GABRIELA SANCHEZ NAGATA

**Correlação entre aspectos clínicos e marcadores biológicos no processo de
fotocarcinogênese de lábio**

São Paulo

2015

GABRIELA SANCHEZ NAGATA

**Correlação entre aspectos clínicos e marcadores biológicos no processo de
fotocarcinogênese de lábio**

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, para obter o do título de Doutor pelo Programa de Pós-Graduação em Patologia e Estomatologia Básica e Aplicada.

Orientador: Profa. Dra. Marília Trierveiler
Martins

São Paulo

2015

Nagata G. Correlação entre aspectos clínicos e marcadores biológicos no processo de fotocarcinogênese de lábio. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutor em Patologia e Estomatologia Básica e Aplicada.

Aprovado em: / /2015

Banca Examinadora

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Dedico essa Tese a meus pais, Hideshi Nagata e Mercedes Sanchez Nagata, por estarem ao meu lado em todos os momentos com seu amor incondicional, fornecendo apoio, força e carinho na concretização de todos os meus objetivos; e a meus irmãos, Felipe Sanchez Nagata e Guilherme Sanchez Nagata, que são a maior motivação em todos os meus atos que promovem um bem maior.

Amo muito vocês.

AGRADECIMENTOS

À minha Orientadora, Profa. Dra Marília Trierveiler Martins, por todo o aprendizado nesses sete anos de convivência, mas principalmente, por me mostrar em sua prática diária quão transformador e importante é o papel de docente e pesquisador. Sinto-me muito honrada por ter trabalhado em seu grupo e te agradeço por me auxiliar a trilhar os passos da minha carreira.

Ao Programa de Pós-Graduação em Patologia e Estomatologia Básica e Aplicada, pela formação de excelência concedida a mim tanto no Mestrado quanto no Doutorado. Tenho muito orgulho de ter participado de atividades de pesquisa, no trabalho de extensão do Serviço de Patologia Cirúrgica, o qual atuei por cinco anos, e na Reunião Anátomo-Clínica, uma tradição de mais de 40 anos.

Obrigada aos professores da Disciplina de Patologia Bucal da FOU SP, Profa. Suzana C. Orsini Machado de Souza, Profa Marina Helena C. Gallottini, Prof. Décio dos Santos Pinto Jr., Prof. Fábio Daumas Nunes, Profa Andrea Mantesso, Profa Karen Lopez Ortega, e também Profa Luciana Correa e Prof Paulo Henrique Brás da Silva, da disciplina de Patologia Geral, pela troca constante de experiências e pela atenção em todos os aspectos da pós-graduação. Tenho profunda admiração por vocês.

Aos Professores Celso Augusto Lemos Jr., Profa Dra. Camila de Barros Gallo, Profa Andrea Lusvarghi Witzel, Prof. Norberto Nobuo Sugaya, Profa Ana Sueli Rodrigues Cavalcanti, Profa Mônica Lotufo, Prof. Dante Antônio Migliari, Prof. Jarbas Arruda Bauer e Prof. Luis Alberto Penna, que embora pertencentes a outros departamentos e até mesmo outras instituições de ensino, também contribuíram para o meu aprendizado. Obrigada pela dedicação e atenção.

À Dra. Tatiana Jazedje, que me deu a oportunidade de trabalhar em uma pesquisa em parceria com o grupo do Instituto de Pesquisa do Genoma Humano. Todo o percurso desse trabalho ampliou minha visão para campos fora da fotocarcinogênese e promoveu contribuiu muito para meu crescimento como pesquisadora. Obrigada pela sua atenção, dedicação e competência. Aprendi muito com você.

A todos os colegas de pós-graduação, por todos os momentos que passamos juntos, em busca da concretização de nossos objetivos. Com certeza essa jornada ficou muito mais alegre e fácil ao lado de cada um de vocês. Agradeço especialmente às amigas Lilia Alves Rocha, Flávia Cristina Rossin, Lara Cristina Oliver Gimenes, Cibele Pelissari dos Santos, Marina Gabriela Teixeira, Karin Sá Fernandes e Fernanda Mombrini Pigatti, por todo carinho e por todo o crescimento pessoal que vocês me proporcionaram. Desejo que possamos continuar compartilhando muitas outras alegrias e nos ajudando nas dificuldades. Vocês são muito especiais para mim.

Aos funcionários da Disciplina de Patologia Bucal: Néia, Zilda, Nair, Juvani, Adriana, Elisa, Fátima e Vinícius, pela dedicação, atenção, auxílio e amizade. Aprendi muito com vocês.

Agradeço a CAPES, pelo financiamento da bolsa de estudos que permitiu com que eu cursasse o meu mestrado e meu doutorado.

À Faculdade de Odontologia da USP, que sempre será a minha casa, local onde eu realizei os maiores sonhos da minha vida, e que permitiu que eu completasse a minha formação com aqueles que fizeram de mim a profissional realizada que sou.

RESUMO

Nagata GS. Correlação entre aspectos clínicos e marcadores biológicos no processo de fotocarcinogênese de lábio [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015. Versão Corrigida.

A queilite actínica (QA) é uma lesão potencialmente maligna importante para identificar indícios precoces de transformação maligna para o carcinoma epidermoide de lábio (CEL), possibilitando a implementação de um tratamento eficiente e menos invasivo, que promova um melhor prognóstico para os pacientes. Pesquisas recentes indicam que os métodos histopatológicos geralmente são falhos em traçar o risco de malignização de casos de QA, pois além de não demonstrar as alterações genéticas presentes nos queratinócitos, não foram realizados estudos de acompanhamento clínico para avaliar se o grau de displasia epitelial da QA está relacionado ao risco de malignização para CE. Assim, a presente pesquisa teve como objetivo caracterizar, a partir dos casos atendidos no Serviço de Patologia Cirúrgica da FOU SP, qual a diferença de perfil clínico-patológico de pacientes de QA com evolução para CEL, pacientes de QA sem informações e sinais presentes de malignização e pacientes apenas diagnosticados com CEL, e também visou analisar a expressão de Ki67 e pRb nesses três grupos. Para isso, os dados dos pacientes como idade, sexo, cor da pele, aspecto clínico da lesão fundamental, coloração, tamanho e tempo de duração das lesões foram resgatados de 998 casos e distribuídos nessas três categorias. Os resultados da análise clínico-epidemiológica revelaram que o único aspecto clínico estatisticamente significativo para diferenciar pacientes apenas diagnosticados com CEL dos demais grupos foi o tempo de duração das lesões. A análise do grau de displasia epitelial nos casos de QA na amostra presente revelou que todos os pacientes de QA posteriormente diagnosticados com CEL foram classificados como lesões de alto risco, e ainda exibiram em maior frequência as atipias: aumento do número de figuras de mitose, variação anormal do tamanho do núcleo, variação anormal do tamanho da célula e alteração da relação núcleo/citoplasma, figuras de mitose anormais e aumento do

número e tamanho de nucléolos. Tanto a expressão da proteína Ki-67 como da proteína pRb não demonstraram significância estatística na comparação entre os grupos do estudo. Assim, a avaliação de uma ampla série de casos revelou diferença significativa no tempo de duração do CEL com relação à QA. Além disso, algumas alterações morfológicas foram observadas com maior frequência em casos de QA com evolução para CEL. No entanto, outros marcadores biológicos devem ser testados em conjunto, para tentar diagnosticar alterações precoces que levem ao desenvolvimento de CEL.

Palavras-chave: Queilite actínica. Carcinoma epidermoide de lábio. Malignização. Graduação histológica. Imuno-histoquímica. Ki-67. Proteína do retinoblastoma.

ABSTRACT

Nagata GS. Relationship between clinical aspects and biological markers during lip photocarcinogenesis process [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2015. Versão Corrigida.

Actinic cheilitis (AC) is a potentially malignant lesion important to identify early signs of malignant transformation into lip squamous cell carcinoma (LSCC), enabling the implementation of an efficient and less invasive treatment to patients. Recent researches pointed that histopatological methods often fail to trace malignization risk in AC cases, because they are unable to identify genetic damage in keratinocytes and do not exist a clinical follow-up studie to assess if the grading of epithelial dysplasia in AC is related with the malignancy risk to LSCC development. Thus, this research aims to characterize, from cases of Surgical Pathology Service of Universidade de São Paulo, the differences in clinical and pathological profile among AC patients which had evolution to LSCC, AC patients without signs and information about malignization and patients diagnosed only with LSCC. This study also analyzed the expression of Ki-67 and pRb proteins in these three groups. To conduct this study, data as age, gender, race, fundamental lesion aspect, color, size and duration time of the lesion were collected from 998 patients. The clinical-epidemiological analysis revealed that duration time of the lesion was the statistically significant clinical feature to differentiate patients diagnosed only with LSCC from other groups. The grading of epithelial dysplasia analysis showed that all AC patients with a posterior diagnosis of LSCC were classified as high risk lesions and these cases also exhibited most frequently atypia figures as: increased number of mitotic features, abnormal variation in nuclear size, abnormal variation in cellular size, increased nuclear/cytoplasmic ratio, abnormal mitotic features and increased number and size of nucleoli. The immunohistochemical expression of both Ki-67 and pRb protein demonstrated lack of significant statistical difference among the groups. We concluded that the evaluation of a large serie of cases revealed differences in duration time of lesion in patiens only diagnoses with LSCC and some morphological criteria were most frequent in AC cases with a posterior diagnosis of LSCC.

However, other biological markers must be tested together, to try to identify early steps of LSCC development.

Key words: Actinic cheilitis. Lip squamous cell carcinoma. Malignization. Histopathological grading. Immunohistochemistry, Ki-67 protein. Retinoblastoma protein.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 5.1 Imuno-histoquímica para Ki-67 e pRb. Expressão de Ki-67 em lábio normal (A), QA com displasia discreta (C), moderada (E), e intensa (G) de pacientes diagnosticados apenas com QA, e casos de CEL (I). Expressão de pRb em lábio normal (B), QA com displasia discreta (D), moderada (F), e intensa (H) de pacientes apenas diagnosticados com QA, e casos de CEL (J).....104
- Figura 5.2 Reações de imuno-histoquímica para as proteínas Ki-67 e pRb. em: semimucosa de lábio normal (A); QA com displasia epitelial intensa do grupo de pacientes de QA com diagnóstico posterior de CEL (C), e caso de CEL (E). Expressão de pRb em: semimucosa de lábio normal (B); QA com displasia intensa de paciente com posterior diagnóstico de CEL (D) e CEL (F).....105

LISTA DE GRÁFICOS

Gráfico 5.1	Idade dos pacientes de QA com posterior diagnóstico de CEL (n=10), pacientes apenas com diagnóstico de QA (n=690) e pacientes apenas com CEL (n=298).....	63
Gráfico 5.2	Blox-Plot comparando os três grupos da amostra com relação à mediana de idade dos pacientes, mensurada em décadas de vida. QAM são os pacientes de QA com posterior diagnóstico de CEL.....	64
Gráfico 5.3	Distribuição da amostra do estudo com relação ao dado epidemiológico sexo, de acordo com os seguintes grupos: pacientes com QA que tiveram diagnóstico posterior de CEL (n=10), pacientes apenas com diagnóstico de QA (n=690) e pacientes apenas com diagnóstico de CEL (n=298).....	65
Gráfico 5.4	Distribuição da amostra com relação ao dado epidemiológico etnia, considerando os grupos: pacientes com diagnóstico de QA e posteriormente CEL (n=10), pacientes apenas com diagnóstico de QA (n=690) e pacientes apenas com CEL (n=298).....	66
Gráfico 5.5	Distribuição dos pacientes com QA e posterior diagnóstico de CEL (n=10), pacientes apenas com diagnóstico de QA (n=690) e pacientes apenas com diagnóstico de CEL (n=298) quanto ao aspecto clínico das lesões.....	68
Gráfico 5.6	Análise da amostra com relação à coloração das lesões em pacientes com QA que evoluíram para CEL (n=10), pacientes de QA sem evolução para CEL (n=690) e pacientes com CEL (n=298).....	69
Gráfico 5.7	Blox-Plot comparando os três grupos da amostra com relação à mediana do tamanho das lesões, medida essa mensurada em milímetros.....	70
Gráfico 5.8	Blox-Plot comparando os três grupos da amostra com relação à mediana do tempo de duração das lesões, medida essa mensurada em meses.....	71

Gráfico 5.9	Intervalos de confiança do Teste de Tukey entre as médias do tempo de duração das lesões entre os grupos de estudo.....	73
Gráfico 5.10	Porcentagem de células positivas para o marcador Ki-67 entre os grupos: pacientes com diagnóstico apenas de (QA), esses distribuídos de acordo com os graus de displasia epitelial do sistema binário, pacientes diagnosticados com QA e posteriormente com CEL (QA-CEL), Lábio normal e pacientes diagnosticados apenas com CEL.....	84
Gráfico 5.11	Porcentagem de células positivas para o marcador Ki-67 entre os grupos: pacientes diagnosticados essencialmente com QA (QA), esses distribuídos de acordo com os graus de displasia epitelial do sistema da OMS, pacientes de QA com diagnóstico posterior de CEL (QA-CEL), Lábio normal e pacientes diagnosticados apenas com CEL.....	84
Gráfico 5.12	Blox-Plot comparando a mediana do percentual de células positivas para a proteína Ki-67 entre os grupos Controle (Lábio normal), QA discreta, QA moderada, QA intensa, QA com diagnóstico posterior de CEL (QA.CEL) e CEL.....	86
Gráfico 5.13	Intervalos de confiança do Teste de Tukey com relação à media da positividade de Ki-67, sendo a displasia epitelial dos casos de pacientes com diagnóstico apenas com QA graduada de acordo com o sistema da OMS.....	88
Gráfico 5.14	Blox-Plot exibindo a mediana do percentual de células positivas para a proteína Ki-67 com relação aos grupos: pacientes com diagnóstico apenas de QA, graduados de acordo com o sistema binário de displasias epiteliais; grupo de pacientes que tiveram QA e posterior diagnóstico de CEL; o grupo fragmento de semimucosa de lábio normal, considerado controle e o grupo pacientes apenas com CEL.....	89

- Gráfico 5.15 Intervalos de confiança do teste de Tukey quanto à media da positividade de Ki-67 com relação ao total de células contadas entre os grupos do estudo, sendo os casos de pacientes diagnosticados apenas por QA graduados de acordo com o sistema binário.....91
- Gráfico 5.16 Porcentagem de células positivas para o marcador pRb entre os grupos : pacientes diagnosticados apenas com QA (QA), esses distribuídos de acordo com os graus de displasia epitelial do sistema binário, pacientes de QA com posterior diagnóstico de CEL (QA-CEL), Lábio normal e pacientes apenas com diagnóstico de CEL.....96
- Gráfico 5.17 Porcentagem de células positivas para o marcador pRb entre os grupos: pacientes com diagnóstico apenas de QA (QA), esses distribuídos de acordo com os graus de displasia epitelial do sistema proposto pela OMS, pacientes do grupo QA com posterior diagnóstico de CEL (QA-CEL), Lábio normal e CEL.....97
- Gráfico 5.18 Blox-Plot comparando a mediana do percentual de células positivas para a proteína pRb entre os grupos Lábio normal (Controle), QA discreta, QA moderada, QA intensa, pacientes de QA diagnosticados posteriormente como CEL (QA.CEL) e CEL.....98
- Gráfico 5.19 Intervalos de confiança do Teste de Tukey com relação à media da positividade de pRb nos grupos: fragmento de semimucosa de lábio normal, o controle sem lesão (Controle); pacientes de QA com posterior diagnóstico de CEL (QA-CEL); pacientes apenas diagnosticados com QA, esses graduados de acordo com o sistema da OMS de displasias epiteliais e pacientes com diagnóstico apenas de CEL.....100
- Gráfico 5.20 Blox-Plot comparando a mediana do percentual de células positivas para a proteína pRb entre os grupos Controle (Lábio normal), QA alto risco, QA baixo risco, pacientes de QA com diagnóstico posterior de CEL (QA.CEL) e pacientes apenas diagnosticados como CEL.....101

Gráfico 5.21 Intervalos de confiança do Teste de Tukey quanto à media da positividade de pRb com relação ao total de células contadas entre os grupos: fragmento de semimucosa de lábio normal, o controle sem lesão (Controle); pacientes de QA com posterior diagnóstico de CEL (QA.CEL); pacientes diagnosticados apenas com QA graduados de acordo com o sistema binário de displasias epiteliais e pacientes apenas com CEL.....103

LISTA DE QUADROS

Quadro 5.1	Resultados das reações de imuno-histoquímica para o anticorpo anti-proteína Ki-67, distribuídos de acordo com os grupos do presente estudo	81
Quadro 5.2	Resultados das reações de imuno-histoquímica para o anticorpo anti-proteína pRb, distribuídos de acordo com os grupos do presente estudo	94

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1	Tabela ANOVA para a idade dos pacientes estipulada em décadas de vida.....	64
Tabela 5.2	Tabela ANOVA para o tamanho das lesões mensurado em milímetro.....	70
Tabela 5.3	Tabela ANOVA para o tamanho das lesões mensurado em milímetros.....	72
Tabela 5.4	Valores de significância do teste estatístico de Tukey para o tempo de duração das lesões, na comparação entre os grupos do estudo.....	72
Tabela 5.5	Análise quanto à sintomatologia dos pacientes com QA apresentando evolução para CEL, QA sem indícios de evolução para CEL e CEL. O cálculo da porcentagem foi realizado considerando como total o número de casos de cada categoria.....	73
Tabela 5.6	Relação entre o tipo de biópsia executado e os grupos: pacientes de QA com posterior diagnóstico de CEL, pacientes apenas com diagnóstico de QA e pacientes apenas com diagnóstico de CEL. O cálculo da porcentagem foi realizado considerando como total o número de casos de cada grupo.....	74
Tabela 5.7	Relação entre o diagnóstico histopatológico e a hipótese de diagnóstico clínico. Porcentagem calculada considerando o total de casos de cada grupo.....	75
Tabela 5.8	Frequência de cada critério arquitetural e citológico proposto pela OMS 2005, observada nos pacientes de QA com diagnóstico posterior de CEL e pacientes com diagnóstico apenas de QA.....	78

Tabela 5.9	Tabela ANOVA para comparação entre o percentual de células positivas para a proteína Ki-67 entre os grupos, em que os casos de QA tiveram displasia epitelial graduada de acordo com o sistema da OMS 2005.	87
Tabela 5.10	Valores de p do teste de Tukey nas comparações das médias do percentual de células positivas para Ki-67 e o total de células contadas entre os grupos do estudo, em que os casos de pacientes apenas com QA foram graduados de acordo com o sistema da OMS.....	87
Tabela 5.11	Tabela ANOVA para comparação entre o percentual de células positivas entre os grupos, em que os casos de QA tiveram displasia epitelial graduada de acordo com o binário.....	90
Tabela 5.12	Valores de p do teste de Tukey nas comparações das médias do percentual de células positivas para Ki-67 e o total de células contadas entre os grupos do estudo, sendo os casos de pacientes apenas com diagnóstico de QA graduados de acordo com o sistema binário.....	90
Tabela 5.13	Tabela de Variância para comparação entre o percentual de células positivas para a proteína pRb entre os grupos, em que os casos de QA tiveram displasia epitelial graduada de acordo com o sistema da OMS 2005.....	99
Tabela 5.14	Valores de p do teste de Tukey nas comparações entre a positividade do anticorpo anti-pRb e os grupos do estudo, em que os casos de pacientes com diagnóstico apenas de QA foram graduados de acordo com o sistema da OMS quanto à displasia epitelial.....	99
Tabela 5.15	Tabela ANOVA para comparação entre o percentual de células positivas entre os grupos, em que os casos de QA tiveram displasia epitelial graduada de acordo com o binário.....	102
Tabela 5.16	Valores de p do teste de Tukey nas comparações entre a positividade do anticorpo anti-pRb e os grupos do estudo, em que os casos de pacientes apenas com diagnóstico de QA foram graduados de acordo com o sistema binário de displasia epitelial.....	102

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Bax	proteína tipo-bcl2 4
Bcl2	proteína de apoptose linfoma de célula B 2 (do inglês, B-cell lymphoma 2)
cAMP	adenosina monofosfato cíclica
C4	carbono na posição 4 do fotoproduto 6-4 pirimidina pirimidona
C5	carbono na posição 5 do dímero de pirimidina ciclobutano
C6	carbono na posição 6 do fotoproduto 6-4 pirimidina pirimidona
C-C	dímero citosina-citosina
CD2	proteína quinase dependente de ciclina 2
CD4	proteína quinase dependente de ciclina 4
CEIO	carcinoma epidermoide intraoral
CEL	carcinoma epidermoide de lábio
CPD	dímero de pirimidina ciclobutano
C-T	dímero citosina – timina
CC-TT	ligação covalente citosina-citosina timina-timina
DAB	diaminibenzidina
DNA	ácido desoxirribonucleico
E2F	fator epidérmico 2, um fator de transcrição.
ER β 1	receptor de estrógeno beta1
EDTA	ácido etilenodiaminotetracético
G1	fase de crescimento 1 do ciclo celular (do inglês “growth 1”)
G2	fase de crescimento 2 do ciclo celular (do inglês “growth 2”)
GADD45	gene de aprisionamento do crescimento e dano celular (do inglês: Growth Arrest and DNA Damage gene)
hMSH2	proteína homóloga 2 à produzida pelo gene mutador S 1
HPV	papilomavírus humano
K	kappa
LSAB	complexo estreptavidina-biotina peroxidase
Ki-67	proteína de proliferação celular Kiel-67
Maspin	protease inibidora da serina mamária
MC1R	receptor de melanocortina tipo 1

MDM2	gene codificador da proteína homóloga de replicação de murinos (do inglês “murine double protein”)
MMPs	enzimas metaloproteinases de matriz extracelular
NaCl	cloreto de sódio
NOTCH1	lócus neurogênico da proteína homóloga notch1
NRAS	gene de proliferação celular da família “ras” (derivado do inglês “rat sarcoma”)
OMS	Organização Mundial da Saúde
p16INK4a	quinase dependente de ciclina inibidor 2A
pH	potencial hidrogeniônico da água
p53	produto codificado pelo gene produtor da proteína tumoral 53
p21	produto do gene ativador de p53 fragmento 1 tipo nativo
PABA	ácido para-aminobenzoico.
PDT	terapia fotodinâmica
6-4PP	fotoproduto 6-4 pirimidina pirimidona
Pol η	DNA polimerase eta
Pol κ	DNA polimerase kappa
Pol γ	DNA polimerase gama
Pol ι	DNA polimerase iota
POLH	gene codificador da polimerase direta de DNA eta
pRb	proteína do retinoblastoma
QA	queilite actínica
RB1	gene do retinoblastoma
Rb-E2F	complexo proteína do retinoblastoma e dímero fator epidérmico 2
Rb- E2F/DP	complexo proteína do retinoblastoma e dímero fator epidérmico 2 difosforilado
Rev1	proteína de reparo do DNA Rev1
S	fase S do ciclo celular ou período “sintético”.
T1	Característica do sistema de estadiamento Tumor-Linfonodo-Metástase. Indica tumores de 2 cm ou menores em seu maior diâmetro.
T2	Característica do sistema de estadiamento Tumor-Linfonodo-Metástase. Indica tumores entre 2cm e 4 cm em seu maior diâmetro.

TNM	sistema de estadiamento tumor-linfonodo-metástase
TP53	gene TP53
Tris	trisaminometano
T-T	dímero de timina
Tween 20	polissorbato 20
UV	radiação ultravioleta
UVA	radiação ultravioleta no espectro A de radiação eletromagnética
UVB	radiação ultravioleta no espectro B de radiação eletromagnética
UVC	radiação ultravioleta no espectro C de radiação eletromagnética
XP-V	síndrome variante do Xeroderma pigmentosa

LISTA DE SÍMBOLOS

°C	graus Celsius
cm	centímetro
mm	milímetros
Mm	milimolar
Nm	nanômetros
%	por cento
J/cm ²	joule por centímetro quadrado
K	kappa
kD	kilodaltons
µl/L	microlitros por litro.

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	24
2 REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1 Carcinoma Epidermoide de Lábio	27
2.2 Queilite Actínica	32
2.3 Fotocarcinogênese	37
2.4 Bases moleculares da fotocarcinogênese e marcadores biológicos de transformação maligna	43
2.5 Características morfológicas de transformação maligna	48
3 PROPOSIÇÃO	54
4 MATERIAL E MÉTODOS	55
4.1 Seleção de casos	55
4.2 Estudo clínico e epidemiológico	56
4.3 Estudo morfológico	57
4.4 Estudo imuno-histoquímico	58
4.5 Análise dos resultados	60
4.5.1 Avaliação dos dados clínicos e epidemiológicos	60
4.5.2 Avaliação dos dados de imuno-histoquímica	61
5 RESULTADOS	62
5.1 Casuística	62
5.2 Análise clínico-epidemiológica	62
5.3 Análise morfológica	76
5.4 Análise imuno-histoquímica	79
5.4.1 Proteína Ki-67	79
5.4.2 Proteína pRb	91
6 DISCUSSÃO	106
7 CONCLUSÃO	123
REFERÊNCIAS	125
Anexos	133

1 INTRODUÇÃO

O carcinoma epidermoide de lábio e cavidade oral constitui um sério problema de saúde pública devido a sua alta incidência - 300 373 casos - e significativa taxa de mortalidade - 145 328 casos, de acordo com dados publicados pela Organização Mundial da Saúde (OMS) no projeto Globocan - o qual visa registrar dados epidemiológicos para traçar políticas de prevenção e tratamento para os diversos tipos de câncer^{1,2}.

Apesar de constituírem neoplasias malignas de origem epitelial e serem contabilizados como uma mesma entidade patológica por diversos órgãos governamentais, o carcinoma epidermoide intraoral (CEIO) e o carcinoma epidermoide de lábio (CEL) apresentam etiologia, comportamento biológico e prognóstico completamente diferentes. O desenvolvimento do CEIO está intimamente associado a hábitos tabagistas e etilistas, apresenta-se como uma lesão agressiva, com altos índices de recidiva e metástase³. Já o CEL tem como fator etiológico principal a exposição excessiva à radiação ultravioleta, é uma lesão bastante indolente, com baixos índices de recidiva e metástase além de 90% de cura em 5 anos. Entretanto, a morbidade em casos de CEL é bastante significativa, pois as sequelas em face, muitas vezes, promovem danos não só estéticos, mas também psicológicos e sociais⁴.

Devido a altas taxas de incidência, morbidade e mortalidade desses tipos de carcinoma, pesquisadores e clínicos são constantemente desafiados a detectar indícios do processo de malignização dessas lesões em estágios precoces.

De acordo com a teoria da cancerização de campo, a mais aceita até o presente momento para explicar o desenvolvimento do CEL e CEIO, a exposição constante do epitélio a carcinógenos como a radiação solar, o fumo, e o álcool, propicia a manifestação de alterações genéticas que resultam em distúrbios na proliferação e diferenciação de queratinócitos, os quais geram clones com uma vantagem seletiva em relação às células normais. Conforme aumenta o acúmulo de mutações e também a presença de danos em genes responsáveis pela manutenção

da estabilidade genômica, tais alterações irão constituir, clinicamente, lesões com distúrbios na maturação, na forma e tamanho de queratinócitos – as desordens com potencial de malignização – e também múltiplos focos de tumores primários^{5,6}. Assim, o estudo de características das desordens potencialmente malignas sempre pareceu o caminho mais obvio para desvendar quais pacientes apresentam um maior risco de sofrer transformação maligna.

Em 1957, a OMS criou o Centro de Colaboração e Referência para Lesões Orais Pré-Cancerizáveis, formado por notáveis especialistas que visavam uniformizar e divulgar o conhecimento clínico e principalmente histopatológico em neoplasias e lesões cancerizáveis do epitélio oral. Esse objetivo começou a ser concretizado em 1978, com uma publicação que tentava padronizar a nomenclatura, os conceitos e os critérios de diagnóstico de lesões potencialmente malignas orais, possibilitando intervenções clínicas em estágios precoces de desenvolvimento de uma neoplasia maligna. Também foram lançadas as bases para a elaboração do sistema de graduação de displasias epiteliais orais baseadas em 12 alterações histológicas que poderiam ocorrer no epitélio dessas lesões. A presença de um maior número de alterações morfológicas estaria associada a um grau de displasia mais elevado, e conseqüentemente, a um maior risco de desenvolvimento de carcinoma. Esse sistema, mesmo após algumas modificações, ainda é o método mais utilizado para determinar o diagnóstico e traçar o prognóstico das desordens potencialmente malignas⁷ e até hoje a OMS ainda mantém essa filosofia de fornecer uma base de conhecimento sólida para cirurgiões dentistas clínicos e patologistas, os profissionais de saúde que atuam diretamente no diagnóstico, tratamento e prognóstico dessas lesões.

