THALITA SANTANA CONCEIÇÃO

**Lesões melanocíticas focais da mucosa oral: estudo epidemiológico, morfológico e imuno-
histoquímico**

São Paulo

2019

THALITA SANTANA CONCEIÇÃO

Lesões melanocíticas focais da mucosa oral: estudo epidemiológico, morfológico e imuno-histoquímico

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, pelo Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas para obter o título de Doutora em Ciências.

Área de concentração: Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes Especiais.

Orientadora: Profa. Dra. Marília Trierveiler Martins

São Paulo

2019

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

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

Conceição, Thalita Santana.

Lesões melanocíticas focais da mucosa oral: estudo epidemiológico, morfológico e imunohistoquímico / Thalita Santana Conceição; orientadora Marília Trierveiler Martins -- São Paulo, 2019.

111 p. : fig., tab., graf. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) – Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas.
Área de Concentração: Patologia Oral e Maxilofacial e Pacientes Especiais –
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida

1. Lesões melanocíticas. 2. Mácula melanótica. 3. Nevo melanocítico. 4. Melanoma. 5. Lentigo. 6. Imunohistoquímica. I. Martins, Marília Trierveiler. II. Título.

Conceição TS. Lesões melanocíticas focais da mucosa oral: estudo epidemiológico, morfológico e imuno-histoquímico. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutora em Ciências.

Aprovado em: / /2020

Banca examinadora

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

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

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

Dedico este trabalho aos meus pais, Antônio Henrique Santos Conceição e Osmalinda de Sousa Santana, que foram meus maiores incentivadores e não mediram esforços para que eu alcançasse meus objetivos. Muito obrigada pelo amor incondicional e suporte durante todos esses anos.

AGRADECIMENTOS

Dedico um agradecimento especial à minha orientadora Profa. Dra. Marília Trierveiler Martins, por ser um exemplo de pesquisadora e docente no qual eu quero me espelhar. Você foi muito mais que uma mentora para mim e me sinto sortuda por ter sido orientada por uma pessoa tão inteligente, ética, competente e preocupada com o desenvolvimento dos seus alunos. Agradeço por todas as oportunidades que você me deu e por todos os ensinamentos. Muito obrigada!

Às minhas supervisoras de iniciação científica, mestrado e doutorado sanduíche, Profa. Dra. Maria Carmen Fontoura Nogueira da Cruz, Profa. Dra. Roseana de Almeida Freitas e Profa. Dra. Alena Skálová, respectivamente. Agradeço por todo o conhecimento compartilhado comigo e os aprendizados adquiridos, que despertaram e lapidaram meu interesse pela pesquisa e docência.

Ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, área de concentração em Patologia Oral e Maxilofacial, e todos os seus docentes, que me receberam de braços abertos na USP e contribuíram muito para a minha formação pessoal e profissional.

Aos colaboradores e funcionários do Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, em especial Adriana, Juvani e Elisa, que me ensinaram muito sobre as técnicas de laboratório e me ajudaram sempre que precisei, colaborando para a existência desta e de outras pesquisas que desenvolvi. Agradeço também ao Vinícius, que estava sempre disposto a resolver todas as nossas dúvidas e problemas burocráticos.

Aos professores Dr. Bruno Augusto Benevenuto de Andrade, Dra. Érika Martins Pereira e Dra. Gabriela Sanchez Nagata, pelos comentários sugeridos no exame de pré-defesa deste trabalho. Agradeço também ao professor Dr. Clóvis Antônio Lopes Pinto, pelas considerações feitas no exame de qualificação deste trabalho.

À toda a minha família, que mesmo distante sempre me apoiou e torceu por mim. Agradeço em especial a todos que foram minha família fora de casa, tanto em Natal durante o mestrado, quando em São Paulo durante o doutorado. Cito aqui os amigos Jefferson Tenório, Marcos Custódio, Natália Andrade, João Nunes, Leorik Pereira e Mara Luana. Vocês são grandes amigos que eu levarei para sempre. Sem vocês essa jornada teria sido muito mais difícil. Muito obrigada!

Aos amigos que fiz em Natal durante o mestrado e que contribuíram muito para o meu crescimento profissional e que fazem muita falta no dia-a-dia: Amanda Gonzaga, Angélica Lopes, Hugo Neto, Eduardo Monroy, Luiz Arthur Barbosa, Marianna Serpa, Maria Luiza Lopes e Melka

Sá. Muito obrigada pela amizade e companheirismo, e pelo conhecimento compartilhado, mesmo que à distância!

A todos os amigos do programa de Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas, em especial a Aline Queiroz que contribuiu de forma valiosa para a realização deste estudo.

Agradeço também aos amigos Cibele Pelissari, Anaeliza Figueiredo, Bruno Matuck, Emília Aguiar, Flávia Prado, Gabriela Reganin, Guilherme Sanches, Ivan Neto, Juliana Mota, Juliana Costa, Letícia Tonin, Maria Fernanda Bartholo, Mariana Bergamini, Nathália Duarte, Paulo Pina e Rayza Rechetnicou. Obrigada por tornarem meus dias mais leves e compartilharem muito conhecimento, além de momentos de descontração durante esse período!

Aos amigos que compartilharam comigo a experiência de realizar um estágio de doutorado sanduíche na República Tcheca: Camila Araújo, Carlos Salamanca, Marco Túlio Mendes e Vinícius Kothe. Muito obrigada pela amizade e por tornarem o período no exterior muito mais divertido!

Às amigas mais antigas que eu tenho, Mariana Bonfim, Mayra Botelho e Paula Medeiros, que mesmo às vezes distantes sempre estiveram presentes nos momentos mais importantes. Agradeço muito por ter vocês na minha vida!

Ao Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq) pelo apoio financeiro que possibilitou a realização desta pesquisa e à Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior (CAPES) pela bolsa de doutorado sanduíche no exterior (código de financiamento 001), que contribuiu imensamente para minha formação profissional.

“A viagem não acaba nunca. Só os viajantes acabam. E mesmo estes podem prolongar-se em memória, em lembrança, em narrativa. Quando o visitante sentou na areia da praia e disse: ‘Não há mais o que ver’, sabia que não era assim. O fim de uma viagem é apenas o começo de outra. É preciso ver o que não foi visto, ver outra vez o que se viu já, ver na primavera o que se vira no verão, ver de dia o que se viu de noite, com o sol onde primeiramente a chuva caía, ver a seara verde, o fruto maduro, a pedra que mudou de lugar, a sombra que aqui não estava. É preciso voltar aos passos que foram dados, para repetir e para traçar caminhos novos ao lado deles. É preciso recomeçar a viagem. Sempre. O viajante volta já.”

