PAULA PRIETO-OLIVEIRA

**Análise histológica e imuno-histoquímica de leiomiomas e leiomiossarcomas
de boca**

São Paulo

2012

PAULA PRIETO-OLIVEIRA

**Análise histológica e imuno-histoquímica de leiomiomas e leiomiossarcomas
de boca**

Versão Corrigida

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o título de Mestre, pelo Programa de Pós-Graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientador: Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes

São Paulo

2012

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.

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

Prieto - Oliveira, Paula.

Análise histológica e imunoistoquímica de leiomiomas e leiomiossarcomas de boca / Paula Prieto Oliveira ; orientador Fábio Daumas Nunes. -- São Paulo, 2012.
51 p. : fig., tab. ; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia. Área de Concentração: Patologia Bucal. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Leiomioma. 2. Leiomiossarcoma. 3. Neoplasias bucais. 4. Patologia Bucal. I. Nunes, Fábio Daumas. II. Título.

Prieto-Oliveira P. Análise histológica e imuno-histoquímica de leiomiomas e leiomiossarcomas de boca. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Aprovado em: / /2012

Banca Examinadora

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

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Julgamento: _____ Assinatura: _____

A meus pais

Que sempre me apoiaram nos momentos difíceis e são a razão da minha vida.

A meu irmão

Que é um grande amigo e companheiro.

A minha tia Sônia

Que sempre esteve disposta a me ajudar com muito carinho e me deu força para superar os desafios.

AGRADECIMENTOS

À Elisa dos Santos e ao Juvani Lago Saturno que me ensinaram e me ajudaram muito em relação às atividades de laboratório.

Aos meus amigos Marco Túlio Brazão Silva por me dar apoio e auxílio nas situações situações em que eu tive dificuldade.

Às professoras Marília Triervelier Martins e Luciana Corrêa, pela disposição e paciência para ensinar e sanar as minhas dúvidas.

À Zilda Alves, pelo carinho, pelas orientações e pelo auxílio em questões burocráticas.

Ao Prof Dr Fábio Daumas Nunes por ser meu orientador e pela oportunidade de realizar o mestrado.

RESUMO

Prieto-Oliveira P. Análise histológica e imuno-histoquímica de leiomiomas e leiomiossarcomas de boca [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2012. Versão corrigida.

O objetivo deste estudo foi comparar leiomiomas e leiomiossarcomas de boca por meio de análise histológica e imunoistoquímica, utilizando os marcadores Ki67, p53 e PTEN. A actina de músculo liso foi utilizada para confirmar o diagnóstico. Foram examinados 13 tumores de músculo liso disponíveis nos arquivos do Departamento de Estomatologia da Faculdade de Odontologia da USP, sendo 7 leiomiossarcomas, 4 angioleiomiomas e 2 leiomiomas sólidos. As lâminas foram avaliadas de acordo com o grau de atipia, índice mitótico e presença de necrose. Foi realizada a análise imunoistoquímica para o ki67, p53 e PTEN, por meio da contagem de células positivas em 500 células nas áreas mais representativas. A maioria dos angioleiomiomas não apresentou atipia, mitose ou necrose; atipia discreta foi encontrada nos dois leiomiomas sólidos, um deles com 1 mitose por 10 CGA. Atipia foi observada em todos os leiomiossarcomas, o índice mitótico variou de 0 a 6 mitoses por 10 CGA, e apenas um caso apresentou necrose. Houve positividade para o ki67 em apenas um angioleiomioma e em 5 leiomiossarcomas, o restante dos casos foram negativos. Em relação ao p53, ocorreu leve positividade para um caso de leiomioma sólido e moderada para o outro; a maioria dos angioleiomiomas foram levemente positivos e apenas um foi negativo; todos os leiomiossarcomas foram positivos, 2 com marcação leve, 4 moderada e um intensa. A expressão do PTEN foi negativa em um leiomioma sólido e intensamente positiva em outro; todos os casos de angioleiomioma foram positivos, sendo que 2 demonstraram positividade leve e 2 moderada; 3 leiomiossarcomas apresentaram positividade moderada e 3 intensa, apenas um foi negativo. Nossos resultados sugerem que a marcação para ki67 e p53 são úteis na diferenciação entre leiomiomas e leiomiossarcomas. O mesmo não foi observado para o anticorpo PTEN.

Palavras-chave: Leiomioma. Leiomiossarcoma. ki67. p53. PTEN.

ABSTRACT

Prieto-Oliveira P. Immunohistochemical and histological analysis of oral leiomyoma and leiomyosarcoma [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2012. Versão corrigida.

This study aimed to compare oral leiomyomas and leiomyosarcomas by means of histological and immunohistochemical analysis. Cases from the Stomatology Department, School of Dentistry at University of São Paulo were retrieved. For immunohistochemistry Ki67, p53 and PTEN markers were used. Smooth muscle actin was used to confirm the diagnosis. There were 13 smooth muscle tumors: 7 leiomyosarcomas, 4 angioleiomyomas and 2 solid leiomyomas. For morphological analysis, sections were evaluated for atypia, mitotic index and presence of necrosis. Immunohistochemical analysis of Ki67, p53 and PTEN expression was performed by counting 500 positive cells in the most representative areas. Most angioleiomyomas did not present atypia, mitosis or necrosis; mild atypia was found in two solid leiomyomas, one with 1 mitosis per 10 HPF. Atypia was found in all leiomyosarcomas, the mitotic index varied from 0 to 6 mitosis per 10 HPF, and necrosis was found in only one case. Ki67 expression was positive in one angioleiomyoma and 5 leiomyosarcomas, the remaining cases were negative. For p53, one solid leiomyoma was mildly positive and the other showed moderate positivity; most of angioleiomyomas were mildly positive and only one was negative; all leiomyosarcomas were positive, 2 with mild expression, 4 moderate and one intense. PTEN expression was negative in one solid leiomyoma and intensely positive in the other; all angioleiomyomas were positive, with 2 mildly positive and 2 moderately positive; 3 leiomyosarcomas presented moderate positivity and 3 intense, only one was negative. Our results suggest that ki67 and p53 are useful in the differentiation between leiomyoma and leiomyosarcoma. The same was not found for PTEN.

Keywords: Leiomyoma. Leiomyosarcoma. ki67. p53. PTEN.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	8
2 REVISÃO DE LITERATURA	10
2.1 Epidemiologia e características clínicas.....	10
2.2 Características histopatológicas	12
2.3 Critérios de malignidade.....	13
2.4 Marcadores biológicos	15
3 PROPOSIÇÃO	25
4 MATERIAIS E MÉTODOS	26
4.1 Casuística e análise morfológica.....	26
4.2 Imuno-histoquímica	26
4.3 Quantificação.....	28
5 RESULTADOS.....	30
6 DISCUSSÃO	35
7 CONCLUSÕES	39
REFERÊNCIAS.....	40

1 INTRODUÇÃO

O leiomioma é uma neoplasia benigna de músculo liso, e ocorre principalmente no útero, trato gastrointestinal e pele (González-Sánchez et al., 2007). É bastante raro na cavidade oral, visto que representa apenas 0,016% a 0,064% de todos os leiomomas (Nonaka et al., 2010).

O leiomiossarcoma é uma neoplasia maligna que se origina da musculatura lisa e representa entre 5 e 10% de todos os sarcomas de tecido mole (Enzinger; Weiss, 2001c). Ocorre principalmente no retroperitônio, trato gastrointestinal e útero (Goldschmidt et al., 1999; Enzinger; Weiss, 2001c). Raramente acomete a cavidade oral, devido à escassez de músculo liso presente nessa região, e surge provavelmente da túnica média dos vasos sanguíneos, das células mioepiteliais, das papilas circunvalares ou de células mesenquimais indiferenciadas e pluripotenciais (Lo Muzio et al., 2000). De todas as neoplasias de músculo liso presentes em boca, apenas 20% são malignos (Farman; Kay, 1977).

Apesar de apresentarem características histológicas semelhantes, os leiomiossarcomas são divididos de acordo com a localização, devido a diferenças clínicas e biológicas, em 3 grupos: viscerais, cutâneos e vasculares. As neoplasias superficiais apresentam melhor prognóstico em relação aos profundos (Enzinger; Weiss, 2001c).

A maioria dos leiomiomas e leiomiossarcomas podem ser diagnosticados baseados no grau de atipia, número de mitoses e tipo de necrose. Entretanto, alguns casos de leiomioma com atipia nuclear e número de mitoses mais elevado podem ser confundidos com o leiomiossarcoma de baixo grau. Por essa razão, torna-se necessário o uso da imunoistoquímica para auxiliar no diagnóstico diferencial (Amada et al., 1995; Zhai et al., 1999; Gökaslan et al., 2005; Rath-Wolfson et al., 2006; O'Neill et al., 2007; Petrovic et al., 2010).

O ki67 é indicativo de proliferação celular e a sua elevada expressão ocorre em várias neoplasias malignas, inclusive no leiomiossarcomas, enquanto as lesões benignas apresentam expressão baixa ou negativa (Brown; Gatter, 2002; Petrovic et al., 2010). A proteína p53 é responsável pelo controle do ciclo celular e está presente em quantidades indetectáveis nas células normais. Entretanto, em células submetidas a estresse ou alterações no gene p53, a expressão desta proteína torna-

se elevada e pode ser observada nas reações imunoistoquímicas (Petrovic et al., 2010). O gene PTEN está localizado no cromossomo 10q23. A região 10q é uma das mais afetadas por deleções em leiomiossarcomas (Hu et al., 2005). Mutações ou deleções desse gene são bastante comuns em estágios avançados de vários tipos de câncer e levam à perda da função supressora de tumor, promovendo aumento da proliferação celular e redução da apoptose (Huang et al., 2011).

Poucos estudos procuram diferenciar essas neoplasias em boca, associando aspectos histológicos característicos de diferenciação neoplásica com marcadores biológicos. Por isso, procuramos estudar essas lesões, no sentido de verificar a frequência desses aspectos histológicos e a possível associação com os marcadores mencionados acima.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Epidemiologia e características clínicas

Os leiomiomas da cavidade oral são mais frequentes na quinta e sexta décadas de vida (Savage et al., 1983; Wertheimer-Hatch et al., 2000; González-Sánchez et al., 2007; Gaitan-Cepeda et al., 2008; Nonaka et al., 2010), sem predileção evidente por sexo (Ravindranathan; Heslop, 1978; Natiella et al., 1982; Praal et al., 1982; Yamamoto et al., 1983; Esguep; Solar, 1986; Svane et al., 1986; Nonaka et al., 2010). Clinicamente, apresentam-se como um nódulo submucoso de superfície lisa e crescimento lento. A coloração pode ser normal de mucosa, avermelhada ou arroxeada, dependendo da vascularização (Praal et al., 1982; Koca et al., 2006; Nonaka et al., 2010). Geralmente, são menores que dois centímetros de diâmetro (Wertheimer-Hatch et al., 2000; Suresh et al., 2007; McParland et al., 2009; Kim et al., 2010), e os locais mais acometidos são: língua, lábios, palato e mucosa jugal (Svane et al., 1986; Baden et al., 1994; Wertheimer-Hatch et al., 2000; González-Sánchez et al., 2007; Gaitan-Cepeda et al., 2008).

