presença de neoplasia inserida no epitélio, e não há evidências de que todas as LOs evoluirão em neoplasias (Warnakulasuriya et al., 2008). Recentemente o grupo de especialistas da OMS do Centro de Câncer e Pré-câncer Oral sugere o uso de um sistema binário para classificar as lesões em “baixo risco” e “alto risco” com o objetivo de prognosticar o risco de transformação maligna das LOs com mais eficiência (Warnakulasuriya et al., 2008; van der Waal, 2009). Esse sistema foi desenvolvido e testado por Kujan et al., com resultados satisfatórios em relação à concordância entre os escores dos patologistas (Kujan et al., 2006).

2.5.2 Marcadores moleculares p53, COX-2 e EGFR

Ainda que características clínicas ou histológicas indiquem o risco de cancerização das LOs, o carcinoma epidermoide oral pode surgir de lesões “inócuas”, sem displasia ou com aspectos clínicos considerados de baixo risco (Cruz et al., 1998; Cowan et al., 2001; Holmstrup et al., 2006). O uso de marcadores

moleculares pode representar um avanço na intervenção de lesões orais com risco de malignização. Técnicas mais sensíveis para a identificação de marcadores moleculares permitem o reconhecimento de modificações precoces do epitélio, antes mesmo que a alteração da morfologia do tecido seja clinicamente perceptível (Regezi et al., 1995; Srinivasan; Jewell, 2001; Warnakulasuriya et al., 2008).

A mutação do gene p53 é um dos eventos genéticos mais comuns da carcinogênese oral, e é encontrada em até 80% dos carcinomas de células escamosas orais (Cruz et al., 1998). Os genes supressores de tumor, como o p53, têm a função de evitar que as células adquiriram características malignas, por meio da regulação de “check-points” durante o ciclo celular, monitorando a replicação do DNA e da mitose. Acredita-se que a supressão do crescimento celular induzida pelo p53 promove um mecanismo pelo qual células geneticamente danificadas têm tempo para a reparação de seu DNA, razão pela qual o p53 é chamado de “guardião do genoma” (Cruz et al., 1998). O p53 quando mutado é inativado, ocorrendo perda da regulação da proliferação, diferenciação e morte celular (Mithani et al., 2007). A detecção da proteína p53 através da imuno-histoquímica geralmente indica presença da sua forma ineficaz, pois sua forma nativa e funcional possui meia-vida curta (Giaccia; Kastan, 1998). A expressão do p53 tem sido detectada por imunohistoquímica em 10–50% das LOs, sendo mais intensa conforme o aumento do grau de displasia, e está relacionada com lesões de maior risco de transformação maligna, indicando a possibilidade desse marcador molecular em identificar lesões de alto risco de malignização (Regezi et al., 1995; Cruz et al., 1998; Lee et al., 2000; Tanda et al., 2000; Piatelli et al., 2002; Kurokawa et al., 2003; Fan et al., 2006). No entanto, alguns trabalhos não encontraram associação entre o aumento da proteína p53 e a mutação do seu gene precursor em leucoplasias e enfatizam a necessidade de outros marcadores para uso em lesões iniciais da carcinogênese (Shanavaz et al., 2000; Warnakulasuriya, 2000). Resultados conflitantes são atribuídos a diferenças de metodologia, como a técnica laboratorial para detecção da proteína ou da mutação do gene, o acompanhamento ou não dos pacientes para verificar o comportamento clínico da lesão, além do uso de diferentes métodos de quantificação da expressão do anticorpo no tecido epitelial (Warnakulasuriya, 2000). Estudos de imuno-histoquímica mostram marcação positiva do p53 no núcleo de células epiteliais, sendo que em tecidos normais ela é restrita à camada basal,

enquanto em LOs ela pode ocorrer em camadas mais superiores do epitélio (Cruz et al., 2002; Fan et al., 2006).

As COX são enzimas responsáveis pela catalisação da reação de síntese de prostaglandinas (PGs). A COX-1 está presente na maioria dos tecidos em sua forma constitutiva e media a síntese de PGs que desempenham funções fisiológicas normais, como a proteção da mucosa gastrointestinal. No entanto, a COX-2 não é detectada na maioria dos tecidos normais e sua produção pode ser induzida em resposta a estímulos de citocinas pró-inflamatórias, fatores de crescimento e promotores de tumores. Cada produto derivado das PGs desempenha uma série de atividades biológicas, e diversas malignidades aparentam produzir maior quantidade de certas PGs (por exemplo, PGE_2) possivelmente alterando a proliferação celular, a angiogênese, e a apoptose (Banerjee et al., 2002; Lin et al., 2002). A COX-2 pode ser identificada em vários tipos de neoplasias malignas, principalmente as do trato gastrointestinal, e em LOs (Chan et al., 1999; Banerjee et al., 2002; Renkonen et al., 2002; Shibata et al., 2005; Sawhney et al., 2007). Estudos verificaram através de reações de imuno-histoquímica a marcação positiva do COX-2 no citoplasma celular do epitélio de LOs, enquanto a expressão da COX-2 em tecidos normais é praticamente inexistente (Renkonen et al., 2002; Shibata et al., 2005; Atula et al., 2006).

Receptores de fatores de crescimento (epidermal growth factor receptor) são moléculas pertencentes à “família” denominada erbB ou HER, reguladoras do crescimento celular (proliferação, migração e diferenciação celular) pois transmitem sinais extracelulares de proliferação, provenientes de seus ligantes, para o citoplasma, através da membrana plasmática. Hiperatividade ou aumento da expressão do EGFR induz a ativação de diversos substratos intracelulares, desencadeando sinais de mitose e outros eventos ligados à progressão de tumores (Harari et al., 2007; Specenier; Vermorken, 2007). Quando há inibição do EGFR, o ciclo celular é bloqueado na fase G1 e outros mecanismos de controle da proliferação são desencadeados, entre eles a hipofosforilação do retinoblastoma (Rb). Há 4 subtipos de receptores da erbB (EGFR/erbB1, erbB2/neu, erbB3 e erbB4), mas o EGFR/erbB1 é o subtipo superexpresso em grande parte dos carcinomas de células escamosas orais, e está relacionado a um pior prognóstico dessa malignidade (Hiraishi et al., 2006). A imuno-histoquímica tem sido uma técnica amplamente utilizada para detectar a expressão do EGFR em carcinomas orais

(Grandis et al., 1996; Hiraishi et al., 2006), mas pouco se sabe sobre esse receptor em LOs (Srinivasan; Jewell, 2001). Assim como o p53, o EGFR foi encontrado super expresso em tecido adjacente a carcinomas de cabeça e pescoço, e sua expressão é expandida às camadas superiores do epitélio à medida que se observa o aumento de displasia epitelial (Shin et al., 1994; van Oijen et al., 1998).

Há evidências da relação entre a expressão do p53 e da COX-2. A expressão da COX-2 foi verificada em neoplasias malignas de cabeça e pescoço que continham a variante mutante do p53, enquanto foi verificada supressão da transcrição da COX-2 pela atividade do gene supressor de tumor p53 em seu estado normal (Subbaramaiah et al., 1999; Gallo et al., 2003). Essa associação parece ocorrer especialmente em neoplasias malignas de estadiamento inicial, não ocorrendo a mesma relação em neoplasias em estágio avançado (Atula et al., 2006).

A ativação da sinalização do EGFR pode levar ao aumento da transcrição da COX-2, e consequentemente ao aumento da produção de PGE_2. Essa PG pode induzir a sinalização do EGFR estimulando a proliferação celular por um mecanismo complexo de *feedback* (Dannenberg et al., 2005). Há evidências da eficácia do bloqueio simultâneo das vias da carcinogênese mediadas pela COX-2 e pelo EGFR para a inibição do crescimento do carcinoma epidermoide, sendo, portanto possíveis agentes de quimioprevenção (Chen et al., 2004; Choe et al., 2005).

Segundo um modelo de progressão da carcinogênese oral, o EGFR, COX-2 e p53 estão envolvidos em diferentes estágios da progressão do epitélio displásico à neoplasia maligna (Lippman et al., 2005). No entanto, não há estudos que avaliem a expressão desses 3 marcadores moleculares em LOs. A expressão do p53, COX-2 e EGFR em LOs através de reações imuno-histoquímicas poderia ser útil na investigação de LOs de maior risco à transformação maligna.

2.5.3 Justificativa deste estudo

Aspectos clínicos e histopatológicos das LOs não são suficientes para identificar lesões que poderão desenvolver malignidade. O uso de marcadores moleculares pode ser útil para identificar LOs com maior potencial de malignização e auxiliar no monitoramento dos pacientes de risco. O tratamento adequado das LOs

também é relevante, e o *laser* de alta potência pode constituir um recurso terapêutico para essa finalidade.

3 PROPOSIÇÃO

Os objetivos deste estudo foram:

1. Determinar características clínicas e demográficas dos pacientes com LO;
2. Avaliar o efeito do tratamento de LOs por excisão com *laser* de CO_2 e de diodo;
3. Avaliar a expressão das proteínas p53, COX-2 e EGFR em cortes histológicos de biópsia incisional das lesões tratadas;
4. Identificar fatores que podem afetar a recorrência, desenvolvimento de novas lesões ou transformação maligna da LO.

4 CASUÍSTICA-MATERIAL E MÉTODOS

4.1 CASUÍSTICA

Este estudo foi composto por 40 pacientes com leucoplasia oral (LO), atendidos consecutivamente no ambulatório da Disciplina de Estomatologia Clínica da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FO-USP) no período de 2003 a 2009. Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FO-USP (protocolo 160/2007; Anexo A). Os pacientes foram informados sobre os objetivos do estudo e o termo de consentimento livre e esclarecido foi obtido de cada participante, conforme as diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisas envolvendo seres humanos (Anexo B).

4.2 MÉTODO

4.2.1 Critérios de diagnóstico da LO

O diagnóstico da LO foi baseado nos critérios estabelecidos no Simpósio Internacional sobre Lesões Brancas da Mucosa Oral, realizado em Uppsala, Suécia, em 1994, segundo os quais, as LOs devem ter um diagnóstico provisório inicial baseado em dados do exame clínico (ou seja, a identificação de uma lesão predominante branca em forma de placa ou mancha que não pode ser caracterizada como nenhuma outra doença da mucosa oral), e outro definitivo auxiliado pela exclusão de fatores etiológicos, quer sejam mecânico (trauma por fricção ou *mordiscatum*), físico ou químico (à exceção do tabagismo) e pelo exame histopatológico. O exame histopatológico é indicado tanto para excluir lesões que podem ter aparência clínica semelhante às das LOs (especificamente o líquen plano oral em placa, o nevo branco esponjoso e a candidose hiperplásica) como para identificar a presença ou não de displasia epitelial. Pacientes em cujas lesões

brancas foram identificados possíveis fatores etiológicos, e nas quais não houve sinais de regressão em um período de 8 semanas após a eliminação dos fatores, foram incluídos no estudo como portadores de LO. Lesões localizadas em lábio não foram consideradas para a análise, já que podem coexistir com a queilite actínica.

4.2.2 Anamnese, exame clínico e procedimento de biópsia

Informações sobre uso contínuo de medicação sistêmica e/ou tópica, antecedentes médicos recentes e pregressos, história familiar de neoplasias, hábitos nocivos (tabagismo e etilismo), idade, gênero, e etnia foram registradas em prontuário específico (Anexo C). Exame físico intraoral incluiu localização, tamanho e caracterização morfológica das LO (homogênea e não homogênea).

Previamente a biópsia, material obtido das superfícies das lesões por raspagem foram corados com PAS para pesquisa de *Candida spp*. Pacientes PAS-positivos foram tratados com antifúngico por duas semanas e retestados. Posteriormente, as lesões foram coradas com azul de toluidina para selecionar áreas mais representativas de biópsia. Áreas de aspecto não homogêneo da superfície da lesão (regiões exofíticas, eritematosas, erosivas ou ulceradas) foram preferencialmente biopsiadas independente de positividade para o azul de toluidina. Em pacientes com múltiplas lesões foram realizadas múltiplas biópsias. Lesões menores do que aproximadamente 1 cm foram removidas por biópsia excisional. Espécimes foram fixados em formol a 10% e enviados para análise histopatológica no Laboratório de Patologia Bucal da FO-USP.

4.2.3 Análise histopatológica, grau de displasia e classificação binária

Os critérios de análise histopatológica das LOs seguiram a classificação da OMS (2005) que subdivide as lesões em hiperplasia, displasia discreta, moderada ou intensa e carcinoma *in situ*, de acordo com a severidade e extensão de alterações citológicas e arquiteturais presentes no epitélio (World Health

Organization Classification of Tumours, 2005). Adicionalmente, foi utilizado um sistema binário que classifica as lesões de acordo com o número de alterações observadas na arquitetura do epitélio e na morfologia celular (descritas na Tabela 4.1), caracterizando lesão de “alto risco” (com no mínimo 4 alterações arquiteturais e 5 citológicas) e de “baixo risco (menos que 4 alterações arquiteturais ou menos de 5 alterações citológicas) (Kujan et al., 2006; Warnakulasuriya et al., 2008). Tanto a análise histológica, quanto o grau de displasia, foram realizadas pelo serviço de rotina da disciplina de Patologia Bucal da FO-USP. A análise do sistema binário foi realizada por um patologista “cego” em relação aos dados clínicos.

Tabela 4.1 - Critérios citológicos e arquiteturais utilizados para a classificação binária

Alterações arquiteturais	Alterações citológicas
1. Estratificação irregular do epitélio	1. Variação do tamanho do núcleo
2. Perda da polaridade da camada basal	2. Variação da forma do núcleo
3. Projeções em gota	3. Variação do tamanho celular
4. Aumento do número de figuras mitóticas	4. Variação da forma celular
5. Mitoses anormais superficiais	5. Aumento da proporção núcleo/citoplasma
6. Queratinização precoce	6. Aumento do tamanho do núcleo
7. Pérolas de queratina	7. Figuras mitóticas atípicas
	8. Aumento do tamanho e da forma do nucléolo
	9. Hipercromatismo

Baseado em Kujan et al. (2006)

4.2.4 Expressão de marcadores imuno-histoquímicos

4.2.4.1 Reações de imuno-histoquímica

O teste de imuno-histoquímica foi realizado em todos os espécimes viáveis de biópsia incisional das LOs e em 20 amostras de tecido de gengiva clinicamente

saudável obtidas de procedimentos cirúrgicos de exodontia realizados na Clínica Odontológica da FO-USP. Previamente à coleta de tecido de gengiva saudável, os pacientes foram informados sobre os objetivos do estudo e o termo de consentimento livre e esclarecido foi obtido de cada participante (Anexo D).

Para a realização das reações imuno-histoquímicas, os cortes foram submetidos aos seguintes anticorpos separadamente: anticorpo monoclonal de camundongo anti-p53 humano (clone DO-7, DAKO, Carpinteria, Califórnia, USA), anticorpo monoclonal de camundongo anti-COX-2 humano (clone CX-294, DAKO), anticorpo monoclonal de camundongo anti-EGFR humano tipo selvagem (S) (clone DAK-H1-WT, DAKO), e anticorpo monoclonal de camundongo anti-EGFR tipo selvagem e mutante (SM) (kit Pharm Dx for manual use, clone 2-18C9, DAKO).