Embora bastante utilizados, os sistemas de graduação de displasias epiteliais são baseados em critérios bastante subjetivos^{8,9}, e muitas vezes não conseguem traçar o prognóstico de desordens potencialmente malignas com precisão, especialmente no caso de queilites actínicas, em que não existem sequer estudos de acompanhamento clínico que demonstrem a aplicabilidade desses sistemas em indicar quais lesões irão evoluir CEL. Outro ponto que vem sendo questionado é o modelo de carcinogênese vigente até o momento, em que as alterações epiteliais passam por todos os graus de displasia epitelial até a evolução para carcinoma epidermoide. Entretanto, a prática em serviços de anatomia

patológica demonstra que muitos casos de displasia epitelial discreta são passíveis de evoluir diretamente para carcinoma¹⁰.

A subjetividade e falta de precisão dos sistemas de graduação de displasias epiteliais tem dado cada vez mais força à busca por marcadores biológicos que indiquem com acurácia casos de queilite actínica, leucoplasia, eritroplasia e fibrose submucosa oral, lesões que exibem maior probabilidade de evoluir para carcinoma epidermoide. Em casos de leucoplasia, moléculas como a proteína de proliferação celular Kiel-67 (Ki67)¹¹, o produto codificado pelo gene da proteína tumoral 53 (p53)¹² e quinase dependente de ciclina inibidor 2A (p16INK4a)¹³ foram considerados bons prognosticadores de transformação maligna, assim como as proteínas p53 mutada¹⁰, protease inibidora da serina mamária (maspin)¹⁴ e proteína homóloga 2 à produzida pelo gene mutador S1 (hMSH2)¹⁵ nos casos de queilite actínica. No entanto, ainda são necessários estudos de acompanhamento clínico para comprovar a eficácia desses marcadores.

O Brasil é um país geograficamente situado em área de grande incidência de radiação solar. O fato de uma considerável parcela da população brasileira estar intensamente exposta à radiação ultravioleta (UV) proveniente do Sol tanto por motivos sócio-econômicos, quanto por motivos estéticos, justifica os esforços de pesquisas em buscar indícios precoces do processo de fotocarcinogênese de lábio, principalmente em características clínicas, que são as mais evidentes de serem diagnosticadas.

Os investimentos em metodologias para um diagnóstico precoce eficiente, principalmente em casos de CEL - uma lesão com sequelas de considerável impacto psicológico - são importantes tanto para garantir um prognóstico mais favorável para os pacientes, com menor morbidade, além de menores gastos para os serviços públicos de saúde.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Carcinoma Epidermoide de Lábio

O carcinoma epidermoide de lábio (CEL) é uma neoplasia maligna de origem epitelial bastante frequente. No entanto, os dados estatísticos com relação a essa neoplasia são escassos e confusos. Os índices epidemiológicos oficiais publicados pelo Projeto Globocan, órgão gerenciado pela OMS para comunicar estimativas contemporâneas de incidência, mortalidade e prevalência dos tipos de câncer mais frequentes em 184 países do mundo, não discriminam os casos de CEL dentre os casos de câncer oral, portanto, não há uma estimativa oficial sobre essa lesão^{1,2}.

As maiores incidências de câncer de lábio no mundo foram registradas no Canadá, Espanha e Austrália, que apresentaram cerca de 12,7¹⁶, 12¹⁷ e 8,85¹⁸ novos casos entre 100 000 pacientes, respectivamente. Israel também apresenta uma alta incidência de pacientes com CEL, com aproximadamente 4,58/100 000 casos¹⁹. Em países da Ásia como China, Japão e Cingapura, o CEL parece ser uma lesão rara, com taxas de incidência de 0,1/100 000 pacientes¹⁶.

A característica comum entre Canadá, Espanha, Austrália e Israel que pode estar relacionada ao grande número de pacientes acometidos por CEL é a exposição crônica à radiação solar e o fato de a população desses países ser constituída, em sua maioria, por indivíduos leucodermas¹⁶. No entanto, um estudo epidemiológico no Zimbábue revelou que 3,91% da amostra analisada apresentou CEL, e entre esses, 36% eram pacientes negros sem deficiência na produção de melanina, como albinismo e xerodermia pigmentosa²⁰, indicando que a exposição à radiação solar é um fator mais crítico que a cor da pele para o desenvolvimento dessa neoplasia.

Países situados na região intertropical do globo terrestre oferecem um grande risco ao desenvolvimento de CEL, pois essa é a zona de maior incidência de raios solares do planeta. Outra área que merece medidas de atenção com relação ao desenvolvimento dessa neoplasia é a Antártida, continente que sofre os danos

diretos do buraco na camada de ozônio, um problema ambiental que permite a incidência de radiações de pequeno comprimento de onda, as quais são bastante mutagênicas. Esse assunto será tratado com maior detalhe nos próximos capítulos¹⁶.

Os dados epidemiológicos sobre o CEL no Brasil também são escassos e confusos, pois não existem índices brutos sobre incidência dessa lesão em estudos de órgãos governamentais. O projeto Globocan prevê uma incidência de 11 390 novos casos de câncer de lábio e cavidade oral na população brasileira em 2015. Recentemente foi publicado que, somente no Estado de Minas Gerais, os casos de CEL representam 10,8% de todos os casos de câncer de boca. Portanto, associando-se essa porcentagem aos índices epidemiológicos do Globocan sobre câncer oral, estima-se que no Brasil sejam registrados cerca de 1.230 novos casos de CEL em 2015^{2,21}.

Além da exposição intensa e prolongada à radiação solar e a pele clara, os pacientes afetados pelo CEL exibem outras características típicas, como: predominância no sexo masculino, média de idade de 50 anos e condições sócio-econômicas menos favorecidas, o que contribui para uma falta de informação sobre a neoplasia e uma maior exposição ao seu agente etiológico. Histórico familiar de casos de CEL não foi relacionado com o desenvolvimento dessa lesão. Além desses fatores, alguns estudos demonstraram relação entre alterações no sistema imune e o maior risco de desenvolvimento de CEL, pois foram relatados casos de CEL em pacientes jovens, submetidos à terapia imunossupressora após transplante renal²¹.

Clinicamente, o CEL pode se apresentar sob diferentes aspectos, como uma úlcera de fundo necrótico com bordas elevadas e endurecidas, ou placas brancas entremeadas por áreas eritematosas, ou mesmo como lesões exofíticas, que são vistas em menor frequência. O lábio inferior é o sítio anatômico mais comum do CEL. Entretanto, o lábio superior também é acometido por essa neoplasia e, curiosamente, 31,3% dos casos de CEL em lábio superior são reportados em mulheres²². Essa lesão desenvolve-se lentamente e não apresenta sintomatologia dolorosa, o que faz com que o paciente demore a buscar o auxílio de um profissional de saúde.

A lesão de diagnóstico diferencial clínico mais crítico para o CEL é o queratoacantoma. A contaminação por papilomavírus humano (HPV), associada a fatores como trauma, exposição ao alcatrão, queimadura e imunossupressão indicam uma maior probabilidade de a lesão ser o queratoacantoma, assim como a transição abrupta entre a o epitélio saudável e a lesão, a ausência de pleomorfismo celular e ulceração²³. O queratoacantoma geralmente involui espontaneamente em um período de seis meses.

Histopatologicamente, o CEL constitui-se de uma neoplasia de epitélio, caracterizada pela proliferação de queratinócitos atípicos que invadem o tecido conjuntivo arranjados em ilhas e cordões. As ilhas neoplásicas apresentam limites precisos e geralmente apresentam pérolas córneas em seu interior, o que evidencia um alto grau de diferenciação dessa lesão. Focos de comedonecrose são raros nessa lesão. Os queratinócitos neoplásicos conservam muitas características morfológicas de diferenciação dos queratinócitos normais, pois apresentam formato poliédrico, evidenciado por citoplasma amplo com limites bem definidos e núcleo arredondado e central. No entanto, são observadas alterações nessas células como pleomorfismo celular e nuclear, presença de nucléolos proeminentes, alteração da relação núcleo/citoplasma, aumento do número de figuras de mitoses e presença de mitoses atípicas¹⁰.

O estroma da lesão é constituído por tecido conjuntivo denso em que se pode notar geralmente intenso infiltrado inflamatório mononuclear com áreas de coleções neutrofílicas¹⁰. A presença de mastócitos no estroma de CEL, detectada através de estudos imuno-histoquímicos para triptase, têm revelado se tratar de uma alteração no microambiente tumoral em estágios iniciais do desenvolvimento da lesão. Esse e outros indícios da participação do sistema imune no microambiente tumoral em casos de CEL vem despertando a atenção de pesquisadores, pois estudos tem revelado um papel importante desse sistema no reconhecimento das células neoplásicas, o que poderia limitar a invasão tumoral e evitar a disseminação de metástases²⁴.

O CEL apresenta uma tendência para extensão tanto em superfície como em profundidade. Nas fases iniciais de desenvolvimento, o CEL é estritamente localizado, porém, conforme vai adquirindo profundidade pode até mesmo atingir

gânglios linfáticos regionais, afetar a proximidade de tecido ósseo cortical, mas raramente emite metástases à distância²³.

A espessura de Breslow é um fator que utiliza a profundidade de invasão tumoral em cortes histológicos como indicador prognóstico de tumores de pele. A presença de espessura de Breslow maior que 4,8mm e infiltrado inflamatório plasmocitário são as características histopatológicas de tumores primários consideradas significantes para o desenvolvimento de metástase cervical em CEL²⁵.

O tratamento de eleição para casos de CEL é a remoção cirúrgica da lesão com margem de segurança. No entanto, características não relacionadas ao tumor como idade, condições sistêmicas do paciente, tempo, custo, resultados funcionais e cosméticos, bem como a experiência do cirurgião, também devem ser consideradas para determinar a modalidade de tratamento do paciente. Quando o diagnóstico é realizado precocemente, o prognóstico do CEL é bastante favorável e a taxa de metástases regionais e recidivas é bastante remota. No entanto, em tumores maiores, a remoção de grande quantidade de tecido é necessária e promove danos funcionais com relação à nutrição e fonação, além de danos estéticos devido à dificuldade de vedamento labial, que diminui a qualidade de vida desses indivíduos, a ponto de prejudicar o paciente até mesmo no âmbito psicológico e social. Por isso, muitas vezes, a remoção cirúrgica é seguida de reconstrução labial imediata, o que diminui as sequelas no paciente²⁶.

Até a década de 90, muitos casos de CEL eram tratados por radioterapia, por ser uma técnica que atingia o tumor pontualmente, diminuindo assim danos estéticos. Estudos evidenciaram que o índice de cura de pacientes com CEL em estágio I tratados por radioterapia é o mesmo de pacientes tratados cirurgicamente. Entretanto, o tratamento radioterápico resultou em maior incidência de metástases cervicais, por isso a radioterapia foi uma modalidade de tratamento abolida desde então²⁷.

Atualmente, a terapia fotodinâmica (PDT) vem sendo reportada como uma modalidade de tratamento para o CEL. Essa terapia visa a morte das células tumorais após a fotoativação de um agente que libera radicais livres de oxigênio ou oxigênio singlete intracelular após a sensibilização com o laser seco de argônio ou diodo, de comprimento de onda de 652nm e densidade de 20J/cm². Em 12 semanas

após a aplicação do PDT, 96% de todas as biópsias revelaram ausência de tumor, e os resultados funcionais foram excelentes, indicando um futuro promissor para essa modalidade tratamento²⁸.

O vermelhão do lábio é uma zona de transição entre a mucosa oral e a pele, compartilhando características de ambas. De um modo geral, considera-se que o CEL tenha características mais semelhantes ao carcinoma epidermoide de pele do que do intraoral, por serem lesões bem diferenciadas e apresentarem comportamento clínico pouco agressivo¹⁸. Essas características conferem ao CEL um prognóstico bastante satisfatório, quando comparado com os casos de CEIO, demonstrado pela sua taxa de sobrevivência de 90% em 5 anos, fato que pode também ser uma consequência do diagnóstico realizado em estágio inicial na maioria das lesões (T1 e T2)^{26,29}. No entanto, metástases linfonodais ocorrem em cerca de 5% a 20% dos pacientes com CEL, e essas taxas são maiores que as metástases de carcinoma epidermoide de pele (0,3% a 3,7%)^{4,30}.

Indícios do desenvolvimento de CEL podem ser notados clínica e histopatologicamente antes da invasão tumoral propriamente dita, e constituem-se pela presença de alterações na maturação, forma e tamanho dos queratinócitos, além de modificações nas fibras colágenas e elásticas, as quais definem a desordem potencialmente maligna queilite actínica (QA). Entretanto, o momento da transformação neoplásica é impossível de ser estimado, fato que dificulta a distinção clínica entre o início do desenvolvimento do CEL e uma QA com muitas alterações morfológicas no epitélio³¹. Assim, o diagnóstico eficiente e o acompanhamento de casos de QA são os mecanismos mais eficientes para uma intervenção precoce em casos de evolução para CEL^{32,33}.

2.2 Queilite Actínica

Em 1923, quando alterações na semimucosa de revestimento labial começaram a chamar a atenção de pesquisadores, acreditava-se que a QA consistia uma alteração inflamatória causada pela radiação UV. Sessenta anos depois, estudos demonstraram efeitos cumulativos da radiação UV nos tecidos e a QA passou a ser considerada a desordem potencialmente maligna que acomete o epitélio de semimucosa da zona de vermelhão de lábio. Com isso, o termo “queilite actínica” - que significa inflamação nos lábios promovida por alterações químicas resultantes da ação da radiação solar - apesar de imperfeito, é o mais antigo e mais utilizado para designar essa lesão, e por isso promove uma comunicação mais uniforme entre clínicos e patologistas³⁴.

A progressão lenta e assintomática da QA faz com que tal lesão seja considerada, pela maioria dos pacientes, uma condição normal do processo de envelhecimento. Esse fato revela a falta de informação da população sobre o risco de malignização dessa lesão, e uma negligência dos órgãos governamentais quanto à conscientização da população quanto ao poder de malignização promovido pelo agente etiológico dessa lesão³⁵.

Assim como no CEL, a QA acomete principalmente pacientes homens, leucodermas, maiores de 40 anos e que foram intensamente expostos à radiação solar na adolescência ou início da fase adulta. O número de mulheres com QA vem aumentando significativamente nas últimas décadas. Alguns fatores sociais que podem explicar essa tendência são: a maior participação feminina em atividades econômicas do setor primário da economia ou setor de serviços; e ao apelo estético a favor da pele bronzeada, uma característica cultural da população brasileira³².

Clinicamente, a QA apresenta-se sob duas formas distintas: a aguda e a crônica. A QA aguda é caracterizada por eritema e edema no lábio inferior, ou ainda fissuras e úlceras, embora não apresente alterações epiteliais irreversíveis. Ocorre devido á exposição intensa ao sol por um curto período de tempo. Já a QA crônica, a que vamos abordar com ênfase nesse estudo devido à presença de danos irreversíveis no epitélio e tecido conjuntivo adjacente, também é caracterizada por

aumento de volume no lábio inferior, o qual adquire consistência mais endurecida e encontra-se, na maioria dos casos, com aspecto ressecado, atrófico, opalescente e apresentando várias fissuras, de profundidade variável, paralelas entre si e perpendiculares à extensão do lábio. O lábio pode estar recoberto por placas brancas, acinzentadas ou acastanhadas, de espessura e extensão variável, com limites bem ou mal definidos, e que não são removidas à raspagem. Entretanto, áreas eritematosas são comumente observadas. Geralmente, as lesões são assintomáticas, mas prurido e queimação já foram sintomas relatados em grande parcela de pacientes. Um aspecto bastante marcante na QA é a perda de definição do limite entre a zona de vermelhão de lábio e a pele³⁶. Zonas de ulceração constituem um forte indício de que o processo já evoluiu para um CEL. Assim, frente a um caso de QA ulcerada, a realização da biópsia se faz essencial³⁵.

Histopatologicamente, a QA se apresenta como um fragmento de semimucosa revestida por epitélio pavimentoso estratificado orto ou paraqueratinizado. A camada de queratina apresenta espessura variável, assim como o número de camadas do epitélio, e a hipergranulose geralmente é um aspecto bem evidente. A característica mais importante da QA é a presença de diferentes graus de displasia epitelial, ou seja, a presença de alterações relacionadas tanto à forma quanto à maturação dos queratinócitos, fator considerado indicativo do processo de malignização do epitélio^{10,37}. O espessamento da camada de queratina também é uma característica histopatológica importante presente nos casos de QA. No trabalho desenvolvido por pesquisadores na Grécia, essa característica foi observada em 100% da amostra. No entanto, como esse não é um critério de atipia da Classificação da OMS, muitas vezes essa alteração não é avaliada³⁸.

Pelo fato de a QA ser considerada uma lesão com potencial de malignização, o grau de displasia epitelial não apenas dita a forma de tratamento como também traça o prognóstico da lesão⁷, embora os sistemas utilizados não apresentem embasamento científico para avaliar o risco de transformação maligna de casos de QA, pois foram elaborados a partir de estudos observacionais do comportamento de casos de leucoplasias intraorais, lesões de etiologia e comportamento clínico completamente diferentes da QA³⁷. De qualquer forma, casos de QA que apresentam poucas alterações epiteliais arquiteturais e citológicas

costumam ser acompanhados clinicamente ou tratados de forma conservadora, pois até o momento acredita-se que esses casos exibem uma baixa probabilidade de transformação maligna para CEL. Já casos de QA com grande número de alterações morfológicas epiteliais, sejam elas tanto relacionadas com o processo de maturação como com o tamanho e forma dos queratinócitos, costumam ser tratadas de forma radical, pois acredita-se que esses casos exibem grande probabilidade de evoluir para CEL³⁵.

No tecido conjuntivo, a QA apresenta uma faixa de material basofílico amorfo e acelular denominada elastose solar ou degeneração basofílica do colágeno, geralmente situada na porção superior da lâmina própria. Infiltrado inflamatório crônico também está comumente presente na lâmina própria, em variados graus, e situado difusamente ou ao redor de vasos sanguíneos, os quais podem se apresentar dilatados³⁹.

A observação ultraestrutural de áreas de elastose solar demonstrou que essa região é subdividida em três porções: a fibrosa, a granular e a homogênea. A área fibrosa é constituída por um emaranhado de fibras elásticas espessas. E acredita-se que as áreas granular e homogênea são o resultado da fragmentação dos elementos da camada fibrosa^{40,41,42}.

A composição e a origem da elastose solar ainda não são entendidas ao certo. Até o início do século XXI, duas vertentes de conhecimento dividiam a opinião dos pesquisadores quanto à patogênese da elastose solar: a teoria da síntese e a teoria da degradação. A teoria da síntese afirmava que a elastose solar originava-se do aumento na deposição de elastina, fibrilina e glicosaminoglicanas (especialmente ácido hialurônico e vesican) por fibroblastos da derme ativados pelo espectro B da radiação ultravioleta (UVB), e também por mastócitos. Já a teoria da degradação revelava que a elastose solar era o resultado da deterioração de fibras elásticas e colágenas por aumento da secreção de metaloproteinases e matrissinas pelo próprio tecido conjuntivo e pelo epitélio, frente à exposição excessiva de radiação UVB⁴³.

Atualmente, uma teoria sobre a patogênese da elastose solar que vem ganhando notoriedade inclui a participação de neutrófilos nesse processo, o qual ocorreria da seguinte forma: a exposição à radiação UV da luz solar, a partir de um certo limiar de estress oxidativo, induz a migração de células inflamatórias, incluindo

neutrófilos, para essa região do tecido afetada. Os neutrófilos atuam liberando enzimas, que primeiramente degradam fibras colágenas e elásticas, como a neutrófilo-elastase e as metaloproteinases de matriz 9 e 12. Essas células inflamatórias também promovem a liberação de citocinas, as quais recrutam células para iniciar a reparação do tecido conjuntivo afetado, e consequentemente aumentam a produção de fibras colágenas, elásticas e substância fundamental amorfa. No entanto, esse tecido é apenas parcialmente reparado, e quanto maior a intensidade e o tempo de exposição à radiação UV, ou seja, conforme o processo vai se tornando um evento crônico, maior o acúmulo de danos, resultando na elastose solar⁴⁴.

Essa teoria, no entanto, vem recebendo críticas bastante consideráveis, pois os neutrófilos e as enzimas de degradação de matriz extracelular por eles liberadas são observadas apenas em células recentemente expostas à UV, e não em material congelado ou parafinado. Além disso, a expressão de enzimas metaloproteinases de matriz extracelular (MMPs) foi mais abundante em fibroblastos e queratinócitos, não em células inflamatórias⁴⁵.

Como comentado anteriormente, o tratamento da QA pode ser conduzido tanto de forma radical como de forma conservadora, dependendo do nível de alterações morfológicas evidenciado no epitélio no exame anátomo-patológico. A forma de tratamento conservadora consiste na aplicação tópica de produtos como o 5-fluorouracil, um agente antineoplásico; o imiquimod, que auxilia o sistema imune a reconhecer células danificadas, e o *peeling* químico ou dermoabrasão, que remove as camadas superficiais do epitélio e a crioterapia⁴⁶. Já a forma radical baseia-se principalmente em métodos cirúrgicos.

O uso dos quimioterápicos 5-fluororacil e imiquimod promove muitos efeitos colaterais, como um desconforto que muitas vezes não é tolerado pelo paciente com QA. Além disso, são relatadas recidivas de displasia epitelial após algum tempo⁴⁷.

A quimioexfoliação e dermoabrasão são modalidades de tratamento menos utilizadas e conhecidas em casos de QA⁴⁸.

A crioterapia é utilizada em casos de QA com pequena extensão. Suas desvantagens residem na falta de controle e falta de padronização do tempo de aplicação do nitrogênio líquido⁴⁹.

A vermelhonectomia, ou seja, a remoção total da espessura do lábio, é a modalidade de tratamento mais utilizada em casos de QA. Embora bastante eficaz quanto à remoção da lesão e ao baixo índice de recidivas, a vermelhonectomia merece grande atenção quanto a sua aplicabilidade, devido ao difícil pós-cirúrgico e resultados estéticos pouco satisfatórios, como a perda de contorno do lábio, presença de cicatriz e parestesia⁴⁸. A cirurgia realizada com laser de dióxido de carbono, apesar de apresentar menores complicações estéticas, exibiu um maior número de recidivas e pode ainda mascarar um epitélio já infiltrativo. Assim, recomenda-se que pacientes de QA submetidos a esse tratamento sejam acompanhados a longo prazo⁵⁰.

O meio mais obvio de prevenir danos causados pelo sol nos lábios é evitar a exposição direta e por longo período ao sol. Entretanto, algumas atividades profissionais dificultam esse método de prevenção. O uso de protetores solares labiais possuem componentes químicos com a função de absorver ou refletir a luz do sol. Tais moléculas são o ácido para-aminobenzoico (PABA), benzofenóis, salicilatos, dióxido de titânio ou óxido de zinco. No entanto, como a semimucosa do lábio permanece úmida algumas vezes, a efetividade desses produtos diminui bastante, mesmo quando diluídos em bases de cremes com derivados de petróleo⁵¹.

Tanto o CEL quanto a QA são causados pelo mesmo agente etiológico: a radiação UV, em um processo denominado fotocarcinogênese, por meio do qual ocorrem alterações genéticas que podem causar a iniciação, progressão e promoção de neoplasias. A radiação UV possui, também, a capacidade de atuar sobre as células do sistema imune prejudicando a resposta imunológica contra antígenos neoplásicos, o que caracteriza o fenômeno da imunotolerância⁵².

2.3 Fotocarcinogênese

A radiação solar, além de constituir a maior fonte de energia do planeta Terra, é elemento essencial para todas as formas de vida aqui existentes, pois ela aquece os seres vivos, é a base energética de moléculas para a realização da fotossíntese, participa da biossíntese de vitamina D, além de apresentar poder bactericida. Entretanto, sua componente UV causa danos irreversíveis no corpo humano quando em excesso, sendo os órgãos mais afetados a pele e os olhos, principalmente por estarem mais expostos ao meio ambiente⁵³.

A semimucosa da zona de vermelhão de lábio, assim como a pele, é um órgão altamente dinâmico e protetor, e apresenta duas propriedades ópticas importantes: a absorção e a reflexão. A absorção ocorre principalmente no estrato córneo e na camada espinhosa do epitélio, que exibe estrutura compacta e contém proteínas e pigmentos para absorver a radiação UV. Já a reflexão ocorre principalmente na lâmina própria, pela presença de fibras colágenas, que formam uma camada espessa e acelular⁵³.

A melanina é um importante cromóforo, ou seja, substância que age como um filtro absorvendo radiação visível e infravermelha, ajudando a transformar essa energia em calor e dispersá-la entre os pelos e capilares. A melanina também é um ligante de radicais livres, como os radicais hidroxila ou oxigênio molecular, contribuindo, assim, para preservar o ácido desoxirribonucleico (DNA) da base de formação de fotoprodutos. No entanto, na deficiência de produção de melanina, a pele fica mais susceptível aos efeitos deletérios da radiação UV⁵³.

A radiação UV é parte do espectro de radiação eletromagnética, a qual se propaga tanto sob a forma de ondas contínuas como também em pequenos pacotes de energia denominados fótons. Tal espectro inclui radiações de pequeno comprimento de onda, como raios X e raios γ , como também radiações de grande comprimento de onda, como as micro-ondas⁵³.

A radiação UV está dividida em três espectros: espectro A de radiação UV (UVA), UVB e o espectro C de radiação UV (UVC), dependendo do comprimento de

onda. Embora a radiação UVA apresente o maior comprimento de onda (320 nm a 400 nm), ela ultrapassa totalmente a camada de ozônio sem ser absorvida, e atinge a superfície da Terra e os seres humanos. O papel da radiação UVA nos tecidos biológicos ainda não é bem entendido, pois na maioria dos experimentos realizados não é possível reproduzir um espectro de emissão semelhante à UVA. Sabe-se que essa radiação promove mutações em queratinócitos, porém a uma taxa bem menor que a radiação UVB, mas estudos vem demonstrando uma participação importante desse espectro de radiação na gênese do melanoma⁵⁴. Além disso, a radiação UVA também contribui de forma menos direta, mas não menos efetiva, na progressão tumoral, por gerar espécies reativas de oxigênio e radicais livres que podem degradar moléculas importantes para a manutenção da estabilidade do genoma⁵⁵. Os raios UVB exibem comprimento de onda de amplitude intermediária (290 nm a 320 nm), sendo parcialmente absorvidos pela camada de ozônio. A parte da radiação UVB que atinge a superfície terrestre e pode ser absorvida por proteínas e ácidos nucleicos, o que causa sérios danos biológicos em tecidos humanos, sendo um de extrema importância o desencadeamento da fotocarcinogênese. Os raios UVC possuem comprimento de onda de 200 nm a 290 nm, e por isso apresentam grande poder de penetração nos tecidos. Mas, como são totalmente absorvidos pela camada de ozônio, não causam lesões em seres vivos. Por isso, medidas de contenção e reversão dos danos na camada de ozônio devem ser uma preocupação constante de órgãos públicos⁵³.

Quando os fótons de energia da radiação UV são absorvidos por moléculas biológicas em queratinócitos, promove-se uma alteração na distribuição de elétrons, o que eleva o estado energético da molécula para o chamado estado singlete. Dessa forma, a molécula pode emitir fluorescência, perder energia na forma de calor, sofrer reação fotoquímica e formar fotoprodutos ou ir para o estado tripleto. No estado tripleto, a molécula também pode emitir fluorescência, reagir fotoquimicamente ou voltar para seu estado energético basal⁵⁶.

No comprimento de onda da radiação UVB, os fótons são altamente energéticos e podem ser eficientemente absorvidos por várias moléculas biológicas, como a melanina, o caroteno, o ácido hialurônico, aminoácidos e a molécula de DNA genômico, — o maior cromóforo para a radiação UVB⁵⁷.

Quando os fótons da radiação UVB são absorvidos pelo DNA de queratinócitos situados na zona de vermelhão de lábio, cria-se um estado de excitação energética que leva a um rearranjo de elétrons. Tal rearranjo eletrônico resulta na formação de uma ligação covalente entre duas bases pirimidinas consecutivas, formando uma estrutura em anel envolvendo os carbonos na posição 5 (C5) e na posição 6 (C6) de bases nitrogenadas que podem ser citosina-timina (C—T) ou citosina-citosina (C—C), constituindo assim os dímeros de pirimidina ciclobutano (CPD). Outro fotoproduto formado é o pirimidina (6-4) pirimidona (6-4PP), que apresenta a ligação covalente não cíclica entre os carbonos C6 (da terminação 5') e da posição 4 (C4) (da terminação 3') estabelecida por rearranjo espontâneo entre pirimidinas⁵⁸.