As neoplasias intra-ósseas tendem a apresentar comportamento mais agressivo, com crescimento rápido (Goldblatt; Edesses, 1977; Katou et al., 1997; Loyola et al., 1999; Bertolini et al., 2003; Reddy et al., 2011), e a mandíbula é mais acometida que a maxila (Liang et al., 2003; Suresh et al., 2007). Radiograficamente, caracterizam-se por uma radiolucência uni ou multilocular e bordas escleróticas bem ou mal definidas. É comum a ocorrência de expansão ou destruição da cortical e também pode haver reabsorção radicular e deslocamento dentário (Liang et al., 2003; Suresh et al., 2007; Reddy et al., 2011). Os leiomiomas são geralmente assintomáticos, mas pode ocorrer dor à palpação, dificuldade de mastigação e mobilidade dentária (Wertheimer-Hatch et al., 2000; González-Sánchez et al., 2007). O aspecto clínico não é patognomônico e pode ser facilmente confundido com outras lesões como fibroma, lipoma, neurofibroma, mucocele e leiomiossarcoma (Praal et al., 1982; Janas et al., 2008; Luaces-Rey et al., 2007).

Os leiomiossarcomas de cavidade oral são mais comuns em adultos, com predomínio da sexta e sétima décadas de vida (Izumi et al., 1995; Wertheimer-Hatch et al., 2000; Nikitakis et al., 2002; Ethunandan et al., 2007), e não há predileção evidente por gênero (Izumi et al., 1995; Dry et al., 2000; Wertheimer-Hatch et al., 2000; Nikitakis et al., 2002; Vilos et al., 2005; Yan et al., 2010). Os ossos gnáticos são os locais mais acometidos e representam entre 43% e 70% dos casos, com ligeira predileção pela maxila, mas também podem ocorrer em: língua, bochecha, gengiva, palato duro e mole, lábio superior e assoalho bucal (Izumi et al., 1995; Savastano et al., 1998; Dry et al., 2000; Wertheimer-Hatch et al., 2000; Nikitakis et al., 2002; Vilos et al., 2005; Ethunandan et al., 2007; Qureshi et al., 2008).

Os leiomiossarcomas geralmente aparecem como massas expansivas e indolores, mas sintomas e sinais como dor, mucosa eritematosa, ulceração secundária, perda ou mobilidade dentária, dificuldade de mastigação e disfagia podem ser encontrados (Izumi et al., 1995; Wertheimer-Hatch et al., 2000; Sobral et al., 2004; Ethunandan et al., 2007; Yan et al., 2010). As neoplasias intra-ósseas são observados radiograficamente como radiolucências mal definidas, com aspecto “roído por traça” e perfuração da cortical óssea (Centeno et al., 2006; Arora et al., 2010). A extensão dessas lesões é melhor demonstrada pela tomografia computadorizada (Centeno et al., 2006). Já que as características clínicas e radiográficas não são específicas, o diagnóstico é realizado por meio do exame histopatológico associado à imunoistoquímica (Krishnan et al., 1991; Centeno et al., 2006). Os leiomiossarcomas orais apresentam comportamento agressivo, com índice de recidiva de 34% e metástase de 35%. O prognóstico é pobre, sendo que a sobrevida em 5 anos é de 55%, semelhante as neoplasias de outras regiões com exceção dos cutâneos, que apresentam prognóstico favorável (Ethunandan et al., 2007). Os locais mais frequentemente envolvidos por metástases são linfonodos cervicais e pulmão (Weitzner, 1980; Savastano et al., 1998; Qureshi et al., 2008).

Entretanto, a incidência das neoplasias de músculo liso em boca parece ser proporcionalmente elevada quando comparada com as mesmas lesões no trato genital feminino. Segundo Farman e Kay (1977), 20% dos tumores de músculo liso orais são malignos, enquanto 1 em cada 800 no útero são leiomiossarcomas (Petrovic et al., 2010).

2.2 Características histopatológicas

Microscopicamente, os leiomiomas correspondem a células musculares lisas maduras e fusiformes, com núcleo alongado em forma de charuto, e são bem delimitados e encapsulados (González-Sánchez et al., 2007; McParland et al., 2009). Essas lesões apresentam 3 tipos histopatológicos: sólido, vascular e epitelióide. O vascular é o mais comum na cavidade oral e corresponde de 67% a 75% dos casos, enquanto o epitelióide é o mais raro (Leung et al., 1990; Baden et al., 1994; Gaitan-Cepeda et al., 2008).

O leiomioma sólido é constituído por uma mistura de células musculares lisas, que se entrelaçam, e colágeno, com vascularidade variável. As fibras musculares geralmente formam espirais por serem cortadas em diferentes planos (Prael et al., 1982; Natiella et al., 1982; Leung et al., 1990; Janas et al., 2008).

O tipo vascular apresenta vasos calibrosos, com camada interna ordenada e circunferencial e externas desorganizadas, misturando-se a fibras musculares periféricas (Enzinger; Weiss, 2001a; Brooks et al., 2004).

O leiomioma epitelióide é composto por células redondas ou poligonais, com uma zona clara ao redor do núcleo e retração do citoplasma. Fibras musculares listas são raramente encontradas (Prael et al., 1982; Natiella et al., 1982; Leung et al., 1990; Koutlas; Manivel, 1996). Áreas mixóides, gordura e necrose hialina também podem ser encontradas. Esta é caracterizada pela interposição de fibras colágenas ou tecido de granulação entre o tecido viável e o necrótico, e frequentemente é associada a regiões de inflamação e hemorragia (Bell et al., 1994; Kempson; Hendrickson, 2000; Hendrickson et al., 2003).

O exame microscópico de um leiomiossarcoma revela feixes entrelaçantes de células alongadas e fusiformes, com núcleo hipercromático oval ou em forma de charuto, em meio a um citoplasma eosinofílico (Dry et al., 2000; Enzinger; Weiss, 2001c; Sobral et al., 2004; Vilos et al., 2005; Yang et al., 2006). Algumas células musculares lisas apresentam vacúolos paranucleares, que causam uma ligeira indentação e, conseqüentemente, o núcleo assume um formato côncavo (Dry et al., 2000; Enzinger; Weiss, 2001c). Atipia e pleomorfismo nuclear estão presentes em níveis variados e o número de mitoses pode ser discreto ou abundante (Enzinger; Weiss, 2001c; Vilos et al., 2005). Também podem ser encontradas células gigantes multinucleadas e epitelióides (Dry et al., 2000; Vilos et al., 2005). Estas últimas são

redondas, demonstram núcleo hipercromático e vacuolização citoplasmática (Vilos et al., 2005).

A aparência do citoplasma varia de acordo com o grau de diferenciação. Em neoplasias bem diferenciadas, são visualizadas, por meio do Tricômico de Masson como estrias vermelhas e paralelas dispostas longitudinalmente. Em lesões pouco diferenciadas, essas estriações são menos numerosas, desorganizadas e mais difíceis de identificar (Enzinger; Weiss, 2001c). Grânulos de glicogênio citoplasmáticos frequentemente são observados por meio do PAS (ácido periódico de Schiff) (Enzinger; Weiss, 2001c; Vilos et al., 2005). O estroma pode apresentar aspecto mixóide (Vilos et al., 2005). Ao contrário do leiomioma, é comum a presença de necrose tumoral coagulativa, caracterizada pela transição abrupta entre o tecido viável e o necrótico; células fantasmas podem ser encontradas, entretanto, áreas de inflamação e hemorragia são raras (Bell et al., 1994; Kempson; Hendrickson, 2000; Hendrickson et al., 2003).

Os leiomiossarcomas podem se assemelhar a outras neoplasias como: rabdomiossarcoma, fibrossarcoma, carcinoma de células fusiformes, tumor maligno da bainha do nervo periférico, miofibrossarcoma, tumor fibroso solitário, fâciite nodular, histiocitoma fibroso maligno e melanoma (Montgomery et al., 2002; Rodini et al., 2007). Por essa razão, é importante o uso de imunoistoquímica para a determinação do diagnóstico final (Sobral et al., 2004; Vilos et al., 2005; Rodini et al., 2007).

2.3 Critérios de malignidade

A distinção histológica entre leiomioma e leiomiossarcoma é um pouco arbitrária e se baseia nas seguintes características: tamanho, celularidade, atipia, necrose e atividade mitótica, que é o mais confiável (Enzinger; Weiss, 2001c; Sobral et al., 2004). Esses parâmetros são subjetivos, pois não há um número exato de mitoses ou de outras características capazes de separar as lesões benignas das malignas com absoluta certeza, e os critérios variam de acordo com a localização anatômica (Nikitakis et al., 2002).

Bell et al. (1994) definiram os seguintes critérios para a realização do diagnóstico de leiomiossarcoma: atipia citológica difusa moderada ou intensa e necrose celular tumoral independente do índice mitótico; atipia citológica difusa moderada ou intensa, ausência de necrose celular tumoral e índice mitótico acima de 10 mitoses/ 10 campos de grande aumento (CGA ou HPF); atipia leve ou ausente com presença de necrose celular tumoral e índice mitótico acima de 10 mitoses por 10 CGA.

De acordo com a última classificação de neoplasias de músculo liso uterinos da Organização Mundial de Saúde (Hendrickson et al., 2003), apenas a presença de necrose coagulativa é suficiente para o diagnóstico de leiomiossarcoma. Na ausência desta, é necessária a presença de atipia difusa moderada ou intensa e índice mitótico acima de 10 mitoses em 10 CGA. Quando o índice mitótico é abaixo deste valor, a chance de recidiva é pequena e este grupo é chamado de leiomioma atípico. As neoplasias que apresentam atipia discreta e elevado número de mitoses também são considerados benignos.

Segundo Hornick e Fletcher (2003), devem ser adotados critérios de malignidade distintos de acordo com a localização anatômica devido a diferenças morfológicas e comportamentais. Leiomioma em tecido mole profundo existe e é definido estritamente na ausência de atipia citológica, necrose e atividade mitótica. A presença de atipia citológica mínima ou necrose tumoral coagulativa garante o diagnóstico de leiomiossarcoma. A expressão imunoistoquímica de receptores hormonais em neoplasias retroperitoneais ou abdominais femininos é indicativa de leiomioma, e a presença de atividade mitótica baixa não permite o diagnóstico de leiomiossarcoma. Enquanto as neoplasias de músculo liso subcutâneos com atipia citológica e qualquer atividade mitótica são considerados malignos, tais lesões confinadas à derme parecem não apresentar potencial metastático e devem ser denominadas de neoplasias de músculo liso atípicas. Já as neoplasias de genitália externa devem ser classificadas como leiomiossarcoma se três ou mais dos seguintes critérios forem encontrados: tamanho acima de cinco centímetros, margens infiltrativas, mais de 5 mitoses por 10 CGA e atipia citológica moderada ou intensa. A presença de necrose tumoral coagulativa, combinada a qualquer uma dessas características eleva a chance de malignidade. Se a neoplasia apresentar um ou dois desses fatores, deve ser denominada de neoplasia de músculo liso atípica.