Para controle positivo e negativo das reações foram utilizados espécimes de carcinoma epidermoide oral para os anti-p53 e anti-COX-2, e de condiloma acuminado oral para o anti-EGFR S. Como controle do anti-EGFR SM foi utilizada lâmina fornecida pelo fabricante. O controle negativo foi realizado omitindo o anticorpo primário.

A partir dos espécimes fixados em formol e emblocados em parafina, foram preparados cortes com espessura de 3 µm, estendidos em lâminas de vidro silanizadas, e deixados em estufa a 60℃ por 24 hor as antes de iniciar as reações imuno-histoquímicas. Primeiramente, os cortes foram desparafinados em dois banhos de xilol e, em seguida, reidratados em cadeia descendente de etanóis. Após a reidratação, foi feita a remoção do pigmento formólico através de incubação em hidróxido de amônia a 10% em solução alcoólica (etanol 95%), por 10 minutos, e lavagem em água subsequentemente.

Os cortes receberam tratamento de recuperação antigênica, com EDTA pH 9,0 para o anti-p53 e TRIS-EDTA pH 9,0 para o anti-COX-2 e o anti-EGFR S, em banho maria, durante 30 minutos. Ao final do tratamento de recuperação antigênica, os cortes foram imediatamente lavados em água corrente, durante 10 minutos, e imersos em água destilada. Em seguida, seguiram para a etapa de bloqueio da peroxidase endógena tecidual, realizada pela incubação em dois banhos, de 15 minutos cada, em solução 1:1 de peróxido de hidrogênio a 10% e metanol. Repetida a lavagem em água, foram imersos em solução de TRIS pH 7,4, com dois banhos de 5 minutos cada.

Os anticorpos foram diluídos em solução tampão de TRIS, pH 7,6, acrescidos de albumina bovina a 1%, em uma diluição de 1:75 para o p-53 e de 1:100 para o anti-COX-2 e o anti-EGFR S e foram incubados sobre os cortes durante 30 minutos para o anti-p53, e 120 minutos para o anti-COX-2 e o anti-EGFR S. Para a incubação do anticorpo de ligação e do complexo terceário, foi usado o sistema o kit LSAB+ (DAKO) para o anti-p53 e o sistema Advance HRP (DAKO) para os anti-COX-2 e anti-EGFR S. Todas as condições experimentais precedentes, e as descritas a seguir, foram otimizadas previamente em laboratório.

As reações foram reveladas pela diaminobenzidina (DAKO Liquid DAB+, K3468) através de incubação por 10 minutos e, após lavagem em TRIS e água deionizada, para remoção de excessos, os cortes foram contracorados com hematoxilina de Mayer. Desde a utilização do anticorpo secundário até a contracoloração todos as etapas foram realizadas automaticamente com o auxílio do Autostainer DAKO e entre cada etapa realizada na máquina, os cortes passaram por lavagens em solução tampão de TRIS pH 7,6.

Para o anti-EGFR SM, o tratamento de recuperação antigênica, bloqueio da peroxidase endógena, incubação do anticorpo e do complexo terceário, revelação e contracoloração, foram utilizados reagentes contidos no kit e as reações foram realizadas manualmente de acordo com as instruções do fabricante.

Desidratação em série crescente de etanóis seguida de diafanização em xilol e montagem das lamínulas com resina Permount, concluíram as reações realizadas e as lâminas seguiram para análise em microscopia de luz (microscópio modelo CHS, Olympus Optical Co., Ltd, Japão).

4.2.4.2 Análise da expressão dos anticorpos

A expressão dos anticorpos anti-p53, anti-EGFR (S e SM) e anti-COX-2 foi avaliada por dois indivíduos calibrados previamente, os quais realizaram análise qualitativa, verificando se houve marcação positiva e em que estrato do epitélio (camada basal, parabasal ou espinhosa) ocorreu (Cruz et al, 1998; Shin et al., 1994). Células foram consideradas positivas para os anticorpos quando houve marcação do

núcleo celular para o anti-p53, do citoplasma para o anti-COX-2, e da membrana celular para os anti-EGFR.

4.2.5 Tratamento cirúrgico com *laser* de alta potência

O tratamento cirúrgico consistiu da excisão das LOs com *laser* de CO_2 (UM–L30, Union Medical Engeneering Co, EUA; 10.600 nm, 5–10 W, modo contínuo) ou *laser* de diodo (GaAlAs, ZAP softlase, ZAP Lasers Inc., EUA; 808 nm, 2–4 W, modo contínuo). O *laser* de CO_2 foi preferencialmente utilizado devido às propriedades de seu comprimento de onda, que promove corte rápido e dano térmico superficial. O *laser* de diodo foi utilizado para lesões de difícil acesso cirúrgico (por exemplo, palato mole) devido ao seu sistema de entrega que permite o contato da fibra óptica com o tecido, reduzindo riscos de acidentes por irradiação em tecidos normais adjacentes.

A técnica de excisão inclui em geral a demarcação das lesões por vaporização com 1 mm de profundidade a 5 mm de sua margem. Em seguida, com o auxílio de uma pinça clínica posicionada no sulco demarcado, as lesões foram tracionadas verticalmente e ressecadas em sua base utilizando o *laser* como um instrumento de corte. O tecido conjuntivo subjacente à área removida foi deixado exposto à cavidade bucal, com reparação da área cirúrgica ocorrendo por segunda intenção. Complicações ocorridas após o tratamento cirúrgico foram tratadas e registradas. Os pacientes foram monitorados a cada 3 meses, sendo o período mínimo de acompanhamento de 6 meses. Pacientes que não retornaram às consultas de seguimento não foram excluídos e seus dados foram registrados até a data da última consulta.

4.2.6 Desfechos clínicos pós-tratamento cirúrgico dos pacientes

Os desfechos clínicos considerados foram: recorrências, aparecimento de novas lesões, ocorrência de transformação maligna.

4.2.7 Análise estatística

4.2.7.1 Curva de Kaplan-Meier, log-rank e análise de regressão de Cox para análise de desfechos clínicos

Os desfechos clínicos (recorrência, novas lesões e transformação maligna) foram analisados pela curva de Kaplan-Meier (análise de sobrevida).

A curva de Kaplan-Meier, complementada pelo teste de log-rank, foi utilizada para analisar fatores que podem afetar a ocorrência dos desfechos clínicos, especificamente gênero, idade, localização da lesão, tamanho da lesão, superfície da lesão, grau de displasia, classificação binária, consumo de álcool, tabagismo e história familiar de neoplasia maligna. Os fatores foram dicotomizados para facilitar a análise estatística, conforme detalhado na tabela 4.2.

Tabela 4.2 - Fatores considerados para análise estatística

Fatores	**Dicotomização**	
Gênero	Feminino	Masculino
Idade	≥ 60 anos	< 60 anos
Localização da lesão	Borda língua, ventre língua, fauce, assoalho bucal	Demais localizações
Tamanho da lesão	≥ 2 cm	< 2 cm
Superfície da lesão	Não homogênea	Homogênea
Grau de displasia	Intensa	Ausente, discreta ou moderada
Classificação binária	Alto risco	Baixo risco
Álcool	Consumo habitual (>200g/semana)	Consumo esporádico
Tabagismo	Sim	Não
História familiar de neoplasia maligna	Sim	Não

O risco (*hazard ratio*) da ocorrência dos desfechos para cada fator estudado foi avaliado pela análise univariada de regressão de Cox. Análise multivariada de regressão de Cox foi realizada para verificar se há associação entre os fatores ou se são independentes para os desfechos clínicos analisados. Para a análise multivariada de Cox somente os fatores com $P < 0,1$ obtidos na análise univariada foram considerados. Significância estatística foi estabelecida para $P < 0,05$.

4.2.7.2 *Odds ratio* e x^2 para análise da expressão dos marcadores imuno-histoquímicos

Teste de *odds ratio* (razão de chance) foi utilizado para avaliar a frequência da expressão dos anticorpos anti-p53, anti-EGFR e anti-COX-2 entre os grupos de lesões LO e grupo controle (tecido de gengiva normal), entre lesões com e sem desfechos clínicos, entre lesões de alto e baixo risco e entre lesões que apresentaram e que não apresentaram displasia epitelial intensa.

Teste de x^2 avaliou possíveis diferenças de expressão entre os anticorpos EGFR S e EGFR SM nos grupos de lesões LO e no grupo controle (tecido de gengiva normal).

5 RESULTADOS

5.1 CARACTERÍSTICAS DEMOGRÁFICAS E HÁBITOS

A amostra deste estudo consisitiu de 40 pacientes, 23 homens– idade média de 56,56 anos (variação, 28–84 anos)– e 17 mulheres, idade média de 64,53 anos (variação, 33–88 anos).

Dezesseis pacientes relataram história familiar de neoplasia maligna, envolvendo o trato gastrointestinal (6 casos), a mucosa oral (4 casos), a mama (2 casos), o útero, pele e pulmão (1 caso em cada órgão), e 1 caso de localização não especificada. Dois pacientes relataram história pregressa de neoplasia maligna (1 caso mama, e outro com 2 neoplasias distintas, em cordas vocais e próstata).

Consumo habitual de tabaco e/ou álcool foi constatado em 19 homens (82,6%), dos quais 7 (30,4%) relataram consumo regular de tabaco e álcool, 11 (47,8%) somente de tabaco e 1 (4,3%) somente de álcool, enquanto 5 (21,7%) não relataram hábitos de risco. Entre as mulheres, foi constatado hábito de tabagismo em 6 pacientes (35.3%) e nenhum envolvendo consumo de álcool (Tabela 5.1). Apenas 2 pacientes (homens) cessaram o hábito de fumar após serem orientados a respeito da relação da LO com o tabaco.

Tabela 5.1 - Idade e hábitos de risco (fumo e álcool) de acordo com o gênero de pacientes com LO atendidos na Clínica de Estomatologia, de 2003 a 2009

	Gênero	
	Homens	**Mulheres**
Idade		
< 60 anos	15	6
≥ 60 anos	8	11
Tabagismo		
≤ 20 cig/dia	11	6
> 20 cig/dia	7	0
não	5	11
Álcool*		
< 200 g/semana	3	0
≥ 200 g/semana	5	0
não	15	17

*De acordo com o consumo seguro de álcool estabelecido pelo Centers for Disease Control and Prevention, 2005

5.2 CARACTERÍSTICAS CLÍNICAS DAS LOS

Características clínicas e localização das lesões estão detalhadas na tabela 5.2. O aspecto homogêneo foi a característica clínica predominante nas LOs (33/49; 67,3%), a maioria das lesões media menos que 2 cm de diâmetro (28/49; 57,1%), e os sítios mais afetados foram: borda de língua (13/49; 26,5%), mucosa jugal (10/49; 20,4%) e assoalho bucal (7/49; 14,3%).

Tabela 5.2 - Características clínicas (tipo e tamanho) de acordo com a localização das LOs (n = 49)

	Características de superfície			**Tamanho**			
Localização	**Homog**	**Não homog**	**Total**	**<2 cm**	**2 a 4 cm**	**>4 cm**	**Total**
Borda de língua	6	7	13	2	8	3	13
Mucosa jugal	9	1	10	8	2	0	10
Assoalho bucal	5	2	7	4	3	0	7
Palato duro	3	1	4	4	0	0	4
Gengiva	1	1	2	1	0	1	2
Rebordo alveolar	3	1	4	4	0	0	4
Palato mole	3	0	3	3	0	0	3
Fauces	0	2	2	1	1	0	2
Dorso de língua	1	1	2	1	1	0	2
Ventre de língua	0	1	1	0	1	0	1
Trígono retromolar	1	0	1	1	0	0	1
Subtotal	32	17	49	29	16	4	49

Homog = homogênea
Não homog = não homogênea

5.3 TRATAMENTO CIRÚRGICO COM *LASER* DE ALTA POTÊNCIA

Um total de 49 lesões foi observado nos 40 pacientes; 9 pacientes apresentavam mais de uma lesão. O tempo médio de acompanhamento dos pacientes foi de 22 meses (variação, 6–71 meses).

Remoção cirúrgica por *laser* de alta potência foi o tratamento preferencial para a maioria das lesões. Tratamento por vaporização foi indicado em 8 lesões devido à proximidade delas à superfície dental (3 casos), a ductos salivares (2 casos) e a vasos sanguíneos superficiais (3 casos). Biópsia excisional com *laser* de alta potência foi realizada em 12 lesões menores que 1 cm.

Durante o pós-operatório o sintoma mais frequentemente relatado foi de “queimação”, controlado pelo uso de bochechos com cloridrato de benzidamina 0,15%. O uso de análgesicos foi prescrito quando necessário. A ocorrência de dor esteve associada à localização da LO, principalmente em borda de língua e mucosa jugal. Medicação antiinflamatória não esteroidal foi utilizada para 7 pacientes, 5 tinham LOs em borda de língua, 1 em mucosa jugal e 1 em assoalho. Os sintomas ocorreram predominantemente do 3º ao 10º dia após a intervenção cirúrgica.

Reparo com re-epitelização completa da mucosa tratada por cirurgia a *laser* foi observado em 4 a 5 semanas após o tratamento. Durante a reparação 2 pacientes apresentaram tecido hiperplásico de aspecto granulomatoso, removidos por vaporização com *laser* de CO_2 em um caso, e por cirurgia convencional em outro, com subsequente reparação completa.

5.4 ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA

Análise histopatológica das biópsias das LO revelou que 61,2% dos espécimes apresentaram displasia epitelial (30/49), 9 (18,3%) com displasia intensa, 14 (28,6%) com displasia moderada e 7 (14,3%) com displasia leve. Análise pela classificação do sistema binário (Kujan et al., 2006) identificou apenas 7 lesões de alto risco e 42 lesões de baixo risco.

5.5 DESFECHOS CLÍNICOS OBSERVADOS (RECORRÊNCIAS, DESENVOLVIMENTO DE NOVAS LESÕES E TRANSFORMAÇÃO MALIGNA)

Recorrência (reaparecimento da lesão no mesmo sítio inicial) foi observada em 7 pacientes (17,5%); desenvolvimento de novas lesões (surgimento de lesão de LO em sítio distinto do inicial) em 4 pacientes (10%); desfechos de recorrência seguidos de desenvolvimento de nova lesão em 4 pacientes (10%). Desfechos clínicos (recorrência ou desenvolvimento de novas lesões) foram mais frequentes em língua (6 casos) e assoalho bucal (3 casos). Dois pacientes (5%) desenvolveram lesão maligna (carcinoma epidermoide) em sítios diferentes da lesão inicial. Malignização ocorreu em média 11,3 meses após o tratamento da lesão inicial. Detalhamento dos casos com desfechos clínicos são mostrados na tabela 5.3.