O efeito total dos CPDs na estrutura do DNA resulta no pareamento alterado de bases nitrogenadas de Watson e Crick. Já o 6-4PP induz uma grande distorção na hélice de DNA e rompe pontes de hidrogênio no sentido 3' da lesão. Assim, ambos fotoprodutos são considerados lesões pré-mutagênicas⁵⁹.

Recentemente, foi demonstrado que a formação do fotoproduto CPD ocorre com radiações eletromagnéticas com comprimento de onda a partir de 315nm, com pico de formação em comprimentos de onda entre 305nm a 291nm, que compreende a faixa de radiação UVB a UVC. Já o fotoproduto 6-4PP é formado principalmente na faixa de comprimento de onda entre 270nm a 261nm, que abrange apenas o espectro de radiação UVC. Além de promover a formação de fotoprodutos, principalmente o CPD, o espectro de radiação UVB é importante na ativação de checkpoints na fase S do ciclo celular, para que os sistemas de sinalização reconheçam os danos no DNA causados pela radiação UV e reduzam a probabilidade de que essas alterações sejam replicadas, o que diminui potencialmente o risco de indução de mutações⁶⁰. Como o espectro de radiação UVC é quase que totalmente barrado pela camada de ozônio, conclui-se que o CPD é o principal efeito biológico da radiação UV sobre a molécula de DNA⁵⁴.

Além da característica estrutural dos fotoprodutos, a extensão do dano no DNA promovida pela radiação UV é determinada por outros fatores, sendo um ponto bastante importante a atuação de enzimas replicativas. A família de polimerases gama (Pol γ) é encontrada tanto em bactérias como em células eucarióticas, e seu

papel, demonstrado por estudos *in vitro* e *in vivo*, é fundamental para a acurácia e eficiência da replicação, pois consiste em inserir bases nitrogenadas, promovendo o pareamento correto desses elementos, para que ocorra a formação da fita de DNA^{59,61}. A atuação da família de polimerases γ frente ao dano no DNA promovido pela radiação UV vem ganhando grande notoriedade na literatura.

Em humanos, a família γ de polimerases é representada por quatro tipos de polimerases: a DNA polimerase eta (pol η), a DNA polimerase kappa (pol κ), DNA polimerase iota (pol ι) e Rev 1 (proteína de reparo do DNA Rev1). A pol η é a grande responsável pela inserção de bases nitrogenadas livre de erros no DNA, mesmo com a presença do fotoproduto CPD. No entanto, uma desordem autossômica recessiva no gene humano *POLH* (gene codificador da polimerase direta de DNA ETA) causa a síndrome variante da xerodermia pigmentosa (XP-V), em que foi notada a inativação da enzima pol η , e consequentemente uma taxa maior de erros no pareamento de bases nitrogenadas nas fitas de DNA após a exposição à radiação UV^{59,62}. As polimerases κ e Rev 1 são incapazes de incorporar nucleotídeos timina opostos à região 3' do CPD, e a pol ι tem demonstrado uma capacidade limitada de inserção de T-T nesse fotoproduto. A inserção de bases nitrogenadas de DNA dependente de pol ι na presença de CPD é altamente propensa ao erro, pois ocorre a inserção de uma base adenina na região dos dímeros de pirimidina, que, no momento da replicação celular seguinte será pareada com uma base timina, constituindo a mutação C-T, denominada “mutação com assinatura UV”, o que demonstra a hipermutabilidade no DNA na presença de dímeros CPD⁶³.

Além de a família γ de polimerases exercer um considerável papel na síntese de CPD, essas enzimas também estão envolvidas em erros na replicação da molécula de DNA frente à presença do fotoproduto 6-4PP em células normais. As polimerases pol η e pol ι são as únicas capazes de incorporar nucleotídeos opostos à timina na direção 3' da fita de DNA contendo o fotoproduto 6-4PP, sendo que a pol η insere preferencialmente a base nitrogenada guanina. Esse erro de pareamento, no momento da replicação da molécula de DNA, promove o aumento da mutagenicidade. Já a pol ι insere uma base nitrogenada adenina na fita oposta à timina da região 3' da molécula de DNA contendo o fotoproduto 6-4PP. A

participação da pol ι em detrimento da pol η resulta em uma menor taxa de mutação, sendo um fator positivo para a célula 6-4PP afetada⁵⁹.

Geralmente, os danos no DNA induzidos por radiação UV são reparados por um mecanismo denominado reparo por excisão de nucleotídeo, o qual consiste na incisão na estrutura fosfodiéster da cadeia principal da molécula de DNA por endonucleases. Em seguida, tal fragmento envolvendo o nucleotídeo danificado é removido e ocorre a polimerização e síntese do fragmento substituto, o qual será inserido na fita de DNA parental⁵⁵. Estudos revelaram que o reparo de fotoprodutos CPD na pele humana, após níveis de exposição fisiológica à radiação UV foi lento, pois esse tipo de dano no DNA ainda estava presente sete dias após a exposição. Em contraste, a pele humana apresenta um reparo rápido e preferencial pelo fotoproduto 6-4PP, com meia-vida de permanência dessas lesões de apenas 2,3 horas. Tal fato indica uma maior eficiência dos mecanismos de reparo em danos que promovem distorção na hélice da fita de DNA⁵⁵.

Se os fotoprodutos CPD e 6,4PP presentes no DNA não forem reparados, será perpetuada a mutação citosina-timina (C-T) ou dímeo citosina-citosina timina (CC-TT), que por ser uma marca característica de danos promovidos pela radiação UVB no DNA é conhecida também pelo termo “mutação com assinatura UV”⁵³. Os genes em que essa mutação já foi observada com maior frequência são: o gene produtor da proteína tumoral 53 (*TP53*)⁶⁴, o gene de aprisionamento do crescimento e dano celular (*GADD45*)⁶⁵, o gene de proliferação celular da família “ras” (*NRAS*)⁶⁶ e o gene codificador da proteína homóloga de replicação de murinos (*MDM2*)⁶⁷.

A célula de queimadura solar (do inglês “*sunburn cells*”) representa queratinócitos com danos genéticos irreparáveis e persistentes causados pela radiação UV que estão sofrendo apoptose. Esse é um mecanismo de defesa do organismo para eliminar células mutagênicas que podem dar origem a um processo neoplásico. A célula de queimadura solar exibe características morfológicas de queratinócitos apoptóticos, como núcleo picnótico e citoplasma contraído, e são primeiramente observadas em células escassas da camada basal. No entanto, com o passar do tempo após a exposição solar, as células de queimadura solar acumulam-se tipicamente nas camadas suprabasal e intermediária do epitélio⁵⁷.

O conhecimento de genes envolvidos no processo de fotocarcinogênese e o detalhamento de ações ocorridas durante esse fenômeno é de extrema importância para tentar barrar o processo antes da invasão neoplásica.

2.4 Bases moleculares da fotocarcinogênese e marcadores biológicos de transformação maligna

O desenvolvimento do CEL e do carcinoma epidermoide de pele estão relacionados à presença de múltiplas alterações genéticas. No entanto, as mutações que acometem genes responsáveis pela manutenção da estabilidade do genoma, como proto-oncogenes, genes supressores de tumor, genes de reparo do DNA e genes codificadores de telomerasas, são as mais críticas em termos de indução neoplásica. Por esse motivo, as pesquisas vêm se desenvolvendo no sentido de desvendar o mecanismo de atuação desses genes alterados e seus respectivos produtos, principalmente durante o processo de transformação maligna de várias lesões com potencial de evoluir para carcinoma epidermoide⁶⁴.

O gene *TP53* é um gene supressor de tumor que tem sido detectado em 50% dos cânceres humanos e em quase todos os tipos de carcinomas de pele. Nesses casos, esse gene exibe, na maioria das vezes, mutações missense, as quais resultam na produção de uma proteína com função alterada, ou apresentam perda de heterozigose⁶⁸.

O gene *TP53* codifica uma proteína, a p53, a qual exibe 53 kD e promove o aprisionamento do ciclo celular e ativação dos programas de morte celular. Assim, frente à situação de estresse como a exposição excessiva à radiação UV, há um aumento nos níveis da proteína p53, pois essa deixa de formar o complexo com a proteína MDM2 e ser ubiquitinada via proteossoma. Em seguida, uma maior quantidade de proteína p53 migra para o núcleo e passa a atuar como um fator de transcrição⁶⁹.

A proteína p53 atua como fator de transcrição através da ativação de diversos genes, como o codificador da proteína p21 (gene ativador do produto de p53 fragmento 1 tipo nativo), o qual irá evitar a fosforilação do gene do retinoblastoma via inibição das proteínas quinases dependentes de ciclina 4 (CDK4) e 2 (CDK2), levando à manutenção do complexo Rb-E2F (proteína do retinoblastoma e dímero fator epidérmico 2), que por sua vez promove o aprisionamento na fase 1 de crescimento do ciclo celular (G1), permitindo um tempo

maior para o reparo de danos no DNA antes da mitose para a divisão celular. A proteína p53 também estimula a translocação da proteína BAX (proteína tipo-bcl2 4) do núcleo para o citoplasma. A proteína BAX substitui a proteína de apoptose linfoma de célula B2 (BCL2) na membrana mitocondrial, aumentando a permeabilidade dessa estrutura, a qual libera citocromo C, induzindo, assim, as vias de apoptose para a eliminação de células que contém danos excessivos no DNA⁶⁹.

Mutações no gene *TP53* são consideradas eventos precoces na fotocarcinogênese, pois foram identificadas no tecido normal adjacente ao carcinoma epidermoide de pele e em 60% de casos de queratose actínica, sugerindo que essa lesão é uma expansão clonal de queratinócitos p53 mutado. Estudos demonstraram, ainda, que em casos de queratose actínica, a radiação UV além de induzir mutações no DNA de queratinócitos, direciona a expansão clonal por aumentar os níveis de apoptose em células adjacentes normais. Esse fato, associado à vantagem proliferativa de queratinócitos p53 mutado, favorece uma repopulação do tecido epitelial com células alteradas⁷⁰.

Tais papéis exercidos pela proteína p53 fazem com que ela seja a mais estudada até então. Nosso grupo de pesquisa desenvolveu alguns trabalhos utilizando a expressão imuno-histoquímica da proteína p53 clone Pab240, um antígeno que reconhece um conjunto de 5 aminoácidos resultante de um dobramento da proteína p53 devido à mutação do gene *TP53*. Assim, esse antígeno é considerado específico na detecção de proteína p53 mutada⁷¹. Em casos de QA solitárias, ou seja, as quais os cortes histológicos não apresentam traços de invasão neoplásica, a expressão de proteína p53 PAb240 foi observada em todos os graus de displasia epitelial, sendo 22,22% em casos graduados como lesões de baixo risco e 25% de casos graduados como displasia epitelial discreta³⁷. A expressão do anticorpo anti-proteína p53 mutada ficou mais evidente quando observada em casos de QA adjacente ao carcinoma epidermoide de lábio, em que 80% dos casos considerados lesões de baixo risco foram positivos para esse marcador, assim como 73,3% dos casos de displasia epitelial discreta¹⁰. Esse fato indica uma grande capacidade de detecção de alterações na proteína p53 desde as fases precoces da fotocarcinogênese por esse anticorpo, revelando indícios de que, no futuro, esse marcador pode ser utilizado para determinar o prognóstico de casos de QA.

Como citada anteriormente, uma importante proteína regulada por p53 e envolvida no desenvolvimento de muitas neoplasias é a proteína do retinoblastoma (pRb). A proteína pRb é codificada pelo gene do retinoblastoma (*RB1*), localizada no 13q14.1-q14.2. A denominação desse gene é decorrente do desenvolvimento de uma neoplasia em células da retina após a exposição excessiva à radiação UV devido à mutação inativadora presente nesse locus gênico em fases precoces do desenvolvimento humano⁷².

A proteína pRb restringe a habilidade de replicação do DNA da célula, impedindo a progressão do ciclo celular da fase G1 para a fase S (período “sintético” do ciclo celular). Nesse processo, as quinases dependentes de ciclina p16 e ciclina D1 impedem a fosforilação da proteína pRb. Assim, a proteína pRb liga-se ao dímero fator epidérmico (E2F), formando um complexo proteico que impede a ligação do dímero E2F ao DNA, e ao inativar o dímero E2F, tal complexo age como um supressor de desenvolvimento celular, impedindo a progressão do ciclo. O complexo proteína do retinoblastoma e dímero fator epidérmico 2 difosforilado (pRb-E2F/DP) também atrai as histonas deacetilases para a cromatina, reduzindo a transcrição dos genes promotores da fase S, consequentemente, suprimindo a síntese de DNA. No entanto, frente a uma inativação da proteína pRb ou a sua fosforilação, não há a formação do complexo pRb- E2F/DP, e o dímero E2F liga-se ao DNA, ativando genes de síntese de DNA e promovendo a progressão do ciclo celular para a fase S⁷².

Outra alteração relacionada à presença de mutações no gene *RB* e/ou a inativação da proteína pRb foi um aumento do número de aneuploidias e instabilidade cromossômica nas células neoplásicas. Esse fato decorre de uma falha na organização do centrôssomo e consequente deficiência na formação do fuso mitótico, o que impede uma coesão adequada dos cromossomos no momento da mitose, resultando na formação de células com um número de cromossomos desigual, sendo umas com perdas outras com ganhos. Assim, essa instabilidade cromossômica favorece o desenvolvimento de neoplasias⁷³.

A via da proteína pRb é bastante estudada na carcinogênese intraoral, como um mecanismo para tentar determinar a taxa de transformação maligna de leucoplasias com displasia epitelial para carcinoma epidermoide. Estudos

demonstraram que a perda de expressão da proteína Rb foi observada em 47% dos casos de tecidos normais adjacentes a carcinomas epidermóides intraorais, e enquanto que lesões potencialmente malignas não demonstraram alteração de expressão da proteína pRb. Esse fato sugere que as alterações na atuação da proteína pRb ocorrem em fases tardias do processo de carcinogênese intraoral⁷⁴. Na fotocarcinogênese de lábio, a expressão dessa proteína ainda não foi estudada.

Outro marcador de proliferação celular, evidenciado nas fases G1, S e G2 (fase de crescimento 2 do ciclo celular) bem como durante a mitose é o antígeno proteína de proliferação celular Ki-67 (Ki-67). Esse antígeno foi gerado através da linhagem celular L428 de linfoma de Hodgking em ratos imunizados. O nome desse antígeno deriva da cidade de origem do experimento (Kiel) e o número do clone original⁷⁵.

A caracterização do anticorpo Ki-67 revelou um interessante padrão de marcação, pois foi reativo exclusivamente na estrutura nuclear de células proliferantes. Em seguida, uma análise detalhada do ciclo celular revelou que tal antígeno estava presente no núcleo de células nas fases G1, S e G2, assim como na fase de mitose. Células quiescentes ou na fase de crescimento do ciclo celular 0 (G0) não expressaram o antígeno Ki-67. Pelo fato desse antígeno estar presente em células proliferantes normais ou neoplásicas, a expressão desse antígeno é considerada um excelente marcador biológico para determinar o índice de proliferação de uma determinada população celular. Por essa razão, esse anticorpo é amplamente utilizado como ferramenta diagnóstica de diferentes tipos de neoplasia⁷⁵.

A expressão de Ki-67 vem sendo utilizada para determinar o índice de proliferação celular em diversos tumores, vários autores têm tentado analisar a relação entre a proliferação celular da neoplasia e o prognóstico dos pacientes. Em casos de carcinoma epidermoide intraoral, a proteína Ki-67 foi altamente expressa em 87,5% dos casos de pacientes que apresentaram metástases em linfonodos cervicais¹¹. A análise da expressão de Ki-67 nas diferentes fases da fotocarcinogênese de lábio revelou positividade desse marcador principalmente nas camadas basal e parabasal do epitélio, mesmo em casos de lábio normal. No entanto, o número de células positivas foi baixo e não revelaram diferença

significativa entre um grau de displasia epitelial e outro³⁷. Apesar de ter sido analisada nos diferentes estágios da fotocarcinogênese de lábio, a expressão dessa proteína ainda não foi avaliada em casos de QA com evolução para CEL.

2.5 Características morfológicas de transformação maligna

As teorias mais aceitas para a iniciação, progressão e metástase do CEL, do carcinoma epidermoide de pele e do CEIO revelam que a exposição contínua a carcinógenos, como a radiação ultravioleta, o tabaco e o álcool, leva a danos irreparáveis no DNA de queratinócitos, promovidos por mutações aleatórias. No entanto, quando essas mutações ocorrem em sequências genéticas que regulam a estabilidade do genoma, a cada geração de clones de queratinócitos alterados, essas mutações propiciam o aparecimento de outras novas mutações, e assim, essas células adquirem uma vantagem seletiva com relação às células normais, pois resistem à falta de suprimento sanguíneo e linfático, possuem maior mobilidade e capacidade de migração e também resistem ao ataque do sistema imune de defesa do hospedeiro. Esses queratinócitos mutados podem apenas apresentar distúrbios na maturação, forma e tamanho, porém sem invadir o tecido adjacente, constituindo assim as lesões com potencial de transformação maligna como a QA, a queratose actínica e as leucoplasias orais com displasia epitelial; ou os queratinócitos podem apresentar um nível de alterações genéticas que os leva a invadir o tecido adjacente e constituir a neoplasia epitelial em semimucosa de vermelhão de lábio, pele ou mucosa oral^{5,6}. Devido a esse fato, as alterações de forma e tamanho dos queratinócitos, ou seja, a presença de displasia epitelial, foi um dos primeiros mecanismos estudados para desvendar indícios do processo de transformação maligna epitelial, e é um parâmetro utilizado até os dias atuais para determinar o tratamento e o prognóstico das lesões com potencial de transformação maligna^{9,76}.

Em sua última publicação em 2005, a OMS aprimorou os critérios de seu sistema de graduação de displasias epiteliais, o qual se baseia na presença de distúrbios relacionados tanto à maturação do epitélio – as alterações arquiteturais – quanto à modificações no tamanho e forma de queratinócitos – as alterações citológicas. A presença desses distúrbios nos terços da espessura do epitélio distribui as lesões potencialmente malignas em três categorias: as lesões com displasia epitelial discreta, ou seja, quando as alterações arquiteturais e citológicas acometem apenas o terço inferior do epitélio; a displasia moderada, quando as alterações atingem o terço médio do epitélio, e as desordens com displasia epitelial

severa, isto é, aquelas que apresentam distúrbios arquiteturais e citológicos além dos dois terços da espessura do epitélio⁷⁶.

Os distúrbios arquiteturais determinados pela OMS são: estratificação epitelial irregular, perda da polaridade das células do estrato basal, projeções epiteliais em forma de gota, aumento do número de figuras de mitose, mitose anormalmente superficiais (mitoses altas), queratinização prematura em células isoladas (disqueratose) e pérolas de queratina em projeções epiteliais. Já os critérios citológicos são: variação anormal de tamanho do núcleo (anisonucleose), variação anormal da forma do núcleo (pleomorfismo nuclear), variação anormal de tamanho da célula (anisocitose), variação anormal da forma da célula (pleomorfismo celular), proporção núcleo/citoplasma aumentada, aumento no tamanho do núcleo, figuras de mitose atípicas, número e tamanho de nucléolos aumentados e hipercromatismo⁷⁶.

Apesar de ser o mais utilizado, o sistema de graduação de displasias epiteliais da OMS exibe várias características em seu mecanismo de funcionamento que implicam em grande subjetividade no diagnóstico final. Algumas regras são confusas para muitos patologistas, por exemplo, a presença de atipia celular acentuada eleva o grau de displasia epitelial, mesmo que essas alterações não se estendam para o terço superior do epitélio^{10,76}.

Além dessa questão, o sistema da OMS atribui divisões arbitrárias em três categorias de um processo como o de malignização que é contínuo, ou seja, não há um ponto de corte que determine o limite entre um grau de displasia e o início do outro, fato que contribui para uma subjetividade nesse sistema^{9,77}. No entanto, o problema mais complicado do sistemas de graduação da OMS é que não há indícios na literatura de que ele tenha sido validado a partir do acompanhamento de lesões com potencial de transformação maligna, e não são demonstrados quais critérios podem de fato influenciar no processo de transformação maligna. A importância de cada critério arquitetural e citológico que leva ao diagnóstico final é determinada pela experiência de cada patologista⁷⁸.

Esses fatores podem levar à falta de acurácia desse sistema em determinar o prognóstico das lesões potencialmente malignas. Um estudo de acompanhamento clínico revelou que entre 16 casos de leucoplasia com displasia epitelial moderada,

que geralmente são tratadas de forma conservadora, 14 tiveram evolução para carcinoma epidermoide de lábio, demonstrando a falha do sistema em traçar o prognóstico de lesões potencialmente malignas e a necessidade de acompanhamento clínico rigoroso mesmo em casos com poucas alterações morfológicas⁹. Além da subjetividade e falta de valor prognóstico, a falta de concordância entre observadores também é um problema notável nesse sistema, pois a pesquisa de Karaburut e colaboradores revelou que o mesmo fragmento de biópsia teve diagnósticos diferentes, variando de displasia a carcinoma *in situ*, fato que pode prejudicar muito a conduta a ser estabelecida nesse paciente⁷⁹.

Na tentativa de minimizar a subjetividade e a falta de concordância entre patologistas em se determinar o grau de displasia epitelial de desordens potencialmente malignas, Kujan e colaboradores⁹, através de uma pesquisa de acompanhamento clínico de casos de leucoplasia, elaborou um sistema de graduação baseado nos mesmos critérios arquiteturais e citológicos da OMS. Durante a elaboração do projeto piloto para esse estudo, foi notado que a maioria das lesões displásicas que tiveram progressão para carcinoma epidermoide intraoral apresentavam pelo menos quatro distúrbios arquiteturais e cinco alterações citológicas, estabelecendo-se assim um ponto de corte para as lesões de “alto risco” de malignização. Da mesma forma, a observação das lesões com displasia epitelial que não evoluíram para carcinoma epidermoide revelou a presença de menos que quatro alterações arquiteturais ou menos que cinco alterações citológicas, determinando-se o limiar das lesões de “baixo risco” para transformação maligna⁹.

A utilização do sistema binário para a graduação de displasias epiteliais demonstrou uma maior concordância inter-observadores, com valores de kappa variando entre 0,35 a 0,67. Já o sistema da OMS revelou uma concordância com valores de kappa entre 0,06 a 0,43. Os autores atribuem a discordância entre patologistas quanto ao grau de displasia do sistema da OMS à falta de critérios quantitativos, uma vez que o reconhecimento dos critérios arquiteturais e citológicos é subjetiva⁹.

A utilização de um escore quantitativo de características morfológicas para definir o grau de displasia no sistema binário também demonstrou um melhor valor preditivo, com sensibilidade de 85% e especificidade de 80%. O trabalho de Kujan

evidenciou o pobre valor preditivo do sistema de graduação da OMS através da graduação de 49 lesões com poucas alterações morfológicas (2 hiperplasias, 17 displasias discretas e 30 moderadas), das quais 17 sofreram transformação maligna, sendo 1 caso de hiperplasia epitelial, 2 de displasia discreta e 14 de displasia moderada⁹.

A elaboração de um sistema com apenas duas categorias, por imprimir uma maior concordância entre observadores e um melhor valor prognóstico, também auxiliou a direccionar uma conduta clínica mais adequada para o paciente, pois os casos de lesões de baixo risco, por apresentarem poucas alterações morfológicas no epitélio, podem ser apenas acompanhados clinicamente ou tratados de forma conservadora. Já os casos de lesões de alto risco, por apresentarem muitas alterações arquiteturais e citológicas, são tratados de forma radical, muitas vezes com excisão cirúrgica da lesão. O sistema binário auxiliou, ainda, a determinar uma categoria mais exata para os casos que apresentem características morfológicas intermediárias entre duas categorias do sistema da OMS, por exemplo “displasia epitelial de discreta a moderada”, fato que leva a uma conduta clínica precisa para o paciente⁹.

Apesar de alguns casos de lesões de baixo risco terem evoluído para carcinoma epidermoide, os criadores do sistema binário ainda acreditam que as características morfológicas do epitélio fornecem dados reproduzíveis e indicativos do processo de transformação maligna⁹.

No entanto, além do fato de o sistema binário ter sido elaborado a partir dos mesmos critérios arquiteturais e citológicos da OMS que são subjetivos, a aplicabilidade do sistema foi realizada através do acompanhamento de casos de leucoplasias orais, e não existem estudos com essa finalidade em casos de queilite actínica^{10,37}.

Um dos poucos estudos sobre o grau de displasias epiteliais em desordens potencialmente malignas de vermelhão de lábio foi o de Pimentel⁸⁰. Em sua pesquisa, foi utilizado o sistema de classificação histológica de queratoses actínicas cutâneas em casos de QA adjacente ao CEL para tentar estabelecer uma correlação entre o tipo histológico e a possibilidade de a lesão sofrer transformação maligna.

Embora a presença de atipia leve tenha sido detectada com maior frequência em QA na margem de CEL, esse dado não foi estatisticamente significativo, talvez pelo fato de que o aspecto clínico das queratoses actínicas utilizados como base para esse sistema de graduação sejam completamente diferentes da QA⁸⁰.

A presença de poucas alterações morfológicas em casos de QA adjacentes a CEL também foi um resultado evidenciado por pesquisas realizadas pelo nosso grupo, nas quais detectamos mais de 80% dos casos graduados como displasias discretas e moderadas e 90% dos casos classificados como lesões de baixo risco¹⁰. Esses dados nos fazem acreditar que os aspectos morfológicos não são capazes de traçar o prognóstico de casos de QA, ou pela subjetividade dos sistemas de graduação de displasias, ou talvez porque o processo de carcinogênese não necessariamente passe por todas as etapas de displasia como é aceito até então. Assim, nossos esforços estão concentrados em detectar outros indícios precoces do desenvolvimento de carcinomas epidermóides de lábio.

Um dos poucos trabalhos que tentam associar características clínicas, epidemiológicas e patológicas em casos de QA que sofreram processo de transformação maligna foi o de Markopoulos. Nesse levantamento de casos, foi detectado que a maioria desses pacientes eram homens, na quinta década de vida, com histórico de intensa exposição à radiação UV. Esses pacientes apresentaram-se em serviços odontológicos queixando-se de uma úlcera com 2,6 anos de duração em média. No entanto, essa pesquisa apresenta uma casuística pequena – apenas 65 casos – e não foram avaliados casos de CEL com a presença de QA em sua margem³⁸.

Como os estudos que associam dados clínico-patológicos e alterações moleculares com o potencial de transformação maligna de casos de queilite actínica são escassos e com casuística pequena, o desenvolvimento desse tipo de estudo utilizando dados do Arquivo do Serviço de Patologia Cirúrgica da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo seria interessante, por disponibilizar de um grande número de casos. A associação entre dados clínicos e aspectos anátomo-patológicos em uma grande casuística auxiliaria detectar quais características, de fato, influenciam no processo de transformação maligna da

queilite actínica. Com um prognóstico mais exato de casos de queilite actínica, a conduta nesses casos promoveria ao paciente uma melhor qualidade de vida.

3 PROPOSIÇÃO

O presente estudo visa caracterizar, a partir dos casos atendidos no Serviço de Patologia Cirúrgica da FOUSP, qual a diferença de perfil clínico-patológico de pacientes com QA que apresentaram evolução para CEL, pacientes de QA que não exibiram sinais de transformação maligna para CEL e pacientes com CEL. Além disso, o estudo visa estabelecer uma relação entre o comportamento biológico das lesões nessas três fases da fotocarcinogênese, e a expressão dos marcadores moleculares indicativos de alterações malignas: Ki67 e pRb.

.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção de casos

A seleção de casos para este estudo teve início a partir da amostra total de fichas de requisição de exame anátomo-patológico pertencentes aos arquivos do Serviço de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Oral e Maxilofacial da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, desde o início do Serviço (1950) até 31 de setembro de 2014, tendo sido selecionados casos de lesões situadas em zona de vermelhão de lábio (superior e inferior) e cujos diagnósticos continham as palavras: queilite actínica (QA), displasia epitelial, atipia epitelial, elastose solar/actínica, hiperqueratose, hiperortoqueratose, o qual teve aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, FR-3311012, sob Protocolo de número 42/2010 (Anexo A). Como continuação dessa pesquisa, em seguida, foram selecionados casos de carcinoma epidermoide de lábio (CEL), carcinoma epidermoide superficialmente invasivo, e carcinoma *in situ*, trabalho esse também aprovado Comitê de Ética em Pesquisa da FOU SP, sob Protocolo de número 1 014 995 (Anexo B).