Yoshida et al. (2009) analisaram 475 casos de neoplasia uterinos de músculo liso, sendo 8 leiomiossarcomas e 467 leiomiomas, com o objetivo de aumentar a precisão do diagnóstico diferencial por meio da análise da expressão do Ki67 e CD34. Adotaram-se os seguintes critérios de malignidade: atipia intensa, índice mitótico acima de 10/CGA e presença de necrose celular tumoral coagulativa. As lesões com pelo menos duas dessas características foram consideradas malignas. Os tumores que apresentavam apenas um dos critérios, atipia leve ou índice mitótico entre 1-9/CGA e obtiveram expressão de Ki67 ou de CD34 em áreas necróticas acima de 15% também foram diagnosticados como leiomiossarcoma.

Para os tumores de músculo liso cutâneos, o diagnóstico de leiomiossarcoma é baseado no índice mitótico acima de duas mitoses por 10 CGA (Bellezza et al., 2004). Fernandez-Flores (2010) adotou os seguintes critérios: número de mitoses acima de 2/10 CGA ou necrose. A atipia isolada não é utilizada como definição de malignidade, a menos que venha acompanhada de uma das duas características citadas anteriormente (Fernandez-Flores, 2010).

Não há critérios de malignidade definidos para tumores de músculo liso em boca. Muitos autores consideram o índice mitótico como principal característica indicativa de comportamento biológico (Kelly; Harrigan, 1977; Yamamoto et al., 1983; Gerçeker et al., 1993; Loyola et al., 1999; Wertheimer-Hatch et al., 2000; Lloria-Benet et al., 2003; Sobral et al., 2004; Rodini et al., 2007; Reddy et al., 2011). Entretanto, há relatos na literatura de tumores com índice mitótico muito baixo e que apresentaram comportamento agressivo, incluindo recidiva e metástase (Sozeri et al., 1992; Karlis et al., 1996; Nikitakis et al., 2002; Ethunandan et al., 2007). Por essa razão, a avaliação do índice mitótico como critério único não é confiável.

2.4 Marcadores biológicos

2.4.1 Actina de músculo liso (AML)

As actinas, proteínas presentes no citoplasma de todas as células, são responsáveis pela movimentação celular. Existem várias isoformas de actina, sendo

que a α_{sm} e a γ_{sm} se encontram predominantemente em músculo liso (Bunnell; Ervasti, 2011). A α_{sm} se manifesta principalmente em tecido vascular, enquanto a γ_{sm} é mais comum nos tratos gastrointestinal e genital (Wang et al., 2006).

Os leiomiomas e os leiomiossarcomas reagem positivamente para a AML, um anticorpo de origem mesenquimal relacionado ao músculo liso, que é o mais frequentemente positivo para a doença e é empregado para confirmar o diagnóstico (Dry et al., 2000; Montgomery et al., 2002; Vilos et al., 2005; Carvalho et al., 2009).

O diagnóstico definitivo de leiomioma e leiomiossarcoma em boca é difícil devido à semelhança histológica com outras neoplasias fusiformes, como o rabdomiossarcoma, carcinoma de células fusiformes, fibrossarcoma, schwannoma, tumor fibroso solitário e histiocitoma fibroso maligno. Por essa razão, a imunoistoquímica é utilizada como técnica auxiliar no diagnóstico diferencial, visto que as lesões citadas acima são negativas ou focalmente positivas para AML, enquanto as neoplasias de músculo liso apresentam positividade difusa (Rodini et al., 2007; Hollmig et al., 2012).

2.4.2 Ki67

Ki67 é uma proteína nuclear, indicativa de proliferação que está presente em todas as fases ativas do ciclo celular, especialmente G2 e M, mas se encontra inativa em repouso celular (Yoshida et al., 2009).

A função da Ki67 ainda é desconhecida, mas sabe-se que ele é fundamental para a proliferação celular, pois sua supressão impede a ocorrência desta (Brown; Gatter, 2002). Algumas funções são sugeridas para essa proteína: organização do DNA; papel estrutural dentro do nucléolo, devido à capacidade de interagir com outras proteínas e se ligar a RNA e DNA; síntese de ribossomos durante a divisão celular, visto que a expressão do ki67 se correlaciona com a taxa de síntese proteica (Brown; Gatter, 2002).

Mais de 75% dos estudos observaram uma relação significativa entre a expressão da Ki67 e o prognóstico em câncer de mama, de pulmão, neoplasias de tecido mole, astrocitoma e meningioma. A marcação da Ki67 também auxilia no

diagnóstico diferencial entre lesões benignas e malignas como: lesões melanocíticas limítrofes e melanoma, hiperplasia de células basalóides e carcinoma de próstata, tricoepitelioma e carcinoma de células basais (Brown; Gatter, 2002).

Muitos trabalhos demonstraram uma associação entre o elevado índice de Ki67 e o prognóstico desfavorável em sarcomas de tecido mole (Enzinger; Weiss, 2001b), entre eles o leiomiossarcoma (Akhan et al., 2005; D'Angelo et al., 2009; D'Angelo et al., 2011).

Amada et al. (1995), Jeffers et al. (1996), Zhai et al. (1999), Mittal e Demopoulos (2001), Mayerhofer et al. (2004), Gökaslan et al. (2005), Rath-Wolfson et al. (2006), D'Angelo et al. (2009), Lee et al. (2009), Yoshida et al. (2009) e Petrovic et al. (2010) avaliaram a expressão de Ki67 em leiomiossarcomas, neoplasias com potencial maligno incerto ou leiomiomas, e observaram uma marcação significativamente maior nos leiomiossarcomas em relação às demais lesões. Segundo esses artigos, o índice de positividade para o Ki67 é bastante útil no diagnóstico diferencial entre neoplasias de músculo liso benignos (leiomioma e tumor com potencial maligno incerto) e malignos (leiomiossarcoma). O'Neill et al. (2007) avaliaram 27 leiomiomas uterinos e apenas um apresentou positividade acima de 20%, enquanto 19 dos 22 leiomiossarcomas uterinos obtiveram o mesmo resultado. Os autores afirmam que um índice acima de 30% é indicativo de leiomiossarcoma, entretanto, esse marcador não tem muita sensibilidade, pois alguns leiomiossarcomas apresentaram índice menor. Chen e Yang (2008) também encontraram imunorreatividade elevada para os leiomiomas pleomórficos, e afirmam que a expressão de Ki67 é limitada na distinção entre leiomiossarcoma e leiomioma pleomórfico.

Akhan et al. (2005), D'Angelo et al. (2009) e D'Angelo et al. (2011) observaram que leiomiossarcomas uterinos com baixo índice de Ki67 apresentaram melhor prognóstico. Porém, Amada et al. (1995), Jeffers et al. (1996), Mittal e Demopoulos (2001), Lee et al. (2009) e Koivisto-Korander et al. (2011) não notaram correlação entre a expressão de Ki67 e o prognóstico dessas lesões. Konomoto et al. (1998) analisaram leiomiossarcomas de tecido mole profundos e superficiais. Nas neoplasias profundas, os que apresentavam índice de Ki67 acima da média tenderam a um pior prognóstico, mas não houve uma correlação significativa entre o índice de Ki67 e o prognóstico.

Alguns autores utilizaram o índice de Ki67 para confirmar o diagnóstico de leiomioma ou leiomiossarcoma de boca. Katou et al. (1997) relataram um caso em mandíbula, com crescimento rápido e características clínicas sugestivas de malignidade. Entretanto, as características histopatológicas associadas à baixa expressão de ki67 (4,7%) e negatividade para o p53 conduziram ao diagnóstico de leiomioma. Foi realizada a excisão cirúrgica dessa neoplasia e 16 meses após a remoção não houve recidiva. Reis et al. (2002) acompanharam uma neoplasia em língua, que apresentou crescimento rápido, mas o aspecto histológico associado à marcação negativa de Ki67 indicaram um leiomioma. Essa lesão foi removida e após dois anos de seguimento não houve recorrência. Mendonça et al. (2008) relataram uma lesão em gengiva, clinicamente semelhante ao granuloma piogênico, que foi removida por biópsia excisional. As características histopatológicas acompanhadas por um índice de Ki67 de 20 a 30% conduziram ao diagnóstico de leiomiossarcoma. Foi realizada uma ressecção segmentar da mandíbula com preservação da basal. Após 11 meses de acompanhamento, o paciente não apresentou sinais de recidiva.

2.4.3 p53

p53 é uma fosfoproteína nuclear, supressora de tumor, composta por 393 aminoácidos divididos em três domínios funcionais: carboxi (C)-terminal, amino (N)-terminal e central (Figura 2.1) (Kim et al., 2011).

A região C-terminal apresenta o domínio de tetramerização e o domínio regulatório. O primeiro é responsável pela formação de tetrâmeros de p53, que é a forma ativa, pela exportação nuclear e pela localização subcelular (Kavalec, 2006; Kim et al., 2011). O domínio regulatório se liga ao DNA fita simples e ao DNA danificado, provavelmente com o objetivo de promover reparo (Kavalec, 2006; Kim et al., 2011). Também é o local onde ocorre a maior parte das modificações pós-traducionais, incluindo acetilação, metilação, ubiquitilação e fosforilação, responsáveis pela regulação da função e dos níveis celulares da p53 (Giono; Manfredi, 2006; Joerger; Fersht, 2010).

Figura 2.1- Representação esquemática da estrutura da proteína p53 segundo suas regiões e domínios principais, bem como alguns resíduos de cisteína (Kim et al., 2011)

O domínio central, que corresponde ao domínio de ligação do DNA, interage com sequências específicas de DNA na região promotora dos genes alvos e também com outras proteínas intracelulares. Essa região apresenta 10 resíduos de cisteína e a orientação de cada resíduo exerce um papel importante na regulação redox do p53 (Kim et al., 2011).

A região N-terminal apresenta o domínio de transativação, que interage com outros componentes da maquinaria transcricional e participa da regulação da transcrição do TP53. Também é o local de ligação da proteína MDM2, o principal regulador negativo da atividade deste supressor tumoral (Giono; Manfredi, 2006; Kim et al., 2011). Além disso, há uma região rica em prolina (SH3), que é necessária para a apoptose e está relacionada com a regulação negativa da p53 (Kavalec, 2006).