5.5.1 Curva de Kaplan-Meier (análise de sobrevida), log-rank e análise de regressão de Cox

Curva de Kaplan-Meier mostrou que a probabilidade de os pacientes estarem livres de qualquer desfecho clínico após 20 meses foi de aproximadamente 50% (Figura 5.1). Para o desfecho de recorrência isoladamente, foi de aproximadamente 70% (Figura 5.2), e para o desfecho de novas lesões, de 50% (Figura 5.3). Após 20 meses de acompanhamento, a curva manteve-se no mesmo nível para o desfecho de recorrência, porém decresceu para o desfecho de novas lesões.

Tabela 5.3 - Detalhamento de características clínicas e histológicas de pacientes com LOs que tiveram desfechos de recorrência, desenvolvimento de novas lesões ou transformação maligna

Nº	Idade	Gênero	Localização da lesão	Grau de displasia (OMS, 2005)	Classificação do risco (Kujan, 2006)	Desfecho	Tempo para o desfecho	Tempo de acompanhamento
1	28	M	Borda língua	Intensa	Alto risco	Recorrência	3 meses	30 meses
2	62	F	Assoalho bucal	Intensa	Baixo risco	Recorrência Nova lesão	6 meses 7meses	27 meses
3	78	F	Mucosa jugal	Moderada	Baixo risco	Recorrência	8 meses	13 meses
4	66	F	Gengiva vestibular	Sem displasia	Baixo risco	Nova lesão	17 meses	29 meses
5	78	F	Mucosa jugal	Sem displasia	Baixo risco	Recorrência Nova lesão	6 meses 20 meses	24 meses
6	70	M	Borda língua	Moderada	Alto risco	Recorrência	9 meses	56 meses
7	73	F	Mucosa jugal	Moderada	Baixo risco	Recorrência Nova lesão	2 meses 24 meses	43 meses
8	55	M	Ventre língua	Sem displasia	Baixo risco	Recorrência	1 mês	6 meses
9	64	F	Borda língua	Moderada	Baixo risco	Nova lesão	7 meses	20 meses
10	83	M	Fauce	Intensa	Alto risco	Transformação maligna	6 meses	12 meses
11	58	F	Dorso língua	Sem displasia	Baixo risco	Recorrência	6 meses	27 meses
12	55	F	Assoalho bucal	Discreta	Baixo risco	Nova lesão	4 meses	6 meses
13	38	M	Dorso língua	Moderada	Baixo risco	Recorrência Nova lesão	24 meses 24 meses	49 meses
14	79	F	Borda língua	Moderada	Baixo risco	Nova lesão	41 meses	67 meses
15	38	M	Rebordo alveolar	Sem displasia	Baixo risco	Recorrência	12 meses	27 meses
16	45	M	Borda língua	Intensa	Baixo risco	Recorrência	9 meses	71 meses
17	57	F	Mucosa jugal	Sem displasia	Baixo risco	Transformação maligna	19 meses	20 meses
18	58	M	Assoalho bucal	Intensa	Alto risco	Recorrência	1 mês	18 meses

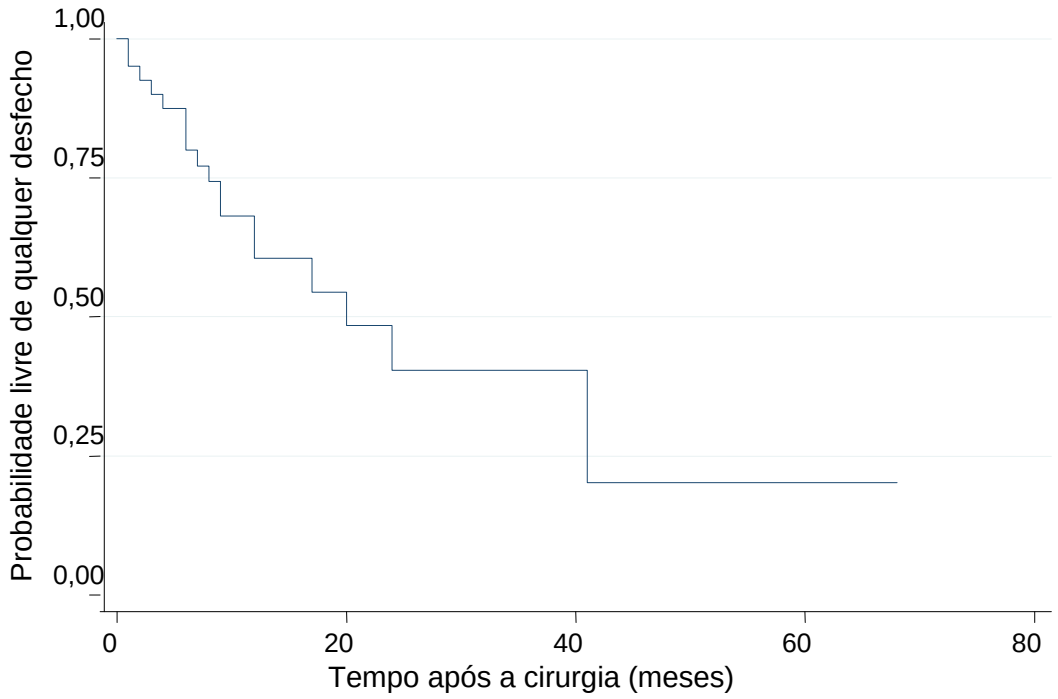

Figura 5.1 - Curva de Kaplan-Meier para os desfechos clínicos em conjunto (recorrência, desenvolvimento de novas lesões ou transformação maligna)

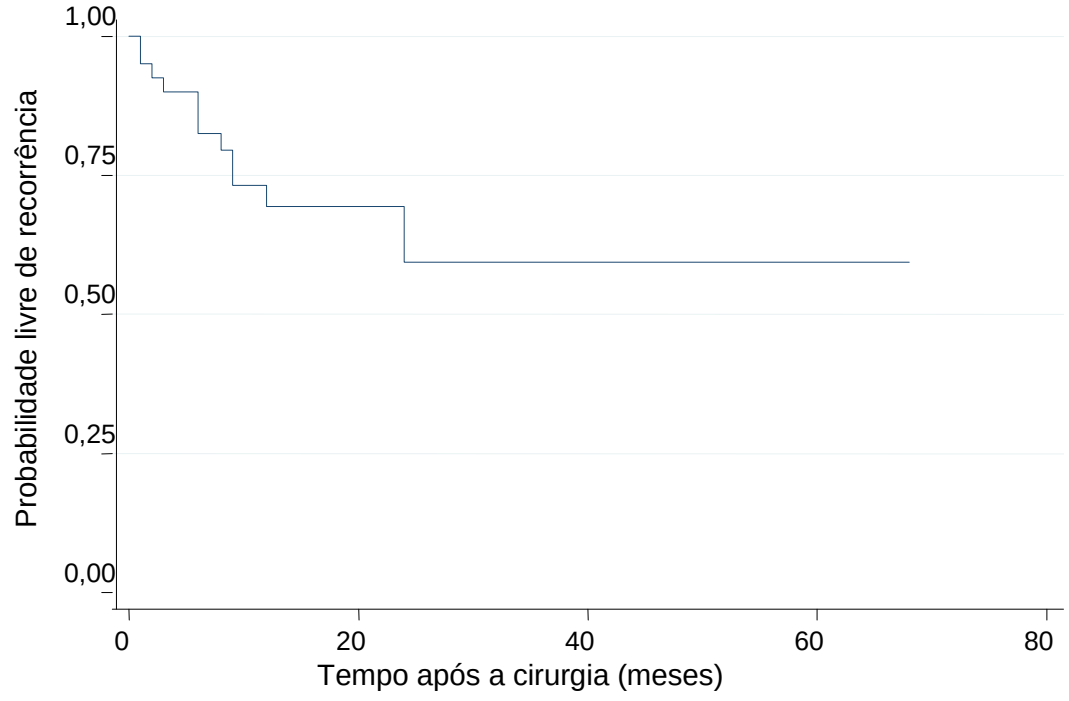

Figura 5.2 - Curva de Kaplan-Meier para o desfecho de recorrência

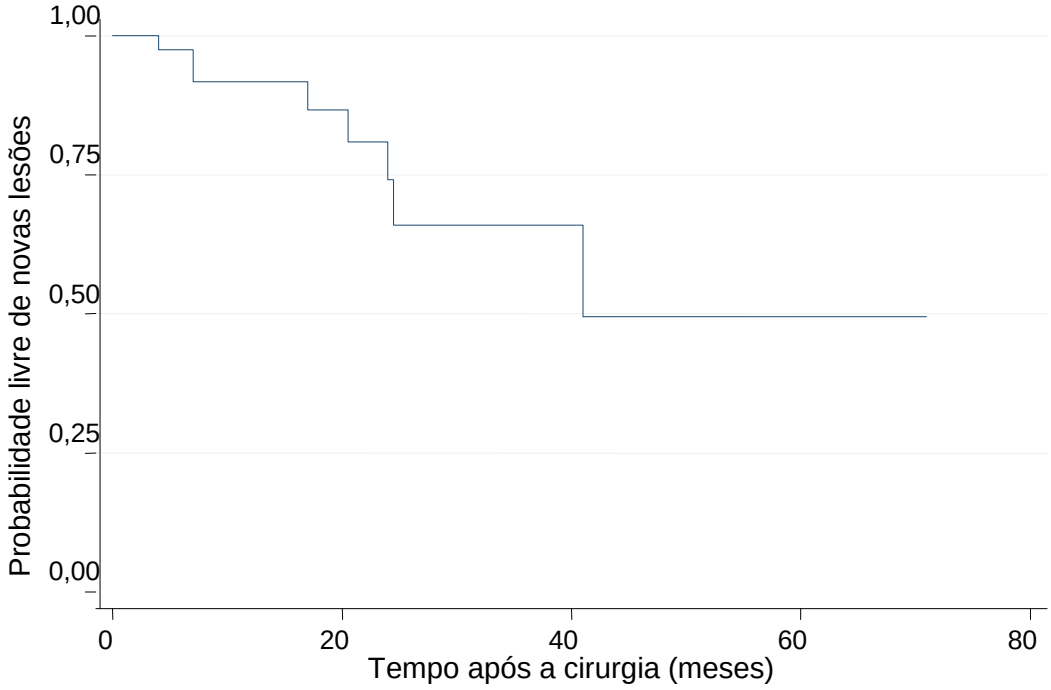

Figura 5.3 -Curva de Kaplan-Meier para o desfecho de desenvolvimento de novas lesões

Teste de log-rank mostrou associação estatisticamente significante para o grupo de pacientes com lesões de alto risco em comparação com os de lesões de baixo risco, para os desfechos clínicos analisados conjuntamente (*P* = 0,009) e para o desfecho de recorrência isoladamente (*P* = 0,037) (Figuras 5.4A e 5.4B). Para o desfecho de novas lesões isoladamente, verificou-se associação estatisticamente significante para o grupo de pacientes > 60 anos (*P* = 0,024) e para as mulheres (*P* = 0,059) (Figuras 5.5A e 5.5B).

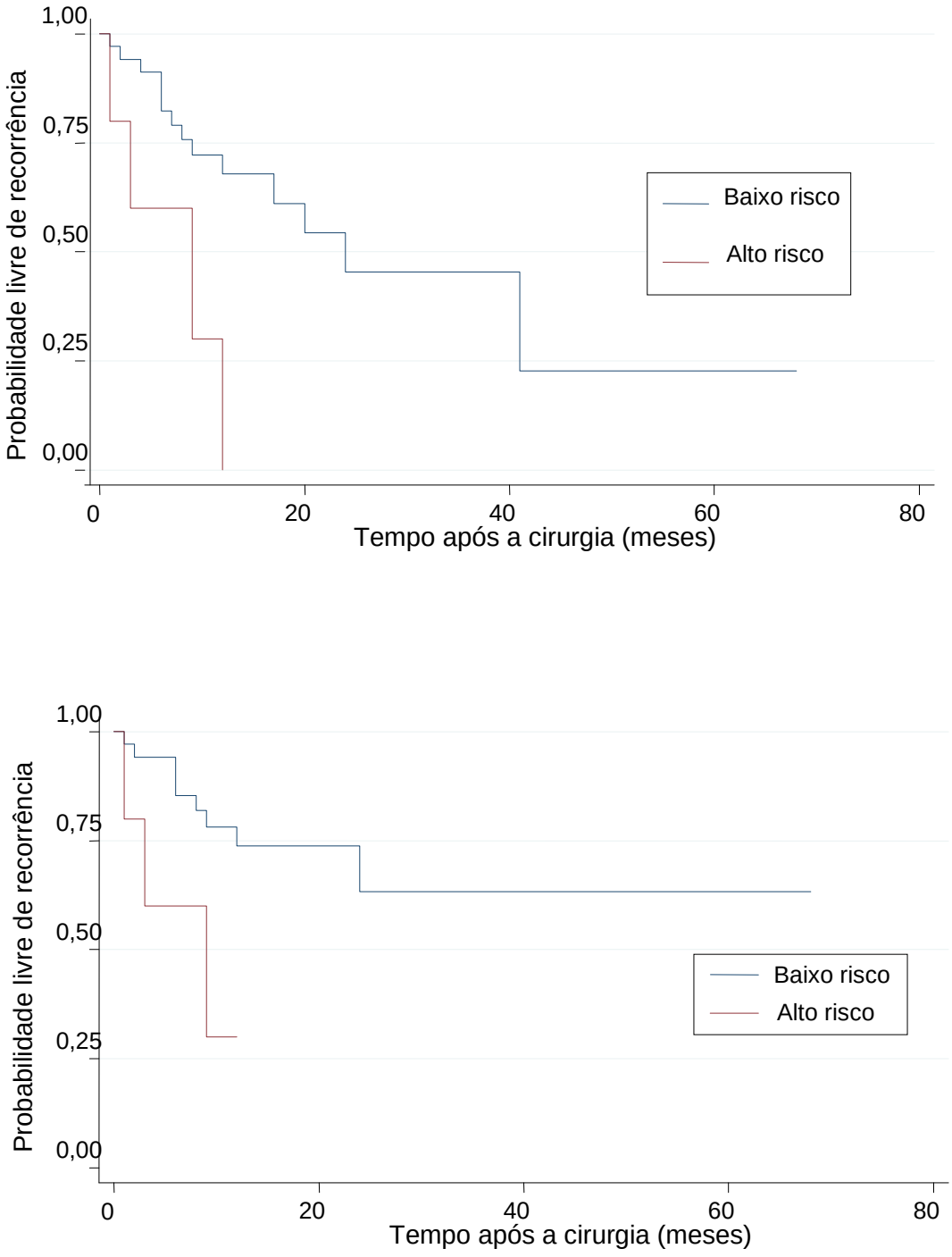

Figura 5.4 - Curva de Kaplan-Meier dos grupos de pacientes apresentando lesões iniciais de alto ou baixo risco, para os desfechos clínicos em conjunto (recorrência, desenvolvimento de novas lesões ou transformação maligna); log-rank *P* = 0,009 (A) e para o desfecho de recorrência isoladamente; log-rank *P* = 0,037 (B)

