GABRIELA SANCHEZ NAGATA

**Avaliação das atipias epiteliais, graduação das displasias e
presença de proteína p53 mutada no epitélio adjacente a
carcinomas epidermóides de lábio**

São Paulo

2011

GABRIELA SANCHEZ NAGATA

Avaliação das atipias epiteliais, graduação das displasias e presença de proteína p53 mutada no epitélio adjacente a carcinomas epidermóides de lábio

Versão Corrigida

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

Área de Concentração: Patologia Bucal

Orientador: Profa. Dra. Marília Trierweiler Martins

São Paulo
2011

Nagata G. Avaliação das atipias epiteliais, graduação das displasias e presença de proteína p53 mutada no epitélio adjacente a carcinomas epidermóides de lábio. Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Odontologia.

Aprovado em: / /2011

Banca Examinadora

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

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Julgamento: _____ Assinatura: _____

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

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Dedico esta Dissertação a meus pais, Hideshi Nagata e Mercedes Sanchez Nagata, pelo amor incondicional e dedicação em fazer de todos os meus sonhos um objetivo realizado. Amo muito vocês!

AGRADECIMENTOS

À minha orientadora, Profa. Dra. Marília Trierveiler Martins, por me apresentar à Patologia de forma tão especial e por me apoiar na escolha da carreira acadêmica desde a época da graduação, mostrando que vivenciar o significado das palavras “ensinar” e “aprender” é o resultado da superação de desafios constantes, mas com momentos bastante gratificantes. Acho que por isso sou tão encantada pelo que faço! Obrigada por construirmos uma relação orientadora – orientanda baseada no respeito, confiança, companheirismo e, principalmente, por todos os dias, me fazer sentir capaz de superar todos os desafios para conquistar uma carreira bem sucedida. Eu me sinto muito honrada em trabalhar com você!

Ao Programa de Pós-Graduação, que possibilitou meu desenvolvimento profissional, não só na área do ensino, mas também pela oportunidade de participar de projetos de pesquisa e atividades como a atuação no Serviço de Patologia Cirúrgica, ainda no mestrado.

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 e Profa Karen Lopez Ortega por me transmitirem uma formação de excelência.

Agradeço a todos os amigos da Pós-Graduação do Departamento de Diagnóstico Bucal pela amizade e companheirismo. Agradeço especialmente a Renata Caraméz e Bruno Matuck, que me acompanharam e ajudaram em todos os momentos da elaboração desta pesquisa. Acho que formamos um trio determinado e competente e espero realizarmos vários outros trabalhos com esse mesmo espírito de equipe. Rê, todos os momentos que dividimos desde a graduação foram muito importantes para o meu “crescimento” pessoal e profissional. Desejo que você seja muito feliz e continue contando com minha amizade e carinho sempre. Bruno, obrigada por “alinhar os meus chakras” e por poder contar com a sua ajuda e amizade a qualquer hora.

Obrigada aos funcionários do Departamento de Patologia Bucal: Zilda, Néia, Nair, Elisa, Adriana, Juvani e Bia pela atenção, dedicação e amizade desde os tempos de Iniciação Científica.

Obrigada à CAPES pelo apoio financeiro concedido para a realização dessa pesquisa, através da bolsa de estudos a mim concedida.

Obrigada à Faculdade de Odontologia da USP, responsável pela minha formação desde a Graduação, pela oportunidade de continuar pertencendo a essa casa. Ser formada por essa instituição representa a realização de um dos maiores sonhos da minha vida e espero ter a oportunidade de completar minha formação com aqueles que me transformaram em uma profissional.

Ó mar salgado, quanto do teu sal

São lágrimas de Portugal!

Por te cruzarmos, quantas mães choraram,

Quantos filhos em vão rezaram!

Quantas noivas ficaram por casar

Para que fosses nosso, ó mar!

Valeu a pena? Tudo vale a pena

Se a alma não é pequena.

Quem quer passar além do Bojador

Tem que passar além da dor.

Deus ao mar o perigo e o abismo deu,

Mas nele é que espelhou o céu.

(Fernando Pessoa, *Mar Português*, Mensagem 1934)

RESUMO

Nagata G. Avaliação das atipias epiteliais, graduação das displasias e presença de proteína p53 mutada no epitélio adjacente a carcinomas epidermóides de lábio. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2011. Versão Corrigida.

O carcinoma epidermoide de lábio (CEL), que é causado pela exposição crônica e excessiva à radiação ultravioleta do sol, é precedido por uma desordem potencialmente maligna, a queilite actínica (QA). No entanto, ainda não é possível determinar quais casos de QA evoluirão para CEL. O método mais utilizado por patologistas para prever o prognóstico de desordens potencialmente malignas é a graduação histológica das displasias epiteliais. Entretanto, o sistema é subjetivo e ineficiente quanto ao seu valor preditivo. Acredita-se que o epitélio adjacente ao CEL tenha alterações genéticas semelhantes ao corpo da neoplasia. O objetivo deste estudo foi graduar as displasias epiteliais na margem do CEL e verificar a presença de proteína p53 mutada nessas áreas. Foram utilizados 40 casos de CEL com epitélio adjacente, no qual a displasia epitelial foi classificada pelo sistema proposto pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e pelo sistema binário. Os casos foram, ainda, submetidos a reações de imuno-histoquímica com anticorpo anti-proteína p53 mutada. Entre os 40 casos estudados, 15 apresentaram displasia epitelial discreta, 18 moderada e 7 intensa. Pelo sistema binário, 36 casos foram classificados como de baixo risco e 4 como de alto risco. A marcação imuno-histoquímica para a proteína p53 mutada foi encontrada no epitélio adjacente de 32 casos (80%) dessa amostra. Considerando-se as duas graduações estudadas, a marcação foi detectada em 11/15 casos de displasia discreta, 16/18 de moderada e 5/7 de intensa pelo sistema da OMS e em 29/36 casos de baixo risco e 3/4 casos de alto risco. Concluiu-se, assim, que o epitélio adjacente ao CEL, mesmo exibindo poucas alterações morfológicas pode ter um comprometimento genético importante em genes que comandam a estabilidade genômica.

Palavras-chave: Carcinoma epidermoide de lábio. Displasia epitelial. Sistemas de graduação de displasias. Proteína p53.

ABSTRACT

Nagata G. Evaluation of epithelial atypia, degree of dysplasia and presence of mutated p53 protein in the epithelium adjacent to lip squamous cell carcinomas. Dissertation. São Paulo, Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2011. Versão Corrigida.

The lip squamous cell carcinoma (LSCC), which is caused by chronic and excessive exposure to solar ultraviolet radiation, is preceded by a potentially malignant disorder, the actinic cheilitis (AC). However, it is not possible to determine which AC cases will progress to LSCC. The method used by pathologists to predict the prognosis of potentially malignant disorders is the histologic grading of epithelial dysplasia. Nevertheless, this system is subjective and inefficient as to its predictive value. It is considered that the epithelium adjacent to LSCC has genetic alterations similar to the main tumor. The aim of this study was to grade the epithelial dysplasia on the LSCC border and also to verify the presence of mutated p53 protein in these areas. Forty LSCC cases with adjacent epithelium were retrieved from our files. The epithelial dysplasia was classified by the system proposed by the World Health Organization (WHO) as well as the binary system. Three μ m sections were submitted to the antibody against mutated p53 protein by means of immunohistochemistry. Among the 40 cases studied, 15 were classified as mild dysplasia, 18 moderate and 7 severe. When the binary system was considered, 36 cases were classified as low risk and four as high risk. Immunostaining revealed the presence of mutated p53 protein in the adjacent epithelium of 32 cases (80%). Analyzing the two grading systems separately, the staining was detected in 11/15 cases of mild dysplasia, 16/18 of moderate and 5/7 of intense; 29/36 of low-risk cases and 3/4 cases high-risk. In conclusion, even if it shows few morphological changes, the epithelium adjacent to LSCC may have a genetic involvement in important genes that control genomic stability.

Keywords: Lip squamous cell carcinoma. Epithelial dysplasia. Dysplasia grading systems. p53 protein.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 5.1 – Casos de CEL corados em HE. A: QA presente no epitélio de superfície, adjacente ao CEL, região onde foram feitas as análises desse trabalho. Observaram-se presença de elastose solar e displasia epitelial, critérios de inclusão para essa pesquisa. B: Displasia epitelial discreta, caracterizada pela presença, principalmente, de inversão de polaridade das células da camada basal e estratificação irregular. C: Displasia epitelial moderada, na qual se notam inversão de polaridade das células da camada basal em algumas áreas, e pleomorfismo celular. D: Displasia epitelial intensa. Observam-se estratificação irregular e presença de projeções epiteliais afiladas54
- Figura 5.2 – Expressão imuno-histoquímica da proteína p53 mutada no epitélio adjacente a CEL. A p53 mutada em um caso de displasia epitelial discreta. A: expressão da proteína é observada principalmente nas células da camada basal. B: Expressão imuno-histoquímica de p53 mutada em poucas células, mas dispostas em todos os estratos do epitélio. C: Positividade de p53 mutada em displasia epitelial intensa. Observa-se a presença da proteína na maioria das células epiteliais de todos os estratos do epitélio55

LISTA DE QUADROS

Quadro 5.1 – Alterações epiteliais presentes nos epitélio adjacente aos 40 casos de CEL, classificação das displasias epiteliais pelo sistema binário, positividade para proteína p53 mutada e dados clínicos dos pacientes.....	48
--	----

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 – Número e porcentagem de aparecimento de cada uma das alterações epiteliais nos 40 casos examinados.....	50
--	----

LISTA DE GRÁFICOS

- Gráfico 5.1 – Positividade para proteína p53 mutada no epitélio adjacente ao CEL e no corpo da neoplasia.....51
- Gráfico 5.2 – Porcentagem de casos positivos e negativos para a proteína p53 mutada entre os três graus de displasia epitelial no sistema de graduação da OMS.....52
- Gráfico 5.3 – Porcentagem de casos positivos para a proteína p53 mutada entre os graus de displasia epitelial do sistema binário de graduação.....53

LISTA DE ABREVIATURAS

BSA	albumina bovina e azida sódica
CFC	clorofluorcarbono
CEL	carcinoma epidermoide de lábio
C-C	ligação covalente citosina-citosina ou dímeros de pirimidina ciclobutano
C-T	ligação covalente citosina-timina ou fotoproduto 6-4 pirimidina pirimidona
CC-TT	ligação covalente citosina citosina-timina timina
DAB	diaminobenzidina
DNA	ácido desoxirribonucléico
GADD45	gene de aprisionamento do crescimento e dano celular (Growth Arrest and DNA Damage gene)
INCA	Instituto Nacional do Câncer
IAOP	Associação Internacional de Patologistas Orais
LSAB	Complexo estreptavidina –biotina-peroxidase
NaCl	cloreto de sódio
OMS	Organização Mundial da Saúde
QA	queilite actínica
TMN	estadiamento tumor-linfonodo –metástase
TP53	gene produtor da proteína tumoral 53
UV	radiação ultravioleta

UVA	espectro A da radiação ultravioleta
UVB	espectro B da radiação ultravioleta
UVC	espectro C da radiação ultravioleta
WAF 1	gene ativador de p53 fragmento 1 tipo nativo

LISTA DE SIGLAS

μl	microlitros por litro
μM	micrômetros
cm	centímetro
kD	kiloDaltons
mm	milímetros
mM	milimolar
Nm	nanômetros
°C	graus Celsius
pH	potencial hidrogeniônico da água
κ	kappa

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	16
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	18
2.1	Carcinoma epidermoide de lábio	18
2.2	Queilite actínica	22
2.3	Fotocarcinogênese.....	25
2.4	Gene <i>TP53</i>	28
2.5	Sistemas de graduação de displasias epiteliais orais	31
3	PROPOSIÇÃO.....	38
4	MATERIAL E MÉTODOS	39
4.1	Seleção de casos	39
4.2	Análise morfológica	40
4.3	Estudo imuno-histoquímico	42
4.4	Forma de análise dos resultados	44
5	RESULTADOS.....	45
5.1	Dados clínicos	45
5.2	Análise morfológica	46
5.3	Classificação dos graus de displasia	50
5.4	Imuno-histoquímica	51
6	DISCUSSÃO.....	56
7	CONCLUSÃO	65
	REFERÊNCIAS.....	66

1 INTRODUÇÃO

Os lábios constituem estruturas anatômicas importantes, pois além de protegerem os dentes anteriores contra traumatismos e auxiliarem na fonação, eles atuam na expressão de várias de nossas emoções, como um sorriso de alegria, um beijo de amor ou uma feição contraída de tristeza, de raiva. No entanto, várias lesões que acometem os lábios exigem tratamento bastante mutilante, fato que causa um prejuízo não só estético e funcional para o paciente, como também promove danos psicológicos e sociais, pois muitas vezes tais marcas são o motivo que leva os pacientes a parar de trabalhar, estudar e até mesmo de conviver com outras pessoas.

Os lábios são formados durante o período embrionário, em torno do 38º dia de gestação, quando se completa a fusão de todos os processos da face do embrião, que também origina a formação de várias outras estruturas, como a porção medial do nariz, a porção anterior da maxila e do palato, e a mandíbula. Entretanto, a formação do lábio superior é mais complexa, pois resulta da fusão dos processos maxilares e nasais mediais, cujo crescimento em direção à linha mediana desloca o processo frontonasal, ao passo que o lábio inferior é formado pela fusão dos dois processos mandibulares na linha mediana¹.