A p53 funciona como fator de transcrição e se acumula devido ao stress celular, incluindo danos ao DNA, hipóxia e ativação oncogênica. Consequentemente, ocorre a ativação de genes alvos da p53 e várias respostas celulares podem ser promovidas: repouso celular, senescência, apoptose, diferenciação, reparo do DNA e inibição da angiogênese (Giono; Manfredi, 2006; Farnebo et al., 2010). A escolha da resposta depende de fatores como tipo celular, ambiente celular e outras alterações oncogênicas apresentadas pela célula, incluindo a extensão do defeito

genético (Vousden; Lu, 2002; Giono; Manfredo, 2006; Oliveira, 2008). A p53 também participa da regulação de diversos processos biológicos como autofagia, metabolismo e envelhecimento (Farnebo et al., 2010).

A proteína alterada apresenta meia-vida mais longa em relação à p53 normal, o que permite a detecção imunoistoquímica da primeira (Enzinger; Weiss, 2001b). Muitos estudos demonstraram uma expressão de p53 significativamente mais elevada para o leiomiossarcoma de útero em relação ao leiomioma (Leiser et al., 2006; Anderson et al., 2006; O'Neill et al., 2007; Chen; Yang, 2008; D'Angelo et al., 2009). Entretanto, no estudo de Chen e Yang (2008), os leiomiomas pleomórficos também apresentaram imunorreatividade acentuada. Anderson et al. (2006) e D'Angelo et al. (2009) observaram melhor prognóstico dos leiomiossarcomas com expressão de p53 baixa ou negativa.

Amada et al. (1995), Zhai et al. (1999), Gökaslan et al. (2005), Anderson et al. (2006), Leiser et al. (2006), Rath-Wolfson et al. (2006), D'Angelo et al. (2009), Lee et al. (2009), Petrovic et al. (2010) e Hewedi et al. (2012) avaliaram a expressão de p53 em leiomiossarcomas, tumores com potencial maligno incerto (TPMI) ou leiomiomas uterinos, e observaram uma marcação significativamente maior nos leiomiossarcomas em relação às demais lesões. Segundo esses artigos, o índice de p53 é útil no diagnóstico diferencial entre neoplasias de músculo liso benignas e malignas. O'Neill et al. (2007) observaram expressão difusa de p53 (acima de 50%) em 32% dos leiomiossarcomas e 4% das variantes de leiomioma, mas em nenhum leiomioma usual e TPMI. Os autores afirmam que a expressão difusa de p53 é relativamente específica de malignidade nas neoplasias de músculo liso mas falta sensibilidade, pois muitos leiomiossarcomas apresentaram marcação negativa ou focalmente positiva. Chen e Yang (2008) também encontraram imunorreatividade elevada para os leiomiomas pleomórficos, e afirmam que o índice de p53 é limitado na distinção entre leiomiossarcoma e leiomioma pleomórfico.

Akhan et al. (2005), Lee et al. (2009) e D'Angelo et al. (2011) observaram que os níveis de expressão de p53 em leiomiossarcomas uterinos não apresentaram relação com o prognóstico dos pacientes. Entretanto, Amada et al. (1995), Layfield et al. (2000), Anderson et al. (2006), D'Angelo et al. (2009) e Koivisto-Korander et al. (2011) obtiveram imunorreatividade baixa ou negativa para os leiomiossarcomas com prognóstico favorável, enquanto os casos com marcação difusa apresentaram

prognóstico pior. Blom et al. (1998) afirmam que a expressão aumentada de p53 nos estágios iniciais de leiomiossarcoma uterino indicam maior risco de recorrência.

Fernandez-Florez (2010) avaliou o índice de positividade para p53 em leiomiomas e leiomiossarcomas cutâneos e afirma que imunorreatividade acima de 60% é altamente sugestiva de malignidade. Entretanto, a marcação negativa não garante benignidade. Konomoto et al. (1998) analisaram alterações gênicas e imunorreatividade do p53 em leiomiossarcomas de tecido mole profundos e superficiais. Houve correlação significativa entre as anormalidades do p53 e o prognóstico em tumores profundos. Em relação aos tumores superficiais, todos os pacientes que morreram da doença apresentavam alterações do p53.

Em um estudo realizado por Rubio et al. (2010), células tronco mensesquimais (CTM) adiposas com deleção do gene p53 foram injetadas em ratos imunocomprometidos e, houve o surgimento de leiomiossarcoma. Entretanto, as CTM que apresentavam outras alterações genéticas e presença de p53 normal não desenvolveram a doença. Esse achado sugere que a ausência de p53 pode ser um dos eventos responsáveis pela transformação maligna.

2.4.4 PTEN

PTEN é uma tirosina fosfatase de dupla especificidade, com atividade lipoproteica, situada tanto no citoplasma como no núcleo. Trata-se de uma proteína supressora de tumor e apresenta 403 aminoácidos, divididos em dois domínios principais: N-terminal e C-terminal, conforme ilustrado na figura 2.2 (Simpson; Parsons, 2001; Yin; Shen, 2008).

A região N-terminal contém o domínio fosfatase, com um centro catalítico, responsável pela desfosforilação de lipídios e proteínas (Steelman et al., 2004). A região C-terminal apresenta o domínio C2 e a cauda. O primeiro se liga aos fosfolipídios da membrana plasmática e ao centrômero, enquanto a cauda é composta por sequências PEST (listradas na figura), envolvidas na estabilidade do PTEN, e domínio PDZ, que promove interações proteína-proteína (Yin; Shen, 2008; Planchon et al., 2008).

Figura 2.2 - Representação esquemática da estrutura da proteína PTEN, mostrando as regiões amino e carboxi-terminal, e os principais domínios (Simpson; Parsons, 2001)

O PTEN apresenta três mecanismos de ação: lipídio-fosfatase, proteína-fosfatase e independente de fosfatase (Yamada; Araki, 2001). A atividade lipídio fosfatase ocorre por meio da desfosforilação do fosfoinositol 3,4,5-trifosfato (PIP3), necessário para a ativação da via PI3K/AKT (Figura 2.3), e promove apoptose, inibição do crescimento, da proliferação e da migração celular (Besson et al., 1999; Yamada; Araki, 2001; Steelman et al., 2004; Blanco-Aparicio et al., 2007).

O PTEN regula a motilidade e a migração celular por meio da desfosforilação e consequente inativação da tirosina kinase FAK e da proteína Shc (Figura 2.3), que participam da via de sinalização das integrinas e são importantes na proliferação celular, na movimentação e na adesão da célula à matriz extracelular (Tamura et al., 1999; Yin; Shen, 2008).

Figura 2.3 - Representação esquemática de parte da via de sinalização da proteína PTEN, mostrando as atividades dependente de fosfatase (segundo Yamada; Araki, 2001)

O PTEN também atua no núcleo e interage com CENP-C, um componente integrante do cinetócoro, localizado no centrômero, para a manutenção da estabilidade cromossômica. Esse mecanismo de ação é independente de fosfatase (Yin; Shen, 2008). Outras funções nucleares incluem: inibição da MAPK e consequente repouso do ciclo celular, aumento dos níveis de RAD51, promovendo o “check point” para reparo da fita dupla de DNA, e apoptose (Yin; Shen, 2008; Planchon et al., 2008).

O gene PTEN, localizado na região 10q23, está mutado em vários tipos de câncer, incluindo: glioblastoma, câncer de endométrio, carcinoma prostático, gástrico, colorretal e melanoma (Simpson; Parsons, 2001; Steelman et al., 2004). Perdas cromossômicas na região 10q são bastante comuns em leiomiossarcoma, e estão presentes principalmente em tumores grandes, de alto grau e metastáticos, contribuindo para um comportamento mais agressivo do mesmo (Hu et al., 2005). Em um estudo realizado por Hernando et al. (2007), ratos apresentando deleção homozigótica do gene PTEN desenvolveram hiperplasia de músculo liso e leiomiossarcoma abdominal, com incidência de 80%. Huang et al. (2011) observaram maior expressão imunoistoquímica dessa proteína nos leiomiomas em relação aos leiomiossarcomas uterinos. Entretanto, nos estudos de Gökaslan et al.

(2005) e D'Angelo et al. (2009) não houve diferença significativa entre esses dois grupos.

2.4.5 PTEN e p53

O PTEN aumenta os níveis de p53 por meio da desfosforilação de PIP3 e consequente inibição do AKT, responsável pela fosforilação de MDM2. Uma vez ativo, o MDM2 é translocado para o núcleo e se liga a p53, permitindo a degradação deste via proteossomos (Mayo; Donner, 2002; Freeman et al., 2003; Yin; Shen, 2008).

O PTEN também estabiliza a proteína p53 por meio de uma interação física, exercendo uma atividade independente de fosfatase. Consequentemente, ocorre aumento da atividade transcricional e da meia vida da p53 (Freeman et al., 2003; Tang; Eng, 2006; Chang et al., 2008; Yin; Shen, 2008). Em contrapartida, esta proteína é capaz de se ligar à região promotora do gene PTEN e elevar a expressão do mesmo, exercendo um feedback positivo (Tang; Eng, 2006; Yin; Shen, 2008).

Em condições celulares normais, a p53 está presente em baixos níveis, enquanto o PTEN apresenta elevados níveis e a sua expressão insuficiente pode levar à tumorigênese. Em situações de stress celular, o PTEN é retido no núcleo e a expressão de p53 torna-se elevada, promovendo a resposta celular ao stress (Chang et al., 2008; Yin; Shen, 2008).

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste estudo é comparar leiomiomas e leiomiossarcomas de boca por meio de análise histológica, utilizando-se os critérios morfológicos do grau de atipia, presença de necrose e índice mitótico, e da reação imunoistoquímica, utilizando os marcadores Ki67, p53 e PTEN.

4 MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Casos e análise morfológica

Foram selecionados 7 casos diagnosticados após revisão como leiomiossarcoma, 4 como angioleiomioma e 2 como leiomioma sólido, disponíveis nos arquivos da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da USP. Os casos que apresentaram expressão negativa para actina de músculo liso foram excluídos do estudo. Cortes histológicos corados com hematoxilina e eosina foram examinados para a presença dos seguintes critérios: atipia celular, índice mitótico e presença de necrose (Bell et al., 1994; Hendrickson et al., 2003). A atipia celular foi analisada no aumento microscópico de 100x e classificada como ausente, leve, moderada ou intensa. O número de mitoses foi quantificado no aumento microscópico de 400x e a contagem foi realizada em campos sequenciais, nas áreas mais representativas das neoplasias, e a média foi obtida de 10 campos. Já a necrose foi classificada como ausente, hialina e coagulativa.

4.2 Imuno-histoquímica

Para análise imunoistoquímica, cortes de três micrômetros de espessura foram obtidos dos blocos de parafina e colocados em lâminas previamente tratadas com organosilano. Para as proteínas AML (actina de músculo liso), ki67 e PTEN, os cortes foram desparafinizados em dois banhos de xilol: o primeiro a 60°C durante 30 minutos, e o segundo a temperatura ambiente por 15 minutos. Em seguida, foram reidratados em banhos descendentes de etanol absoluto (três vezes): 95%, 90% e 85%, durante três minutos cada. A remoção do pigmento de formol ocorreu pela imersão dos cortes em solução de hidróxido de amônia 10% associada a etanol 95%, por cinco minutos. Em seguida, foram lavados em água destilada durante dez minutos.

