LARA CRISTINA OLIVER GIMENEZ

Leucoplasia verrucosa proliferativa e carcinoma verrucoso: semelhanças e diferenças histopatológicas e de proliferação celular por Ki67

São Paulo

2014

LARA CRISTINA OLIVER GIMENEZ

Leucoplasia verrucosa proliferativa e carcinoma verrucoso: semelhanças e diferenças histopatológicas e de proliferação celular por Ki67

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 e Estomatologia Básica e Aplicada

Orientador: Prof. Dr. Décio dos Santos Pinto Junior

São Paulo

2014

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

Gimenez, Lara Cristina Oliver

Leucoplasia verrucosa proliferativa e carcinoma verrucoso: semelhanças e diferenças histopatológicas e de proliferação celular por Ki67 / Lara Cristina Oliver Gimenez; orientador Décio dos Santos Pinto Junior. -- São Paulo, 2014.

106 p. : il. ; tab., fig.; 30 cm.

Dissertação (Mestrado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Patologia e Estomatologia Básica e Aplicada. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Lesões bucais. 2. Leucoplasia bucal. 3. Carcinoma. 4. Diagnóstico bucal – Histopatologia. 5. Marcador molecular. I. Pinto Júnior, Décio dos Santos. II. Título.

Gimenez LCO. Leucoplasia verrucosa proliferativa e carcinoma verrucoso: semelhanças e diferenças histopatológicas e de proliferação celular por Ki67. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Patologia Bucal.

Aprovado em: / /2014

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

À vocês,

Aparecido, **M**arilene e **A**rthur

Pela compreensão e o estímulo

em todos os momentos.

Agradecimentos Especiais

Ao meu orientador, Décio dos Santos Pinto Júnior, minha profunda gratidão por me aceitar como aluna de Mestrado.

Serei, para todo o sempre, grata pela oportunidade de iniciar um caminho que, previamente, se limitava a mera aspiração.

Muito obrigada pelo acolhimento, por todo o conhecimento transmitido e pela paciência e compreensão que demonstrou nos momentos de maiores desarranjos...

À minha co-orientadora, Marília Trierveiler Martins, muito obrigada por cada dia em que tive a oportunidade de conviver e aprender com você. Por cada detalhe observado que fez toda a diferença não só nas descrições histopatológicas como na construção do meu conhecimento como um todo.

Agradeço imensamente a oportunidade de poder trabalhar e contar com você.

À vocês, meu carinho e admiração.

Agradecimentos

Meus sinceros agradecimentos àqueles que contribuíram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho, bem como para com minha formação pessoal e acadêmica.

Aos professores da Disciplina de Patologia Bucal: Prof^a Dr^a Andrea Mantesso, Prof. Dr. Fabio Daumas Nunes, Prof^a Dr^a Karem Lopez Ortega e Prof^a Dr^a Marina Helena Cury Gallottini, com os quais tive a oportunidade de conviver e muito aprender nos últimos dois anos, por meio da rotina de histopatologia, programa de aperfeiçoamento de ensino e reuniões anátomo-clínicas.

Agradeço especialmente à Prof^a Dr^a Suzana Cantanhede Orsini Machado de Sousa, pela pessoa que é, por todas as vezes que me atendeu prontamente para solucionar questões pertinentes à histopatologia, além de toda a ajuda dispensada com os painéis da SOBEP.

À Prof^a Dr^a Luciana Corrêa, da Disciplina de Patologia Geral, pela receptividade e disposição com que me esclareceu tantas dúvidas concernentes à pesquisa.

Minha gratidão e admiração à vocês, Zilda Ramos Alves, Neia Barbosa e Nair Pereira, que me acolheram desde o início do Mestrado, e, no decorrer do mesmo, foram mais que profissionais, foram amigas.

Minha deferência à Adriana Fraga Costa Samos Paris, com quem pude sempre contar. Por seu imenso apoio na execução dos experimentos laboratoriais imuno-histoquímicos e de cultivo celular.

À Elisa dos Santos e Juvani Lago Saturno. Sou grata à vocês pelo acolhimento no início do Mestrado. Obrigada pela boa vontade em me esclarecer as dúvidas surgidas principalmente nos primeiros momentos desta passagem. Agradeço por toda a colaboração e apoio.

Agradeço aos colegas e aos que se tornaram amigos de pós-graduação, pessoas essas que me cativaram cada um a seu modo ímpar de ser, e com os quais também muito aprendi.

Cláudia Arruda, pela afinidade, pelas longas conversas élficas pacificadoras, pelo apoio, pelos brindes vickings, os dados rolados... pela amizade! Agradeço também por sua ativa contribuição ao presente trabalho.

Nelise Lascane, pela cumplicidade, pelas visitas, pela paciência em ouvir minhas apresentações, por ter me elucidado alguns pontos em minha primeira rotina de histopatologia e, sobretudo, por fazer parar a tempestade nos meus copinhos de água por vezes transbordantes. Obrigada pela amizade.

Flávia Rosin, a menina do Thor, meu muito obrigada pela amizade, companheirismo, pela preocupação em meio às turbulências e por toda ajuda nas empreitadas laboratoriais de cada dia, é sempre um grande prazer poder trabalhar e contar com pessoas sérias e, ao mesmo tempo, agradáveis como você.

Gabriela Nagata, pela afeição, por todo o otimismo transmitido, pela companhia em tantos almoços na copa do departamento, por poder contar você, pela paciência em me ouvir apresentar, identificando e apontando detalhes passíveis de melhora.

Bruno Sedassari por todo o conhecimento compartilhado bem como pelos momentos agradáveis de descontração. Obrigada pelas palavras tão incisivas quanto certas em momentos adequados.

Lourdes Chiok, sua determinação e perseverança são dignas de admiração. Posso dizer que, neste íterim, nós corremos paralelamente. Laboratório e CEPUSP que o digam! E foi um prazer.

Cibele Pelissari, é sempre bom conversar com pessoas francas como você. Foi muito bom tê-la por perto no laboratório, sala dos alunos e nas temakerias que acabei vindo a conhecer. Obrigada pelos presentes e, claro, pelos abraços, inclusive os coletivos!

Mário Mota foi um imenso prazer conhecê-lo e poder conviver com você ainda que por um espaço de tempo relativamente curto. Não, curto demais. Esperava que fosse voltar antes do começo destes agradecimentos. Obrigada pelas dúvidas sanadas e pelos bons momentos compartilhados.

Cibele Nagano, pela presença, pelo apoio pré-reuniões anátomo-clínicas, por todas as conversas afáveis.

Marina Teixeira, pela agradável companhia no laboratório, na sala dos alunos e em tantos almoços *a la* bandeirão.

Juliana Seo, foi gratificante passar pelo programa de aperfeiçoamento de ensino juntamente com você. Esta aproximação permitiu conhecer melhor a excelente pessoa e primorosa profissional que você é.

Ademais, agradeço imensamente a oportunidade que tive de partilhar esta jornada, por vezes brevemente, com Cibele Pelissari, Karin Fernandes, Lília Alves Rocha, Daniela Assis, Lucyene Miguita, Fernanda Mombrini Pigatti, Renata Moura, Bianca Pulino, Luis Pagotto, Carol Mussi, Kaue Pavanello, Fernanda Giudice, Felipe Sperandio, Lilian Caldas Quirino, Felipe Peroso Daltoé, Carla Rezende, Ana Maria Hoyos, Priscila Tobouti, Michella Lima e Rita Barcessat.

Aos professores que apoiaram e me inspiraram a trilhar esse caminho... Prof. Dr. Alvimar Lima de Castro, Profª Drª Ana Cláudia Okamoto, Profª Drª Ana Maria Pires Soubhia, Prof. Dr. Marcelo Macedo Crivelini, Profª Drª Renata Bianco Consolaro e Profª Drª Sandra Helena Penha de Oliveira.

Sou grata aos amigos unespianos que têm se mantido presentes em minha vida nesses últimos anos... Lara Vieira Pacanaro, Sara Vieira Pacanaro, Jean Soares Borges, Vivian Silva e Diego Peixe, que está para Pink Floyd como os jesuítas estavam para Cristo.

Agradeço também aos bons e velhos, apesar da distância e do tempo, pelas lembranças dos momentos bons, ruins, cômicos e hilários: Marsan Petri, Diego Kadry, “alma” Willian Artale, Laisa Beatriz, Jacky Miike e minha maninha...

...Giulliane Carla Crociolle, a quem eu amo e se fez presente em todos os momentos, até quando não estava, e em todas as lutas, inclusive literalmente!

O navio sai para alto mar, mas o porto se mantém...

“I get high with a little help from my friends”, na voz rouca do Joe Cocker.

Muito obrigada ao Igor de Oliveira Puttini pelos momentos compartilhados, pelo carinho, dedicação e acima de tudo pelo amor que se sobrepujou às intempéries da distância. Meu amigo, meu companheiro, meu amor...

Hoje não visualizo mais esta estrada sem você, faça bom tempo ou não.

Agradeço aos avós Laura Garcia Gimenez e André Gimenez Martins...

Aos meus tios Cláudio Gimenez Garcia e Ilda Gomes, Norberto Gimenez Garcia e Eliete Andrade Gimenez, Luzia Oliver...

Aos meus primos Maria Julia Andrade Gimenez e André Luiz Andrade Gimenez...

...por todo amor, apoio e torcida. Amo vocês!

Minha eterna gratidão àqueles que constituem minha razão de viver, minha motivação e essência do meu ser, meus maiores exemplos...

...meus pais Aparecido Gimenez Garcia e Marilene Oliver Gimenez.

...meu irmão, amigo, confidente e companheiro de batalha Arthur Oliver Gimenez, grande detentor da memorável história dos dinossauros.

“Like a bridge over troubled water”...

...Amo e admiro imensamente vocês!

Agradeço, por fim, ao Mestre Jesus e ao Grande Arquiteto do Universo pela existência e por tudo que me tem proporcionado nesta jornada.

Muito Obrigada!

"Você pode encontrar as coisas que perdeu, mas nunca as que abandonou"

Gandalf em A Sociedade do Anel, J.R.R. Tolkien

"Long you live and high you fly and smiles you'll give and tears you'll cry
And all you touch and all you see is all your life will ever be"

Pink Floyd

RESUMO

Gimenez LCO. Leucoplasia verrucosa proliferativa e carcinoma verrucoso: semelhanças e diferenças histopatológicas e na proliferação celular por Ki67 [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014. Versão Corrigida.

Carcinoma verrucoso e leucoplasia verrucosa proliferativa, estão entre as lesões que apresentam difícil diagnóstico diferencial devido às semelhanças histopatológicas que ocorrem em determinada fase de evolução. Existe, para tanto, a necessidade de somar dados clínico-epidemiológicos ao histopatológico a fim de se estabelecer o diagnóstico final. A leucoplasia verrucosa proliferativa caracteriza-se por seu acometimento multifocal, grande potencial de recidiva e perfil progressivo que resulta em alto risco de transformação maligna. Por outro lado, o carcinoma verrucoso, variante de baixo grau do carcinoma epidermoide, é unifocal e dificilmente recidiva. A importância de novos estudos acerca das suas duas lesões mencionadas vem a agregar conhecimento de modo a facilitar um correto diagnóstico e, conseqüentemente, um apurado prognóstico. A leucoplasia verrucosa proliferativa, por se tratar de lesão com alto potencial de transformação maligna, pode evoluir para carcinoma epidermoide invasivo, menos diferenciado e mais agressivo com conseqüente prognóstico obscuro, ao passo que, o carcinoma verrucoso não incorre em metástases e apresenta um prognóstico mais favorável. Isso posto, com o objetivo de aumentar a precisão diagnóstica, o presente trabalho propôs identificar e quantificar em porcentagem os critérios histopatológicos encontrados na leucoplasia verrucosa proliferativa e no carcinoma verrucoso visando diferenciar morfológicamente as lesões dos dois grupos. Também buscamos comparar os dados epidemiológicos referentes aos casos inseridos no estudo, dentre eles vinte e dois casos de leucoplasia verrucosa proliferativa, dezoito casos de carcinoma verrucoso e dois casos apresentando tanto leucoplasia verrucosa proliferativa quanto carcinoma verrucoso, casos esses com diagnósticos estabelecidos previamente (baseando-se nos dados epidemiológicos somados ao histopatológico). A utilização de um marcador imuno-histoquímico da atividade proliferativa celular, o Ki67, também permitiu uma análise comparativa entre o comportamento biológico de

ambas as lesões através de um ensaio quantitativo e qualitativo. A marcação mostrou-se escassa, mas evidente em células mitóticas da leucoplasia verrucosa proliferativa, mostrando, no entanto, maior número de células positivas no carcinoma verrucoso, estas visíveis nas camadas basal e parabasal. Os resultados do presente trabalho permitiram concluir então que o marcador Ki67 pode auxiliar no diagnóstico diferencial entre leucoplasia verrucosa proliferativa e carcinoma verrucoso. Foi possível depreender também que, histologicamente, o carcinoma verrucoso apresenta maior alteração em sua conformação epitelial, bem como maior número de atipias cito-arquiteturais quando comparado à leucoplasia verrucosa proliferativa, que, apesar de seu aspecto morfológico, evolui no sentido de uma potencial transformação maligna, apresentando, por sua vez, maior frequência de projeções em gota.

Palavras-chave: Leucoplasia verrucosa proliferativa. Carcinoma verrucoso. Histopatológico. Ki67.

ABSTRACT

Gimenez LCO. Proliferative verrucous leukoplakia and verrucous carcinoma: histopathological similarities and differences and cell proliferation by Ki67 [dissertation]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014. Versão Corrigida.

Verrucous carcinoma and proliferative verrucous leukoplakia, are among the injuries presenting difficult differential diagnosis due to histopathological similarities that occur at some stage of evolution. There is a need to add clinical, epidemiological and histopathological data to achieve the final diagnosis. Proliferative verrucous leukoplakia is characterized by its multifocal involvement, great potential for relapse and progressive profile that results in malignant transformation high risk. On the other hand, the verrucous carcinoma, which is considered low-grade variant of squamous cell carcinoma, is unifocal and unlikely to return. The importance of new studies on its two mentioned lesions is to generate knowledge aiming at a correct diagnosis and prognosis. The proliferative verrucous leukoplakia, since it is a lesion with high potential for malignant transformation, can develop into less differentiated and more aggressive invasive squamous cell carcinoma with subsequent poor prognosis, whereas the verrucous carcinoma incurs no metastases and presents a more favorable prognosis. Thus, aimed to increase the diagnostic accuracy, the present work looked for to identify and quantify in percentage the histopathological criteria found on proliferative verrucous leukoplakia and verrucous carcinoma, aiming morphologically differentiate the lesions from both groups. We also seek to compare the epidemiological data related to cases included in the study, including twenty-two cases of proliferative verrucous leukoplakia, eighteen cases of verrucous carcinoma and two cases showing both proliferative verrucous leukoplakia as verrucous carcinoma, cases with these diagnoses established previously (based on epidemiological data added to histopathology data). Using a cell proliferation immunohistochemical marker, Ki67, we made a comparative analysis between the biological behavior of both lesions by quantitative and qualitative assay. We saw a few strongly positive mitotic cells in samples of proliferative verrucous leukoplakia, and numerous positive cells observed in the basal and parabasal layers of verrucous carcinoma samples. This study results indicate, then, that the Ki67 marker may help

in the differential diagnosis between proliferative verrucous leukoplakia and verrucous carcinoma. It was also possible to conclude that, histologically, the verrucous carcinoma shows greater change in its epithelial conformation and a higher number of cyto-architectural atypia when compared to proliferative verrucous leukoplakia, which, despite its morphological appearance, evolves towards a potential malignant transformation, presenting, in turn, higher drop-shaped rete ridges frequency.

Keywords: Proliferative verrucous leukoplakia. Verrucous carcinoma. Histopathological. Ki67.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 5.1 - Distribuição do número de biópsias por paciente para os grupos LVP e CV	47
Gráfico 5.2 - Número percentual de pacientes com diagnósticos distintos de LVP, CV, CEC (carcinoma epidermoide) e outras lesões como hiperqueratose e displasias de diferentes graus	48
Gráfico 5.3 - Distribuição do número percentual de pacientes por sexo para os grupos LVP e CV	49
Gráfico 5.4 - Distribuição do número percentual de pacientes por idade para os grupos LVP e CV	49
Gráfico 5.5 - Incidência de acometimento: sítio anatômico por paciente	51
Gráfico 5.6 - Incidência de acometimento: sítio anatômico por biópsia (lesão)	51
Gráfico 5.7 - Distribuição do número de biópsias (lesões) envolvendo mais de um sítio anatômico no momento da biópsia	52
Gráfico 5.8 - Distribuição do número de pacientes com lesões de LVP em mais de um sítio anatômico em momentos diferentes com biópsias distintas ...	52
Gráfico 5.9 - Distribuição do número percentual de pacientes considerando a cor da pele para os grupos LVP e CV	53
Gráfico 5.10- Distribuição do número percentual de pacientes considerando hábitos tabagistas para os grupos LVP e CV	54
Gráfico 5.11- Distribuição do número percentual de pacientes considerando o etilismo	54
Gráfico 5.12- Distribuição do número percentual de biópsias considerando sintomatologia de cada lesão	55

Gráfico 5.13-Distribuição do número percentual de biópsias considerando a conformação epitelial: superfície verrucosa (papilomatose) e interface epitélio-conjuntiva em dobras.....	56
Gráfico 5.14-Distribuição do número percentual de biópsias considerando tipo de queratina presente na camada córnea epitelial.....	57
Gráfico 5.15-Distribuição do número percentual de biópsias considerando a presença do tampão de queratina.....	57
Gráfico 5.16-Distribuição do número percentual de biópsias considerando a presença da hipergranulose epitelial.....	58
Gráfico 5.17-Distribuição do número percentual de biópsias considerando a ocorrência de estratificação epitelial irregular	59
Gráfico 5.18-Distribuição do número percentual de biópsias considerando a inversão de polaridade nas células oriundas da camada basal epitelial.....	60
Gráfico 5.19-Distribuição do número percentual de biópsias considerando a presença de projeções epiteliais em forma de gota no sentido do tecido conjuntivo adjacente.....	60
Gráfico 5.20-Distribuição do número percentual de biópsias considerando o aumento do número de mitoses e a presença de mitoses em camadas altas do epitélio.....	61
Gráfico 5.21-Distribuição do número percentual de biópsias considerando a presença de disqueratose (queratinização celular individual) e pérolas córneas (grupos de células epiteliais queratinizadas em áreas não córneas)	62
Gráfico 5.22-Distribuição do número percentual de biópsias considerando a aumento no tamanho do núcleo, proporção núcleo/citoplasma aumentada, variação no tamanho do núcleo e variação no tamanho da célula.....	63
Gráfico 5.23-Distribuição do número percentual de biópsias considerando pleomorfismo nuclear, pleomorfismo celular, hiperchromatismo nuclear e aumento do tamanho e número de nucléolos	63

Gráfico 5.24- Distribuição do número percentual de biópsias considerando a presença de células com edema perinuclear	64
Gráfico 5.25- Distribuição do número percentual de biópsias considerando infiltrado inflamatório mononuclear e polimorfonuclear.....	66
Gráfico 5.26- Percentual de cada escore encontrado para marcação imuno-histoquímica	67
Figura 5.27- Cortes histológicos de LVP corados em H&E (A, B, C, D) e cortes submetidos à imuno-histoquímica para Ki67 (E, F) de cada padrão encontrado para marcação imuno-histoquímica	68
Figura 5.28- Cortes histológicos de CV corados em H&E (A, B, C) e cortes submetidos à imuno-histoquímica para Ki67 (D, E)	69