A zona de vermelhão de lábio é a transição gradual entre a pele e a mucosa oral. Nessa região, o epitélio é estratificado, de poucas camadas, fino, o estrato córneo diminui desde a borda da pele até a mucosa, o estrato granuloso está ausente e as papilas conjuntivas são bastante altas¹. O epitélio fino associado a um tecido conjuntivo adjacente bem vascularizado é responsável pela cor vermelha e brilhante dos lábios². Esse epitélio de transição é acometido por lesões de diversas etiologias, dentre elas distúrbios de desenvolvimento como a fenda labial, lesões infecciosas, como as provocadas pelo vírus do herpes simples, e neoplasias.

A neoplasia mais comum em zona de vermelhão de lábio é o carcinoma epidermoide. Sabe-se que o carcinoma epidermoide de lábio (CEL), assim como o carcinoma basocelular e o melanoma de pele, são causados por alterações provocadas pela radiação ultravioleta (UV) do sol.

A camada de ozônio barra a maior parte dos raios UV emitidos pelo sol, possibilitando assim a manutenção do fitoplâncton e de toda a cadeia alimentar aquática, além de evitar a propagação de danos em moléculas orgânicas importantes para os seres vivos. Atualmente, vive-se um grave problema ambiental, o aumento do buraco da camada de ozônio, devido à grande quantidade de emissão de gases clorofluorcarbono – o CFC – que nas altas camadas da estratosfera recebem energia dos raios UV e degradam-se, liberando radicais livres, no caso o cloro, que é capaz de destruir cerca de 100 mil moléculas de ozônio. Com o aumento do buraco na camada de ozônio, estima-se um aumento nas taxas de neoplasia relacionadas com danos pela radiação UV, além de problemas nos olhos, como a catarata e diminuição de defesas imunológicas, favorecendo o aparecimento de doenças infecciosas^{3,4,5}.

Atualmente, a palavra de ordem na área de saúde é “prevenção”, e principalmente com relação às neoplasias, com o diagnóstico precoce tenta-se evitar tratamentos mais radicais para os pacientes, e até mesmo a impossibilidade de tratamento. Além disso, a prevenção também propicia um menor custo para o governo, diminuindo gastos com leitos de hospital e medicações, como a quimioterapia, por exemplo, e a radioterapia. Seria importante encontrar um método mais eficiente de detecção precoce de pacientes em risco de desenvolver CEL.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Carcinoma epidermoide de lábio

O carcinoma epidermoide de lábio (CEL) é uma neoplasia maligna comum, que corresponde a uma porcentagem de 25% a 30% entre todos os cânceres orais. Ocorre mais frequentemente em pacientes homens, de pele clara, com idade superior a 50 anos e que tenham sido expostos de forma crônica à radiação ultravioleta (UV) do sol. É muito raro em jovens, embora seja relatado em pacientes que passaram por terapia imunossupressora após transplante renal^{4,6,7}.

O câncer de lábio possui incidência variável pelo mundo, mas os países com os maiores índices dessa doença encontram-se principalmente na zona equatorial e intertropical do globo, onde a incidência dos raios solares é mais intensa. Os maiores números de casos de CEL foram reportados no sul da Austrália, Zimbábue e Israel^{8,9,10}, além de algumas regiões do Canadá e Espanha. Nos Estados Unidos, a incidência de homens com essa neoplasia é considerável, porém menor que a dos países anteriormente citados¹¹.

No Brasil, os dados epidemiológicos relacionados ao CEL são bastante imprecisos, pois os dados publicados pelo Instituto Nacional do Câncer (INCA) agrupam em uma mesma categoria – câncer oral – os casos de carcinoma intraoral e carcinoma epidermoide de lábio, apesar de a etiologia e comportamento clínico dessas duas lesões serem completamente distintos. Baseando-se nas estimativas do INCA de que até o final do ano de 2010 seriam notificados 14.120 novos casos de carcinoma intraoral no Brasil, conclui-se então que entre esses casos estejam incluídos 3.580 novos casos de CEL. Esse número de pacientes acometidos por CEL é significativo e pode ser um reflexo da economia do país, no qual a agricultura e o extrativismo

vegetal ainda são atividades importantes que concentram um grande número de trabalhadores constantemente expostos ao sol, como agricultores, pescadores, pedreiros, entre outros. Além disso, esses pacientes geralmente possuem uma condição social desfavorecida, em que o acesso à educação e atendimento de saúde é escasso e precário. Um fator agravante é que a maioria desses pacientes não têm informação sobre a etiologia do câncer de lábio e os riscos provocados pela exposição solar^{12,13}.

Clinicamente, o CEL caracteriza-se mais frequentemente por uma úlcera de fundo necrótico com margens elevadas, mas lesões exofíticas com margens aparentemente nítidas e placas brancas entremeadas por zonas eritematosas também são vistas⁶. O lábio inferior é a localização mais frequente dessa lesão, pois a própria posição anatômica dessa estrutura favorece uma maior exposição dessa área à radiação solar. Entretanto, o lábio superior também é acometido por neoplasia maligna de origem epitelial, sendo que 50% desses casos são reportados em mulheres¹¹.

Histologicamente, o CEL caracteriza-se pela invasão epitelial do tecido conjuntivo em forma de ilhas ou cordões e, na grande maioria dos casos, contém pérolas de queratina em seu interior. Os queratinócitos neoplásicos exibem formato poligonal, geralmente o citoplasma é amplo com limites bem definidos, o núcleo apresenta-se arredondado com cromatina frouxa. Individualmente, pode-se observar pleomorfismo celular e nuclear, células com inversão de polaridade e aumento no número de mitoses, entre outras atipias. É comum a observação de infiltrado inflamatório mononuclear difuso no estroma da lesão. Além disso, observa-se a elastose solar, ou degeneração basofílica do colágeno, uma alteração típica dos tecidos conjuntivos que sofreram ação da radiação UV¹⁴.

O sítio de ocorrência do CEL é de fácil visualização, tanto para os pacientes como para profissionais da saúde, o que facilita um diagnóstico precoce e tratamento da lesão em fases iniciais, melhorando o prognóstico e a qualidade de vida do paciente. Por outro lado, o diagnóstico dessa lesão, em algumas situações, ainda é feito tardiamente, pois além de o acompanhamento periódico da lesão cancerizável ser negligenciado, a sintomatologia dolorosa raramente é relatada, fato que propicia um crescimento da neoplasia e aumenta a possibilidade de invasão regional^{12,15}.

O tratamento de eleição para os casos de CEL é a ressecção cirúrgica completa da lesão com margem de segurança de 8 mm a 10 mm. Muitas vezes a remoção da neoplasia é imediatamente seguida da cirurgia de reconstrução labial – queiloplastia –, para que os danos estéticos e funcionais sejam minimizados. Recentemente, a radioterapia também tem sido considerada uma modalidade de tratamento efetiva para pacientes com CEL, devido à facilidade com a qual toda a extensão da lesão pode ser englobada pela radiação, ao mesmo tempo em que há uma menor destruição tecidual, garantindo assim melhores resultados estéticos e funcionais. O tipo de radiação utilizado depende de fatores como tamanho e localização da lesão. Pacientes em estágios avançados dessa neoplasia necessitam de tratamento cirúrgico em combinação com radioterapia adjuvante, a fim de reduzir o risco de recidivas¹⁵.

Para um correto planejamento terapêutico, devem ser considerados fatores relacionados ao tumor (localização topográfica, extensão do tumor primário, aspecto macro e microscópico da lesão, comprometimento de linfonodos cervicais e presença ou ausência de metástase à distância) e ao paciente (estado clínico geral, hábitos pessoais, fatores socioeconômicos, condição da dentição, idade e tratamento prévio do tumor). O tratamento em estágios avançados diminui significativamente a qualidade de vida devido a resultados funcionais e cosméticos insatisfatórios¹⁶.

Os pacientes com CEL apresentam um prognóstico mais favorável que os pacientes com carcinoma epidermoide intraoral, com taxa de sobrevivência maior que 90% em um período de acompanhamento de cinco anos. Várias pesquisas têm demonstrado uma predominância de casos de CEL nos estágios T1 e T2, e uma predominância de casos de carcinoma epidermoide intraoral nos estágios T3 e T4^{15,17}. No entanto, metástases linfonodais são vistas em 5% a 20% dos casos e tais pacientes apresentam um pior prognóstico, com taxa de sobrevivência de 30% a 70% em um período de cinco anos⁶. Embora essas taxas de sobrevida sejam consideradas boas, os estudos não apontam os danos funcionais apresentados pelos pacientes, os quais geralmente são muito deficientes, tanto em termos de nutrição e fonação como nos aspectos estéticos, principalmente quando o tumor é extenso e grande quantidade de tecido é perdida, o que dificulta uma adequada vedação labial¹¹.

Existem vários métodos para tentar prever o prognóstico dos pacientes acometidos por CEL. O sistema de estadiamento tumor-linfonodo-metástase (TMN) é um parâmetro clínico bastante utilizado em vários tipos de cânceres humanos e baseia-se na análise conjunta de três características fundamentais que irão determinar um estágio para a neoplasia em questão: o tamanho do tumor primário em centímetros; o envolvimento de linfonodos locais e a presença de metástases a distância. Quanto maior o estágio estabelecido, pior o prognóstico do paciente¹⁸.

Resultados de estudos que buscam características histológicas para detectar o perfil de carcinomas epidermóides de alto grau de malignidade revelam que o CEL é uma neoplasia essencialmente de baixo grau de malignidade, pois a maioria dos casos analisados possui características histológicas que revelam um alto grau de diferenciação, ou seja, a maioria das células neoplásicas exibindo formato típico, citoplasma amplo e bem delimitado, núcleo arredondado e pérolas de queratina. Apenas em uma pequena parte dos casos nota-se a presença de células anaplásicas e fusiformes, semelhantes a sarcomas, o que indica uma neoplasia bastante indiferenciada. Esses estudos também demonstraram que a diferenciação do CEL foi relacionada com as baixas taxas de metástase, pois essas estão presentes com uma frequência muito maior em casos indiferenciados¹⁹.

Os primeiros passos para o desenvolvimento do CEL podem ocorrer muitos anos antes do desenvolvimento da neoplasia em si, quando danos irreversíveis, tanto no epitélio quanto no tecido conjuntivo da zona de vermelhão de lábio, causados pela ação cumulativa da radiação solar, levam ao surgimento da lesão cancerizável queilite actínica (QA)²⁰.

2.2 Queilite actínica

Uma confusão com o uso dos termos QA, queratose actínica e queratose solar é bastante comum. A palavra “actínica” indica uma propriedade da energia radiante, especialmente no intervalo entre a luz visível e os raios UV para produzir transformações químicas. Já a palavra “queilite” se refere à inflamação dos lábios, que tem muitas causas potenciais, mas a inflamação nem sempre está presente nos fragmentos de biópsia das lesões actínicas. “Queratose” é o espessamento da camada de queratina do epitélio, que também nem sempre está presente. Embora imperfeito, o termo recomendado para designar as lesões em lábio com um conjunto de aspectos clínicos e um espectro de alterações histológicas no epitélio causada pela radiação UV que podem levar à transformação maligna é queilite actínica (QA). Tal termo possibilita uma melhor comunicação entre o clínico e o patologista, pois na literatura é o único que se associa com os termos doenças nos lábios e neoplasias de lábio²¹.

A QA é uma condição degenerativa do lábio inferior que por ser bastante lenta, geralmente é aceita pela maioria dos pacientes como condição normal do processo de envelhecimento, fato preocupante que demonstra a negligência e a falta de informação da população frente à possibilidade de uma transformação maligna. Ocorre mais frequentemente, e de maneira mais severa, em pacientes do sexo masculino, leucodermas, maiores de quarenta anos, que tiveram exposição intensa e prolongada ao sol em algum período da vida. O número de mulheres com QA vem aumentando nos últimos anos devido à maior participação das mulheres em atividades econômicas que exigem exposição solar e ao apelo estético imposto pela sociedade a favor da pele bronzeada²².

Quando um paciente sofre exposição solar intensa e contínua por um curto período de tempo, desencadeia-se uma inflamação aguda superficial, caracterizada pela presença de bolhas, ressecamento e inchaço do lábio inferior, mas sem a presença de alterações displásicas no epitélio. Tais episódios, na maioria dos casos, são

resolvidos espontaneamente em poucos dias ou semanas e constituem a QA aguda, que não será abordada nesse estudo por não ter seu aparecimento comprovadamente associado ao desenvolvimento do carcinoma nesta localização²².

Clinicamente, os lábios dos pacientes acometidos por QA mostram-se ressecados, opalescentes, com placas brancas ou cinzas levemente elevadas e que não são removidas com raspagem. Áreas isoladas de hiperqueratose podem ser evidentes, assim como perda de elasticidade e edema, com inversão do lábio inferior em muitos casos. Rachaduras paralelas entre si, regiões ulceradas e zonas hemorrágicas ou eritematosas são outros aspectos clínicos comuns. A zona de transição entre a pele e a região do vermelhão de lábio é pouco evidente e essa característica se relaciona com um pior prognóstico para o paciente. Outras lesões podem fazer diagnóstico diferencial com QA, como o líquen plano do lábio e o lúpus eritematoso. No entanto, o líquen plano, além de apresentar hiperqueratose reticular é, na maioria das vezes, concomitante com lesões intraorais, e o lúpus eritematoso deve apresentar outras lesões na região da face²².

Histologicamente a QA é caracterizada pelo espessamento da camada de queratina do epitélio, variando bastante a espessura e o tipo, que pode ser orto ou paraqueratina. O estrato granuloso também está, geralmente, aumentado e bem evidente. O número de camadas do epitélio também varia desde a atrofia até áreas focais de acantose e até mesmo a hiperplasia epitelial como um todo. No entanto, a característica mais importante da QA é a presença de displasia epitelial em seus vários graus. Além disso, a elastose solar ou degeneração basofílica do colágeno, deve estar sempre presente e representa a formação de um material granular resultante da destruição das fibras colágenas e elásticas do tecido conjuntivo devido à ação dos raios UV²³. Infiltrado inflamatório crônico e vasos sanguíneos dilatados são outras alterações bastante frequentes no tecido conjuntivo dessa lesão²⁴.