José Saramago (in Viagem a Portugal, p. 387)

RESUMO

Conceição TS. Lesões melanocíticas focais da mucosa oral: estudo epidemiológico, morfológico e imuno-histoquímico [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2019. Versão corrigida

Lesões pigmentadas na cavidade oral podem variar desde alterações fisiológicas a manifestações de doenças sistêmicas e neoplasias malignas. A identificação de lesões melanocíticas intraorais pode constituir um dilema diagnóstico para o cirurgião-dentista. Este trabalho teve como objetivo compilar as lesões focais de origem melanocítica diagnosticadas no Serviço de Patológica Cirúrgica da Faculdade de Odontologia de Universidade de São Paulo, no período de 2001 a 2019, e analisar as suas respectivas características clínicas e histopatológicas. Além disso, foram realizados estudos de imuno-histoquímica para as proteínas p16, CDK4 e PTEN, com o propósito de comparar suas expressões em nevos melanocíticos e melanomas. Para comparação entre as variáveis foram utilizados os testes estatísticos adequados e valores de $p < 0,05$ foram considerados significantes. Foram identificadas 341 lesões melanocíticas dentre 64.695 amostras recebidas para análise histopatológica no serviço. Destes casos 191 foram diagnosticados como mácula melanótica (0,3%); 112 nevos melanocíticos (0,17%); 14 lentigos simples de mucosa (0,02%); 12 melanomas orais (0,02%); nove lentigos actínicos (0,01%) e um melanoacantoma (0,001%). Em geral, todas as lesões estudadas foram mais comuns em mulheres ($n=218$; 65,5%) de cor da pele branca ($n=217$; 74%). O principal aspecto clínico relado foi de mancha ($n=124$; 67,6%), com coloração enegrecida/acastanhada ($n=247$; 80,7%). As lesões melanocíticas ocorreram principalmente em vermelhão de lábio ($n=83$; 25,6%), seguido por palato ($n=74$; 22,8%), mucosa jugal ($n=56$; 17,3%), mucosa labial ($n=46$; 14,2%) e gengiva ($n=30$; 9,2%). Os casos de mácula melanótica foram mais comuns em vermelhão de lábio, enquanto os nevos melanocíticos ocorreram mais em palato. A idade dos pacientes foi maior em pacientes com melanoma ($p = 0,002$) e esse casos apresentaram menor média de duração até o momento do diagnóstico (15 meses) ($p = 0,02$). A maioria das lesões era pequena e apenas os melanomas orais apresentaram um tamanho maior quando comparados às outras lesões ($p < 0,0001$). O estudo morfológico dos casos confirmou as características histopatológicas descritas para cada lesão. As máculas melanóticas apresentavam

depósito de pigmento melânico ao longo da camada basal do epitélio, enquanto os lentigos simples de mucosa exibiam aumento do número de melanócitos ao longo da camada basal e cristas epiteliais alongadas; os lentigos actínicos exibiam as mesmas características, além de elastose solar. O caso de melanoacantoma exibia acantose epitelial e presença de melanócitos dendríticos na camada espinhosa do epitélio. Os nevos melanocíticos consistiam em uma proliferação de células névicas de morfologia epitelióide, ovoide ou fusiforme, com quantidade variada de melanina. Foram observados 50 (44,6%) nevos intramucosos, 27 (24,1%) nevos compostos, 23 (20,5%) nevos azuis, seis nevos azuis combinados (5,4%), cinco (4,5%) nevos juncionais e um (0,9%) nevo displásico. Os melanomas em sua maioria exibiam proliferação de melanócitos atípicos em região juncional do epitélio e também na profundidade do tecido conjuntivo; apenas um caso foi classificado com melanoma *in situ*. Para o estudo imuno-histoquímico, as proteínas CDK4, p16 e PTEN foram avaliadas de forma semi-quantitativa em 42 casos de nevos melanocíticos e 5 casos de melanoma. CDK4 exibiu alta expressão nuclear nos casos de nevos melanocíticos e melanomas. Já p16 apresentou baixa expressão nuclear nos casos de nevos melanocíticos orais, e moderada expressão em melanomas orais. PTEN apresentou alta expressão citoplasmática em todos os casos estudados. Conclui-se que as lesões melanocíticas focais mais comuns em mucosa oral são máculas melanóticas e nevos melanocíticos. Lentigo simples de mucosa, lentigo actínico, melanoacantoma e melanoma são lesões raras na mucosa oral. As proteínas CDK4 e PTEN apresentam expressão imuno-histoquímica elevada em nevos melanocíticos e melanomas orais. A proteína p16 apresenta baixa expressão imuno-histoquímica em nevos melanocíticos orais e expressão moderada em melanomas orais.

Palavras-chave: Lesões melanocíticas. Mácula melanótica. Nevo melanocítico. Melanoma. Lentigo simples. Lentigo actínico. Imuno-histoquímica.

ABSTRACT

Conceição TS. Focal melanocytic lesions of the oral mucosa: epidemiological, morphological and immunohistochemical study [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2019. Versão corrigida

Pigmented lesions in the oral cavity may range from physiological changes to manifestations of systemic diseases and malignant neoplasms. The identification of intraoral melanocytic lesions may constitute a diagnostic dilemma for the dentist. This study aimed to compile the focal lesions of melanocytic origin diagnosed at the Service of Surgical Pathology of the School of Dentistry of the University of São Paulo, from 2001 to 2019, and to analyze their respective clinical and histopathological characteristics. In addition, immunohistochemical studies for p16, CDK4 and PTEN proteins were performed to compare their expression in melanocytic nevi and melanomas. To compare the variables, appropriate statistical tests were used and values of $p < 0.05$ were considered significant. We identified 341 lesions among 64,695 samples received for histopathological analysis at this service. Of these cases, 191 were diagnosed as melanotic macule (0.3%); 112 melanocytic nevi (0.17%); 14 mucosal lentigines simplex (0.02%); 12 oral melanomas (0.02%); nine actinic lentigines (0.01%) and one melanoacanthoma (0.001%). In general, all lesions studied were more common in women ($n=218$; 65.5%) with white skin color ($n=217$; 74%). The main reported clinical aspect was macular ($n=124$; 67.6%), with blackish/brownish color ($n=247$; 80.7%). Melanocytic lesions occurred mainly in lip vermilion ($n=83$; 25.6%), followed by palate ($n=74$; 22.8%), buccal mucosa ($n=56$; 17.3%), lip mucosa ($n=46$; 14.2%) and gingiva ($n=30$; 9.2%). Cases of melanotic macule were more common in lip vermilion, while melanocytic nevi occurred more in the palate. The age of the patients was higher in melanoma patients ($p = 0.002$) and these cases had a shorter average duration until the time of diagnosis (15 months) ($p = 0.02$). Most lesions were small and only oral melanomas were larger in size when compared to other lesions ($p < 0.0001$). The morphological study of the cases confirmed the histopathological characteristics described for each lesion. Melanotic macules showed deposition of melanic pigment along the basal layer of the epithelium, while mucosal lentigines simplex showed increased number

of melanocytes along the basal layer and elongated epithelial ridges; actinic lentigines exhibited the same characteristics, as well as solar elastosis. The case of melanoacanthoma exhibited epithelial acanthosis and the presence of dendritic melanocytes in the spinous layer of the epithelium. Melanocytic nevi consisted of a proliferation of nevus cells of epithelioid, ovoid or fusiform morphology with varying amounts of melanin. We observed 50 (44.6%) intramucosal nevi, 27 (24.1%) compound nevi, 23 (20.5%) blue nevi, six combined blue nevi (5.4%), five (4.5%) junctional nevi and one (0.9%) dysplastic nevus. Most melanomas exhibited proliferation of atypical melanocytes in the junctional region of the epithelium and also in the connective tissue depth; only one case was classified as melanoma *in situ*. For the immunohistochemical study, CDK4, p16 and PTEN proteins were evaluated semi-quantitatively in 42 cases of melanocytic nevi and 5 cases of melanoma. CDK4 exhibited high nuclear expression in cases of melanocytic nevi and melanomas. On the other hand, p16 showed low nuclear expression in cases of oral melanocytic nevi, and moderate expression in oral melanomas. PTEN showed high cytoplasmic expression in all cases studied. In conclusion, we observed that the most common focal melanocytic lesions in the oral mucosa are melanotic macules and melanocytic nevi. Mucosal lentigo simplex, actinic lentigo, melanoacanthoma, and melanoma are rare lesions in the oral mucosa. CDK4 and PTEN proteins show high immunohistochemical expression in melanocytic nevi and oral melanomas. Whereas p16 protein shows low immunohistochemical expression in oral melanocytic nevi and moderate expression in oral melanomas.