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1-	Distribuição dos números percentuais referentes à exocitose nos grupos LVP e CV considerando, a partir desses números, a intensidade nos graus 01, 02 e 03.....	65
Tabela 5.2-	Caracterização da amostra segundo grupos e resultados dos testes de comparação de percentual para sexo, cor, faixa etária, tabagismo, etilismo e sintomatologia	71
Tabela 5.3-	Caracterização da amostra segundo grupos e resultados dos testes de comparação de percentual para sítios anatômicos combinados e isolados	72
Tabela 5.4-	Caracterização da amostra segundo grupos e resultados dos testes de comparação de percentual para tampão de queratina, orto/paraqueratina, hipergranulose e papilomatose	73
Tabela 5.5-	Caracterização da amostra segundo grupos e resultados dos testes de comparação de percentual para projeções em gota, estratificação epitelial irregular, inversão de polaridade, aumento do número de mitoses, mitoses em camadas altas do epitélio, disqueratose e pérolas córneas	74
Tabela 5.6-	Caracterização da amostra segundo grupos e resultados dos testes de comparação de percentual para aumento do tamanho dos núcleos, variação do tamanho no núcleo, variação no tamanho da célula, pleomorfismo nuclear, pleomorfismo celular, proporção núcleo/citoplasma aumentada, aumento no tamanho e número dos nucléolos	75
Tabela 5.7-	Caracterização da amostra segundo grupos e resultados dos testes de comparação de percentual para hiper Cromatismo nuclear, exocitose, grau de exocitose, edema perinuclear, interface epitélio-conjuntiva em dobras, infiltrado inflamatório mononuclear e infiltrado inflamatório polimorfonuclear.....	76
Tabela 5.8-	Caracterização da amostra segundo grupos e resultados dos testes de comparação de percentual para padrões imuno-histoquímicos	77

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Bcl-2	B-cell CLL/lymphoma 2
BSA	bovine serum albumin
CDC-6	Cell division cycle 6
CDT-1	Chromatin licensing and DNA replication factor 1
CV	Carcinoma verrucoso
DNA	Ácido desoxiribonucleico
EBV	Epstein-barr vírus
G1	Intervalo de tempo (Gap 1) - crescimento celular
G2	Intervalo de tempo (Gap 2) - preparação da divisão celular
H&E	Hematoxilina e eosina
HER2/neu	Human epidermal growth factor receptor 2
HPV	Papilomavirus humano
Ki67	Proteína de proliferação celular codificada pelo gene MK167
Laminina-5 γ 2	Laminina gama 2
LVP	Leucoplasia verrucosa proliferativa
LVPG	Leucoplasia verrucosa proliferativa de gengiva
M	Fase de mitose celular
M0	Ausência de metástase à distância
MCM	Mini chromosome maintenance
MMPs	Metaloproteinases
N0	Ausência de metástase em linfonodos regionais
OMS	Organização Mundial da Saúde
P53	Proteína p53

PKi67	Proteína Ki67
PRb	Proteína retinoblastoma
Rb1	Gene retinoblastoma 1
S	Fase de síntese - replicação do material genético celular
T1	Tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão
T2	Tumor com mais de 2 cm e até 4 cm em sua maior dimensão
TGF- α	Transforming growth factor alpha
TNM	Estadiamento tumor linfonodo metástase
TP53	Gene codificador da proteína tumoral p53
α B-cristalina	Cristalina alfa B
α v β 6	Interina α v β 6
β 4 integrina	Integrina beta 4

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	23
2 REVISÃO DE LITERATURA	26
2.1 Leucoplasia verrucosa proliferativa	26
2.2 Carcinoma verrucoso.....	32
2.3 Proteína Ki67	37
3 PROPOSIÇÕES.....	40
4 MATERIAL E MÉTODOS	41
4.1 Material.....	41
4.1.1 Casos e amostras teciduais	41
4.1.2 Dados epidemiológicos	42
4.2 Métodos.....	42
4.2.1 Aspectos morfológicos	42
4.2.2 Imuno-histoquímica	43
4.2.2 Análise dos resultados	44
5 RESULTADOS.....	46
5.1 Casuística	46
5.2 Epidemiológico.....	48
5.3 Morfológico	55
5.4 Imuno-histoquímica	66
5.5 Análise estatística	70
6 DISCUSSÃO	78
7 CONCLUSÕES	91
REFERÊNCIAS.....	93
ANEXO A.....	103

1 INTRODUÇÃO

Dentre as alterações epiteliais que ocorrem na mucosa bucal, está a papilomatose, caracterizada pela formação de projeções epiteliais no sentido da superfície que, por sua vez, adquire um aspecto verrucoso. Naturalmente, este tipo de comprometimento epitelial pode apresentar origens diversas como, por exemplo, processo reativo, neoplásico ou viral. Dentro deste contexto, destacamos a existência de duas lesões que muito se assemelham histologicamente seguindo, no entanto, cursos de evolução completamente divergentes: a leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP) e o carcinoma verrucoso (CV).

A LVP, apesar do nome 'leucoplasia', caracteriza-se por distinguir consideravelmente da leucoplasia oral, sendo, para tanto, considerada uma entidade clínico-patológica isolada dos demais tipos de leucoplasia. Destaca-se por seu alto risco de transformação maligna, acometimento multifocal e pelo grande potencial de recidiva. Maior prevalência é observada em pacientes do sexo feminino, não fumantes e com idade girando em torno da sexta década de vida. Clinicamente, a LVP é observada como lesão séssil de aspecto esbranquiçado apresentando, grande parte das vezes, superfície verrucosa. Histologicamente apresenta um epitélio de conformação alterada, no qual projeções, por vezes afiladas, no sentido da superfície (papilomatose) originam fendas preenchidas total ou parcialmente por queratina. Outras alterações arquiteturais e celulares podem ser observadas compondo um quadro histológico com diferentes graus de displasia epitelial.

O CV, considerado por alguns autores como variante de baixo grau do carcinoma epidermoide, é uma neoplasia maligna que invade tecidos vizinhos sem que ocorra rompimento da membrana basal, não incorre em metástases e dificilmente recidiva. Pacientes do sexo masculino com idade próxima à sexta década de vida e de hábitos tabagistas são os mais acometidos. Clinicamente se mostra como massa esbranquiçada, séssil e superficialmente verrucosa. No histológico é possível observar a sinuosidade epitelial em aspecto papilomatoso revestida por espessa camada de queratina que, por sua vez, preenche as fendas intraepiteliais. Assim como na LVP, outras alterações arquiteturais e celulares se fazem presentes nos variados graus de displasia epitelial que podem ocorrer.

A análise pormenorizada da LVP e do CV se faz pertinente em face do aspecto histopatológico de ambas. Atualmente o diagnóstico só é possível somando informações clínicas, dados epidemiológicos e etiológicos, que são essenciais, às informações oriundas do exame histopatológico para que se estabeleça o diagnóstico final.

Dentre os aspectos que diferem as duas patologias está o sexo. A LVP acomete predominantemente pacientes do sexo feminino ao passo que o CV é observado em maior número de pacientes do sexo masculino. Outro dado que corrobora com essa distinção, é o acometimento multifocal e espalhado da LVP.

É comum encontrar no arquivo dos serviços de patologia, muitos registros de um mesmo paciente acometido pela LVP. Muitas vezes esses pacientes passam por biopsia incisional de vários sítios da cavidade oral que são simultaneamente acometidos, passando também pela excisão cirúrgica que se repete devido aos quadros de recorrência subsequentes, enquanto o CV, cujo tratamento de escolha mais indicado consiste na excisão cirúrgica, apresenta lesão focal e a recorrência não é comum.

Sítios bucais como gengiva e rebordo alveolar apresentando lesão verrucosa podem indicar LVP ao passo que o acometimento da mucosa jugal está mais se relacionado ao CV.

O tabagismo em pacientes do sexo masculino é grande indício de CV, muitas vezes relatando hábitos como mascar fumo ou utilizar rapé. Essa associação do tabagismo ao CV não se faz verdadeira para LVP. Pacientes acometidos pela LVP, em sua grande maioria, não são tabagistas, diferindo neste aspecto também de outros tipos de leucoplasia amplamente associadas ao tabaco. Por outro lado, a idade dos pacientes acometidos pela LVP e CV não difere, ficando em torno da sexta década de vida.

Muito embora existam parâmetros que permitam diferenciar as duas lesões, como os já citados: sexo, tabagismo, acometimento focal/multifocal e histórico de recidiva, por exemplo, é importante ressaltar que não necessariamente a lesão biopsiada preencherá os requisitos de modo a permitir que se feche seguramente o diagnóstico final.

A preocupação com diagnóstico correto se fundamenta nos diferentes cursos que as patologias estudadas podem seguir. A LVP, além de se caracterizar por seu grande potencial de recidiva, pode ser considerada uma lesão com alto potencial de transformação maligna. A LVP, em seu curso progressivo no sentido de malignizar, pode evoluir para o CV, no entanto, a probabilidade ainda maior de incorrer em carcinoma epidermoide invasivo, desperta a atenção para um pior prognóstico e possibilidade de metástase. Por outro lado, o CV, variante de baixo grau do carcinoma epidermoide, se mostra menos invasivo e recorrente respondendo positivamente ao tratamento cirúrgico, além de não gerar metástase, o que torna o CV uma neoplasia maligna com melhor prognóstico que a própria LVP. Para tanto, o correto diagnóstico permite que seja estabelecido prognóstico adequado e tratamento apropriado para cada patologia de acordo com suas características específicas. Esse diagnóstico pode ser facilitado estabelecendo aspectos histopatológicos morfológicos predominantes em cada lesão, além de marcadores que venham a auxiliar no entendimento e distinção de cada uma delas independentemente de sua fase evolutiva.

2 REVISÃO DE LITERATURA

A presente revisão de literatura vem a englobar aspectos clínicos, epidemiológicos e histopatológicos da leucoplasia verrucosa proliferativa e carcinoma verrucoso, abordando, de modo geral pesquisas previamente realizadas que possibilitam traçar um perfil para cada lesão individualmente.

2.1 Leucoplasia verrucosa proliferativa

Leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP), subtipo incomum e mais agressivo da leucoplasia oral, também considerada entidade clinicopatológica distinta, destaca-se por apresentar grande potencial de recidiva, acometimento multifocal e alto risco de transformação maligna (1-8). Foi descrita inicialmente por Hansen et al. em 1985, em estudo que compreendeu a análise de 30 pacientes com LVP, acompanhados por um espaço de tempo de 1 a 20 anos. Em 1997, Silverman et al., examinaram 54 casos que confirmaram as características observadas por Hansen para definir a LVP, que viria a ser reconhecida pela Organização Mundial da Saúde em 2005 (1-3).

A LVP mostra acentuada predileção pelo sexo feminino (1-3, 8-11) em uma proporção homem/mulher de 1:4 (2). A média de idade dos pacientes gira em torno da sexta década de vida (1-3, 9, 12), podendo em alguns estudos se aproximar mais da sétima década de vida (10, 11). Possíveis correlações entre tabagismo e LVP vêm sendo investigadas e os resultados levam a crer que o tabaco não está associado ao surgimento, evolução e recidiva da lesão (3, 8, 10, 11). O consumo de álcool também não se mostra associado à LVP (8, 11).

Dentre os locais afetados por esta patologia, estudos apontam predomínio de região gengival (4, 6, 10) e rebordo alveolar (4, 11) seguidos por mucosa jugal e língua (10). A mucosa jugal é mais frequentemente acometida em pacientes do sexo feminino e língua em pacientes do sexo masculino (2, 3). Estudos baseados em pacientes acometidos por LVP especificamente em gengiva, sugerem que se

particularize a lesão como entidade patológica a parte que se denominaria leucoplasia verrucosa proliferativa de gengiva (LVPG), particularizada por acometer um único sítio anatômico, além de mostrar características típicas da LVP como grande potencial de recidiva e progressão clínica e histopatológica (13). Entretanto, um outro estudo que compreendeu análise de 30 pacientes observou que todos apresentavam lesão multifocal e a grande maioria acometia região de gengiva (10). Devido a grande incidência de LVP em gengiva, ressalta-se a importância dessa patologia não só para a periodontia, mas para todas as áreas da odontologia, uma vez que esses profissionais podem proceder precocemente ao encaminhamento e diagnóstico possibilitando o tratamento que deve ser executado o quanto antes (7). Ressalta-se também que lesões em gengiva, principalmente inferior, apresentam maior tendência de progredir para carcinoma (10) sendo gengiva e língua, os sítios anatômicos relacionados à maior prevalência de transformação maligna (2,11).

Diagnosticada a partir de informações clínicas somadas aos dados histopatológicos, a LVP, lesão de curso evolutivo lento e irreversível, é caracterizada clinicamente por formação exofítica verrucosa de coloração esbranquiçada em mucosa oral. Uma das principais características é seu acometimento multifocal atingindo mais de um sítio anatômico na cavidade oral. Inicialmente a lesão pode se apresentar focal com aspecto plano, esbranquiçado e homogêneo, vindo a progredir para formas exofíticas e verrucosas, aumentando em dimensão e acometendo novos sítios orais (1, 3, 11, 14). Por vezes, áreas de eritroleucoplasias podem estar presentes (10, 11). Apesar dos diversos estudos que correlacionam a LVP a outros fatores, sua etiologia permanece indefinida (1, 2, 3).

Histopatologicamente, caracterizando seu perfil progressivo, a lesão pode consistir inicialmente em simples hiperqueratose por orto ou paraqueratina vindo a apresentar áreas de acantose epitelial (2, 9, 11, 13). Pode apresentar hiperplasia psoriforme e infiltrado inflamatório intenso distribuído difusamente, por vezes contando com a presença de eosinófilos no tecido conjuntivo e neutrófilos no epitélio (13). As lesões exibem variações histopatológicas entre os pacientes bem como entre os sítios anatômicos de um mesmo paciente, mostrando desde hiperqueratose, diferentes graus de displasia, até carcinoma verrucoso ou carcinoma epidermoide (3, 6). Muito embora a displasia epitelial esteja relacionada à gravidade da doença, o desenvolvimento de neoplasias pode não ser precedido por displasia

intensa (8). Algumas lesões podem não exibir atipias nucleares e apresentar leve hiperchromatismo das células basais e parabasais (13). Gradações histopatológicas de progressão foram propostas, inicialmente em 1985, seguindo a sequência que compreende: hiperqueratose → diferentes graus de displasia → carcinoma verrucoso → carcinoma epidermoide (1); posteriormente, em 1999, abarcando: hiperqueratose sem displasia epitelial → hiperplasia verrucosa → carcinoma verrucoso → carcinoma epidermoide; dentro desta gradação, o estágio de hiperplasia verrucosa poderia representar lesão irreversível precedendo o desenvolvimento do carcinoma verrucoso (15). Em estágios iniciais, apenas alterações moleculares subcelulares podem estar presentes, não podendo ser detectadas clinicamente ou microscopicamente, o que levou Silverman et al., a concluir que existe a necessidade de se definir marcadores moleculares de maior confiabilidade (3).

A LVP destaca-se por seu alto risco de transformação maligna (2, 5-7). Apesar de apresentar grande potencial de recidiva (9), a agressividade da LVP não se refere a essa característica da lesão, mas ao grande potencial de transformação maligna que apresenta fazendo com que seja considerada lesão pré-maligna (15). Aproximadamente 70% dos pacientes desenvolvem carcinoma nos sítios previamente acometidos pela LVP (3, 10) em um espaço de tempo com média de 7,7 anos (3). Estudos mostram que o curso da lesão pode levar ao desenvolvimento do carcinoma epidermoide, o que ocorre com maior prevalência (10, 11, 13), podendo também incorrer no desenvolvimento do carcinoma verrucoso (10, 13).

Possíveis correlações com a progressão da LVP têm sido estudadas, dentre elas a infecção pelo papilomavirus humano (HPV). Estudos não encontraram relação entre prevalência da infecção por HPV e LVP ou esta se mostrou pouco expressiva indicando a não correlação do HPV à patogênese ou transformação maligna da lesão (4, 13, 16-18). Além do HPV, outro agente infeccioso foi avaliado em relação à LVP, o vírus Epstein-Barr (EBV) que se aloja e procede à replicação em células epiteliais da mucosa oral. A porcentagem de pacientes com LVP que apresentou infecção por EBV foi maior que a apresentada pelo grupo de pacientes com carcinoma epidermoide não vinculado à LVP. Mais estudos ainda se fazem necessários para esclarecer esta correlação (19).

Fatores de crescimento também podem estar alterados no desenvolvimento da LVP. Amostras de LVP e carcinoma epidermoide mostraram expressão citoplasmática de TGF- α aumentada quando comparadas a amostras de mucosa normal muito embora ainda não esteja claro o mecanismo dessa alteração (20). Possíveis correlações entre LVP e doença autoimune ou imunodeficiência não foram estabelecidas (3).

É natural que se pense em possíveis alterações genéticas para a LVP uma vez que se trata de patologia de aspecto multifocal e perfil evolutivo com grande potencial de transformação maligna, assim como é inerente este desvio genético a todo e qualquer processo neoplásico. Para tanto, a expressão de determinadas proteínas relacionadas ao ciclo celular vem sendo estudadas na LVP, dentre elas a p53, do gene supressor de tumor *TP53* que se localiza no braço curto do cromossomo 17 (17p13.1), também conhecido como “guardião do genoma”. A p53 é codificada pelo gene *TP53* e tem a função de corrigir defeitos no material genético celular ou induzir a célula defeituosa a apoptose. É produzida e degradada nos tecidos, para tanto não é comum que seja encontrada em tecidos saudáveis por imunohistoquímica. Sua presença indica então que a p53 não está sendo degradada permanecendo não funcional, o que poderia advir de mutações anteriores ou regulação negativa por mecanismos diversos podendo incorrer em transformação maligna. Estudos prévios de análise comparativa entre carcinoma epidermoide e LVP, detectaram mutações do gene *TP53* em amostras de carcinoma epidermoide mas não em amostras de LVP. Já análises imunohistoquímicas para p53 mostraram positividade em amostras de LVP com marcação leve nas camadas basal e suprabasal ao passo que a marcação em amostras de carcinoma epidermoide mostrou-se intensa e difusa. A fraca marcação para p53 tanto em amostras de displasia epitelial leve como em displasia epitelial moderada, não permitiu observar aumento da expressão de p53 acompanhando o curso progressivo das alterações epiteliais. No entanto, ocorre que, a não marcação da p53 nativa, mais comumente estudada através do anticorpo DO-7, não infere necessariamente em sua ausência, uma vez que esta apresenta meia-vida curta e se mantém em baixas quantidades nos tecidos. Outra opção para se detectar não só a p53 nativa mas também, e principalmente, a p53 mutada, em amostras de displasia epitelial seria a imunohistoquímica pelo anticorpo monoclonal PAb 240, cujo resultado positivo confirma

mutação específica do *TP53* definindo precisamente numa região da molécula p53 estruturalmente alterada pela mudança induzida pela mutação. A p53 mutada, ao contrário da p53 nativa, exibe período de meia-vida prolongado e se acumula em quantidades melhor detectáveis nos tecidos, podendo, por sua vez indicar uma possibilidade a ser testada em amostras de LVP (11, 16, 21-24).

Outra proteína analisada, a pKi67, melhor descrita em seu tópico específico (2.3 Proteína Ki67), se relaciona à atividade proliferativa da célula e se mostra altamente expressa na fase S do ciclo celular. Os resultados mostraram positividade elevada para amostras de LVP quando comparado a mucosa normal, marcando predominantemente queratinócitos da camada suprabasal (8, 11, 13). Ainda considerando análise da atividade proliferativa celular, estudos também se voltam para o heteroexâmero MCM (Mini Chromosome Maintenance), diretamente relacionado à atividade proliferativa da célula. O complexo MCM é composto por seis subunidades (MCM 2-7) com atividade de helicase, cujo papel consiste em regular a replicação do DNA permitindo que sejam diferenciadas células quiescentes de células proliferativas. MCMs são recrutados pelos fatores CDT1 e CDC-6 e ligados à cromatina dando origem ao complexo de pré-replicação que por sua vez permite início da fase S (período de síntese de DNA), seguida pela G2 e M mostrando-se então presentes em todo o ciclo de divisão celular e início da fase de diferenciação, ou seja, seu tempo de meia-vida é prolongado, quando comparado ao Ki67, o que o torna um melhor marcador da atividade proliferativa celular. MCMs são identificados por imuno-histoquímica no interior dos núcleos celulares, nos quais permanecem durante as fases S, G2, M e G1. A imuno-histoquímica para as proteínas MCM-2 e MCM-5 em amostras de LVP mostraram positividade expressiva evidenciando resultados mais representativos que os derivados do Ki67. Amostras analisadas para MCM-2 mostraram positividade não só em células da camada suprabasal como também na camada basal do epitélio comparado ao Ki67. Contudo, não houve aumento na expressão tanto do MCM-2 como p53 de acordo com a progressão das alterações epiteliais, soma-se a isso casos de displasia epitelial leve e moderada com forte marcação positiva para MCM-2 e MCM-5 não restritas às camadas basal e suprabasal do epitélio. Apesar de MCM-2 não mostrar aumento de expressão proporcional às alterações epiteliais, fala-se em ferramenta passível de ser utilizada na tentativa de estabelecer áreas de transformação

maligna, além de auxiliar no prognóstico do carcinoma epidermoide de boca, lesão esta amplamente relacionada ao curso evolutivo da LVP (8, 11, 25-31).