Atualmente, a graduação da displasia epitelial pelo profissional patologista é a principal característica utilizada para o cálculo do prognóstico do paciente com QA. Esse é o parâmetro utilizado para se determinar a conduta terapêutica a ser adotada. Na maior parte dos centros, casos de displasia discreta e alguns casos de displasia epitelial

moderada são apenas acompanhados periodicamente e recebem como recomendação o uso de protetor labial; já os casos de displasia epitelial moderada com atipias arquiteturais importantes, como aumento do número de mitoses e projeções em gota, assim como os casos de displasia epitelial intensa, podem até ser tratados cirurgicamente²⁵.

O tratamento da QA visa, além de promover o alívio dos sintomas, prevenir o desenvolvimento do CEL. Existem vários tipos de tratamento para a QA, entretanto cada procedimento apresenta níveis variáveis de riscos e sucessos. É importante que, antes do tratamento, seja realizada a biópsia de áreas alteradas com aspecto endurecido, ulcerado ou esbranquiçado, para excluir a possibilidade de um caso de neoplasia epitelial em lábio²⁶.

A vermelhnectomia é o tratamento mais tradicional para casos de QA severa e difusa. Trata-se da remoção cirúrgica total da borda do lábio ou ressecção horizontal em cunha da área afetada. Embora esse método seja acompanhado por excelentes resultados biológicos, notam-se complicações como parestesia do lábio inferior, presença de prurido do lábio, tensão da cicatriz labial, dor na área de cicatriz e sensação de formigamento e abrasão no lábio superior causada pela presença de pelos perto da cicatriz do lábio inferior. Além disso, tal método também traz um grande trauma psicológico no paciente²⁶. A vermelhnectomia pode ser realizada pelo uso de laser de dióxido de carbono, que traz consequências semelhantes às aquelas causadas pelo uso do bisturi²⁶.

A crioterapia com nitrogênio líquido também é um método bastante comum utilizado no tratamento da QA e apresenta uma maior aceitação por parte dos pacientes por permitir um pós operatório mais tranquilo²⁶.

É possível, ainda, fazer o tratamento pelo uso de um agente quimioterápico de aplicação local, o 5-fluororacil. Esse método é bastante utilizado em pele, mas seus resultados ainda são controversos²⁶.

A etiologia da QA, bem como do CEL e lesões correlatas em pele é atribuída às mutações no DNA e danos em algumas proteínas das células epiteliais provocados

pela ação cumulativa da radiação UV, num processo denominado de fotocarcinogênese²⁷.

2.3 Fotocarcinogênese

A radiação solar é essencial para a vida na superfície terrestre: ela aquece os seres vivos, participa da fotossíntese e da síntese de vitamina D, além de apresentar um poder cicatrizante e bactericida. Entretanto, sua componente UV causa efeitos indesejáveis no corpo humano quando em excesso, sendo os órgãos mais afetados a pele e os olhos⁴.

A luz visível e a radiação UV são radiações eletromagnéticas, assim como radiações de pequeno comprimento de onda como os raios X, γ e radiações de grande comprimento de onda, como as micro-ondas. A radiação UV pode ser descrita tanto sob a forma de ondas como de pequenos pacotes de energia denominados fótons, pois seu comprimento de onda permite a realização de fenômenos típicos de ondas, como a interferência, a difração e a polarização, e também o efeito fotoelétrico, que é a capacidade do fóton de liberar um elétron da camada de valência de um metal, característica de partículas²⁷.

Os níveis de radiação UV que chegam à superfície da Terra podem variar e vários fatores contribuem para um maior risco de superexposição, que leva a consequências prejudiciais à saúde dos seres humanos. Tais fatores são:

- Espessura da camada de ozônio: a quantidade de radiação UV absorvida varia de acordo com as estações climáticas do ano e com outros eventos naturais que afetam a espessura da camada de ozônio. Atualmente, essa camada se encontra menos espessa

devido à emissão de substâncias químicas poluentes e produtos de consumo, como as embalagens em aerossóis com CFC.

- Período do dia: ao meio dia o ângulo de incidência dos raios solares em relação à superfície terrestre é mais próximo de 90° . Por isso, a distância percorrida pela radiação UV para atravessar a atmosfera é menor e consequentemente a intensidade dessa radiação é maior. No início da manhã e final da tarde o ângulo de incidência dos raios solares é menos próximo de 90° , fazendo com que a intensidade de radiação UV na superfície da Terra seja menor.
- Latitude: a intensidade dos raios solares é maior na linha do equador, pois a inclinação do eixo do nosso planeta faz com que, nessa região, os raios solares e a superfície da Terra formem um ângulo de 90° , o que aumenta a incidência dos raios UV nessa região. Nos trópicos, a camada de ozônio é mais fina, o que permite uma maior incidência de raios UV nessas regiões quando comparadas às áreas de altas latitudes.
- Altitude: grandes altitudes permitem uma maior exposição aos raios UV devido a uma menor quantidade de atmosfera para absorvê-los.
- Condições climáticas: as nuvens são capazes de reduzir os níveis de radiação UV, mas não completamente.
- Reflexão: superfícies como a neve, areia e asfalto refletem grande quantidade dos raios UV que os atingem. Devido à reflexão, a intensidade dos raios UV pode ser enganosa mesmo em áreas sombreadas²⁸.

A radiação UV é dividida em três espectros: UVA, UVB e UVC, de acordo com o comprimento de onda. Os raios UVC possuem o menor comprimento de onda (200 nm a 290nm) e como são totalmente absorvidos na atmosfera, não causam lesões em seres vivos. De qualquer forma, os raios UVC caracterizam-se pela alta capacidade de penetrar nos tecidos e podem causar lesões nas moléculas de DNA. Os raios UVB exibem comprimento de onda com tamanho intermediário (290nm a 320nm) e são apenas parcialmente absorvidos pela camada de ozônio. A radiação UVB que atinge a

superfície da Terra pode ser absorvida por proteínas e ácidos nucleicos, causando eritema em pele quando ocorre exposição aguda moderada aos raios de sol. A radiação UVA passa totalmente pela camada de ozônio e atinge a superfície da Terra, mas, até o momento, acredita-se que não provoquem danos ao DNA e seus efeitos maléficos em seres humanos estariam mais relacionados aos processos de fotoenvelhecimento^{27,29}.

Os efeitos da radiação UV são mais conhecidos em estudos em pele e podem ser divididos em duas categorias: os efeitos imediatos e os efeitos tardios. Entre os efeitos imediatos da radiação UV podemos citar: o eritema ou queimadura, provocado pela ação da radiação UVB sobre os queratinócitos, os quais têm seu DNA lesado, o que leva à liberação de mediadores da inflamação e dilatação dos vasos sanguíneos; o bronzeamento, ou seja, o aumento de pigmentação da pele pela radiação UV em consequência de alterações que ocorrem nos melanócitos. Esses proliferam, aumentam de tamanho e exibem maior concentração de melanina nos melanossomas, que, em seguida, são injetados nos queratinócitos adjacentes. Já os efeitos tardios na pele são principalmente o fotoenvelhecimento e a fotocarcinogênese⁴.

O fotoenvelhecimento é a deterioração gradual dos constituintes e das funções da pele em consequência da exposição prolongada e recorrente à radiação UV de fontes solar ou artificial. Ocorre desarranjo das fibras colágenas, alterações nas fibras elásticas⁴.

No comprimento de onda da radiação UVB, os fótons são altamente energéticos e, quando absorvidos pelas moléculas biológicas como o DNA, melanina, amino-ácidos, caroteno e ácido hialurônico, os chamados cromóforos, cria-se um estado de excitação e ocorre um rearranjo de elétrons. Quando esse rearranjo de elétrons provocado pela radiação UVB atinge o DNA de queratinócitos, forma-se uma ligação covalente entre duas bases pirimidinas consecutivas, que podem ser citosina-timina (C-T) ou citosina-citosina (C-C), constituindo os fotoprodutos dímeros de pirimidina ciclobutano e pirimidina pirimidona. No momento da duplicação do DNA, a enzima DNA polimerase não reconhece a ligação covalente e então insere duas bases adenina nesse local. Na replicação seguinte, as adeninas são pareadas com duas bases timina, constituindo assim a mutação C-T ou CC-TT²⁷.

Portanto, a marca registrada das radiações solares no DNA são as mutações de C para T ou CC para TT. Quando essas mutações afetam a função de genes responsáveis pela estabilidade do genoma, tais como oncogenes, genes supressores de tumor, genes dos sistemas de reparo de DNA e genes codificadores de polimerases, ocorre a transformação maligna de queratinócitos e melanócitos. Além disso, a transdução de sinal alterada pela radiação UV afeta mutações indiretamente, como por exemplo, diminuindo o tempo para o reparo do DNA e priorizando a replicação, ou reduzindo os níveis das enzimas que protegem as células dos danos UV²⁷.

Os genes mais conhecidos afetados pela radiação UV são *GADD45* e *TP53*, que evitam a propagação de danos no DNA tanto pelo aprisionamento do ciclo celular como pela indução da apoptose, e o gene *MDM2*, responsável pela proliferação celular³⁰.

2.4 Gene *TP53*

O gene *TP53* codifica uma fosfoproteína nuclear de 53 kD que atua na manutenção da estabilidade genômica, prevenindo o acúmulo de danos celulares³¹.

A mutação do gene *TP53*, que é um supressor de tumor, representa a alteração genética mais comum no câncer humano. As alterações genéticas relacionadas ao *TP53* que mais contribuem para formação de neoplasias malignas são as mutações com troca de sentido, resultando na produção de uma proteína com função alterada; e a perda de heterozigose, que ocorre quando há a perda de um dos dois alelos desse gene³¹.

A proteína p53 constitui-se de um tetrâmero que é acumulado no citoplasma durante a fase G1 do ciclo celular e migra para o núcleo no início da fase S, momento

em que ocorre um importante ponto de checagem no DNA da célula. Quando a molécula de DNA apresenta um dano ou a célula encontra-se em uma condição de estresse, há uma superexpressão de proteína p53. No núcleo, a proteína p53 age como fator de transcrição ao ativar genes como o *CDKN1A* (p21/WAF1), um potente inibidor de quinase dependente de ciclina, resultando assim no bloqueio da progressão do ciclo celular para que os danos no DNA sejam removidos antes de ocorrer a síntese de DNA e mitose necessárias para a divisão celular, o que evita a propagação de mutações. Quando não é possível corrigir os erros na molécula de DNA, a proteína p53 ativa as vias de indução da apoptose³².

Mutações no gene *TP53* podem ser induzidas pela ação da radiação UV e a presença de mutações C para T e CC para TT no gene, ou seja, aquelas com assinatura da UV, estão relacionadas tanto com o desenvolvimento de lesões cancerizáveis quanto com o estabelecimento e progressão de processos neoplásicos e já foram observadas em pelo menos parte dos carcinomas epidermóides e queratoses actínicas em pele humana exposta ao sol³³, bem como em pele de rato irradiada com radiação UV^{34,35}.

Também já se demonstrou a presença das mutações C-T e CC-TT em casos de CEL, sendo que no carcinoma epidermoide intraoral, a mutação mais comum neste gene é a transversão de G para T³⁶.

A observação da expressão imuno-histoquímica da proteína p53 é uma técnica bastante utilizada para detectar alterações na atividade do gene *TP53*. A proteína p53 normal tem meia-vida curta e sua quantidade nas células normais é pequena. Já a proteína p53 mutada tem meia-vida prolongada e pode se acumular nas células a níveis detectáveis, no entanto, é inativa²⁵.

Entre os diversos tipos de anticorpos anti-proteína p53 disponíveis no mercado, o anticorpo p53 clone DO-7, apesar de não ser positivo para proteína citoplasmática, é o mais utilizado por ser mais específico, sensível e seguro em reconhecer proteína p53 nuclear, tanto nativa como mutada. O anticorpo p53 PAb 1801 também é capaz de reconhecer proteína p53 nativa e mutada, no entanto é capaz de realizar reação cruzada com outras proteínas²⁵. Já a capacidade do anticorpo PAb

421 em reconhecer seu epítopo específico na proteína p53, depende da conformação tridimensional da proteína e, além disso, tanto o anticorpo 421 como o BP53.12 são capazes de detectar proteína p53 nuclear e citoplasmática³⁷. O anticorpo anti-proteína p53 clone PAb 248 produz uma marcação citoplasmática-perinuclear e nuclear, tanto em tecidos normais quanto em tecidos que apresentam a proteína p53 mutada. No entanto, é muito mais eficiente em detectar proteína p53 tipo nativa³⁸.

Acredita-se que a maior parte das mutações que ocorrem no gene *TP53* cause um desdobramento parcial do domínio central da proteína. Com essa modificação, uma região de cinco aminoácidos é exposta e, assim, pode ser reconhecida pelo anticorpo PAb 240, considerado específico para a proteína p53 mutada^{39,40}. O clone PAb 240 do anticorpo anti-proteína p53 produz coloração imuno-histoquímica tanto nuclear como citoplasmática-perinuclear e foi positivo em quase todas as células de linhagens que apresentam proteína p53 mutada, no entanto foi positivo somente em poucas células escassas de linhagens celulares com proteína p53 nativa³⁸.