Keywords: Melanocytic lesions. Melanotic macule. Melanocytic nevus. Melanoma. Lentigo simplex. Actinic lentigo. Immunohistochemistry.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Figura 2.1 -	Esquema ilustrando o processo de produção da eumelanina e feomelanina a partir da Tirosina.....	27
Gráfico 5.1 -	Box-plot mostrando a idade mínima e máxima e a média de idade entre as lesões melanocíticas estudadas.	64
Gráfico 5.2 -	Box-plot mostrando a média e desvio padrão do tamanho das lesões melanocíticas estudadas.	64
Gráfico 5.3 -	Box-plot da média e desvio padrão da duração das lesões melanocíticas estudadas.	65
Figura 5.1 –	Aspectos morfológicos de mácula melanótica, lentigo simples de mucosa e lentigo solar. a) Fotomicrografia em menor aumento exibindo mácula melanótica labial associada a queilite actínica (100x); (b) Detalhe de mácula melanótica labial exibindo pigmentação melânica na camada basal (400x); (c) Fotomicrografia em menor aumento mostrando lentigo simples de mucosa exibindo alongamento das cristas epiteliais (100x); (d) Lentigo simples de mucosa em maior detalhe, exibindo hiperplasia melanocítica ao longo da camada basal (400x). (e) Fotomicrografia em menor aumento exibindo lentigo actínico, com alongamento das cristas epiteliais e área de elastose solar (100X). (f) Maior detalhe de lentigo actínico exibindo hiperplasia melanocítica ao longo da camada basal (400x). Hematoxilina e eosina.	68
Figura 5.2 –	Aspectos morfológicos de nevos melanocíticos. a) Fotomicrografia em menor aumento exibindo nevo junctional oral (100x); (b) Detalhe de nevo junctional oral exibindo proliferação de células névicas em tecas restritas à camada basal do epitélio (400x); (c) Fotomicrografia em menor aumento mostrando nevo composto oral (100x); (d) Detalhe de nevo composto oral exibindo proliferação de células névicas em camada basal de epitélio e em tecido conjuntivo (400x). (e) Fotomicrografia em menor aumento exibindo nevo intramucoso oral (100X). (f) Detalhe de nevo intramucoso oral exibindo proliferação de células névicas restritas ao tecido conjuntivo (400x). Hematoxilina e eosina.	71
Figura 5.3 –	Aspectos morfológicos de nevos azuis. (a) Fotomicrografia em menor aumento exibindo nevo azul oral (100x); (b) Detalhe de nevo azul oral exibindo proliferação de células névicas fusiformes altamente pigmentadas (400x); (c) Fotomicrografia em menor aumento exibindo nevo azul combinado com nevo intramucoso (100x); (d) Detalhe de nevo azul combinado com nevo intramucoso exibindo proliferação de células névicas ovóides e fusiformes, com pigmento melânico em região mais profunda (400x). Hematoxilina e eosina.	72

- Figura 5.4 – Aspectos morfológicos do nevo melanocítico composto displásico (a) Fotomicrografia em menor aumento exibindo nevo melanocítico composto displásico em mucosa oral (100x); (b) Detalhe de nevo melanocítico composto displásico proliferação lentiginosa de células névicas atípicas (400x). Hematoxilina e eosina.73
- Figura 5.5 – Aspectos morfológicos do melanoma oral. (a) Fotomicrografia em menor aumento exibindo melanoma em mucosa oral (100x); (b) Detalhe de melanoma oral, exibindo melanócitos atípicos altamente pigmentados proliferando em epitélio e tecido conjuntivo (HE/400x); (c) Fotomicrografia em menor aumento de melanoma em mucosa oral exibindo proliferação em lençol de melanócitos atípicos (100x); (d) Detalhe de melanoma em mucosa oral exibindo melanócitos atípicos epitelioides, com poucas áreas de deposição melânica (400x); Hematoxilina e eosina.75
- Gráfico 5.4 - Distribuição dos padrões de arranjo celular em cada subtipo de nevo melanocítico oral, referente aos casos diagnosticados no Serviço de Patologia Cirúrgica da FOUSP no período de janeiro de 2001 a setembro de 2019.....77
- Gráfico 5.5 - Distribuição dos subtipos de nevos melanocíticos orais de acordo com sua localização anatômica, referente aos casos diagnosticados no Serviço de Patologia Cirúrgica da FOUSP no período de janeiro de 2001 a setembro de 2019.....78
- Gráfico 5.6 - Distribuição dos tipos de células névicas presentes nos nevos melanocíticos orais diagnosticados no Serviço de Patologia Cirúrgica da FOUSP no período de janeiro de 2001 a setembro de 2019.....78
- Gráfico 5.7 - Distribuição da porcentagem de pigmento melânico presente nos nevos melanocíticos orais diagnosticados no Serviço de Patologia Cirúrgica da FOUSP no período de janeiro de 2001 a setembro de 2019.....79
- Figura 5.6 – Fotomicrografias com exemplos da imunoexpressão dos marcadores estudados em nevos melanocíticos orais. (a-f) DAB, (g,h) Permanent red®. (a) CDK4, imunoexpressão nuclear e citoplasmática (100x); (b) CDK4 (400x); (c) p16, imunoexpressão nuclear (100x); (d) p16 (400x) (e) PTEN, imunoexpressão nuclear e citoplasmática (100x); (f) PTEN (400x); (g) PTEN, imunoexpressão citoplasmática (100x); (h) PTEN (400x).....82
- Figura 5.7 – Fotomicrografias com exemplos da imunoexpressão dos marcadores estudados em melanomas orais. (a-e) DAB, (f) Permanent red®. (a,b) CDK4, imunoexpressão nuclear e citoplasmática (400x); (c,d) p16, imunoexpressão nuclear e citoplasmática (400x); (e) PTEN, imunoexpressão nuclear e citoplasmática (400x); (f) PTEN, imunoexpressão citoplasmática (400x);83