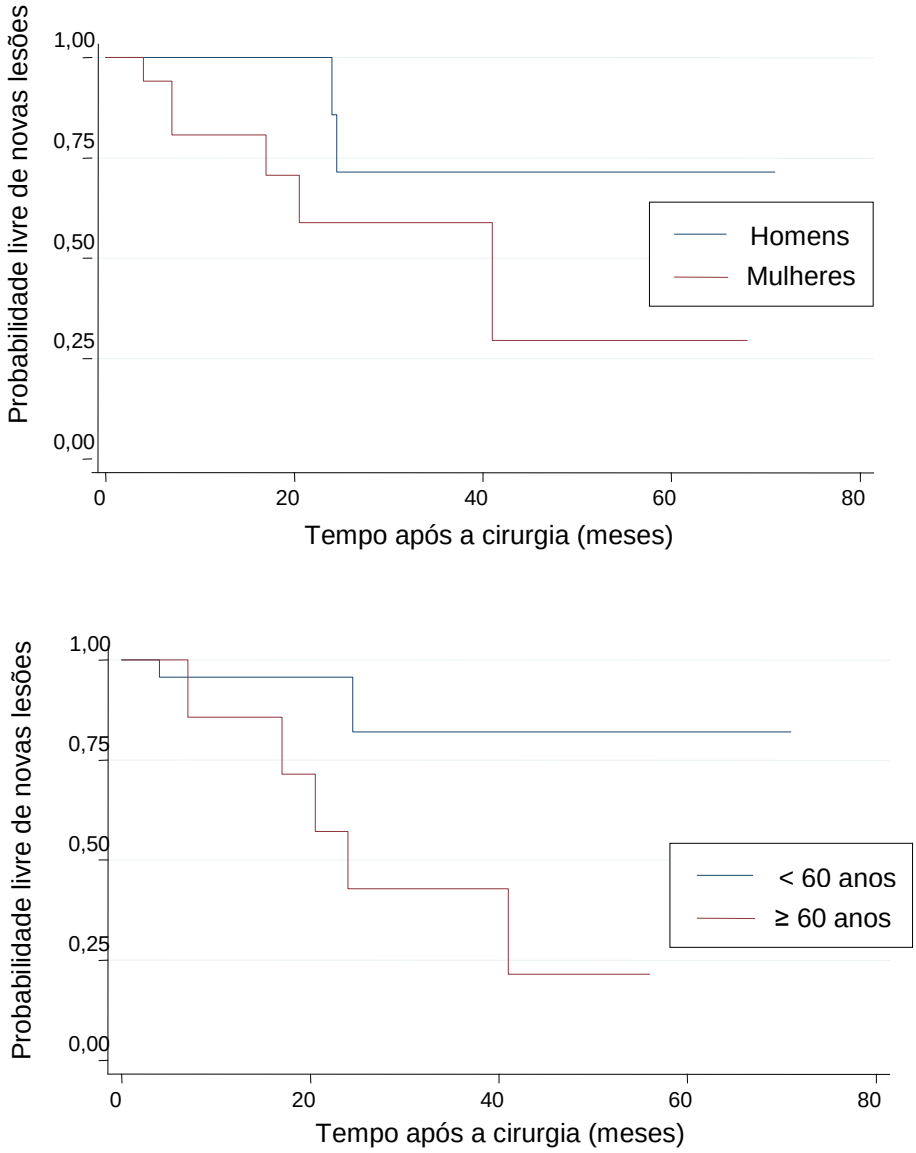

Figura 5.5 - Curva de Kaplan-Meier dos grupos de pacientes para o desfecho de desenvolvimento de novas lesões de acordo com o gênero; log-rank *P* = 0,059 (A) e a idade; log-rank *P* = 0,024 (B)

O resultado da análise de regressão univariada de Cox (Tabela 5.4) para os fatores associados aos desfechos clínicos analisados em conjunto mostrou que pacientes classificados como portadores de lesões de alto risco apresentam um risco maior para o desenvolvimento de desfechos clínicos do que pacientes com lesões de baixo risco (*hazard ratio* = 4,09; IC = 1,65–10,14). Outros fatores analisados (gênero, idade, localização da lesão, superfície da lesão, grau de displasia, álcool, tabagismo, história familiar de neoplasia maligna) não tiveram influência estatisticamente significante como fatores de risco para a ocorrência de desfechos clínicos (*P* > 0,05). Com relação ao tamanho das lesões, observou-se maior risco para o desenvolvimento dos desfechos clínicos em lesões maiores que 2 cm do que lesões menores que 2 cm, porém a diferença não foi estatisticamente significante (*P* = 0,094). Utilizando a análise de regressão multivariada de Cox para avaliar se existe associação entre lesões de alto risco e lesões > 2 cm para a ocorrência dos desfechos clínicos verificou-se que lesões de alto risco constituem por si só fator de risco independentemente do tamanho da lesão (*hazard ratio* = 4,8; IC = 1,72–13,49; Tabela 5.5).

Tabela 5.4 - Análise de regressão univariada de Cox para desfechos clínicos em conjunto (recorrência, desenvolvimento de novas lesões e transformação maligna)

Variável	*Hazard ratio*	*P*	IC (95%)
Gênero	1,06	0,895	0,41–2,70
Idade	1,51	0,370	0,61–3,75
Localização da lesão	0,94	0,894	0,38–2,32
Tamanho da lesão**	2,19	**0,094**	0,87–5,53
Superfície da lesão	1,37	0,486	0,55–3,41
Grau de displasia	2,24	0,124	0,80–6,26
Classificação binária	4,09	**0,002***	1,65–10,14
Álcool	0,68	0,651	0,13–3,50
Tabagismo	0,88	0,781	0,36–2,11
História familiar de neoplasia maligna	0,64	0,382	0,24–1,72

* estatisticamente significante (*P* < 0,05)

** variável considerada para análise de regressão multivariada (*P* < 0,01)

Tabela 5.5 - Análise de regressão multivariada de Cox para desfechos clínicos em conjunto (recorrência, desenvolvimento de novas lesões e transformação maligna)

Variável	*Hazard ratio*	*P*	IC (95%)
Tamanho da lesão	2,4	0,069	0,93–6,26
Classificação binária	4,8	0,003	1,72–13,49

Análise de regressão univariada de Cox foi usada para testar isoladamente os desfechos de recorrência e novas lesões, mas não para transformação maligna, pois houve apenas 2 casos com este desfecho.

Análise de regressão univariada de Cox usada para testar os desfechos clínicos isoladamente mostrou que o risco para o desfecho de recorrência (Tabela 5.6) foi maior para pacientes com lesões de alto risco comparado com o de pacientes com lesões de baixo risco (*hazard ratio* = 3,69; IC = 1,03–13,11). Como nenhuma outra variável testada apresentou valor de *P* estatisticamente significante e valores de *P* < 0,1, para o desfecho de recorrência não foi realizada análise de regressão multivariada de Cox. O risco do desfecho de novas lesões (Tabela 5.7) foi maior para pacientes do gênero feminino (*hazard ratio* = 4,22; IC = 0,94–18,85) e para pacientes com idade ≥ 60 anos (*hazard ratio* = 5,32; IC = 1,10–25,54), mas somente o último apresentou diferença estatisticamente significante. Análise de regressão multivariada de Cox para pacientes do gênero feminino e pacientes com idade ≥ 60 anos mostrou que os dois fatores (idade e gênero) são interdependentes para a ocorrência de novas lesões. Os dois fatores isoladamente não têm influência estatisticamente significante no desenvolvimento de novas lesões (*P* > 0,05; Tabela 5.8).

Tabela 5.6 - Análise de regressão univariada de Cox para o desfecho clínico de recorrência

Variável	***Hazard ratio***	***P***	**IC (95%)**
Gênero	0,58	0,393	0,17–1,99
Idade	0,96	0,950	0,31–2,98
Localização da lesão	0,76	0,637	0,25–2,28
Tamanho da lesão	1,93	0,240	0,64–5,85
Superfície da lesão	1,52	0,443	0,51–4,50
Grau de displasia	2,55	0,122	0,77–8,39
Classificação binária	3,69	**0,044***	1,03–13,11
Álcool	1,01	0,990	0,19–5,17
Tabagismo	1,34	0,617	0,42–4,24
História familiar de neoplasia maligna	0,57	0,367	0,16–1,92

*estatisticamente significante (*P* < 0,05)

Tabela 5.7 - Análise de regressão univariada de Cox para o desfecho clínico de desenvolvimento de novas lesões

Variável	*Hazard ratio*	*P*	IC (95%)
Gênero**	4,22	**0,059**	0,94–18,85
Idade	5,32	**0,037***	1,10–25,54
Localização da lesão	0,64	0,459	0,20–2,04
Tamanho da lesão	2,62	0,168	0,66–10,36
Superfície da lesão	0,40	0,244	0,09–1,83
Grau de displasia	0,52	0,577	0,05–4,95
Classificação binária[o]	–	–	–
Álcool	1,16	0,874	0,17–7,74
Tabagismo	0,38	0,167	0,09–1,49
História familiar de neoplasia maligna	1,70	0,447	0,42–6,81

* estatisticamente significante ($P < 0,05$)
** variável considerada para análisede regressão multivariada ($P < 0,01$)
[o] não foi possível realizar o teste

Tabela 5.8 - Análise de regressão multivariada de Cox para o desfecho clínico de desenvolvimento de novas lesões

Variável	*Hazard ratio*	*P*	IC (95%)
Gênero	3,10	0,138	0,69–13,90
Idade	4,14	0,101	0,75–22,64

5.6 EXPRESSÃO DOS ANTICORPOS ANTI-P53, ANTI-COX-2, ANTI-EGFR S E ANTI-EGFR SM

As reações imunohistoquímicas foram realizadas em 39 das 49 lesões de LO; 10 blocos parafinados de biópsia de LO não apresentavam material suficiente para processar as reações.

O anticorpo anti-p53 foi positivo em 26 lesões de LO (26/39; 66,6%) e em 4 espécimes do grupo controle (4/20; 20%). No entanto, a expressão no grupo controle foi restrita à camada basal, enquanto no grupo LO não houve predomínio de expressão em uma camada específica (Figuras 5.6A e 5.6B).

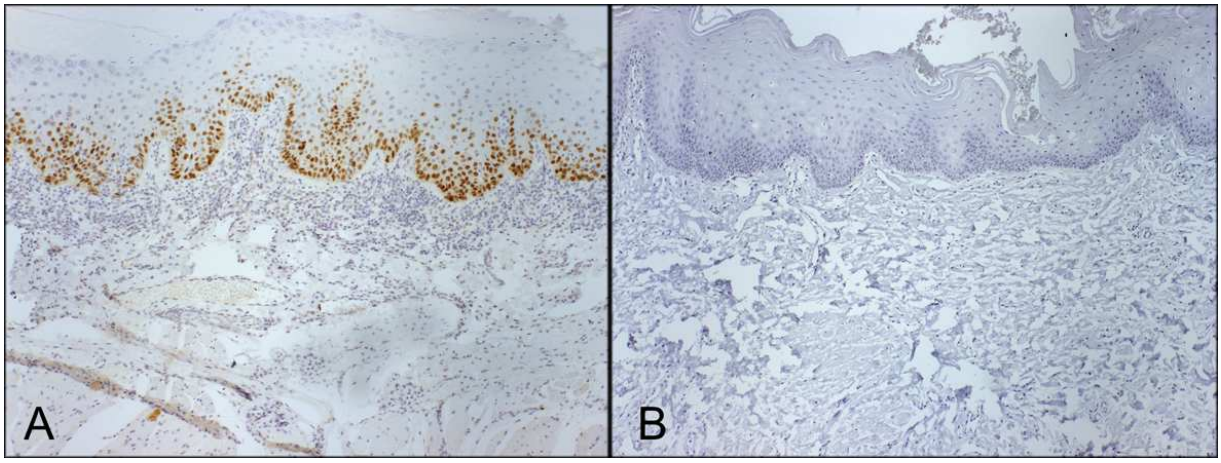

Figura 5.6 - Padrão de marcação do anticorpo anti-p53 nas LOs (A) e no grupo controle (B) (aumento de 100 x)

O anticorpo anti-COX2 foi positivo em 21 lesões de LO (21/39; 53,8%), apresentando padrão de expressão focal e mais frequente na camada basal, especialmente em lesões com displasia epitelial intensa ou de alto risco. Em espécimes do grupo controle o anti-COX2 marcou a camada basal em apenas 2 casos (2/20; 10%; Figuras 5.7A e 5.7B).

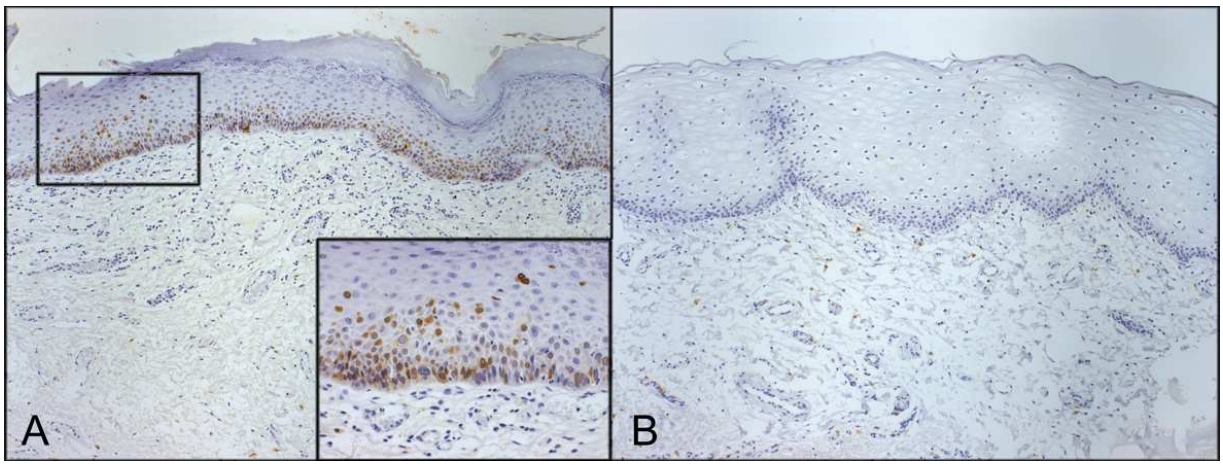

Figura 5.7 - Padrão de marcação do anticorpo anti-COX-2 nas LOs (A) e no grupo controle (B) (aumento de 100 x); em detalhe pode-se observar marcação citoplasmática de células epiteliais na camada basal, parabasal e espinhosa (aumento de 400 x)

Os anticorpos anti-EGFR apresentaram padrão de expressão uniforme em lesões de LO e no grupo controle. O anticorpo anti-EGFR S foi positivo desde a camada basal até a camada espinhosa em 11 lesões do grupo de LO (11/39; 28%) e em 11 espécimes do grupo controle (11/20; 55%). O anticorpo anti-EGFR SM foi positivo desde a camada basal até a espinhosa em 20 lesões de LO (21/39; 53,8%) e em 10 espécimes do grupo controle (10/20; 50%; Figuras 5.8A, 5.8B e 5.9A, 5.9B).