A recuperação antigênica das proteínas AML e PTEN foram realizadas com solução de ácido cítrico (10mM, pH 6,0), e do ki67 com EDTA (10mM, pH 9,0) em banho Maria a 95°C por 30 minutos. Posteriormente, as lâminas foram lavadas em água destilada durante 10 minutos.

Para o p53, a desparafinização, a reidratação e a recuperação antigênica foram feitas em uma única etapa, utilizando-se 1 mL da solução de trilogy (Cell marque, Rocklin USA) em 99 mL de água destilada em banho Maria a 95°C. As lâminas foram mergulhadas em dois banhos dessa solução, um de 30 e outro de 10 minutos. Em seguida, as lâminas foram lavadas em água corrente durante 5 minutos com um banho rápido em água destilada.

O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado igualmente para todas as proteínas analisadas, utilizando-se solução de peróxido de hidrogênio 20 volumes associado ao metanol, na proporção de 1/1, em que as lâminas foram mergulhadas em dois banhos, de 15 minutos cada. Os cortes de AML, ki67 e PTEN foram colocados na água destilada por 5 minutos, e logo após em solução tampão TRIS, pH 7,6, por cinco minutos. As lâminas de p53 foram lavadas em dois banhos de TRIS pH 7,6 durante 10 minutos.

Para imuno-marcação com o anticorpo AML, as etapas seguintes (incubação do anticorpo primário, do anticorpo de ligação e complexo terciário, coloração e contra-coloração) foram realizadas automaticamente por meio do sistema de coloração universal Autostainer Dako (Dakocytomation, Carpinteria USA). Após a acomodação das lâminas no equipamento, houve a incubação com o anticorpo primário monoclonal AML1A4 (Dako, Denmark, Carpinteria USA), diluído em solução de Tris pH 7,4 acrescido de BSA 1% (albumina bovina e azida sódica), na proporção de 1:200. Como soro secundário e complexo terciário, utilizou-se o kit Lsab (Dako). Os cortes foram corados com diaminobenzidina (DAB) e contra-corados com hematoxilina de Mayer.

As reações para os anticorpos ki67, PTEN e p53 foram realizadas manualmente. O ki67 e o PTEN foram diluídos em solução de BSA, como descrito acima, enquanto o p53 foi diluído em emerald. As concentrações e o tempo de incubação desses anticorpos primários utilizados estão descritos na tabela 4.1.

Tabela 4.1 - Anticorpos primários utilizados segundo o tipo, a concentração, a empresa, o clone e o tempo de incubação

Soro	Tipo	Concentração	Marca	Clone	Incubação
Ki67	Monoclonal	1:75	Dako	MIB-1	18 h
PTEN	Policlonal	1:400	Zymed	PN-37	1 h
P53	Monoclonal	1:250	Cell marque	DO-7	18 h
AML	Monoclonal	1:200	Dako	1A4	40 min

Após a incubação dos anticorpos primários, todos os procedimentos posteriores foram sempre precedidos de três banhos de Tris pH 7,6. Para a incubação do anticorpo de ligação e do complexo terciário, foi utilizado o kit Lsab Dako pra AML e ki67, o kit Dako Advance HRP para PTEN, e o Hides Detection HRP Polymer System para p53.

Independente do método de imuno-histoquímica utilizado, as lâminas de todos os anticorpos foram coradas com diaminobenzidina 0,025% (DAB 3,3-diaminobenzidina, Sigma Chemical Co., St Louis MO/USA) e contra-corados com hematoxilina de Mayer previamente filtrada. Posteriormente, foi realizada a desidratação em cadeia ascendente de etanóis, diafanização em dois banhos de xilol e montagem automática das lâminas por meio do equipamento Tissue Tek SCA (Sakura Seiki, Nagano Japão).

Um caso de carcinoma epidermóide de boca foi utilizado como controle positivo para o ki67 e o p53, e regiões não neoplásicas das lâminas como controle negativo. Os vasos sanguíneos das lesões foram usados como controle interno nas reações de PTEN.

4.3 Quantificação

Para o ki67, apenas a marcação nuclear foi considerada, e a marcação foi considerada negativa quando menos de 10% das células neoplásicas estavam marcadas, e positiva quando acima de 10% das células neoplásicas estavam marcadas (D'Angelo et al., 2011; Lee et al., 2009).

O p53 foi avaliado como negativo, como marcação leve (+) quando não mais que 10% das células foram positivamente marcadas, marcação moderada (++) quando entre 11 e 50% das células eram positivas, e intensa(+++) com mais que 50% das células positivas (Konomoto et al., 1998; Mawrin et al., 2002). Foram consideradas marcação nuclear e citoplasmática.

A marcação do anticorpo PTEN foi considerada negativa (-) na total ausência de células neoplásicas marcadas; marcação leve (+), quando até 10% das células neoplásicas estavam marcadas; moderadamente positiva (++) entre 11-50% de células marcadas; e marcação intensa (+++), acima de 50% de células marcadas (Gökaslan et al., 2005). Foram consideradas a marcação nuclear e a citoplasmática.

5 RESULTADOS

Todos os casos selecionados apresentaram marcação para o anticorpo AML, e consequentemente foram mantidos no estudo. A análise histopatológica mostrou que dos quatro angioleiomiomas, três estavam desprovidos de atipia, mitose e necrose. Apenas um caso mostrou atipia discreta e uma mitose por 10 CGA. Os dois leiomiomas sólidos apresentaram atipia discreta e ausência de necrose; o índice mitótico de um dos casos foi de uma mitose por 10 CGA, enquanto o outro não mostrou mitose. Todos os leiomiossarcomas apresentaram atipia difusa, sendo três delas discreta e quatro moderada, e o índice mitótico variou de 0 a 6 mitoses por 10CGA. Foi observado necrose tumoral coagulativa em apenas um caso (Tabela 5.1). A figura 5.1. ilustra o grau de atipia e a presença de necrose.

Tabela 5.1 - Características histopatológicas dos casos examinados, segundo o diagnóstico, o índice mitótico em 10 CGA, o grau de atipia e a presença ou ausência de necrose

	Índice mitótico em 10CGA	Atipia
Angioleiomioma	0	Ausente
1	1	Discreta
2	0	Ausente
3	0	Ausente
4	0	Ausente
Leiomioma sólido		
5	0	Discreta
6	1	Discreta
Leiomiossarcoma		
7	6	Moderada
8	2	Discreta
9	0	Discreta
10	3	Moderada
11	4	Moderada
12	2	Moderada
13	2	Discreta

CGA: campo de grande aumento

Figura 5.1 - Exemplos de alterações histológicas encontradas nos casos estudados. Em A, observamos caso de leiomioma apresentando atipia considerada leve. Em B pode ser observado caso de leiomiossarcoma mostrando atipia considerada como moderada. Em C, observa-se caso de leiomiossarcoma com extensa área de necrose tumoral coagulativa. Aumento de 400x em A e B, e de 100x em C

- Imuno-histoquímica

Os resultados das reações imunoistoquímicas são mostrados na tabela 5.2 e na figura 5.2. Todos os casos examinados foram positivos para o anticorpo anti-AML. Em relação à marcação com o anticorpo anti-Ki67, dois casos de leiomioma sólido foram negativos e apenas um angioleiomioma foi positivo; a maioria dos casos de leiomiossarcoma foram positivos.

Tabela 5.2 - Resultado da marcação imunoistoquímica para os anticorpos Ki67, p53 e PTEN, segundo o diagnóstico, o número de casos e sua a porcentagem, e o grau de marcação.

	Ki-67	p53			PTEN		
		+	++	+++	+	++	+++
Angioleiomioma	1/4 (25%)	3/4 (75%)	0/0	0/0	2/4 (50%)	2/4 (50%)	0/0
Leiomioma	0/2	1/2 (50%)	1/2 (50%)	0/0	0/0	0/0	1/2 (50%)
Leiomiossarcoma	5/7 (71,4%)	2/7 (28,6%)	4/7 (57,1%)	1/7 (14,3%)	0/0	3/7 (42,9%)	3/7 (42,9%)

Ki-67: positivo quando mais de 10% das células estavam marcadas; p53 e PTEN: + (marcação leve, até 10% das células marcadas), ++ (marcação moderada, de 11 a 50% de marcação), +++ (marcação intensa, mais de 50% das células positivas).

Figura 5.2 - Exemplos representativos da marcação imunoistoquímica obtidas nos casos de leiomioma (A, C, E, G) e leiomiossarcoma (B, D, F, H) estudados. Marcação negativa para o anticorpo Ki67 em caso de leiomioma vascular (A) e de leiomiossarcoma (B). Positividade discreta para p53 em leiomioma (C) e de maior intensidade em leiomiossarcoma (D). Marcação positiva para PTEN em leiomioma vascular (E) e leiomiossarcoma (F). Casos de leiomioma sólido (G) e leiomiossarcoma (H), mostrando positividade de intensidade variável para AML. Aumento de 200x.

A análise de expressão da proteína p53 mostrou leve positividade para um caso de leiomioma sólido e moderada para o outro, a maioria dos angioleiomiomas foram levemente positivos e apenas um foi negativo. Todos os leiomiossarcomas foram positivos, sendo que dois apresentaram marcação leve, quatro moderada e um intensa.

Em relação à marcação do PTEN, um caso de leiomioma sólido foi negativo e o outro apresentou positividade intensa, todos os casos de angioleiomioma foram positivos, sendo que dois demonstraram positividade leve e dois moderada. Três leiomiossarcomas apresentaram positividade moderada e três intensa, apenas um foi negativo.

5 DISCUSSÃO

As neoplasias de músculo liso são bastante raros na cavidade oral e não há um critério de diagnóstico definido nessa região, visto que este varia de acordo com a localização (Miettinen; Fetsch, 2006). As lesões de útero são consideradas malignas se apresentarem pelo menos duas dessas características: índice mitótico acima de 10/10 CGA, necrose tumoral coagulativa e atipia moderada/severa (Hendrickson et al., 2003). Entretanto, as neoplasias cutâneas são consideradas malignas se apresentarem número de mitoses acima de 2/10 CGA ou necrose. A atipia isolada não é utilizada como critério de malignidade, a menos que venha acompanhada de uma das duas características citadas anteriormente (Fernandez-Flores, 2010).