O diagnóstico e, conseqüentemente o prognóstico, podem ser dificultados por uma biopsia cuja profundidade seja insuficiente não abrangendo adequadamente camada basal e as margens da lesão e impossibilitando que essas sejam melhor examinadas molecular e histologicamente (4). Apesar de apresentar um perfil retrospectivo, uma vez que história de lesões brancas proliferativas anteriores é altamente sugestivo de LVP, o diagnóstico através do exame histopatológico tem seu papel na detecção de transformação maligna. Estudos sugerem que proceder à ploidia de DNA em casos de LVP pode indicar previamente a transformação maligna pela confirmação de aneuploidia, alteração do material genético celular, nas lesões examinadas (6, 8). Uma revisão de literatura propôs critérios diagnósticos classificados em major e minor, sendo a major, objetivada na presença de lesões leucoplásicas em pelo menos dois locais distintos da mucosa oral, área verrucosa, espalhamento dessas áreas no desenvolvimento da lesão, recidiva em áreas previamente tratadas, histopatologicamente pode apresentar desde simples hiperqueratose à carcinoma epidermoide. E a minor compreendida na presença de pelo menos três centímetros de lesão leucoplásica considerando todas as lesões presentes, paciente do sexo feminino, não tabagista e evolução da lesão de cinco anos. A soma de três critérios major indicariam LVP (32).

Por se tratar de uma lesão que tem como característica a resistência aos tratamentos disponíveis, é fundamental que os pacientes acometidos pela LVP sejam precocemente submetidos a um tratamento mais agressivo baseado em ampla excisão cirúrgica (1-4, 9, 12). Quimioterapia somada à excisão cirúrgica da lesão, bem como radioterapia externa convencional, não se mostraram tratamentos vantajosos para o paciente (3). Terapêutica a base de vitaminas (A, C, E e betacaroteno) pode apresentar resultados positivos revertendo quadros de leucoplasia oral, porém mostrou-se uma opção inócua para a LVP em específico (3). A terapia fotodinâmica é uma opção que tem sido sugerida por apresentar baixa morbidade e capacidade de abranger lesões multifocais propiciando melhor qualidade de vida (4, 33) muito embora tratamentos mais conservadores possam não abranger suficientemente a área comprometida, incorrendo em posterior recidiva e alto risco de transformação maligna (2, 3). Os pacientes devem ser

acompanhados por um longo espaço de tempo a fim de se verificar recidivas ou novos pontos de lesão na mucosa oral (4, 9, 12). É sugerido acompanhamento em intervalos de tempo semestrais por toda a vida do paciente (14). Ainda se fazem necessários estudos de novas modalidades terapêuticas para a leucoplasia LVP (4).

2.2 Carcinoma verrucoso

Outra lesão de aspecto exofítico verrucoso que, por sua vez, se assemelha à leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP) é o carcinoma verrucoso (CV), assim denominado por Lauren V. Ackerman em 1948 (tumor de Ackerman). Trata-se de variante incomum e de baixo grau do carcinoma epidermoide (2, 34, 35). O CV exibe bom prognóstico, não incorrendo em metástase (2, 36-38). Ao qualificá-los de acordo com a classificação TNM, esses tumores apresentam estágios T1 e T2, N0 e M0 (39, 40) além de dificilmente apresentar recidivas (36, 41) que, quando ocorrem, podem aparecer na forma de carcinoma epidermoide (42). Em alguns estudos a frequência relatada de recidiva do CV pode se mostrar maior que a taxa referida na literatura (38, 43). É corriqueira a ocorrência de lesões híbridas, nas quais se observa, além do CV, área desdiferenciada de carcinoma epidermoide, resultando em chances aumentadas de recidiva. Sobrevida de cinco anos sem o CV para pacientes submetidos à excisão cirúrgica fica em torno de 80 a 90% (2).

Acomete predominantemente pacientes do sexo masculino (2, 34, 36), podendo pontualmente em alguns estudos mostrar uma prevalência maior para pacientes do sexo feminino (44, 45). Em geral a idade dos pacientes está acima da sexta década de vida podendo girar em torno da sétima década (2, 35, 36, 44, 45). Estudos prévios não apontam predileção racial para acometimento do CV.

O tabagismo é considerado fator etiológico primário do CV com destaque para o tabaco sem fumo (de mascar) além do rapé (2, 34), no entanto, pode não ser predominante pontualmente (45). Nos pacientes que mascam fumo ou utilizam rapé, as lesões podem aparecer nas áreas de mucosa que continuamente entram em contato com o tabaco (2). A cavidade bucal é a região mais acometida pelo CV seguida pela laringe, podendo acometer, inclusive, cavidade nasal e seios

paranasais, ainda que raramente. Genitais e pele também podem apresentar esta variante de carcinoma. Na cavidade oral, o sítio mais acometido é mucosa jugal seguida por rebordo alveolar mandibular e gengiva (2, 34, 39, 43-46), podendo aparecer também em língua e palato duro (36). Há uma associação entre lesões em palato duro e rebordo alveolar superior a um comportamento mais agressivo do CV (43).

Clinicamente, o CV apresenta-se como formação espessa e exofítica que se mostra papilar ou verrucosa com a coloração variando de esbranquiçada a eritematosa. Pode evoluir de hiperplasia verrucosa para CV, por vezes apresentando associação de ambas as lesões, devendo-se tratar como o próprio CV (2, 35, 37, 47, 48). Esta neoplasia também pode mostrar perda da diferenciação, evoluindo para carcinoma epidermoide (1, 49). É focal, de base séssil em sua maioria e inicia-se como placa branca, delgada e de limites precisos, progredindo rapidamente para seu aspecto característico (2). Apresenta crescimento lento com margens que se alastram podendo gerar desconforto e aumento de volume ou se desenvolver de modo assintomático, por vezes mostrando grande extensão (2, 36). Seu comportamento localmente agressivo pode levar ao acometimento ósseo, muscular e de glândula salivar e mostrar extensão da lesão para face cutânea da bochecha e região externa adjacente à comissura labial (34, 35, 37, 38).

Histologicamente, o CV é caracterizado pela proliferação de células cujo citoplasma se mostra amplo e eosinofílico, núcleos redondos e levemente hiper cromáticos compatíveis com queratinócitos, formando epitélio de superfície verrucosa hiperparaqueratinizada e disposta em dobras com proeminências rombas no sentido do conjuntivo subjacente. O epitélio neoplásico mostra invasão por afastamento da membrana basal que se mantém intacta. Atipias celulares e estruturais bem como mitoses atípicas são raras evidenciando seu aspecto neoplásico bem diferenciado. Quando presentes, as atipias são discretas e observadas em região de camada basal (2, 34-36, 38). Algumas lesões podem mostrar displasia em áreas adjacentes ao CV além de carcinoma epidermoide localmente invasivo associado ao CV em lesões híbridas (36). As células neoplásicas podem apresentar queratinização individual (disqueratose) por alteração no processo de maturação dessas células ou mesmo mostrar formações de pérolas córneas (36). Intenso infiltrado inflamatório linfoplasmocitário adjacente à neoplasia

e microabcessos intraepiteliais podem estar presentes ao exame microscópico (2, 34, 38). Um estudo de 2011 analisou 10 casos de CV identificando em todos eles presença de células compatíveis com coilócitos, ou seja, células epiteliais vacuolizadas cujo núcleo se mostra picnótico e hipercromático e o citoplasma levemente hialino em razão de infecção viral, porém se valendo apenas do aspecto morfológico das células coradas em H&E (36).

Investigando mutações que possam estar associadas à patogênese do CV, considera-se a possibilidade de mutação genética no *TP53*, uma vez que a proteína p53 se mostra superexpressa mediante análise imuno-histoquímica em amostras de CV, assim como ocorre em outras neoplasias malignas de cabeça e pescoço, o que pode ser observado em células presentes na camada basal e áreas de microinvasão (36, 41, 50-52). Superexpressão da ciclina D1 em amostras de CV, proteína envolvida na regulação do ciclo celular, pode indicar regulação negativa do gene supressor de tumor *TRb* que tem sua proteína Rb (retinoblastoma) inalterada (50).

DNA do vírus HPV-16, que se relaciona ao potencial de proliferação, não foi encontrado em um estudo que avaliou vinte e três casos de CV oral, sugerindo a não relação deste à carcinogênese desta neoplasia (53).

Também foi analisada por imuno-histoquímica a marcação da proteína Ki67 (2.3 Proteína Ki67) a fim de determinar atividade proliferativa que é comumente alterada na carcinogênese. A imuno-histoquímica foi realizada através do MIB1, anticorpo monoclonal produzido pelos recombinantes do Ki-67, que se evidenciou, ainda que moderadamente, na camada basal do epitélio (36, 51, 54). Expressão do proto-oncogene HER2/neu também foi analisada em amostras de CV mostrando resultado negativo. Proteína anti-apoptótica Bcl-2 se mostrou presente no citoplasma de escassas células tumorais do CV (51). As metaloproteinases (MMPs), enzimas proteolíticas dependentes de zinco, atuam na degradação da membrana basal e matriz extracelular na invasão tumoral. Amostras de CV são praticamente desprovidas de marcação pelas MMPs 7, 9 e 12 quando comparado ao carcinoma epidermoide, podendo auxiliar no prognóstico deste. A MMP-7, ou matrilisina-1, é comumente presente em carcinomas mais agressivos, apresentando capacidade de degradar proteínas cujo papel na adesão e migração celular é essencial durante a carcinogênese, proteínas essas como fibronectina, tenascina e $\beta 4$ integrina. MMP-7

se mostrou presente em amostras de carcinoma epidermoide e praticamente ausente em CV. A $\alpha\text{v}\beta 6$, uma integrina epitelial que se liga à fibronectina e tenascina, não é comumente expressa em queratinócitos normais, a expressão desta em CV foi discreta em comparação ao carcinoma epidermoide, no qual se mostrou amplamente expressa no epitélio e no interior das ilhotas de células neoplásicas invasivas. Os resultados imuno-histoquímicos para MMP-26 (matrilisina-2) e laminina-5 γ 2 não puderam ser considerados marcadores de invasão (52, 55). A proteína αB -cristalina se mostrou uma oncoproteína presente no desenvolvimento de outras neoplasias malignas estudadas anteriormente. Sua análise em amostras de CV mostrou superexpressão indicando o provável desempenho de um papel anti-apoptótico inibindo a via da proteína pró-apoptótica caspase-3(56).

Para que se possa proceder ao exame histopatológico é necessário que seja realizada biópsia de profundidade considerável, abrangendo área neoplásica e periferia da lesão com região de membrana basal (2, 35, 43, 57). As margens da lesão, quando devidamente biopsiadas permitem melhor distinção entre CV e hiperplasia verrucosa (48). Muitas vezes se faz necessário mais de uma biópsia para que se possa confirmar área de carcinoma invasivo (39). A soma do exame histopatológico ao exame clínico possibilita o diagnóstico da lesão descartando outras afecções, tais como hiperplasia verrucosa, hiperplasia pseudoepiteliomatosa, carcinoma epidermoide bem diferenciado ou indiferenciado, candidíase crônica e condiloma acuminado (35, 37, 48).

O tratamento mais indicado para esta neoplasia, devido à característica não agressiva e não invasiva é a excisão cirúrgica (35, 42-45, 58). Radioterapia como opção terapêutica para o CV é controverso (42, 44). Inicialmente, estudos apontavam para os efeitos negativos de se proceder à radioterapia ressaltando potencial transformação anaplásica do tumor e consequente metástase em uma parcela dos pacientes (35, 59, 60). Contrariando esses resultados estão os casos que não apresentaram essa transformação ou que mostrou transformação anaplásica após tratamento cirúrgico, ressaltando a possibilidade deste processo se tratar, na verdade, de um carcinoma menos diferenciado e não de um CV (61). Tratamento baseado apenas na radioterapia pode resultar em chance consideravelmente maior de recidiva a menos que sejam tratadas lesões superficiais e de pequena dimensão (34). A associação desta ao tratamento cirúrgico pode

apresentar resultados positivos (54) até porque, estudos prévios mostraram que a radioterapia como escolha terapêutica se mostrou tão eficaz quanto à excisão cirúrgica e o CV aparentou ter capacidade de resposta à radioterapia semelhante ao carcinoma epidermoide bem diferenciado incorrendo em maior sobrevida sem desdiferenciação ou metástase (46, 62) o que corrobora com os resultados de trabalhos que compararam o tratamento do CV ao do carcinoma epidermoide, mostrando que ambos podem ser tratados de maneira semelhante, principalmente quando o carcinoma epidermoide se mostra mais diferenciado e, conseqüentemente, menos agressivo (39, 40). Também a associação da radioterapia à quimioterapia com vimblastina, metotrexato e bleomicina se mostrou boa opção terapêutica de primeira escolha para casos inoperáveis de CV ou casos de pacientes que recusaram tratamento cirúrgico (63). No caso do antimetabólico metotrexato, este foi empregado em um estudo baseado na aplicação intra-arterial contínua por, em média, sete dias, em quinze homens acometidos pelo CV, mostrando resultados satisfatórios com a regressão seguida pelo desaparecimento da lesão em poucos meses, sem que houvesse, no entanto, recidiva em pelo menos três anos após tratamento (64). Apesar de ser a excisão cirúrgica, até o presente momento, o tratamento de escolha para o CV, cabe ressaltar que cada caso deve ser avaliado de modo particular considerando cada uma das opções terapêuticas disponíveis. A escolha de um tratamento conservador, como a anteriormente referida quimioterapia, pode mostrar vantagens sobre o processo cirúrgico por preservar as estruturas anatômicas acometidas preservando a estética e, principalmente, a função (64). É importante que hábitos relacionados à etiologia da neoplasia, como tabagismo, sejam cessados, bem como seja reconsiderada e melhorada a higienização bucal. Uma boa alimentação também soma positivamente ao tratamento do paciente acometido (54) que, posteriormente ao tratamento, deve ser acompanhado em consultas de rotina para que seja detectada precocemente, caso ocorra, a recidiva da lesão (43).

2.3 Proteína Ki67

O anticorpo monoclonal de rato Ki67 foi identificado por Gerdes e colaboradores no ano de 1983, na cidade de Kiel, oeste da Alemanha, durante a utilização da 67^a placa de cultura. Fatos estes que dão origem ao nome o qual recebe (65).

Ki67 é um anticorpo da classe IgG1 que se liga a uma proteína (pKi67), esta, por sua vez, é constituída por banda dupla com peso molecular aparente de 395 e 345kDa, codificada por um gene localizado no braço longo do cromossomo 10 (10q25-ter) (65-68). A pKi67 é uma proteína não histona, susceptível à ação de proteases mas não de outras enzimas e seu papel, restrito à atividade proliferativa da célula, se mostra fundamental para a progressão do ciclo de divisão celular (66, 67, 69).

Associação do Ki67 ao ciclo de proliferação celular se deve a estudos também iniciados por Gerdes e colaboradores, caracterizando-se por identificar a marcação nuclear positiva em células ativas para as fases S, G2, M e fase G1, para esta última, ocorrendo a marcação apenas após efetuada a passagem pelo primeiro ciclo mitótico. Ou seja, a marcação para o anticorpo Ki67 não é identificando em células quiescentes, mas em células biossinteticamente ativas (65, 67, 70-72). PKi67 reage com antígeno nucleolar de células em proliferação, localizando-se em regiões distintas conforme a fase do ciclo celular (66, 67, 73-76). Durante o período de intérfase do ciclo celular, no qual ocorre a preparação da célula para a divisão, a estrutura nucleolar, ainda intacta, mostra associação à pKi67 que se aloca ao córtex e aos componentes fibrilares densos, vindo os nucléolos a desintegrarem na prófase, fase esta na qual a pKi67 estará localizada na superfície da heterocromatina. No decorrer da metáfase, a pKi67 situa-se na superfície das estruturas cromossomais, estas em condensação máxima durante a referida fase. Na sequência, a positividade da pKi67 situa-se na cariolinfa antes do reaparecimento das estruturas nucleolares, degradando rapidamente uma vez concluída a fase de mitose (73, 75, 76).

O perfil de marcador proliferativo do anticorpo Ki67 viria então a possibilitar um maior entendimento da proliferação celular em processos neoplásicos também

auxiliando no acompanhamento desses processos com intuito de avaliar a eficácia de protocolos terapêuticos (70, 71).

Níveis de proliferação celular em amostras de epitélio oriundo de mucosa oral foram avaliados para diferentes graus de displasia epitelial, bem como para amostras não displásicas. Em amostras de displasia epitelial intensa, a expressão Ki67 foi consideravelmente maior quando comparado a displasia moderada, leve e grupo controle, resultados estes proporcionais ao grau de displasia das amostras indicando aumento no índice de proliferação celular junto ao aumento da intensidade displásica. As células epiteliais de amostras não displásicas mostraram positividade restrita às camadas basal e parabasal, com maior concentração para esta última, ao passo que nos casos de displasia, esta positividade ocorreu também em células altas integrantes da camada espinhosa e até da camada córnea, ou seja, áreas epiteliais em cuja proliferação não se adéqua às condições fisiológicas de normalidade. A expressão Ki67 em células supra-basais mostrou correlação significativa com a ocorrência da displasia e seu grau de intensidade (77-82). Para tanto, o marcador de proliferação celular Ki67, além de indicar, por sua expressão, os níveis de displasia epitelial permitindo que se estabeleça melhor esta graduação, pode ainda indicar uma condição displásica que apresente grande potencial de transformação maligna por sua acentuada marcação (83).

Além dos estudos que avaliam os resultados imuno-histoquímicos do Ki67 (clone Mib-1) em displasias epiteliais, um pior prognóstico de neoplasias malignas também tem sido relacionado à positividade do anticorpo Ki67. Em casos de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço, pacientes que passaram por cirurgia inicial e radioterapia pós-operatória, dos quais as amostras indicaram maior índice de marcação para o anticorpo, também apresentaram pior curso clínico e prognóstico quando comparado a pacientes com a mesma neoplasia e tratamento mas com resposta positiva ao protocolo terapêutico (84). No entanto, a marcação Ki67 apenas, se mostra insuficiente na previsão de prognóstico para o carcinoma epidermoide oral (85).

A marcação da atividade proliferativa também se relaciona a positividade da proteína supressora de tumor p53. A p53, uma vez alterada, desencadearia um aumento na proliferação celular com conseqüente aumento da positividade Ki67

(86). Estudo mostrou que o aumento na expressão de ambos resultou em correlação estatisticamente significativa para amostras de leucoplasia oral (77). Ainda o aumento na expressão desses anticorpos apontou para pior prognóstico nos casos de leucoplasia oral indicando maior instabilidade genômica (87). A expressão de ambos os marcadores pode também estar relacionada ao processo de carcinogênese da neoplasia que mais comumente acomete a cavidade oral, o carcinoma epidermoide (86). Em amostras desta neoplasia, a positividade da p53 somada ao alto índice de proliferação celular apontado pelo Ki67, indicou quadro de pior prognóstico para os casos acompanhados (88). Outro estudo caminhou para resultados destoantes do anterior, não detectando influência das marcações imuno-histoquímicas para p53 e Ki67 no curso clínico de casos de carcinoma epidermoide oral, neste caso, considerando a resposta à terapêutica radio-quimioterápica (89). Deste modo, a positividade para p53 e Ki67 não se fizeram suficientes para determinar tratamento de escolha ou a alteração deste nos casos de carcinoma epidermoide de cabeça e pescoço (89, 90).