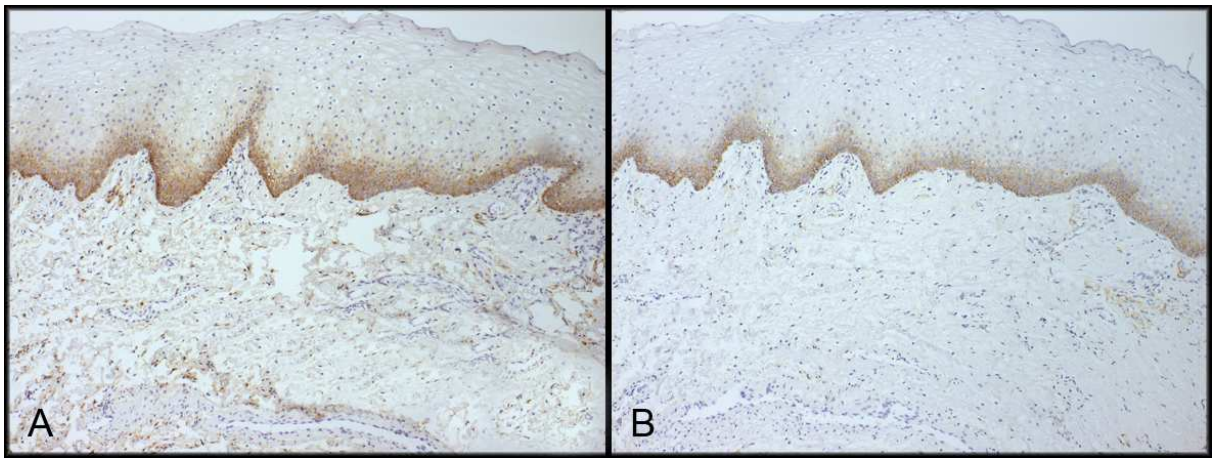

Figura 5.8 - Padrão de marcação do anticorpo anti-EGFR S (A) e anti-EGFR SM (B) no grupo controle (aumento de 100 x); nota-se a expressão dos dois clones nos mesmos estratos do epitélio (camada basal)

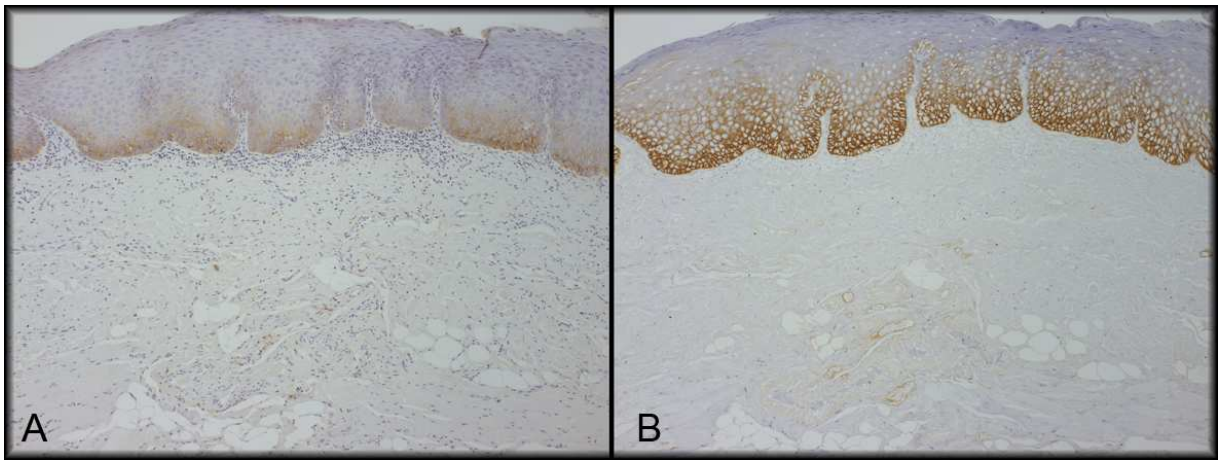

Figura 5.9 - Padrão de marcação do anticorpo anti-EGFR S e anti-EGFR SM no grupo de LOs (aumento de 100 x); nota-se a expressão do anti-EGFR S restrito à camada basal (A), enquanto a expressão do anti-EGFR SM se estende até camada espinhosa (B)

5.6.1 Análise da expressão dos anticorpos

De acordo com os resultados observados na análise microscópica, a variável expressão dos anticorpos foi dicotomizada para permitir a análise estatística.

- Anticorpos anti-p53 e anti-COX-2 dicotomizados em: ausência de marcação e marcação em qualquer estrato do epitélio (camada basal, parabasal ou espinhosa).
- Anticorpos anti-EGFR S e anti-EGFR SM dicotomizados em: ausência de marcação na camada espinhosa (sem marcação, marcação nas camadas basal ou parabasal) e marcação na camada espinhosa.

A análise pelo teste de *odds ratio* mostrou associação estatisticamente significante da expressão do p53 (OR = 4,66; IC = 1,45–14,96) e do COX-2 (OR = 10,50; IC = 2,13–51,52) no grupo de pacientes com LO comparados com a do grupo controle (Tabela 5.9). Não houve diferença estatisticamente significante quando a expressão dos anticorpos (p53, COX-2, EGFR S e EGFR SM) no grupo de pacientes com desfechos clínicos foi comparada com a dos pacientes sem desfechos clínicos (*P* > 0,05; Tabela 5.10). Não houve diferença estatisticamente significante da expressão dos anticorpos (p53, COX-2, EGFR S e EGFR SM) entre o grupo de lesões de baixo risco comparado com a do grupo de lesões de alto risco (*P* > 0,05; Tabela 5.11). Não houve associação estatisticamente significante da expressão dos anticorpos p53, EGFR S e EGFR SM entre as lesões com displasias intensas comparadas com as lesões de menor grau de displasia e sem displasia (*P* > 0,05; Tabela 5.12). Dada a amplitude de expressão do anticorpo anti-COX-2 não foi possível executar o teste estatístico.

A análise do teste de x^2 mostrou que a diferença de expressão entre os anticorpos anti-EGFR S e anti-EGFR SM nos cortes histológicos das LOs não foi estatisticamente significante (*P* = 0,064; Tabela 5.13). Também não houve diferença estatisticamente significante de expressão entre os anticorpos anti-EGFR S e anti-EGFR SM nos cortes histológicos de mucosa gengival normal do grupo controle (*P* = 1; Tabela 5.14).

Tabela 5.9 - Distribuição da marcação dos anticorpos nos grupos de pacientes com LO e grupo controle

Marcação do anticorpo	Grupo LO (n = 39)	Grupo controle (n = 20)	*Odds ratio*	*P*	IC (95%)
p53					
positiva	26	6	4,66	**0,016***	1,45–14,96
negativa	13	14			
COX2					
positiva	21	2	10,50	**0,002***	2,13–51,52
negativa	18	18			
EGFR S					
esp positiva	11	11	0,32	0,08	0,10–0,08
esp negativa	28	9			
EGFR SM					
esp positiva	20	10	1,05	0,8	0,35–3,09
esp negativa	19	10			

* estatisticamente significante ($P < 0,05$)
esp positiva: marcação positiva na camada espinhosa
esp negativa: ausência de marcação na camada espinhosa

Tabela 5.10 - Distribuição da marcação dos anticorpos nos grupos de pacientes de LO com desfecho clínico e sem desfecho clínico

Marcação do anticorpo	Grupo com desfecho (n = 18)	Grupo sem desfecho (n = 21)	*Odds ratio*	*P*	IC (95%)
p53					
positiva	12	14	1	0,733	0,16–2,39
negativa	6	7			
COX2					
positiva	11	10	1,72	0,602	0,48–6,20
negativa	7	11			
EGFR S					
esp positiva	5	6	0,96	0,762	0,23–3,89
esp negativa	13	15			
EGFR SM					
esp positiva	11	9	2,09	0,414	0,58–7,55
esp negativa	7	12			

esp positiva: marcação positiva na camada espinhosa
esp negativa: ausência de marcação na camada espinhosa

Tabela 5.11 - Distribuição da marcação dos anticorpos de acordo com a classificação binária

Marcação do anticorpo	Alto risco (n = 7)	Baixo risco (n = 32)	*Odds ratio*	*P*	IC (95%)
p53					
positiva	3	23	0,29	0,302	0,05–1,58
negativa	4	9			
COX2					
positiva	6	15	6,80	0,147	0,73–36,11
negativa	1	17			
EGFR S					
esp positiva	1	10	0,36	0,660	0,03–3,46
esp negativa	6	22			
EGFR SM					
esp positiva	3	17	0,66	0,940	0,12–3,44
esp negativa	4	15			

esp positiva: marcação positiva na camada espinhosa
esp negativa: ausência de marcação na camada espinhosa

Tabela 5.12 - Distribuição da marcação dos anticorpos de acordo com a classificação da displasia (OMS,2005)

Marcação do anticorpo	Intensa (n = 9)	Não intensa (n = 30)	*Odds ratio*	*P*	IC (95%)
p53					
positiva	5	21	0,53	0,686	0,11–2,42
negativa	4	9			
COX2º					
positiva	9	12	–	–	–
negativa	0	18			
EGFR S					
esp positva	1	10	0,25	0,380	0,02–2,28
esp negativa	8	20			
EGFR SM					
esp positiva	5	15	1,25	0,930	0,27–5,58
esp negativa	4	15			

º não foi possível realizar o teste
esp positiva: marcação positiva na camada espinhosa
esp negativa: ausência de marcação na camada espinhosa

Tabela 5.13 - Distribuição da marcação das proteínas EGRF S e EGFR SM entre as lesões leucoplásicas

Marcação do anticorpo	EGFR S (n = 39)	EGFR SM (n = 39)	X^2	*P*	X^2 Correção de Yates	*P*
esp positiva	11	20	4,33	0,037	3,42	0,064
esp negativa	28	19				

* estatisticamente significante ($P < 0,05$)
esp positiva: marcação positiva na camada espinhosa
esp negativa: ausência de marcação na camada espinhosa

Tabela 5.14 - Distribuição da marcação das proteínas EGRF S e EGFR SM entre espécimes do grupo controle

Marcação do anticorpo	EGFR S (n = 20)	EGFR SM (n = 20)	X^2	*P*	X^2 Correção de Yates	*P*
esp positiva	11	10	0,10	0,751	0,00	1,000
esp negativa	9	10				

esp positiva: marcação positiva na camada espinhosa
esp negativa: ausência de marcação na camada espinhosa

6 DISCUSSÃO

Durante o período de 2003 a 2009, 40 pacientes com LO foram examinados e diagnosticados em nossa clínica, correspondendo à média de 5,7 pacientes ao ano. Comparativamente, a frequência de atendimento de pacientes com LO em nossa clínica aproxima-se à da média de atendimento relatada em outros estudos, de 8,6 pacientes por ano (Schepman et al. 1998; Saito et al., 2001; Thomson; Wylie, 2002; Chandu; Smith, 2005; van der Hem et al., 2005; Holmstrup et al., 2006). Alguns desses estudos são realizados em centros de referências, onde a média de atendimento ultrapassa 11 pacientes por ano.

Embora não haja dados exatos da prevalência da LO em nossa população, o número de atendimentos anuais registrados neste estudo indica que é uma doença de relativa frequência, o que demanda investigações constantes, sobretudo por ser uma lesão cancerizável. O fato de a LO ser uma doença geralmente assintomática, sendo por isso diagnosticada, na maioria dos casos, em exame clínico de rotina, representa um dado que pode caracterizar uma sub-representação da doença em ambulatórios.

Estudos populacionais em geral mostram que a LO afeta predominantemente indivíduos na faixa etária entre 50 e 70 anos, e com maior incidência em homens, com a relação homens/mulheres de 2,5 a 3:1 (Petti, 2003). A média de idade observada nos pacientes deste estudo foi de 60,5 anos, com maior prevalência em homens, porém a relação homem/mulher foi de 1,3:1, semelhante à de resultados de outros estudos similares, mostrando que a LO tende a ocorrer com igual frequência em homens e mulheres em atendimento ambulatorial (Napier; Speight, 2008). A maior prevalência da doença em homens, verificada em estudos populacionais, pode ser explicada pela maior exposição dos homens aos hábitos de tabagismo. A tendência do número de casos de LO ocorrer de forma similar em homens e mulheres nos ambulatórios deve-se provavelmente a maior procura pela mulher a cuidados preventivos de saúde, permitindo a identificação da LO com mais frequência, enquanto nos homens a identificação ocorreria em menor proporção e de forma mais casual.

Em relação à localização das lesões, este estudo mostrou que borda lateral da língua, mucosa jugal e assoalho bucal foram os sítios mais afetados, em ordem

decrescente. Estudos epidemiológicos indicam resultados um pouco diferentes, sendo a mucosa bucal a área mais afetada (Napier; Speight, 2008). Características clínicas predominantemente observadas neste estudo foram o aspecto homogêneo (67,3%) e tamanho de até 4 cm (89,9%). Segundo a literatura, LOs em áreas como borda lateral da língua e assoalho bucal, aspecto não homogêneo e lesões maiores que 4 cm apresentam maior risco de malignização (van der Waal, 2009). Todavia, há registros de malignização de LOs também em lesões de aspecto homogêneo e menores que 4 cm. Clinicamente não há dados que possam prognosticar com confiabilidade lesões que irão ou não ter transformação maligna. Baseado nisto, não houve diferença de conduta clínica entre pacientes que apresentaram lesões homogêneas e não homogêneas e também lesões menores ou maiores que 4 cm. Essa conduta incluiu lesões que não apresentaram displasia epitelial. Quanto à localização, lesões localizadas em borda e assoalho de língua tiveram uma avaliação mais rigorosa, pois como já mencionado, o índice de malignização nessas áreas é acentuadamente mais elevado.

Um dos objetivos deste estudo foi avaliar a eficácia do *laser* de alta potência no tratamento das LOs. Dados do aspecto terapêutico mostraram que os *lasers* de alta potência utilizados (de CO_2 e de diodo) foram eficientes para a remoção cirúrgica das LOs, e o pós-operatório foi bem tolerado pela maioria dos pacientes, independentemente do tipo de *laser*. A sintomatologia dolorosa esteve mais associada a áreas de atrito constante, como borda lateral da língua e mucosa jugal, do que em áreas menos sujeitas a traumas, como o assoalho bucal.

Complicações pós-operatórias foram observadas somente em dois casos, caracterizadas pela reparação tardia associada ao aparecimento de granulomas nas áreas irradiadas. Em um dos casos esta complicação pôde ser atribuída à menor vascularização do local da cirurgia (palato duro) associada ao intenso hábito de tabagismo, e, no outro caso, à condição sistêmica do paciente (*diabetes mellitus*) e possível trauma da região. Complicações após a remoção das LOs por *laser* de alta potência provavelmente não são comuns (há poucos casos relatados na literatura), porém esses tipos *lasers* devem ser manipulados somente por profissionais habilitados.