Para a realização da análise morfológica e reações de imuno-histoquímica, foram selecionados, dentre a amostra previamente coletada para a obtenção dos dados clínicos, casos de QA que apresentavam fragmento de semimucosa revestida por epitélio pavimentoso estratificado paraqueratinizado ou ortoqueratinizado, com variados graus de displasia epitelial, além de faixa nítida de degeneração basofílica do colágeno na lâmina própria, elemento característico de danos provocados pela radiação UV no tecido conjuntivo. Além disso, o caso selecionado deveria apresentar material suficiente para a realização de 4 cortes de 5 micrômetros de espessura.

Já os critérios de inclusão para CEL na análise morfológica e reações de imuno-histoquímica foram, dentre a amostra previamente selecionada para a obtenção dos dados clínicos, casos que revelem presença de ilhas e cordões de queratinócitos neoplásicos apresentando figuras de atipia e situados na lâmina

própria, além de focos de degeneração basofílica do colágeno. Também foi necessário que houvesse material suficiente para a realização de pelo menos 4 cortes de 5 micrômetros de espessura.

Foram descartados todos os casos em que fosse possível discernir, por meio da ficha clínica, se tratar de lesão de mucosa labial.

Além desses casos de QA e CEL, também foram selecionados casos de outras lesões situadas em lábio inferior (como mucocelos, hemangiomas, ou biópsias de vermelhão de lábio) que apresentavam epitélio de semimucosa da zona de vermelhão de lábio com características histopatológicas de normalidade, para constituir o grupo controle do estudo imuno-histoquímico com marcadores biológicos do processo de carcinogênese.

4.2 Estudo clínico e epidemiológico

Os dados clínicos e epidemiológicos recuperados das fichas de requisição para exame anátomo-patológico foram: sexo, idade, etnia, sintomatologia, tamanho da lesão em mm, tempo de duração da lesão em meses, aspecto clínico da lesão fundamental, coloração da lesão, e finalmente, tipo de biópsia.

Após coletados os dados, identificou-se quais pacientes apresentavam mais de um exame anátomo-patológico. Nessa situação, os dados clínicos e epidemiológicos avaliados foram aqueles presentes na ficha de solicitação do primeiro exame anátomo-patológico. Dessa forma, os casos da amostra foram distribuídos em 3 grupos:

- Pacientes apenas com diagnóstico de QA – Pacientes com uma ou mais fichas de exame anátomo-patológico com diagnóstico histopatológico de QA.
- Pacientes apenas com diagnóstico de CEL – Pacientes com uma ou mais fichas de exame anátomo-patológico com diagnóstico histopatológico de CEL.
- Pacientes com diagnóstico de QA e posterior diagnóstico de CEL – pacientes com mais de uma ficha de requisição de exame anátomo-patológico sendo

pelo menos uma com diagnóstico histopatológico de QA e outra com diagnóstico histopatológico de CEL.

4.3 Estudo morfológico

Os casos de QA desses subgrupos, além da avaliação dos dados clínicos, foram submetidos também à avaliação do grau de alterações morfológicas, em lâminas coradas em hematoxilina e eosina. Primeiramente foram identificados os critérios arquiteturais e citológico estipulados pela OMS, e em seguida foi revelado o grau de displasia epitelial através da graduação da displasia epitelial pelo sistema proposto pela OMS publicado em 2005⁷⁶ e pelo sistema binário, proposto por Kujan⁹.

Os critérios arquiteturais avaliados nas QAs foram:

- Estratificação epitelial irregular
- Perda de polaridade das células da camada basal
- Projeções epiteliais em forma de gota
- Aumento do número de figuras de mitose
- Mitoses altas
- Queratinização prematura em células isoladas
- Pérolas de queratina em projeções epiteliais

Já os critérios citológicos foram:

- Variação anormal do tamanho do núcleo
- Pleomorfismo nuclear
- Variação anormal do tamanho da célula
- Pleomorfismo celular
- Proporção núcleo/citoplasma aumentada
- Aumento do tamanho do núcleo
- Figuras de mitose anormais
- Número e tamanho de nucléolos aumentados
- Hiperchromatismo

O sistema de graduação de displasias da OMS apresenta três categorias:

- Displasia epitelial discreta: alterações arquiteturais limitadas ao terço basal do epitélio, acompanhado de atipia citológica;
- Displasia epitelial moderada: alterações arquiteturais se estendendo ao terço médio da espessura do epitélio. A análise do grau de atipia citológica pode aumentar o grau de displasia;
- Displasia epitelial intensa: alterações arquiteturais em mais de dois terços inferiores do epitélio associado à atipias citológicas.

O Sistema Binário de graduação de displasias epiteliais proposto por Kujan⁹ exibe os seguintes escores:

- Lesões de alto risco: para serem consideradas lesões de alto risco é necessário a presença de pelo menos quatro alterações arquiteturais e pelo menos cinco alterações citológicas.
- Lesões de baixo risco: casos que apresentarem menos de quatro alterações arquiteturais ou menos de cinco citológicas serão classificados como de baixo risco

4.4 Estudo imuno-histoquímico

Em um segundo momento dessa pesquisa, foram selecionados 6 casos de QA com posterior diagnóstico de CEL, 90 casos apenas com diagnóstico de QA, sendo 30 casos para cada grau de displasia epitelial, o qual foi estipulado segundo o sistema de graduação da OMS 2005⁷⁶ e 30 casos apenas com diagnóstico de CEL. Os casos de QA com posterior diagnóstico de CEL também foram graduados de acordo com os dois sistemas propostos. A determinação do grau de displasia epitelial visou estabelecer uma relação entre o comportamento biológico das lesões nas diversas fases da fotocarcinogênese e a expressão de marcadores biológicos de controle do ciclo celular (Ki-67 e pRB).

Para cada caso selecionado foi realizada reação imuno-histoquímica com o sistema de amplificação da estreptavidina-biotina peroxidase, utilizando como

marcador os anticorpos anti-Ki-67 clone MIB-1 (Dako DAKO, Glostrup, Dinamarca), anti proteína do retinoblastoma clone Rb1 (Dako DAKO, Glostrup, Dinamarca).

A partir do material emblocado em parafina, foram feitos cortes de 3 micrômetros de espessura estendidos em lâminas de vidro previamente tratadas pelo 3-aminopropiltrietoxisilano para aumento da adesividade do corte. Os cortes seguiram então para desparafinização em dois banhos de xilol a temperatura ambiente, por 15 minutos. A seguir, foi feita reidratação em cadeia descendente de etanóis diluídos a 100%, 95%, 90%, 85%, 80% - sendo que os cortes ficaram imersos em cada uma dessas soluções por 3 minutos, passando imediatamente para a remoção do pigmento formólico, através da incubação das lâminas em hidróxido de amônia a 10% em solução alcoólica, por 10 minutos.

Após lavagem em água destilada, as lâminas receberam os tratamentos de recuperação dos sítios antigênicos, através de sua imersão por 30 minutos em banho a 95°C com solução de trisaminometano (TRIS) (50 mM) e ácido etilenodiaminotetracético (EDTA) (1 mM) com polissorbato 20 (Tween 20) (200µl/L) em pH 9,0 nos cortes histológicos para a avaliação do anticorpo anti-proteína do retinoblastoma e solução de EDTA (1 mM) nos cortes submetidos ao anticorpo anti-proteína Ki-67.

Após o tratamento, os cortes foram novamente lavados em água destilada e realizou-se a etapa de bloqueio da peroxidase endógena tecidual, que se constitui pela incubação em dois banhos, de 15 minutos cada, em uma solução 1:1 (v/v) de peróxido de hidrogênio a 6% e metanol.

Repetida a lavagem em água destilada, os cortes foram imersos em solução de TRIS (TRIS 50 mM, cloreto de sódio (NaCl) 150 mM) pH 7,6, solução tampão da reação, em três banhos de 5 minutos cada, seguindo-se a incubação do anticorpo primário, diluído em TRIS acrescido de albumina bovina. Os anticorpos foram titulados com as seguintes concentrações: anti-proteína Ki-67, diluição de 1:75 e anticorpo anti-Rb, diluição de 1:100. Esses dois anticorpos foram incubados por 18 horas a 4°C.

Todos os procedimentos posteriores foram sempre precedidos de banhos de Tris, pH7,6.

Para a incubação do anticorpo de ligação e do complexo terciário, foi utilizado o complexo estreptavidina-biotina peroxidase do kit LSAB plus (DAKO LSAB plus; DAKO Carpinteria, CA, USA). Cada um dos reagentes que constituem o kit foram incubados por 30 minutos, a temperatura ambiente. As reações foram reveladas utilizando-se o cromógeno diaminobenzidina (DAB) (DAKO Liquid DAB+, K3468; DAKO Carpinteria, CA, USA), de coloração acastanhada, o qual foi incubado por 10 minutos também á temperatura ambiente e, após lavagem em Tris e água deionizada, para remoção de excessos, os cortes foram contracorados com hematoxilina de Mayer.

Após nova lavagem em água corrente e água destilada, os cortes foram desidratados em cadeia crescente de etanóis, diafanizados em xilol, montados em resina para microscopia e examinados em microscópio de luz.

Como controle positivo das reações, utilizaram-se cortes de carcinoma epidermoide intraoral, para ambos os anticorpos. Como controle negativo, utilizou-se a supressão do anticorpo primário e incubação com TRIS-albuna bovina. Além disso, utilizaram-se os controles internos negativos (tecidos sabidamente negativos para os marcadores).

4.5 Análise dos resultados

Os resultados desse trabalho foram avaliados em duas partes distintas: os resultados do estudo clínico-epidemiológico e os resultados do estudo imuno-histoquímico para os marcadores de transformação maligna.

4.5.1 Avaliação dos dados clínicos e epidemiológicos

Os dados clínico-epidemiológicos foram comparados entre os grupos : pacientes apenas com diagnóstico de CEL; pacientes apenas com diagnóstico de

QA; pacientes com diagnóstico de QA e posterior diagnóstico de CEL. Foram, ainda, realizados os testes estatísticos Anova, para a avaliação da hipótese de semelhanças das médias de idade, tamanho e duração da lesão, entre os grupos do estudo. Para a característica tempo de duração da lesão, foi realizado ainda o teste estatístico de Tukey para avaliar em quais grupos as médias dos tempos de duração das lesões eram semelhantes.

4.5.2 Avaliação dos dados de imuno-histoquímica

Os anticorpos anti-proteína Ki-67 e anti-proteína do retinoblastoma são de ocorrência nuclear. A análise dos resultados da expressão desses anticorpos foi feita quantitativamente, com a utilização de um microscópio de luz e sistema de aquisição de imagem Axio Imager A1 (Carl Zeiss, Thornwood, NY, EUA), além do software WCIF ImageJ, com o qual foram contados um mínimo de 500 núcleos de queratinócitos em cada corte, e o total de núcleos positivos entre esses. A contagem dessas foi realizada da seguinte maneira: primeiramente, foram selecionadas as áreas mais significativas do corte com relação à positividade; e em seguida as células iam sendo contadas uma a uma, iniciando-se pelo estrato basal e seguindo em direção ao estrato córneo.

Os resultados para cada uma das proteínas avaliadas no estudo foram submetidos à análise estatística utilizando-se os testes de Kruskal Wallis e Anova, para determinar a variação do percentual de células positivas com relação ao total de células contadas da amostra, e também foi realizado o Teste de Tukey, para comparar o percentual de células positivas entre os grupos do estudo. O software utilizado para a análise estatística foi o "R" (University of California, Los Angeles, EUA; <https://www.r-project.org>).

5 RESULTADOS

5.1 Casuística

Para esse estudo foram levantados casos de lesões em zona de semimucosa de vermelhão de lábio, pertencentes aos arquivos do Serviço de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Oral e Maxilofacial da Faculdade de Odontologia da USP. Tal arquivo continha 1120 fichas de exame anátomo-patológico de lesões em lábio com diagnóstico de queilite actínica (QA) ou carcinoma epidermoide (CEL). Após a organização dos dados dessas fichas em casos, ou seja, a reunião de exames realizados em ocasiões distintas porém pertencentes ao mesmo paciente, a amostra final passou a contar com um total de 998 casos.

Desses 998 casos analisados, 982 estavam localizados em lábio inferior e 11 casos constituíam-se de lesões situadas em lábio superior, sendo esses 3 casos de QA e 8 casos de CEL. Em 5 casos, não havia informação sobre qual dos lábios foi acometido. Todos os pacientes de QA no lábio superior eram mulheres, assim como 5 dos 8 pacientes de CEL em lábio superior.

5.2 Análise clínico-epidemiológica

Dentre os 998 casos da amostra estudada, 10 constituíam-se de pacientes com um exame anátomo-patológico de QA e outros exames subsequentes sendo pelo menos um deles com diagnóstico histopatológico de CEL, na mesma região da primeira lesão, formando assim o grupo pacientes de QA com posterior diagnóstico de CEL. Outros 690 casos de QA ou constituíam-se de biópsias únicas, ou apresentavam mais de um registro de biópsia, porém sem dados para diagnosticar indícios de evolução para CEL no exame anátomo-patológico, sendo reunidos no grupo pacientes apenas com diagnóstico de QA. Ainda, 298 casos observados

nesse estudo constituíam-se de CEL, e dentre esses, 67 foram diagnosticados como carcinomas epidermóides superficialmente invasivos e 6 casos foram considerados carcinomas *in situ*, e passaram a compor o grupo pacientes apenas com diagnóstico de CEL.

Os pacientes dessa pesquisa apresentaram idades variando desde a segunda até a décima década de vida, sendo a idade mínima registrada de 11 anos e a idade máxima evidenciada de 93 anos. Os casos de pacientes com QA que posteriormente exibiram diagnóstico de CEL apresentaram as lesões exclusivamente na sexta, sétima e oitava décadas de vida, e a idade média desses pacientes foi 63,6 anos. Já os pacientes apenas com diagnóstico de QA foram acometidos desde a segunda até a décima décadas de vida, mas a maioria dos casos foram observados entre a quinta e a oitava décadas, sendo a média de idade dos casos que informaram esse dado 58,9 anos. Quanto aos casos com diagnóstico apenas de CEL, somente 1 paciente acometido por essa lesão estava na segunda década de vida, e não houve acometimento de pacientes na décima década de vida. O pico de prevalência das idades foi da quinta à oitava décadas, e a média de idade dos pacientes apenas diagnosticados com CEL foi de 60,7 anos. 55 pacientes não tiveram a idade informada na ficha de exame anátomo-patológico.

Gráfico 5.1 - Idade dos pacientes de QA com posterior diagnóstico de CEL (n=10), pacientes apenas com diagnóstico de QA (n=690) e pacientes apenas com CEL (n=298). Porcentagem realizada considerando como total o número de casos de cada grupo.

A análise descritiva da comparação entre os grupos estudados quanto à idade de acometimento das lesões em décadas revelou uma mediana na sétima década de vida em todos os grupos, e uma maior variabilidade de idades em relação a essa mediana entre os pacientes do grupo CEL, e do grupo de QA com posterior diagnóstico de CEL. Foi realizado ainda o teste estatístico ANOVA para avaliar a hipótese de igualdade entre as médias de idade dos grupos de pacientes: apenas com QA; pacientes de QA com posterior diagnóstico de CEL e pacientes apenas com CEL, com nível de significância de 95%. Porém, não foi constatada diferenças significantes, dado que o valor de p foi 0,11.

Tabela 5.1 – Tabela ANOVA para a idade dos pacientes estipulada em décadas de vida.

	<i>Diferença</i>	<i>Soma dos Quadrados</i>	<i>Quadrados das médias</i>	<i>Valor de F</i>	<i>P(>F)</i>
Grupo	2	9,58	4,79	2,17	0,11
Resíduo	940	2076,15	2,21

Gráfico 5.2 - Blox-Plot comparando os três grupos da amostra com relação à mediana de idade dos pacientes, mensurada em décadas de vida.

A amostra total do presente estudo contou com a presença de 717 pacientes do sexo masculino e 281 pacientes do sexo feminino. Considerando os 10 pacientes de QA com diagnóstico posterior de CEL, apenas um era do sexo feminino. Já entre os pacientes apenas com diagnóstico de QA, 206 eram do sexo feminino e 484 do sexo masculino. Os pacientes apenas com diagnóstico de CEL revelaram a presença de 74 pacientes do sexo feminino e 224 pacientes do sexo masculino, o que demonstra uma predominância do sexo masculino em todos os grupos de lesões com potencial de malignização e malignidades da semimucosa labial.

Gráfico 5.3 - Distribuição da amostra do estudo com relação ao dado epidemiológico sexo, de acordo com os seguintes grupos: pacientes com QA que tiveram diagnóstico posterior de CEL (n=10), pacientes apenas com diagnóstico de QA (n=690) e pacientes apenas com diagnóstico de CEL (n=298).

A análise descritiva das lesões quanto ao sexo já demonstrou um predomínio de pacientes do sexo masculino em todos os grupos e pouca variabilidade entre os grupos quanto ao número de pacientes do sexo feminino, ou seja, há pouca variabilidade entre os grupos com relação ao sexo dos pacientes, portanto, não foram realizados testes estatísticos para avaliar a significância quanto à hipótese de igualdade.

Entre os 998 casos dessa pesquisa, a grande maioria, ou seja, 893 casos, referiam-se a pacientes leucodermas. 29 pacientes eram melanodermas, 10

xantodermas, 17 exibiam outras etnias, entre elas feodermas e indígenas. Em 49 casos a cor da pele não foi informada. Os 10 pacientes com QA que tiveram diagnóstico posterior de CEL eram leucodermas. A grande maioria dos pacientes apenas com diagnóstico de QA – 616 – também eram leucodermas, mas esse grupo ainda apresentou 20 pacientes melanodermas, 9 pacientes xantodermas, 14 pacientes de outras etnias e 31 casos sem esse dado. Os casos de pacientes apenas com diagnóstico de CEL constituíam-se de 267 pacientes leucodermas, 9 melanodermas, 3 pacientes de outras etnias e 18 casos sem a informação da cor da pele.

Gráfico 5.4 - Distribuição da amostra com relação ao dado epidemiológico etnia, considerando os grupos: pacientes com diagnóstico de QA e posteriormente CEL (n=10), pacientes apenas com diagnóstico de QA (n=690) e pacientes apenas com CEL (n=298).

A análise descritiva das lesões quanto à etnia demonstrou um grande número de casos de pacientes leucodermas comparado às outras duas etnias, e os pacientes melanodermas e xantodermas apresentavam-se em quantidades semelhantes em todos os grupos, e bem inferiores aos índices de pacientes leucodermas. Devido a essa escassa variabilidade entre os grupos, não foram realizados testes estatísticos para avaliar a significância quanto à hipótese de igualdade.

O primeiro dado clínico a ser avaliado nesse estudo foi o aspecto fundamental da lesão. Entre os 998 casos da amostra, 77 descreveram a lesão fundamental observada no lábio inferior como uma mancha, as quais estavam presentes em 75 casos de pacientes apenas com diagnóstico de QA e em 2 casos de pacientes com CEL apenas. A descrição de nódulos como lesão fundamental foi observada em 24 pacientes com diagnóstico unicamente de QA e 9 pacientes com diagnóstico apenas de CEL. Já as lesões interpretadas como placas foram detectadas em 110 casos, sendo 102 desses em pacientes apenas diagnosticados com QA e 8 casos de pacientes apenas com diagnóstico de CEL. As úlceras foram relatadas em 126 casos apenas com diagnóstico de QA, 174 casos de pacientes diagnosticados apenas com CEL e 4 casos de pacientes diagnosticados inicialmente com QA mas com posterior evolução para CEL, totalizando 304 casos. Entretanto, em alguns casos, áreas de ulceração foram observadas concomitantemente a outras lesões fundamentais, exceto manchas. Assim, entre os 4 casos descritos como nódulo e úlcera, 3 pertenciam ao grupo de pacientes apenas com CEL e 1 era de paciente com diagnóstico apenas de QA. Já entre os 7 casos considerados placas com úlceras, 4 eram em pacientes com CEL e 3 em pacientes com QAs apenas. Em 461 casos não havia informação sobre a lesão fundamental e 2 casos foram considerados outras lesões fundamentais, como bolha e pápula.

Gráfico 5.5 - Distribuição dos pacientes com QA e posterior diagnóstico de CEL (n=10), pacientes apenas com diagnóstico de QA (n=690) e pacientes apenas com diagnóstico de CEL (n=298) quanto ao aspecto clínico das lesões.

Como em todos os grupos da amostra houve um predomínio de úlcera como aspecto clínico fundamental das lesões, e uma discreta diferença entre a porcentagem das demais lesões fundamentais avaliadas, cujo número absoluto era bem menor que o de úlceras, foi realizada apenas uma análise gráfica descritiva, descartando-se a avaliação de testes estatísticos de comparação de igualdade entre os grupos de pacientes com diagnóstico apenas de QA, pacientes de QA com posterior diagnóstico de CEL e pacientes diagnosticados apenas com CEL.

Com respeito à coloração das lesões, entre os 998 casos, 15 apresentavam-se arrocheadas, 17 possuíam coloração de mucosa com aspecto de normalidade, 118 eram vermelhas, 460 eram brancas, 59 foram consideradas vermelhas e brancas, 78 apresentavam outras colorações, entre elas acastanhada, amarelada e enegrecida. Entre os casos de QA com posterior diagnóstico de CEL, 2 pacientes exibiam lesões vermelhas, 2 lesões brancas, 2 outras colorações e 4 casos não informaram esse dado na ficha de exame anátomo-patológico. Já nos casos de pacientes diagnosticados unicamente com QA, 15 exibiam lesões arroxeadas, 11 lesões com coloração de mucosa normal, 67 eram vermelhas, 385 brancas, 16 eram

vermelhas e brancas, 54 foram consideradas lesões com outras colorações e 112 dos casos não informaram a coloração das lesões. Nenhum caso de paciente apenas com diagnóstico de CEL apresentou lesão de coloração arrocheada, mas entre esses 6 exibiram lesões com coloração de mucosa com aspecto de normalidade, 49 eram vermelhas, 73 brancas, 13 vermelhas e brancas, 22 possuíam outras colorações e 135 não tinham informação sobre a coloração da lesão.

Gráfico 5.6 - Análise da amostra com relação à coloração das lesões em pacientes com QA que evoluíram para CEL (n=10), pacientes de QA sem evolução para CEL (n=690) e pacientes com CEL (n=298).

O predomínio de lesões brancas nos três grupos analisados, associado a uma pequena diferença de casos com outras colorações de lesão em todos os grupos, fato observado já em fases descritivas de dados, descartou a necessidade de testes estatísticos para comprovar comparações de igualdade entre os grupos.

Outra característica avaliada nessa pesquisa foi o tamanho das lesões. Esse dado estava descrito em 875 dos 998 casos analisados. Considerando o total da amostra com esse dado relatado, o tamanho das lesões variou de 1mm a 109mm, com média de 24,7mm. Assim, o tamanho médio das lesões do grupo de pacientes de QA com posterior diagnóstico de CEL foi 33,11mm, assim como a média do tamanho das lesões de pacientes com QA apenas foi 23,5mm e dos pacientes diagnosticados exclusivamente como CEL foi de 27,1mm.

A análise descritiva do gráfico de Blox-Plot revelou uma mediana de 15mm no grupo dos pacientes apenas com CEL, 12,5mm no grupo dos pacientes apenas com QA e 21,25mm nos casos de QA com posterior CEL. A barra mais estreita entre os casos de QA com posterior desenvolvimento de CEL revelou uma menor variabilidade de tamanho das lesões entre os grupos avaliados.

Além disso, foi realizado o teste estatístico ANOVA para avaliar a hipótese de igualdade das médias do tamanho das lesões entre os grupos, com um nível de significância de 95%. Entretanto, o valor de $p=0,2$ exclui essa significância.

Tabela 5.2 – Tabela ANOVA para o tamanho das lesões mensurado em milímetros.

	<i>Diferença</i>	<i>Soma dos Quadrados</i>	<i>Quadrados das médias</i>	<i>Valor de F</i>	<i>P(>F)</i>
Grupo	2	3034,77	1517,38	1,61	0,20
Resíduo	872	820749,15	941,23

Gráfico 5.7 - Blox-Plot comparando os três grupos da amostra com relação à mediana do tamanho das lesões, medida em milímetros.

Com relação ao tempo de duração das lesões, o qual constitui o período de tempo entre a percepção da lesão pelo paciente até o momento da biópsia, a média do total de casos da amostra foi 30,3 meses, sendo que a duração mais breve foi 0,13 meses e a mais longa foi 600 meses. Os casos de QA com posterior

diagnóstico de CEL apresentaram lesões com tempo de duração médio de 75,30 meses, ao passo que os casos diagnosticados apenas como QA tiveram duração média de 36,5 meses até o momento da biópsia. Já os casos de CEL exibiram tempo de duração das lesões com média de 19,73 meses.

A análise descritiva do tempo de duração das lesões nos três grupos do estudo, demonstrada através do gráfico de Blox-Plot, revelou uma mediana em torno de 12 meses no caso de pacientes com diagnóstico apenas de CEL, 16 meses nos casos de pacientes apenas com QA e 18 meses no grupo de pacientes com QA e posterior diagnóstico de CEL. O tempo de evolução das lesões em cada grupo demonstrou pouca variabilidade em torno da mediana, característica representada no gráfico 5.8 através das barras estreitas.

Gráfico 5.8 - Blox-Plot comparando os três grupos da amostra com relação à mediana do tempo de duração das lesões, medida em meses.

Para avaliar a hipótese de igualdade entre as médias do tempo de duração das lesões entre os grupos, foi executado o teste estatístico ANOVA, com nível de significância de 95%. Como o valor de p foi zero, mas o quadrado da média das idades dos grupos foi maior que o quadrado da média das idades dos resíduos, a hipótese de desigualdade não pode ser descartada. Em seguida, foi aplicado o teste estatístico Tukey para verificar em quais grupos ocorre a desigualdade das médias do tempo de duração das lesões, utilizando-se um intervalo de confiança de 95%.

Tabela 5.3 – Tabela ANOVA para o tamanho das lesões mensurado em milímetros.

	<i>Diferença</i>	<i>Soma dos Quadrados</i>	<i>Média dos Quadrados</i>	<i>Valor de F</i>	<i>P(>F)</i>
Grupo	2	58866,37	29433,19	7,80	0,00
Resíduo	634	2393754,44	3775,64		

Tabela 5.4 - Valores de significância do teste estatístico de Tukey para o tempo de duração das lesões, na comparação entre os grupos do estudo.

<i>Grupo</i>	<i>Diferença</i>	<i>Inferior</i>	<i>Superior</i>	<i>p adj</i>
QA : CEL	1.675.116	5021250	2848206	0.0024222
QA - CEL : CEL	5.551.232	3679006	10734564	0.0324266
QA - CEL : QA	3.876.067	12816677	9033801	0.1821410

Como os limites “inferior” e “superior” das comparações “QA - CEL” e “QA.CEL- CEL” não contém o valor zero, podemos inferir que há diferenças significativas entre as médias de duração em meses do grupo de pacientes diagnosticados apenas com CEL se comparado aos demais.

Gráfico 5.9 – Intervalos de confiança do Teste de Tukey entre as médias do tempo de duração das lesões entre os grupos de estudo.

Outros dados que também foram avaliados nesse estudo foram a sintomatologia, o tipo de biópsia executado e as lesões designadas pelo clínico como hipóteses de diagnóstico para as lesões em lábio estudadas. Esses dados encontram-se expostos nas tabelas 5.2, 5.3 e 5.4.

Tabela 5.5 - Análise quanto à sintomatologia dos pacientes com QA apresentando evolução para CEL, QA sem indícios de evolução para CEL e CEL. O cálculo da porcentagem foi realizado considerando como total o número de casos de cada categoria.

Lesões	Sintomáticos	Assintomáticos	Dado não informado
QA - CEL ($n_{\text{total}}=10$)	10%	80%	10%
QA ($n_{\text{total}} = 690$)	14%	73%	13%
CEL ($n_{\text{total}} = 298$)	28%	59%	13%

Tabela 5.6 - Relação entre o tipo de biópsia executado e os grupos: pacientes de QA com posterior diagnóstico de CEL, pacientes apenas com diagnóstico de QA e pacientes apenas com diagnóstico de CEL. O cálculo da porcentagem foi realizado considerando como total o número de casos de cada grupo

<i>Lesão</i>	<i>Biópsia Incisional</i>	<i>Biópsia Excisional</i>	<i>Dado não informado</i>
QA - CEL ($n_{\text{total}}=10$)	90%	0%	10%
QA ($n_{\text{total}} = 690$)	65%	30%	4%
CEL ($n_{\text{total}} = 298$)	72%	21%	7%

Tabela 5.7 - Relação entre o diagnóstico histopatológico e a hipótese de diagnóstico clínico. Porcentagem calculada considerando o total de casos de cada grupo.