Em nosso estudo, quatro leiomiomas foram desprovidos de atipia, mitose ou necrose, enquanto quatro leiomiossarcomas apresentaram atipia moderada, com índice mitótico variando entre 2 e 6/10 CGA e um destes com necrose. Essas características estão de acordo com os critérios descritos na literatura para a maioria das regiões, discordando apenas dos leiomiossarcomas de útero e de genitália externa feminina (Hornick; Fletcher, 2003; Miettinen; Fetsch, 2006). Muitos autores consideram o índice mitótico como principal característica indicativa de comportamento biológico em boca (Kelly; Harrigan, 1977; Yamamoto et al., 1983; Gerçeker et al., 1993; Loyola et al., 1999; Wertheimer-Hatch et al., 2000; Lloria-Benet et al., 2003; Sobral et al., 2004; Rodini et al., 2007; Reddy et al., 2011). Entretanto, há relatos na literatura de neoplasias com índice mitótico muito baixo e atipia moderada que apresentaram comportamento agressivo, incluindo recidiva e metástase (Sozeri et al., 1992; Karlis et al., 1996; Nikitakis et al., 2002; Ethunandan et al., 2007). Por essa razão, a avaliação do índice mitótico como critério único não é confiável.

Nos casos analisados nesse estudo, três leiomiomas apresentavam atipia discreta, dois destes com 1 mitose por 10 CGA, enquanto três leiomiossarcomas também apresentaram atipia discreta, dois destes com índice mitótico de 2/10 CGA. Segundo Hornick e Fletcher (2003), lesões confinadas à derme exibindo baixo número de mitoses e atipia leve devem ser chamadas de tumores de músculo liso atípicos com potencial de recorrência, enquanto lesões subcutâneas com as

mesmas características são consideradas como leiomiossarcoma. Miettinen e Fetsch (2006) afirmam que, neoplasias de músculo liso gastrointestinais com atipia discreta e baixo índice mitótico devem ser classificados como tumores com potencial maligno incerto, porque a experiência em relação a essas lesões é bastante limitada. Infelizmente, não temos o acompanhamento dos pacientes e por essa razão não é possível relacionar as características histológicas ao prognóstico. Não há consenso na literatura sobre como devem ser classificados as neoplasias com atipia discreta e baixo número de mitoses em boca. Alguns são classificados como leiomioma e outros como leiomiossarcoma. Diante do desconhecimento em relação ao comportamento das lesões com essas características em cavidade oral, o mais adequado é que elas sejam classificadas como neoplasias com potencial maligno incerto, até que possa ser realizada uma correlação adequada entre as características histológicas e o prognóstico. O uso de marcadores biológicos pode ser outra forma de se obter uma classificação mais apropriada, pois o uso apenas da morfologia pode dificultar o diagnóstico de lesões limítrofes.

Nos casos analisados nesse estudo, houve imunorreatividade para o Ki67 acima de 10% em cinco dos sete leiomiossarcomas, enquanto apenas um angioleiomioma foi positivo. Nossos resultados estão de acordo com outros estudos, que também observaram marcação maior nos leiomiossarcomas, embora alguns casos tenham sido negativos (Jeffers et al., 1996; Bellezza et al., 2004; Mayerhofer et al., 2004; Gökaslan et al., 2005; O'Neill et al., 2007; Chen; Yang, 2008; D'Angelo et al., 2009; Lee et al., 2009; Petrovic et al, 2010). D'Angelo et al. (2011) encontraram positividade em 62% dos leiomiossarcomas uterinos. O'Neill et al. (2007) afirmam que o ki67 é específico de malignidade mas não tem muita sensibilidade, visto que alguns leiomiossarcomas apresentaram índice de marcação baixo ou negativo. D'Angelo et al. (2009) e D'Angelo et al. (2011) observaram prognóstico favorável para os pacientes com baixa expressão de ki67, enquanto os casos com marcação positiva apresentaram pior prognóstico. Entretanto, Amada et al. (1995), Jeffers et al. (1996) e Lee et al. (2009) não identificaram essa correlação. O Ki67 é bastante útil na distinção entre leiomioma e leiomiossarcoma, mas a associação deste marcador com o prognóstico é controversa. Deve ser considerado que a ausência de marcação pode ser decorrente do processamento inadequado do tecido como, por exemplo, o uso de fixador não tamponado.

Em relação ao p53, apenas um leiomioma foi negativo, quatro apresentaram positividade leve e um moderada. Todos os leiomiossarcomas foram positivos, sendo dois com marcação leve (abaixo de 10%), quatro moderada e um intensa. Entretanto, Amada et al. (1995) observaram apenas 8 casos com expressão maior que 10% em 24 leiomiossarcomas. Blom et al. (1998) encontraram 27% dos leiomiossarcomas com marcação acima de 10%. Konomoto et al. (1998) avaliaram 33 leiomiossarcomas e oito foram positivos, sendo que seis apresentaram imunorreatividade esporádica e os outros dois difusa (acima de 50%). Petrovic et al. (2010) observaram seis casos com expressão maior que 10% em 17 leiomiossarcomas. A forma de análise da expressão do p53 é bastante variável na literatura, o que torna difícil a comparação. Alguns autores consideram expressão positiva ou sugestiva de leiomiossarcoma quando o número de células marcadas é maior que 50% (O'Neill et al., 2007; Lee et al., 2009; D'Angelo et al., 2011). O'Neill et al. (2007) encontraram marcação acima de 50% em 32% dos leiomiossarcomas e em 4% das variantes de leiomioma, mas em nenhum leiomioma ou tumor com potencial maligno incerto. Lee et al. (2009) observaram positividade em 23% dos leiomiossarcomas ginecológicos e em 17% dos não-ginecológicos, enquanto todos os leiomiomas foram negativos. D'Angelo et al. (2011) obtiveram marcação positiva em 23% dos leiomiossarcomas uterinos. O'Neill et al. (2007) afirmam que o p53 é relativamente específico de malignidade mas não tem sensibilidade, visto que muitos casos apresentaram índice de marcação baixo ou negativo. Amada et al. (1995) encontraram correlação entre o índice de p53 e o prognóstico. Entretanto, D'Angelo et al. (2011) não observaram essa associação. A expressão de p53 pode ser útil na distinção entre leiomioma e leiomiossarcoma, mas a relação deste marcador com o prognóstico também é controversa.

Em nosso estudo, a imunorreatividade de PTEN foi maior nos leiomiossarcomas do que nos leiomiomas. Para estes, dois casos apresentaram positividade leve, dois moderada, um intensa e um foi negativo. Para os leiomiossarcomas, três pacientes obtiveram expressão moderada, três intensa e um foi negativo. Entretanto, Huang et al. (2011) observaram maior marcação nos leiomiomas do que nos leiomiossarcomas e TPML. Gökaslan et al. (2005) e D'Angelo et al. (2009) não encontraram diferença em relação à imunorreatividade para o PTEN nos leiomiomas e nos leiomiossarcomas. No estudo de Gökaslan et al. (2005), houve positividade intensa em 14 dos 15 leiomiomas e em 13 dos 17

leiomiossarcomas. Não houve muita diferença na expressão de PTEN para leiomioma e leiomiossarcoma. Sendo assim, este marcador não deve ser utilizado para ajudar no diagnóstico diferencial.

Pesquisas futuras com leiomiossarcomas de boca, e com seguimento clínico, podem confirmar se a presença de atipia moderada, baixo índice mitótico e positividade acima de 10% para Ki-67 e p53, podem ser úteis na distinção entre leiomiomas e leiomiossarcomas, bem como da ocorrência de lesões limítrofes em boca.

7 CONCLUSÕES

- O ki67 e o p53 são úteis na diferenciação entre leiomiomas e leiomiossarcomas, mas o PTEN não é específico.
- Lesões com atipia moderada e poucas mitoses podem ser classificadas como leiomiossarcomas, principalmente associadas aos marcadores imunoistoquímicos Ki67 e p53).

REFERÊNCIAS¹

Akhan SE, Yavuz E, Tecer A, Iyibozkurt CA, Topuz A, Tzulali S, et al. The expression of ki67, p53, estrogen and progesterone receptors affecting survival in leiomyosarcomas: a clinicopathological study. *Gynecol Oncol*. 2005;99:36-42.

Amada S, Nakano H, Tsuneyoshi M. Leiomyosarcoma versus bizarre and cellular leiomyomas of the uterus: a comparative study based on the MIB-1 and proliferating cell nuclear antigen indices, p53 expression, DNA flow cytometry, and muscle specific actins. *Int J Gynecol Pathol*. 1995;14:134-42.

Anderson SE, Nonaka D, Chuai S, Olshen AB, Chi D, Sabbatini P, et al. p53, epidermal growth factor, and platelet-derived growth factor in uterine leiomyosarcoma and leiomyomas. *Int J Gynecol Cancer*. 2006 Mar-Apr;16(2):849-53.

Arora P, Jain S, Khurana N. Pleomorphic leiomyosarcoma of gingivoalveolar sulcus: a case report. *Acta Cytol* 2010;54:1043-9.

Baden E, Doyle JL, Lederman DA. Leiomyoma of the oral cavity: a light microscopic and immunohistochemical study with review of the literature from 1884 to 1992. *Oral Oncol, Eur J Cancer*. 1994;30B(1):1-7.

Bell SW, Kempson RL, Hendrickson MR. Problematic uterine smooth muscle neoplasms. A clinicopathologic study of 213 cases. *Am J Surg Pathol*. 1994;18(6):535-58.

Bellezza G, Sidoni A, Cavaliere A, Scheibel M, Bucciarelli E. Primary cutaneous leiomyosarcoma: a clinicopathological immunohistochemical study of 7 cases. *Int J Surg Pathol*. 2004;12(1):39-44.

Bertolini F, Bianchi B, Corradi D, Caradonna L, Sesenna E. Mandibular intraosseous leiomyoma in a child: report of a case. *J Clin Pediatr Dent*. 2003;27(4):385-87.

Besson A, Robbins SM, Yong VW. PTEN/MMAC1/TEP1 in signal transduction and tumorigenesis. *Eur J Biochem*. 1999;263:605-11.

¹ De acordo com estilo Vancouver.

Blanco-Aparicio C, Renner O, Leal JFM, Carnero A. PTEN, more than the AKT pathway. *Carcinogenesis* 2007;28(7):1379-86.

Blom R, Guerrieri C, Stal O, Malmstrom H, Simonsen E. Leiomyosarcoma of the uterus: a clinicopathologic, DNA flow cytometric, p53 and mdm-2 analysis in 49 cases. *Gynecol Oncol.* 1998;68:54-61.

Brooks JK, Ricalde P, Nikitakis NG, Levy BA. Angioleiomyoma of the tongue. *Gen Dent.* 2004;52(1):52-4.

Brown DC, Gatter KC. Ki67 protein: the immaculate deception? *Histopathology.* 2002 Jan;40(1):2-11.

Bunnell TM, Ervasti JM. Structural and functional properties of actin gene family. *Crit Rev Eukaryot Gene Expr.* 2011;21(3):255-66.

Carvalho JC, Thomas DG, Lucas DR. Cluster analysis of immunohistochemical markers in leiomyosarcoma delineates specific anatomic and gender subgroups. *Cancer.* 2009 Sept;115(18):4186-95.