Embora o tratamento preferencial para as LOs seja o cirúrgico, principalmente pelo uso dos *lasers*, devido à rapidez e ao melhor controle do sangramento que esses instrumentos cirúrgicos oferecem, os pacientes não permanecem livres de

recorrência ou do aparecimento de novas lesões (Lodi; Porter, 2008). Durante avaliações periódicas após excisão cirúrgica das LOs, recorrências ou desenvolvimento de novas lesões foram observados em 37,5% dos pacientes; recorrências isoladamente corresponderam a 27,5% dos casos. Esses resultados não diferem dos dados relatados na literatura científica, que registram uma variação de 10% a 57% (Lodi; Porter, 2008).

Variações do percentual de recorrências e desenvolvimento de novas lesões têm sido atribuídas a critérios de inclusão e exclusão dos pacientes e aos equipamentos cirúrgicos utilizados. Especificamente, alguns estudos excluíram pacientes com alto grau de displasia, favorecendo a diminuição das taxas de recorrência; outros utilizaram microscópio associado ao *laser*, o que permite uma melhor execução da técnica, reduzindo também o grau de recorrência (Frame et al., 1984; Chu et al., 1988; Chiesa et al., 1990; Roodenburg et al., 1991; van der Hem et al., 2005; Holmstrup et al., 2006; Lodi; Porter, 2008; Vivek et al., 2008).

Apenas 2 casos com transformação maligna foram observados neste estudo, correspondendo a 5% da casuística, compatível com os percentuais de transformação maligna das LOs registrados na literatura (4%–12%). Deve ser ressaltado que os 2 casos observados ocorreram em localizações distintas do sítio inicial da LO. O desenvolvimento de lesões malignas em sítios distintos da lesão inicial também foi notado em outros estudos (Schepman et al., 1998; Chandu; Smith, 2005; Hamadah; Thomson, 2009), sugerindo a presença de alterações distribuídas em toda a mucosa oral, corroborando com a ideia da existência de um campo de cancerização que acomete o epitélio oral como um todo. Essas malignizações em sítios distintos da lesão inicial reforçam a necessidade do acompanhamento dos pacientes com LO por período indefinido, tão longo quanto possível.

Outro dado importante em relação a esses 2 casos de transformação maligna foi a detecção do carcinoma epidermoide somente na biópsia excisional. A análise histopatológica das biópsias incisionais dessas lesões mostraram hiperqueratose com displasia epitelial intensa. Esse evento foi observado também em outros trabalhos, pois biópsias incisionais são pouco representativas em lesões potencialmente malignas (Thomson; Wylie, 2002; van der Hem et al., 2005).

Para evitar a falha na identificação de áreas de malignidade em LOs sugere-se a realização de biópsias mais extensas (*punch* com mínimo de 6 mm), preferencialmente em áreas de aspecto erosivo ou verrucoso (van der Hem et al.,

2005). A remoção completa das lesões e sua subsequente análise histopatológica são importantes para determinar o grau de displasia e detectar eventual presença de carcinoma epidermoide (Chiesa et al., 1990; Lumerman et al., 1995). Desse modo, embora o tratamento cirúrgico das LOs não seja eficaz como uma intervenção de prevenção de transformação maligna, ela pode desempenhar o papel de detectar o câncer em um estágio inicial quando este não é identificado na biópsia incisional (Lodi; Porter, 2008).

Após 20 meses de seguimento clínico, a probabilidade dos pacientes estarem livres de qualquer desfecho clínico (recorrência, desenvolvimento de novas lesões e transformação maligna) foi de aproximadamente 50%. Após esse período, a curva para o desfecho de recorrência manteve-se sem variações, enquanto a curva para o desfecho de novas lesões decresceu. No que se refere às recorrências, ainda que o controle local das lesões tenha sido aparentemente estabelecido durante o período analisado, o seguimento dos pacientes deve ser mantido, pois a porcentagem de pacientes livres de LO tende a diminuir com o tempo de acompanhamento (Chiesa et al., 1990; Chandu; Smith, 2005; Hamadah; Thomson, 2009).

Dos fatores analisados que podem contribuir com os desfechos clínicos, os mais significativos foram as alterações morfológicas epiteliais severas, caracterizadas como lesões de alto risco. Os fatores gênero feminino e idade superior a 60 anos também estiveram associados ao desenvolvimento de novas lesões. Portanto, os resultados deste estudo mostraram que lesões de alto risco, gênero feminino e idade superior a 60 anos devem ser considerados fatores de maior relevância para o risco de malignização das LOs. Na literatura consultada não há consenso entre os fatores de risco para os desfechos clínicos, inclusive alguns autores não observaram nenhuma associação entre os fatores e desfechos (Saito et al., 2001; Thomson; Wylie, 2002; van der Hem et al., 2005). Porém, alguns fatores como paciente do gênero feminino sem hábitos de tabagismo, tamanho da lesão, e displasia epitelial intensa, são referenciados como os mais frequentemente associados aos desfechos clínicos (Schepman et al., 1998; Napier et al., 2003; Chandu; Smith, 2005; Holmstrup et al., 2006).

Poucos estudos analisaram conjuntamente a classificação binária (lesões de alto e baixo risco) e o grau de displasia para a ocorrência de desfechos clínicos pós tratamento cirúrgico de LOs. Como analisado neste estudo, a classificação binária pode ser mais eficiente do que a classificação da displasia ao prognosticar lesões

com maior risco a recorrências, devendo ser incluído na avaliação histopatológicas das LOs, como também sugerido em recente artigo de Warnakulasuryia et al. (2008).

Considerando apenas fatores intrísecos às lesões (tamanho, aspecto de superfície e alterações morfológicas do epitélio), algumas condutas como o aumento da área de excisão, complementada pela vaporização das margens cirúrgicas, auxiliam na redução de recorrências e asseguram a remoção de lesões com malignização incipiente, conforme mostram os resultados dos estudos de Chiesa et al. (1990) e Hamadah e Thomson (2009).

Estudos realizados nas últimas décadas não evidenciaram nenhum tipo de marcador específico que possa servir como indicador confiável no prognóstico das LOs (Warnakulasuriya, 2000; Warnakulasuriya et al., 2008). Diversos marcadores moleculares associados à transformação maligna têm sido investigados para diferentes tipos de neoplasias malignas. No presente estudo os marcadores EGFR, COX-2 e p53 foram selecionados para investigação, pois há evidências da participação deles no processo inicial da carcinogênese (Lippman et al., 2005).

Os padrões de expressão do p53, COX-2 e do EGFR SM observados em nosso estudo estão de acordo com os relatados na literatura (Cruz et al., 2002; Renkonen et al., 2002; Shibata et al., 2005; Fan et al., 2006). A frequência e o padrão de expressão dos marcadores p53 e COX-2 observada nas LOs, em comparação ao observado no grupo controle, sugerem que as LOs têm alterações moleculares epiteliais semelhantes às observadas em neoplasias malignas orais. Embora as LOs expressem os marcadores p53 e COX-2 de maneira significativa, estes marcadores não foram associados a lesões que tiveram desfechos clínicos desfavoráveis (recorrência, desenvolvimento de novas lesões ou transformação maligna). A ausência de correlação entre os marcadores e os desfechos clínicos deve-se provavelmente ao processo biológico de indução epitelial envolvido nos desfechos de recorrências e no desenvolvimento de novas lesões, não associado aos marcadores moleculares investigados. Quanto ao desfecho de transformação maligna, os dados apresentados neste estudo são limitados na avaliação deste aspecto, uma vez que apenas 2 casos de malignização foram observados. Em caráter especulativo, pode-se dizer que os marcadores p53 e COX-2 podem ser úteis como indicadores da existência de potencial de malignização de lesões, mas não necessariamente como indicadores precisos de transformação maligna.

Associação significante entre expressão do p53 e o grau de displasia foi verificada em 2 estudos (Kurokawa et al., 2003; Cruz et al., 2002), enquanto em outros essa associação não foi evidenciada (Kannan et al., 1996; Piatelli et al., 2002; Fan et al., 2006). Os achados do estudo de Kannan et al. (1996) mostraram ainda que a expressão do p53 foi mais frequente nas lesões não displásicas que nas displásicas. No presente estudo, também não foi observada uma associação estatisticamente significante entre a expressão do p53 e o grau de displasia ou em LOs de baixo risco. Os diferentes resultados apresentados em relação à expressão do p53 em LOs podem ser explicados pelas diferenças de metodologias no processamento das reações de imuno-histoquímica e na quantificação da expressão do anticorpo.

Considerando o grau de displasia observado nas LOs, apenas o COX-2 foi expresso em todas as lesões apresentando displasia intensa e em 6 das 7 lesões classificadas como de alto risco. Os dados em relação à severidade da displasia estão de acordo com os resultados de outro estudo semelhante (Shibata et al., 2005). Seria importante investigar se LOs com transformação maligna apresentam marcação positiva para a COX-2, o que não foi possível realizar neste presente estudo. Esse tipo de investigação apresenta conflito ético, pois a análise da expressão da COX-2 em LOs como indicador de transformação maligna só poderia ser feita se as lesões permanecessem sem tratamento cirúrgico e fossem acompanhadas por tempo necessário até a ocorrência da malignização.

A expressão dos dois clones do anti-EGFR (S e SM) observada em tecidos normais mostra que esses receptores estão presentes normalmente no epitélio da mucosa oral, enquanto que em LOs há uma tendência da perda da expressão do anti-EGFR S na camada espinhosa do epitélio. A ausência de associação estatisticamente significante entre a marcação do EGFR SM na camada espinhosa e as LOs possivelmente ocorreu pelo tamanho insuficiente da amostra. A possibilidade de que houvesse diferença na expressão entre os clones do anti-EGFR poderia indicar que não há diferença relevante entre o número de receptores presentes em tecido normal e o leucoplásico, mas que os receptores mutados observados no epitélio de LOs possivelmente desempenham um papel distinto dos receptores normais. Para confirmar esta hipótese, seria necessário investigar a expressão em LOs e tecido epitelial normal de um anticorpo anti-EGFR que marcasse somente os receptores mutados.

Os resultados deste e de outros estudos imuno-histoquímicos mostraram-se limitados no que diz respeito a ampliar a capacidade de prognosticar LOs com maior risco de malignização. Fatores como idade, gênero e classificação binária, além de outros de importância já estabelecida, como a extensão da lesão, localização e grau de displasia, são os indicadores com os quais devemos nos basear para avaliar lesões com maior potencial de malignização. O tratamento proposto constitui um recurso importante de remoção de lesões com malignização precoce clinicamente não detectáveis, embora não tenha ação de alterar os eventos de recorrência, desenvolvimento de novas lesões ou transformação maligna.

7 CONCLUSÕES

1. LOs são lesões de relativa frequência em nosso ambulatório; mulheres estiveram menos expostas ao hábito de tabagismo.
2. Tratamento por *lasers* de alta potência (CO_2 e diodo) mostrou-se eficiente na remoção das lesões, mas não evitou desfechos clínicos de recorrência, desenvolvimento de novas lesões e transformação maligna.
3. Idade acima de 60 anos no gênero feminino constituiu fator de risco ao desenvolvimento de novas lesões após o tratamento.
4. Lesões de alto risco foram associadas à ocorrência de recorrências após o tratamento.
5. Os marcadores p53, COX-2 e EGFR (clone S e clone SM) não constituíram indicadores associados ao risco aumentado de desfechos clínicos.

REFERÊNCIAS[1]

Abbey LM, Kaugars GE, Gunsolley JC, et al. Intraexaminer and interexaminer reliability in the diagnosis of oral epithelial dysplasia. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1995;80:188–91.

Allen CM. Toluidine blue: proceed with caution? Oral Surg Oral Med Oral Pathol. 1998;86:255.

Arduino PG, Surace A, Carbone M, et al. Outcome of oral dysplasia: a retrospective hospital-based study of 207 patients with a long follow-up. J Oral Pathol Med. 2009;38:540–4.

Atula T, Hedström J, Ristimäki A, et al. Cyclooxygenase-2 expression in squamous cell carcinoma of the oral cavity and pharynx: association to p53 and clinical outcome. Oncol Rep. 2006;16:485–490.

Axéll T, Pindborg JJ, Smith CJ, et al. Oral white lesions with special reference to precancerous and tobacco-related lesions: conclusions of na international symposium held in Uppsala, Sweden, May 18-21 1994. J Oral Pathol Med. 1996;25:49–54.

Banerjee AG, Gopalakrishnan VK, Bhattacharya I, Vishwanatha JK. Desregulated cyclooxigenase-2 expression in oral premalignant tissues. Mol Cancer Ther. 2002;1:1265–71.

Bánóczy J, Squier CA, Kremer M, et al. The permeability of oral leukoplakia. Eur J Oral Sci. 2003;111:312–5.

Campisi G, Margiotta V. Oral mucosal lesions and risk habits among men in na Italian study population. J Oral Pathol Med. 2000;30:22–8.

Chan G, Boyle GO, Yang EK, et al. Cyclooxygenase-2 expression is up-regulated in squamous cell carcinoma of the head and neck. Cancer Res. 1999;59:991–4.

[1] De acordo com Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

Chandu A, Smith ACH. The use of CO_2 laser in the treatment of oral white patches: outcomes and factors affecting recurrence. Int J Oral Maxillofac Surg. 2005;34:396–400.

Chattopadhyay A, Ray JG. AgNOR cut-point to distinguish mild and moderate epithelial dysplasia. J Oral Pathol Med. 2008;37:78–82.

Chen ZG, Zhang X, Li MF, et al. Simutanously targeting epidermal growth factor receptor tyrosine kinase and cyclooxigenase-2, an efficient approach to inhibition of squamous cell carcinoma of the head and neck. Clin Cancer Res. 2004;10:5930–9.

Chiesa F, Tradati N, Sala L, et al. Follow-up of oral leukoplakia after carbon dioxide laser surgery. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 1990;116:177–80.

Choe MS, Zhang X, Shin HJC, Shin DM, Chen ZG. Interaction between epidermal growth factor receptor and cyclooxigenase-2-mediated pathways and its implications for the chemoprevention of head and neck cancer. Mol Cancer Ther. 2005;4:1448–55.

Chu FWK, Silverman S Jr, Dedo HH. CO2 laser treatment of oral leukoplakia. Laryngoscope. 1988;98:125–30.

Cowan CG, Gregg TA, Napier SS, McKenna SM, Kee F. Potentially malignant oral lesions in Northern Ireland: a 20-year population-based perspective of malignant transformation. Oral Dis. 2001;7:18–24.

Cruz I, Napier SS, van der Waal I, et al. Suprabasal p53 immunoexpression is strongly associated with high grade dysplasia and risk for malignant transformation in potentially malignant oral lesions from Northern Ireland. J Clin Pathol. 2002;55:98–104.