<i>Lesões atribuídas como diagnóstico clínico diferencial</i>																
<i>Diagnóstico Histopatológico</i>	QA		CEL		Leucoplasia		Nevus		Hemangioma		Líquen Plano		Outras lesões		Dado não informado	
	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
QA -CEL	4	40%	2	20%	0	0%	0	0%	0	0%	0	0%	2	20%	0	0%
QA	359	52%	29	4%	99	14%	21	3%	18	3%	9	1%	55	8%	15	2%
CEL	39	13%	168	56%	13	4%	3	1%	0	0%	1	0%	16	5%	3	1%

5.3 Análise morfológica

A segunda parte do presente estudo constituiu-se de uma análise de características morfológicas e moleculares de casos de QA com posterior diagnóstico de CEL, realizada em 6 dos 10 casos desse grupo, e casos de pacientes com diagnóstico exclusivo de QA, em que foram selecionados 90 dos 650 casos pertencentes a esse grupo. Todos os casos de pacientes com QA, tanto os que evoluíram para CEL como os que não passaram pelo processo de malignização, apresentavam epitélio de superfície do tipo pavimentoso estratificado, que em alguns casos se mostrava paraqueratinizado enquanto em outros era ortoqueratinizado, e a hipergranulose foi observada em um número de casos considerável. A espessura do epitélio apresentou atrofia como uma característica frequente. As células do estrato basal apresentava-se ora com formato cuboidal típico, ora afiladas e com as alterações morfológicas descritas pela OMS, as quais serão abordadas em maior detalhe a seguir. A lâmina própria dos casos de QA exibiu faixa de material basofílico amorfo acelular, a elastose solar, disposta ou de forma uniforme formando uma faixa de espessura variável na parte superior da zona submucosa do tecido conjuntivo, ou disposta em focos dispersos de tamanho variável, também na região superior da lâmina própria.

O grupo de casos de pacientes diagnosticados unicamente com CEL, utilizado nessa fase do estudo como comparação de um estágio mais grave das lesões de QA, constituiu-se histologicamente de fragmentos de neoplasia exibindo queratinócitos invadindo o tecido conjuntivo adjacente, organizados em ilhotas e cordões. No interior das ilhotas foram observadas pérolas de queratina com grande frequência, e as células epiteliais exibiam pleomorfismo celular e nuclear, alteração da relação núcleo/citoplasma, hiper cromatismo e aumento do número de figuras de mitose, além de mitoses atípicas. O estroma dos casos de CEL era constituído por tecido conjuntivo denso, e em muitas vezes encontrava-se permeado por intenso infiltrado inflamatório mononuclear difuso ou coleções neutrofílicas.

Ainda nessa fase da pesquisa, foram selecionados 15 casos contendo fragmento de semimucosa de vermelhão de lábio com aspectos histológicos usuais de normalidade. Esses casos foram utilizados como um grupo controle com

ausência de lesões para comparação das alterações morfológicas e moleculares entre os grupos do estudo. Nesses fragmentos, o epitélio de revestimento era do tipo pavimentoso estratificado paraqueratinizado ou ortoqueratinizado. A espessura desse epitélio apresentava-se mais atrófica que as regiões de mucosa não queratinizada e as projeções epiteliais eram mais encurtadas. As células do estrato basal exibiam formato cuboidal em sua maioria, e a lâmina própria mostrava-se bem vascularizada principalmente na região submucosa.

A tabela 5.5 exibe a porcentagem dos critérios arquiteturais e citológicos de lesões potencialmente malignas propostos pela OMS em sua publicação de 2005, presentes nos casos de pacientes de QA e posterior diagnóstico de CEL e pacientes com diagnóstico apenas de QA.

Tabela 5.8 - Frequência de cada critério arquitetural e citológico proposto pela OMS 2005, observada nos pacientes de QA com diagnóstico posterior de CEL e pacientes com diagnóstico apenas de QA. Note que entre as lesões de baixo risco não há casos de pacientes de QA com posterior diagnóstico de CEL. Os critérios aumento do número de figuras de mitose, variação anormal do tamanho do núcleo e variação anormal do tamanho da célula, proporção núcleo/citoplasma aumentada, figuras de mitose anormal e número e tamanho de nucléolos aumentados apresentam-se em 100% dos casos de lesões de alto risco e em poucas lesões classificadas como baixo risco.

Alteração epitelial		Sistema Binário								Sistema OMS 2005											
		Alto risco (nt=34)				Baixo Risco (nt=56)				Discreta (nt=30)				Moderada (nt=30)				Intensa (nt=30)			
		QA		QA-CEL		QA		QA-CEL		QA		QA-CEL		QA		QA-CEL		QA		QA-CEL	
		n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%	n	%
A.Arquiteturais	Estratificação epitelial irregular	27	79	6	100	33	59	0	0	10	34	0	0	21	70	3	100	29	97	3	100
	Perda de polaridade das células da camada basal	34	100	6	100	56	100	0	0	30	100	0	0	30	100	3	100	30	100	3	100
	Projeções epiteliais em forma de gota	32	94	5	84	7	13	0	0	0	0	0	0	10	34	2	67	29	97	3	100
	Aumento do número de figuras de mitose	26	77	6	100	3	5	0	0	0	0	0	0	7	24	3	100	22	74	3	100
	Mitoses altas	12	35	1	3	1	2	0	0	0	0	0	0	3	10	1	3	10	10	0	0
	Queratinização prematura em células isoladas	17	50	0	0	12	21	0	0	8	27	0	0	6	20	0	0	15	50	0	0
	Pérolas de queratina em projeções epiteliais	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0
b. Citológicos	Variação anormal do tamanho do núcleo	32	94	6	100	9	16	0	0	1	3	0	0	11	37	3	100	29	97	3	100
	Pleomorfismo nuclear	34	100	6	100	54	96	0	0	28	94	0	0	30	100	3	100	30	100	3	100
	Variação anormal do tamanho da célula	32	94	6	100	9	16	0	0	1	3	0	0	11	37	3	100	29	97	3	100
	Pleomorfismo celular	34	100	6	100	54	96	0	0	28	94	0	0	30	100	3	100	30	100	3	100
	Proporção núcleo/citoplasma aumentada	21	62	4	67	3	5	0	0	0	0	0	0	6	20	2	34	18	60	2	34
	Aumento do tamanho do núcleo	21	62	4	67	3	5	0	0	0	0	0	0	6	20	2	34	18	60	2	34
	Figuras de mitose anormais	3	9	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	0	3	10	0	0
	Número e tamanho de nucléolos aumentados	29	85	6	100	35	63	0	0	19	64	0	0	19	64	3	100	26	87	3	100
	Hipercromatismo	29	85	5	84	47	84	0	0	26	87	0	0	24	80	2	67	26	87	3	100

Na amostra avaliada, todos os casos de pacientes de QA com posterior CEL foram graduadas como lesões de alto risco pelo sistema binário, e como displasias moderada e intensa pelo sistema da OMS.

5.4 Análise imuno-histoquímica

5.4.1 Proteína Ki-67

A avaliação imuno-histoquímica das lâminas para o marcador Ki-67, realizada através da observação dos cortes histológicos em microscópio de luz, revelou uma expressão exclusivamente nuclear para essa proteína. A grande maioria dos casos do presente estudo mostrou-se positiva para o anticorpo anti-Ki-67, e exibiu uma intensidade de marcação forte. A expressão da proteína Ki-67 foi observada nas células neoplásicas das ilhotas de invasão dos casos de CEL. Já nos casos de QA, a presença de marcação de Ki-67 foi detectada principalmente nos estratos basal e parabasal, ao passo que 12 casos evidenciaram a presença desse marcador também no estrato espinhoso, sendo esses distribuídos da seguinte maneira entre os grupos do estudo: 3 QAs com displasia discreta, 3 QAs com displasia moderada, 5 QAs com displasia intensa. Esses casos estavam incluídos no grupo de pacientes diagnosticados apenas com QA. Um caso de paciente de QA com posterior evolução para CEL apresentou expressão de Ki-67 englobando o estrato espinhoso. Todas as células demonstrando a presença de mitose, em suas diferentes fases, tiveram a expressão de Ki-67. Esse fato foi observado tanto em casos de CEL quanto em casos de QA nos mais variados graus de displasia epitelial. Nos casos de lábio normal, o grupo controle desse estudo, a expressão dessa molécula estava concentrada nos estratos basal e parabasal. Apenas 12 casos da amostra total foram negativos para o marcador em questão, sendo 1 caso do grupo pacientes com diagnóstico apenas de CEL, 3 casos de lábio normal, 5 casos de QA discreta e 3 casos de QA intensa do grupo de pacientes apenas com diagnóstico de QA.

As figuras 5.1 e 5.2 exemplificam a expressão da proteína Ki-67 entre os grupos do estudo.

O quadro 5.2 exibe um panorama geral do número de células positivas para Ki-67 e do número de células contadas, além da porcentagem de células positivas. Esses resultados foram distribuídos entre os grupos dessa pesquisa.

Casos	Lesão	Graduação Binária	Graduação OMS	Positivas Ki-7	Total Ki-67	% células positivas Ki-67
1	QA-CEL	Alto risco	Moderada	56	649	8,63%
2	QA-CEL	Alto risco	Intensa	78	802	9,73%
3	QA-CEL	Alto risco	Moderada	279	818	34,11%
4	QA-CEL	Alto risco	Intensa	111	575	19,30%
5	QA-CEL	Alto risco	Intensa	240	670	35,82%
6	QA-CEL	Alto risco	Moderada	51	707	7,21%
7	QA	Baixo risco	Discreta	158	621	25,44%
8	QA	Baixo risco	Discreta	30	518	5,79%
9	QA	Baixo risco	Discreta	75	549	13,66%
10	QA	Baixo risco	Discreta	69	579	11,92%
11	QA	Baixo risco	Discreta	201	575	34,96%
12	QA	Baixo risco	Discreta	130	521	24,95%
13	QA	Baixo risco	Discreta	100	732	13,66%
14	QA	Baixo risco	Discreta	116	691	16,79%
15	QA	Baixo risco	Discreta	90	689	13,06%
16	QA	Baixo risco	Discreta	95	586	16,21%
17	QA	Baixo risco	Discreta	30	509	5,89%
18	QA	Baixo risco	Discreta	264	594	44,44%
19	QA	Baixo risco	Discreta	0	583	0,00%
20	QA	Baixo risco	Discreta	56	639	8,76%
21	QA	Baixo risco	Discreta	181	513	35,28%
22	QA	Baixo risco	Discreta	0	505	0,00%
23	QA	Baixo risco	Discreta	121	595	20,34%
24	QA	Baixo risco	Discreta	202	652	30,98%
25	QA	Baixo risco	Discreta	325	799	40,68%
26	QA	Baixo risco	Discreta	195	668	29,19%
27	QA	Baixo risco	Discreta	203	617	32,90%
28	QA	Baixo risco	Discreta	179	813	22,02%
29	QA	Baixo risco	Discreta	121	611	19,80%
30	QA	Baixo risco	Discreta	0	523	0,00%
31	QA	Baixo risco	Discreta	115	844	13,63%
32	QA	Baixo risco	Discreta	148	756	19,58%

Casos	Lesão	Graduação Binária	Graduação OMS	Positivas Ki-7	Total Ki-67	% células positivas Ki-67
33	QA	Baixo risco	Discreta	89	620	14,35%
34	QA	Baixo risco	Discreta	0	508	0,00%
35	QA	Baixo risco	Discreta	67	613	10,93%
36	QA	Baixo risco	Discreta	0	561	0,00%
37	QA	Baixo risco	Moderada	146	655	22,29%
38	QA	Baixo risco	Moderada	197	965	20,41%
39	QA	Baixo risco	Moderada	118	530	22,26%
40	QA	Baixo risco	Moderada	119	760	15,66%
41	QA	Baixo risco	Moderada	175	788	22,21%
42	QA	Baixo risco	Moderada	53	536	9,89%
43	QA	Baixo risco	Moderada	120	554	21,66%
44	QA	Baixo risco	Moderada	213	704	30,26%
45	QA	Baixo risco	Moderada	74	585	12,65%
46	QA	Baixo risco	Moderada	89	500	17,80%
47	QA	Baixo risco	Moderada	26	716	3,63%
48	QA	Baixo risco	Moderada	100	524	19,08%
49	QA	Alto risco	Moderada	394	840	46,90%
50	QA	Baixo risco	Moderada	25	561	4,46%
51	QA	Baixo risco	Moderada	81	578	14,01%
52	QA	Alto risco	Moderada	207	741	27,94%
53	QA	Alto risco	Moderada	163	512	31,84%
54	QA	Alto risco	Moderada	159	795	20,00%
55	QA	Baixo risco	Moderada	260	825	31,52%
56	QA	Baixo risco	Moderada	168	654	25,69%
57	QA	Baixo risco	Moderada	190	753	25,23%
58	QA	Baixo risco	Moderada	190	587	32,37%
59	QA	Baixo risco	Moderada	153	924	16,56%
60	QA	Baixo risco	Moderada	216	852	25,35%
61	QA	Baixo risco	Moderada	87	516	16,86%
62	QA	Baixo risco	Moderada	57	514	11,09%
63	QA	Baixo risco	Moderada	103	749	13,75%
64	QA	Baixo risco	Moderada	113	570	19,82%
65	QA	Baixo risco	Moderada	128	595	21,51%
66	QA	Baixo risco	Moderada	60	575	10,43%
67	QA	Alto risco	Intensa	133	761	17,48%
68	QA	Alto risco	Intensa	134	679	19,73%
69	QA	Alto risco	Intensa	359	742	48,38%
70	QA	Alto risco	Intensa	167	733	22,78%
71	QA	Alto risco	Intensa	93	503	18,49%
72	QA	Alto risco	Intensa	71	643	11,04%
73	QA	Alto risco	Intensa	161	855	18,83%
74	QA	Alto risco	Intensa	119	763	15,60%
75	QA	Alto risco	Intensa	162	560	28,93%

Casos	Lesão	Graduação Binária	Graduação OMS	Positivas Ki-7	Total Ki-67	% células positivas Ki-67
76	QA	Alto risco	Intensa	128	611	20,95%
77	QA	Alto risco	Intensa	0	611	0,00%
78	QA	Alto risco	Intensa	219	856	25,58%
79	QA	Alto risco	Intensa	114	869	13,12%
80	QA	Alto risco	Intensa	307	597	51,42%
81	QA	Alto risco	Intensa	138	533	25,89%
82	QA	Alto risco	Intensa	292	507	57,59%
83	QA	Alto risco	Intensa	0	534	0,00%
84	QA	Alto risco	Intensa	46	516	8,91%
85	QA	Alto risco	Intensa	2	893	0,22%
86	QA	Alto risco	Intensa	66	500	13,20%
87	QA	Alto risco	Intensa	121	803	15,07%
88	QA	Alto risco	Intensa	0	545	0,00%
89	QA	Alto risco	Intensa	133	929	14,32%
90	QA	Alto risco	Intensa	197	702	28,06%
91	QA	Alto risco	Intensa	119	945	12,59%
92	QA	Alto risco	Intensa	203	819	24,79%
93	QA	Alto risco	Intensa	188	544	34,56%
94	QA	Alto risco	Intensa	138	743	18,57%
95	QA	Alto risco	Intensa	161	816	19,73%
96	QA	Alto risco	Intensa	170	647	26,28%
97	LN	LN	LN	40	849	4,71%
98	LN	LN	LN	123	574	21,43%
99	LN	LN	LN	0	500	0,00%
100	LN	LN	LN	179	658	27,20%
101	LN	LN	LN	136	667	20,39%
102	LN	LN	LN	158	539	29,31%
103	LN	LN	LN	0	517	0,00%
104	LN	LN	LN	61	608	10,03%
105	LN	LN	LN	87	553	15,73%
106	LN	LN	LN	0	553	0,00%
107	LN	LN	LN	239	914	26,15%
108	LN	LN	LN	245	883	27,75%
109	LN	LN	LN	88	608	14,47%
110	LN	LN	LN	45	770	5,84%
111	LN	LN	LN	285	853	33,41%
112	CEL	CEL	CEL	164	846	19,39%
113	CEL	CEL	CEL	86	716	12,01%
114	CEL	CEL	CEL	165	765	21,57%
115	CEL	CEL	CEL	0	516	0,00%
116	CEL	CEL	CEL	52	504	10,32%
117	CEL	CEL	CEL	9	512	1,76%
118	CEL	CEL	CEL	12	508	2,36%

Casos	Lesão	Graduação Binária	Graduação OMS	Positivas Ki-7	Total Ki-67	% células positivas Ki-67
119	CEL	CEL	CEL	261	738	35,37%
120	CEL	CEL	CEL	239	779	30,68%
121	CEL	CEL	CEL	52	573	9,08%
122	CEL	CEL	CEL	12	749	1,60%
123	CEL	CEL	CEL	139	717	19,39%
124	CEL	CEL	CEL	113	702	16,10%
125	CEL	CEL	CEL	316	653	48,39%
126	CEL	CEL	CEL	34	553	6,15%
127	CEL	CEL	CEL	136	893	15,23%
128	CEL	CEL	CEL	58	543	10,68%
129	CEL	CEL	CEL	117	798	14,66%
130	CEL	CEL	CEL	66	675	9,78%
131	CEL	CEL	CEL	298	961	31,01%
132	CEL	CEL	CEL	27	569	4,75%
133	CEL	CEL	CEL	125	875	14,29%
134	CEL	CEL	CEL	32	510	6,27%
135	CEL	CEL	CEL	98	636	15,41%
136	CEL	CEL	CEL	103	744	13,84%
137	CEL	CEL	CEL	197	836	23,56%
138	CEL	CEL	CEL	134	680	19,71%
139	CEL	CEL	CEL	212	677	31,31%
140	CEL	CEL	CEL	269	548	49,09%
141	CEL	CEL	CEL	179	541	33,09%

QA-CEL – casos de pacientes de QA com posterior diagnóstico de CEL; QA – casos pacientes com diagnóstico apenas de QA; CEL – casos de pacientes apenas com CEL; LN – fragmento de semimucosa de lábio com aspectos usuais de normalidade.

Quadro 5.1 - Resultados das reações de imuno-histoquímica para o anticorpo anti-proteína Ki-67, distribuídos de acordo com os grupos do presente estudo: Os casos de queilite actínica foram ainda distribuídos quanto ao grau de displasia epitelial. Os casos com total de células positivas igual a “0” apresentaram ausência total da expressão da proteína.

Gráfico 5.10 - Porcentagem de células positivas para o marcador Ki-67 entre os grupos: pacientes com diagnóstico apenas de (QA), esses distribuídos de acordo com os graus de displasia epitelial do sistema binário, pacientes diagnosticados com QA e posteriormente com CEL (QA-CEL), Lábio normal e pacientes diagnosticados apenas com CEL.

Gráfico 5.11 - Porcentagem de células positivas para o marcador Ki-67 entre os grupos: pacientes diagnosticados essencialmente com QA (QA), esses distribuídos de acordo com os graus de displasia epitelial do sistema da OMS, pacientes de QA com diagnóstico posterior de CEL (QA-CEL), Lábio normal e pacientes diagnosticados apenas com CEL.

A análise estatística da expressão do anticorpo anti-proteína Ki-67 iniciou-se com a descrição dos resultados das médias do percentual de células positivas entre os grupos. O grupo de QA com posterior diagnóstico de CEL teve média de 19,13% de células positivas para Ki-67. Já o grupo de pacientes apenas com diagnóstico de QA exibiu 17,51% de média para células positivas em casos graduados com displasia discreta, 20,44% em displasias moderadas e 20,40% em QAs com displasia intensa. O grupo de pacientes apenas com CEL teve média do percentual de células positivas de 17,56%, e o grupo lábio normal teve 17,76%. Quanto à análise da mediana e variabilidade do percentual de células positivas para essa molécula com relação ao total de células contadas, os casos de lábio normal, ou seja, o grupo controle com ausência de alteração epitelial, foi 0,18; no grupo de pacientes diagnosticados apenas com QA, a mediana nas displasias discretas foi 0,15, nas displasias moderadas foi 0,20, nos casos de displasia intensa foi 0,18; no grupo de pacientes de QA com diagnóstico posterior de CEL, a mediana foi 0,15 e nos casos do grupo de pacientes apenas com CEL a mediana foi 0,15. A menor variabilidade com relação à porcentagem de células positivas entre os grupos foi observada nos casos de displasia epitelial moderada dos pacientes apenas com diagnóstico de QA. Já a maior variabilidade de células positivas foi observada no grupo controle lábio normal.

Gráfico 5.12 - Blox-Plot comparando a mediana do percentual de células positivas para a proteína Ki-67 entre os grupos Controle (Lábio normal), QA discreta, QA moderada, QA intensa, QA com diagnóstico posterior de CEL (QA.CEL) e CEL

A média do percentual de células positivas entre os grupos avaliados nesse estudo foi comparada através do teste estatístico de Variância, com nível de significância de 95%, o qual revelou um valor de p de 0,7468. No entanto, como o valor de F calculado foi maior que o valor de F tabelado, a hipótese de haver diferença entre as médias de algum dos grupos estudados não pode ser descartada.

Tabela 5.9 – Tabela ANOVA para comparação entre o percentual de células positivas para a proteína Ki-67 entre os grupos, em que os casos de QA tiveram displasia epitelial graduada de acordo com o sistema da OMS 2005.

	<i>Diferença</i>	<i>Soma dos Quadrados</i>	<i>Quadrado das médias</i>	<i>Valor de F</i>	<i>P(>F)</i>
Grupos	5	0,04043	0,008087	0,5386	0,7468
Resíduos	135	2,02699	0,015015		

Dessa forma, foi realizado o teste de Tukey, com valor de significância de 95%, para comparar as médias percentuais de células positivas sobre o total de células contadas dos grupos entre si, e essa comparação não foi estatisticamente significativa para nenhum dos pares dos grupos da amostra. Os valores de p de cada comparação encontram-se na tabela a seguir:

Tabela 5.10 - Valores de p do teste de Tukey nas comparações das médias do percentual de células positivas para Ki-67 e o total de células contadas entre os grupos do estudo, em que os casos de pacientes apenas com QA foram graduados de acordo com o sistema da OMS

<i>Grupo</i>	<i>Diferença</i>	<i>Inferior</i>	<i>Superior</i>	<i>p adj</i>
LN-CEL	-1,866667	-0,13069263	0,0933594	0,9967291
QA discreta - CEL	-1,110223	-0,0914689	0,0914689	1
QA intensa - CEL	2,9	-0,0624689	0,1204689	0,9416652
QA moderada - CEL	2,933333	-0,06213557	0,12080223	0,9388758
QA-CEL - CEL	1,633333	-0,14209545	0,17476211	0,9996783
QA discreta -LN	1,866667	-0,0933594	0,13069273	0,9967291
QA intensa - LN	4,766667	-0,0643594	0,15969273	0,8213494
QA moderada - LN	4,8	-0,06402606	0,16002603	0,8169978
QA-CEL - LN	3,5	-0,13612264	0,20612264	0,991469
QA intensa - QA discreta	2,9	-0,0624689	0,1204689	0,9416652
QA moderada - QA discreta	2,933333	-0,06213557	0,12080223	0,9388758
QA-CEL - QA discreta	1,633333	-0,14209545	0,17476211	0,9996783
QA moderada - QA intensa	3,333333	-0,09113557	0,09180223	1
QA-CEL - QA intensa	-1,266667	-0,17109545	0,14576211	0,9999079
QA-CEL - QA moderada	-1,3	-0,17142878	0,14542878	0,9998953

Gráfico 5.13 – Intervalos de confiança do Teste de Tukey com relação à média da positividade de Ki-67, sendo a displasia epitelial dos casos de QA de pacientes com diagnóstico apenas com QA graduada de acordo com o sistema da OMS

Quando a expressão da proteína Ki-67 foi avaliada sob a perspectiva da graduação de displasia epitelial dos casos de QA de acordo com o sistema binário, nota-se que a média do percentual de células positivas nas lesões de baixo risco dos casos de pacientes com diagnóstico apenas de QA foi 18,57% e a mediana foi 0,18, enquanto as lesões de alto risco de pacientes desse mesmo grupo exibiram média do percentual de células positivas de 20,97% e mediana de 0,20. Os casos de QA com posterior diagnóstico de CEL foram todos graduados como lesão de alto risco, e apresentaram mediana do percentual de células positivas sobre o percentual de células contadas de 19,13% e mediana de 0,15.

O grupo que apresentou maior variabilidade do percentual de células positivas em relação à mediana foi o de pacientes de QA com posterior diagnóstico de CEL, representado no gráfico de Blox-Plot pela barra mais ampla. Já o que apresentou menor variabilidade desse percentual em relação à mediana foi o das QAs de baixo risco sem evolução para CEL.

Gráfico 5.14 - Blox-Plot exibindo a mediana do percentual de células positivas para a proteína Ki-67 com relação aos grupos: pacientes com diagnóstico apenas de QA, graduados de acordo com o sistema binário de displasias epiteliais; grupo de pacientes que tiveram QA e posterior diagnóstico de CEL; o grupo fragmento de semimucosa de lábio normal, considerado controle e o grupo pacientes apenas com CEL

Foi realizada, ainda, uma análise de variância, na qual o valor de p obtido foi 0,4565. Embora seja menor que 95%, como o quadrado das médias dos grupos foi maior que o quadrado das médias dos resíduos, não se pode descartar a hipótese de que haja alguma diferença na média do percentual de células positivas para Ki-67 em algum dos grupos. O teste estatístico de Tukey foi então utilizado para comparar as médias dos percentuais de células positivas dos pares de grupos entre si, adotando-se o valor de significância de 95%. No entanto, a comparação de nenhum grupo mostrou-se estatisticamente significativa.

Tabela 5.11 – Tabela ANOVA para comparação entre o percentual de células positivas entre os grupos, em que os casos de QA tiveram displasia epitelial graduada de acordo com o binário.

	<i>Diferença</i>	<i>Soma dos Quadrados</i>	<i>Quadrado das médias</i>	<i>Valor de F</i>	<i>P(>F)</i>
Grupos	4	0,013716	0,063169	0,9164	0,4565
Resíduos	132	0,014967	0,048767		

Tabela 5.12 - Valores de p do teste de Tukey nas comparações das médias do percentual de células positivas para Ki-67 e o total de células contadas entre os grupos do estudo, sendo os casos de pacientes apenas com diagnóstico de QA graduados de acordo com o sistema binário

<i>Grupo</i>	<i>Diferença</i>	<i>Inferior</i>	<i>Superior</i>	<i>p adj</i>
Baixo risco - Alto risco	-0,04194601	-0,12056715	0,03667512	0,5800728
CEL - Alto risco	-0,04762963	-0,13739171	0,04213245	0,5852544
LN - Alto risco	-0,0662963	-0,17526332	0,04267073	0,4481107
QA-CEL - Alto risco	-0,0312963	-0,18401683	0,12142424	0,9796189
CEL - Baixo risco	-0,00568362	-0,08155995	0,07019272	0,9995849
LN - Baixo risco	-0,02435028	-0,12219608	0,07349552	0,9587052
QA-CEL - Baixo risco	0,010649718	-0,13434528	0,15564472	0,999616
LN - CEL	-0,01866667	-0,12567016	0,08833683	0,9888426
QA-CEL - CEL	0,016333333	-0,13499246	0,16765913	0,9982496
QA-CEL - LN	0,035	-0,12845054	0,19845054	0,9760347

Gráfico 5.15 – Intervalos de confiança do teste de Tukey quanto à média da positividade de Ki-67 com relação ao total de células contadas entre os grupos do estudo, sendo os casos de pacientes diagnosticados apenas por QA graduados de acordo com o sistema binário.

5.4.2 Proteína pRb

A avaliação imuno-histoquímica das lâminas para o marcador pRb, também realizada através da observação dos cortes histológicos em microscópio de luz, revelou uma expressão nuclear para essa proteína. Entretanto, 44 casos do presente estudo apresentaram evidências de proteína pRb no citoplasma, sendo 9 casos de pacientes diagnosticados apenas com CEL, 14 casos de displasia epitelial discreta, 16 casos de displasia moderada, 8 casos de displasia intensa do grupo de pacientes apenas com diagnóstico de QA e 3 casos de pacientes de QA com diagnóstico posterior de CEL, além de 3 casos de fragmento de semimucosa de lábio normal. A maioria dos casos analisados apresentou expressão positiva para o anticorpo anti-pRb, e exibiu uma intensidade de marcação variando de forte a discreta. Apenas 13 casos da amostra total foram negativos para o marcador em

questão, sendo 4 casos de pacientes apenas com CEL, 2 casos de QA discreta, 3 casos de QA moderada e 4 casos de QA intensa dos pacientes com diagnóstico apenas de QA . Quanto à intensidade de marcação, 9 casos exibiram marcação discreta, em que 3 eram pertencentes ao grupo CEL e 6 casos eram do grupo de pacientes com diagnóstico apenas de QAs, sendo 3 graduados como displasia epitelial discreta, 1 como displasia epitelial moderada e 2 displasia epitelial intensa. A expressão da proteína pRb foi observada tanto nas células neoplásicas das ilhotas de invasão como no epitélio de superfície dos casos de CEL. Já nos casos de QA, tanto aquelas que tiveram evolução para CEL como as sem evolução neoplásica, a presença de marcação da proteína pRb foi detectada em todos os estratos do epitélio, desde o basal até o granuloso. Todas as células demonstrando a presença de mitose, em suas diferentes fases, não exibiram expressão da proteína pRb. Esse fato foi observado tanto em casos de CEL quanto em casos de QA nos mais variados graus de displasia epitelial. Nos casos de lábio normal, o grupo controle desse estudo, a expressão dessa molécula também foi observada em todos os estratos do epitélio.