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 -	Características clínicas e demográficos dos casos de mácula melanótica oral diagnosticados no Serviço de Patologia Cirúrgica da FOU SP no período de janeiro de 2001 a setembro de 2019.....	53
Tabela 5.2-	Características clínicas e demográficos dos casos de nevos melanocíticos orais diagnosticados no Serviço de Patologia Cirúrgica da FOU SP no período de janeiro de 2001 a setembro de 2019.....	55
Tabela 5.3-	Características clínicas e demográficos dos casos de lentigo simples de mucosa diagnosticados no Serviço de Patologia Cirúrgica da FOU SP no período de janeiro de 2001 a setembro de 2019.....	57
Tabela 5.4-	Características clínicas e demográficos dos casos de lentigo solar diagnosticados no Serviço de Patologia Cirúrgica da FOU SP no período de janeiro de 2001 a setembro de 2019.....	59
Tabela 5.5-	Características clínicas e demográficos dos casos de melanoma diagnosticados no Serviço de Patologia Cirúrgica da FOU SP no período de janeiro de 2001 a setembro de 2019.....	61
Tabela 5.6-	Comparação das variáveis clínicas e demográficas categóricas entre as lesões estudadas.....	63
Tabela 5.7-	Comparação das variáveis clínicas e demográficas numéricas entre as lesões estudadas.....	66
Tabela 5.8-	Características morfológicas dos casos de nevos melanocíticos diagnosticados no Serviço de Patologia Cirúrgica da FOU SP no período de janeiro de 2001 a setembro de 2019.....	76
Tabela 5.9-	Comparação das variáveis clínicas e demográficas numéricas entre os subtipos de nevos melanocíticos diagnosticados no Serviço de Patologia Cirúrgica da FOU SP no período de janeiro de 2001 a setembro de 2019.	79
Tabela 5.10-	Comparação da expressão imuno-histoquímica de PTEN, CDK4 e p16 entre nevos melanocíticos e melanoma orais diagnosticados no Serviço de Patologia Cirúrgica da FOU SP no período de janeiro de 2001 a setembro de 2019.	81
Tabela 5.11-	Expressão imuno-histoquímica de PTEN, CDK4 e p16 em nevos melanocíticos e melanoma orais diagnosticados no Serviço de Patologia Cirúrgica da FOU SP no período de janeiro de 2001 a setembro de 2019.....	81

LISTA DE SIGLAS E ABREVIATURAS

Akt	Proteína quinase B
BRAF	Proteína quinase do tipo RAF
CDK4	Ciclina dependente de quinase 4
CDKI	Inibidor de ciclinas dependentes de quinase
CDKN2A	Inibidor de ciclina dependente de quinase 2A
c-KIT	Proteína tirosina quinase KIT
FGFR3	Receptor 3 do fator de crescimento de fibroblasto
FOUSP	Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
GNAQ	Subunidade alpha da proteína G(q)
HE	Hematoxilina e eosina
HRAS	Oncogene da família <i>Ras</i>
KRAS	Oncogene da família <i>Ras</i>
MAPK	Proteínas quinases ativadas por mitógenos
mTOR	Proteína alvo da rapamicina em mamíferos
NF1	Neurofibromina 1
NRAS	Oncogene da família <i>Ras</i>
p15	Proteína p15
p16	Proteína p16
p18	Proteína p18
p19	Proteína p19
p21	Proteína p21
p27	Proteína p27
p57	Proteína p57
PI3K	Fosfoinositídeo 3-quinase
PTEN	Fosfatase e homólogo de tensina deletada no cromossomo 10
RAF	Proteína quinase (“ <i>Rapidly Accelerated Fibrosarcoma</i> ”)
Tyr	Tirosinase

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO.....	23
2	REVISÃO DE LITERATURA	25
3	PROPOSIÇÃO.....	43
4	MATERIAL E MÉTODOS.....	45
5	RESULTADOS	51
6	DISCUSSÃO	85
7	CONCLUSÕES.....	99
	REFERÊNCIAS.....	101
	ANEXOS.....	109

1 INTRODUÇÃO

Lesões pigmentadas na cavidade oral podem representar entidades clínicas diversas, que variam desde alterações fisiológicas a manifestações de doenças sistêmicas e neoplasias malignas. A presença de pigmentação na mucosa bucal pode ser de origem endógena ou exógena, sendo que a pigmentação de origem exógena geralmente ocorre por implantação de corpo estranho, como na tatuagem por amálgama. No caso de pigmentação endógena os pigmentos podem incluir melanina, hemoglobina, hemossiderina e carotenos (1–3).

A melanina é um pigmento derivado da tirosina, sendo sintetizada por melanócitos na camada basal do epitélio e transferida para os queratinócitos adjacentes através dos melanossomos. Além disso, a melanina também é sintetizada por células névicas, que são originadas de crista neural e encontradas na pele e nas mucosas (4). Acredita-se que na pele a melanina apresenta efeito citoprotetor contra danos causados pela radiação ultravioleta (UV) do Sol; entretanto, o papel dos melanócitos no epitélio oral continua incerto (4,5). A pigmentação melânica pode se apresentar de maneira focal, multifocal ou difusa. A produção patológica de melanina na mucosa oral pode estar associada a etiologias diversas. As mais preocupantes incluem o melanoma e doenças sistêmicas, como a insuficiência adrenal e doença de Cushing, que apresentam manifestações orais que podem simular uma gama de lesões idiopáticas, reativas, benignas e neoplásicas (6).

A identificação de lesões pigmentadas na cavidade oral pode constituir um dilema diagnóstico para os clínicos. A pigmentação da mucosa oral pode variar de uma coloração macular difusa até nódulos ou massas tumorais. A cor, localização, duração, distribuição e aparência da lesão pigmentada tem importância fundamental para o diagnóstico, assim como uma história médica e odontológica completa. Teste laboratoriais também podem ser de grande valia para o diagnóstico. Entretanto, em muitos casos a causa da pigmentação não pode ser prontamente identificada, fazendo-se essencial a realização de biópsia tecidual e análise histopatológica para o diagnóstico definitivo (1–3,6,7).

Ainda assim, a análise morfológica de algumas dessas desordens pode ser desafiadora para muitos patologistas, devido a sua raridade. Nesse sentido, alguns biomarcadores imuno-

histoquímicos poderiam auxiliar e guiar o diagnóstico de alterações melanocíticas. Entretanto, poucos trabalhos na literatura enfocam a expressão de biomarcadores em potencial em lesões melanocíticas da mucosa oral.

O entendimento das diferentes desordens e substâncias que podem causar a pigmentação patológica da mucosa bucal é essencial para a avaliação, diagnóstico e manejo corretos das diversas lesões pigmentadas da mucosa oral e região maxilofacial. Portanto, este trabalho teve como objetivo compilar as lesões focais de origem melanocítica diagnosticadas no Serviço de Anatomia Cirúrgica da Faculdade de Odontologia de Universidade de São Paulo e analisar as suas respectivas características clínicas e histopatológicas e o perfil de marcação imuno-histoquímica para CDK4, p16 e PTEN em nevos melanocíticos e melanomas.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Mecanismos de melanogênese

Melanina é o termo utilizado para denotar pigmentos de estruturas e origens diversas que, em animais, são derivados da oxidação e polimerização da tirosina e, em outros organismos, de compostos fenólicos (4). Esse é provavelmente o mais prevalente, resistente, heterogêneo e antigo grupo de pigmentos encontrado na natureza, tendo sido observado em fósseis antigos de dinossauros, pássaros primários, espécies terópodes não aviárias e cefalópodes primários (8).

O nome melanina deriva do Grego antigo *melanos*, que significa “escuro”, tendo sido provavelmente utilizado pela primeira vez pelo químico sueco Berzelius em 1840 para denominar um pigmento escuro extraído da membrana ocular (9). Para melhor compreensão desse grupo de pigmentos, a classificação dos principais tipos de melanina é geralmente dividida de acordo com a sua origem, compreendendo as melaninas derivadas de animais, plantas, fungos, bactérias e as de origem sintética. As unidades fenólicas do polímero e as propriedades das oxidações necessárias para a formação do polímero possuem diferenças importantes entre cada grupo. O estudo das melaninas de cada origem levou à denominação das principais melaninas em: eumelanina, feomelanina, neuromelanina, alomelanina e piomelanina (8,9).