3 PROPOSIÇÕES

1. Comparar dados epidemiológicos referentes aos pacientes inseridos nos grupos estudados: leucoplasia verrucosa proliferativa e carcinoma verrucoso;
2. Identificar e quantificar critérios histopatológicos visando diferenciar morfológicamente lesões de leucoplasia verrucosa proliferativa e carcinoma verrucoso;
3. Analisar marcações imuno-histoquímicas para a proteína Ki67, marcador da atividade proliferativa celular, identificando e quantificando as células positivas de forma comparativa para leucoplasia verrucosa proliferativa e carcinoma verrucoso.

4 MATERIAL E MÉTODOS

O presente trabalho foi previamente aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, sob parecer 500.217 (Anexo A).

4.1 Material

Acerca do material utilizado na presente pesquisa, seguem descritos nos tópicos seguintes os casos e amostras teciduais utilizados, bem como os dados epidemiológicos referentes aos pacientes inseridos no estudo.

4.1.1 Casos e amostras teciduais

Foram selecionadas 39 amostras teciduais de leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP) e 20 de carcinoma verrucoso (CV), oriundos do Serviço de Patologia Cirúrgica da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP). Tal amostragem se faz proveniente de um total de 42 pacientes, 22 diagnosticados com leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP) e 18 diagnosticados com carcinoma verrucoso (CV) e 02 diagnosticados com LVP e CV no período compreendido entre os anos de 2000 e 2014. Pacientes com mais de uma lesão tiveram as mesmas inseridas no estudo como lesões distintas. De cada caso foram recuperados os blocos de material parafinado fixado previamente em formol 10% e cortes de 05 µM estendidos em lâminas de vidro corados em hematoxilina e eosina (H&E), todos pertencentes ao arquivo do referido serviço. Amostras de carcinoma epidermoide de boca também foram utilizadas com a finalidade de obter controle positivo nas reações imuno-histoquímicas.

4.1.2 Dados epidemiológicos

A partir da ficha de pedido de exame enviado ao serviço, foram recuperados para cada caso os dados: sexo; idade; cor da pele; aspectos clínicos da lesão; sítios anatômicos acometidos (nos fornecendo informação de acometimento focal ou multifocal); tabagismo; etilismo e sintomatologia. Foi realizado também, para cada paciente incluído no estudo, levantamento de todos os diagnósticos já registrados no Serviço de Patologia Cirúrgica da FOUSP, tais como carcinoma epidermoide, hiperqueratose, acantose e displasias epiteliais, bem como os sítios anatômicos acometidos.

4.2 MÉTODOS

No que tange aos métodos empregados, seguem descritos os procedimentos para análise dos aspectos morfológicos histopatológicos, técnica imuno-histoquímica utilizada e meios para apreciação dos resultados obtidos.

4.2.1 Aspectos morfológicos

Partindo das condições anteriormente postas, as lâminas coradas em H&E das amostras foram inspecionadas ao microscópio de luz e os aspectos morfológicos devidamente identificados e tabulados para posterior quantificação em cada grupo: leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP) e carcinoma verrucoso (CV).

Os aspectos morfológicos identificados, considerando a classificação de 2005 da Organização Mundial da Saúde, foram: superfície epitelial verrucosa (papilomatose); hiperortoqueratinização ou hiperparaqueratinização; presença de tampão de queratina; hipergranulose; estratificação epitelial irregular; inversão de polaridade das células pertencentes à camada basal; projeções epiteliais em forma

de gota; aumento do número de figuras de mitose; mitoses em camadas altas (compreendendo os dois terços superiores do epitélio); disqueratose; pérolas córneas; aumento do tamanho do núcleo; variação anormal do tamanho do núcleo; variação anormal do tamanho da célula; pleomorfismo nuclear; pleomorfismo celular; proporção núcleo/citoplasma aumentada; aumento do tamanho e do número de nucléolos; hipercromatismo nuclear; exocitose por mono e polimorfonucleares com graduação de 01 a 03; edema perinuclear; interface epitélio-conjuntiva em dobras; infiltrado inflamatório mononuclear e infiltrado inflamatório polimorfonuclear. Cada aspecto foi avaliado individualmente, tabulado e quantificado para posterior cruzamento de dados entre critérios que se correlacionam e entre os grupos estabelecidos LVP e CV.

4.2.2 Imuno-histoquímica

A partir da recuperação do material embocado em parafina e previamente fixado em formol 10%, foram realizados novos cortes de 03 µm estendidos em lâminas previamente tratadas pelo 3-aminopropyltriethoxysilane (organosilano da marca SIGMA) visando aumentar a adesividade dos cortes. Os cortes permaneceram em estufa a 60°C overnight. Processo de desparafinização se iniciou com um primeiro banho de xilol em estufa a 60°C por trinta minutos, na sequência os cortes permaneceram em novo xilol em temperatura ambiente por quinze minutos. A reidratação foi realizada em cadeia descendente de etanóis, começando por três banhos em etanol absoluto, seguindo para etanol 95%, 90%, 85%, 80%, sucessivamente, e, por fim, banho em solução de etanol somado a hidróxido de amônio (NH₄OH) 10% por cinco minutos. Um banho em água destilada por cinco minutos, seguido por novo banho em água destilada aquecida precedeu a recuperação antigênica em banho-maria a 95°C por trinta minutos, na qual foi utilizado EDTA pH9,0. As cubas com a lâminas foram retiradas do banho-maria e seu conteúdo foi gradualmente substituído por água destilada de modo a evitar que os cortes sofressem choque térmico. Após banho em água destilada procedeu-se o

bloqueio da peroxidase endógena tecidual através da imersão em solução de metanol e peróxido de hidrogênio 6% na proporção de 1/1, duas vezes, quinze minutos cada. Mais duas lavagens de cinco minutos precederam a solução tampão da reação, Tris (Tris 50mM, NaCl 150 mM) pH 7,6, na qual as lâminas foram três vezes imersas por cinco minutos cada imersão. Na sequência, os cortes foram expostos ao anticorpo primário anti-Ki67 (clone MIB1, DAKO, F7268, Carpinteria, CA, USA) na titulação de 1:75 em BSA, permanecendo em câmara úmida na temperatura de 37°C por 1h30 minutos. Os cortes ficaram por cinco minutos imersos em solução Tris, repetindo por três vezes. Com a finalidade de amplificar o sinal da reação antígeno-anticorpo, foi realizada incubação do anticorpo de ligação e complexo terciário por meio do kit EnVision® + System-HRP(DAKO, K4004, Carpinteria, CA, USA), por trinta minutos. Após incubação seguiu-se imersão na solução tampão por três vezes de cinco minutos. As reações foram reveladas pela diaminobenzidina (DAKO Liquid DAB+, K3468, DAKO, Carpinteria, CA, USA) em incubação de dez minutos e, após lavagem em tampão e água destilada por dez minutos, visando remoção de excessos, os cortes foram contracorados com hematoxilina de Mayer por dois minutos. Após nova lavagem de cinco minutos em água corrente os cortes foram desidratados em cadeia ascendente de etanóis começando por passagem em etanol 70%, 75% e 80%, três minutos em etanol 85%, 90%, 95%, 100% e novo banho etanol 100%, seguindo para terceiro banho etanol 100% por cinco minutos e, por fim, os cortes foram diafanizados em xilol, montados em resina para microscopia e protegidas por lamínulas para observação ao microscópio de luz.

4.2.3 Análise dos resultados

A análise das lâminas foi realizada por meio de microscópio de luz, efetivando-se a observação de todas as lâminas pertencentes a todas as amostras oriundas dos pacientes inseridos no presente estudo. Por meio da varredura de cada corte histológico, os aspectos observados foram tabulados e quantificados. Os

resultados provenientes das análises morfológicas foram posteriormente calculados em porcentagem e disposto em gráficos comparativos para cada grupo de lesões.

Para a análise imuno-histoquímica, além da observação das lâminas ao microscópio de luz, estas foram avaliadas por meio de captura ao microscópio Axio Imager A2 (Zeiss) com uma câmera digital acoplada (Axio Cam HRc-Zeiss®) com auxílio do software Axio Vision (Zeiss) a fim de se fotografar campos aleatórios e proceder a contagem das células positivas utilizando o software Wright Cell Image Facility ImageJ (WCIF ImageJ). A análise imuno-histoquímica foi quantitativa, por meio da contagem do número células com núcleos positivos (núcleos de coloração acastanhada) para o marcador Ki67 em um número mínimo de 500 células por lâmina em campos aleatórios, porém significativos, no aumento de 400 vezes. O resultado da contagem de células permitiu classificar a marcação por escores, consistindo em <5% de células positivas escore 0, entre 5 e 25% escore 1, entre 26 e 50% 2 e acima de 50% 3.

Para os testes estatísticos, as variáveis consistiram nos dados epidemiológicos, morfológicos e imuno-histoquímicos provenientes dos dois grupos de pacientes e lesões. Para esta análise foi utilizado o teste para proporções, o qual verifica a hipótese de que as proporções entre os dois grupos (LVP e CV) são semelhantes. O nível de significância adotado, p-valor significativo, foi de 0,050: >0,050 para resultados estatisticamente significantes em que não há semelhança entre as proporções analisadas.

5 RESULTADOS

Os resultados seguem descritos de modo a individualizar o enfoque para casuística, epidemiológico, morfológico, imuno-histoquímica e análise estatística.

5.1 Casuística

Compõem este estudo 42 pacientes, 22 diagnosticados com leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP) e 18 diagnosticados com carcinoma verrucoso (CV) e 02 diagnosticados com LVP e CV no período compreendido entre os anos de 2000 e 2014.

A proporção de registro de biópsia por paciente com CV foi de 1/1 enquanto a mesma proporção para LVP foi de 24/39 englobando, neste contexto, desde paciente com um único registro de biópsia com o referido diagnóstico até paciente com 06 registros (Gráfico 5.1). Os pacientes inseridos no estudo também apresentaram registros de biópsia de outras lesões, dentre elas carcinoma epidermoide, hiperqueratose, acantose e diferentes graus de displasia epitelial (Gráfico 5.2).

Gráfico 5.1 - Distribuição do número de biópsias por paciente para os grupos LVP e CV

Dentre os 42 pacientes, um paciente do sexo feminino apresentou ambas as lesões, LVP e CV. A mesma paciente teve também outros registros de biópsia no mesmo serviço em cujos resultados constavam hiperqueratose, papilomatose, acantose e displasia epitelial intensa envolvendo lábio inferior (CV, hiperqueratose e displasia epitelial intensa) e mucosa jugal (LVP, hiperqueratose, papilomatose, acantose e candidíase). Outra paciente apresentou, além de LVP (língua) e CV (língua), diagnóstico de carcinoma epidermoide *in situ* e hiperqueratose com displasia epitelial intensa, neste caso sem dados de localização.

Foram 03 os pacientes com LVP e carcinoma epidermoide sem CV. Um deles com acometimento em lábio inferior (LVP), mucosa jugal (carcinoma epidermoide e hiperqueratose com displasia epitelial discreta) e língua (hiperqueratose com displasia epitelial moderada). Outro com lesão em mucosa jugal (LVP e carcinoma epidermoide), rebordo alveolar (LVP), fundo de sulco (carcinoma epidermoide) e palato (carcinoma epidermoide). O último com envolvimento de mucosa jugal (LVP e carcinoma epidermoide) e mucosa jugal (carcinoma epidermoide). Um único paciente apresentou apenas CV e carcinoma epidermoide.

Sete pacientes tiveram diagnóstico de LVP além de outros resultados incluindo hiperqueratose, paraqueratose, ulceração, papilomatose, acantose,

displasia epitelial discreta, moderada e intensa, mucosite e candidíase em sítios anatômicos variados como língua, rebordo alveolar, assoalho, mucosa jugal, lábio e fundo de sulco. Também foram 07 os pacientes apresentando além do CV, diagnósticos incluindo paraqueratose, hiperqueratose, acantose, papilomatose, displasia epitelial discreta, moderada e intensa, hiperplasia papilomatosa inflamatória, mucosite, candidíase e candidíase hiperplásica em língua, rebordo alveolar e mucosa jugal.

Doze pacientes apresentaram LVP sem outros resultados diagnósticos, da mesma forma foram 11 os pacientes que tiveram apenas diagnóstico de CV.

Gráfico 5.2 - Distribuição do número de biópsias por paciente para os grupos LVP e CV

5.2 Epidemiológico

Todos os casos de LVP foram diagnosticados em pacientes do sexo feminino e, dos 18 pacientes diagnosticados com CV, 04 eram homens e 14 eram mulheres,

ficando na proporção homem/mulher de 1:4. Pacientes com LVP e CV eram mulheres (Gráfico 5.3).

Gráfico 5.3 - Distribuição do número percentual de pacientes por sexo para os grupos LVP e CV

A média de idade para pacientes com LVP foi 75,6, partindo da idade mínima de 57 e máxima de 87 anos. Para o CV a média de idade ficou em 66,9 anos com a mínima de 40 e máxima de 88 anos (Gráfico 5.4).

Gráfico 5.4 - Distribuição número percentual de pacientes por idade para os grupos LVP e CV

Os sítios anatômicos mais acometidos pela LVP foram rebordo alveolar, com envolvimento em 14 biópsias de 11 pacientes, e mucosa jugal com 12 biópsias de 10 pacientes. Três biópsias de 03 pacientes foram de lesão em fundo de sulco e 03 biópsias de 02 pacientes mostraram envolvimento de língua. Tanto gengiva como palato e trígono retromolar apresentaram LVP em 02 biópsias de 02 pacientes cada. Por fim, o envolvimento labial ocorreu em apenas 01 caso. Foram 04 as biópsias sem informação quanto à região anatômica afetada (Gráfico 5.5 e 5.6).

Desses pacientes, já contabilizados anteriormente, 04 apresentaram acometimento multifocal com lesões abrangendo mais de um sítio anatômico no momento da biópsia: 03 apresentaram lesão se estendendo entre mucosa jugal e rebordo alveolar e 01 lesão em rebordo alveolar e fundo de sulco (Gráfico 5.7). Também partindo dos dados contabilizados anteriormente, 05 pacientes tiveram lesões em mais de um sítio anatômico em momentos diferentes, registrados em biópsias distintas: 02 pacientes tiveram LVP em mucosa jugal e rebordo alveolar, 01 paciente apresentou lesão em rebordo alveolar e trígono retromolar, 01 caso de LVP em mucosa jugal e trígono retromolar e, por fim, 01 paciente com lesão em rebordo alveolar, fundo de sulco e gengiva. Totalizando, foram 09 os pacientes com lesões extensas e/ou de acometimento multifocal com envolvimento de mais de um sítio anatômico (Gráfico 5.8).

O CV acometeu predominantemente rebordo alveolar, em 05 pacientes, e língua em 04 pacientes, seguido por mucosa jugal, 03 pacientes, lábio, 02 casos, assim como palato também com 02 casos. Retrocomissura, fundo de sulco, soalho de boca e orofaringe apresentaram 01 caso apenas cada. Dois casos de ficha incompleta não continham essa informação especificamente (Gráfico 5.5 e 5.6).

Foram 02 os pacientes, já contabilizados nos dados anteriores, que apresentaram lesão abrangendo mais de um sítio anatômico no momento da biópsia. Um dos pacientes apresentou lesão que se estendia do rebordo alveolar para fundo de sulco e, outro paciente, apresentou lesão em rebordo alveolar e soalho de boca (Gráfico 5.7).

Note que, nos Gráficos 5.5 e 5.6, referente ao número de pacientes e biópsias, respectivamente, somam uma quantidade maior de registros para ambos,

uma vez que um mesmo paciente pode apresentar mais de um sítio anatômico na mesma ficha de biópsia ou em biópsias distintas.

Gráfico 5.5 - Incidência de acometimento: sítio anatômico por paciente

Gráfico 5.6 - Incidência de acometimento: sítio anatômico por biópsia (lesão)

Gráfico 5.7 - Distribuição do número de biópsias (lesões) envolvendo mais de um sítio anatômico no momento da biópsia

Gráfico 5.8 - Distribuição do número de pacientes com lesões de LVP em mais de um sítio anatômico em momentos diferentes com biópsias distintas

A prevalência de pacientes de pele branca acometidos pela LVP foi consideravelmente alta com 18 dos 24 pacientes. Uma paciente negra e uma paciente amarela fizeram parte do estudo. Nas fichas de outros 04 pacientes não

constava cor da pele. Com CV, foram 19 dos 20 pacientes eram brancos e 01 de pele negra (Gráfico 5.9).

Gráfico 5.9 - Distribuição do número percentual de pacientes considerando a cor da pele para os grupos LVP e CV

Pacientes tabagistas compõem em menor número os grupos estudados. Um fumante para 22 pacientes com LVP e 03 fumantes para 18 pacientes com CV. Na contagem dos pacientes não tabagistas com LVP, 15 não eram fumantes e 01 ex-fumante. Foram 05 os casos de LVP sem esta informação. Nove pacientes com CV não era fumantes e 06 não tiveram as fichas preenchidas para tabagismo. Os dois casos de pacientes com LVP e CV não eram fumantes (Gráfico 5.10).

Gráfico 5.10 - Distribuição do número percentual pacientes considerando hábitos tabagistas para os grupos LVP e CV

Considerando o etilismo, 15 pacientes com LVP não eram etilistas, 01 etilista e 06 casos sem dados sobre. Com CV, 07 pacientes não eram etilistas, 01 etilista e 10 não informaram. Os dois casos de LVP e CV também não eram etilistas (Gráfico 5.11).

Gráfico 5.11 - Distribuição do número percentual de pacientes considerando etilismo

Das 39 lesões de LVP biopsiadas, 25 eram assintomáticas (de 15 pacientes), 06 sintomáticas (de 03 pacientes) e 08 incertos (05 pacientes). Das 20 lesões de CV biopsiadas, 12 eram assintomáticas, 02 sintomáticas e, de 06 não foram obtidas informações. Incluindo em ambos os grupos (LVP e CV) os casos que apresentam as duas lesões e lembrando que para CV, a proporção paciente/biopsias foi de 1/1, diferente da LVP (Gráfico 5.12).

Gráfico 5.12 - Distribuição do número percentual de biópsias considerando sintomatologia de cada lesão

5.3 Morfológico

A análise morfológica das lesões possibilitou identificar, ao microscópio de luz, tabular e quantificar critérios para cada lesão biopsiada, individualmente, de ambos os grupos LVP e CV de modo comparativo (Figura 5.27 e 5.28). Foram contabilizadas 59 lesões distintas, dentre elas 39 de LVP e 20 de CV.

O critério superfície verrucosa (Figura 5.27-A e 5.28-B), foi identificado em cortes histológicos em cujo epitélio se mostrava voltado para a superfície compondo sinuosidades por vezes digitiformes ou papilomatosas. Noventa e dois por cento dos casos de LVP foram positivos para este critério e a totalidade (100%) positiva para

os casos de CV. Interface epitélio-conjuntiva em dobras esteve presente em 76,3% dos casos de LVP e em 100% no grupo CV (Gráfico 5.13).

Gráfico 5.13 - Distribuição do número percentual de biópsias considerando a conformação epitelial: superfície verrucosa (papilomatose) e interface epitélio-conjuntiva em dobras

Camada córnea dos cortes analisados apresentou hiperparaqueratina em 65,7% das LVPs e em 90% dos CVs. Hiperortoqueratina esteve presente em 15,7% dos casos de LVP, não ocorrendo isoladamente em nenhum dos casos de CV (0%). Também foram consideradas as lesões cujos cortes mostraram tanto paraqueratina quanto ortoqueratina. Desses casos 18,40% eram de LVP e 10% de CV (Gráfico 5.14).

Gráfico 5.14 - Distribuição do número percentual de biópsias considerando tipo de queratina presente na camada córnea epitelial

A conformação alterada do epitélio de revestimento formando insinuações estreitas e afiladas no sentido do conjuntivo, sendo estas preenchidas por queratina (orto ou paraqueratina), nos deu o critério tampão de queratina (Figura 5.28-B), ocorrendo em 57,8% das LVPs e em 80% dos CVs (Gráfico 5.15).

Gráfico 5.15 - Distribuição do número percentual de biópsias considerando a presença do tampão de queratina

Camada granulosa do epitélio de revestimento, quando evidente, permite identificar a ocorrência da hipergranulose, critério este observado em 47,3% das LVPs e em 30% dos CVs (Gráfico 5.16).