As figuras 5.1 e 5.2 exemplificam a expressão da proteína pRb entre os grupos do estudo.

O quadro 5.3 exhibe um panorama geral do número de células positivas para pRb e do número de células contadas, além da porcentagem de células positivas. Esses resultados foram distribuídos entre os grupos dessa pesquisa.

Casos	Lesão	Graduação Binária	Graduação OMS	Positivas pRb	Total pRb	% células positivas pRb
1	QA-CEL	Alto risco	Moderada	132	688	19,19%
2	QA-CEL	Alto risco	Intensa	347	756	45,90%
3	QA-CEL	Alto risco	Moderada	323	521	62,00%
4	QA-CEL	Alto risco	Intensa	242	691	35,02%
5	QA-CEL	Alto risco	Intensa	347	589	58,91%
6	QA-CEL	Alto risco	Moderada	404	582	69,42%
7	QA	Baixo risco	Discreta	250	604	41,39%
8	QA	Baixo risco	Discreta	155	569	27,24%
9	QA	Baixo risco	Discreta	305	514	59,34%
10	QA	Baixo risco	Discreta	178	580	30,69%
11	QA	Baixo risco	Discreta	367	753	48,74%
12	QA	Baixo risco	Discreta	541	688	78,63%
13	QA	Baixo risco	Discreta	81	598	13,55%
14	QA	Baixo risco	Discreta	357	544	65,63%
15	QA	Baixo risco	Discreta	163	751	21,70%
16	QA	Baixo risco	Discreta	187	678	27,58%
17	QA	Baixo risco	Discreta	158	568	27,82%
18	QA	Baixo risco	Discreta	153	509	30,06%
19	QA	Baixo risco	Discreta	118	551	21,42%
20	QA	Baixo risco	Discreta	72	585	12,31%
21	QA	Baixo risco	Discreta	310	625	49,60%
22	QA	Baixo risco	Discreta	42	882	4,76%
23	QA	Baixo risco	Discreta	127	638	19,91%
24	QA	Baixo risco	Discreta	283	504	56,15%
25	QA	Baixo risco	Discreta	426	914	46,61%
26	QA	Baixo risco	Discreta	0	543	0,00%
27	QA	Baixo risco	Discreta	214	518	41,31%
28	QA	Baixo risco	Discreta	420	812	51,72%
29	QA	Baixo risco	Discreta	311	571	54,47%
30	QA	Baixo risco	Discreta	65	603	10,78%
31	QA	Baixo risco	Discreta	386	794	48,61%
32	QA	Baixo risco	Discreta	235	633	37,12%
33	QA	Baixo risco	Discreta	207	552	37,50%
34	QA	Baixo risco	Discreta	203	502	40,44%
35	QA	Baixo risco	Discreta	351	646	54,33%
36	QA	Baixo risco	Discreta	0	584	0,00%
37	QA	Baixo risco	Moderada	274	722	37,95%
38	QA	Baixo risco	Moderada	244	598	40,80%
39	QA	Baixo risco	Moderada	581	935	62,14%
40	QA	Baixo risco	Moderada	449	672	66,82%
41	QA	Baixo risco	Moderada	376	901	41,73%
42	QA	Baixo risco	Moderada	117	640	18,28%
43	QA	Baixo risco	Moderada	0	528	0,00%
44	QA	Baixo risco	Moderada	82	683	12,01%

Casos	Lesão	Graduação Binária	Graduação OMS	Positivas pRb	Total pRb	% células positivas pRb
45	QA	Baixo risco	Moderada	99	814	12,16%
46	QA	Baixo risco	Moderada	82	557	14,72%
47	QA	Baixo risco	Moderada	119	537	22,16%
48	QA	Baixo risco	Moderada	355	658	53,95%
49	QA	Alto risco	Moderada	681	813	83,76%
50	QA	Baixo risco	Moderada	242	783	30,91%
51	QA	Baixo risco	Moderada	189	720	26,25%
52	QA	Alto risco	Moderada	118	675	17,48%
53	QA	Alto risco	Moderada	458	601	76,21%
54	QA	Alto risco	Moderada	456	678	67,26%
55	QA	Baixo risco	Moderada	612	832	73,56%
56	QA	Baixo risco	Moderada	457	630	72,54%
57	QA	Baixo risco	Moderada	404	830	48,67%
58	QA	Baixo risco	Moderada	0	537	0,00%
59	QA	Baixo risco	Moderada	311	733	42,43%
60	QA	Baixo risco	Moderada	483	719	67,18%
61	QA	Baixo risco	Moderada	482	733	65,76%
62	QA	Baixo risco	Moderada	0	522	0,00%
63	QA	Baixo risco	Moderada	389	747	52,07%
64	QA	Baixo risco	Moderada	169	664	25,45%
65	QA	Baixo risco	Moderada	141	527	26,76%
66	QA	Baixo risco	Moderada	172	755	22,78%
67	QA	Alto risco	Intensa	319	794	40,18%
68	QA	Alto risco	Intensa	338	575	58,78%
69	QA	Alto risco	Intensa	316	850	37,18%
70	QA	Alto risco	Intensa	327	561	58,29%
71	QA	Alto risco	Intensa	209	566	36,93%
72	QA	Alto risco	Intensa	208	543	38,31%
73	QA	Alto risco	Intensa	314	702	44,73%
74	QA	Alto risco	Intensa	331	641	51,64%
75	QA	Alto risco	Intensa	344	823	41,80%
76	QA	Alto risco	Intensa	293	763	38,40%
77	QA	Alto risco	Intensa	184	773	23,80%
78	QA	Alto risco	Intensa	0	516	0,00%
79	QA	Alto risco	Intensa	227	505	44,95%
80	QA	Alto risco	Intensa	480	776	61,86%
81	QA	Alto risco	Intensa	0	502	0,00%
82	QA	Alto risco	Intensa	164	673	24,37%
83	QA	Alto risco	Intensa	356	519	68,59%
84	QA	Alto risco	Intensa	198	520	38,08%
85	QA	Alto risco	Intensa	0	536	0,00%
86	QA	Alto risco	Intensa	293	571	51,31%
87	QA	Alto risco	Intensa	111	856	12,97%
88	QA	Alto risco	Intensa	0	607	0,00%

Casos	Lesão	Graduação Binária	Graduação OMS	Positivas pRb	Total pRb	% células positivas pRb
89	QA	Alto risco	Intensa	505	698	72,35%
90	QA	Alto risco	Intensa	389	531	73,26%
91	QA	Alto risco	Intensa	255	704	36,22%
92	QA	Alto risco	Intensa	458	855	53,57%
93	QA	Alto risco	Intensa	338	506	66,80%
94	QA	Alto risco	Intensa	26	539	4,82%
95	QA	Alto risco	Intensa	96	501	19,16%
96	QA	Alto risco	Intensa	302	533	56,66%
97	LN	LN	LN	72	599	12,02%
98	LN	LN	LN	323	766	42,17%
99	LN	LN	LN	394	507	77,71%
100	LN	LN	LN	374	713	52,45%
101	LN	LN	LN	574	892	64,35%
102	LN	LN	LN	493	863	57,13%
103	LN	LN	LN	237	574	41,29%
104	LN	LN	LN	175	712	24,58%
105	LN	LN	LN	184	674	27,30%
106	LN	LN	LN	544	867	62,75%
107	LN	LN	LN	459	836	54,90%
108	LN	LN	LN	280	788	35,53%
109	LN	LN	LN	302	511	59,10%
110	LN	LN	LN	198	682	29,03%
111	LN	LN	LN	358	525	68,19%
112	CEL	CEL	CEL	109	551	19,78%
113	CEL	CEL	CEL	171	773	22,12%
114	CEL	CEL	CEL	310	575	53,91%
115	CEL	CEL	CEL	0	507	0,00%
116	CEL	CEL	CEL	168	847	19,83%
117	CEL	CEL	CEL	162	638	25,39%
118	CEL	CEL	CEL	69	623	11,08%
119	CEL	CEL	CEL	157	592	26,52%
120	CEL	CEL	CEL	274	767	35,72%
121	CEL	CEL	CEL	193	582	33,16%
122	CEL	CEL	CEL	0	515	0,00%
123	CEL	CEL	CEL	348	716	48,60%
124	CEL	CEL	CEL	205	774	26,49%
125	CEL	CEL	CEL	390	596	65,44%
126	CEL	CEL	CEL	210	614	34,20%
127	CEL	CEL	CEL	314	702	44,73%
128	CEL	CEL	CEL	0	618	0,00%
129	CEL	CEL	CEL	0	587	0,00%
130	CEL	CEL	CEL	161	724	22,24%
131	CEL	CEL	CEL	252	947	26,61%
132	CEL	CEL	CEL	477	897	53,18%

Casos	Lesão	Gradação Binária	Gradação OMS	Positivas pRb	Total pRb	% células positivas pRb
133	CEL	CEL	CEL	204	647	31,53%
134	CEL	CEL	CEL	107	621	17,23%
135	CEL	CEL	CEL	180	834	21,58%
136	CEL	CEL	CEL	77	500	15,40%
137	CEL	CEL	CEL	491	601	81,70%
138	CEL	CEL	CEL	369	975	37,85%
139	CEL	CEL	CEL	603	888	67,91%
140	CEL	CEL	CEL	597	982	60,79%
141	CEL	CEL	CEL	569	863	65,93%

QA-CEL – casos de pacientes de queilite actínica com posterior diagnóstico de carcinoma epidermoide de lábio; QA – casos pacientes apenas com diagnóstico queilite actínica; CEL – casos de pacientes apenas diagnosticados com carcinoma pidermoide de lábio; LN – fragmento de semimucosa de lábio com aspectos usuais de normalidade.

Quadro 5.2 - Resultados das reações de imuno-histoquímica para o anticorpo anti-proteína pRb, distribuídos de acordo com os grupos do presente estudo: Os casos de queilite actínica foram ainda distribuídos quanto ao grau de displasia epitelial. Os casos com total de células positivas igual a “0” apresentaram ausência total da expressão da proteína

Gráfico 5.16 - Porcentagem de células positivas para o marcador pRb entre os grupos : pacientes diagnosticados apenas com QA (QA), esses distribuídos de acordo com os graus de displasia epitelial do sistema binário, pacientes de QA com posterior diagnóstico de CEL (QA-CEL), Lábio normal e pacientes apenas com diagnóstico de CEL

Gráfico 5.17 - Porcentagem de células positivas para o marcador pRb entre os grupos: pacientes com diagnóstico apenas de QA (QA), esses distribuídos de acordo com os graus de displasia epitelial do sistema proposto pela OMS, pacientes do grupo QA com posterior diagnóstico de CEL (QA-CEL), Lábio normal e CEL

A análise estatística quanto à expressão do anticorpo anti-proteína Rb (pRb) teve início com a descrição da média, da mediana e da variabilidade do percentual de células positivas para essa proteína, sendo os casos de pacientes com diagnóstico apenas de QA graduados quanto ao status de displasia epitelial de acordo com o sistema da OMS. A média percentual de células positivas para a proteína pRB foi de 47,23% no grupo controle com ausência de lesão no epitélio da semimucosa de lábio, ou seja, o lábio normal; 35,31% em QA com displasia epitelial discreta, 39,39% em QA com displasia moderada e 38,50% em QA com displasia intensa de pacientes dignosticados apenas com QA; 48,41% em pacientes de QA com posterior diagnóstico de CEL e 32,30% em pacientes diagnosticados apenas com CEL. A mediana dos casos avaliados distribuiu-se da seguinte forma: 0,52 para o grupo lábio normal; 0,38 nos casos de displasia epitelial discreta, 0,31 nas displasias moderadas e 0,39 para os casos de displasia intensa; 0,53 para os casos pacientes de QA com diagnóstico posterior de CEL e 0,28 para os casos de pacientes com diagnóstico apenas de CEL. O grupo que apresentou maior variabilidade no percentual de células positivas para a proteína pRb foi a displasia

epitelial moderada, enquanto o grupo com menor variabilidade percentual de células positivas foi o grupo de pacientes de QA que também possuíam diagnóstico de CEL (QA-CEL).

Gráfico 5.18 - Gráfico Blox-Plot comparando a mediana do percentual de células positivas para a proteína pRb entre os grupos Lábio normal (Controle), QA discreta, QA moderada, QA intensa, pacientes de QA diagnosticados posteriormente como CEL (QA.CEL) e CEL

A média do percentual de células positivas para pRb nos grupos avaliados nesse estudo foi comparado através do teste estatístico de Variância, com nível de significância de 95%, o qual revelou um valor de p de 0,27. No entanto, como o quadrado das médias do percentual de células positivas para pRb dos grupos foi maior que o quadrado das médias dos resíduos, a hipótese de um ou mais grupos apresentar média com diferença significativa não pode ser descartada. Por isso, foi realizado o teste de Tukey, com valor de significância de 95%, para comparar as médias percentuais de células positivas para a proteína pRb sobre o total de células contadas dos grupos entre si, e essa comparação não foi estatisticamente significativa. Os valores de p dos testes estatísticos de Variância e Tukey encontram-se nas tabelas a seguir:

Tabela 5.13 – Tabela de Variância para comparação entre o percentual de células positivas para a proteína pRb entre os grupos, em que os casos de QA tiveram displasia epitelial graduada de acordo com o sistema da OMS 2005.

	<i>Diferença</i>	<i>Soma dos Quadrados</i>	<i>Quadrado das médias</i>	<i>Valor de F</i>	<i>P(>F)</i>
Grupos	5	0,3158	0,063169	1,2953	0,27
Resíduos	128	6,2421	0,048767		

Tabela 5.14 Valores de p do teste de Tukey nas comparações entre a positividade do anticorpo anti-pRb e os grupos do estudo, em que os casos de pacientes com diagnóstico apenas de QA foram graduados de acordo com o sistema da OMS quanto à displasia epitelial

<i>Grupo</i>	<i>Diferença</i>	<i>Inferior</i>	<i>Superior</i>	<i>p adj</i>
LN-CEL	0,14866667	0,05338575	0,35071908	0,2792246
QA discreta - CEL	0,03033333	0,13464177	0,19530844	0,9947738
QA intensa - CEL	0,06166667	0,10330844	0,22664177	0,8879278
QA moderada - CEL	0,0740579	0,10302526	0,2511412	0,8312756
QA-CEL - CEL	0,16	0,12574527	0,44574527	0,5868739
QA discreta - LN	0,11833333	0,32038575	0,08371908	0,5379365
QA intensa - LN	0,087	0,28905242	0,11505242	0,8133352
QA moderada - LN	0,0746087	0,28666261	0,13744522	0,9111713
QA-CEL - LN	0,01133333	0,29730683	0,3199735	0,9999981
QA intensa - QA discreta	0,31333333	0,13364177	0,19630844	0,993919
QA moderada - QA discreta	0,04372464	0,13335859	0,22080787	0,9798976
QA-CEL - QA discreta	0,12966667	0,1560786	0,41541193	0,7774102
QA moderada - QA intensa	0,0123913	0,16469193	0,18947454	0,9999521
QA-CEL - QA intensa	0,09833333	0,18741193	0,3840786	0,918568
QA-CEL - QA moderada	0,08594203	0,20696076	0,37884482	0,9575575

Gráfico 5.19 – Intervalos de confiança do Teste de Tukey com relação à média da positividade de pRb nos grupos: fragmento de semimucosa de lábio normal, o controle sem lesão (Controle); pacientes de QA com posterior diagnóstico de CEL (QA-CEL); pacientes apenas diagnosticados com QA, esses graduados de acordo com o sistema da OMS de displasias epiteliais e pacientes com diagnóstico apenas de CEL

Como todos os intervalos contém o valor 0 (zero), conclui-se que não há diferenças significativas entre a positividade da proteína pRb (sobre o total de células) para nenhuma das comparações entre os grupos.

A análise da expressão da proteína pRb sob a análise da displasia epitelial de casos de QA de acordo com o sistema binário revelou que as médias do percentual de células positivas para a proteína pRb foi de 35,65% nas lesões de baixo risco e 41,17% nas lesões de alto risco de pacientes apenas diagnosticados com QA. Os pacientes de QA com posterior diagnóstico de CEL foram todos

graduados como lesões de alto risco e exibiram média de 48,41% para o percentual de células positivas da proteína pRb. Já as medianas com relação à porcentagem de células positivas para pRb com relação ao total de células contadas foram: 0,52 para o grupo fragmento de lábio normal – controle; 0,38 para casos de pacientes apenas com diagnóstico de QA graduadas como baixo risco; 0,42 para casos de pacientes apenas com diagnóstico de QA graduados como lesões de alto risco; 0,53 para QAs com evolução para CEL, cujos 6 casos foram graduados como lesões de alto risco, e 0,28 para os casos de CEL.

A maior variabilidade de porcentagem de células positivas para pRb com relação à mediana foi observada em casos de lesões de alto risco de pacientes com diagnóstico apenas de QA. Já os casos com menor variabilidade foi observado no grupo de pacientes com lesões de QA com diagnóstico posterior de CEL.

Gráfico 5.20 - Gráfico Blox-Plot comparando a mediana do percentual de células positivas para a proteína pRb entre os grupos Controle (Lábio normal), QA alto risco, QA baixo risco, pacientes de QA com diagnóstico posterior de CEL (QA.CEL) e pacientes apenas diagnosticados como CEL

A análise estatística de Variância obteve valor de p de 0,1862, indicando que a diferença na média de células pRb positivas com relação ao total de células contadas são causadas por variabilidade da própria amostra. No entanto, como o quadrado das médias dos grupos foi maior que o quadrado das médias dos resíduos, a hipótese de diferença na média em algum dos grupos não pode ser descartada. Assim, o teste estatístico de Tukey foi realizado para comparar as médias dos percentuais de células positivas para a proteína pRb entre os grupos, adotando-se o valor de significância de 95%. No entanto, a comparação de nenhum grupo mostrou-se estatisticamente significativa.

Tabela 5.15 – Tabela ANOVA para comparação entre o percentual de células positivas entre os grupos, em que os casos de QA tiveram displasia epitelial graduada de acordo com o binário.

	<i>Diferença</i>	<i>Soma dos Quadrados</i>	<i>Quadrado das médias</i>	<i>Valor de F</i>	<i>P(>F)</i>
Grupos	4	0,3075	0,076867	1,5692	0,1862
Resíduos	132	6,4661	0,048986		

Tabela 5.16 - Valores de p do teste de Tukey nas comparações entre a positividade do anticorpo anti-pRb e os grupos do estudo, em que os casos de pacientes apenas com diagnóstico de QA foram graduados de acordo com o sistema binário de displasia epitelial

<i>Grupo</i>	<i>Diferença</i>	<i>Inferior</i>	<i>Superior</i>	<i>p adj</i>
Baixo risco - Alto risco	-0,03207784	-0,17431234	0,11015666	0,9710333
CEL - Alto risco	-0,07518519	-0,23757491	0,08720454	0,7035842
LN - Alto risco	0,07348148	-0,12365216	0,27061513	0,8405985
QA-CEL - Alto risco	0,08481481	-0,19147386	0,36110349	0,9146049
CEL - Baixo risco	-0,04310734	-0,18037619	0,0941615	0,9078827
LN - Baixo risco	0,10555932	-0,07145477	0,28557341	0,4688837
QA-CEL - Baixo risco	0,11689266	-0,14541965	0,37920496	0,7324149
LN - CEL	0,14866667	-0,04491473	0,34224806	0,216093
QA-CEL - CEL	0,16	-0,11376543	0,43376543	0,4896037
QA-CEL - LN	0,01133333	-0,28436713	0,3070338	0,9999711

Gráfico 5.21 – Intervalos de confiança do Teste de Tukey quanto à média da positividade de pRb com relação ao total de células contadas entre os grupos: fragmento de semimucosa de lábio normal, o controle sem lesão (Controle); pacientes de QA com posterior diagnóstico de CEL (QA.CEL); pacientes diagnosticados apenas com QA graduados de acordo com o sistema binário de displasias epiteliais e pacientes apenas com CEL

Figura 5.1 - Imuno-histoquímica para Ki-67 e pRb. Expressão de proteína Ki-67 em lábio normal (A), casos de QA com displasia epitelial discreta (C), moderada (E) e intensa (G) de pacientes diagnosticados apenas com QA; e caso de CEL (I). Expressão de pRb em lábio normal (B), casos de QA com displasia epitelial discreta (D), moderada (F) e intensa (H), de pacientes diagnosticados apenas com QA; e caso de CEL (J).

Figura 5.2 - Reações de imuno-histoquímica para as proteínas Ki-67 e pRb. Expressão de Ki-67 em: semimucosa de lábio normal (A); QA com displasia epitelial intensa do grupo pacientes de QA com diagnóstico posterior de CEL (C), e caso de CEL (E). Expressão de pRb em semimucosa de lábio normal (B); QA com displasia epitelial intensa, de paciente com posterior diagnóstico de CEL (D) e CEL (F)

6. DISCUSSÃO

O Serviço de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Oral e Maxilofacial da FOUSP, fundado em 1950, possui um acervo com cerca de 84 000 casos, os quais constituem fragmentos de tecido humano emblocado em parafina, originários de biópsias e peças cirúrgicas, enviados com a finalidade de realização de exame anátomo-patológico. Frente a esse acervo com ampla diversidade de patologias orais, a análise das características desses casos pode ser uma fonte de conhecimento interessante.

O primeiro estudo do nosso grupo de pesquisa utilizando dados desse arquivo foi realizado pela Profa. Dra. Marília Trierveiler Martins, e constituiu na graduação histológica de 458 casos de queilite actínica (QA). Durante a realização desse estudo, percebeu-se que alguns pacientes com QA apresentavam mais de um exame anátomo-patológico referente a biópsias realizadas na zona de vermelhão de lábio, porém, com diagnóstico histopatológico de carcinoma epidermoide de lábio (CEL), indicando um processo de malignização da QA para CEL³⁷. Assim, o presente estudo teve como objetivo avaliar características epidemiológicas e clínicas de pacientes de QA que tiveram diagnóstico posterior de CEL, pacientes com diagnóstico apenas de QA e também pacientes que tiveram apenas diagnóstico de CEL, a partir de dados coletados dos arquivos do Serviço de Patologia Cirúrgica da FOUSP. A finalidade da análise clínico-epidemiológica é tentar auxiliar o profissional clínico a detectar, já nas primeiras avaliações, sinais que permitam distinguir pacientes de QA com potencial para evolução a CEL. Além disso, o presente estudo também visou estabelecer uma relação entre o comportamento biológico da QA nessas três fases da fotocarcinogênese e a expressão imuno-histoquímica de marcadores indicativos do processo de malignização, como o Ki-67 e a proteína do retinoblastoma (pRb), por considerar esse método capaz de indicar a patologistas indícios moleculares de evolução do processo de malignização de casos de QA, fornecendo, assim, dados clínicos e moleculares para a detecção precoce da evolução de CEL, fato essencial para estabelecer um prognóstico mais adequado aos pacientes.

Nesse levantamento foram encontradas 1120 fichas de requisição de exame anátomo-patológico de QA e CEL. Dessas fichas, 802 eram QAs e 318 eram CEL. Após a organização do banco de dados em ordem alfabética, foram encontradas fichas de pacientes com o mesmo nome e idades compatíveis com relação à data de realização das biópsias, as quais foram reunidas em casos. Isso resultou em um total de 998 casos. Entre esses, 10 constituíam-se de pacientes que apresentaram pelo menos um exame anátomo-patológico com diagnóstico histopatológico de QA e pelo menos um exame posterior anátomo-patológico com diagnóstico de CEL. Assim, esses pacientes foram designados como pacientes de QAs com diagnóstico posterior de CEL, ou seja, o grupo que apresentou malignização. Outros vinte casos de QA apresentaram mais de um exame anátomo-patológico, porém mantendo esse mesmo diagnóstico de QA, e o intervalo de tempo entre esses dois exames era maior ou igual a um ano. Além desses, outros 42 casos de QA apresentaram intervalo de tempo menor que 1 ano entre exames consecutivos. Todos esses casos de QA foram designados ao grupo pacientes apenas com diagnóstico de QA, ou seja, o grupo com ausência de indícios do processo de malignização. Entre os pacientes com diagnóstico apenas de CEL, 6 apresentavam mais de um exame anátomo-patológico com esse mesmo diagnóstico.

Entre os 998 casos analisados, 982 localizavam-se em lábio inferior e 11 em lábio superior, sendo 3 desses QA e 8 CEL. A maioria dos pacientes com QA em lábio superior eram mulheres, assim como 5 pacientes com CEL nessa localização. Essas pacientes apresentavam média de idades ao redor dos 60 anos. A presença de QA em lábio superior de mulheres não é relatada frequentemente na literatura. Entretanto, foi relatada uma incidência de 10% a 34%^{18,22} de casos de CEL em lábio superior, sendo que 31,3%²² desses acometiam mulheres. A menor incidência de casos de CEL em mulheres é explicada por uma menor exposição e maior proteção à radiação UV¹⁸. Contudo, o maior número de casos de CEL em lábio superior de mulheres apresenta uma etiologia controversa. Alguns autores afirmam que esses casos constituem infiltração de carcinomas epidermóides de pele para o epitélio de vermelhão de lábio superior, teoria essa reforçada pelo aspecto clínico de neoplasias em estágio avançado nesses casos, embora essa relação seja difícil de ser comprovada²¹. Nos casos de CEL em lábio superior no presente estudo, não houve relatos de neoplasias concomitantes ao CEL em pele.

A idade dos pacientes acometidos por QA e CEL na literatura revela uma prevalência dessas lesões após os 40 anos de vida^{38,35}. Nesses trabalhos, pacientes acometidos por QA sem evolução para CEL exibem idade média de 53,1 anos, e pacientes de QA com evolução para CEL apresentam média de idade de 55 anos, com idades na 5ª a 8ª décadas de vida³⁸. Os casos avaliados em nosso estudo constituíam-se de pacientes entre 11 a 93 anos. As médias de idade encontradas nos grupos pacientes com QA e posterior diagnóstico de CEL e pacientes apenas com QA apresentam-se maiores que as relatadas na literatura, sendo 63,6 anos e 58,9 anos respectivamente. A média dos pacientes com diagnóstico apenas de CEL girou em torno de 60,7 anos. A prevalência de pacientes de QA com posterior diagnóstico de CEL esteve concentrada entre a 6ª, 7ª e 8ª décadas de vida, com distribuição semelhante dos pacientes entre essas décadas. Já os pacientes acometidos somente por QA distribuem-se entre a segunda e a décima décadas de vida, com pico de prevalência entre a 5ª e a 8ª décadas. Os casos de pacientes apenas com CEL exibem encontram-se entre a 3ª e a 9ª décadas de vida, com prevalência entre a 5ª e 8ª décadas.

A comparação estatística entre a média de idade dos grupos foi avaliada pelo teste estatístico Anova, que não mostrou significância desse fator para diferenciar os estágios das lesões estudadas. Entretanto, a literatura revela que a idade seja um fator estatisticamente significativo em pacientes de QA sem evolução para CEL³⁵.

Os dados da presente pesquisa quanto à distribuição dos pacientes com relação ao sexo corroboram com os dados da literatura vigente, que demonstra uma prevalência de pacientes do sexo masculino em todos os grupos analisados, com média de 90% de pacientes do sexo masculino e 1% de pacientes do sexo feminino em pacientes de QA com posterior diagnóstico de CEL, 70% de pacientes do sexo masculino e 30% de pacientes do sexo feminino para pacientes acometidos apenas por QA e 75% para pacientes do sexo masculino e 25% de pacientes do sexo feminino acometidos apenas por CEL.