Melanogênese é o termo utilizado para descrever o complexo processo de síntese de melaninas na natureza, e por extensão, em sistemas *in vitro*. Os pigmentos melânicos são produzidos por células denominadas melanócitos, que são células dendríticas de origem neuroectodérmica e têm como precursores os melanoblastos (células não pigmentadas originárias de células embrionárias de crista neural). Após o fechamento do tubo neural, os melanoblastos migram de várias regiões do corpo e se diferenciam em melanócitos, assim como em células do sistema nervoso periférico, ossos e cartilagem da cabeça e coróide do olho. Os melanoblastos que se diferenciam em melanócitos são encontrados predominantemente na camada basal da epiderme e dos folículos pilosos (10).

A melanina é produzida em organelas especializadas denominadas melanossomos, um tipo de vesícula citoplasmática relacionada aos lisossomos. A síntese desse pigmento é catalisada por

uma enzima que converte a tirosina em dopaquinona, a tirosinase (Tyr). Em mamíferos e aves, as células cutâneas contendo pigmentos são chamadas de “melanócitos clássicos” e são responsáveis pela pigmentação da pele e pelos. Melanócitos localizados em outras áreas, como olhos, ouvido, meninges, tecido adiposo, coração e, possivelmente, ossos, são descritos como “não clássicos”. Dois tipos de pigmentos melânicos são produzidos durante a melanogênese na epiderme: a feomelanina (de cor amarela ou vermelha) e a eumelanina (de cor marrom ou preta). A regulação entre a quantidade desses dois pigmentos resulta na cor da pele e pelos dos indivíduos. Entretanto, apenas a eumelanina protege as células contra a radiação UV de forma efetiva (8,9).

Três enzimas bastante semelhantes às metaloproteínas de matriz participam do processo de melanogênese. A Tirosinase (Tyr) tem papel fundamental nos estágios iniciais de síntese da melanina, adicionando hidroxila à I – tirosina para gerar I – 3,4 – dihidroxifenilalanina (I – dopa) e então oxida a I – dopa para gerar a I – dopaquinona, que é polimerizada espontaneamente para gerar a eumelanina. As outras enzimas, a proteína 1 relacionada a tirosinase (Typr1) e a proteína 2 relacionada a tirosinase (Typr2, ou dopacromo tautomerase [Dct]), são semelhantes a Tyr e regulam a síntese da eumelanina a partir da I – dopaquinona. A feomelanina é produzida a partir da dopaquinona e cisteína (8). A eumelanina é sintetizada a partir da L-dopacromo, que atua aumentando a atividade da tirosinase, enquanto a L-tirosina induz a síntese de melanossomos e regula a atividade da Tyr. A L-tirosina é o material inicial necessário para a biossíntese de melanina e seu produto imediato, dopa, aumenta a síntese de melanina (10). O processo de melanogênese a partir da Tirosina está resumido na figura 2.1.

O início da melanogênese e a extensão da pigmentação podem ser influenciados por diversos fatores intrínsecos e extrínsecos. Os fatores intrínsecos incluem moléculas secretadas pelos queratinóticos adjacentes, fibroblastos e células neurais, endócrinas e inflamatórias, que podem ser afetadas por condições sistêmicas, como diabetes e gravidez. Já os fatores extrínsecos incluem a radiação UV e certos compostos químicos, como melatonina, produtos clareadores para tratamento de desordens pigmentadas (por exemplo a Hidroquinona) e drogas como Amicacina e Cloridrato de Tioridazina. Além disso, a síntese de melanina também pode ser influenciada por fatores genéticos predeterminados como idade e etnia (10).

Figura 2.1 – Esquema ilustrando o processo de produção da eumelanina e feomelanina a partir da Tirosina.

Fonte: Adaptado de “*Melanins and melanogenesis: from pigment cells to human health and technological applications*” (D’Ischia et al., 2015).

2.2 Pigmentações melanocíticas focais da mucosa oral

2.2.1 Mácula melanótica oral

A mácula melanótica oral é representada por uma alteração de cor na mucosa, que se apresenta plana e marrom, provocada por um aumento focal na deposição de melanina e, possivelmente, um aumento no número de melanócitos. Entretanto, sua etiologia é desconhecida e, ao contrário das efélides (sardas), independe da exposição à luz solar (11,12).

Em uma série de 773 casos de lesões melanocíticas de mucosa oral, a mácula melanótica foi a lesão pigmentada mais comumente encontrada, representando 86,1% de todos os casos estudados e 0,7% de um total de 89.430 biópsias avaliadas num período de 19 anos (13). Em uma revisão de 86202 biópsias, Kaugars et al. (14) diagnosticaram 353 casos de mácula melanótica oral, representando 0,4% de todas as lesões orais avaliadas. Os locais mais acometidos por essa lesão são vermelhão de lábio, gengiva e palato (13,14). Em estudo realizado na Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, Sousa (15) identificou 129 casos de lesões pigmentadas em cavidade oral dentre 36.000 casos estudados, sendo que 38 (29,5%) casos representavam máculas melanóticas ou pigmentações melânicas. Em um estudo conduzido em Belo Horizonte - MG, Brasil, foram reportadas 230 (1,34%) lesões melanocíticas de um total de 34.127 espécimes analisadas em um período de 64 anos, sendo que 83,1% dessas lesões correspondiam a máculas melanóticas (16). Em um estudo clínico conduzido em Amã, Jordania, foram identificados 22 casos de mácula melanótica oral dentre 1.275 pacientes adultos avaliados (17). A frequência de máculas melanóticas dentre todas as lesões de cabeça e pescoço foi de 0,3%, semelhante às frequências reportadas previamente de 0,4% (14), 0,5% (18), 0,3% (16).

Os locais mais acometidos pelas máculas melanóticas são o vermelhão de lábio, a gengiva e o palato (13,14). As lesões labiais ocorrem quase sempre em lábio inferior, enquanto as máculas melanóticas gengivais ocorrem frequentemente na região anterior de maxila. A razão entre sexos é de 2:1 para mulheres. A maioria das lesões é diagnosticada durante a quinta década de vida (13,14,19).

Existem controvérsias em relação à patogênese das máculas melanóticas e ainda não existe consenso se essas lesões representam um processo fisiológico e reativo, associado a predisposição genética (20). Alguns autores preferem considerar as lesões em vermelhão de lábio como uma entidade distinta, devido à exposição solar frequente dessa região, denominando-a mácula melanótica labial (11).