Cruz IB, Snijders PJF, Meijer CJ, Braakhuis BJ, Snow G, Walboomers JM et al. p53 expression above the basal cell layer in oral mucosa is an early event of malignant transformation and hás predictive value for developing oral squamous cell carcinoma. J Pathol. 1998;184:360–8.

Dannenberg AJ, Lippman SM, Mann JR, Subbaramaiah K, DuBois RN. Cyclooxigenase-2 and epidermal growth factor receptor: Pharmacologic targets for chemoprevention. J Clin Oncol. 2005;23:254–66.

D’Arcangelo C, Di Maio FDN, Prosperi GD, Conte E, Baldi M, Caputi S. A preliminary study of healing of diode laser versus scalpel incisions in rat oral tissue: a comparison of clinical, histological, and immunohistochemical results. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2007;103:764–73.

Dietary Guidelines for Americans 2005. Centers for disease control and prevention [citado 16 jan. 2010]. Disponível em: http://www.**cdc**.gov/**alcohol**/faqs.htm.

Dietrich T, Reichart PA, Scheifele C. Clinical risk factors of oral leukoplakia in a representative sample of the US population. Oral Oncol. 2004;40:158–63.

Epstein JB, Zhang L, Rosin M. Advances in the diagnosis of oral premalignant and malignant lesions. J Can Dent Assoc. 2002;68:617–21.

Fan G-K, Chen J, Ping F, Geng Y. Immunohistochemical analysis of P57(kip2), p53 and hsp60 expressions in premalignant and malignant oral tissues. Oral Oncol. 2006;42:147–53.

Fisher DJ, Epstein JB, Morton TH, Schwartz SM. Interobserver reliability in the histopathologic diagnosis of oral pre-malignant and malignant lesions. J Oral Pathol Med. 2004;33:65–70.

Fisher MA, Bouquot JE, Shelton BJ. Assessment of risk factors for oral leukoplakia in West Virginia. Community Dent Oral Epidemiol. 2005;33:45–52.

Fisher SE, Frame JW. The effects of the carbon dioxide surgical laser on oral tissues. Brit J Oral Maxillofac Surg. 1984;22:414–25.

Flynn MB, White M, Tabah RJ. Use of carbon dioxide laser for the treatment of premalignant lesions of the oral mucosa. J Surg Oncol. 1988;37:232–4.

Frame JW, Das Gupta AR, Dalton GA, Rhys Evans PH. Use of the carbon dioxide laser in the management of premalignant lesions of the oral mucosa. J Laryngol Otol. 1984;98:1251–60.

Gallo O, Schiavone N, Papucci L, et al. Down-regulation of nitric oxide synthase-2 and cyclooxygenase -2 pathways by p53 in squamous cell carcinoma. Am J Pathol. 2003;163:723–32.

Giaccia AJ, Kastan MB. The complexity of p53 modulation: emerging patterns from divergent signals. Genes & Dev. 1998;12:2973–83.

Grandis JR, Melhem MF, Barnes EL, Tweardy DJ. Quantitative Immunohistochemical analysis of transforming growth factor-α and epidermal growth factor receptor in patients with squamous cell carcinoma of the head and neck. Cancer. 1996;78:1284–92.

Hamadah O, Goodson ML, Thomson PJ. Clinicopathological behaviour of multiple oral dysplastic lesions compared with that of single lesions. Br J Oral Maxillofac Surg. 2009;41:17–25.

Hamadah O, Thomson PJ. Factors affecting carbon dioxide laser treatment for oral precancer: a patient cohort study. Lasers Surg Med. 2009;41:17–25.

Harari PM, Allen GW, Bonner JA. Biology of interactions: antiepidermal growth factor receptor agents. J Clin Oncol. 2007;35:4057–65.

Hiraishi Y, Wada T, Nakatani K, Negoro K, Fujita S. Immunohistochemical expression of EGFR and p-EGFR in oral squamous cell carcinomas. Pathol Oncol Res. 2006;12:87–91.

Holmstrup P, Vedtofte P, Reibel J, Stoltze K. Long-term treatment outcome of oral premalignant lesions. Oral Oncol. 2006;42:461–74.

Ishii J, Fujita K, Komori T. Laser surgery as a treatment for oral leukoplakia. Oral Oncol. 2003;39:759–69.

Jaber MA, Porter SR, Gilthorpe MS, Bedi R, Scully C. Risk factors for oral epithelial dysplasia–the role of smoking and alcohol. Oral Oncol. 1999;35:151–6.

Jaber MA, Porter SR, Speight P, Eveson JW, Scully C. Oral epithelial dysplasia: clinical characteristics of western European residents. Oral Oncol. 2003;39:589–96.

Kademani D, Dierks E. Surgical management of oral and mucosal dysplasias: the case for surgical excision. J Oral Maxillofac Surg. 2007;65:287–92.

Kannan S, Chandran GJ, Pillai KR, et al. Expression of p53 in leukoplakia and squamous cell carcinoma of the oral mucosa: Correlation with expression of Ki67. J Clin Pathol Mol Pathol. 1996;49:M170–5.

Kujan O, Oliver RJ, Khattab A, Roberts SA, Thakker N, Sloan P. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. Oral Oncol. 2006;42:987–93.

Kurokawa H, Matsumoto S, Murata T, et al. Immunohistochemical study of syndecan-1 down-regulation and the expression of p53 protein or Ki-67 antigen in oral leukoplakia with or without dysplasia. J Oral Pathol Med. 2003;32:513–21.

Laskaris G. How to treat oral leukoplakia. J Eur Acad Dermatol Venereol. 2000;14:446–7.

Lee JJ, Horg WK, HIttleman WN, et al. Predicting cancer development in oral leukoplakia: ten years of translational research. Clin Cancer Res. 2000;6:1702–10.

Lee JJ, Hung HC, Cheng SJ, et al. Carcinoma and dysplasia in oral leukoplakias in Taiwan: prevalence and risk factors. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2006;101:472–80.

Lim K, Moles DR, Downer MC, Speight PM. Opportunistic screening for oral cancer and precancer in general dental practice: results of a demonstration study. Br Dental J. 2003;194:497–502.

Lin DT, Subbaramaiah K, Shah JP, Dannenberg AJ, Boyle JO. Cyclooxygenase-2: a novel molecular target for the prevention and treatment of head and neck cancer. Head Neck. 2002;24:792–9.

Lippman SM, Sudbo J, Hong WK. Oral cancer prevention and the evolution of molecular-targeted drug development. J Clin Oncol. 2005;23:346–56.

Lodi G, Porter S. Management of potentially malignant disorders: evidence and critique. J Oral Pathol Med. 2008;37:63–9.

Lodi G, Sardella A, Bez C, Demarosi F, Carassi A. Interventions for treating oral leukoplakia (Cochrane review). The Cochrane Library 2007; 2 [cited 2007 Nov. 2]. Available from: http://cochrane.bvsalud.org.

Lodi G, Sardella A, Bez C, Demarosi F, Carassi A. Systematic review of randomized trials for the treatment of oral leukoplakia. J Dental Education. 2002;66:896–902.

Lumerman H, Freedman P, Kerpel S. Oral epithelial dysplasia and the development of invasive squamous cell carcinoma. Oral Maxillofac Pathol. 1995;79:321–9.

Luomanen M. Experience with a carbon dioxide laser for removal of benign oral soft-tissue lesions. Proc Finn Soc. 1992;88:49–55.

Luomanen M, Lehto V-P, Meurman JH. Myofibroblasts in healing laser wounds of rat tongue mucosa. Archs Oral Biol. 1988;33:17–23.

Meltzer C. Surgical management of oral and mucosal dysplasias: the case for laser excision. J Oral Maxillofac Surg. 2007;65:293–5.

Mithani SK, Mydlarz WK, Grumbine FL, Smith IM, Califano JA. Molecular genetics of premalignant oral lesions. Oral Dis. 2007;13:126–33.

Nagao T, Ikeda N, Fukano H, Hashimoto S, Shimozato K, Warnakulasuriya S. Incidence rates for oral leukoplakia and lichen planus in a Japanese population. J Oral Pathol Med. 2005;34:532–9.

Napier SS, Cowan CG, Gregg TA, Stevenson M, Lamey PJ, Toner PG. Potentially malignant oral lesions in Northern Ireland: size (extent) matters. Oral Dis. 2003;9:129–37.

Napier SS, Speight PM. Natural history of potentially malignant oral lesions and conditions: an overview of the literature. J Oral Pathol Med. 2008:37;1–10.

Pentenero M, Carozzo M, Pagano M, et al. Oral mucosal dysplastic lesions and early squamous cell carcinomas: underdiagnosis from incisional biopsy. Oral Dis. 2003;9:68–72.

Petti S. Pooled estimate of world leukoplakia prevalence: a systematic review. Oral Oncol. 2003;39:770–80.

Piatelli A, Rubini C, Fioroni M, Iezzi G, Santinelli A. Prevalence of p53, bcl-2, and Ki-67 immunoreactivity and in premalignant and malignant lesions of the oral cavity. J Oral Maxillofac Surg. 2002;60:532–40.

Pindborg JJ, Reichart P, Smith CJ, van der Waal I. World Health Organization: histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa. Berlin: Springer-Verlag; 1997.

Regezi JA, Zarbo RJ, Regev E, Pisanty S, Silverman S, Gazit D. p53 protein expression in sequential biopsies of oral dysplasia and *in situ* carcinomas. J Oral Pathol Med 1995; 24: 18–22.

Reibel J. Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. Crit Rev Oral Biol Med. 2003;14:47–62.

Reichart PA. Identification of risk groups for oral precancer and cancer and preventive measures. Clin Oral Invest. 2001;5:207–213.

Reichart PA. Oral mucosal lesions in a representative cross-sectional study of aging Germans. Community Dent Oral Epidemiol. 2000;28:390–8.

Renkonen J, Wolff H, Paavonen T. Expression of cyclo-oxygenase-2 in human tongue carcinoma and its precursor lesions. Virchows Arch. 2002;440:594–7.

Roodenburg JLN, Panders AK, Vermey A. Carbon dioxide laser surgery of oral leukoplakia. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1991;71:670–4.

Roosar A, Yin L, Johansson ALV, Sandborgh-Englund, Nyrén O, Axéll T. A long-term follow-up study on the natural course of oral leukoplakia in a Swedish population-based sample. J Oral Pathol Med. 2007;36:78–82.

Saito T, Sugiura C, Hirai A, et al. High malignant transformation rate of widespread multiple oral leukoplakias. Oral Dis. 1999;5:15–9.

Saito T, Sugiura C, Hirai A, et al. Development of squamous cell carcinoma from pre-existent oral leukoplakia: with respect to treatment modality. Int J Oral Maxillofac Surg. 2001;30:49–53.

Sawhney M, Rohatgi N, Kaur J, et al. Expression of NF-κB parallels COX-2 expression in oral precancer and cancer: association with smokeless tobacco. Int J Cancer. 2007;120:2545–56.

Scully C, Sudbø J, Speight PM. Progress in determining the malignant potential of oral lesions. J Oral Pathol Med. 2003;32:251–6.

Scheifele C, Reichart PA. Is there a natural limit of the transformation rate of oral leukoplakia? Oral Oncol. 2003;39:470–5.

Schepman KP, van der Meij EH, Smeele LE, van der Waal I. Malignant transformation of oral leukoplakia: a follow-up study of a hospital-based population of 166 patients with oral leukoplakia from The Netherlands. Oral Oncol. 1998;34:270–5.

Schoelch ML, Sekandari N, Regezi JA, Silverman S Jr. Laser management of oral leukoplakias: a follow-up of 70 patients. Laryngoscope. 1999;109:949–53.

Shahnavaz SA, Regezi JA, Bradley G, Dubé ID, Jordan RCK. p53 gene mutations in sequential oral epithelial dysplasias and squamous cell carcinoma. J Pathol. 2000;190:417–22.

Shibata M, Kodani I, Osaki M, et al. Cyclo-oxygenase-1 and -2 expression in human oral mucosa, dysplasias and squamous cell carcinomas and their pathological significance. Oral Oncol. 2005;41:304–12.

Shin DM, Ro JY, Hong WK, Hittelman WN. Dysregulation of epidermal growth factor receptor expression in premalignat lesions during head and neck tumorigenesis. Cancer Res. 1994;54:3153–9.

Sieron A, Adamek M, Kawczyk-Krupka A, Mazur S, Ilevicz L. Photodynamic therapy (PDT) using topically applied δ-aminolevulinic acid (ALA) for the treatment of oral leukoplakia. J Oral Pathol Med. 2003;32:330–6.

Silverman S Jr, Gorsky M, Lozada F. Oral leukoplakia and malignant transformation–a follow-up study of 257 patients. Cancer. 1984;53:563–8.

Slaughter DP, Southwick HW, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium. Cancer. 1953;6:963–8.

Smith BD, Smith GL, Carter D, et al. Molecular marker expression in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 2001;127:780–5.

Specenier PM, Vermorken JB. Targeted therapies in head and neck cancer. Targ Oncol. 2007;2:73–88.

Srinivasan M, Jewell SD. Evaluation of TGF-α and EGFR expression in oral leukoplakia and oral submucous fibrosis by quantitative immunohistochemistry. Oncol. 2001;61:284-292.

Subbaramaiah K, Altorki N, Chung WJ, Mestre JR, Sampat A, Dannenberg AJ. Inhibition of cyclooxigenase-2 gene expression by p53. J Biol Chem. 1999;274:10911–5.

Tanda N, Mori S, Saito K, Ikawa K, Sakamoto S. Expression of apoptotic signaling proteins in leukoplakia and oral lichen planus: quantitative and topographical studies. J Oral Pathol Med. 2000;29:385–93.

Thomson PJ, Hamadah O. Cancerization within the oral cavity: the use of ‘field mapping biopsies’ in clinical management. Oral Oncol 2007; 43: 20–6.

Thomson PJ, Wylie J. Interventional laser surgery: an effective surgical and diagnostic tool in oral diagnostic tool in oral precancer management. Int J Oral Maxillofac Surg. 2002;31:145–53.

Tsantoulis PK, Kastrinakis NG, Tourvas AD, Laskaris G, Gorgoulis VG. Advances in the biology of oral cancer. Oral Oncol. 2006;43:523–34.

van der Hem PS, Nauta JM, van der Wal JE, Roodenburg JLN. The results of CO_2 laser surgery in patients with oral leukoplakia: a 25 year follow-up. Oral Oncol. 2005;41:31–7.

van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa: terminology, classification and present concepts of management. Oral Oncol. 2009;45:317–23.

van der Waal I, Axéll T. Oral leukoplakia: a proposal for uniform reporting. Oral Oncol. 2002;38:521–6.

van der Waal I, Schepman KP, van der Meij EH, Smeele LE. Oral leukoplakia: a clinicopathological review. Oral Oncol. 1997; 33:291–301.

van Oijen MG, Rijksen G, ten Broek FW, Slootweg PJ. Increased expression of epidermal growth factor receptor in normal epithelium adjacent to head and neck carcinomas independent of tobacco and alcohol abuse. Oral Dis. 1998;4:4–8.