Gráfico 5.16 - Distribuição do número percentual de biópsias considerando a presença da hipergranulose epitelial

A estratificação epitelial irregular, identificada pela presença de células com aspectos distintos da camada epitelial a que se encontra, podendo ser caracterizada por células de aspecto basalóide em camadas altas, por exemplo, ocorreu em 34,2% dos casos de LVP e em 25,0% dos casos de CV (Gráfico 5.17).

Gráfico 5.17 - Distribuição do número percentual de biópsias considerando a ocorrência de estratificação epitelial irregular

Camada basal do epitélio, em sua normalidade, apresenta células cujos núcleos se mostram centralizados. A ocorrência da inversão de polaridade caracteriza-se pela presença desses núcleos voltados no sentido oposto à membrana basal. A inversão de polaridade dessas células ocorreu em 50,0% dos casos de LVP e em 55,0% dos casos de CV (Gráfico 5.18).

Gráfico 5.18 - Distribuição do número percentual de biópsias considerando a inversão de polaridade nas células oriundas da camada basal epitelial

Continuando a análise do epitélio comprometido, a formação de projeções morfológicamente semelhantes à gota, ou seja, de base ovalada e ampla no sentido do conjuntivo, ligada ao restante do epitélio por uma região de estrangulamento, ocorreu em 57,8% das LVPs e em 15,0% dos CVs (Gráfico 5.19).

Gráfico 5.19 - Distribuição do número percentual de biópsias considerando a presença de projeções epiteliais em forma de gota no sentido do tecido conjuntivo adjacente

As mitoses também foram observadas (Figura 5.27-D). O aumento do número de mitoses foi observado em 76,3% dos casos de LVP e em 95,0% dos casos de CV. Já as mitoses em camadas altas, identificadas nos dois terços superiores do epitélio, ocorreram em 68,4% das LVPs e em 55,0% dos CVs (Gráfico 5.20).

Gráfico 5.20 - Distribuição do número percentual de biópsias considerando o aumento do número de mitoses e a presença de mitoses em camadas altas do epitélio

O epitélio alterado também pode exibir alterações relacionadas à maturidade celular. A disqueratose (Figura 5.27-C), por exemplo, ocorre devido ao avanço na maturação de uma célula que, individualmente, passa a queratinizar em camadas mais baixas do epitélio como as camadas granulosa e espinhosa. A este mesmo processo de maturação envolvendo um grupo de células queratinizando, dá-se o nome de pérola córnea. A disqueratose ocorreu em 92,1% dos casos de LVP e em 85,0% dos casos de CV. Já as formações de pérolas córneas esteve presente em 50,0% dos casos de LVP e em 45,0% dos casos de CV (Gráfico 5.21).

Gráfico 5.21 - Distribuição do número percentual de biópsias considerando a presença de disqueratose (queratinização celular individual) e pérolas córneas (grupos de células epiteliais queratinizadas em áreas não córneas)

Alterações celulares também foram analisadas, dentre elas tamanho nuclear e celular, forma, hipercromatismo e aumento no tamanho e número de nucléolos (Figura 5.27-D e Figura 5.28-C). O aumento do tamanho do núcleo ocorreu em 39,4% das LVPs e em 50,0% dos CVs. A proporção núcleo/citoplasma aumentada foi observada em 60,5% das LVPs e em 85,0% dos CVs. Tanto a variação do tamanho do núcleo como a variação do tamanho da célula esteve presente em 71,0% das LVPs e em 85% dos CVs (Gráfico 5.22). Pleomorfismo nuclear e pleomorfismo celular (Figura 5.27-D e Figura 5.28-C) ocorreu em 89,4% dos casos de LVP e em 100,0% dos casos de CV. Hipercromatismo nuclear, ocasionado por maior adensamento do material genético basofílico, foi observado em 57,8% das LVPs e em 65,0% dos CVs. Aumento do tamanho e número de nucléolos ocorreu em 92,1% das LVPs e em 85,0% dos CVs (Gráfico 5.23).

Gráfico 5.22 - Distribuição do número percentual de biópsias considerando aumento no tamanho do núcleo, proporção núcleo/citoplasma aumentada, variação no tamanho do núcleo e variação no tamanho da célula

Gráfico 5.23 - Distribuição do número percentual de biópsias considerando pleomorfismo nuclear, pleomorfismo celular, hiperccrtomatismo nuclear e aumento do tamanho e número de nucléolos

A presença de tipos celulares nas camadas altas do epitélio exibindo halo esbranquiçado no entorno nuclear e destoantes de queratinócitos ou outros tipos celulares epiteliais ou inflamatórios nos deu o critério “edema perinuclear”, que foi

observado em 47,3% dos casos de LVP e em 50,0% dos casos de CV (Gráfico 5.24).

Gráfico 5.24 - Distribuição do número percentual de biópsias considerando a presença de células com edema perinuclear

Células inflamatórias presentes no epitélio, exocitose, também foi analisada em tipo (mononucleares e polimorfonucleares) e intensidade (graduação de 1 a 3). A exocitose das LVPs por mononucleares ocorreu em 55,8%, desses, 84,2% eram de intensidade grau 1, 15,7% grau 2 e nenhum caso de grau 3. A exocitose por ambos mononucleares e polimorfonucleares nas LVPs foi observada em 47,0%, desses 31,2% grau 1, 37,5% grau 2 e 31,20% grau 3. Nos CVs, a exocitose por mononucleares ocorreu em 30,0% sendo, desses, 83,30% em grau 1, 16,60% grau 2 e nenhum caso grau 3. A exocitose por ambos, mononucleares e polimorfonucleares nos CVs foi observada em 70,0% dos casos, desses, 15,30% grau 1, 53,80% grau 2 e 30,70% grau 3 (Tabela 5.1).

Tabela 5.1 - Distribuição dos números percentuais referentes à exocitose nos grupos LVP e CV considerando, a partir desses números, a intensidade nos graus 01, 02 e 03

LVP	Exocitose por mononucleares	Intensidade 01	Intensidade 02	Intensidade 03
	55,8%	84,20%	15,70%	0%
	Exocitose por ambos mono e polimorfonucleares			
	47,0%	31,20%	37,50%	31,20%
CV	Exocitose por mononucleares	Intensidade 01	Intensidade 02	Intensidade 03
	30,00%	83,30%	16,60%	0%
	Exocitose por ambos mono e polimorfonucleares			
	70,00%	15,30%	53,80%	30,70%

Grande parte das lesões apresentava, nas lâminas examinadas ao microscópio de luz, estreita faixa de tecido conjuntivo, por vezes o único tecido conjuntivo remanescente podia ser observado apenas por entre as dobras epiteliais. Examinando o tecido conjuntivo das lesões estudadas, foi possível notar a presença de infiltrado inflamatório mononuclear (crônico) em 100,0% dos casos de LVP e CV. Infiltrado inflamatório polimorfonuclear (agudo) ocorreu em 31,5% dos casos de LVP e em 45,0% dos casos de CV (Gráfico 5.25).

Gráfico 5.25 - Distribuição do número percentual de biópsias considerando infiltrado inflamatório mononuclear e polimorfonuclear

5.4 Imuno-histoquímica

A marcação imuno-histoquímica para a proteína Ki67, identificada pela coloração acastanhada de nucléolos e núcleos de células positivas, mostrou significativa diferença de marcação entre os grupos estudados: leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP) e carcinoma verrucoso (CV). Dos casos de LVP, 37,14% apresentaram menos de 5% de células positivas, compondo o escore 0. Também no escore 0 foram inseridos 5,26% dos casos de CV. Com marcação positiva entre 5 e 25% das células, escore 1, foram 51,42% dos casos de LVP e 52,63% dos casos de CV. No escore 2, com positividade imuno-histoquímica entre 26 e 50%, obtivemos 11,42% dos casos de LVP e 26,31% dos casos de CV. Por fim, com mais de 50% de células positivas caracterizando o escore 3, foram 15,78% dos casos de CV e nenhum caso de LVP (Gráfico 5.26).

Também na análise das lâminas coradas, notou-se que, a marcação se fazia mais prevalente nas camadas basal e parabasal (Figura 5.28-DE), muito embora, em alguns casos esta se fizesse presente também em camadas altas do epitélio. Notamos também que, embora algumas lâminas apresentassem escore 0 de

marcação, nas poucas células coradas para este escore, a fase M do ciclo celular se destacava evidenciando as fases de prófase, metáfase, anáfase e telófase (Figura 5.27-EF).

Gráfico 5.26 - Percentual de cada escore encontrado para marcação imuno-histoquímica

Figura 5.27 - Cortes histológicos de LVP corados em H&E (A, B, C, D) e cortes submetidos à imunohistoquímica para Ki67 (E, F). **A:** Amostra de LVP em aumento de 25x evidenciando superfície verrucosa com exuberante camada de ortoqueratina e interface epitélio-conjuntiva levemente tortuosa. **B:** LVP no aumento de 100x com ostensiva hipergranulose. **C:** LVP em 400x com enfoque para disqueratose. **D:** LVP em 400x evidenciando a ocorrência de pleomorfismo nuclear e celular, aumento no tamanho e número de nucléolos e mitoses nas fases de prófase, metáfase, e anáfase. **E:** LVP em 100x na qual se nota marcação nuclear específica do Ki67 em células das camadas parabasal e alta. **F:** LVP em 400x evidenciando a marcação do Ki67 em células ativas com maior enfoque para a marcação de células na fase M do ciclo celular, na imagem se destacam células em prófase

Figura 5.28 - Cortes histológicos de CV corados em H&E (A, B, C) e cortes submetidos à imuno-histoquímica para Ki67 (D, E). **A:** Amostra de CV em aumento de 100x evidenciando projeções no sentido da superfície com tampões de queratina e hipergranulose, bem como sinuosa interface epitélio-conjuntiva. **B:** CV no aumento de 25x mostrando exuberante alteração na conformação do epitélio neoplásico com a formação de tampões de queratina. **C:** CV em 400x no qual se observa pleomorfismo nuclear e celular, hiper cromatismo e evidente perda de polaridade das células que compõem a camada basal. **D:** Imuno-histoquímica para Ki67 em CV, aumento de 400x exibindo marcação nuclear específica em células das camadas basal e parabasal com maior prevalência nesta última. **E:** CV em 100x mostrando marcação para Ki67 nas camadas germinativas do epitélio

5.5 Análise estatística

Utilizando um teste para proporções e comparação de percentuais, a hipótese testada foi de que as proporções entre dois grupos são semelhantes. Rejeita-se esta hipótese quando o p-valor é significativo ($>0,050$), indicando diferença entre as proporções testadas.

O montante de dados comparados incluiu, dentro dos aspectos epidemiológicos: sexo, cor, faixa etária, tabagismo, etilismo, sintomatologia e sítio anatômico acometido.

Incorporando os aspectos histopatológicos, consideramos a significância estatística para tampão de queratina, presença de ortoqueratina, paraqueratina ou ambos, hipergranulose, papilomatose, projeções em gota, estratificação epitelial irregular, inversão de polaridade, aumento no número de mitoses, mitoses em camadas altas do epitélio, disqueratose, pérolas córneas, aumento do tamanho dos núcleos, variação do tamanho do núcleo, variação do tamanho da célula, pleomorfismo nuclear, pleomorfismo celular, proporção núcleo/citoplasma aumentada, aumento no tamanho e número de nucléolos, hiper cromatismo nuclear, exocitose, grau de exocitose, edema perinuclear, interface epitélio-conjuntiva em dobras, infiltrando inflamatório mononuclear e polimorfonuclear.

Por fim, a análise estatística para imuno-histoquímica considerou os escores de marcação de 0 a 3.

Todos esses aspectos foram comparados estatisticamente entre os grupos de leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP) e carcinoma verrucoso (CV).

Os resultados obtidos salientaram, dentro do conjunto dos aspectos epidemiológicos como sexo, cor da pele, faixa etária, tabagismo, etilismo e sintomatologia, uma diferença estatisticamente significativa apenas para a variável “sexo”. No sexo masculino o maior percentual é de CV, já no feminino é de LVP com p-valor de 0,034 (Tabela 5.2).

Tabela 5.2 - Caracterização da amostra segundo grupos e resultados dos testes de comparação de percentual para sexo, cor, faixa etária, tabagismo, etilismo e sintomatologia

Variáveis	Grupos				p-valor
	CV		LVP		
	N	%	N	%	
Sexo					
Masculino	5	25,0	0	0,0	0,034
Feminino	15	75,0	24	100,0	0,034
Cor					
Branca	19	95,0	18	75,0	0,164
Negra	1	5,0	1	4,2	0,549
Amarela	0	0,0	1	4,2	0,933
Sem informação	0	0,0	4	16,7	0,164
Faixa etária					
40 a 49 anos	2	10,0	0	0,0	0,390
50 a 59 anos	2	10,0	1	4,2	0,873
60 a 69 anos	7	35,0	3	12,5	0,158
70 a 79 anos	5	25,0	11	45,8	0,265
80 anos ou mais	3	15,0	9	37,5	0,184
Sem informação	1	5,0	0	0,0	0,926
Tabagismo					
Sim	3	15,0	1	4,2	0,475
Não	11	55,0	17	70,8	0,441
Ex-fumante	0	0,0	1	4,2	0,933
Sem informação	6	30,0	5	20,8	0,725
Etilismo					
Sim	1	5,0	1	4,2	0,549
Não	9	45,0	17	70,8	0,154
Sem informação	10	50,0	6	25,0	0,161
Sintomatologia					
Sintomático	2	10,0	6	15,4	0,864
Assintomático	12	60,0	25	64,1	0,981
Sem informação	6	30,0	8	20,5	-
Total	20	100,0	24	100,0	-

A incidência de LVP e CV para cada sítio anatômico foi analisada. Não foi detectada diferença estatisticamente significativa entre o acometimento de LVP e CV para os sítios anatômicos afetados (Tabela 5.3).

Tabela 5.3 - Caracterização da amostra segundo grupos e resultados dos testes de comparação de percentual para sítios anatômicos combinados e isolados

Variáveis	Grupos				p-valor
	CV		LVP		
	n	%	n	%	
Sítio anatômico (combinações)					
Fundo de sulco	0	0,0	1	2,6	0,741
Gengiva	0	0,0	2	5,1	0,791
Lábio	2	10,0	1	2,6	0,550
Língua	4	20,0	3	7,7	0,338
Mucosa Jugal	3	15,0	10	25,6	0,550
Orofaringe	1	5,0	0	0,0	0,732
Palato	2	10,0	2	5,1	0,871
Rebordo Alveolar	3	15,0	10	25,6	0,550
Retrocomissura	1	5,0	0	0,0	0,732
Trígono retromolar	0	0,0	2	5,1	0,791
Rebordo Alveolar / Mucosa Jugal	0	0,0	3	7,7	0,517
Rebordo Alveolar / Fundo de sulco	1	5,0	1	2,6	0,782
Rebordo Alveolar / Soalho	1	5,0	0	0,0	0,732
Sem informação	2	10,0	4	10,3	0,676
Sítio anatômico (isolados)					
Fundo de sulco	1	5,0	2	5,1	0,542
Gengiva	0	0,0	2	5,1	0,791
Lábio	2	10,0	1	2,6	0,550
Língua	4	20,0	3	7,7	0,338
Mucosa Jugal	3	15,0	13	33,3	0,235
Orofaringe	1	5,0	0	0,0	0,732
Palato	2	10,0	2	5,1	0,871
Rebordo Alveolar	5	25,0	14	35,9	0,580
Retrocomissura	1	5,0	0	0,0	0,732
Trígono retromolar	0	0,0	2	5,1	0,791
Soalho	1	5,0	0	0,0	0,732
Sem informação	2	10,0	4	10,3	0,676
Total	20	100,0	39	100,0	-

Para os resultados morfológicos (Tabelas 5.4, 5.5, 5.6, 5.7), foi encontrada diferença estatisticamente significativa nas variáveis “projeções em gota” (Tabela 5.5) e “interface epitélio-conjuntiva em dobras” (Tabela 5.7). Projeções em gota: pode-se dizer que, para o resultado “Positivo” o maior percentual está no grupo LVP, já para os “Negativos” o maior percentual está para o grupo CV. Interface epitélio-conjuntiva em dobras: pode-se dizer que, para o resultado “Positivo” o maior percentual está no grupo CV.

Tabela 5.4 - Caracterização da amostra segundo grupos e resultados dos testes de comparação de percentual para tampão de queratina, orto/paraqueratina, hipergranulose e papilomatose

Variáveis	Grupos				p-valor
	CV		LVP		
	n	%	N	%	
Tampão de queratina					
Positivo	16	80,0	22	56,4	0,132
Negativo	4	20,0	17	43,6	0,132
Orto/paraqueratina					
Paraqueratina	18	90,0	25	64,1	0,071
Ortoqueratina	0	0,0	6	15,4	0,162
Ambos	2	10,0	7	17,9	0,677
Sem informação	0	0,0	1	2,6	-
Hipergranulose					
Positivo	6	30,0	18	46,2	0,358
Negativo	14	70,0	20	51,3	0,272
Sem informação	-	-	1	2,6	-
Papilomatose					
Positivo	20	100,0	35	89,7	0,347
Negativo	0	0,0	3	7,7	0,517
Sem informação	0	0,0	1	2,6	-
Total	20	100,0	39	100,0	-

Tabela 5.5 - Caracterização da amostra segundo grupos e resultados dos testes de comparação de percentual para projeções em gota, estratificação epitelial irregular, inversão de polaridade, aumento do número de mitoses, mitoses em camadas altas do epitélio, disqueratose e pérolas córneas

Variáveis	Grupos				p-valor
	CV		LVP		
	N	%	n	%	
Projeções em gota					
Positivo	3	15,0	22	56,4	0,006
Negativo	17	85,0	16	41,0	0,003
Sem informação	0	0,0	1	2,6	-
Estratificação epitelial irregular					
Positivo	5	25,0	13	33,3	0,721
Negativo	15	75,0	25	64,1	0,580
Sem informação	0	0,0	1	2,6	-
Inversão de polaridade					
Positivo	11	55,0	19	48,7	0,855
Negativo	9	45,0	19	48,7	0,995
Sem informação	0	0,0	1	2,6	-
Aumento no número de mitoses					
Positivo	19	95,0	29	74,4	0,116
Negativo	1	5,0	9	23,1	0,165
Sem informação	0	0,0	1	2,6	-
Mitoses em camadas altas do epitélio					
Positivo	11	55,0	26	66,7	0,552
Negativo	9	45,0	12	30,8	0,429
Sem informação	0	0,0	1	2,6	-
Disqueratose					
Positivo	17	85,0	35	89,7	0,918
Negativo	3	15,0	3	7,7	0,672
Sem informação	0	0,0	1	2,6	-
Pérolas córneas					
Positivo	9	45,0	19	48,7	0,995
Negativo	11	55,0	19	48,7	0,855
Sem informação	0	0,0	1	2,6	-
Total	20	100,0	39	100,0	-

Tabela 5.6 - Caracterização da amostra segundo grupos e resultados dos testes de comparação de percentual para aumento do tamanho dos núcleos, variação do tamanho no núcleo, variação no tamanho da célula, pleomorfismo nuclear, pleomorfismo celular, proporção núcleo/citoplasma aumentada, aumento no tamanho e número dos nucléolos

Variáveis	Grupos				p-valor
	CV		LVP		
	N	%	N	%	
Aumento do tamanho dos núcleos					
Positivo	10	50,0	15	38,5	0,570
Negativo	10	50,0	23	59,0	0,702
Sem informação	0	0,0	1	2,6	-
Variação tamanho núcleo					
Positivo	17	85,0	27	69,2	0,316
Negativo	3	15,0	11	28,2	0,421
Sem informação	0	0,0	1	2,6	-
Variação tamanho célula					
Positivo	17	85,0	27	69,2	0,316
Negativo	3	15,0	11	28,2	0,421
Sem informação	0	0,0	1	2,6	-
Pleomorfismo nuclear					
Positivo	20	100,0	34	87,2	0,239
Negativo	0	0,0	4	10,3	0,347
Sem informação	0	0,0	1	2,6	-
Pleomorfismo celular					
Positivo	20	100,0	34	87,2	0,239
Negativo	0	0,0	4	10,3	0,347
Sem informação	0	0,0	1	2,6	-
Proporção núcleo/citoplasma aumentada					
Positivo	17	85,0	23	59,0	0,084
Negativo	3	15,0	15	38,5	0,120
Sem informação	0	0,0	1	2,6	-
Aumento no tamanho e número de nucléolos					
Positivo	17	85,0	35	89,7	0,918
Negativo	3	15,0	3	7,7	0,672
Sem informação	0	0,0	1	2,6	-
Total	20	100,0	39	100,0	-

Tabela 5.7 - Caracterização da amostra segundo grupos e resultados dos testes de comparação de percentual para hipercromatismo nuclear, exocitose, grau de exocitose, edema perinuclear, interface epitélio-conjuntiva em dobras, infiltrado inflamatório mononuclear e infiltrado inflamatório polimorfonuclear

Variáveis	Grupos				p-valor
	CV		LVP		
	n	%	N	%	
Hipercromatismo nuclear					
Positivo	13	65,0	22	56,4	0,721
Negativo	7	35,0	16	41,0	0,869
Sem informação	0	0,0	1	2,6	-
Exocitose					
Mononuclear	6	30,0	19	48,7	0,272
Ambos	14	70,0	16	41,0	0,067
Sem informação	0	0,0	4	10,3	-
Grau da exocitose					
Grau 1	7	35,0	21	53,8	0,274
Grau 2	8	40,0	10	25,6	0,411
Grau 3	4	20,0	5	12,8	0,730
Sem informação	1	5,0	3	7,7	-
Edema perinuclear					
Positivo	10	50,0	18	46,2	0,999
Negativo	10	50,0	20	51,3	0,857
Sem informação	0	0,0	1	2,6	-
Interface epitélio-conjuntiva em dobras					
Positivo	20	100,0	29	74,4	0,034
Negativo	0	0,0	9	23,1	0,051
Sem informação	0	0,0	1	2,6	-
Infiltrado infl. Mononuclear					
Positivo	20	100,0	38	97,4	0,741
Negativo	0	0,0	0	0,0	-
Sem informação	0	0,0	1	2,6	-
Infiltrado infl. Polimorfonuclear					
Positivo	9	45,0	12	30,8	0,429
Negativo	11	55,0	26	66,7	0,552
Sem informação	0	0,0	1	2,6	-
Total	20	100,0	39	100,0	-

Para a classificação em padrões dos resultados imuno-histoquímicos do Ki67, foi encontrada diferença estatisticamente significativa somente no “escore 0” (<5% no total de células positivas), neste caso há um maior percentual de “escore 0” no grupo LVP (Tabela 5.8).