As máculas melanóticas geralmente são lesões solitárias, bem circunscritas de coloração azulada ou amarronzada a enegrecida, com menos de 1 cm de diâmetro. Frequentemente as lesões intraorais são maiores do que aquelas localizadas em vermelhão de lábio. Diferentemente das efélides, as máculas melanóticas não escurecem após a exposição à radiação UV. Ao exame de dermatoscopia, pode-se observar um padrão sem estrutura definida, com pigmentação marrom-enegrecida difusa, distribuída irregularmente, com ausência de redes ou glóbulos de pigmento. O diagnóstico geralmente é feito clinicamente (11,19,20). O diagnóstico diferencial deve incluir condições comuns como a pigmentação fisiológica ou racial e a melanose do fumante. Outros diagnósticos diferenciais incluem pigmentações características de doenças sistêmicas (como a doença de Addison), de condições genéticas (por exemplo: neurofibromatose tipo I, síndrome de Peutz-Jeghers, síndrome de McCune-Albright, síndrome de Laugier-Hunziker, síndrome de LEOPARD e xeroderma pigmentoso) ou do uso de medicamentos (como a cloroquina e derivados da quinina, fenolftaleína, estrogênio e medicamentos relacionados à síndrome da imunodeficiência adquirida [AIDS]) (11).

No caso do exame histopatológico, não são observadas alterações epiteliais, como alongamento das projeções epiteliais, e não se observa aumento de atividade melanocítica. A pigmentação melânica geralmente é observada na camada basal do epitélio e incontinência pigmentar e melanófagos podem ser observados na lâmina própria, em região justaepitelial (11,20).

2.2.2 Lentigo simples de mucosa

Lentigos simples são considerados uma das diversas formas de hiperplasia melanocítica cutânea, que também podem ocorrer em mucosas, apesar de raras. Essas lesões são caracterizadas por hiperpigmentações maculares, geralmente pequenas (entre 2 e 3mm), simétricas e bem-

circunscritas, com coloração marrom ou enegrecida. Em contraste às efélides, o lentigo simples ocorre em locais não expostos à luz solar e ocorrem principalmente em crianças. Geralmente são lesões solitárias, entretanto, nas condições sistêmicas como lentiginose profusa, síndrome de Peutz-Jeghers e síndrome de LEOPARD (lentigos múltiplos, anormalidades eletrocardiográficas, hipertelorismo ocular, estenose pulmonar, anormalidades da genitália, retardo do crescimento e surdez) as lesões apresentam-se de forma múltipla (11). O diagnóstico diferencial deve incluir a mácula melanótica, assim como as condições citadas anteriormente para o diagnóstico diferencial dessa lesão.

Os lentigos simples são considerados por alguns pesquisadores como precursores ou um estágio inicial dos nevos melanocíticos e clinicamente são indistinguíveis do nevo melanocítico junctional. A distinção entre essas lesões é feita em nível histológico, sendo que o lentigo simples apresenta um número de melanócitos epidérmicos aumentados na camada basal, mas as tecas de melanócitos/células névicas que definem os nevos não são identificadas. Além disso, os lentigos simples exibem alongamento das cristas epiteliais e um aumento na quantidade de melanina tanto nos melanócitos quanto nos queratinócitos adjacentes. Quando tecas de células névicas são identificadas em um padrão histológico semelhante ao lentigo, a lesão é denominada nevo junctional lentiginoso (21).

Apesar das semelhanças entre lentigos simples e nevos junctionais, uma pesquisa demonstrou ausência da mutação BRAF V600E em lentigos simples cutâneos, enquanto 57% dos casos de nevos melanocíticos estudados apresentaram essa mutação, o que indica que o lentigo simples provavelmente apresenta uma patogênese diferenciada, porém ainda desconhecida (22).

Em 2002, o estudo de Sousa identificou 29 casos de lentigo simples de mucosa na Serviço de Patologia Cirúrgica da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, representando um total de 22,5% de todas as lesões melanocíticas diagnosticadas neste serviço (15).

2.2.3 Lentigo actínico

O lentigo actínico (ou lentigo solar) é considerado um marcador de dano causado pela radiação ultravioleta (UV) na pele, sendo uma lesão associada à exposição crônica a luz solar. É

frequente em pele da face e pode ocorrer em lábios, afetando mais de 90% dos homens brancos com mais de 70 anos. Essa lesão pode estar associada a mutações nos genes FGFR3 e PIK3CA (11).

Clinicamente o lentigo solar se apresenta como máculas amarronzadas com bordas bem definidas, geralmente com menos de 5mm de diâmetro. Entretanto, lesões adjacentes podem coalescer. O principal diagnóstico diferencial dessa lesão é a mácula melanótica labial. Essas lesões não sofrem alteração de na intensidade de cor após exposição à radiação UV. Assim como no lentigo simples, microscopicamente o lentigo solar apresenta cristas epiteliais alongadas, com aumento do número de melanócitos ao longo dessas cristas e pigmentação melânica aumentada nos queratinócitos basais. Além disso, observa-se presença de elastose solar na derme (21).

2.2.4 Melanoacantoma oral

O melanoacantoma oral, ou melanoacantose, é uma pigmentação rara e benigna da mucosa oral, caracterizada pela proliferação de melanócitos dendríticos em meio ao epitélio. Acredita-se que esta lesão seja um processo reativo, que pode ser provocado por trauma. Clinicamente, é caracterizada por uma placa pigmentada bem circunscrita, solitária e assintomática, com tendência a um aumento de tamanho rápido (1,11,20). Em uma revisão de 773 casos de lesões pigmentadas solitárias da mucosa oral, Buchner et al. (13) identificaram 7 casos de melanoacantoma, representando um total de 0,9% de todas as lesões pigmentadas e 0,008% do número total de biópsias avaliadas.

Essa lesão é mais comumente relatada em pacientes negros, com predominância no sexo feminino e na terceira e quarta década de vida. Ocorre principalmente em mucosa jugal, podendo acometer também lábios, gengiva, rebordo alveolar e palato. Apesar de ser principalmente uma lesão focal, acometimento bilateral ou multifocal tem sido relatado (1,11,20). Devido ao seu crescimento rápido, o principal diagnóstico diferencial do melanoacantoma oral deve ser o melanoma, portanto a biópsia incisional é sempre indicada nesses casos.

Ao exame histológico, o melanoacantoma exhibe numerosos melanócitos dendríticos de aspecto benigno espalhados pela camada espinhosa do epitélio (em ocasiões normais, os

melanócitos dendríticos encontram-se restritos à camada basal). Nessa lesão, o número de melanócitos da camada basal também está aumentado. O epitélio de revestimento pode exibir espongiose e acantose e na lâmina própria é possível observar a presença de queda de pigmento melânico, melanófagos e moderado infiltrado inflamatório crônico, com presença de eosinófilos (11,20,23).

2.2.5 Nevo melanocítico oral

O termo nevo (ou *nevus*) representa uma conotação genérica utilizada comumente para referir-se a malformações na pele ou mucosa, que podem surgir no epitélio ou tecido conjuntivo. O tipo mais comum de nevo é o nevo melanocítico adquirido (ou nevo nevocelular), que é caracterizado por uma proliferação benigna e localizada de células névicas, derivadas da crista neural. Não se sabe se essas células representam melanócitos ou se são células “primas”, bastante semelhantes aos melanócitos, que migram da epiderme durante o desenvolvimento (11).

O nevo melanocítico adquirido é provavelmente uma das neoplasias benignas mais comuns em humanos, que podem variar de uma média de 10 lesões cutâneas a centenas em uma mesma pessoa. Entretanto, nevos melanocíticos intraorais são lesões raras. Os nevos raramente estão presentes ao nascimento, e quando ocorrem, são denominados nevos congênitos. Geralmente, a maioria dos nevos surgem ao longo da primeira e segunda décadas de vida. Após os 30 anos de idade, alguns nevos podem regredir e desaparecer completamente; entretanto, esse processo de involução clínica ainda não foi elucidado e parece aumentar com o avanço da idade (24).