A literatura há muitos anos defende que a prevalência de casos de QA e CEL em homens ocorre devido a uma maior exposição desses pacientes à radiação UV e a uma menor proteção contra os danos promovidos por esse tipo de radiação. No

entanto, pesquisas recentes têm demonstrado uma influência hormonal no desenvolvimento de casos de carcinoma epidermoide de pele, lesão também causada por danos promovidos pela radiação UV e de comportamento biológico semelhante ao CEL. Esses trabalhos demonstraram que o gene locus neurogênico da proteína homóloga notch1 (NOTCH1), responsável pela diferenciação de queratinócitos, apresenta atividade transcricional regulada pela ativação do receptor de estrógeno $\beta 1$ (ER $\beta 1$). Assim, foi notado que em linhagens celulares de carcinoma epidermoide de pele havia uma diminuição da expressão de ER $\beta 1$, o que desencadeava a sub-regulação do gene NOTCH1, resultando em uma maior proliferação celular e menor diferenciação de queratinócitos nesses casos⁸¹. Embora não tenhamos tido acesso ao status hormonal dos pacientes, alguns resultados no presente estudo indicam que a influência hormonal no desenvolvimento de CEL pode ser possível, pois houve uma maior prevalência de casos de CEL em pacientes do sexo masculino e acometimento de mulheres com essa lesão na faixa etária média de 65 anos, época em que a produção de estrógeno é bem mais baixa. Além disso, pacientes diagnosticadas apenas com QA e pacientes de QA com evolução para CEL também apresentaram faixas etárias semelhantes a essa, de 59,3 e 63 anos respectivamente.

A grande maioria dos casos avaliados apresentou etnia leucoderma, abrangendo 100% dos casos de QA com diagnóstico posterior de CEL, 89% dos casos com diagnóstico de QA apenas e 90% dos casos de pacientes diagnosticados apenas com CEL, o que revela uma pequena diferença de porcentagem entre os grupos quanto a essa etnia. No entanto, 3% dos pacientes apenas com QA e 3 % dos pacientes apenas com CEL eram melanodermas, e ainda 1% dos pacientes diagnosticados apenas com QA eram xantodermas. A presença de 36% de pacientes melanodermas com CEL foi relatada em um trabalho realizado no Zimbábue²⁰.

A cor da pele e a proteção contra danos provocados pela radiação UV são determinados pela ação do receptor de melanocortina tipo 1 (MC1R). Esse receptor, um tipo de proteína G-transmembrana, ao ser estimulado pelo hormônio α -melanócito-estimulante e pró-ópiomelanocortina, aumenta a produção de AMP cíclico (cAMP), o qual irá ativar os genes codificadores de eumelanina - o composto efetivo na dispersão da luz UV e proteção do DNA - ao invés de feomelanina,

composto inativo quanto a dispersão da luz UV. No entanto, a presença de algumas alterações no locus do gene codificador do MC1R, como a Arg151Cys, Arg160Trp e Asp294His, promovem uma heterozigotidade ou variações nos dois alelos desse gene, resultando em uma produção elevada de feomelanina, a qual produz radicais livres em resposta à ação da radiação UV, desencadeando, assim, o processo da fotocarcinogênese. Como a presença de variações genéticas no gene codificador do MC1R foi detectada em casos de carcinoma epidermoide de pele em indivíduos com tipo de pele I, II, III e IV, ou seja, de leucodermas a melanodermas, comprova-se que a cor da pele e a presença de alterações genéticas no MC1R que levam ao desenvolvimento de carcinomas epidermóides de pele são eventos não relacionados entre si⁸². Esse fato revela que a proteção e os cuidados contra os danos da radiação UV também devem ser adotados por pacientes melanodermas.

Quanto ao aspecto clínico fundamental das lesões, aqueles observados com maior frequência foram úlceras e placas. As úlceras estavam presentes em 304 casos da amostra, acometendo em maior número os pacientes diagnosticados apenas com CEL. Esse aspecto clínico também foi considerável entre os pacientes de QA com posterior diagnóstico de CEL, sendo observado em 4 dos 10 casos. Já as placas foram detectadas em 110 casos, sendo a grande maioria, 102 desses, em pacientes apenas com QA. Além disso, áreas de ulceração foram observadas concomitantemente a outras lesões fundamentais em 11 casos, entre os quais 4 foram descritos como nódulo e úlcera e 7 casos foram considerados placas com úlceras, sendo a maioria detectados em pacientes apenas com CEL. Outros 77 casos da amostra total foram descritos como manchas e 33 casos da amostra foram descritos como nódulo. A comparação estatística entre o tipo de lesão fundamental e sua predominância em cada grupo do estudo não pode ser realizada devido à presença de poucos casos no grupo de pacientes de QA com posterior diagnóstico de CEL, além da predominância de placas e úlceras, contra um pequeno número de casos das outras lesões fundamentais.

Embora a QA geralmente seja descrita como uma placa leucoplásica na zona de vermelhão de lábio, que pode apresentar áreas ulceradas⁸³, a presença de outros aspectos como áreas de atrofia, lesões descamantes, edema dos lábios, ulceração e perda do limite entre o vermelhão de lábio e a pele são características mais frequentes que placas ou manchas³⁵. Como a presença de úlceras foi um

achado bastante frequente entre os casos de pacientes com QA e posterior diagnóstico de CEL e pacientes diagnosticados apenas com CEL, é necessário reforçar a importância da realização de biópsia incisional frente a um caso de QA com zona de ulceração.

Os dados de nossa pesquisa revelam um grande número de casos em que o aspecto clínico da lesão fundamental não foi informado. Tal fato pode ter ocorrido pois as fichas de solicitação de exame anátomo-patológico mais antigas do Serviço de Patologia Cirúrgica da FOUSP não questionavam sobre essa característica. Em tais fichas era perguntado ao cirurgião dentista clínico apenas a coloração da lesão, com as possibilidades de lesão branca, vermelha ou outras.

Houve um intenso predomínio de lesões de coloração branca entre lesões de coloração arroxeadas, cor de mucosa normal, vermelhas e lesões com outras colorações. As lesões brancas foram evidenciadas principalmente no grupo dos pacientes diagnosticados apenas com QA, entre os quais 56% exibiam essa coloração de lesão. Já as lesões de coloração avermelhada foram observadas com maior frequência entre os pacientes de QA com posterior diagnóstico de CEL, correspondendo a 20% desses casos, ao passo que entre os pacientes apenas diagnosticados com QA, 10% exibiram lesões avermelhadas e nos pacientes diagnosticados apenas com CEL, 16% dessas exibiam esse tipo de alteração. Assim, clinicamente, a presença de lesões eritematosas homogêneas pode indicar um caso de QA com maior probabilidade de evolução para CEL. Essa relação não tinha sido demonstrada antes na literatura, porém, estudos com um maior número de casos de QA com evolução para CEL necessitam ser realizados.

O grupo de pacientes de QA com posterior diagnóstico de CEL apresentou lesões com maior dimensão, exibindo tamanho médio de 33,11 mm. Já a média do tamanho das lesões de pacientes com QA apenas é 23,5 mm, e em pacientes apenas com CEL é de 27,1 mm. Embora testes estatísticos demonstrem pouca variabilidade de tamanho nas lesões de pacientes de QA com evolução para CEL, eles não demonstraram significância quanto à influência do tamanho das lesões comparado aos diferentes grupos. Esse pode ser um dos motivos pelo qual o tamanho das lesões de QA não foi um parâmetro avaliado na maioria das séries de casos publicadas. Entretanto, a dimensão de lesões é um fator importante em

tumores primários, incluindo o CEL. O tamanho da neoplasia é um fator utilizado no estadiamento clínico do sistema sistema de estadiamento tumor-linfonodo-metástase (TNM), o qual implica diretamente no prognóstico do paciente, pois os pacientes com tumores de 2 cm de diâmetro ou menos e tumores entre 2 cm e 4 cm, classificados como T1 e T2 respectivamente, constituem categorias de melhor prognóstico. Já tumores maiores que 4 cm de diâmetro ou que invadem tecidos adjacentes sem delimitação precisa, são classificados como tumores T3 e T4 e exibem um pior prognóstico⁸⁴.

O tempo de duração das lesões, definido nesse estudo como intervalo de tempo desde a detecção da lesão pelo paciente até o momento da realização da biópsia, também foi um aspecto mensurado nesse estudo. Embora exibam pouca diferença, o grupo de pacientes de QA com posterior diagnóstico de CEL apresentou um maior tempo de duração das lesões, com mediana de 18 meses, o grupo de pacientes com diagnóstico apenas de QA exibiu lesões com média de 16 meses de duração e o grupo de pacientes com diagnóstico exclusivo de CEL apresentou um tempo de duração da lesão de 12 meses. A comparação estatística entre os grupos mostrou-se estatisticamente significativa em pacientes apenas com diagnóstico de CEL com relação aos demais. Esse resultado, embora apresente uma carga considerável de subjetividade, pois depende da capacidade de percepção da lesão por cada indivíduo, revela que o processo de fotocarcinogênese é notado pela maioria dos pacientes apenas em suas fases mais avançadas, fato que demonstra uma falta de informação da população sobre o risco de transformação maligna da QA, muitas vezes interpretada como uma característica natural do processo de envelhecimento³⁵.

O tempo de duração das lesões é um aspecto bastante subjetivo, pois depende da capacidade de percepção da lesão pelo paciente,

Outros dados clínicos que foram avaliados no presente estudo são sintomatologia e diagnóstico clínico diferencial. A maioria dos pacientes da amostra total era assintomática, dado que corrobora com a literatura vigente e é um fator que prejudica o diagnóstico precoce de casos de CEL, pois os pacientes que não conhecem as características da QA e seu potencial para transformação maligna demoram a procurar auxílio de um profissional de saúde para o correto tratamento

dessa lesão. No entanto, o grupo de pacientes diagnosticados apenas com QA exibiu a maior porcentagem de pacientes que relataram algum tipo de sintomatologia – 73%. A sensação de queimação e inchaço foram os sintomas relatados em 34,48% dos casos do estudo de Cavalcante e colaboradores 2005³⁵, sendo que a sensação de queimação foi um sintoma já descrito no trabalho de Main e Pavone³². Já o grupo de pacientes de QA com posterior diagnóstico de CEL apresentou o menor número de pacientes sintomáticos, com uma porcentagem de 10% e os pacientes com CEL apenas apresentam porcentagens mais equilibradas quanto a sintomatologia, com 28% de pacientes sintomáticos e 59% de pacientes assintomáticos.

Na maioria dos casos da amostra, o diagnóstico histopatológico foi realizado mediante à análise de fragmentos de biópsia incisional, observada em 90% dos casos de pacientes de QA com evolução para CEL, 65% dos casos de pacientes de QA sem evolução para CEL e 72% dos casos de pacientes com CEL.

As lesões mais frequentemente estabelecidas como diagnóstico diferencial clínico nas fichas de exame anátomo-patológico da amostra avaliada foram QA, CEL, leucoplasia, nevus, hemangioma, líquen plano e outras. O grupo de pacientes de QA com posterior diagnóstico de CEL teve, na maioria dos casos, diagnóstico diferencial clínico de QA (40%) e CEL (20%), revelando um aspecto típico de lesões malignas ou com potencial de malignização em semimucosa de lábio. Já o grupo de pacientes com diagnóstico de QA apenas apresentou, em sua maioria, diagnóstico clínico diferencial de QA (52%), mas também foram enviados os diagnósticos de CEL, nevus, hemangioma e líquen plano, em proporções menores, mas demonstrando um aspecto clínico bastante diversificado para lesões desse grupo. O mesmo ocorreu no grupo de pacientes diagnosticados apenas com CEL, que apresentou diagnóstico diferencial clínico de CEL na maioria dos casos (56%), entretanto QA, leucoplasias e nevus também foram diagnósticos diferenciais estabelecidos para esses casos.

A busca por características além de sinais e sintomas clínicos que indiquem quais casos de lesões potencialmente malignas exibem maior probabilidade de evoluir para carcinoma epidermoide vem ocorrendo desde 1957, e essa questão levou à reunião de pesquisadores no Centro de Colaboração e Referência para

Lesões Orais Pré-Cancerizáveis da OMS, grupo que visa uniformizar o conhecimento para estabelecer as melhores formas de tratamento para casos de leucoplasias intraorais, eritroplasias, fibrose submucosa intraoral e QA, a fim de que os pacientes com essas lesões apresentem o melhor prognóstico⁷.

No entanto, mesmo tendo a consciência de que os danos provocados pela radiação UV no genoma podem levar ao desenvolvimento de CEL, não foram realizados trabalhos que indiquem a real taxa de transformação maligna das QAs, e além disso, os sistemas de graduação de displasias epiteliais, mecanismo utilizado para traçar o tratamento e o prognóstico de casos de lesões com potencial de transformação maligna, foram baseados no prognóstico de casos de leucoplasias intraorais, não de QAs, lesões com etiologia e comportamento biológico completamente diferentes. Um trabalho realizado pelo nosso grupo demonstrou que um grande percentual de casos de QA adjacentes a CEL exibem poucas alterações morfológicas no epitélio de superfície, mas a intensa expressão de proteína p53 mutada nesses mesmos casos revelou que o grau de alterações morfológicas mensuradas pelos sistemas de graduação de displasias epiteliais mais utilizados por patologistas não correspondem ao nível de expressão de danos em genes responsáveis pela manutenção da estabilidade do genoma, fato que pode implicar na falta de acurácia no prognóstico dos pacientes com QA¹⁰. Por isso, o estudo de métodos para aprimorar critérios morfológicos e também moleculares que indiquem eventos precoces do processo de malignização devem ser incentivados.

Primeiramente, os 6 casos do grupo pacientes de QA com diagnóstico posterior de CEL e os 90 casos do grupo pacientes apenas com diagnóstico de QA, foram submetidos a uma avaliação dos critérios arquiteturais e citológicos da OMS, pois essa é a base para o mecanismo de classificação de displasias epiteliais nos dois sistemas mais utilizados por patologistas: o sistema da OMS 2005⁷⁶ e o sistema binário⁹. Imediatamente após essa avaliação da presença dos critérios arquiteturais e citológicos, foi realizada a graduação da displasia epitelial utilizando-se os dois sistemas mais utilizados na literatura. O grupo de pacientes de QA com posterior diagnóstico de CEL apresentou seus 6 casos classificados como lesões de alto risco, de acordo com o sistema binário, além de 3 casos graduados como displasia moderada e 3 casos graduados como displasia intensa, de acordo com o sistema da OMS. Já o grupo de pacientes com diagnóstico apenas de QA revelou a presença

de 34 casos de lesões de alto risco e 56 casos de lesões de baixo risco. Entre essas lesões consideradas de alto risco, 4 foram graduadas como displasias epiteliais moderadas e 30 foram consideradas displasias epiteliais intensas pelo sistema da OMS. Já as lesões de baixo risco englobaram todas as displasias epiteliais discretas mais 26 casos de displasia epitelial moderada. Tais dados revelam uma maior acurácia do sistema binário em traçar o prognóstico de casos de QAs, pois todos os casos que evoluíram para CEL foram considerados lesões de alto risco, e todos os casos de QA exibindo displasia epitelial discreta e considerados lesões de baixo risco não tiveram evolução para CEL.

A correlação entre a presença de critérios arquiteturais e citológicos e o grau de displasia epitelial nos grupos pacientes de QA com posterior diagnóstico de CEL e pacientes com diagnóstico apenas de QA demonstrou resultados curiosos. A perda de polaridade das células da camada basal foi uma característica observada em 100% dos casos do grupo de pacientes apenas com QA e também em 100% dos casos de pacientes de QA com posterior diagnóstico de CEL, demonstrando que essa é uma característica determinante da lesão QA, e não de um estágio específico do processo de malignização, pois foi observada em porcentagens iguais tanto no grupo de lesões de baixo risco como em lesões de alto risco. Entretanto, no caso de leucoplasias intraorais, a presença do critério perda de polaridade das células da camada basal apresenta um peso importante no processo de desenvolvimento do carcinoma epidermoide intraoral, fato que demonstra características histológicas distintas no processo de malignização de leucoplasias intraorais e CEL^{77,78}.

A estratificação epitelial irregular também foi um critério observado com grande frequência em casos do grupo pacientes apenas com diagnóstico de QA – 67% - e do grupo pacientes de QA com posterior diagnóstico de CEL – 100% dos casos. Não houve uma diferença percentual acentuada da frequência desse critério considerando os graus do sistema binário, pois há 67% dos casos de lesões de alto risco e 59% dos casos de lesões de baixo risco com estratificação epitelial irregular. Assim como no trabalho de Martins³⁷, para a determinação desse critério foram considerados tanto casos em que era possível observar falta de maturação dos queratinócitos como atrofia extrema, e esse pode ser um motivo para a presença desses casos nos graus de displasia epitelial com maior alteração morfológica – 100% das lesões de alto risco, 100% das displasias moderadas e 100% das

displasias intensas de pacientes de QA com diagnóstico posterior de CEL, e 70% das displasias moderadas e 97% das displasias intensas nos casos de pacientes de QA sem evolução para CEL. Essa alteração arquitetural apresenta os maiores índices de discordância entre os patologistas do estudo de Kujan⁷⁸, fato que pode implicar na subjetividade dos sistemas morfológicos de graduação de displasias epiteliais⁷⁸. Assim, é necessário uma definição mais clara a respeito desse critério

No critério projeção em gota, houve uma frequência muito mais elevada em lesões de alto risco e displasias epiteliais intensas e moderadas de ambos os grupos pacientes de QA com posterior diagnóstico de CEL e pacientes apenas diagnosticados com QA, do que em lesões de baixo risco e displasias discretas nos dois grupos. Esse fato é explicado porque a OMS preconiza que a presença desse critério eleva o grau de displasia epitelial em casos de leucoplasias intraorais⁷⁶. Como essa foi uma regra estabelecida pela OMS, esse critério apresenta um elevado índice de concordância entre observadores⁷⁸, demonstrando que uma padronização dos critérios diminui a subjetividade entre os graus de displasia epitelial.

O aumento do número de figuras de mitose foi observado em 100% dos casos do grupo pacientes de QA posterior diagnóstico de CEL e 33% das lesões de pacientes apenas com QA, podendo ser considerado, portanto, um critério importante no processo de transformação maligna durante a fotocarcinogênese. Esse critério estava presente principalmente nos casos de displasia epitelial mais elevados, dos dois sistemas de classificação utilizados. A presença de mais de uma figura de mitose foi considerada um aumento, assim como no trabalho de Martins et al, e os critérios para reconhecer as figuras de mitose foram: membrana nuclear ausente, cromossomos condensados e citoplasma basofílico⁸⁵. Essa alteração não apresenta implicação clínica em casos de leucoplasias intraorais⁷⁸.

Os critérios queratinização prematura em células isoladas e mitoses altas foram os menos frequentemente observados em nossa amostra. Além disso, não foi observado nenhum caso no presente estudo demonstrando pérolas de queratina em projeções epiteliais.

Entre os critérios citológicos, os mais frequentes foram pleomorfismo celular e pleomorfismo nuclear, observados em 100% dos casos do grupo de pacientes de QA com posterior diagnóstico de CEL e 97% do grupo de pacientes diagnosticados apenas como QA. Esses critérios estiveram presentes em todos os graus de displasia epitelial em ambos os grupos, diferentemente dos resultados descritos no trabalho de Martins³⁷, em que houve uma maior frequência de pleomorfismo celular e pleomorfismo nuclear nos graus de displasia epitelial mais elevados. O pleomorfismo celular foi um dos critérios citológicos com menor discrepância entre observadores em casos de leucoplasias intraorais, e o pleomorfismo nuclear demonstrou relevância clínica com a malignidade nessas lesões⁷⁸, diferentemente dos resultados observados nos casos de QA do presente estudo.

A variação anormal do tamanho do núcleo, variação anormal do tamanho da célula e alteração da relação núcleo/citoplasma foram critérios citológicos observados em 100% dos casos de QA com evolução para CEL e 45% das lesões de QA sem evolução para CEL. Em ambos os grupos avaliados, esses critérios foram observados principalmente em lesões de alto risco com displasias moderadas e intensas, ou seja, lesões com maior grau de alterações morfológicas. Nesses casos, os queratinócitos exibiam, em sua maioria, núcleo com volume aumentado, assim como o citoplasma, constituindo critérios morfológicos importantes a serem considerados no processo de malignização de casos de QA. Em casos de leucoplasias intraorais, os critérios variação anormal do tamanho do núcleo e variação anormal do tamanho da célula também exibiram relevância clínica no processo de malignidade. No entanto, a variação anormal do tamanho do núcleo foi uma alteração que apresentou grande discrepância entre patologistas⁷⁸, demonstrando a necessidade de esclarecimento e padronização desse critério.

Já células com núcleo aumentado foram observadas em maior proporção e em porcentagens semelhantes em casos de lesões de alto risco, nos dois grupos analisados: pacientes de QA com posterior diagnóstico de CEL (67%) e pacientes apenas com diagnóstico de QA (62%). Quando o sistema utilizado foi o da OMS, a presença de células com núcleo aumentado foi observada em maior porcentagem em casos de displasia moderada entre os pacientes de QA que desenvolveram CEL, ao passo que entre os pacientes apenas com QA, o grau de displasia com maior índice de células com núcleo aumentado foi a intensa, demonstrando uma

discrepância de informações sobre aumento do tamanho do núcleo no sistema da OMS nos diferentes estágios da fotocarcinogênese, o que favorece a subjetividade desse sistema de classificação de displasias.

A presença de figuras de mitose anormais foi o critério citológico menos observado na amostra analisada, pois apenas 9% das lesões de alto risco do grupo de pacientes apenas diagnosticados com QA apresentaram essa alteração, e esses casos foram graduados como displasias epiteliais intensas no sistema da OMS, representando agora 10% dos casos desse subgrupo. Em casos de leucoplasias intraorais, as mitoses anormais foram observadas com maior frequência, com percentuais de 1,5% a 38% dependendo do patologista observador, e esse também foi considerado um critério relacionado à malignidade desses casos⁷⁸.

O aumento do número e tamanho de nucléolos representa um estágio imediatamente após a divisão celular, em que múltiplos nucléolos se formam para depois ser formado um único nucléolo, e por isso essa característica tem sido relacionada à atividade mitótica⁸⁶. Assim, a expressão dessa alteração morfológica, observada principalmente nas lesões de alto risco no grupo pacientes de QA com posterior diagnóstico de CEL exibindo displasia moderada e intensa indicam a relação desse critério com um comportamento biológico de malignidade, assim como foi comprovado em casos de leucoplasias intraorais⁷⁸.

O hiperchromatismo foi um critério de atipia observado com grande frequência entre os casos estudados. Essa alteração constituiu 84% das lesões de alto risco do grupo de pacientes de QA que tiveram evolução para CEL e 85% das QAs sem evolução para CEL, não sendo significativa na distinção entre esses dois grupos. Quanto ao sistema da OMS, a menor frequência de hiperchromatismo foi observada entre os casos de displasia moderada do grupo de pacientes de QA com posterior diagnóstico de CEL, e a maior frequência foi observada entre os casos de displasia intensa de QA desse mesmo grupo.

O trabalho de Kujan⁷⁸ revela ainda que, embora haja uma grande subjetividade em reconhecer os critérios arquiteturais e citológicos da OMS por vários patologistas, fato que implica diretamente na determinação do grau de displasia epitelial no sistema elaborado por essa instituição, e consequentemente,

no tratamento e prognóstico dos pacientes portadores de lesões com potencial de malignização, a utilização do sistema binário revelou uma maior concordância em se determinar o grau de displasia final desse tipo de lesão, fazendo com que a subjetividade em reconhecer os critérios morfológicos fique diluída e tenha uma menor influência no grau de displasia final, fato considerado uma vantagem a mais desse sistema com relação ao da OMS.

Tendo em mente o propósito de buscar marcadores moleculares para detectar indícios precoces do processo de transformação maligna de casos de QA, a segunda parte do presente estudo visou, ainda, comparar a expressão de duas moléculas indicadoras do processo de malignização – a proteína Ki-67 e pRb – nos diferentes status de displasia epitelial dos grupos: pacientes apenas com diagnóstico de QA, pacientes de QA com posterior diagnóstico de CEL, pacientes apenas com diagnóstico de CEL e também fragmentos de semimucosa de lábio com aspecto de normalidade.

A escolha das proteínas Ki-67 e pRb deve-se ao fato de que ambas atuam no controle do ciclo celular da fase G1 para S, período que evidencia o início da divisão celular. Um nível de proliferação celular exacerbado seria considerado um forte indício do processo de malignização. No entanto, enquanto a proteína Ki-67 encontra-se em maior expressão nas células proliferantes⁷⁵, a proteína pRb exibe uma menor expressão nessa situação, pois sua inativação via fosforilação permite a interação do dímero E2F com o DNA, constituindo assim um fator de transcrição para genes de progressão do ciclo celular para fase de preparação da mitose⁷².

A maioria dos casos do grupo pacientes de QA com posterior diagnóstico de CEL teve uma porcentagem de células positivas para Ki-67 baixa, com uma mediana de 14%. Já os casos do grupo pacientes apenas com diagnóstico de QA tiveram porcentagens de células positivas para esse anticorpo um pouco maiores, e distribuídas da seguinte forma: 15% para os casos de displasia discreta, 20% para os casos de displasia moderada e 18% para as displasias intensas. O grupo controle sem lesão, o lábio normal, foi 16% e o grupo CEL foi 15%. A distribuição da positividade de células nesses grupos não revelou nenhum padrão específico. (gráficos de dispersão). Considerando-se a porcentagem de células positivas para Ki-67 entre os graus de displasia epitelial do sistema binário, o grupo de pacientes

de QA com posterior diagnóstico de CEL apresentou mediana de células positivas com relação ao total de células contadas de 15%, já no grupo pacientes apenas com diagnóstico de QA, a mediana foi 18% para as lesões de baixo risco e 20% para lesões de alto risco, também revelando porcentagens de células positivas semelhantes entre os grupos. A distribuição de positividade de células entre os grupos não revelou nenhum padrão específico.

Além disso, as comparações estatísticas entre a porcentagem de células positivas para Ki-67 e os grupos pacientes de QA com posterior diagnóstico de CEL, pacientes apenas com diagnóstico de QA com displasias discreta, moderada e intensa, lábio normal e CEL não demonstrou significância estatística, assim como a comparação entre os grupos pacientes de QA com posterior diagnóstico de CEL, pacientes apenas com diagnóstico de QA com lesões de alto risco e baixo risco, CEL e lábio normal. Esse fato revela que as taxas de proliferação celular são baixas e ocorrem de maneira semelhante nas diversas fases da fotocarcinogênese de acordo com o sistema da OMS e do sistema binário, não permitindo a distinção entre uma fase e outra, nem mesmo conseguem diferenciar a QA do tecido normal, provando que o Ki-67 não pode ser considerado um marcador biológico para indicar o processo de malignização de casos de QA.

No entanto, a razão “expressão da proteína Ki-67/ expressão da proteína p53 maior que 3” foi um fator observado em 4 de 7 casos com leucoplasias orais sem displasia epitelial que evoluíram para carcinoma epidermoide intraoral, sendo considerado estatisticamente significativo para detectar sinais precoces de transformação maligna em mucosa oral⁸⁷. Esse fato evidencia que a combinação de vários marcadores pode ser mais significativo em indicar sinais de alterações genéticas de desestabilização do genoma que moléculas isoladas.

A proteína pRb mostrou um nível de expressão bastante elevado entre os casos de QA, em todos os estágios da fotocarcinogênese, e foi observada tanto nos estratos basal e parabasal, os quais possuem maior número de células em estágio de proliferação, como nas camadas superiores, que apresentam níveis de proliferação baixos, pois são células altamente diferenciadas.

A maioria dos casos do grupo pacientes de QA com posterior diagnóstico de CEL teve uma porcentagem de células positivas para pRb considerável, com uma mediana de 53%. Já no grupo pacientes apenas com diagnóstico de QA, a mediana da porcentagem de células positivas para esse anticorpo foi 38% para os casos de displasia discreta, 31% para os casos de displasia moderada e 39% para as displasias intensas. O grupo controle sem lesão, o lábio normal, foi 52% e o grupo pacientes apenas com diagnóstico de CEL foi 28%. A mediana de porcentagem de células positivas entre os grupos pacientes de QA com posterior diagnóstico de CEL foi maior em comparação com todos os níveis de displasia epitelial do grupo pacientes apenas com diagnóstico de QA, evidenciando uma discrepância, pois no processo de proliferação celular, o mais obvio é esperar uma inativação e perda de expressão da proteína pRb. Além disso, a comparação das medianas da porcentagem de células positivas dos grupos QA com evolução para CEL e lábio normal foi semelhante, demonstrando que esse marcador não é capaz de distinguir o processo de malignização da QA. A distribuição da positividade de células nesses grupos não revelou nenhum padrão específico (gráficos de dispersão). Uma pesquisa realizada em território nacional também evidenciou aumento na expressão imuno-histoquímica de pRb em 75% dos casos de carcinoma epidermoide intraoral e de lábio. No entanto, a maior positividade dessa proteína em lesões com potencial de malignização - leucoplasias intraorais e QA - foi de 25%, resultado que demonstra um marcador biológico em fases avançadas do processo de carcinogênese⁸⁸. A expressão de pRb também foi elevada em casos de carcinoma epidermoide de laringe, com 88% dos casos positivos para essa proteína⁸⁹.