Tabela 5.8 - Caracterização da amostra segundo grupos e resultados dos testes de comparação de percentual para os padrões imuno-histoquímicos

Variáveis	Grupos				p-valor
	CV		LVP		
	n	%	N	%	
Escore					
Escore 0	1	5,0	13	33,3	0,036
Escore 1	10	50,0	18	46,2	0,999
Escore 2	5	25,0	4	10,3	0,270
Escore 3	3	15,0	0	0,0	0,063
Sem informação	1	5,0	4	10,3	-
Total	20	100,0	39	100,0	-

6 DISCUSSÃO

A leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP) é uma lesão displásica que se caracteriza por seu acometimento multifocal, perfil progressivo, grande potencial de recidiva e alto risco de transformação maligna (1-8). Devido a este perfil, pacientes diagnosticados com LVP comumente apresentam mais de um registro de biópsia, o que é o caso dos pacientes inseridos na casuística do presente estudo, para os quais a proporção biópsia/paciente foi de 24/39 (Gráfico 5.1). Ocorre que, no momento do procedimento cirúrgico, as amostras histopatológicas podem ser coletadas a partir de pontos diferentes de uma mesma lesão que venha a acometer extensamente a mucosa oral, a fim de se verificar a ocorrência de invasão e malignidade. O mesmo acontece em casos de acometimento bilateral ou mediante comprometimento de diferentes sítios anatômicos no momento da biópsia. Outra situação que explica esta proporção biópsia/paciente é a recorrência da lesão em um sítio anatômico previamente submetido à excisão cirúrgica ou o surgimento de novos focos displásicos, ocorrência esta inerente ao comportamento clínico-histopatológico progressivo da LVP, o que não podemos observar no grupo do carcinoma verrucoso (CV), para o qual a proporção biópsia/paciente foi de 1/1, concordando com estudos que mostraram este baixo índice de recidiva para o CV (36, 41).

Para os pacientes inseridos em nossa casuística, foi verificada a existência de outros registros de biópsia a fim de se traçar um perfil percentual considerando a somatória de diagnósticos registrados no Serviço de Patologia Cirúrgica da Universidade de São Paulo (FOUSP). Dentro deste contexto, 29% da totalidade de pacientes inseridos no presente estudo, obtiveram diagnóstico unicamente de LVP e 26% de CV. Dezesete por cento dos pacientes apresentaram diagnósticos de LVP e outros (entenda-se hiperqueratose, acantose e diferentes graus de displasia epitelial). Da mesma forma, foram 17% os pacientes que mostraram diagnóstico de CV e outros. Diagnósticos de LVP, CV e outros ocorreram em 2% dos casos. Também 2% foram os casos de LVP, CV, carcinoma epidermoide (CEC) e outros. Foram 7% os pacientes acometidos por LVP e CEC. Quando consideramos a ocorrência de uma neoplasia maligna invasiva, o CEC, os números mostram que

este mais se relaciona à LVP, uma vez que, além de aparecer em 7% dos casos que apresentaram apenas LVP além do próprio CEC, a mesma neoplasia se mostra presente em 2% dos casos que envolveram LVP, CV e outros. Ou seja, esta proximidade ocorreu apenas em casos que envolviam, invariavelmente, o diagnóstico de LVP, não se relacionando, no entanto ao CV, com o qual se mostrou associado apenas nos 2% que também continham diagnóstico de LVP (Gráfico 5.2). Entendemos, para tanto, que este resultado corrobora com estudos anteriores ressaltando o grande potencial de transformação maligna inerente à LVP (2, 5-7) com sua maior tendência voltada para o CEC (10, 11, 13), destoando, no entanto, de estudos que propuseram gradações para a LVP e, para os quais a lesão evoluiria antes para o CV só então passando a apresentar áreas de invasão características do CEC (1, 15).

Concordando com a literatura, os resultados do presente trabalho indicaram maior acometimento do sexo feminino pela LVP (1-3, 8-11) com a totalidade dos casos registrados em mulheres, incluindo ainda as duas pacientes que apresentaram LVP e CV (Gráfico 5.3). No grupo do CV, a proporção homem/mulher foi de 1/4, revelando uma diferença estatisticamente significativa para o acometimento no qual se faz mais prevalente o sexo feminino para a LVP e o sexo masculino para o CV ($p=0,034$). Ainda assim, em nossos resultados o número de mulheres foi maior que o número de homens diagnosticados com CV, destoando da literatura no aspecto em que esta patologia se mostra mais prevalente em homens. Esta prevalência se justificaria no maior índice de tabagistas entre os homens, porém esta realidade vem sendo alterada nas últimas décadas com um crescente número de mulheres inseridas neste grupo, considerando ainda que parte dos pacientes do sexo feminino diagnosticados com CV em nosso estudo integrou os grupos de “tabagista” e “ex-tabagista”.

Para pacientes com LVP, a média de idade foi de 75,6 anos (Gráfico 5.4), se aproximando dos resultados na literatura que obtiveram resultados próximos à sétima década de vida (10, 11), enquanto na literatura a média de idade mais prevalente girou em torno da sexta década de vida (1-3, 9, 12). No grupo do CV a média de idade ficou em 66,9 anos concordando com a literatura na qual a idade dos pacientes está acima da sexta década de vida podendo girar em torno da sétima década (2, 35, 36, 44, 45).

Os sítios anatômicos mais acometidos pela LVP foram rebordo alveolar e mucosa jugal, diferindo significativamente em prevalência de todos os outros sítios contabilizados para esta lesão, dentre eles língua, gengiva, palato, trígono retromolar, e lábio, com semelhante distribuição entre estes (Gráfico 5.5 e 5.6) Tais resultados concordam com estudos que mostraram grande prevalência no acometimento de rebordo alveolar (4, 11) seguido por mucosa jugal (10), discordando, no entanto, das pesquisas em cujos sítios anatômicos mais acometidos pela LVP esteve a mucosa gengival (4, 6, 7, 10). Também o acometimento multifocal foi constatado em casos que apresentaram lesões abrangendo mais de um sítio anatômico no momento da biópsia (Gráfico 5.7) ou biópsias com registros distintos designando uma mesma região anatômica. Além do envolvimento de áreas distintas da mucosa no momento da biópsia, verificado pela denominação de mais de um sítio anatômico por ficha, sendo estas de mesma região anatômica ou não, os pacientes acometidos pela LVP também apresentaram dois ou mais registros de biópsia oriundos de um mesmo sítio anatômico, como mencionado anteriormente, podendo decorrer de acometimento bilateral, envolvimento extenso, recorrência da lesão em áreas previamente tratadas ou ocorrência de novos focos displásicos em uma mesma região anatômica (Gráfico 5.8). Estes resultados acompanham a literatura que aponta para um alto índice de recidiva e acometimento multifocal (1-8).

Já no grupo do CV, os sítios anatômicos acometidos não apresentaram diferenças significativas entre si quanto à prevalência. Em ordem decrescente, o sítio anatômico mais acometido foi rebordo alveolar, assim como na LVP, seguido por língua e mucosa jugal, com menor envolvimento de lábio e palato. Também ocorreu em retrocomissura, fundo de sulco, soalho de boca e orofaringe (Gráfico 5.5 e 5.6), mostrando diferença quanto aos índices de prevalência para os sítios anatômicos apontados pela literatura, nos quais se faz mais incidente a ocorrência em mucosa jugal seguida por rebordo alveolar mandibular e gengiva (2, 34, 39, 43-46). Assim como nos casos de LVP, para o CV também ocorreu envolvimento de mais de um sítio anatômico no momento da biópsia. Um dos pacientes apresentou lesão abrangendo rebordo alveolar e fundo de sulco e, outro paciente, apresentou lesão em rebordo alveolar e soalho de boca (Gráfico 5.7), o que poderia indicar, ainda que em menor número, a ocorrência de acometimento multifocal, o que não é

comum para o CV (2), ou se justificaria por tratar-se de lesões extensas, passíveis do CV (2, 36).

A maior parte dos pacientes diagnosticados tanto com LVP como CV apresentavam cor da pele branca (Gráfico 5.9). Quanto aos pacientes tidos como cor de pele negra, ainda que minoria, fica em aberto se esses pacientes eram de fato negros ou pardos, uma vez que, nos campos a serem preenchidos pelo clínico responsável, as opções limitam-se a cor branca, negra e amarela. Para esta última, uma única paciente do grupo LVP foi assim denominada amarela. Este parâmetro pode implicar minimamente no traçar de perfil das lesões estudadas, ficando susceptível à cor de pele predominante à região geográfica na qual se efetuam os atendimentos aos pacientes e a pesquisa em si.

Associação das lesões estudadas ao tabagismo é de suma importância, posto que, sua não correlação ao surgimento, evolução e recidiva da LVP (3, 8, 10, 11) é um dos fatores que faz desta uma entidade clinico-patológica distinta das leucoplasias orais, estas, por sua vez, amplamente associadas ao tabaco. Por outro lado, sua correlação ao CV se justifica por ser o tabagismo considerado fator etiológico primário do mesmo (2, 34). No presente estudo, os pacientes não tabagistas constituíram a maioria em ambos os grupos LVP e CV (Gráfico 5.10), com os pacientes tabagistas compondo em menor número os grupos estudados. Ainda assim, o grupo CV apresentou maior número de pacientes tabagistas e ex-tabagistas quando comparado ao grupo LVP.

Ainda considerando hábitos dos pacientes diagnosticados com LVP e CV, o etilismo se mostrou pouco recorrente nos casos estudados (Gráfico 5.11). Nossos resultados corroboram com estudos que mostraram o etilismo não associado à LVP (8, 11), muito embora este campo seja ainda bastante negligenciado no preenchimento da ficha, somando considerável número de fichas com dados faltantes.

Quanto à sintomatologia, esta foi considerada para cada lesão biopsiada e não por paciente. A maior parte das lesões biopsiadas para LVP e CV eram assintomáticas, com um grande número de fichas também por preencher neste campo (Gráfico 5.12).

A avaliação pormenorizada dos aspectos morfológicos analisados individualmente nos cortes histológicos oriundos das amostras de LVP e CV, consistiu em um segmento de grande relevância na tentativa de se traçar um perfil histopatológico de maior incidência para cada lesão. Ainda que não seja a regra para todas as lesões de LVP ou todos os estágios de desenvolvimento do CV, a característica mais marcante de ambas as lesões é a alteração da conformação epitelial (Figura 5.27-A e 5.28-AB) que tende a se mostrar irregular com sinuosidades ou projeções no sentido da superfície podendo mostrar um aspecto verrucoso ou papilomatoso (1-3, 11, 14, 34-36, 38). Esta característica foi observada em 92% dos casos de LVP e em todos os casos de CV. Considerando ainda a alteração conformacional do epitélio comprometido, além de seu aspecto superficial, foi verificada a ocorrência de interface epitélio-conjuntiva em dobras, positiva para 76,3% dos casos de LVP e em 100% no grupo CV (Gráfico 5.13), dados esses com positividade estatisticamente significativa ($p = 0,034$) (Tabela 5.7), o que nos indica uma leve tendência da LVP a se mostrar menos verrucosa e com interface epitélio-conjuntiva mais linear quando comparado ao CV. Este, por sua vez, apresenta invasão por afastamento da membrana basal que se mantém intacta (2, 36), podendo o fato justificar suas proeminências rombas no sentido do conjuntivo adjacente. Nossas amostras de CV, por muitas vezes, exibiram tamanha alteração em sua conformação epitelial que, somada ao plano de corte, ao examinarmos as lâminas histológicas, pudemos observar uma massa de epitélio dobrada sobre si mesma assemelhando-se as circunvoluções com giros, sulcos e fissuras presentes no córtex cerebral humano. A superfície epitelial alterada, por sua vez, propicia a formação de estreitas fendas no sentido do tecido conjuntivo adjacente. Estas, podem se mostrar preenchidas por orto ou paraqueratina formando os tampões de queratina (Figura 5.28-B) que se fizeram mais presentes nos casos de CV (80%) que nos casos de LVP (57,8%)(Gráfico 5.15). Esta maior incidência dos tampões de queratina poderia justificar-se pela maior prevalência de alteração na conformação epitelial dos CVs.

Camada córnea do epitélio de revestimento foi analisada a fim de se verificar a ocorrência de hiperpara e hiperortoqueratina. A presença de núcleos basofílicos, picnóticos de morfologia achatada por entre as lâminas de queratina em camadas altas do epitélio de revestimento, permitiu identificar a paraqueratina que, por sua

vez, se fez mais prevalente tanto nos cortes de LVP como de CV (Gráfico 5.14), quando comparada à prevalência da hiperortoqueratina. O que poderia ser justificado considerando a maturação dos queratinócitos. O referido processo, consiste na desidratação e acúmulo de tonofilamentos de queratina no interior dessas células à medida que estas tornam-se gradualmente superficiais (91). A ruptura no processo normal de maturação celular que, uma vez alterado ou acelerado, levaria a deposição de tonofilamentos de queratina no interior dos queratinócitos com velocidade tal que mantivesse os núcleos aprisionados na camada córnea. Por outro lado, a ocorrência de hiperortoqueratina, que é a queratinização completa da célula (91), ocorreu isoladamente em uma pequena porção das LVPs e os cortes que apresentaram hiperpara e hiperortoqueratina associadas, constituíram a minoria tanto para LVPs como para CVs.

Entre as camadas córnea e espinhosa do epitélio de revestimento, situa-se a camada granulosa que pode ou não evidenciar os grânulos compostos por queratohialina e pela proteína filagrina. Este conteúdo quando liberado, passa a atuar como impermeabilizante, permanecendo visível no espaço intercelular das camadas altas (91). A esta conjuntura, denominamos hipergranulose (Figura 5.27-B). Em nossos resultados, a ocorrência desta se mostrou relativamente baixa para CVs (30%), sucedendo em quase metade das LVPs (47,3%) (Gráfico 5.16). A camada granulosa, apesar de presente nos epitélios não completamente queratinizados, melhor se evidencia mediante queratinização completa das células superficiais, ou seja, na presença da ortoqueratina (91), o que explica sua incidência não significativa nas lesões examinadas de ambos os grupos, principalmente considerando que sua menor prevalência nos casos de CV corre em paralelo à, também baixa, incidência da hiperortoqueratina nestes casos, como discutido anteriormente.

O epitélio de mucosa oral subdivide-se nas camadas córnea, granulosa, espinhosa e basal, partindo do estrato mais superficial no sentido do tecido conjuntivo. Cada camada, por sua vez, caracteriza-se pelo tipo celular que a forma. Os queratinócitos adquirem características morfológicas que se distinguem entre as camadas a medida que estes passam pelo processo de maturação partindo da camada basal até sua completa esfoliação pelo estrato córneo. Esta variação morfológica, além da localização, nos permite individualizar cada camada. Ao

observarmos a porção germinativa do epitélio, a camada basal, o que vemos é uma faixa de células cuboidais de núcleos esféricos. Adjacente às camadas basal e parabasal, segue-se uma ampla faixa de células poliédricas caracterizadas pelas pontes intercelulares, os desmossos, que se evidenciam após a retração celular sofrida mediante processamento do tecido. Por fim, as camadas já mencionadas anteriormente, camada granulosa e córnea (91, 92). Uma vez que os componentes celulares característicos de um determinado extrato do epitélio se mostrem presentes em áreas atípicas, a este evento chamamos estratificação epitelial irregular, que, por sua vez, consiste em uma das atipias arquiteturais utilizadas no diagnóstico da displasia epitelial, de acordo com a OMS, 2005 (2). Em nossos casos, a prevalência desta alteração foi relativamente baixa, com 34,2% das LVPs e 25,0% dos CVs (Gráfico 5.17).

A camada basal do epitélio, mencionada anteriormente, associa-se à lâmina basal que interage e justapõe-se entre os tecidos epitelial e conjuntivo. Dentre as funções provenientes da lâmina basal, está a regulação da proliferação e diferenciação celular influenciando na polaridade das células componentes da camada basal (92). Ou seja, quando observamos uma perda de polaridade nos queratinócitos basais, em cujos núcleos passam a voltar-se para o sentido oposto à membrana basal, podemos intuir que tal alteração está levando essas células à franca atividade, sob à regulação da lâmina basal, indicando possíveis eventos de proliferação celular. Este fenômeno, também inserido na lista de atipias que caracterizam as displasias epiteliais pela OMS (2), está presente em, aproximadamente, metade dos nossos casos de LVP e CV (Gráfico 5.18).

Outra alteração arquitetural que se insere nos critérios utilizados para diagnóstico das displasias epiteliais, é a projeção em gota (2) morfológicamente caracterizada por projeção epitelial no sentido do tecido conjuntivo apresentando base ampla, por vezes ovalada, mostrando estreitamento em sua junção ao epitélio restante. Esta atipia mostrou maior prevalência em casos de LVP (57,8%) que em casos de CV (15,0%) (Gráfico 5.19), apontando, para tanto, diferença estatisticamente significativa entre LVP e CV para os resultados positivos do critério analisado ($p = 0,006$), assim como para os resultados negativos ($p = 0,003$) (Tabela 5.5). Os referidos resultados corroboram com o perfil mais agressivo da LVP e seu alto risco de transformação maligna (2, 5-7) uma vez que comprovam a ocorrência

de um critério displásico, condição esta indicativa de alterações celulares, subcelulares e genéticas predisponentes ao processo de malignização. No entanto, apesar de ser esta uma condição que nos coloca em alerta para o comportamento clínico-histopatológico da lesão, é necessário ainda que sejam somadas outras alterações arquiteturais e celulares para se dimensionar o comprometimento epitelial como um todo.