A presença de proteína p53 tanto em casos de CEL e carcinoma epidermoide intraoral quanto em lesões cancerizáveis, como QA e leucoplasias, levou à realização de vários estudos que tentaram utilizar essa molécula como um marcador prognóstico. Estudos realizados indicam que mais de 50% dos carcinomas epidermóides intraorais apresentam-se com alterações genéticas no *TP53* e são positivos para proteína p53, assim como displasias epiteliais no epitélio adjacente a carcinomas epidermóides e também em displasias epiteliais não associadas a carcinomas epidermóides intraorais, mas a relação entre a superexpressão de p53 e a subsequente malignização da lesão ainda não foi estabelecida³¹.

O estudo de Pimentel⁴¹ et al. é um dos poucos trabalhos em lesões da zona de vermelhão de lábio que analisou a presença de proteína p53 em QA associadas a CELs ou isoladas, com diferentes características histopatológicas, tentando estabelecer uma possível relação entre a porcentagem de células p53 positivas e a susceptibilidade para transformação maligna de QAs. Esse trabalho revelou expressão de proteína p53 em 80% dos casos de CEL e 85% de QA levando os autores a sugerirem que a maioria dos casos dessas lesões seja mesmo provocada por danos no gene *TP53*⁴¹.

O gene TP53 regula a expressão de proteínas que também vêm sendo testadas como possíveis marcadores prognósticos. Esse conceito levou ao desenvolvimento de um trabalho por nosso grupo que relacionou os graus mais avançados de displasia epitelial presente nos casos de QA com a perda de expressão de maspin, uma proteína com função inibidora de invasão, regulada pela proteína p53 e cuja expressão imuno-histoquímica está inversamente associada com o comportamento maligno de várias neoplasias. O estudo revelou que 100% dos casos de QA com displasia epitelial discreta apresentaram positividade para a maspin em mais de 50% das células do epitélio. Entretanto, todos os casos com displasia epitelial intensa apresentaram marcação imuno-histoquímica positiva para proteína maspin em menos de 5% das células epiteliais. Por outro lado, todos os casos de CEL presentes nesse estudo apresentaram positividade para a maspin em mais de 50% das células. O que se sugeriu é que quando ocorre a invasão propriamente dita, outras vias de sinalização são ativadas para ocorrer aumento na produção de proteína maspin⁴².

O padrão de expressão da proteína p53 acima do estrato basal do epitélio é um dado que deve ser levado em consideração como indicador do desenvolvimento de carcinoma, mesmo na ausência de displasia óbvia^{43,44}.

2.5 Sistemas de graduação de displasias epiteliais orais

Apesar de várias tentativas para encontrar um marcador biológico que consiga detectar os possíveis casos de transformação maligna em QA e leucoplasias orais, ainda não há marcadores prognósticos confiáveis. Portanto, a graduação histológica ainda é a mais utilizada.

De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), uma lesão cancerizável é definida como um tecido morfollogicamente alterado com um risco maior de malignização do que um epitélio normal, embora não revele evidências de invasão celular para os tecidos vizinhos⁴⁵.

Displasia epitelial oral é o termo diagnóstico utilizado para descrever as alterações histopatológicas observadas em desordens crônicas, progressivas e cancerizáveis da mucosa oral⁴⁶. A displasia epitelial é caracterizada, histologicamente, pela presença de distúrbios arquiteturais acompanhados por atipias celulares no epitélio, ou seja, variações na organização típica das camadas do epitélio associadas a variações no tamanho e forma dos queratinócitos. Assim, essas alterações constituem a base do sistema mais amplamente utilizado, tanto pelos patologistas quanto pelos clínicos, para tentar prever quais lesões cancerizáveis apresentam um potencial maior para evoluir para carcinoma epidermoide⁴⁵.

As características da displasia epitelial relacionam-se principalmente com alterações na proliferação celular e maturação do epitélio pavimentoso estratificado queratinizado. As características que são predominantemente causadas por alterações da cinética celular encontram-se no compartimento proliferativo do epitélio e indicam aumento do crescimento ou divisão celular. Já os distúrbios de maturação manifestam-se na forma de estratificação irregular e aumento da queratinização de células individuais abaixo da camada de queratina⁴⁷.

Em 1957, a OMS criou o Centro de Colaboração e Referência para Lesões Orais Pré-Cancerizáveis, formado por notáveis especialistas que reuniram todos os dados da literatura da época para tentar uniformizar o conhecimento clínico e histopatológico em neoplasias e lesões cancerizáveis. Em 1978 esse grupo publicou um trabalho que visou estabelecer a nomenclatura, os conceitos e os critérios para realizar um diagnóstico mais eficiente dessas lesões, evitando a evolução desse quadro para uma neoplasia maligna. Também foram lançadas as bases para a elaboração do sistema de graduação de displasias epiteliais orais baseadas em 12 alterações que poderiam ocorrer no epitélio apresentando displasia epitelial, a saber: perda de polaridade das células do estrato basal, presença de mais de uma camada de células

com aparência basaloide, aumento da proporção núcleo-citoplasma, projeções em formato de gota, estratificação epitelial irregular, aumento do número de figuras de mitose (poucas mitoses anormais devem estar presentes), presença de figuras de mitose na metade superficial do epitélio, pleomorfismo celular, hipercromatismo nuclear, nucléolo aumentado, redução da coesão celular e queratinização de uma única célula ou grupos celulares no estrato espinhoso⁴⁸.

A presença de um maior número de alterações estaria associada a um grau de displasia mais elevado, e conseqüentemente, a um maior risco de desenvolvimento de carcinoma. Esse sistema teria a finalidade de facilitar a troca de informação entre os profissionais, acompanhar a evolução dos resultados das intervenções, comparar as respostas dos tratamentos e traçar o prognóstico das displasias. No entanto, já no início da elaboração desse sistema puderam-se notar algumas complicações, pois a presença de atipia celular também é observada em condições inflamatórias e trauma e além disso, não é possível prever o comportamento das lesões cancerizáveis⁴⁸.

Até a publicação do trabalho do Centro de Colaboração e Referência para Lesões Orais Pré-Cancerizáveis da OMS, o diagnóstico de lesões cancerizáveis era feito de várias maneiras diferentes, de acordo com a experiência clínica e histopatológica de cada profissional da saúde, e por isso as taxas de malignização reportadas nessa época não são confiáveis⁴⁹.

O trabalho de Smith e Pindborg^a de 1969 (apud Warnakulasuirya⁴⁷, 2001), por exemplo, atribuiu valores numéricos diferentes para cada uma das 13 características microscópicas mais comumente observadas na displasia epitelial, totalizando um valor máximo de 75. Foram consideradas displasias epiteliais discretas as lesões com escores entre 11 e 25, displasias moderadas os casos entre 26 e 45 e severas as displasias epiteliais com escore maior de 45. Entre as 13 características histológicas descritas nesse trabalho, 12 passaram a constituir oficialmente o sistema de classificação de displasias da OMS publicado em 1978⁴⁸.

^a Smith C, Pindborg JJ. Histological grading of oral epithelial atypia by the use of photographic standards. Copenhagen: C. Hambergers Bogtrykkeri; 1969.

Já Bánoczi e Csiba, em 1976 estudando lesões intraorais, propuseram diagnosticar displasia quando duas ou mais atipias estivessem presentes e a displasia epitelial foi graduada em três categorias: discreta quando duas características histológicas listadas anteriormente estavam presentes; moderada quando duas a quatro características eram notadas; e severa quando cinco ou mais características fossem encontradas⁴⁹.

Apesar dos esforços da OMS e pesquisadores em aprimorar os sistemas de graduação, desde a sua elaboração até os dias atuais ainda há entre patologistas uma grande discrepância de opiniões com relação à determinação do grau de displasias epiteliais orais. No estudo de Pindborg⁵⁰ et al., realizado durante o 2º Encontro da Associação Internacional de Patologistas Orais (IAOP), nove fotomicrografias de lesões displásicas foram avaliadas por 72 patologistas orais participantes do congresso e houve uma grande discrepância entre a classificação estabelecida pelos membros do Centro de Colaboração e Referência para Lesões Orais Pré-Cancerizáveis da OMS e os demais patologistas participantes, principalmente nos casos de displasia moderada. Esse foi um dos primeiros estudos a provar o grande nível de subjetividade no sistema de classificação de displasias orais e foi sugerida uma maior atenção para algumas características histológicas importantes, como por exemplo, a espessura do epitélio, para se determinar o grau de displasia⁵⁰.

Na classificação proposta pela OMS em 2005 os critérios a serem julgados foram divididos em alterações arquiteturais e atipias celulares⁴⁵.

As alterações arquiteturais a serem avaliadas 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 hiperchromatismo⁴⁵.

Convencionalmente, a displasia epitelial é dividida em três graus: discreta, moderada e intensa. A displasia epitelial discreta ocorre quando, em geral, distúrbios arquiteturais são limitados ao terço inferior do epitélio, acompanhado por mínima atipia celular. Já a displasia epitelial moderada é caracterizada pela extensão dos distúrbios arquiteturais para o terço médio do epitélio e então, uma consideração maior é dada à presença de atipia celular. A displasia epitelial intensa é determinada quando mais que dois terços do epitélio exibem distúrbios arquiteturais associados com atipia celular. Entretanto, algumas questões são confusas para muitos patologistas, pois a presença de atipia celular acentuada indica que a lesão deve ser classificada como displasia intensa, apesar de não se estender para o terço superior do epitélio e, além disso, lesões com leves características atípicas estendendo-se para o terço médio do epitélio são consideradas displasias epiteliais discretas⁴⁵.

Já foi apontado que, um grave problema do sistema de graduação proposto pela OMS é a divisão arbitrária em três categorias, que são distintas do real processo de malignização como ele é entendido agora, no qual, uma vez estabelecida alterações em genes-chaves, o processo torna-se contínuo, ou seja, não há um ponto de corte para estabelecer um limite preciso entre uma categoria e outra. O uso da divisão em três categorias acarreta em grande subjetividade no diagnóstico final³¹.

Em um estudo de Kujan⁵¹ et al. foi mostrado que 15% de casos de lesões intraorais classificados como displasia discreta ou apenas hiperplasia epitelial evoluíram para carcinoma epidermoide, assim como 46,7% de casos classificados como displasia moderada. Isso significa que a taxa de transformação maligna não é compatível com a severidade histológica observada.

O sistema de graduação de displasias epiteliais em três categorias distintas, como foi proposto pela OMS, tenta uniformizar o diagnóstico das lesões cancerizáveis, para que, através da identificação das alterações arquiteturais e citológicas, seja determinado um único grau do estágio em que se encontra a lesão no fragmento de biópsia analisado, a fim de que o tratamento seja conduzido adequadamente e o

prognóstico de cada lesão traçado de acordo com suas características morfológicas. No entanto, é grande a variabilidade de opiniões inter-observadores em se determinar o grau de displasias epiteliais. A escolha da categoria a qual pertencem as lesões cancerizáveis, a presença e a importância do significado de cada característica atípica são baseadas na interpretação de cada patologista⁵². O trabalho de Kurabulut⁵³ et al. revelou uma taxa de concordância interobservadores expresso por valores de κ de 27%-45%, mostrando assim um grau de concordância entre patologistas de pobre a moderado. Nesse estudo, foram dados quatro diagnósticos diferentes para um mesmo fragmento de biópsia, que variou desde lesão sem displasia até carcinoma *in situ*. Essa discordância, além de representar uma grande subjetividade intrínseca do sistema de graduação que se reflete na baixa reprodutibilidade do sistema, pode gerar graves consequências terapêuticas para o paciente⁵³.

Um estudo de acompanhamento clínico de casos de leucoplasia oral durante 32 meses, observou que há maior probabilidade de ocorrer transformação maligna em casos de displasia moderada e intensa, mas entre os 20 pacientes que desenvolveram carcinoma epidermoide, 30% não apresentaram displasia epitelial na primeira biópsia⁵⁴.

Para tentar diminuir tais problemas, foi proposto por Kujan⁵¹ et al., em 2006, a utilização de um sistema binário, baseado nos critérios arquiteturais e citológicos do proposto pela OMS classificando as displasias epiteliais em lesões de “alto risco” (quando as lesões apresentam 4 alterações arquiteturais e 5 alterações citológicas) e “baixo risco” (quando as lesões apresentam menos que 4 alterações arquiteturais e menos que 5 alterações citológicas). O objetivo do sistema binário é agrupar as lesões em menos categorias para auxiliar o clínico a determinar um tratamento mais conservador nas displasias com menos alterações epiteliais e, portanto, menor chance de transformação maligna, e um tratamento mais radical nos casos com mais alterações celulares, e consequentemente, com maior chance de evolução para carcinoma. A determinação do número de alterações foi feita pela análise do prognóstico de desordens potencialmente malignas intraorais⁵¹. Esse sistema ainda não foi testado na fotocarcinogênese em lábio.

Mais recentemente, foi demonstrado pelo mesmo grupo que apenas os critérios arquiteturais inversão de polaridade das células do estrato basal, projeções em gota e presença de figuras de mitose nas camadas superficiais relacionam-se com o prognóstico do paciente, assim como, dos critérios citológicos, apenas o pleomorfismo celular, as figuras de mitoses atípicas e a evidência nucleolar demonstraram significância estatística para prever o prognóstico⁵².

Outra dificuldade em se determinar o grau das displasias epiteliais decorre do fato de que essas não são uniformes se considerarmos o todo da lesão. A prolongada exposição a carcinógenos predispõe o tecido a uma instabilidade genômica que leva ao desenvolvimento de vários “campos condenados” que podem exibir desde numerosas lesões cancerizáveis com diferentes graus de displasia até múltiplos tumores primários⁵⁵. Sendo assim, dependendo do local onde foi realizada a biópsia é possível encontrar diferentes graus de displasia e até carcinoma epidermoide em diferentes estágios de invasão. Por isso, recomenda-se a remoção cirúrgica total de todos os focos de lesões cancerizáveis do paciente e o diagnóstico é estabelecido pela análise do campo com maior número de atipias⁴⁷.