A história natural do nevo melanocítico adquirido inclui quatro estágios: I. Iniciação (desenvolvimento de mutações em uma célula progenitora – possivelmente uma célula tronco melanocítica ou melanócitos indiferenciados); II. Promoção (ativação e proliferação da célula progenitora mutada); III. Senescência (parada da proliferação celular); e IV. Involução (regressão clínica) (11).

Pesquisadores têm identificado mutações no gene BRAF em cerca de 80% dos nevos melanocíticos adquiridos, sendo que essas mutações também são comuns em melanomas cutâneos.

O BRAF é um oncogene que codifica a quinase serina/treonina envolvida na via de sinalização da MAP quinase (*Mitogen Activated Protein Kinase* - MAPK) (11,24,25).

O nevo melanocítico adquirido evolui através de diferentes estágios de desenvolvimento: juncional, composto e intradérmico/intramucoso; entretanto, nem todos os nevos passam por cada um desses estágios. Clinicamente, o nevo juncional caracteriza-se por uma mácula marrom ou negra, bem demarcada e geralmente com menos de 6 mm de diâmetro. Essas características podem perdurar até idades mais avançadas; porém, mais frequentemente as células névicas tendem a proliferar com o passar dos anos, dando origem a uma pápula elevada, com superfície lisa e consistência macia (nevo composto). Nesse tipo de nevo a pigmentação diminui e a maioria das lesões é caracterizada por uma coloração amarronzada. O nevo intradérmico tende a surgir com o passar do tempo, apresentando uma perda de pigmentação mais acentuada e superfície por vezes papilomatosa, com crescimento de pelos no centro (11).

O nevo melanocítico oral é uma lesão incomum que acomete principalmente palato, mucosa jugal e gengiva (20). De forma semelhante a sua contraparte de pele, os nevos intraorais podem ter sua etiologia pouco elucidada, sabendo-se apenas que oncogenes codificantes da via de sinalização RAS podem estar envolvidos no seu desenvolvimento (26). Frequentemente, os nevos da mucosa oral não apresentam superfície papilomatosa e mais de um em cinco casos não apresentam pigmentação. Aproximadamente dois terços das ocorrências são em mulheres, com diagnóstico por volta da terceira década de vida (11). Os nevos melanocíticos orais podem mimetizar um melanoma em estágio inicial, portanto, a biópsia é sempre recomendada nesses casos. Quando não pigmentadas ou quando apresentam grandes extensões, essas lesões podem fazer diagnóstico diferencial com outras desordens, como fibroma, granuloma piogênico ou lesão periférica de células gigantes (11).

Buchner et al. (13) relataram uma frequência de 11,8% de nevos intraorais dentre o grupo de lesões melanocíticas estudadas. Entretanto, essas lesões representaram apenas 0,1% das lesões orais avaliadas. Os autores relataram maior ocorrência de nevos intramucosos (64%), seguidos por nevos compostos (16,5%) e nevo azul (16,5%). Os nevos juncionais representaram apenas 3% da amostra de 773 lesões melanocíticas (13). Meleti et al. (27) relataram uma incidência anual de nevos melanocíticos orais excisados de 4,35 casos por 10 milhões de pessoas (27). Sousa (15) identificou 33 casos de nevos melanocíticos intraorais no Serviço de Patologia Cirúrgica da

Faculdade de Odontologia da USP, o que representou 25,5% das lesões pigmentadas de boca diagnosticadas no período estudado.

Ao exame histopatológico, o nevo melanocítico adquirido exhibe uma proliferação benigna e não encapsulada de células névicas, geralmente exibindo zonas de diferenciação entre as células. As células névicas mais superficiais tendem a se organizar em tecas (agregados pequenos e arredondados de células), e apresentam morfologia ovoide ou epitelióide, com citoplasma amplo e geralmente exibindo acúmulo de melanina intracelular. Por sua vez, as células mais profundas, costumam exibir menos citoplasma, pouca pigmentação e núcleos amplos e arredondados, assemelhando-se a linfócitos. Um terceiro tipo de célula névica pode ser observado mais profundamente na mucosa, caracterizando-se por morfologia fusiforme e alongada, semelhantes a células de Schwann ou fibroblastos. Alguns autores classificam esses tipos celulares em: A (epitelióide), B (semelhantes a linfócitos) e C (fusiformes) (11).

Outras variantes do nevo melanocítico incluem o nevo melanocítico congênito, o nevo azul e o nevo melanocítico displásico. Os nevos melanocíticos congênitos costumam ocorrer principalmente em tronco e extremidades de recém-nascidos, sendo raro o envolvimento intraoral. Geralmente surgem como máculas médias a grandes com coloração clara que ao longo do tempo podem se tornar em placas castanho-escuras ou pretas. Histologicamente, se assemelham ao nevo melanocítico adquirido, sendo que em casos pequenos não é possível distingui-los microscopicamente. O nevo melanocítico adquirido pode apresentar células névicas em padrão juncional, composto ou intradérmico/intramucoso (sendo os dois últimos padrões os mais comuns); esse tipo de nevo costuma se estender mais profundamente na derme, com infiltrado de células névicas entre as fibras colágenas e em meio aos feixes neurovasculares, além de circundar estruturas anexas da pele, como glândulas sebáceas, pelos e folículos (11).

Por sua vez, o nevo azul é caracterizado por uma proliferação benigna e incomum de melanócitos profundos no tecido conjuntivo, e é dividido em nevo azul comum e nevo azul celular. O nevo azul comum é o segundo tipo de nevo mais comum em cavidade oral, ocorrendo principalmente em palato. A coloração azul desse tipo de nevo se deve ao *efeito de Tyndall*, que se refere à absorção dos comprimentos de onda. Como a melanina fica localizada mais profundamente na derme/mucosa, os tecidos absorvem os comprimentos de onda longos (amarelos e vermelhos) primeiro e refletem o comprimento de onda mais curto, de cor azul. Estudos demonstram que o nevo azul apresenta mais frequentemente mutações no gene GNAQ e, raramente, mutações do

BRAF. Ao exame histológico, o nevo azul comum exhibe diversos melanócitos alongados e fusiformes, com prolongamento dendríticos e grânulos de melanina abundantes, localizados profundamente na derme/lâmina própria e organizados de maneira paralela à superfície epitelial. O nevo azul celular, que é mais raro e ocorre principalmente em nádegas ou região sacrococcídea, apresenta um agregado bem circunscrito com proliferação de células fusiformes grandes e produtoras de melanina, na derme ou submucosa (6,11,20).

Os nevos displásicos foram descritos inicialmente em 1978 como lesões distintas tanto clínica como histologicamente em famílias com pré-disposição para desenvolvimento do melanoma, sendo descritos com o termo inicial de síndrome “*B-K mole*”, nomeada em referência a duas famílias que apresentavam essas lesões (28). Em 1992, a Conferência de Consenso dos Institutos Nacionais de Saúde do Estados Unidos (NIH) recomendou que o termo nevo displásico fosse substituído por “nevo com desordem arquitetural” com ou sem atipia citológica, entretanto, o termo nevo displásico continua sendo amplamente utilizado por dermatopatologistas e, até o presente momento, não existem evidências de que o nevo displásico de pele esteja verdadeiramente ligado a um maior risco de desenvolvimento de melanoma (29). Os nevos displásicos aparecem, geralmente, na puberdade e prevalecem em indivíduos jovens, tendo predileção por áreas expostas ao sol, especialmente, o tronco. Histologicamente, esses nevos apresentam hiperplasia lentiginosa dos melanócitos, atipia melanocítica epitelióide, fibrose lamelar e infiltrado linfocitário perivascular na derme papilar (28).