Aumento do número de mitoses e mitoses em camadas altas do epitélio (Figura 5.27-DEF e 5.28-C), também listadas como atipias arquiteturais (2), aponta para uma perfil francamente proliferativo. O aumento do número de mitoses é constatado pela ocorrência em camadas não germinativas, ou seja, acima das camadas basal e parabasal mas ainda no primeiro terço inferior do epitélio. Nossos resultados apontaram para um comportamento mais proliferativo dos CVs que mostraram aumento no número de mitoses em 95% das amostras contra 76,3% das LVPs. No entanto, quanto mais o queratinócito se aproxima das camadas altas do epitélio, afastando-se da zona germinativa, mais inusitada se torna a ocorrência de mitose. As mitoses em camadas altas, identificadas nos dois terços superiores do epitélio, mostraram leve predominância nas LVPs com 68,4% dos casos quando comparado aos CVs com 55,% dos casos (Gráfico 5.20).

Os queratinócitos presentes em camadas não córneas, podem também passar por um processo de queratinização prematura individual caracterizando o processo denominado disqueratose, que se destaca por seu aspecto eosinofílico destoante das células adjacentes (Figura 5.27-C). A disqueratose se mostrou bastante prevalente em nossas amostras de LVP (92,1%) e CV (85%). A ocorrência desta queratinização prematura quando em grupos de células dispostas concêntricamente, vem a constituir o que chamamos pérolas córneas. Estas se mostraram presentes em aproximadamente metade de todas as nossas amostras (Gráfico 5.21). Tanto a disqueratose, como a pérola córnea, também foram previamente observadas em amostras de CV (36).

Assim como foi discorrido anteriormente sobre atipias arquiteturais, as alterações que serão tratadas na sequência integram a lista da OMS no tocante às atipias citológicas que se somam às arquiteturais no diagnóstico das displasias epiteliais.

Dentre as alterações citológicas observadas no presente estudo, estão aquelas que envolvem o tamanho de estruturas celulares como o aumento do tamanho do núcleo, que não mostrou prevalência significativa para os dois grupos de lesões, nem tão pouco diferença considerável entre ambos. A proporção núcleo/citoplasma, em cujo citoplasma se faz proporcionalmente menor que o núcleo ou este maior, foi mais prevalente em nossas amostras que o critério anterior, mostrando maior incidência nos CVs com 85% contra 60,5% das LVPs. A variação do tamanho do núcleo, assim como a variação do tamanho da célula, quebrando a homogeneidade entre células de uma mesma camada epitelial se mostrou prevalente para os grupos LVP (71%) e CV (85%), com maior enfoque para este último (Gráfico 5.22). O aumento do tamanho e número de nucléolos (Figura 5.27-D e 5.28-C), que se correlaciona ao ciclo de proliferação celular, foi bastante prevalente tanto nos CVs (85,0%), como nas LVPs (92,1%), com maior incidência para estas (Gráfico 5.23).

Além das atipias que envolvem o tamanho de componentes celulares, foram analisadas as alterações que comprometem a morfologia celular. Atipia na forma do núcleo, ou pleomorfismo nuclear, e atipia na forma da célula, pleomorfismo celular (Figura 5.27-D e 5.28-C), ocorreram em todos os casos de CV e em 89,4% dos casos de LVP.

Finalizando os critérios de diagnóstico displásico da OMS, também verificamos a ocorrência do hiperchromatismo nuclear, já observada em LVPs de intensidade leve nas células basais e parabasais (13). Hiperchromatismo é ocasionado por maior adensamento do material genético levando a uma marcante basofilia nuclear que foi encontrada em 57,8% das LVPs e em 65,0% dos CVs, sempre considerando, para nossas amostras, a ocorrência em camadas acima dos estratos basais e parabasais, uma vez que estes tendem a se mostrar normalmente hiperchromáticos por seu perfil germinativo (Gráfico 5.23) mostrando pouca diferença entre os grupos de lesões.

Considerando todas as atipias citológicas mencionadas anteriormente, notamos que, de maneira geral, estas se mostraram significativamente prevalentes, ainda que, em alguns casos iniciais de LVP, as alterações presentes limitem-se aos níveis moleculares subcelulares não podendo ser identificados clínica ou

microscopicamente (3). Esta prevalência vem a destoar da literatura em cujo enfoque consiste no aspecto neoplásico bem diferenciado dos CVs, concordando, por outro lado, com a maior incidência das referidas atipias às camadas mais baixas do epitélio (2, 34-36, 38).

Inserimos também o critério intitulado “edema perinuclear” ao presente estudo por conta da observação de células na camada espinhosa alta e/ou granulosa apresentando núcleo envolto por halo esbranquiçado, lembrando morfológicamente os coilócitos presentes em lesões relacionadas ao HPV e diferindo, entretanto, de queratinócitos com aspecto de normalidade ou em apoptose, também de células inflamatórias ou outros tipo celulares normalmente presentes no epitélio mesmo que em condições inflamatórias. Considerando esta observação, cabe mencionar um estudo realizado em amostras de CV no qual se afirmou a ocorrência de células compatíveis com coilócitos se valendo apenas do aspecto morfológico das células em amostras de tecido neoplásico coradas em H&E (36). Apesar do termo “edema”, por assim se assemelhar morfológicamente, ainda desconhecemos a natureza desta célula, utilizando, para tanto, tal denominação apenas com o intuito de nomear e assim identificar e quantificar esta ocorrência. Estas células foram observadas em aproximadamente metade de todas as nossas amostras considerando os dois grupos, LVP e CV, não permitindo, para tanto, correlacionar esta ocorrência a uma ou outra lesão com finalidades diagnósticas (Gráfico 5.24).

A exocitose, evento no qual se observam células inflamatórias no interior do epitélio, também foi verificada em nossas amostras, considerando separadamente células mononucleares ou crônicas e células polimorfonucleares ou agudas, a fim de se correlacionar esta ocorrência às alterações epiteliais como um todo, uma vez que a inflamação epitelial, quando intensa e somada a um infiltrado inflamatório proeminente, leva a uma significativa perda das características teciduais. Em nossos resultados, a exocitose por mononucleares ocorreu em todos os casos de LVP e CV. Já a exocitose por polimorfonucleares, já observada em amostras de LVP (13) e em amostras de CV (2, 34, 38) em estudos prévios, se fez mais presente nos CVs, com 70% dos casos, contra 47% das LVPs. Ou seja, apenas 30% dos casos de CV não mostrou presença de polimorfonucleares.

A intensidade desta inflamação epitelial também foi graduada, de maneira crescente, em 1, 2 e 3. A maior parte dos casos de LVP com exocitose apenas por mononucleares, apresentou exocitose grau 1 (84,2%), ficando o restante desses casos classificados como grau 2. Da mesma forma, a pequena parte de CVs que apresentou apenas mononucleares, teve sua maioria classificada em grau 1 (83,3%) e o restante grau 2. A intensidade grau 3 de inflamação não ocorreu em nenhum dos casos de LVP e CV em cuja exocitose consistia apenas em mononucleares. Por outro lado, a maior intensidade de exocitose mostrou correlação à presença de polimorfonucleares, uma vez que, para estes casos, os graus 2 e 3 passaram a apresentar maior significância, equiparando-se ao grau 1, como observamos nos casos de LVP, nos quais 31,2% foram classificados como grau 1, 37,5% como grau 2 e 31,2% como grau 3. Da mesma forma nos casos de CV com 15,3% em grau 1, 53,8% grau 2 e 30,7% grau 3, mostrando ainda menor parte inserida em grau 1 (Tabela 5.1).

Como mencionado anteriormente, o tecido inflamado tende a perder suas características, para tanto, baseado em nossos resultados, poderíamos estabelecer uma correlação entre exocitose por polimorfonucleares, maior intensidade desta inflamação epitelial e maior evidenciação de alterações na conformação epitelial em amostras de CV.

Para somar aos resultados anteriores, a presença de infiltrado inflamatório mononuclear e polimorfonuclear, que pode se mostrar intenso nas adjacências de LVPs e CVs (2, 13, 34, 38) também foi verificada em nossas amostras examinando o tecido conjuntivo das lesões estudadas, o que nos mostrou a ocorrência de infiltrado inflamatório mononuclear em todas as amostras de LVP e CV. Já o infiltrado inflamatório polimorfonuclear, se mostrou menos prevalente, não chegando à metade dos casos de LVP (31,5%) e CV (45,%), mas ainda se mostrando mais vinculado ao CV, como ocorreu na exocitose (Gráfico 5.25).

Apesar da grande importância consistente nos aspectos morfológicos histopatológicos no entendimento das lesões estudadas, os aspectos moleculares vem a embasar a dinâmica do desenvolvimento e curso clínico, permitindo que sejam estabelecidas relevantes correlações para uma apreensão melhor embasada de cada patologia. Isso posto, seguimos com os procedimentos imuno-histoquímicos

para averiguar a expressão do marcador de proliferação celular Ki67 através do estabelecimento de padrões de marcação. Estes padrões partiram do 0 ao 3, de maneira crescente, considerando, para esta graduação, o número de células positivas para um mínimo de 500 células contadas. A positividade imuno-histoquímica apontou diferença estatisticamente significativa para o escore 0 (menos que 5% no total de células positivas). Neste, ocorreu um maior percentual para grupo LVP ($p = 0,036$) quando comparado ao CV (Tabela 5.8). Entretanto, no escore 1 (positividade entre 5 e 25% das células), observamos uma clara semelhança de marcação para os dois grupos. Inseridos no escore 2 (positividade entre 26 e 50%), os CVs mostraram maior incidência que as LVPs. Por fim, o escore 3 (mais de 50% de células positivas) foram 15,78% dos casos de CV e nenhum caso de LVP. De uma maneira geral, considerando esta graduação para marcação imuno-histoquímica, notamos que as LVPs tendem a se aproximar mais do escore 0 de marcação ao passo que os CVs mais se aproximam do escore 3, ainda que ambos se façam mais incidentes no escore 1 de marcação (Gráfico 5.26).

Apesar da marcação muitas vezes observada em camadas altas do epitélio, a expressão do Ki67 em nossas amostras de LVP e CV apontaram maior prevalência de indício proliferativo nos extratos germinativos epiteliais, camadas basal e parabasal, resultados estes concordantes de estudos anteriores em casos de LVP (8, 11, 13) e CV (36, 51, 54).

Ainda continuando na análise das lâminas coradas, como mencionado nos resultados do presente trabalho, pudemos notar que, embora algumas lâminas apresentassem escore 0 de marcação, nas poucas células coradas para este mesmo escore, a fase M do ciclo celular se destacava evidenciando as fases de prófase, metáfase, anáfase e telófase (Figura 5.27-EF). Ou seja, ainda que este marcador se faça presente em todas as fases do ciclo celular, com exceção da quiescência, sua marcação pode se fazer mais evidente na fase M do ciclo celular, auxiliando na identificação de mitoses em células epiteliais. Resultado este que corrobora com os altos índices de marcação do Ki67 anteriormente observados em células mitóticas de outro estudo (75). Nossos resultados podem indicar também um padrão de marcação do Ki67 de modo comparativo para os grupos de lesões estudadas, uma vez que esta marcação se faz escassa, porém marcante, em células mitóticas quando em cortes de LVP. Por outro lado, esta marcação se

mostra, mais prevalente nas células neoplásicas do CV, fato este constatado pelo grande número de células marcadas nas camadas germinativas, por vezes acima destas, evidenciando com menor frequência células mitóticas (Figura 5.28-DE).

7 CONCLUSÕES

Os resultados do presente trabalho permitem concluir, dentro dos dados epidemiológicos, que pacientes acometidos pela leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP) apresentam maior susceptibilidade a passar por mais de um processo cirúrgico com finalidade diagnóstica. Este mesmo grupo também mostra maior correlação ao carcinoma epidermoide, quando comparado ao grupo do carcinoma verrucoso (CV). Os resultados epidemiológicos apontaram também maior prevalência do sexo feminino para LVP. Todavia, apesar das mulheres também integraram em maior número o grupo do CV, neste conjunto ainda se inserem maior número de homens quando comparado à LVP. Considerando o sítio anatômico mais acometido pela LVP e CV, a mucosa oriunda do rebordo alveolar se fez mais presente para ambos, assim como o perfil assintomático dessas lesões. A maior parte dos pacientes acometidos por LVP ou CV, não apresentam hábitos tabagistas. Ainda assim, quando ocorre, sua prevalência ainda se faz maior no grupo CV. Considerando ainda os hábitos dos pacientes acometidos por LVP e CV, o etilismo se mostra irrisório para ambas as patologias.

Critérios histopatológicos identificados e quantificados nos permitiram concluir que alterações na conformação epitelial, caracterizadas por marcante sinuosidade em projeções superficiais e no sentido do conjuntivo adjacente, apresentam maior correlação ao CV. Da mesma forma, e conseqüentemente, a presença de tampão de queratina obliterando fendas epiteliais ocorre em maior número neste grupo. Ainda na análise da camada córnea, observamos que a hiperparaqueratina apresenta maior ocorrência que hiperortoqueratina para os casos de LVP e CV. Na outra extremidade epitelial, a atipia arquitetural denominada projeção em gota, se faz significativamente mais prevalente em amostras de LVP quando comparado ao CV. Analisando ainda o epitélio em sua integridade, concluímos que o aumento no número de mitoses é mais observado em casos de CV, no entanto, mitoses em camadas altas ocorrem com maior freqüência em casos de LVP apontando para seu perfil de curso agressivo. Alteração no processo de maturação celular, disqueratose se faz consideravelmente prevalente para casos de LVP e CV, ao passo que a formação de pérolas córneas pode ocorrer em aproximadamente metade dos casos.

Proporção núcleo-citoplasma aumentada, variação do tamanho nuclear e celular e aumento no tamanho do núcleo são mais prevalentes em casos de CV, ao passo que alterações de forma, pleomorfismo nuclear e celular, são freqüentes tanto em casos de LVP como CV. A análise do processo de inflamação mostrou que a exocitose de maior intensidade por polimorfonucleares relaciona-se mais aos casos de CV que LVP enquanto o infiltrado inflamatório mononuclear se mostra impreterivelmente presente nas amostras de ambos os grupos.

Por fim, nossos resultados imuno-histoquímicos permitem concluir que o marcador Ki67 pode auxiliar na diferenciação entre LVP e CV uma vez que, em amostras de LVP, o Ki67 caracteriza-se por marcação esparsa e, ao mesmo tempo, evidente em células mitóticas, destoando das reações em CV, que mostraram maior índice de células marcadas ainda que restringindo-se às camadas germinativas na maior parte dos casos.

REFERÊNCIAS¹

1. Hansen LS, Olson JA, Silverman S Jr. Proliferative verrucous leukoplakia. A long-term study of thirty patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1985 Sep;60(3):285-98.
2. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky E (Eds). World Health Organization Classification of Tumors. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. IARC Press: Lyon 2005.
3. Silverman S Jr, Gorsky M. Proliferative verrucous leukoplakia: a follow-up study of 54 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1997 Aug;84(2):154-7.
4. Zakrzewska JM, Lopes V, Speight P, Hopper C. Proliferative verrucous leukoplakia: a report of ten cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1996 Oct;82(4):396-401.
5. Bagan JV, Jiménez-Soriano Y, Diaz-Fernandez JM, Murillo-Cortés J, Sanchis-Bielsa JM, Poveda-Roda R, Bagan L. Malignant transformation of proliferative verrucous leukoplakia to oral squamous cell carcinoma: a series of 55 cases. *Oral Oncol*. 2011 Aug;47(8):732-5.
6. Klanrit P, Sperandio M, Brown AL, Shirlaw PJ, Challacombe SJ, Morgan PR, Odell EW. DNA ploidy in proliferative verrucous leukoplakia. *Oral Oncol*. 2007 Mar;43(3):310-6.
7. Gandolfo S, Castellani R, Pentenero M. Proliferative verrucous leukoplakia: a potentially malignant disorder involving periodontal sites. *J Periodontol*. 2009 Feb;80(2):274-81.
8. Gouvêa AF, Santos Silva AR, Speight PM, Hunter K, Carlos R, Vargas PA, de Almeida OP, Lopes MA. High incidence of DNA ploidy abnormalities and increased Mcm2 expression may predict malignant change in oral proliferative verrucous leukoplakia. *Histopathology*. 2013 Mar;62(4):551-62.

¹De acordo com Estilo Vancouver.

9. Cabay RJ, Morton TH Jr, Epstein JB. Proliferative verrucous leukoplakia and its progression to oral carcinoma: a review of the literature. *J Oral Pathol Med.* 2007 May;36(5):255-61.
10. Bagan JV, Jimenez Y, Sanchis JM, Poveda R, Milian MA, Murillo J, Scully C. Proliferative verrucous leukoplakia: high incidence of gingival squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2003 Aug;32(7):379-82.
11. Gouvêa AF, Vargas PA, Coletta RD, Jorge J, Lopes MA. Clinicopathological features and immunohistochemical expression of p53, Ki-67, Mcm-2 and Mcm-5 in proliferative verrucous leukoplakia. *J Oral Pathol Med.* 2010 Jul;39(6):447-52.
12. Ghazali N, Bakri MM, Zain RB. Aggressive, multifocal oral verrucous leukoplakia: proliferative verrucous leukoplakia or not? *J Oral Pathol Med.* 2003 Aug;32(7):383-92.
13. Fettig A, Pogrel MA, Silverman S Jr, Bramanti TE, Da Costa M, Regezi JA. Proliferative verrucous leukoplakia of the gingiva. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2000 Dec;90(6):723-30.
14. van der Waal I, Reichart PA. Oral proliferative verrucous leukoplakia revisited. *Oral Oncol.* 2008 Aug;44(8):719-21.
15. Batsakis JG, Suarez P, el-Naggar AK. Proliferative verrucous leukoplakia and its related lesions. *Oral Oncol.* 1999 Jul;35(4):354-9.
16. Gopalakrishnan R, Weghorst CM, Lehman TA, Calvert RJ, Bijur G, Sabourin CL, Mallery SR, Schuller DE, Stoner GD. Mutated and wild-type p53 expression and HPV integration in proliferative verrucous leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1997 Apr;83(4):471-7.
17. Campisi G, Giovannelli L, Ammatuna P, Capra G, Colella G, Di Liberto C, Gandolfo S, Pentenero M, Carrozzo M, Serpico R, D'Angelo M. Proliferative verrucous vs conventional leukoplakia: no significantly increased risk of HPV infection. *Oral Oncol.* 2004 Sep;40(8):835-40.
18. Bagan JV, Jimenez Y, Murillo J, Gavalda C, Poveda R, Scully C, Alberola TM, Torres-Puente M, Pérez-Alonso M. Lack of association between proliferative verrucous leukoplakia and human papillomavirus infection. *J Oral Maxillofac Surg.* 2007 Jan;65(1):46-9.

19. Bagan JV, Jiménez Y, Murillo J, Poveda R, Díaz JM, Gavaldá C, Margaix M, Scully C, Alberola TM, Torres Puente M, Pérez Alonso M. Epstein-Barr virus in oral proliferative verrucous leukoplakia and squamous cell carcinoma: A preliminary study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2008 Feb 1;13(2):E110-3.
20. Kannan R, Bijur GN, Mallery SR, Beck FM, Sabourin CL, Jewell SD, Schuller DE, Stoner GD. Transforming growth factor-alpha overexpression in proliferative verrucous leukoplakia and oral squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1996 Jul;82(1):69-74.
21. Sakai E, Rikimaru K, Ueda M, Matsumoto Y, Ishii N, Enomoto S, Yamamoto H, Tsuchida N. The p53 tumor-suppressor gene and ras oncogene mutations in oral squamous-cell carcinoma. *Int J Cancer*. 1992 Dec 2;52(6):867-72.
22. Sakai E, Tsuchida N. Most human squamous cell carcinomas in the oral cavity contain mutated p53 tumor-suppressor genes. *Oncogene*. 1992 May;7(5):927-33.
23. Silva Júnior Jde A, Camisasca DR, Bernardo V, Ribeiro GS, Dias FL, de Faria PA, de Amorim LM, Lourenço SQ. The significance of p53 immunoexpression with different clones (DO-7 and PAb-240) in oral squamous cell carcinoma. *ORL J Otorhinolaryngol Relat Spec*. 2013;75(2):82-90.
24. Stephen CW, Lane DP. Mutant conformation of p53. Precise epitope mapping using a filamentous phage epitope library. *J Mol Biol*. 1992 Jun 5;225(3):577-83.
25. Kodani I, Osaki M, Shomori K, Araki K, Goto E, Ryoke K, Ito H. Minichromosome maintenance 2 expression is correlated with mode of invasion and prognosis in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med*. 2003 Sep;32(8):468-74.
26. Gonzalez MA, Tachibana KE, Laskey RA, Coleman N. Control of DNA replication and its potential clinical exploitation. *Nat Rev Cancer*. 2005 Feb;5(2):135-41.
27. Musahl C, Holthoff HP, Lesch R, Knippers R. Stability of the replicative Mcm3 protein in proliferating and differentiating human cells. *Exp Cell Res*. 1998 May 25;241(1):260-4.
28. Stoeber K, Tlsty TD, Happerfield L, Thomas GA, Romanov S, Bobrow L, Williams ED, Williams GH. DNA replication licensing and human cell proliferation. *J Cell Sci*. 2001 Jun;114(Pt 11):2027-41.