Estudos sobre o grau de displasias epiteliais em desordens potencialmente malignas de vermelhão de lábio são bastante raros. Pimentel⁴¹ et al. em 2006, em sua pesquisa, utilizaram um método de classificação de QAs, tanto solitárias quanto no epitélio adjacente a CEL, que se baseou na classificação histológica de queratoses actínicas cutâneas, para tentar estabelecer uma correlação entre o tipo histológico e a possibilidade de a lesão sofrer transformação maligna. Entretanto, não foi encontrada nessa pesquisa uma correlação estatisticamente significativa entre o tipo histológico da QA e a progressão dessa lesão para CEL, pois os aspectos clínicos das queratoses actínicas utilizados como base para esse sistema de graduação são completamente diferentes da QA.⁴¹

3 PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi:

- Avaliar as atipias celulares e alterações arquiteturais no epitélio adjacente a carcinomas epidermóides de lábio (CEL), determinando quais as mais frequentes nesta situação;
- Conferir uma graduação histológica às displasias do epitélio adjacente a CELs, utilizando tanto a graduação proposta pela OMS — em três graus, discreta, moderada ou intensa —, quanto a binária, proposta por Kujan⁵¹ et al. para as displasias intraorais, dividindo-as em alto e baixo risco de malignização;
- Avaliar, através da técnica de imuno-histoquímica, a presença da proteína p53 mutada no epitélio adjacente ao CEL, comparando esses achados à graduação histológica das displasias.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Seleção de casos

Após a aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOU SP, sob Protocolo de número 206/2010 (Anexo A), a primeira etapa desse trabalho foi a seleção de casos.

Para este estudo foram levantados os casos de lesões em lábio cujo diagnóstico histológico determinado foi “carcinoma epidermoide”, selecionados do arquivo do Serviço de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo desde 08 de junho de 1987 a 12 de março de 2011. Nesse período, um total de 211 casos foi diagnosticado.

A partir do levantamento dos casos, foram selecionados para esse estudo somente aqueles que apresentavam epitélio de superfície adjacente ao carcinoma, além de faixa nítida de degeneração basofílica do colágeno no tecido conjuntivo, demonstrando que as alterações nesse tecido foram causadas pela exposição crônica à radiação UV. O epitélio adjacente ao tumor poderia estar localizado em apenas um ou em ambos os lados do corpo da neoplasia.

Foram excluídos da amostra os casos de carcinoma epidermoide de lábio (CEL) sem epitélio de superfície adjacente e/ou com ausência de faixa nítida de degeneração basofílica do colágeno nas lâminas coradas em hematoxilina e eosina. Também foram descartados os casos em que, nos cortes submetidos à reação imuno-histoquímica, não foram observadas áreas de carcinoma epidermoide ou de epitélio de

superfície em zona sem invasão. Sendo assim, a amostra final desta pesquisa contou com 40 casos de CEL.

Em seguida, foram obtidos alguns dados clínicos dos pacientes referentes aos 40 casos de CEL selecionados para este estudo. Tais dados estavam contidos nas fichas de encaminhamento de material para exame no Serviço. Os dados recuperados foram referentes ao sexo, idade e cor da pele dos pacientes.

4.2 Análise morfológica

Lâminas coradas em hematoxilina e eosina foram sujeitas à análise do epitélio adjacente a carcinomas de lábio em microscópio de luz. Para padronização da zona a ser avaliada, foi traçada uma linha imaginária perpendicular ao epitélio de superfície e que tangenciava a última ilhota lateral do corpo da lesão. A zona avaliada para as atipias foi aquela imediatamente ao lado da linha imaginária traçada. Quando havia epitélio adjacente em ambos os lados da neoplasia, a análise histológica foi realizada nos dois lados da lesão, porém apenas os dados do lado com maior número de atipias foram considerados para os resultados desta pesquisa.

A graduação das displasias epiteliais foi realizada por dois pesquisadores separadamente e nos casos em que houve discordância, foi feita uma nova análise com os dois pesquisadores juntos e o grau de displasia final foi determinado por um acordo das partes.

Os critérios analisados foram aqueles sugeridos pela Organização Mundial da Saúde (OMS)⁴⁵. A saber:

A. Arquiteturais:

- 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);
- pérolas de queratina em projeções epiteliais;

B. Citológicos:

- 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;
- hipercromatismo.

A seguir, cada caso foi classificado de acordo com a proposta da OMS. Abaixo, uma descrição dos critérios para classificação nas três categorias utilizadas:

- 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 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 do epitélio associadas a atipias citológicas.

Os cortes receberam, também, um escore de acordo com o sistema binário de graduação de displasias epiteliais proposto por Kujan⁵¹ et al. 2006, segundo o qual, para ser considerada de alto risco é necessária a presença de pelo menos quatro alterações arquiteturais e pelo menos cinco alterações citológicas. Já casos com menos de quatro alterações arquiteturais ou menos de cinco citológicas são classificados como de baixo risco.

4.3 Estudo imuno-histoquímico

Para cada caso selecionado também foi realizada reação imuno-histoquímica pela técnica da estreptavidina-biotina utilizando como marcador o anticorpo anti-p53 clone Pab 240 (Abcam, Cambridge, MA, EUA).

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, o primeiro a 60 °C, por 30 minutos e o segundo a temperatura ambiente, por 15 minutos. A seguir, foi feita reidratação em cadeia descendente de etanóis, passando imediatamente para a remoção do pigmento formólico através da incubação 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 da imersão das lâminas por 30 minutos em banho a 95°C com solução de Tris (50 mM) e EDTA (1 mM) com Tween 20 (200µl/L) em pH 9,0.

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, 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.

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

A seguir foi feita a incubação dos anticorpos primários em diluição 1:100 em tampão Tris acrescido de BSA (albumina bovina e azida sódica) durante 18 horas a 4 °C.

Para a incubação do anticorpo de ligação e do complexo terciário, foi utilizado o kit LSAB plus (DAKO, Carpinteria, CA, USA). As reações foram reveladas pela diaminobenzidina (DAKO Liquid DAB+, K3468) através de incubação por 10 minutos e, após lavagem em Tris e água deionizada, para remoção de excessos, os cortes foram contracolorados 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.

A análise foi feita quanto à presença ou ausência de marcação positiva para o anticorpo anti-proteína p53 clone PAb240. Foram consideradas positivas apenas as células que apresentaram coloração acastanhada no núcleo, entretanto foi observada

marcação para o anticorpo PAb240 no núcleo e no citoplasma de queratinócitos. A marcação de interesse foi aquela da região do epitélio adjacente, mas também se observou a presença, ou não, da proteína mutada no corpo da neoplasia.

4.4 Forma de análise dos resultados

Foram calculadas quais são as alterações arquiteturais e citológicas mais frequentes no epitélio adjacente ao CEL, assim como a distribuição dos diferentes graus de displasias, pelas duas formas de graduação. Por fim, a presença de células portando a proteína p53 mutada foi comparada às duas formas de graduação histológica das displasias.

5 RESULTADOS

Para este estudo foram levantados os casos de lesões em lábio, cujo diagnóstico histológico determinado foi “carcinoma epidermoide”, pertencentes ao arquivo do Serviço de Patologia Cirúrgica da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo desde 08 de junho de 1987 a 12 de março de 2011. Um total de 211 casos de carcinoma epidermoide de lábio (CEL) foi diagnosticado, destacando-se que apenas cinco localizavam-se em lábio superior. Após a aplicação dos critérios de inclusão e exclusão 40 casos foram selecionados para compor a amostra deste trabalho.

5.1 Dados clínicos

Entre os 40 casos de CEL selecionados para este estudo, 31 (77,5%) eram pacientes do sexo masculino e 9 (22,5%) de pacientes do sexo feminino. A idade dos pacientes variou entre 33 e 82 anos, sendo que 2 casos não tiveram idade revelada. A média de idade dos pacientes acometidos por CEL nessa pesquisa foi de 56,8 anos. Com relação à cor de pele, a informação estava presente para 38 casos, sendo todos leucodermas.

5.2 Análise morfológica

A análise morfológica dos 40 casos de CEL deste estudo foi realizada nos cortes histológicos corados em hematoxilina e eosina que revelaram que a área de CEL caracteriza-se pela proliferação de queratinócitos atípicos que invadem o tecido conjuntivo subjacente na forma de ilhas, geralmente contendo pérolas de queratina em seu interior. Os queratinócitos neoplásicos são bem diferenciados e geralmente apresentam formato poligonal, de limites bem definidos e exibindo citoplasma amplo. O núcleo possui formato arredondado, com cromatina densa e está localizado na região central da célula. Também foi possível observar várias atipias na área de invasão, sendo as mais comuns o pleomorfismo celular e nuclear, aumento do número de mitoses e alteração da proporção núcleo/citoplasma. Na maioria dos casos, notou-se a presença de intenso infiltrado inflamatório crônico difuso permeando as ilhotas de células neoplásicas. A área de CEL geralmente encontrou-se revestida por epitélio pavimentoso estratificado hiperparaqueratinizado, mas em alguns casos observaram-se zonas ulceradas, caracterizadas pela solução de continuidade no epitélio de superfície.

Na área adjacente ao CEL, o epitélio de superfície mostrou-se do tipo estratificado pavimentoso que, na maioria dos casos, estava hiperqueratinizado, mas áreas de paraqueratina ou mistura de orto e paraqueratina também foram observadas. A espessura do estrato córneo mostrou-se variável, com igual número de casos com atrofia e acantose. O estrato basal também foi bastante variável, ora apresentando uma única camada de células de aspecto mais cuboidal e núcleo grande e arredondado, ora apresentando-se hiperplásico e desorganizado, constituído por células de formato e tamanho bastante diferentes das células que geralmente constituem esse estrato (Figura 5.1A).

A lâmina própria subjacente à área de epitélio adjacente ao CEL é composta por tecido conjuntivo denso e apresentou em todos os casos desta amostra degeneração basofílica do colágeno ou elastose solar, que ora mostrou-se evidente em algumas

áreas focais, ora estendia-se por todo o corte em faixas estreitas ou espessas, paralelas ao epitélio de superfície. Infiltrado inflamatório crônico também foi um achado comum nessas lesões, porém sua intensidade foi bastante variável, assim como sua disposição pelo corte.

Em alguns casos foi notada a presença de pigmentação melânica em células do estrato basal do epitélio adjacente ao CEL, embora muitas vezes os melanócitos não foram notados.

O quadro 5.1 ilustra todos os achados para os 40 casos de CEL estudados, abrangendo os resultados da avaliação das alterações celulares e arquiteturais observados no epitélio adjacente, a classificação das displasias segundo os critérios propostos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) e também pelo sistema binário, além da análise imuno-histoquímica para o anticorpo anti-proteína p53 mutada (PAb 240) e os dados clínicos obtidos das fichas dos pacientes.

	A. Arquiteturais						B. Citológicos								Resultados				Dados clínicos				
	estratificação epitelial irregular	perda da polaridade das células do estrato 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	variação anormal de tamanho do núcleo	pleomorfismo nuclear	variação anormal de tamanho da célula	pleomorfismo celular	proporção núcleo/citoplasma aumentada	aumento no tamanho do núcleo	figuras de mitose anormais	número e tamanho de nucléolos aumentados	hipercromatismo	Gradação OMS	Gradação binária	p53 mutada no epitélio adjacente	p53 mutada no corpo da neoplasia	Idade (em anos)	Sexo	Cor da Pele
1	x	x	x					x	x	x	x					x	M	B	+	+	60	Masc	Leuco
2		x													x		D	B	+	+	37	Masc	Leuco
3		x													x	x	D	B	+	-	79	Fem	Leuco
4	x					x		x	x	x	x				x		M	B	-	+	45	Masc	Leuco
5	x	x						x	x	x	x	x				x	I	B	+	+	55	Masc	Leuco
6		x	x						x		x				x		M	B	+	+	65	Masc	Leuco
7		x							x		x				x		D	B	+	+	57	Masc	Leuco
8	x	x	x					x	x	x	x				x		M	B	+	+	33	Masc	Leuco
9	x	x	x	x				x	x	x	x	x	x		x	x	I	A	+	+	61	Masc	Leuco
10	x	x		x				x	x	x	x	x	x		x		I	B	-	-	51	Fem	Leuco
11		x				x		x	x	x	x					x	M	B	+	+	61	Masc	Leuco
12		x	x						x		x	x			x		M	B	+	+	59	Fem	Leuco
13	x	x	x						x		x					x	M	B	+	+	67	Masc	Leuco
14		x		x				x		x					x		D	B	+	+	35	Masc	Leuco
15	x	x	x					x	x	x	x	x				x	M	B	+	+	73	Masc	Leuco
16		x							x		x						D	B	-	+	66	Masc	N/I
17		x							x		x						D	B	+	+	77	Masc	Leuco
18		x	x														D	B	+	+	40	Masc	Leuco
19		x	x					x	x	x	x					x	M	B	+	+	38	Fem	Leuco
20	x	x		x					x		x	x			x		M	B	+	+	43	Masc	Leuco
21	x	x	x					x	x	x	x					x	M	B	-	+	N/I	Masc	Leuco
22		x		x		x		x	x	x	x	x	x		x		M	B	+	+	81	Fem	Leuco
23		x							x		x						D	B	-	-	58	Masc	Leuco
24	x	x	x	x				x	x	x	x	x			x		I	A	-	-	63	Masc	Leuco
25	x	x		x	x			x	x	x	x	x	x		x		I	A	+	-	79	Masc	Leuco

(Continua)

X – alteração encontrada; D – displasia discreta; M – displasia moderada; I – displasia intensa; B – baixo risco; A – alto risco; (+) - positivo para p53 PAb 240; (-) – negativo para p53 PAb 240; Masc – sexo masculino; Fem – sexo feminino; Leuco – leucoderma; N/I – não informado