Centeno CR, Nadini F, Adam R, Godoy H, Reichart PA. Primary leiomyosarcoma of the mandible. *Oral Oncol Extra.* 2006;42:40-5.

Chang CJ, Mulholland DJ, Valamehr B, Mosessian S, Sellers WR, Wu H. PTEN nuclear localization is regulated by oxidative stress and mediates p53-dependent tumor suppression. *Mol Cell Biol* 2008 May;28(10):3281-9.

Chen L, Yang B. Immunohistochemical analysis of p16, p53, and Ki-67 expression in uterine smooth muscle tumors. *Int J Gynecol Pathol.* 2008 Jul;27(3):326-32.

D'Angelo E, Espinosa I, Ali R, Gilks CB, Rijn M, Lee CH, et al. Uterine leiomyosarcomas: tumor size, mitotic index, and biomarkers ki67, and bcl-2 identify two groups with different prognosis. *Gynecol Oncol.* 2011 May;121(2):328-33.

D'Angelo E, Spagnoli LG, Prat J. Comparative clinicopathologic and immunohistochemical analysis of uterine sarcomas diagnosed using the World Health Organization classification system. *Hum Pathol.* 2009 Nov;40(11):1571-85.

Dry SM, Jorgensen JL, Fletcher CD. Leiomyosarcomas of the oral cavity: an unusual topographic subset easily mistaken for nonmesenchymal tumours. *Histopathology*. 2000 Mar;36(3):210-20.

Enzinger FM, Weiss SW. Benign tumors of smooth muscle. In: Gay SM, editor. *Soft tissue tumors*. 4th ed. St Louis: Mosby-Year Book; 2001a. p. 695-726.

Enzinger FM, Weiss SW. Immunohistochemistry for analysis of soft tissue tumors. In: Gay SM, editor. *Soft tissue tumors*. 4th ed. St Louis: Mosby-Year Book; 2001b. p 199-245.

Enzinger FM, Weiss SW. Leiomyosarcoma. In: Gay SM, editor. *Soft tissue tumors*. 4th ed. St Louis: Mosby-Year Book; 2001c. p 727-48.

Esguep A, Solar M. Oral vascular leiomyoma- report of 5 cases and review of the literature. *J Oral Med*. 1986 Apr-Jun;41(2):126-9.

Ethunandan M, Stokes C, Higgins B, Spedding A, Way C, Brennan P. Primary oral leiomyosarcoma: a clinico-pathologic study and analysis of prognostic factors. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2007 May;36(5):409-16.

Farman AG, Kay S. Oral leiomyosarcoma. Report of a case and review of the literature pertaining to smooth-muscle tumors of the oral cavity. *Oral Surg*. 1977 Mar;43(3):402-9.

Farnebo M, Bykov VJ, Wiman KG. The tumor suppressor p53: a master regulator of diverse cellular processes and therapeutic target in cancer. *Biochem Biophys Res Commun*. 2010 May;396(1):85-9.

Fernandez-Flores A. Cutaneous leiomyomas and leiomyosarcomas: an immunohistochemical study with p53. *Rom J Morphol Embryol*. 2010;51(2):295-8.

Freeman DJ, Li AG, Wei G, Li HH, Kertesz N, Lesche R, et al. PTEN tumor suppressor regulates p53 protein levels and activity through phosphatase-dependent and -independent mechanisms. *Cancer Cell*. 2003 Feb;3:117-30.

Gaitan-Cepeda LA, Quezada-Rivera D, Tenorio-Rocha F, Leyva-Huerta ER, Mendez-Sánchez E. Vascular leiomyoma of the oral cavity. Clinical, histopathological and imunohistoquemical characteristics. Presentation of five cases and review of the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2008 Aug; 1;13(8):E483-8.

Gerçeker M, Anadolu RY, Bulay O. Leiomyoma of the cheek. Case report. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1993;22(1):42-3.

Giono LE, Manfredi JJ. The p53 tumor suppressor participates in multiple cell cycle checkpoints. *J Cell Physiol*. 2006 Oct;209(1):13-20.

Gökaslan H, Türkeri L, Kavak ZN, Eren F, Sismanoglu A, Ilvan S, et al. Differential diagnosis of smooth muscle tumors utilizing PTEN, p53 and Ki67 expression with strogen and progesterone receptors. *Gynecol Obstet Invest*. 2005;59:36-40.

Goldblatt LI, Edesess RB. Central leiomyoma of the mandible: report of a case with ultrastructural confirmation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1977;43(4):591-7.

Goldschmidt PR, Goldschmidt JD, Lieblisch SE, Eisenberg E. Leiomyosarcoma presenting as a mandibular gingival swelling: a case report. *J Periodontol*. 1999 Jan;70(1):84-9.

González-Sánchez MA, Colorado-Bonnin M, Berini-Aytés L, Gay-Escoda C. Leiomyoma of the hard palate: a case report. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2007;12:E221-4.

Hendrickson MR, Tavassoli FA, Kempson RL, Mc Cluggage WG, Haller U, Kubik-Huch RA. Mensenchymal tumours and related lesions. In: Tavassoli FA, Devilee P, editors. *Word Health Organization Classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of the breast and female genital organs*. Lyon: IARC Press; 2003.

Hernando E, Charytonowicz E, Dudas ME, Menendez S, Matushansky I, Mills J, et al. The AKT-mTOR pathway plays a critical role in the development of leiomyosarcomas. *Nature Med*. 2007;13(6):748-53.

Hewedi IH, Radwan NA, Shash LS. Diagnostic value of progesterone receptor and p53 expression in uterine smooth muscle tumors. *Diagn Pathol*. 2012 Jan 5;7:1.

Hollmig ST, Sachdev R, Cockerell CJ, Posten W, Chiang M, Kim J. Spindle cell neoplasms encountered in dermatologic surgery: a review. *Dermatol Surg*. 2012 Jun;38(6):825-50.

Hornick JL, Fletcher CD. Criteria for malignancy in nonvisceral smooth muscle tumors. *Ann Diagn Pathol*. 2003 Feb;7(1):60-6.

Hu J, Rao UNM, Jasani S, Khanna V, Yaw K, Surti U. Loss of DNA copy number of 10q is associated with aggressive behavior of leiomyosarcomas: a comparative genomic hibridization study. *Cancer Genet Cytogenet*. 2005;161:20-7.

Huang LC, Ye JC, HsiehCH, Chen LM, Lin TY, Hung YC, et al. PTEN, tau-AP-3, thymidylate synthase immunohistochemistry scoring expression in patients with uterine leiomyomas, uterine smooth muscle tumors of uncertain malignancy potential and uterine leiomyosarcomas. *Eur J Gynaec Oncol*. 2011;32(5):496-9.

Izumi K, Maeda T, Cheng J, Saku T. Primary leiomyosarcoma of the maxilla with regional lymph node metastasis. Report of a case and review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1995 Sept;80(3):310-9.

Janas A, Grzesiak-Janias G, Sporny S. Removal of oral cavity leiomyoma with carbon dioxide laser. *Quintessence Int*. 2008 Jan 1;39(1):1-4.

Jeffers MD, Oakes SJ, Richmond JA, Macaulay EM. Proliferation, ploidy and prognosis in uterine smooth muscle tumours. *Histopathology*. 1996;29:217-23.

Joerger AC, Fersht AR. The tumor suppressor p53: from structures to drug discovery. *Cold Spring Harb Perspect Biol*. 2010 Jun;2(6):a000919.

Karlis V, Zalsow M, Minkowitz G, Glickman RS. Leiomyosarcoma of the mandible: report of a case and literature review. *J Oral Maxillofac Surg*. 1996;54:1127-30.

Katou F, Andoh N, Motegi K, Nagura H. Leiomyoma of the mandible: a rapid growing case with immunohistochemical and electron microscopic observations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1997;84:45-50.

Kavalec FL. Proliferação e apoptose de fibroblastos com mutação no gene Tp53 de paciente com Síndrome de Li-Fraumeni [dissertação]. Curitiba: Universidade Federal do Paraná; 2006.

Kelly DE, Harrigan WF. Leiomyoma of the tongue: report of a case. *J Oral Surg*. 1977;35(4):316-8.

Kempson RL, Hendrickson MR. Smooth muscle, endometrial stromal, and mixed müllerian tumors of the uterus. *Mod Pathol*. 2000 Mar;13(3):328-42.

Kim DH, Kundu JK, Surh YJ. Redox modulation of p53: mechanisms and functional significance. *Mol Carcinog*. 2011 Apr;50(4):222-34.

Kim HY, Jung SN, Kwon H, Sohn WI, Moon SH. Angiomyoma in the buccal space. *J Craniofac Surg*. 2010;21(5):1634-5.

Koca H, Guneri P, Çetingul E, Onal T. A very rare form of leiomyoma: mandibular angioleiomyoma. *Int J Ped Otorhinolaringol Extra*. 2006;110-4.

Koivisto-Korander R, Butzow R, Koivisto AM, Leminen A. Immunohistochemical studies on uterine carcinosarcoma, leiomyosarcoma, and endometrial stromal sarcoma: expression and prognostic importance of ten different markers. *Tumor Biol*. 2011;32:451-9.

Konomoto T, Fukuda T, Hayashi K, Kumazawa J, Tsuneyoshi M. Leiomyosarcoma in soft tissue: examination of p53 status and cell proliferating factors in different locations. *Human Pathol*. 1998 Jan;29(1):74-81.

Koutlas IG, Manivel JC. Epithelioid leiomyoma of the oral mucosa. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1996;82:670-3.

Krishnan V, Miyaji CM, Mainous EG. Leiomyosarcoma of the mandible: a case report. *J Oral Maxillofac Surg*. 1991;49:652-5.

Layfield LJ, Liu K, Dodge R, Barsky SH. Uterine smooth muscle tumors utility of classification by proliferation, ploidy and prognostic markers versus traditional histopathology. *Arch Pathol Lab Med*. 2000 Feb;124:221-7.

Lee CH, Turbin DA, Sung YC, Espinosa I, Montgomery K, van de Rijn M, et al. A panel of antibodies to determine site of origin and malignancy in smooth muscle tumors. *Mod Pathol*. 2009 Dec;22(12):1519-31.

Leiser AL, Anderson SE, Nonaka D, Chuai S, Olshen AB, Chi DS, et al. Apoptotic and cell cycle regulatory markers in uterine leiomyosarcoma. *Gynecol Oncol*. 2006 Apr;101(1):86-91.

Leung K, Wong DY, Li W. Oral leiomyoma: case report. *J Oral Maxillofac Surg.* 1990;48(7):735-8.

Liang H, Frederiksen NL, Binnie WH, Cheng YS. Intraosseous oral leiomyoma: systematic review and report of one case. *Dentomaxillofac Radiol.* 2003;32(5):285-90.

Lloria-Benet M, Bagán JV, Lloria de Miguel E, Borja-Morant A, Alonso S. Oral leiomyoma a case report. *Med Oral.* 2003;8:215-9.