Vivek V, Jayasreee RS, Balan A, Sreelatha KT, Gupta AK. Three-year follow-up of oral leukoplakia after neodymium:yttrium aluminum garnet (Nd:YAG) laser surgery. Lasers Med Sci. 2008;23:375–9.

Warnakulasuriya S. Lack of molecular markers to predict malignant potential of oral precancer. J Pathol. 2000;190:407–9.

Warnakulasuriya S, Johnson NW, van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. J Oral Pathol Med. 2007;36:575–80.

Warnakulasuriya S, Reibel J, Bouquot J, Dabelsteen E. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. J Oral Pathol Med. 2008;37:127–33.

Wight AJ, Ogden GR. Possible mechanisms by which alcohol may influence the development of oral cancer–a review. Oral Oncol. 1998;34:441–7.

World Health Organization Classification of Tumours. Pathology & genetics. Head and neck tumours. International Agency for Research on Cancer (IARC). In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, SidranskyD, editors. Head and neck tumours. Lyon: IARC Press, 2005; 177–80.

Yang SW, Lee YS, Chen TA, Wu CJ, Tsai CN. Human papillomavirus in oral leukoplakia is no prognostic indicatior of malignant transformation. Cancer Epidemiol. 2009;33:118–22.

Yeh C-J. Simple cryosurgical treatment for oral lesions. Int J Oral Maxillofac Surg. 2000;29:212–6.

Zeinoun T, Nammour S, Dourov N, Aftimos G, Luomanen M. Myofibroblasts in healing laser excision wounds. Lasers Surg Med. 2001;28:74–9.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia
Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 160/2007

Com base em parecer de relator, o Comitê de Ética em Pesquisa APROVOU o protocolo de pesquisa "**USO DO LASER DE CO2 E DE DIODO NO TRATAMENTO DA LEUCOPLASIA ORAL E DE MARCADORES IMUNOHISTOQUÍMICOS PARA IDENTIFICAR LESÕES DE ALTO RISCO**", de responsabilidade da pesquisadora VIVIAN CUNHA GALLETTA KERN, sob orientação dos Profs. Drs. DANTE ANTONIO MIGLIARI e FÁBIO DAUMAS NUNES, APROVADO em 10 de abril de 2008.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 08 de setembro de 2008.

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Coordenador do CEP-FOUSP

Av. Prof. Lineu Prestes, 2227 - Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira".
São Paulo - SP - CEP 05508-900 – Telef./FAX (0XX11) 3091-7887

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia
Comitê de Ética em Pesquisa

DECLARAÇÃO
Protocolo 205/2007

Declaramos que o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo recebeu e aceitou o adendo referente a alteração do projeto intitulado de "**Uso do laser de CO_2 e de diodo no tratamento da leucoplasia oral e de marcadores imunohistoquímicos para identificar lesões de alto risco**", com o acréscimo de um grupo controle, de responsabilidade da Pesquisadora Vivian Cunha Galleta Kern, sob orientação do Professor Doutor Dante Antonio Migliari.

São Paulo, 02 de março de 2009.

Prof. Dr. João Gualberto de Cerqueira Luz
Coordenador CEP/FOUSP

Av. Prof. Lineu Prestes, 2227 - Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira".
São Paulo - SP - CEP 05508-900 - FAX (0XX11) 3091-7887.

ANEXO B – Termo de consentimento para pacientes com LO

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPACÃO EM PESQUISA

OBJETIVOS

As informações abaixo são para esclarecer e pedir a sua participação voluntária neste estudo, que tem o objetivo de acompanhar placas brancas na boca (também chamadas de leucoplasias orais) tratadas com laser cirúrgico, e realizar estudo laboratorial (também chamado de reação imunohistoquímica) do material colhido na biópsia incisional de rotina na Clínica de Estomatologia, Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP). O título da pesquisa é "Estudo do potencial de malignização da leucoplasia oral marcadores imunohistoquímicos e da utilização de laser de CO_2 e de diodo como tratamento". Este trabalho está sendo conduzido pela cirurgiã-dentista Vivian Cunha Galletta Kern, aluna regular do curso de pós-graduação de Diagnóstico Bucal da FOUSP em nível de doutorado.

BENEFÍCIOS

O tratamento convencional das placas brancas em boca (leucoplasias orais) consiste na remoção cirúrgica, seja por lâmina de bisturi ou laser de alta potência. A utilização do laser cirúrgico para o tratamento desta condição tem vantagens como: controle de sangramento, maior visibilidade para o cirurgião, redução do tempo de cirurgia, menor cicatriz, menor bacteremia, e dispensa a necessidade de sutura (ponto). No entanto, apresenta a desvantagem de ter uma cicatrização relativamente mais longa que a técnica tradicional. Caso você prefira a cirurgia por lâmina de bisturi à cirurgia por laser, ou ainda declinar da condição de participante desta pesquisa, não haverá prejuízo do atendimento e do tratamento na Clínica de Estomatologia da FOUSP. A duração do tratamento é independente deste estudo, sendo garantido mesmo após a conclusão da pesquisa.

DESCRIÇÃO DO ESTUDO E RISCO POTENCIAL

Caso você tenha concordado em participar da pesquisa, será realizado o protocolo de tratamento de rotina da disciplina de Estomatologia Clínica, que consiste em:

- exame de citologia esfoliativa: coleta de células descamativas da mucosa da boca por meio de raspagem de uma escova estéril na área da lesão branca. Este procedimento não dói, nem provoca ferida.

- coloração com azul de toluidina: aplicação de ácido acético 1% embebido em algodão para limpeza da área da lesão branca, em seguida, aplicação do corante azul de toluidina 10% por 1 minuto, e novamente aplicação de ácido acético 1% para remoção do excesso de corante. Este procedimento não dói, nem provoca ferida e é realizado para verificar se há alguma área favorável para a realização da biópsia incisional.

- biópsia incional: coleta de parte da lesão branca através da remoção com lâmina de bisturi, sob anestesia local. Este procedimento é necessário para confirmação da hipótese diagnóstica clínica. Eventualmente, durante o pós-operatório, será necessário o uso de medicamento analgésico, de custo do próprio paciente.

Confirmado o diagnóstico de leucoplasia oral, o paciente receberá o tratamento, que consistirá na remoção cirúrgica da lesão branca com laser cirúrgico. Este procedimento é de risco mínimo, considerando a possibilidade de acidente pela irradiação de outras áreas que não sejam a lesão. Eventualmente, durante o pós-operatório, será necessário o uso de medicamento analgésico, de custo do próprio paciente. Retornos periódicos serão marcados para controle da doença, durante 1 ano.

Parte da lesão branca removida será enviada ao Serviço de Patologia Bucal da FOUSP, para a conclusão do diagnóstico e estudo laboratorial denominado de reação de imunohistoquímica.

GARANTIA DE SIGILO/ DÚVIDAS E ESCLARECIMENTOS

Os registros de sua participação neste estudo são confidenciais, e permanecerão sob a guarda do pesquisador responsável e à disposição do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da FOUSP. Não se fará, no curso do estudo ou depois deste e em qualquer tipo de apresentação ou publicação científica, uso de informação que possa identificá-lo ou comprometê-lo. Você poderá, entretanto, vir a ser solicitado a confirmar por escrito que participou desse estudo. Caso tenha alguma dúvida, você poderá perguntar direta e pessoalmente ao pesquisador, ou ainda através do telefone (11) 3091-7883.

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Após ler estas informações e de ter minhas dúvidas suficientemente esclarecidas pelo pesquisador, eu _____, RG _____, concordo em participar de forma voluntária neste estudo.

São Paulo, ____ de _____ de _____

_____

(Assinatura do participante da pesquisa ou do seu representante legal)

Endereço do participante: _____

Bairro:_____CEP:_____

Telefone:_____ Cidade:_____

ANEXO C – Formulário utilizado para o protocolo de tratamento das leucoplasias orais

PROTOCOLO DE LASERS DE ALTA POTÊNCIA EM LEUCOPLASIAS

Nº USP:_____ Nº Semiologia:_____

Nome:_____Idade:_____

Endereço:_____CEP:_____

Cidade:_____Estado:_____Natural de:_____

Telefones: res:_____cel:_____com:_____

RG:_____Profissão:_____Gênero: ( )M ( )F

Data de nascimento: _____/_____/_____ Estado Civil:_____

leucoderma ( ) feoderma ( ) melanoderma ( ) xantoderma ( )

Características da lesão:

Tamanho: <2cm ( ) >2cm a 4cm ( ) >4cm ( )

Quantidade:_____Tipo: ( ) homogênea ( ) não-homogênea

Duração: _____dias_____meses_____anos

Cor: ( ) branca ( ) predominantemente branca ( ) branca com áreas de eritema

Superfície: ( ) lisa ( ) corrugada ( ) estriada ( ) verrucosa ( ) papular

Removível por raspagem: ( ) não ( ) sim Presença de ulcerações: ( ) sim ( ) não

Localização da lesão:

Língua ( ) D ( ) E ( ) dorso ( ) ventre Mucosa jugal ( ) D ( ) E

Rebordo Alveolar Superior ( ) D ( ) E ( ) V ( ) P ( ) anterior

Rebordo Alveolar Inferior ( ) D ( ) E ( ) V ( ) P ( ) anterior

Palato duro ( ) D ( ) E ( ) linha média Palato mole ( ) D ( ) E ( ) linha média

Assoalho de boca ( ) D ( ) E ( ) linha média

Sintomatologia:

Ausente ( ) ardência ( ) dor ( )

Exame histopatológico da(s) lesão(ões):

Data	Número do AP	Grau de Displasia

Exames complementares:

Data	Cit. Esfoliativa (positivo/negativo para candidose)	Azul de Toluidina (positivo/negativo)

HISTÓRIA MÉDICA

Hipertensão ( ) Há quanto tempo:_____

Medicamento(s):_____ Tempo de uso: _____

Diabetes ( ) tipo 1 ( ) tipo 2 Há quanto tempo:_____

Medicamento(s):_____ Tempo de uso:_____

Cardiopatia ( ) Há quanto tempo:_____

Medicamento(s):_____ Tempo de uso:_____

Outras enfermidades ( ) _____(rim, fígado, pulmão, tireóide)

Há quanto tempo:_____

Medicamento(s):_____ Tempo de uso:_____

Outros medicamentos

Medicamento:_____ Tempo de uso:_____

Medicamento:_____ Tempo de uso:_____

HISTÓRIA FAMILIAR DE MALIGNIDADE ( ) sim/local:_____( ) não

HÁBITOS

Fumo ( ) sim ( ) não Há quanto tempo:_____Quantidade: _____

Tipo:_____ Parou há quanto tempo:_____

Álcool ( ) sim ( ) não Há quanto tempo:_____Quantidade:_____

Tipo:_____ Parou há quanto tempo:_____

Drogas ( ) sim ( ) não Há quanto tempo:_____Quantidade:_____

Tipo:_____ Parou há quanto tempo:_____

LASER UTILIZADO: CO2 ( ) DIODO ( ) POTÊNCIA_____W

	CONDUTA CLÍNICA E PROCEDIMENTOS REALIZADOS

ANEXO D – Termo de consentimento para pacientes do grupo controle

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO PARA PARTICIPACÃO EM PESQUISA

OBJETIVOS

As informações abaixo são para esclarecer e pedir a sua participação voluntária neste estudo, que tem o objetivo de acompanhar pacientes com placas brancas na boca, denominadas de leucoplasia oral (este não e o seu caso), tratadas com laser cirúrgico, e realizar estudo laboratorial (também chamado de reação imunohistoquímica) do material colhido na biópsia incisional de rotina na Clínica de Estomatologia, Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP). O título da pesquisa é "Estudo do potencial de malignização da leucoplasia oral marcadores imunohistoquímicos e da utilização de laser de CO_2 e de diodo como tratamento". Este trabalho está sendo conduzido pela cirurgiã-dentista Vivian Cunha Galletta Kern, aluna regular do curso de pós-graduação de Diagnóstico Bucal da FOUSP em nível de doutorado.

BENEFÍCIOS

A sua participação nesta pesquisa não trará benefícios diretos a você, porém poderá beneficiar pacientes portadores da leucoplasia oral, uma lesão que pode se transformar em câncer de boca com o passar do tempo, sem tratamento eficiente até o presente momento. Caso você prefira não participar ou declinar da condição de participante desta pesquisa, não haverá prejuízo do atendimento e do tratamento na Clínica Odontológica da FOUSP. A duração do tratamento é independente deste estudo, sendo garantido mesmo após a conclusão da pesquisa.

DESCRIÇÃO DO ESTUDO E RISCO POTENCIAL

Caso você tenha concordado em participar da pesquisa, será realizada a coleta de um pequeno fragmento de tecido gengival normal que foi removido durante o procedimento cirúrgico, sem prejuízo para o fechamento da ferida ou sua cicatrização. Este fragmento será utilizado para um estudo laboratorial denominado reação imunohistoquímica. O objetivo deste estudo é comparar a reação deste fragmento com a reação de fragmentos da lesão de leucoplasia oral de outros pacientes, para possivelmente estabelecer quais lesões de leucoplasia possuem risco de transformação maligna, ou seja, de se transformarem em câncer de boca.

O procedimento para a coleta do fragmento de tecido gengival removido durante o procedimento cirúrgico não tem nenhum risco para você, nem prejudicará seu tratamento.

GARANTIA DE SIGILO/ DÚVIDAS E ESCLARECIMENTOS

Os registros de sua participação neste estudo são confidenciais, e permanecerão sob a guarda do pesquisador responsável e à disposição do Comitê de Ética em Pesquisa Envolvendo Seres Humanos da FOUSP. Não se fará, no curso do estudo ou depois deste e em qualquer tipo de apresentação ou publicação científica, uso de informação que possa identificá-lo ou comprometê-lo. Você poderá, entretanto, vir a ser solicitado a confirmar por

escrito que participou desse estudo. Caso tenha alguma dúvida, você poderá perguntar direta e pessoalmente ao pesquisador, ou ainda através do telefone (11) 3091-7883.

CONSENTIMENTO PÓS-INFORMAÇÃO

Após ler estas informações e de ter minhas dúvidas suficientemente esclarecidas pelo pesquisador, eu _____, RG _____, concordo em participar de forma voluntária neste estudo.

São Paulo, ____ de _____ de _____

_____

(Assinatura do participante da pesquisa ou do seu representante legal)

Endereço do participante: _____

Bairro:_____CEP:_____

Telefone:_____ Cidade:_____

HÁBITOS

Fumo ( ) sim ( ) não Há quanto tempo: Quantidade: _____

Tipo: _____ Parou há quanto tempo: _____

Álcool ( ) sim ( ) não Há quanto tempo: Quantidade: _____

Tipo: _____ Parou há quanto tempo: _____

Drogas ( ) sim ( ) não Há quanto tempo: Quantidade: _____

Tipo: _____ Parou há quanto tempo: _____