	A. Arquiteturais					B. Citológicos								Resultados				Dados clínicos			
	estratificação epitelial irregular perda da polaridade das células do estrato 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					variação anormal de tamanho do núcleo pleomorfismo nuclear variação anormal de tamanho da célula pleomorfismo celular proporção núcleo/citoplasma aumentada aumento no tamanho do núcleo figuras de mitose anormais número e tamanho de nucléolos aumentados hipercromatismo								Graduação OMS Graduação binária p53 mutada no epitélio adjacente p53 mutada no corpo da neoplasia				Idade (em anos) Sexo Cor da Pele			
26	x		x	x		x	x	x	x				x	x	M	B	+	-	76	Masc	N/I
27	x	x	x			x	x	x	x				x		M	B	+	-	81	Masc	Leuco
28	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x	x		x		I	A	+	+	49	Masc	Leuco
29		x													D	B	+	-	76	Fem	Leuco
30		x					x		x				x		D	B	-	-	81	Masc	Leuco
31	x					x	x	x	x					x	D	B	-	-	N/I	Masc	Leuco
32	x	x		x		x	x	x	x	x			x	x	I	B	+	+	82	Masc	Leuco
33	x	x			x		x		x				x	x	M	B	+	+	53	Masc	Leuco
34	x	x		x		x	x	x	x					x	M	B	+	-	42	Masc	Leuco
35				x			x		x						D	B	+	+	48	Masc	Leuco
36		x				x			x						D	B	+	-	34	Fem	Leuco
37		x					x		x					x	D	B	+	+	70	Fem	Leuco
38		x					x		x						D	B	+	+	47	Masc	Leuco
39		x			x	x	x	x	x				x		M	B	+	+	53	Masc	Leuco
40	x	x				x	x	x	x				x	x	M	B	+	+	46	Fem	Leuco

(Conclusão)

X – alteração encontrada; D – displasia discreta; M – displasia moderada; I – displasia intensa; B – baixo risco; A – alto risco; (+) - positivo para p53 PAb 240; (-) – negativo para p53 PAb 240; Masc – sexo masculino; Fem – sexo feminino; Leuco – leucoderma; N/I – não informado

Quadro 5.1 – Alterações epiteliais presentes nos epitélio adjacente aos 40 casos de CEL, classificação das displasias epiteliais pelo sistema binário, positividade para proteína p53 mutada e dados clínicos dos pacientes.

A tabela 5.1 sumariza a quantidade de casos em que cada uma das alterações epiteliais foi encontrada.

Tabela 5.1 – Número e porcentagem de aparecimento de cada uma das alterações epiteliais nos 40 casos examinados.

	Alteração epitelial	Número de casos positivos	Porcentagem
A. Arquiteturais	Estratificação epitelial irregular	20	50
	Perda da polaridade das células do estrato basal	36	90
	Projeções epiteliais em forma de gota	14	35
	Aumento do número de figuras de mitose	12	30
	Mitoses altas	2	5
	Queratinização prematura em células isoladas	5	12,5
	Pérolas de queratina em projeções epiteliais	0	0
B. Citológicos	Variação anormal de tamanho do núcleo	23	57,5
	Pleomorfismo nuclear	34	85
	Variação anormal de tamanho da célula	23	57,5
	Pleomorfismo celular	34	85
	Proporção núcleo/citoplasma aumentada	11	27,5
	Aumento no tamanho do núcleo	5	12,5
	Figuras de mitose anormais	0	0
	Número e tamanho de nucléolos aumentados	22	55
	Hipercromatismo	16	40

5.3 Classificação dos graus de displasia

A determinação do grau de displasia epitelial no epitélio adjacente ao CEL de acordo com o sistema de classificação da OMS mostrou que entre os 40 casos analisados 15 (37,5% do total) apresentaram displasia epitelial discreta, 18 (45%) exibiam displasia epitelial moderada e 7 (17,5%) foram classificados como tendo displasia epitelial intensa. Já quando o sistema binário de graduação foi aplicado, 36 dos 40 casos (90%) foram classificados como baixo risco e apenas 4 (10%) receberam graduação alto risco (Figura 5.1B a D).

Comparando-se as classificações recebidas por cada caso de acordo com cada sistema de graduação de displasia utilizado, observou-se que os 4 casos considerados de alto risco pelo sistema binário foram graduados como displasia epitelial intensa pelo sistema da OMS. Já entre os 36 casos considerados de baixo risco pelo sistema

binário, 15 (41,7%) foram graduadas como displasia epitelial discreta, 18 (50%) como displasia epitelial moderada e 3 (8,3%) como displasia epitelial intensa.

5.4 Imuno-histoquímica

A marcação imuno-histoquímica para a proteína p53 mutada foi encontrada no epitélio adjacente de 32 casos (80%) desta amostra. Vinte e oito casos (70%) exibiram marcação positiva nas ilhotas neoplásicas do carcinoma. Em 25 casos (62,5%) tanto o epitélio adjacente quanto o corpo da neoplasia estavam positivas, enquanto 7 casos (17,5%) exibiram positividade apenas no epitélio adjacente e 3 casos (7,5%) apenas nas ilhas do carcinoma. Dos 40 casos estudados apenas 5 (12,5%) foram totalmente negativos para a proteína p53 mutada (Figura 5.2).

O gráfico 5.1 mostra a distribuição da positividade para a p53 mutada no epitélio adjacente ao CEL e no corpo da neoplasia.

Gráfico 5.1 – Positividade para proteína p53 mutada no epitélio adjacente ao CEL e no corpo da neoplasia

Considerando apenas a região de epitélio adjacente, a presença de proteína p53 mutada foi detectada em 11 casos de displasia epitelial discreta (27,5% do total de casos do estudo e 73,3% das displasias epiteliais discretas estudadas), 16 casos de displasia epitelial moderada (40% do total de casos estudados e 88,8% das displasias moderadas analisadas) e 5 casos de displasia epitelial intensa (12,5% do total de casos desse estudo e 71,4% de todas as displasias epiteliais intensas observadas nesse estudo). Esses dados estão demonstrados no gráfico 5.2

Gráfico 5.2 – Porcentagem de casos positivos e negativos para a proteína p53 mutada entre os três graus de displasia epitelial no sistema de graduação da OMS

Considerando-se a graduação binária das displasias do epitélio adjacente ao CEL, dos 36 casos graduados como de baixo risco 29 (72,5% do total de casos estudados e 80% das lesões de baixo risco) apresentaram positividade para a p53 mutada, enquanto que dos 4 casos classificados como de alto risco 3 (7,5% do total de

casos estudados e 75% dos casos graduados como de alto risco) expressaram a proteína estudada. Esses dados estão representados no gráfico 5.3.

Gráfico 5.3 – Porcentagem de casos positivos para a proteína p53 mutada entre os graus de displasia epitelial do sistema binário de graduação

A presença de proteína p53 mutada no citoplasma das células epiteliais foi observada em 62,5% dos casos deste estudo.

Figura 5.1 – Casos de CEL corados em HE. **A:** QA presente no epitélio de superfície, adjacente ao CEL, região onde foram feitas as análises desse trabalho. Observaram-se presença de elastose solar e displasia epitelial, critérios de inclusão para essa pesquisa. **B:** Displasia epitelial discreta, caracterizada pela presença, principalmente, de inversão de polaridade das células da camada basal e estratificação irregular. **C:** Displasia epitelial moderada, na qual se notam inversão de polaridade das células da camada basal em algumas áreas, e pleomorfismo celular. **D:** Displasia epitelial intensa. Observam-se estratificação irregular e presença de projeções epiteliais afiladas.

Figura 5.2 – Expressão imuno-histoquímica da proteína p53 mutada no epitélio adjacente a CEL.
A: expressão da proteína é observada principalmente nas células da camada basal.
B: p53 mutada em poucas células, mas dispostas em todos os estratos do epitélio.
C: Na displasia epitelial intensa observa-se a proteína na maioria das células epiteliais de todos os estratos do epitélio.

6 DISCUSSÃO

A diversidade da vida na Terra só foi possível devido à existência da camada de gás ozônio na estratosfera, capaz de barrar grande parte dos raios ultravioleta (UV) e evitar a ação nociva desse tipo de radiação nos seres vivos. A emissão cada vez maior de poluentes como o gás carbônico (CO_2) produzido com as queimadas das matas e queima de combustíveis fósseis; os óxidos nitroso (NO) e nítrico (NO_2) liberados por exaustores de veículos; além dos gases clorofluorcarbonos (CFC) contribuem para a destruição acelerada da camada de ozônio, permitindo assim a passagem de raios ultravioleta para a superfície terrestre⁵.

Além de uma maior incidência de radiação UV provocada pelo aumento da emissão de poluentes, o Brasil é um país geograficamente propício a uma maior exposição a esse tipo de radiação, pois se situa principalmente na região dos trópicos – onde a camada de ozônio é mais fina – e estende-se até o equador, a região do globo com maior incidência de raios solares. Aliados aos fatores de ordem ambiental, fatores culturais também colaboram para uma elevada exposição da população brasileira à radiação solar²⁸

A pele é o órgão mais afetado pela radiação UV, pois sua área de exposição ao meio ambiente é maior que de qualquer outro órgão. Entre as lesões de pele causadas pela radiação UV, as mais comuns são a queratose actínica e os cânceres de pele melanoma e carcinomas. A queratose actínica é considerada uma lesão precursora e ao mesmo tempo um marcador de risco aumentado para o desenvolvimento de câncer de pele não melanoma²⁷.

De acordo com as estimativas para o ano de 2010-2011 do INCA⁵⁶, estão previstos no Brasil cerca de 53.410 novos casos de câncer de pele não melanoma em homens e 60.440 novos casos de câncer de pele em mulheres⁵⁶. Existem em média 200 mil novos casos de carcinoma epidermoide de pele diagnosticados a cada ano nos

Estados Unidos, dos quais 1.300 a 2.300 casos produzem metástases que levam o paciente a óbito^{27,57}. Assim como na pele, a radiação UV também é capaz de provocar lesões no epitélio de transição que recobre a zona de vermelhão de lábio, sendo as duas principais o carcinoma epidermoide de lábio (CEL) e a desordem potencialmente maligna que precede o CEL em virtualmente todos os casos, a queilite actínica (QA)²⁰.

Séries em diversas partes do mundo têm revelado a ocorrência dessas duas patologias em pacientes expostos de maneira crônica e excessiva à radiação UV do sol^{8,11,21,58}. Não há dados oficiais do Brasil com relação à incidência do CEL em nossa população.

Um levantamento dos arquivos do Serviço de Patologia Cirúrgica da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, englobando os casos atendidos de junho de 1987 a março de 2011, revelou 211 casos diagnosticados como CEL e 560 como QA, em um universo de mais de 60 mil casos.

Um problema em relação a desordens com potencial de malignização — não apenas a QA, mas também a leucoplasia oral, leucoplasia verrucosa proliferativa, a eritroleucoplasia e também lesões correlatas em outros órgão e sistemas — é que até o presente momento não é possível prever com acurácia quantos e quais casos dessas lesões irão evoluir para um processo maligno. Especificamente em relação à QA, não há trabalhos de acompanhamento de pacientes por longos períodos e que possam indicar qual o real potencial de evolução desse processo para o carcinoma invasivo. Classicamente tem se considerado que entre 10 e 20% dos casos de QA irão sofrer evolução para CEL, mas não há trabalhos que tenham de fato identificado esta taxa de transformação por meio do seguimento cuidadoso e sistemático de pacientes²⁴.

O trabalho de Marcopoulos⁵⁸ et al. revelou uma taxa de transformação de QA em CEL de 3,5% em dois anos de acompanhamento. Esse trabalho mostra, também, que lesões diagnosticadas na clínica como QA, quando submetidas a exame histopatológico, podem revelar que a invasão já ocorreu, o que foi observado em cerca de 14% dos casos desse trabalho.

Apesar dos esforços da comunidade científica em detectar um marcador biológico que aponte, com segurança, quais os pacientes que sofrerão a evolução do processo para um carcinoma invasivo, até o momento nenhum, de fato, confiável foi descrito para desordens potencialmente malignas de boca, incluindo aquelas de lábio e intraorais. Várias moléculas vêm sendo testadas, como os marcadores de proliferação Ki67 e PCNA², além de proteínas de aprisionamento do ciclo celular como p21, p53 e p63^{59,60}

O método mais utilizado para cálculo de prognóstico nessas lesões tem sido a graduação histológica da displasia epitelial exibida pela lesão^{48,49,51}. Displasia epitelial é o termo diagnóstico aplicado à presença de distúrbios arquiteturais acompanhados por atipias citológicas no epitélio. Uma série de estudos prospectivos demonstrou que há uma relação entre presença de displasia epitelial e transformação maligna^{49,61,62}. As diversas classificações propostas para as displasias epiteliais foram organizadas na tentativa de relacionar um determinado espectro de alterações histológicas com o potencial de uma determinada lesão de evoluir para a malignidade⁴⁵

No entanto, esse método é subjetivo, pois se baseia em critérios morfológicos que dependem da visualização e da experiência de cada patologista em reconhecê-los. Além disso, tem se relatado que a relação entre os vários graus de displasia epitelial e o desenvolvimento de câncer é muitas vezes incoerente, pois muitos estudos provam que uma proporção considerável de pacientes com lesões cancerizáveis apresentando displasia epitelial discreta, ou até mesmo lesões sem displasia epitelial, evolui para carcinoma, ou seja, os sistemas de graduação de displasias epiteliais não conseguem prever o comportamento das lesões displásicas e falham quanto ao seu valor preditivo^{44,48,51}. De qualquer forma, este sistema é o mais utilizado pelos profissionais para tomar decisões terapêuticas.