29. Madine MA, Swietlik M, Pelizon C, Romanowski P, Mills AD, Laskey RA. The roles of the MCM, ORC, and Cdc6 proteins in determining the replication competence of chromatin in quiescent cells. *J Struct Biol.* 2000 Apr;129(2-3):198-210.

30. Dimitrova DS, Prokhorova TA, Blow JJ, Todorov IT, Gilbert DM. Mammalian nuclei become licensed for DNA replication during late telophase. *J Cell Sci.* 2002 Jan 1;115(Pt 1):51-9.

31. Lameira AG, Pontes FS, Guimarães DM, Alves AC, de Jesus AS, Pontes HA, Pinto Ddos S Jr. MCM3 could be a better marker than Ki-67 for evaluation of dysplastic oral lesions: an immunohistochemical study. *J Oral Pathol Med.* 2014 Jul;43(6):427-34.

32. Cerero-Lapiedra R, Baladé-Martínez D, Moreno-López LA, Esparza-Gómez G, Bagán JV. Proliferative verrucous leukoplakia: a proposal for diagnostic criteria. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2010 Nov 1;15(6):e839-45.

33. Chainani-Wu N, Purnell DM, Silverman S Jr. A case report of conservative management of extensive proliferative verrucous leukoplakia using a carbon dioxide laser. *Photomed Laser Surg.* 2013 Apr;31(4):183-7.

34. Ackerman LV. Verrucous carcinoma of the oral cavity. *Surgery.* 1948 Apr;23(4):670-8.

35. Ferlito A, Recher G. Ackerman's tumor (verrucous carcinoma) of the larynx: a clinicopathologic study of 77 cases. *Cancer.* 1980 Oct 1;46(7):1617-30.

36. Terada T. Verrucous carcinoma of the oral cavity: a histopathologic study of 10 Japanese cases. *J Maxillofac Oral Surg.* 2011 Jun;10(2):148-51.

37. Rajendran R, Sugathan CK, Augustine J, Vasudevan DM, Vijayakumar T. Ackerman's tumour (Verrucous carcinoma) of the oral cavity: a histopathologic study of 426 cases. *Singapore Dent J.* 1989 Dec;14(1):48-53.

38. Oliveira DT, de Moraes RV, Fiamengui Filho JF, Fanton Neto J, Landman G, Kowalski LP. Oral verrucous carcinoma: a retrospective study in São Paulo Region, Brazil. *Clin Oral Investig.* 2006 Sep;10(3):205-9.

39. Vidyasagar MS, Fernandes DJ, Kasturi DP, Akhileshwaran R, Rao K, Rao S, Rao RV, Solomon JG. Radiotherapy and verrucous carcinoma of the oral cavity. A study of 107 cases. *Acta Oncol.* 1992;31(1):43-7.
40. Nair MK, Sankaranarayanan R, Padmanabhan TK, Madhu CS. Oral verrucous carcinoma. Treatment with radiotherapy. *Cancer.* 1988 Feb 1;61(3):458-61.
41. López-Amado M, García-Caballero T, Lozano-Ramírez A, Labella-Caballero T. Human papillomavirus and p53 oncoprotein in verrucous carcinoma of the larynx. *J Laryngol Otol.* 1996 Aug;110(8):742-7.
42. Medina JE, Dichtel W, Luna MA. Verrucous-squamous carcinomas of the oral cavity. A clinicopathologic study of 104 cases. *Arch Otolaryngol.* 1984 Jul;110(7):437-40.
43. Walvekar RR, Chaukar DA, Deshpande MS, Pai PS, Chaturvedi P, Kakade A, Kane SV, D'Cruz AK. Verrucous carcinoma of the oral cavity: A clinical and pathological study of 101 cases. *Oral Oncol.* 2009 Jan;45(1):47-51.
44. McCoy JM, Waldron CA. Verrucous carcinoma of the oral cavity. A review of forty-nine cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1981 Dec;52(6):623-9.
45. Tornes K, Bang G, Strømme Koppang H, Pedersen KN. Oral verrucous carcinoma. *Int J Oral Surg.* 1985 Dec;14(6):485-92.
46. Jyothirmayi R, Sankaranarayanan R, Varghese C, Jacob R, Nair MK. Radiotherapy in the treatment of verrucous carcinoma of the oral cavity. *Oral Oncol.* 1997 Mar;33(2):124-8.
47. Murrah VA, Batsakis JG. Proliferative verrucous leukoplakia and verrucous hyperplasia. *Ann Otol Rhinol Laryngol.* 1994 Aug;103(8 Pt 1):660-3.
48. Shear M, Pindborg JJ. Verrucous hyperplasia of the oral mucosa. *Cancer.* 1980 Oct 15;46(8):1855-62.
49. Shimizu A, Tamura A, Ishikawa O. Invasive squamous cell carcinoma arising from verrucous carcinoma. Recognition of verrucous carcinoma of skin as an in situ carcinoma. *Eur J Dermatol.* 2006 Jul-Aug;16(4):439-42.

50. Gimenez-Conti IB, Collet AM, Lanfranchi H, Itoiz ME, Luna M, Xu HJ, Hu SX, Benedict WF, Conti CJ. p53, Rb, and cyclin D1 expression in human oral verrucous carcinomas. *Cancer*. 1996 Jul 1;78(1):17-23.
51. Drachenberg CB, Blanchaert R, Ioffe OB, Ord RA, Papadimitriou JC. Comparative study of invasive squamous cell carcinoma and verrucous carcinoma of the oral cavity: expression of bcl-2, p53, and Her-2/neu, and indexes of cell turnover. *Cancer Detect Prev*. 1997;21(6):483-9.
52. Mohtasham N, Babakoohi S, Shiva A, Shadman A, Kamyab-Hesari K, Shakeri MT, Sharifi-Sistani N. Immunohistochemical study of p53, Ki-67, MMP-2 and MMP-9 expression at invasive front of squamous cell and verrucous carcinoma in oral cavity. *Pathol Res Pract*. 2013 Feb 15;209(2):110-4.
53. Fujita S, Senba M, Kumatori A, Hayashi T, Ikeda T, Toriyama K. Human papillomavirus infection in oral verrucous carcinoma: genotyping analysis and inverse correlation with p53 expression. *Pathobiology*. 2008;75(4):257-64.
54. Kamath VV, Varma RR, Gadewar DR, Muralidhar M. Oral verrucous carcinoma. An analysis of 37 cases. *J Craniomaxillofac Surg*. 1989 Oct;17(7):309-14.
55. Impola U, Uitto VJ, Hietanen J, Hakkinen L, Zhang L, Larjava H, Isaka K, Saarialho-Kere U. Differential expression of matrilysin-1 (MMP-7), 92 kD gelatinase (MMP-9), and metalloelastase (MMP-12) in oral verrucous and squamous cell cancer. *J Pathol*. 2004 Jan;202(1):14-22.
56. Quan H, Tang Z, Zhao L, Wang Y, Liu O, Yao Z, Zuo J. Expression of α B-crystallin and its potential anti-apoptotic role in oral verrucous carcinoma. *Oncol Lett*. 2012 Feb;3(2):330-334.
57. Jacobson S, Shear M. Verrucous carcinoma of the mouth. *J Oral Pathol*. 1972;1(2):66-75.
58. Awange DO, Onyango JF. Oral verrucous carcinoma: report of two cases and review of literature. *East Afr Med J*. 1993 May;70(5):316-8.
59. Ferlito A, Rinaldo A, Mannarà GM. Is primary radiotherapy an appropriate option for the treatment of verrucous carcinoma of the head and neck? *J Laryngol Otol*. 1998 Feb;112(2):132-9.
60. Demian SD, Bushkin FL, Echevarria RA. Perineural invasion and anaplastic

transformation of verrucous carcinoma. *Cancer*. 1973 Aug;32(2):395-401.

61. Tharp ME 2nd, Shidnia H. Radiotherapy in the treatment of verrucous carcinoma of the head and neck. *Laryngoscope*. 1995 Apr;105(4 Pt 1):391-6.

62. Huang SH, Lockwood G, Irish J, Ringash J, Cummings B, Waldron J, Kim J, Dawson LA, Bayley A, Hope A, O'Sullivan B. Truths and myths about radiotherapy for verrucous carcinoma of larynx. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2009 Mar 15;73(4):1110-5.

63. Strojan P, Soba E, Budihna M, Auersperg M. Radiochemotherapy with Vinblastine, Methotrexate, and Bleomycin in the treatment of verrucous carcinoma of the head and neck. *J Surg Oncol*. 2005 Dec 15;92(4):278-83.

64. Strojan P, Soba E, Budihna M, Auersperg M. Radiochemotherapy with Vinblastine, Methotrexate, and Bleomycin in the treatment of verrucous carcinoma of the head and neck. *J Surg Oncol*. 2005 Dec 15;92(4):278-83.

65. Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer*. 1983 Jan 15;31(1):13-20.

66. Gerdes J, Li L, Schlueter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Gerlach C, Stahmer I, Kloth S, Brandt E, Flad HD. Immunobiochemical and molecular biologic characterization of the cell proliferation-associated nuclear antigen that is defined by monoclonal antibody Ki-67. *Am J Pathol*. 1991 Apr;138(4):867-73.

67. Schlüter C, Duchrow M, Wohlenberg C, Becker MH, Key G, Flad HD, Gerdes J. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *J Cell Biol*. 1993 Nov;123(3):513-22.

68. Duchrow M, Schlüter C, Wohlenberg C, Flad HD, Gerdes J. Molecular characterization of the gene locus of the human cell proliferation-associated nuclear protein defined by monoclonal antibody Ki-67. *Cell Prolif*. 1996 Jan;29(1):1-12.

69. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 2000 Mar;182(3):311-22.

70. Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol.* 1984 Oct;133(4):1710-5.
71. Brown DC, Gatter KC. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology.* 1990 Dec;17(6):489-503.
72. MacCallum DE, Hall PA. The location of pKi67 in the outer dense fibrillary compartment of the nucleolus points to a role in ribosome biogenesis during the cell division cycle. *J Pathol.* 2000 Apr;190(5):537-44.
73. Verheijen R, Kuijpers HJ, Schlingemann RO, Boehmer AL, van Driel R, Brakenhoff GJ, Ramaekers FC. Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. I. Intracellular localization during interphase. *J Cell Sci.* 1989 Jan;92 (Pt 1):123-30.
74. Verheijen R, Kuijpers HJ, van Driel R, Beck JL, van Dierendonck JH, Brakenhoff GJ, Ramaekers FC. Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. II. Localization in mitotic cells and association with chromosomes. *J Cell Sci.* 1989 Apr;92 (Pt 4):531-40.
75. Isola J, Helin H, Kallioniemi OP. Immunoelectron-microscopic localization of a proliferation-associated antigen Ki-67 in MCF-7 cells. *Histochem J.* 1990 Sep;22(9):498-506.
76. Bruno S, Darzynkiewicz Z. Cell cycle dependent expression and stability of the nuclear protein detected by Ki-67 antibody in HL-60 cells. *Cell Prolif.* 1992 Jan;25(1):31-40.
77. Kushner J, Bradley G, Jordan RC. Patterns of p53 and Ki-67 protein expression in epithelial dysplasia from the floor of the mouth. *J Pathol.* 1997 Dec;183(4):418-23.
78. Liu SC, Sauter ER, Clapper ML, Feldman RS, Levin L, Chen SY, Yen TJ, Ross E, Engstrom PF, Klein-Szanto AJ. Markers of cell proliferation in normal epithelia and dysplastic leukoplakias of the oral cavity. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev.* 1998 Jul;7(7):597-603.
79. Liu SC, Klein-Szanto AJ. Markers of proliferation in normal and leukoplakic oral epithelia. *Oral Oncol.* 2000 Mar;36(2):145-51.

80. Gonzalez-Moles MA, Ruiz-Avila I, Rodriguez-Archilla A, Martinez-Lara I. Suprabasal expression of Ki-67 antigen as a marker for the presence and severity of oral epithelial dysplasia. *Head Neck*. 2000 Oct;22(7):658-61.
- 81 Takeda T, Sugihara K, Hirayama Y, Hirano M, Tanuma JI, Semba I. Immunohistological evaluation of Ki-67, p63, CK19 and p53 expression in oral epithelial dysplasias. *J Oral Pathol Med*. 2006 Jul;35(6):369-75.
82. Torres-Rendon A, Roy S, Craig GT, Speight PM. Expression of Mcm2, geminin and Ki67 in normal oral mucosa, oral epithelial dysplasias and their corresponding squamous-cell carcinomas. *Br J Cancer*. 2009 Apr 7;100(7):1128-34.
83. Angiero F, Berenzi A, Benetti A, Rossi E, Del Sordo R, Sidoni A, Stefani M, Dessy E. Expression of p16, p53 and Ki-67 proteins in the progression of epithelial dysplasia of the oral cavity. *Anticancer Res*. 2008 Sep-Oct;28(5A):2535-9.
84. Sittel C, Ruiz S, Volling P, Kvasnicka HM, Jungehülsing M, Eckel HE. Prognostic significance of Ki-67 (MIB1), PCNA and p53 in cancer of the oropharynx and oral cavity. *Oral Oncol*. 1999 Nov;35(6):583-9.
85. Gonzalez-Moles MA, Ruiz-Avila I, Gil-Montoya JA, Esteban F, Bravo M. Analysis of Ki-67 expression in oral squamous cell carcinoma: why Ki-67 is not a prognostic indicator. *Oral Oncol*. 2010 Jul;46(7):525-30.
86. Iamaroon A, Khemaleelakul U, Pongsiriwet S, Pintong J. Co-expression of p53 and Ki67 and lack of EBV expression in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2004 Jan;33(1):30-6.
87. Kövesi G, Szende B. Changes in apoptosis and mitotic index, p53 and Ki67 expression in various types of oral leukoplakia. *Oncology*. 2003;65(4):331-6.
88. Girod SC, Pfeiffer P, Ries J, Pape HD. Proliferative activity and loss of function of tumour suppressor genes as 'biomarkers' in diagnosis and prognosis of benign and preneoplastic oral lesions and oral squamous cell carcinoma. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 1998 Aug;36(4):252-60.

89. Koelbl O, Rosenwald A, Haberl M, Müller J, Reuther J, Flentje M. p53 and Ki-67 as predictive markers for radiosensitivity in squamous cell carcinoma of the oral cavity? an immunohistochemical and clinicopathologic study. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 2001 Jan 1;49(1):147-54.
90. Lavertu P, Adelstein DJ, Myles J, Secic M. P53 and Ki-67 as outcome predictors for advanced squamous cell cancers of the head and neck treated with chemoradiotherapy. *Laryngoscope*. 2001 Nov;111(11 Pt 1):1878-92.
91. Katchburian E, Arana V. *Histologia e embriologia oral*. 3ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2012.
92. Junqueira LC, Carneiro J. *Histologia básica*. 10ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Diagnóstico de leucoplasia verrucosa proliferativa e carcinoma verrucoso.

Pesquisador: Décio dos Santos Pinto Junior

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 16358913.1.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Universidade de São Paulo

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 500.217

Data da Relatoria: 18/12/2013

Apresentação do Projeto:

O trabalho propõe a análise de potenciais critérios histopatológicos presentes em 30 casos de CV e 30 de LVP (com um total de 60), partindo de um diagnóstico já definido baseado, inclusive, em dados prévios (clínico e etiológico), bem como proceder a uma análise por imuno-histoquímica de diferenciação através do marcador para proteína p53 mutada e marcadores de proliferação MCM-3 e, como parâmetro de comparação para atividade proliferativa celular, o marcador Ki67. Os casos serão de pacientes distintos, oriundos do Serviço de Anatomia Patológica da Faculdade de Odontologia da USP. Todo o material oriundo de cada paciente será analisado por inteiro. De cada caso serão recuperados os blocos de material parafinado fixado em formol e lâminas coradas em hematoxilina e eosina, todos pertencentes ao arquivo do referido serviço. A partir da ficha de pedido de exame enviado ao serviço, serão recuperados para cada caso os dados: sexo; idade; cor da pele; aspectos clínicos da lesão; sítios acometidos (nos fornecendo informação de acometimento focal ou multifocal); histórico de recidiva em áreas previamente tratadas cirurgicamente; tabagismo; etilismo; sintomatologia; exames anteriores de PAS. A pesquisa irá realizar análises quanto aos aspectos morfológicos e imuno-histoquímicos bem como análise estatísticas dos dados coletados. Todas as análises estão bem descritas na metodologia do projeto. A hipótese levantada pelo autor é de que existam aspectos morfológicos e histopatológicos de maior incidência em cada grupo de lesões, o que remeteria a determinação de

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

FACULDADE DE ODONTOLOGIA DA UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 500.217

critérios diagnósticos histopatológicos de cada uma delas.

Objetivo da Pesquisa:

O estudo apresenta 4 objetivos: 1) Determinar critérios histopatológicos visando uma diferenciação morfológica entre leucoplasia verrucosa proliferativa (LVP) e carcinoma verrucoso (CV); 2)-Identificar por imuno-histoquímica a presença da proteína p53 mutada em amostras de LVP e CV; 3)- Identificar por imuno-histoquímica a presença da proteína MCM-3 em amostras de LVP e CV, expressa durante todo o ciclo de proliferação celular e início da diferenciação celular;4)-Identificar por imuno-histoquímica a presença da proteína Ki67, marcador da atividade proliferativa celular.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

no que se refere aos riscos: no projeto há o relato de que o presente trabalho não inclui manejo de pacientes, não incorrendo, portanto em riscos. O que está de acordo com o apresentado pelo pesquisador em todo o projeto. Quanto aos benefícios são apresentados: auxílio no diagnóstico de duas lesões (leucoplasia verrucosa proliferativa e carcinoma verrucoso) de prognósticos distintos cujo histopatológico se mostra semelhante; além de que, o correto diagnóstico permite que seja estabelecido prognóstico adequado e tratamento apropriado para cada patologia de acordo com suas características específicas, estando, portanto, de acordo com o que se propõe.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa é relevante, pois busca-se determinar critérios diagnósticos histopatológicos de duas lesões importantes: a Leucoplasia Verrucosa Proliferativa - LVP(subtipo incomum e mais agressivo da leucoplasia oral, destacando-se por apresentar grande potencial de recidiva, acometimento multifocal e alto risco de transformação maligna) e o Carcinoma Verrucoso, CV (lesão de aspecto exofítico verrucoso que, por sua vez, se assemelha à LVP, tendo, entretanto, um prognóstico, não incorrendo em metástase). Ambas são semelhantes quanto aos aspectos histopatológicos, entretanto, o pesquisador aponta como hipótese a existência de aspectos morfológicos e histopatológicos de maior incidência em cada lesão. Acredita-se que esta pesquisa trará impacto positivo no que se refere ao diagnóstico e prognóstico precoce. Enaltecendo mais uma vez a relevância deste estudo, ressalta-se a importância de se ter os resultados desta pesquisa divulgados como forma de artigo científico e não apenas monografia como previsto no cronograma, alcançando assim maior número de profissionais que atuam nesta área.

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 500.217

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

O pesquisador apresentou todos os documentos obrigatórios solicitados.

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais semestrais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

O pesquisador atendeu todas as solicitações apresentadas no parecer anterior. Dessa forma, não apresenta pendências.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO PAULO, 18 de Dezembro de 2013

Assinador por:
Maria Gabriela Haye Biazevic
(Coordenador)

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br