Lo Muzio L, Favia G, Mignogna MD, Piattelli A, Maiorano E. Primary intraoral leiomyosarcoma of the tongue: an immunohistochemical study and review of the literature. *Oral Oncol.* 2000 Nov;36(6):519-24.

Loyola AM, Araújo NS, Zanetta-Barbosa D, Mendes VC, Jordão-Silva C, Bittar TO. Intraosseous leiomyoma of the mandible. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Endod.* 1999;87:78-82.

Luaces-Rey R, Lorenzo-Franco F, Gomez-Oliveira G, Patiño-Seijas G, Guitián D, Lopez-Cedrun-Cembranos JL. Oral leiomyoma in retromolar trigone. A case report. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2007;12:E53-5.

Mawrin C, Kirches E, Boltze C, Dietzmann K, Roessner A, Schneider-Stock R. Immunohistochemical and molecular analysis of p53, RB, PTEN in malignant peripheral nerve sheath tumors. *Virchows Arch.* 2002;440(6):610-5.

Mayerhofer K, Lozanov P, Bodner K, Bodner-Adler B, Kimberger O, Czerwenka K. Ki67 expression in patients with uterine leiomyomas, uterine smooth muscle tumors with uncertain malignant potential (STUMP) and uterine leiomyosarcomas (LMS). *Act Obstet Gynecol Scand.* 2004;83:1085-8.

Mayo LD, Donner DB. The PTEN, mdm-2, p53 tumor suppressor- oncoprotein network. *Trends Biochem Sci.* 2002 Sept;27(9):462-7.

McParland H, Warnakulasuriya S, Cook RJ. Angioleiomyoma: an unusual diagnosis for a lump in the cheek. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2009;47:641-2.

Mendonça EF, Martins da Silva C, Meneghini AJ, Silva GB, Filho JA, Batista AC. Low-grade gingival leiomyosarcoma in a child. *J Dent Child (Chic).* 2008 Sept-Dec;75(3):301-5.

- Miettinen M, Fetsch JF. Evaluation of biological potential of smooth muscle tumours. *Histopathology*. 2006;48:97-105.
- Mittal K, Demopoulos RI. MIB-1 (ki67), p53, estrogen receptor, and progesterone receptor expression in uterine smooth muscle tumors. *Hum Pathol*. 2001 Sept;32(9):984-7.
- Montgomery E, Goldblum JR, Fisher C. Leiomyosarcoma of the head and neck: a clinicopathological study. *Histopathology*. 2002 Jun;40(6):518-25.
- Natiella JR, Neiders ME, Greene GW. Oral leiomyoma: report of six cases and a review of the literature. *J Oral Pathol*. 1982;11:353-65.
- Nikitakis NG, Lopes MA, Bailey JS, Blanchaert RH, Ord RA, Sauk JJ. Oral leiomyosarcoma: review of the literature and report of two cases with assessment of the prognostic and diagnostic significance of immunohistochemical and molecular markers. *Oral Oncol*. 2002 Feb;38(2):201-8.
- Nonaka CFW, Pereira KMA, Miguel MCC. Oral vascular leiomyoma with extensive calcification areas. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2010;76(4):539.
- O'Neill CJ, Mc Bride HA, Connolly LE, McCluggage WG. Uterine leiomyosarcoma are characterized by high p16, p53 and MIB-1 expression in comparison with usual leiomyomas, leiomyoma variants, and smooth muscle tumors with uncertain malignant potential. *Histopathology*. 2007;50:851-8.
- Oliveira LR. Impacto prognóstico da expressão imunohistoquímica do p53 e p63 e o papel do HPV no carcinoma epidermóide oral [tese]. Riberão Preto: Universidade de São Paulo, Faculdade de Medicina; 2008.
- Petrovic D, Babic D, Forko JI, Martinac I. Expression of ki-67, p53 and progesterone receptors in uterine smooth muscle tumors. Diagnostic value. *Coll Antropol*. 2010 Mar;34(1):93-7.
- Planchon SM, Waite KA, Eng C. The nuclear affairs of PTEN. *J Cell Sci*. 2008;121(3):249-53.

Praal FR, Ioannides CA, Beek GJ, Molengraft F. Oral leiomyomas. *J Maxillofac Surg.* 1982;10:229-35.

Qureshi SS, Mistry RC, Natrajan G, Gujral S, Laskar S, Banavali S. Leiomyosarcoma of the maxilla as second malignancy in retinoblastoma. *Indian J Cancer.* 2008 Jul-Sept;45(3):123-5.

Rath-Wolfson L, Rosenblat Y, Halpern M, Herbert M, Hammel I, Gal R, et al. A new scoring system using multiple immunohistochemical markers for diagnosis of uterine smooth muscle tumors. *J Cell Mol Med.* 2006;10(1):197-205.

Ravindranathan N, Heslop IH. Oral leiomyoma- a case report and review of the literature. *Br J Oral Surg* 1978(2);16:93-9.

Reddy BVR, Shoba Rany S, Amuradha CH, Chandrasekh P, Shamala R, Lingamaneni KP. Leiomyoma of the mandible in a child. *J Oral Maxillofac Pathol.* 2011 Aug;15(1):101-4.

Reis SRA, Sadigursky M, Andrade MGS, Marchionni AMT. Leiomyoma of the tongue: case report. *Rev Pos Grad.* 2002 Apr/Jun;9(2):186-90.

Rodini CO, Pontes FS, Pontes HA, Santos PS, Magalhães MG, Pinto DS. Oral leiomyosarcomas: report of two cases with immunohistochemical profile. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007 Oct;104(4):e50-5.

Rubio R, Garcia-Castro J, Guiterrez-Aranda I, Pramio J, Santos M, Catalina P, et al. Deficiency in p53 but not retinoblastoma induces the transformation of mesenchymal stem cells in vitro and initiates leiomyosarcoma in vivo. *Cancer Res.* 2010 May 15;70(10):4185-94.

Savage NW, Adkins KF, Young WG, Chapman PJ. Oral vascular leiomyoma: review of the literature and report of two cases. *Aust Dent J.* 1983;28(6):346-51.

Savastano G, Palombini L, Muscariello, Erra S. Leiomyosarcoma of the maxilla: a case report. *J Oral Maxillofac Surg.* 1998;56:1101-3.

Simpson L, Parsons R. PTEN: life as a tumor suppressor. *Exp Cell Res.* 2001 Mar 10;264(1):29-41.

- Sobral APV, do Nascimento GJF, Soubhia AMP, Pinto DS Jr. Leiomyosarcoma de boca: estudo histoquímico e imuno-histoquímico de dois casos clínicos. *J Bras Patol Med Lab*. 2004 out;40(5):358-63.
- Sozeri B, Onerci M, Hosal S, Ruacan S. Primary gingival leiomyosarcoma. *J Laryngol Otol*. 1992 Jan;106:46-7.
- Steelman LS, Bertrand FE, McCubrey JA. The complexity of PTEN: mutation, marker and potential target for therapeutic intervention. *Expert Opin Ther Targets*. 2004;8(6):537-50.
- Suresh L, Matsumura E, Calixto LEM, Ruckert E, Aguirre A. Intraosseous angiomatoma of the mandible. *Gen Dent*. 2007;55(2):132-5.
- Svane TJ, Brian RS, Cosentino BJ, Cundiff EJ, Ceravolo JJ. Oral leiomyomas: Review of the literature and report of a case of palatal angioleiomyoma. *J Periodontol* 1986;57:433-5.
- Tamura M, Gu J, Tran H, Yamada KM. PTEN gene and integrin signaling in cancer. *J Nat Cancer Inst*. 1999 Nov;91(21):1820-8.
- Tang Y, Eng C. PTEN autoregulates its expression by stabilization of p53 in a phosphatase-independent manner. *Cancer Res*. 2006 Jan;66(2):736-42.
- Vilos GA, Rapidis AD, Lagogiannis GD, Apostolidis C. Leiomyosarcomas of the oral tissues: clinicopathologic analysis of 50 cases. *J Oral Maxillofac Surg*. 2005 Oct;63(10):1461-77.
- Vousden KH, Lu X. Live or let die: the cell's response to p53. *Nature Rev*. 2002 Aug;2:594-604.
- Wang J, Zohar R, McCulloch CA. Multiple roles of alpha smooth muscle actin in mechanotransduction. *Exp Cell Res*. 2006 Feb 1;312(3):205-14.
- Weitzner S. Leiomyosarcoma of the anterior maxillary alveolar ridge. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1980;50(1):62-4.
- Wertheimer-Hatch L, Hatch GF, Hatch KF, Davis GB, Blanchard DK, Foster RS, et al. Tumors of the oral cavity and pharynx. *World J Surg*. 2000;24:395-400.

Yamada KM, Araki M. Tumor suppressor PTEN: modulator of cell signaling, growth, migration and apoptosis. *J Cell Sci.* 2001;114(3):2375-82.

Yamamoto H, Takagi M, Otake S, Ohmori M. Leiomyoma of the right lower gingiva: a case and a review of the japanese literature. *J Oral and Maxillofac Surg.* 1983 Oct;41(10):671-5.

Yan B, Li Y, Pan J, Xia H, Li LJ. Primary oral leiomyosarcoma: a retrospective clinical analysis of 20 cases. *Oral Dis.* 2010 Mar;16(2):198-203.

Yang SW, Chen TM, Tsai CY, Lin CY. A peculiar site of leiomyosarcoma: the tongue tip- report of a case. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2006;35:469-71.

Yin Y, Shen WH. PTEN: a new guardian of the genome. *Oncogene.* 2008;27:5443-53.

Yoshida C, Ichimura T, Kawamura N, Nakano A, Kasai M, Sumi T, et al. A scoring system for histopathologic and immunohistochemical evaluations of uterine leiomyosarcomas. *Oncol Rep.* 2009 Oct;22(4):725-31.

Zhai YL, Koabayashi Y, Mori A, Orii A, Nikaido T, Konishi I, et al. Expression of steroid receptors, ki67, and p53 in uterine leiomyosarcomas. *Int J Gynecol Pathol.* 1999 jan;18(1):20-8.

ANEXO A – Parecer de Aprovação do Comitê de Ética

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA

PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 75/11
CAAE 0087.0.017.000-11

O grupo de trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa APROVOU o protocolo de pesquisa "Análise histológica e imunoistoquímica de leiomiomas e leiomiossarcomas de boca", de responsabilidade do(a) Pesquisador(a) Paula Prieto Oliveira sob orientação do(a) Prof.(a) Dr.(a) Fábio Daumas Nunes.

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 a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 07 de julho de 2011.

Marcia Turoila Wanderley
Prof.ª Dra. Marcia Turoila Wanderley
Coordenadora do CEP-FOUSP

Av. Prof. Linceu Prestes, 2227 - Cidade Universitária "Armando de Salles Oliveira".
São Paulo, SP - CEP 05508-900