Tendo como justificativa que a fotocarcinogênese em lábio é um exemplo de cancerização de campo⁵⁵, e que é provável que nas margens de um CEL já exista um acúmulo de alterações genéticas comprometedoras da estabilidade do genoma, este trabalho teve por objetivo analisar a presença de displasia epitelial no epitélio adjacente ao carcinoma invasivo provocado pela radiação UV nos lábios. Além disso,

teve por objetivo detectar a presença da proteína p53 mutada nessa área, considerando-se que o gene que codifica para esta proteína é, sabidamente, um dos principais alvos das mutações provocadas pela radiação UV.

Os dados clínicos analisados neste trabalho caracterizaram nossa amostra como compatível com o perfil de pacientes de CEL no mundo. A maioria dos pacientes era do sexo masculino (77,5%) e leucodermas (100% dos casos em que o dado foi informado). A maior parcela de pacientes de CEL ser do sexo masculino tem sido explicada pelo contingente de trabalhadores homens nos campos e outras atividades que exigem exposição à radiação UV²². A média de idade dos pacientes deste estudo ficou entre os 50 e 60 anos, como tem sido encontrado na maioria dos trabalhos^{13,22}.

Foram analisadas as alterações citológicas e os distúrbios arquiteturais presentes no epitélio adjacente a 40 casos de CEL. Todos os casos deste estudo exibiram, pelo menos, uma das 16 alterações propostas como critério de graduação de displasia pela OMS⁴⁵. A alteração mais comumente encontrada foi a perda de polaridade das células do estrato basal, vista em 90% dos casos. Esse resultado foi o mesmo encontrado em um trabalho desenvolvido este ano por nosso grupo, que avaliou uma ampla série de casos de QA⁶³. A seguir, o pleomorfismo celular e nuclear, que foi encontrado em 85% dos casos estudados, seguido da variação do tamanho de núcleo e da célula, presente em 57,5% da amostra. Número e tamanho de nucléolos aumentados estavam presentes em 55% dos casos, enquanto a estratificação epitelial irregular foi vista em 50% dos epitélios adjacentes ao CEL deste estudo.

As demais alterações epiteliais foram todas encontradas em menos da metade da amostra, sendo que o hiperchromatismo estava presente em 40% dos casos, as projeções epiteliais em forma de gota em 35%, o aumento do número de figuras de mitose em 30%, a proporção núcleo/citoplasma aumentada em 27,5%, o aumento no tamanho do núcleo e a queratinização prematura em células isoladas foram ambos vistos em 12,5% e as mitoses altas estavam presentes em apenas 2 casos, que representam 5% da amostra.

Duas alterações não foram vistas nesta série de casos: uma arquitetural — a presença de pérolas de queratina em projeções epiteliais; e uma citológica — as figuras de mitose anormais.

Estudo realizado recentemente em desordens potencialmente malignas intraorais revelou que, entre os distúrbios arquiteturais, apenas perda de polaridade das células do estrato basal, projeções em gota e figuras de mitoses em camadas altas do epitélio estão associadas com a resposta clínica do paciente, sendo sua presença realmente determinante no diagnóstico da lesão. Da mesma forma, entre as alterações citológicas, apenas pleomorfismo nuclear, variação do tamanho da célula, pleomorfismo celular, figuras de mitoses atípicas e número e tamanho de nucléolos aumentados foram as únicas características com implicação na resposta clínica⁵². Não é possível saber, até o momento, se esses achados se aplicam à fotocarcinogênese em lábio.

Em seguida, o presente estudo estipulou o grau de displasia epitelial na região de epitélio adjacente ao CEL de acordo com o sistema da OMS — o mais utilizado por patologistas para prever o prognóstico das lesões cancerizáveis —, e também o sistema binário proposto para as displasias intraorais^{45,51}. Essas classificações foram realizadas com o objetivo de observar se o processo de malignização das lesões cancerizáveis é diretamente proporcional ao acúmulo de alterações morfológicas no epitélio.

Os resultados da classificação da displasia epitelial na região de epitélio adjacente ao CEL revelaram que 37,5% das lesões analisadas correspondiam a displasias epiteliais discretas, 45% a displasias epiteliais moderadas e 17,5% a displasias epiteliais intensas. Portanto, a maior parte das displasias observadas nas margens do CEL é de baixa e moderada intensidade, somando mais de 80% dos casos estudados. Apenas uma pequena porção dos casos exibiu um grau elevado de alterações epiteliais.

Quando o sistema binário de graduação foi aplicado, esta característica de pouca alteração tecidual nas margens do CEL ficou ainda mais evidente, pois 90% dos

casos foram graduados como de baixo risco, ou seja, apresentaram menos de 4 alterações arquiteturais e 5 citológicas.

Comparando a classificação de displasias epiteliais entre o sistema da OMS e o sistema binário, observa-se que, neste estudo, todos os casos considerados lesões de alto risco para transformação maligna foram classificados como displasia intensa, demonstrando consistência na comparação entre os dois métodos.

Alguns estudos já demonstraram que casos com baixo grau de displasia epitelial evoluíram para carcinomas invasivos, assim como casos com importante comprometimento tecidual se mantiveram estáveis por muitos anos, confirmando a sugestão de que o grau de displasia epitelial não deve ser utilizado como fator prognosticador^{64,65}. Portanto, a falta de acurácia em prever quais lesões com potencial de malignidade têm maior probabilidade de evoluir para carcinoma epidermoide pode ocorrer não só pelo fato de haver grande subjetividade e falta de concordância entre os observadores que utilizam o sistema da OMS^{47,51}, mas também porque nem sempre as alterações genéticas se refletem em alterações morfológicas.

Dessa forma, alguns autores preconizam que o melhor tratamento para casos de leucoplasia seja a remoção cirúrgica total da lesão⁶⁴. O mesmo já foi sugerido para a QA⁶⁶. Em nossa opinião, o baixo índice de evolução para carcinomas invasivos não justifica o emprego de terapias agressivas e, muitas vezes, mutiladoras da face do paciente.

Mutações no gene *TP53* causadas pela radiação UV constituem um passo inicial na desestabilização do genoma de queratinócitos, que leva ao desenvolvimento de lesões precursoras e também malignas⁶⁷.

Pelo que se conhece do processo de fotocarcinogênese em pele, acredita-se que os queratinócitos-alvos das mutações com assinatura UV sejam células-tronco agrupadas em pacotes, cuja replicação forma os clones de células neoplásicas em carcinomas epidermóides. Há indícios de que esses clones de células-tronco mutadas já estejam presentes mesmo na pele bronzeada exposta cronicamente ao sol⁶⁸. Em seu estado normal, a proteína p53 age como um sensor molecular para os efeitos da

radiação UV em queratinócitos do epitélio danificados por esse tipo de radiação ou queimadura pelo sol⁶⁸.

O anticorpo anti-proteína p53 do clone PAb 240 é considerado específico para detectar proteína p53 mutada, pois seu epítipo de ligação na molécula nativa está oculto e apenas com a modificação conformacional que ocorre após uma mutação é que ele fica disponível para esse anticorpo³⁹. Por essa característica esse anticorpo tem potencial para ser importante marcador biológico.

Neste estudo, 87,5% dos 40 casos analisados exibiram alguma positividade para a proteína p53 mutada, embora em alguns dos cortes apenas o epitélio adjacente mostrou marcação, enquanto o corpo do tumor foi totalmente negativo para a reação.

A mutação do gene *TP53* já foi anteriormente observada em casos de CEL por estudos em biologia molecular, sendo que o primeiro trabalho nesta área revelou alteração genética no *TP53* em 38% dos casos³⁶. Os resultados deste estudo apontam para uma participação bem mais marcante da mutação desse gene na fotocarcinogênese em lábio.

Apenas um número reduzido dos casos exibiu positividade para a proteína p53 mutada exclusivamente nas zonas de ilhotas invasivas (7,5%), o que fala a favor desse ser realmente um evento precoce na fotocarcinogênese em lábio e aponta para um uso prognóstico desse achado nos pacientes com QA.

Dos achados deste trabalho, o mais difícil de explicar é a presença de 17,5% de casos em que a mutação da p53 foi encontrada apenas no epitélio adjacente e as ilhas neoplásicas ficaram livres de imunomarcação. Uma possível explicação é o contínuo acúmulo de alterações genéticas que sofrem as células transformadas. Nesses casos, a exposição contínua a carcinógenos pode levar ao acúmulo de mutações em genes codificadores de DNA polimerases, genes de replicação e reparo do DNA e outros genes fundamentais para manutenção da estabilidade do genoma. Essa instabilidade genômica propicia a propagação de mutações sucessivas, acarretando assim o desenvolvimento do processo neoplásico⁶⁹.

Outros genes já foram relacionados com a carcinogênese induzida por radiação UV, como o oncogene *NRAS*, um gene produtor de proteínas GTPases responsáveis pelo crescimento, diferenciação e sobrevivência da célula. Embora esse gene tenha sido detectado mutado em uma frequência menor do que o *TP53* nas lesões induzidas por UV^{70,71}, novos estudos devem ser feitos para talvez associá-lo com a detecção de p53 mutada no prognóstico das lesões precursoras como QA e queratose actínica.

Existem outros genes, ainda, que foram relacionados à fotocarcinogênese, como, por exemplo, o *GADD45*, que quando alterado pode causar o desenvolvimento de papilomas e carcinomas epidermóides em epiderme de ratos irradiados³⁰ e o gene do retinoblastoma (*RBI*), cuja proteína controla a passagem do ciclo celular da fase G1 para a fase S e encontra-se em pequena quantidade nos casos de hiperplasia epitelial e mostra-se ausente nos graus mais avançados de displasia epitelial oral e carcinoma epidermoide intraoral⁷².

Quando a análise da presença da proteína p53 mutada foi relacionada com a graduação histológica das displasias do epitélio adjacente ao CEL, notou-se uma grande quantidade de casos com pouca displasia, mas com a mutação do gene. Dos casos graduados como displasia discreta 73,3% exibiram positividade para o marcador, assim como 88,8% das displasias graduadas como moderada. Os resultados com relação ao sistema binário de graduação foram semelhantes e até mais expressivos, pois 80% dos casos considerados de baixo risco apresentaram mutação da p53. O índice menor encontrado para os casos graduados como de alto risco (75%) pode ser explicado pelo reduzido número de espécimes neste grupo (apenas 4).

Existem trabalhos que mostram que a mutação do gene *TP53* é um evento tardio no carcinoma epidermoide intraoral e que, na maioria das vezes só ocorre após a invasão estabelecida⁷³. Esse é mais um indício de que as duas formas de carcinoma epidermoide, a intraoral e a labial devem ser vistas e tratadas como entidades diferentes.

Não podemos ignorar os 12,5% de casos que foram totalmente negativos no estudo imuno-histoquímico. Duas hipóteses podem ser consideradas: a primeira é de que existe realmente um grupo de casos de CEL que não envolve a mutação do gene *TP53* e sejam outros os genes envolvidos na carcinogênese; e a segunda é que a mutação ocorrida seja uma das raras que o anticorpo PAb240 não é capaz de evidenciar. Seria interessante analisar estes casos por biologia molecular.

Parte dos casos do presente estudo exibiu proteína p53 mutada no citoplasma das células epiteliais. A proteína p53 pode estar presente no citoplasma das células, pois é produzida nos ribossomos do retículo endoplasmático, porém nessa localização encontra-se inativa. A proteína p53 só é ativa quando presente no núcleo da célula, ligada aos genes promotores responsáveis tanto pelo aprisionamento do ciclo celular quanto pela apoptose. Outros autores como Barket⁷⁴ et al e Pezzella³⁸ et al explicam a presença de coloração imuno-histoquímica citoplasmática do anticorpo PAb 240 com o fato de que a conformação da proteína p53 mutada pode se ligar a uma sequência genética situada no centrossomo do cromossomo 17 e que o centrossomo está localizado na região perinuclear da célula.

Apesar de conhecido, o anticorpo anti-proteína p53 clone PAb 240 ainda é pouco utilizado. Portanto, seria interessante que mais estudos fossem realizados para analisar a expressão desse anticorpo em outras lesões cancerizáveis, como leucoplasias e eritroplasias.

7 CONCLUSÃO

A partir dos achados deste trabalho, foi possível concluir:

- As alterações epiteliais mais frequentemente encontradas no epitélio adjacente ao carcinoma epidermoide de lábio (CEL) nos casos estudados foram: perda de polaridade das células do estrato basal, pleomorfismo nuclear e celular e variação anormal de tamanho do núcleo e da célula;
- A maior parte dos casos foi classificada como displasia discreta e moderada pela graduação da OMS e de baixo risco pela graduação binária;
- Dos casos estudados, 87, 5% exibiram alguma positividade para a proteína p53 mutada, demonstrando a importante participação da mutação do gene *TP53* na fotocarcinogênese em lábio;
- Quando apenas o epitélio adjacente foi considerado, 80% dos casos revelou presença da proteína p53 mutada;

Portanto, o epitélio que margeia o CEL apresenta importante comprometimento genético, o que foi demonstrado pela presença da proteína p53 mutada, apesar de as alterações morfológicas observadas serem reduzidas. Esses resultados sugerem que o uso das classificações morfológicas das displasias epiteliais para cálculo prognóstico e determinação de tratamento nos casos de queilite actínica pode não ser adequado.

REFERÊNCIAS^b

1. Katchburian E Arana-Chaves VE. Histologia e embriologia oral: texto-atlas-correlações clínicas. 2a ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. 372p.