Considerando-se a porcentagem de células positivas para pRb entre os graus de displasia epitelial do sistema binário, o grupo pacientes de QA com posterior diagnóstico de CEL exibiu mediana de células positivas com relação ao total de células contadas de 53% . Já o grupo pacientes com diagnóstico apenas de QA teve mediana de 38% entre as lesões consideradas de baixo risco e 42% para as lesões consideradas de alto risco, revelando uma pequena variação entre os grupos.

Além disso, as comparações estatísticas entre a porcentagem de células positivas para pRb e os grupos pacientes de QA com posterior diagnóstico de CEL, pacientes apenas com diagnóstico de QA com displasias discreta, moderada e

intensa, lábio normal e pacientes com CEL, não demonstrou significância estatística, assim como a comparação entre os grupos pacientes de QA com posterior diagnóstico de CEL, pacientes apenas com diagnóstico de QA com lesões de baixo risco, pacientes com diagnóstico apenas de QA com lesões de alto risco, lábio normal e pacientes com CEL. Esse fato revela que os níveis de produção de proteína pRb são elevados e se mantêm constantes em todas as fases da fotocarcinogênese. Em neoplasias como carcinoma de orofaringe, o retinoblastoma, carcinomas de pulmão, osteossarcomas, carcinomas de mama e outros, os níveis de expressão da proteína pRb são baixos, pois ocorre a inibição da produção dessa proteína devido a mutações no gene RB, ou destruição da proteína por proteínas virais, como em neoplasias causadas pelo HPV⁷².

A proteína pRb é considerada um marcador biológico de diagnóstico para lesões causadas pelo vírus HPV, pois em 90% dos casos de carcinoma epidermoide de orofaringe em que o RNA viral foi detectado, 85% tiveram diminuição da expressão de pRb ao utilizarem os clones IF8 (Santa Cruz Biotechnology Inc. California EUA) e Bp-53-11 (Progen Biotech Heidelberg, Alemanha)^{74,90}. No entanto, no caso do presente estudo foi utilizado o clone Rb1, o qual se mostrou inespecífico para detectar a proteína Rb fosforilada, responsável pela inibição da transcrição de proteínas de controle da passagem do ciclo celular da fase G1 para S. Por esse motivo, a proteína pRb clone Rb1 não pode ser considerada um marcador biológico eficiente de estágios precoces da fotocarcinogênese de lábio. Apesar disso, a busca por marcadores biológicos que indiquem o prognóstico de casos de QA deve ser intensificada.

7 CONCLUSÕES

As evidências encontradas no presente estudo permitem concluir que:

- Os parâmetros epidemiológicos idade, sexo e etnia não apresentaram diferenças significantes entre os pacientes de queilite actínica (QA) que apresentaram posterior desenvolvimento de carcinoma epidermoide de lábio (CEL), pacientes apenas com diagnóstico de QA e pacientes apenas com diagnóstico de CEL
- O parâmetro lesão fundamental que caracteriza o grupo de pacientes apenas com diagnóstico de QA são as placas. Já a presença de lesões de coloração avermelhada foram evidenciadas com maior frequência em pacientes de QA com evolução para CEL. Já a média do tempo de evolução da lesão de 19 meses foi significativa para diferenciar o grupo de pacientes com diagnóstico apenas de CEL dos demais grupos. O tamanho de evolução das lesões não foi um fator significativo para diferenciar os grupos do estudo.
- Entre os critérios arquiteturais e citológicos designados pela OMS para detectar alterações morfológicas do processo de malignização, o aumento do número de figuras de mitose, variação anormal do tamanho do núcleo, variação anormal do tamanho da célula e alteração da relação núcleo/citoplasma, figuras de mitose anormal e aumento do número e tamanho de nucléolos estiveram presentes com maior frequência no grupo de pacientes de QA com posterior diagnóstico de CEL, indicando uma possível relação entre essas alterações e o início do processo de transformação maligna de casos de QA.
- O sistema binário de graduação de displasias epiteliais mostrou-se mais eficiente, na amostra analisada, em detectar lesões com maior potencial de evolução para CEL, pois todos os pacientes de QA com posterior evolução para CEL foram classificados como lesões de alto risco.

- A expressão das proteínas ki-67 e pRb não foi estatisticamente significativa em nenhum dos grupos avaliados, demonstrando falta de correlação entre esses marcadores biológicos do controle do ciclo celular e indícios precoces de transformação de casos de QA.

Assim, a avaliação de uma ampla série de casos permitiu caracterizar os casos de QA com evolução para CEL, casos de QA sem informação sobre possível malignização e casos de CEL, através de aspectos clínicos e morfológicos que podem auxiliar clínicos e patologistas a detectar traços de malignização em fases precoces da fotocarcinogênese de lábio. No entanto, outros marcadores biológicos devem ser testados em conjunto, para tentar diagnosticar alterações na instabilidade do genoma que levem ao desenvolvimento de carcinoma epidermoide de lábio.

REFERÊNCIAS¹

1. Bray F, Ren JS, Masuyer E, Ferlay J. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int J Cancer*. 2013 May;132(5):1133–45.
2. World Health Organization. globocan 2015. <http://globocan.iarc.fr/Default.aspx>.
3. Boffetta P, Hashibe M. Alcohol and cancer. *Lancet Oncol*. 2006 Feb;7(2):149–56.
4. Hasson O. Squamous cell carcinoma of the lower lip. *J Oral Maxillofac Surg*. 2008 Jun;66(6):1259–62.
5. Fox EJ, Loeb L a. Lethal Mutagenesis: Targeting the Mutator Phenotype in Cancer. *Semin Cancer Biol*. 2010 Oct;20(5):353–9.
6. Kanjilal S, Pierceall WE, Cummings KK, Kripke ML, Ananthaswamy HN. High frequency of p53 mutations in ultraviolet radiation-induced murine skin tumors: Evidence for strand bias and tumor heterogeneity. *Cancer Res*. 1993 Jun;53(13):2961–4.
7. Warnakulasuriya S. Histological grading of oral epithelial dysplasia: revisited. *J Pathol*. 2001 Jul;194(3):294–7.
8. Pindborg JJ, Reibel J, Holmstrup P. Subjectivity in evaluating oral epithelial dysplasia, carcinoma in situ and initial carcinoma. *J Oral Pathol*. 1985 Oct;14(9):698–708.
9. Kujan O, Oliver RJ, Khatrab A, Roberts SA, Thakker N, Sloan P. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. *Oral Oncol*. 2006 Nov;42(10):987–93.
10. Nagata G. Avaliação das atipias epiteliais, graduação das displasias e presença de proteína p53 mutada no epitélio adjacente a carcinomas epidermóides de lábio. [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2011.
11. Da R, Motta R, Zettler CG, Cambruzzi E, Jotz GP, Berni RB. Ki-67 and p53 correlation prognostic value in squamous cell carcinomas of the oral cavity and tongue. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2009 Jan;75(4):544–9.
12. Barzilai A, Lyakhovitsky A, Trau H, Fogel M, Huszar M. Expression of p53 in the evolution of squamous cell carcinoma: correlation with the histology of the lesion. *J Am Acad Dermatol*. 2007 Oct;57(4):669–76.

¹ De acordo com o Estilo Vancouver.

13. Montebugnoli L, Cervellati F, Cocchi R, Farnedi A, Pennesi MG, Flamminio F, et al. Immunohistochemical expression of p16INK4A protein as a helpful marker of a subset of potentially malignant oral epithelial lesions: Study on a series with long-term follow-up. *Histopathol.* 2010 May;57(4):528–34.
14. Fontes A, de Sousa SM, dos Santos E, Martins MT. The severity of epithelial dysplasia is associated with loss of maspin expression in actinic cheilitis. *J Cutan Pathol.* 2009 Nov;36(11):1151–6.
15. De Oliveira DHIP, de Sousa Lopes MLD, de Santana Sarmento DJ, Queiroz LMG, da Costa Miguel MC, da Silveira, Dantas J. Relationship between the epithelial expression of hMLH1, MDM2, and p63 and lower lip carcinogenesis. *J Oral Pathol Med.* 2013 May;357–63.
16. Moore S, Johnson N, Pierce A, Wilson D. The epidemiology of lip cancer: a review of global incidence and aetiology. *Oral Dis.* 1999 Jan;5(3):185–95.
17. Perea-Milla López E, Miñarro-Del Moral RM, Martínez-García C, Zanetti R, Rosso S, Serrano S, et al. Lifestyles, environmental and phenotypic factors associated with lip cancer: a case-control study in southern Spain. *Br J Cancer.* 2003 Mar;88(11):1702–7.
18. Abreu L, Kruger E, Tennant M. Lip cancer in Western Australia, 1982-2006: a 25-year retrospective epidemiological study. *Aust Dent J.* 2009 Jun;54(2):130–5.
19. Czerninski R, Zini a, Sgan-Cohen HD. Lip cancer: incidence, trends, histology and survival: 1970-2006. *Br J Dermatol.* 2010 May;162(5):1103–9.
20. Chidzonga MM. Lip cancer in Zimbabwe. Report of 14 cases. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2005 Mar;34(2):149–51.
21. Souza R-L, Fonseca-Fonseca T, Oliveira-Santos C-C, Corrêa G-T-B, Santos F-B-G, Cardoso C-M, et al. Lip squamous cell carcinoma in a Brazilian population: epidemiological study and clinicopathological associations. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2011 Sep;16(6):e757–62.
22. Luna-Ortiz K, Güemes-Meza A, Villavicencio-Valencia V, Mosqueda-Taylor A. Lip cancer experience in Mexico. An 11-year retrospective study. *Oral Oncol.* 2004 Nov;40(10):992–9.
23. Pătrașcu V, Georgescu CV, Tănase L, Mogoantă L. The place of the histopathologic exam for establishing the profile of the squamous cell carcinoma of the lower lip with a high degree of malignity. *Rom J Morphol Embryol.* 2006 Jan;47(2):147–53.
24. Costa NL, Oton-Leite AF, Cheim-Júnior AP, Alencar RDCG, Bittar GOJ, Silva TA, et al. Density and migration of mast cells in lip squamous cell carcinoma and actinic cheilitis. *Histol Histopathol.* 2009 Apr;24(4):457–65.

25. Quaedvlieg PJF, Creytens DHK V, Epping GG, Peutz-Kootstra CJ, Nieman FHM, Thissen MRTM, et al. Histopathological characteristics of metastasizing squamous cell carcinoma of the skin and lips. *Histopathology*. 2006 Sep;49(3):256–64.
26. Vukadinovic M, Jezdic Z, Petrovic M, Medenica LM, Lens M. Surgical management of squamous cell carcinoma of the lip: analysis of a 10-year experience in 223 patients. *J Oral Maxillofac Surg*. 2007 Apr;65(4):675–9.
27. De Visscher JG, Botke G, Schakenraad J a, van der Waal I. A comparison of results after radiotherapy and surgery for stage I squamous cell carcinoma of the lower lip. *Head Neck*. 1999 Sep;21(6):526–30.
28. Kübler AC, de Carpentier J, Hopper C, Leonard AG, Putnam G. Treatment of squamous cell carcinoma of the lip using Foscan-mediated photodynamic therapy. *Int. J Oral Maxillofac Surg*. 2001 Dec;30(6):504-09.
29. Batista AC, Costa NL, Oton-Leite AF, Mendonça EF, Alencar RDCG, Silva TA. Distinctive clinical and microscopic features of squamous cell carcinoma of oral cavity and lip. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2010 Mar;109(3):e74–9.
30. Samarasinghe V, Madan V. Nonmelanoma skin cancer. *J Cutan Aesthet Surg*. 2012 Jan;5(1):3–10.
31. Salasche SJ. Epidemiology of actinic keratoses and squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol*. 2000 Jan;42(1 Pt 2):4–7.
32. Main JH, Pavone M. Actinic cheilitis and carcinoma of the lip. *J Can Dent Assoc*. 1994;60(2):113–6.
33. Rogers RS, Bekic M. Diseases of the lips. *Semin Cutan Med Surg*. 1997 Dec;16(4):328–36.
34. Kaugars GE, Pillion T, Svirsky JA, Page DG, Burns JC, Abbey LM. Actinic cheilitis. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol*. 1999 Feb;88(4):181–6.
35. Cavalcante ASR, Anbinder AL, Carvalho YR. Actinic cheilitis: clinical and histological features. *J Oral Maxillofac Surg*. 2008 Mar;66(3):498–503.
36. Terezhalmay GT, Naylor GD. Actinic cheilitis. *J Indiana Dent Assoc*. 1998 Apr;24(4):12–5.
37. Martins MT. Queilite actínica : avaliação das alterações teciduais e graduação histológica em 458 casos. [tese].São Paulo: Universidade de São Paulo; Faculdade de Odontologia; 2011.
38. Markopoulos A, Albanidou-Farmaki E, Kayavis I. Actinic cheilitis: clinical and pathologic characteristics in 65 cases. *Oral Dis*. 2004 Jul;10(4):212–6.

39. Cataldo E, Doku HC. Solar cheilitis. *J Dermatol Surg Oncol*. 1981 Nov;7(12):989–95.
40. Braverman IM, Fonferko E. Studies in cutaneous aging: I. The elastic fiber network. *J Invest Dermatol*. 1982 Mar;78(5):434–43.
41. Tsuji T. Scanning electron microscope studies of solar elastosis. *Br J Dermatol*. 1980 Jul;103(3):307–12.
42. Suwabe H, Serizawa a, Kajiwarra H, Ohkido M, Tsutsumi Y. Degenerative processes of elastic fibers in sun-protected and sun-exposed skin: immunoelectron microscopic observation of elastin, fibrillin-1, amyloid P component, lysozyme and alpha1-antitrypsin. *Pathol Int*. 1999 Jan;49(5):391–402.
43. Sellheyer K. Pathogenesis of solar elastosis: synthesis or degradation? *J Cutan Pathol*. 2003 Feb;30(2):123–7.
44. Rijken F, Kiekens RCM, van den Worm E, Lee PL, van Weelden H, Bruijnzeel PLB. Pathophysiology of photoaging of human skin: focus on neutrophils. *Photochem Photobiol Sci*. 2006 Jan;5(2):184–9.
45. Rijken F, Bruijnzeel PLB. The pathogenesis of photoaging: the role of neutrophils and neutrophil-derived enzymes. *J Invest Dermatol Symp Proc*; 2009 Jan;14(1):67–72.
46. Humphreys TR, Werth V, Dzubow L, Kligman a. Treatment of photodamaged skin with trichloroacetic acid and topical tretinoin. *J Am Acad Dermatol*. 1996 Apr;34(4):638–44.
47. Grossberg AL, Gaspari AA. Topical antineoplastic agents in the treatment of mucocutaneous diseases. *Curr Probl Dermatol*. 2011 Sep;40:71–82.
48. Shah AY, Doherty SD, Rosen T. Actinic cheilitis: A treatment review. *Int J Dermatol*. 2010 Dec;49(11):1225–34.
49. Dufresne RG, Cruz AP, Zeikus P, Perlis C, Jellinek NJ. Dermabrasion for actinic cheilitis. *Dermatol Surg*. 2008 Jun;34(6):848–50.
50. Castiñeiras I, Del Pozo J, Mazaira M, Rodríguez-Lojo R, Fonseca E. Actinic cheilitis: evolution to squamous cell carcinoma after carbon dioxide laser vaporization. A study of 43 cases. *J Dermatolog Treat*. 2010 Aug;21(1):49–53.
51. Lundeen RC, Langlais RP, Terezhalmay GT. Sunscreen protection for lip mucosa: a review and update. *J Am Dent Assoc*. 1985 Apr;111(4):617–21.
52. Dias RHFCP. Análise do fenômeno da imunotolerância na fotocarcinogênese em lábio. [dissertação]. São Paulo: Universidade de São Paulo; Faculdade de Odontologia;2011.

53. Hussein MR. Ultraviolet radiation and skin cancer: molecular mechanisms. *J Cutan Pathol*. 2005 Mar;32(3):191–205.
54. Besaratinia A, Yoon J-I, Schroeder C, Bradforth SE, Cockburn M, Pfeifer GP. Wavelength dependence of ultraviolet radiation-induced DNA damage as determined by laser irradiation suggests that cyclobutane pyrimidine dimers are the principal DNA lesions produced by terrestrial sunlight. *FASEB J*. 2011 Sep;25(9):3079–91.
55. Black HS, de Gruijl FR, Forbes PD, Cleaver JE, Ananthaswamy HN, deFabo EC, et al. Photocarcinogenesis: an overview. *J Photochem Photobiol B*. 1997 Aug;40(1):29–47.
56. Claerhout S, Van Laethem A, Agostinis P, Garmyn M. Pathways involved in sunburn cell formation: deregulation in skin cancer. *Photochem Photobiol Sci*. 2006 Aug;5(2):199–207.
57. Van Laethem A, Claerhout S, Garmyn M, Agostinis P. The sunburn cell: regulation of death and survival of the keratinocyte. *Int J Biochem Cell Biol*. 2005 Aug;37(8):1547–53.
58. Rastogi RP, Richa, Kumar A, Tyagi MB, Sinha RP. Molecular mechanisms of ultraviolet radiation-induced DNA damage and repair. *J Nucleic Acids*. 2010 Jan;59(2):980-85.
59. Vaisman A, Frank EG, Iwai S, Ohashi E, Ohmori H, Hanaoka F, et al. Sequence context-dependent replication of DNA templates containing UV-induced lesions by human DNA polymerase η ? *DNA Repair (Amst)*. 2003 May;2(9):991–1006.
60. Sproul CD, Mitchell DL, Rao S, Ibrahim JG. HHS Public Access. *Photochem Photobiol*. 2015 Mar;(2010):375–80.
61. McCulloch SD, Kokoska RJ, Masutani C, Iwai S, Hanaoka F, Kunkel T a. Preferential cis-syn thymine dimer bypass by DNA polymerase η occurs with biased fidelity. *Nature*. 2004 Aug;428(6978):97–100.
62. Choi J-H, Pfeifer GP. The role of DNA polymerase η in UV mutational spectra. *DNA Repair (Amst)*. 2005 Feb 3;4(2):211–20.
63. Varga A, Marcus AP, Himoto M, Iwai S, Szűts D. Analysis of CPD Ultraviolet Lesion Bypass in Chicken DT40 Cells: Polymerase η and PCNA Ubiquitylation Play Identical Roles. *PLoS One*. 2012 Dec;7(12):e52472.
64. Benjamin CL, Ananthaswamy HN. P53 and the Pathogenesis of Skin Cancer. *Toxicol Appl Pharmacol*. 2007 Nov;224(3):241–8.

65. Hildesheim J, Bulavin D V, Anver MR, Alvord WG, Hollander MC, Vardanian L, et al. Gadd45a protects against UV irradiation-induced skin tumors, and promotes apoptosis and stress signaling via MAPK and p53. *Cancer Res.* 2002 Dec 15;62(24):7305–15.
66. Kanjilal S, Strom SS, Clayman GL, Gary L, Weber RS, El-naggar AK, et al. p53 Mutations in Nonmelanoma Skin Cancer of the Head and Neck : Molecular Evidence for Field Cancerization p53 Mutations in Nonmelanoma Skin Cancer of the Head and Neck : Molecular Evidence for Field Cancerization1. 1995 Aug;3604–9.
67. Almquist LM, Karagas MR, Christensen BC, Welsh MM, Perry AE, Storm CA., et al. The role of TP53 and MDM2 polymorphisms in TP53 mutagenesis and risk of non-melanoma skin cancer. *Carcinogenesis.* 2011 Jan;32(3):327–30.
68. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene : Clues to Cancer Etiology and Molecular Pathogenesis Mutations in the p53 Tumor Suppressor Gene : Clues to Cancer Etiology and Molecular Pathogenesis1. *Cancer Res.* 1994 Sep;54(15):4855–78.
69. Smith ML, Chen IT, Zhan Q, Bae I, Chen CY, Gilmer TM, et al. Interaction of the p53-regulated protein Gadd45 with proliferating cell nuclear antigen. *Science.* 1994 Apr;266(5189):1376–80.
70. Brash DE, Rudolph JA, Simon JA, Lin A, McKenna GJ, Baden HP, et al. A role for sunlight in skin cancer: UV-induced p53 mutations in squamous cell carcinoma. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1991 May;88(22):10124–8.
71. Gannon J V, Greavesl R, Lane DP. Activating conformational monoclonal. 1990 Aug;9(5):1595–602.
72. Nevins JR. The Rb/E2F pathway and cancer. *Hum Mol Genet.* 2001 Apr 1;10(7):699–703.
73. Manning AL, Longworth MS, Dyson NJ. Loss of pRB causes centromere dysfunction and chromosomal instability. *Genes Dev.* 2010 Sep;24(13):1364–76.
74. Soni S, Kaur J, Kumar A, Chakravarti N, Mathur M, Bahadur S, et al. Alterations of rb pathway components are frequent events in patients with oral epithelial dysplasia and predict clinical outcome in patients with squamous cell carcinoma. *Oncology.* 2005 Jan;68(4-6):314–25.
75. Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: From the known and the unknown. *J Cel Physiol.* 2000 Jun;182(3):311–22.
76. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization Classification of Tumours Pathology & Genetics Head and Neck Tumours IARC WHO Classification Head and Neck Tumours. Leon Barnes MD, John W.

- Eveson MD, Peter Reichart MD, David Sidransky MD, editors. Lyon: IARC Press; 2005. 435 p.
77. Reibel J. Prognosis of Oral Pre-Malignant Lesions: Significance of Clinical, Histopathological, and Molecular Biological Characteristics. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003 Jan 1;14(1):47–62.
 78. Kujan O, Khattab A, Oliver RJ, Roberts SA, Thakker N, Sloan P. Why oral histopathology suffers inter-observer variability on grading oral epithelial dysplasia: an attempt to understand the sources of variation. *Oral Oncol*. 2007 Mar;43(3):224–31.
 79. Karabulut A, Reibel J, Therkildsen MH, Praetorius F, Nielsen HW, Dabelsteen E. Observer variability in the histologic assessment of oral premalignant lesions. *J Oral Pathol Med*. 1995 May;24(5):198–200.
 80. Neto Pimentel DR, Michalany N, Alchorne M, Abreu M, Borra RC, Weckx L. Actinic cheilitis: histopathology and p53. *J Cutan Pathol*. 2006 Aug;33(8):539–44.
 81. Brooks YS, Ostano P, Jo SH, Dai J, Getsios S, Dziunycz P, et al. Multifactorial ER β and NOTCH1 control of squamous differentiation and cancer. *J Clin Invest*. 2014 Dec;124(5):2260–76.
 82. Bastiaens MT, ter Huurne JA, Kielich C, Gruis NA, Westendorp RG, Vermeer BJ, et al. Melanocortin-1 receptor gene variants determine the risk of nonmelanoma skin cancer independently of fair skin and red hair. *Am J Hum Genet*. 2001 Mar;68(4):884–94.
 83. Onofre MA, Sposto MR, Navarro CM, Motta ME, Turatti E, Almeida RT. Potentially malignant epithelial oral lesions: discrepancies between clinical and histological diagnosis. *Oral Dis*. 1997 Oct;3(3):148–52.
 84. Patel SG, Shah JP. TNM staging of cancers of the head and neck: striving for uniformity among diversity. *CA Cancer J Clin*. 2005 Apr;55(4):242–58; quiz 261–2, 264.
 85. Van Diest PJ, Baak JP, Matze-Cok P, Wisse-Brekelmans EC, van Galen CM, Kurver PH, et al. Reproducibility of mitosis counting in 2,469 breast cancer specimens: results from the Multicenter Morphometric Mammary Carcinoma Project. *Human pathology*. 1992 Jul;23(6):603–7
 86. Alberts B, Johnson A, Lewis J, Raff M, Roberts K, Walter P. *Molecular Biology of the Cell* [Internet]. 4th Edition, New York. 2002. 1616 pages p. Available from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/books/NBK21054/>
 87. Montebugnoli L, Felicetti L, Gissi DB, Cervellati F, Servidio D, Marchetti C, et al. Predictive Role of p53 Protein as a Single Marker or Associated to Ki67 Antigen in Oral Carcinogenesis. *Open Dent J*. 2008 Jan;2:24–9.

88. Gerhardt M, Doutora DO, Universidade P. Expressão da p53 e da Rb em Leucoplasias e Carcinomas Espinocelulares P53 e Rb expression in leukoplakias and oral squamous cell carcinomas. Rev Bras Cir buco-maxilo-facial. 2011 Aug;1(1):7–14.
89. Krecicki T, Smigiel R, Fraczek M, Kowalczyk M, Sasiadek MM. Studies of the cell cycle regulatory proteins P16, cyclin D1 and retinoblastoma protein in laryngeal carcinoma tissue. J Laryngol Otol. 2004 Sep;118(9):676–80.
90. Holzinger D, Flechtenmacher C, Henfling N, Kaden I, Grabe N, Lahrmann B, et al. Identification of oropharyngeal squamous cell carcinomas with active HPV16 involvement by immunohistochemical analysis of the retinoblastoma protein pathway. Int J Cancer. 2013 May;133(6):1389–99.

Anexo A

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER DE APROVAÇÃO FR – 3311012 Protocolo 42/2010

O grupo de trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa **APROVOU** o protocolo de pesquisa "**Queilite actínica: relação entre alterações teciduais, gradação histológica e marcadores prognósticos estabelecidos**", de responsabilidade da Pesquisadora Profa. Dra. Marília Trierveiler Martins.

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

São Paulo, 16 de abril de 2010.

Prof. Dra. Marcia Turolia Wanderley
Coordenadora do CEP-FOUSP

Anexo B

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

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

Título da Pesquisa: Correlação entre aspectos clínicos e marcadores biológicos no processo de fotocarcinogênese de lábio

Pesquisador: Marília Trierveiler Martins

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 43203315.2.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Universidade de São Paulo

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 1.014.995

Data da Relatoria: 08/04/2015

Apresentação do Projeto:

Este é um estudo observacional, em que será feita uma análise individual transversal de dados clínicos como sexo, idade, cor da pele, além de aspecto clínico, tamanho, coloração e tempo de evolução da lesão de pacientes com diagnóstico de QA e CEL. Tais dados serão obtidos a partir de fichas de requisição de exame anátomo-patológico, pertencentes aos arquivos de Serviço de Patologia Cirúrgica da Faculdade de Odontologia da USP. De acordo com o histórico de diagnósticos do Serviço, os pacientes serão distribuídos em 3 grupos: 1) pacientes apenas com diagnóstico de CEL; 2) pacientes apenas com diagnóstico de QA; 3) pacientes com diagnóstico de QA e posterior diagnóstico de CEL. Os dados clínicos serão comparados entre os grupos. Em um segundo momento, serão selecionados 30 casos de cada um dos três grupos, e os dados clínicos obtidos serão relacionados com a expressão imuno-histoquímica de três marcadores moleculares indicativos de malignização: o Ki 67, a E-caderina e pRb, constituindo assim uma parte de estudo experimental individual longitudinal. Nos casos de QA, as alterações morfológicas do epitélio, caracterizadas pelo grau de displasia epitelial, também será um elemento associado à expressão imuno-histoquímica dos marcadores moleculares.

Objetivo da Pesquisa:

O presente estudo visa caracterizar a partir dos casos atendidos no Serviço de Patologia Cirúrgica

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: 1.014.995

da FOUUSP, qual a diferença de perfil clinicopatológico de pacientes com: CEL, QA que não apresentou evolução para CEL e QA que sofreu transformação maligna para CEL. Além disso, o estudo visa estabelecer uma relação entre o comportamento biológico das lesões nessas três fases da fotocarcinogênese, e a expressão dos marcadores moleculares indicativos de alterações malignas: Ki67, E-caderina e pRb.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Este estudo não oferece nenhum tipo de risco nem dano aos sujeitos de pesquisa, pois o material utilizado para a obtenção e análise dos resultados consta de fichas de requisição de exame, tecido oriundo de fragmentos de biópsia fixados em formol e emblocados em parafina e lâminas histológicas pertencentes aos Arquivos do Serviço de Patologia Cirúrgica da Faculdade de Odontologia da USP. Não há benefícios diretos pelo mesmo motivo.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

A pesquisa envolve coleta de dados de fichas de requisição de exame anátomo-patológico, pertencentes aos arquivos de Serviço de Patologia Cirúrgica da Faculdade de Odontologia da USP. Esses dados representam dados secundários a serem coletados. Por isso, essa informação deve ser ajustada no preenchimento da Plataforma Brasil.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Foi apresentado termo de anuência para utilização do acervo do Serviço de Patologia Cirúrgica da Faculdade de Odontologia da USP, assinado pelo seu responsável e garantindo o sigilo dos dados coletados e identificação dos pacientes.

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:

Protocolo delineado dentro dos preceitos éticos e passível de ser aprovado pelo CEP.

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

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: 1.014.995

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO PAULO, 08 de Abril de 2015

Assinado 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