2. Fabbrocini G, Russo N, Pagliuca MC, Delfino M, Staibano S, Molea G, Mancini A, Virgili A, Valente MG, Bratina G, Galbiati S, Marzaduri A, Orlandi K, Bottoni U, Calvieri S, Di Landro A, Cainelli T, Delfino S, De Rosa G. p53, cyclin-D1, PCNA, AgNOR expression in squamous cell cancer of the lip: a multicenter study. *Photodermatol Photoimmunol Photomed*. 2000 Aug;16(4):172-7.

3. Wikipédia, a enciclopédia livre. [citado em 29 ago 2011]. Disponível em <http://pt.wikipedia.org/wiki/Ozonosfera>

4. Okuno E, Vilela MAC. Radiação ultravioleta: características e efeitos. 1ª ed. São Paulo: Editora Livraria da Física; 2005. 78p.

5. O que é a camada de ozônio? World Wildlife Fund. [Citado em 19 jul 2011]. Disponível em: http://www.wwf.org.br/informacoes/questoes_ambientais/camada_ozonio

6. Hasson O. Squamous cell carcinoma of the lower lip. *J Oral Maxillofac Surg*. 2008 Jun;66(6):1259-62.

7. Batista AC, Costa NL, Oton-Leite AF, Mendonça EF, Alencar RCG, 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):74-9.

8. 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.

^b De acordo com Estilo Vancouver.

9. Chidzonga MM. Lip cancer in Zimbabwe. Report of 14 cases. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2005 Mar;34(2):149-51.
10. 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.
11. 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.
12. Souza RL, Silva-Fonseca T, Carvalho-Oliveira-Santos C, Batista-Corrêa GT, Guimarães-Santos FB, Cardoso CM, Sant'ana-Haikal D, Sena-Guimarães AL, Batista-De Paula AM. Lip squamous cell carcinoma in a Brazilian population: epidemiological study and clinicopathological associations. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2011 Jan 3. [Epub ahead of print]
13. de Visscher JG, Bouwes Bavinck JN, van der Waal I. Squamous cell carcinoma of the lower lip in renal-transplant recipients. Report of six cases. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1997 Apr;26(2):120-3.
14. Knott A, Reuschlein K, Lucius R, Stäb F, Wenck H, Gallinat S. Deregulation of versican and elastin binding protein in solar elastosis. *Biogerontol*. 2009 Apr;10(2):181-90.
15. 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.
16. Sena MF, Costa APS, Nóbrega AGS, Costa ALL, Ferreira MAF. Avaliação dos fatores prognósticos relacionados ao câncer de lábio: revisão sistemática. *Rev Bras Cancerol*. 2010 Aug;56(1):93-102.
17. Batista AC, Costa NL, Oton-Leite AF, Mendonça EF, Alencar RCG, 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 Oct;109(3):74-9.

18. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. *Patologia Oral e Maxilofacial*. 3^a ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2009. p. 406-8.
19. Patrascu 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 Mar;47(2): 147–53.
20. Cavalcante ASR, Anbinder AL, Carvalho YR. Actinic Cheilitis: Clinical and Histological Features. *J Oral Maxillofac Surg*. 2008 Mar;66(3): 498-503.
21. Kaugars EG, Pillion T, Svirsky JA, Page DG, Burns JC, Abbey LM. Actinic cheilitis : A review of 152 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1999 Aug;88(2):181-6.
22. Main JH, Pavone M. Actinic cheilitis and carcinoma of the lip. *J Can Dent Assoc*. 1994 Feb;60(2):113-6.
23. Sellheyer K. Pathogenesis of solar elastosis: synthesis or degradation? *J Cutan Pathol*. 2003 Feb;30(2):123-7.
24. Cataldo E, Doku HC. Solar cheilitis. *J Dermatol Surg Oncol*. 1991 Dec;7(12):989-95.
25. Warnakulasuriya KA, Johnson NW. Expression of p53 mutant nuclear phosphoprotein in oral carcinoma and potentially malignant oral lesions. *J Oral Pathol Med*, 1992 Oct;21(9):404-8.
26. Terezhalmay GT, Naylor GD. Actinic cheilitis. *J Indiana Dent Assoc*. 1993 Aug;72(4):12-5.
27. Hussein MR. Ultraviolet radiation and skin cancer: molecular mechanisms. *J Cutan Pathol*. 2005 Mar;32(3):191–205.
28. United States Environmental Protection Agency.[citado em 06 jun. 2010]. Disponível em <http://www.epa.gov/sunwise/doc/healtheffects.pdf>

29. de Laat A, van Tilburg M, van der Leun JC, van Vloten WA, de Gruijl FR. Cell cycle effects and concomitant p53 expression in hairless murine skin after longwave UVA (365 nm) irradiation: a comparison with UVB irradiation. *Photochem Photobiol.* 1997 Apr;65(4):730–5.
30. Hildesheim J, Bulavin DV, Anver MR, Alvord WG, Hollander MC, Vardanian L, Fornace AJ Jr. Gadd45a protects against UV irradiation-induced skin tumors, and promotes apoptosis and stress signaling via MAPK and p53. *Cancer Res.* 2002 Dec;62(24):7305-15.
31. Reibel J. Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2003;14(1):47-62.
32. el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, Lin D, Mercer WE, Kinzler KW, Vogelstein B. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell.* 1993 Nov;75(4):817-25.
33. 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.
34. Benjamin CL, Ananthaswamy HN. p53 and the pathogenesis of skin cancer. *Toxicol Appl Pharmacol.* 2007 Nov;224(3):241–8.
35. Benjamin CL, Ullrich SE, Kripke ML, Ananthaswamy HN. p53 Tumor Suppressor Gene: A Critical Molecular Target for UV Induction and Prevention of Skin Cancer. *Photochem Photobiol.* 2008 Feb;84(1):55–62.
36. Ostwald C, Gogacz P, Hillmann T, Schweder J, Gundlach K, Kundt G, Barten M. p53 mutational spectra are different between squamous-cell carcinomas of the lip and the oral cavity. *Int J Cancer.* 2000 Oct;88(1):82-6.
37. Danks MK, Whipple DO, McPake CR, Lu D, Harris LC. Differences in epitope accessibility of p53 monoclonal antibodies suggest at least three conformations or states of protein binding of p53 protein in human tumor cell lines. *Cell Death Differ.* 1998 Aug;5(8):678-86.

38. Pezzella F, Micklem K, Turley H, Pulford K, Jones M, Kocialkowski S, Delia D, Aiello A, Bicknell R, Smith K, et al. Antibody for detecting p53 protein by immunohistochemistry in normal tissues. *J Clin Pathol.* 1994 Jul;47(7):592-6.
39. Gannon JV, Greaves R, Iggo R, Lane DP. Activating mutations in p53 produce a common conformational effect. A monoclonal antibody specific for the mutant form. *EMBO J.* 1990 May;9(5):1595-602.
40. Stephen CW, Lane DP. Mutant conformation of p53. Precise epitope mapping using a filamentous phage epitope library. *J Mol Biol.* 1992 Jun;225(3):577-83.
41. 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.
42. 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.
43. Cruz IB, Snijders PJF, Meijer CJ, Braakhuis BJ, Snow GB, Walboomers JM, Van Der Waal I. p53 expression above the basal cell layer in Oral mucosa is an early event of malignant transformation and has predictive value for developing oral squamous cell carcinoma. *J Pathol.* 1998 Apr;184(4):360-8.
44. Cruz IB, Napier SS, van der Waal I, Snijders PJF, Walboomers JMM, Lamey PJ, Cowan CG, Gregg TA, Maxwell P, Meijer CJLM. Suprabasal p53 immunoexpression is strongly associated with high grade dysplasia and risk for malignant transformation in potentially malignant oral lesions from Northern Ireland. *J Clin Pathol.* 2002 Feb;55(2):98-104.
45. Barnes L, Eveson JW, Reicgart P, Sidransky D (Eds): World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. IARC Press: Lyon 2005. 430 p.
46. Lumerman H, Freedman P, Kerpel S. Oral epithelial dysplasia and the development of invasive squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1995 Mar;79(3):321-9.

47. Warnakulasuriya S. Histological grading of oral epithelial dysplasia: revisited. *J Pathol.* 2001 Jul;194(3):294-7.
48. Kramer IR, Lucas RB, Pindborg JJ, Sobin LH. Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1978 Oct;46(4):518-39.
49. Bánóczy J, Csiba A. Occurrence of epithelial dysplasia in oral leukoplakia. Analysis and follow-up study of 12 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1976 Dec;42(6):766-74.
50. 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.
51. Kujan O, Oliver RJ, Khattab A, Roberts SA, Thakker N, Sloan P. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. *Oral Oncol.* 2006 Nov;42(10):987-93.
52. Kujan O, Oliver RJ, Khattab A, 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;43:224–31.
53. 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.
54. Schepman KP, van der Meij EH, Smeele LE, van der Waal I. Malignant transformation of oral leukoplakia: a follow-up study of a hospital-based population of 166 patients with oral leukoplakia from The Netherlands. *Oral Oncol.* 1998 Jul;34:270–5.
55. Kanjilal S, Strom SS, Clayman GL, Weber RS, el-Naggar AK, Kapur V, Cummings KK, Hill LA, Spitz MR, Kripke ML, et al. p53 mutations in nonmelanoma skin cancer of the head and neck: molecular evidence for field cancerization. *Cancer Res.* 1995 Aug;55(16):3604-9.

56. Instituto Nacional do Câncer. [citado em 28 agost 2011]. Disponível em <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/>
57. Ackerman AB, Mones JM. Solar (actinic) keratosis is squamous cell carcinoma. *Br J Dermatol*. 2006 Jul;155(1):9-22.
58. Markopoulos A, Albanidou-Farmaki E, Kayavis I. Actinic cheilitis: clinical and pathologic characteristics in 65 cases. *Oral Dis*. 2004 Jul;10(4):212-6.
59. Martínez A, Brthauer U, Rojas IG, Spencer M, Mucienes F, Borlando J, Rudolph MI. Expression of apoptotic and cell proliferation regulatory proteins in actinic cheilitis. *J OralPathol Med*. 2005 May;34(5):257-62.
60. Xavier FC, Takiya CM, Reis SR, Ramalho LM. p63 Immunoexpression in lip carcinogenesis. *J Mol Histol*. 2009 Apr;40(2):131-7.
61. Pindborg JJ, Daftary DK, Mehta FS. A follow-up study of sixty-one oral dysplastic precancerous lesions in Indian villagers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1977 Mar;43(3):383-90.
62. Gupta PC, Mehta FS, Daftary DK, Pindborg JJ, Bohnsle RB, Jalnawalla PN, et al. Incidence rates of oral câncer and natural history of oral precancerous lesions in a 10-year follow-up study of Indian villagers. *Community Dent. Oral Epidemiol*. 1980;8(6):283-333.
63. Martins MT. Queilite actínica: avaliação das alterações teciduais e graduação histológica em 458 casos [tese de livre docência]. São Paulo. Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2011.
64. Silverman S Jr, Gorsky M, Lozada F. Oral leukoplakia and malignant transformation. A follow-up study of 257 patients. *Cancer*. 1984 Feb 1;53(3):563-8.
65. Lee JJ, Hong WK, Hittelman WN, Mao L, Lotan R, Shin DM, Benner SE, Xu XC, Lee JS, Papadimitrakopoulou VM, Geyer C, Perez C, Martin JW, El-Naggar AK, Lippman SM. Predicting cancer development in oral leukoplakia: ten years of translational research. *Clin Cancer Res*. 2000 May;6(5):1702-10.

66. Menta Simonsen Nico M, Rivitti EA, Lourenço SV. Actinic cheilitis: histologic study of the entire vermilion and comparison with previous biopsy. *J Cutan Pathol*. 2007 Apr;34(4):309-14.
67. Warnakulasuriya KA, Tavassoli M, Johnson NW. Relationship of p53 overexpression to other cell cycle regulatory proteins in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 1998 Sep;27(8):376-81.
68. Jonason AS, Kunala S, Price GJ, Restifo RJ, Spinelli HM, Persing JA, Leffell DJ, Tarone RE, Brash DE. Frequent clones of p53-mutated keratinocytes in normal human skin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1996 Nov;93(24):14025-9.
69. Loeb LA. Mutator phenotype in cancer: origin and consequences. *Semin Cancer Biol*. 2010 Oct;20(5):279-80.
70. 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 Jul;53(13):2961-4.
71. Pierceall WE, Kripke ML, Ananthaswamy HN. N-ras mutation in ultraviolet radiation-induced murine skin cancers. *Cancer Res*. 1992 Jul 15;52(14):3946-51.
72. Soni S, Kaur J, Kumar A, Chakravarti N, Mathur M, Bahadur S, Shukla NK, Deo SV, Ralhan R. 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 Jul;68(4-6):314-25.
73. Shahnavaaz SA, Regezi JA, Bradley G, Dubé ID, Jordan RC. p53 gene mutations in sequential oral epithelial dysplasias and squamous cell carcinomas. *J Pathol*. 2000 Mar;190(4):417-22.
74. Baker SJ, Markowitz S, Fearon ER, Willson JK, Vogelstein B. Suppression of human colorectal carcinoma cell growth by wild-type p53. *Science*. 1990 Aug;249(4971):912-5.

ANEXO A – Parecer do comitê de ética em pesquisa

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

PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo Nº 206/2010
CAAE 0028.0.017.000-10

O grupo de trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa **APROVOU** o protocolo de pesquisa *"Avaliação das atipias epiteliais, graduação das displasias e presença de proteína p53 mutada no epitélio adjacente a carcinomas de lábio"*, de responsabilidade do(a) Pesquisador(a) Gabriela Sanchez Nagata sob orientação da 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 a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 09 de dezembro de 2010.

Profa. Dra. Marcia Turolla Wanderley
Coordenadora do CEP-FOUSP