2.2.6 Melanoma maligno oral

O melanoma maligno é um tumor agressivo de origem melanocítica que ocorre principalmente em pele, sendo raras as lesões em mucosas. A exposição à radiação UV é um fator etiológico importante nas lesões de pele, com maior ocorrência em populações caucasianas e em regiões próximas à linha do equador (11). Alguns fatores de risco para a ocorrência do melanoma incluem pele, cabelos e olhos claros, tendência a queimaduras solares ou ocorrência de sardas, histórico de queimaduras solares dolorosas ou com formação de bolhas durante a infância, hábitos de lazer em áreas de exposição solar, histórico familiar ou pessoal de melanoma, histórico pessoal

de nevo displásico ou nevo congênito e o histórico de nevos comuns excessivos (>100). Acredita-se que a ocorrência do melanoma também esteja associada ao uso de bronzamento artificial, terapia imunossupressora associada a transplante de órgãos e ocorrência de várias neoplasias malignas durante a infância (11).

O melanoma maligno oral é extremamente raro e representa 0,5% de todas as neoplasias malignas de boca. Sua etiologia é desconhecida e sua ocorrência é mais comum no Japão e no continente Africano. Alguns autores sugerem que cerca de 30% dos melanomas de boca são precedidos por pigmentações orais presentes por vários meses ou anos. O uso de tabaco e irritação crônica por prótese dentária também já foram sugeridos como possíveis fatores de risco, entretanto existem poucas evidências que embasem essa teoria (20,30).

Diversas hipóteses têm sido formuladas em relação à patogênese do melanoma oral. Alguns autores acreditam que essa lesão surja a partir de nevos melanocíticos, áreas pigmentadas pré-existent ou *de novo*, de uma mucosa de aparência normal. Assim como em outros tumores, acredita-se que o melanoma oral também possa surgir a partir de células precursoras pré-existent originadas de células-tronco progenitoras de melanócitos; essas células teriam adquirido fenótipo maligno a partir de uma série de alterações moleculares. Outra hipótese sugere que as células precursoras possam se desenvolver como melanócitos maduros que ficam aprisionados na submucosa e, como resultado de alterações moleculares e citogenéticas específicas, adquirem fenótipo desdiferenciado, com capacidade de autorrenovação (31).

Algumas mutações nos genes CDKN2A e CDK4 foram identificadas como fator de risco para o desenvolvimento do melanoma, assim como variantes alélicas em um gene fundamental da pigmentação, o receptor de melanocortina 1 (MC1R) (24).

Em 2002, notou-se que mutações que ativam o gene BRAF são comuns em cânceres humanos, incluindo o melanoma. As proteínas RAF são quinases serinas/treoninas, que quando ativadas por sinais mitogênicos ou por mutações gerenciam a sinalização através da via da MAPK, que funciona como um ativador central de proliferação celular. Cerca de 50% dos casos de melanoma cutâneo apresentam mutações ativadoras do BRAF, sendo a mutação V600E a mais comum (24).

O papel do BRAF como um oncogene do melanoma foi demonstrado através da resposta positiva ao uso de inibidores da BRAF para o tratamento de melanomas. A ativação da via MAPK é possivelmente uma característica da maioria dos casos de melanoma e ocorre através de diversos

mecanismos, incluindo a mutação de outros componentes dessa via, como do NRAS, NF1. Outros genes também podem estar mutados no melanoma, como o HRAS, KRAS, KIT, GNAQ e GNA11 (24).

Ao exame clínico, o melanoma oral costuma se apresentar como uma lesão nodular, sendo que em alguns casos as lesões iniciais podem ser planas. Existe uma predileção pelo sexo masculino e costuma ocorrer entre a quinta e sétima década de vida. A maioria dos casos ocorre em palato ou gengiva/rebordo maxilar. Geralmente, um a cada três pacientes com melanoma oral possui histórico de mácula pigmentada na região do tumor, alguns meses ou anos antes do diagnóstico. A lesão costuma se iniciar como uma mácula marrom ou enegrecida, com bordas irregulares, podendo exibir também variação de coloração entre arroxeadado, vermelho, cinza ou mesmo ausência de pigmentação (melanoma amelanótico) ou cor de mucosa normal. Após um tempo, a mácula se estende lateralmente e após o início da fase de crescimento vertical a lesão é caracterizada por uma massa exofítica e lobulada. Focos de lesões satélites também costumam ser observados próximos ao tumor primário. Algumas lesões podem exibir áreas de ulceração e o osso alveolar adjacente pode exibir evidência radiográfica de destruição óssea irregular, com aspecto de “roído de traça”. Metástase linfonodal também é geralmente observada (11,30,32).

Em 2004, Buchner et al. (13) avaliaram 773 lesões melanocíticas focais em mucosa oral e observaram uma frequência de 0,6% (n=5) para o melanoma maligno oral, sendo que essa lesão representou apenas 0,006% de um total de 89.430 biópsias de cavidade oral analisadas em um período de 19 anos. Um estudo que avaliou o “Banco de Dados de Incidência de Câncer em Cinco Continentes Volume IX” (*The Cancer Incidence in Five Continents volume IX [CI5-IX] database*), identificou 319 casos de melanoma maligno oral primário em 67 registros de câncer, em cinco continentes (Oceania, América do Norte, Europa, América Latina e Ásia), no período de 1998-2002 (33). No mesmo período e nos mesmos 67 registros, foram observados 314.433 casos de melanoma maligno de pele, contabilizando 986 casos de melanoma de pele para cada caso de melanoma maligno oral primário. As taxas de incidência de melanoma maligno oral padronizadas para faixa etária/100.000 pessoas foram de 0.01 para homens e 0.007 para mulheres (33). Um total de oito casos de melanoma oral foi diagnosticado na Faculdade de Odontologia da USP até o ano de 2001, representando 6,2% de todos os casos de lesões pigmentadas intraorais (15).

O melanoma maligno oral provavelmente tem origem a partir dos melanócitos juncionais. Na fase inicial de desenvolvimento, as células estão restritas ao compartimento epitelial, sendo

denominado melanoma *in situ*; em seguida, as células melanoma (malignas) invadem o tecido conjuntivo. Essas células podem exibir morfologias variadas, com características fusiformes, plasmocitoides ou epitelioides e, ocasionalmente, células claras. O melanoma oral não é subdividido nas categorias clássicas do melanoma cutâneo, que incluem melanoma superficial, melanoma nodular e melanoma acral lentiginoso (sendo esse último semelhante ao melanoma de mucosa ou melanoma oral). O sistema de microestadiamento histológico de Clark, amplamente utilizado para o melanoma cutâneo, também não é aplicado para a mucosa oral, devido as diferenças histológicas entre a mucosa e a derme (20,30).

A taxa de sobrevivência global em 5 anos para o melanoma de mucosa em cabeça e pescoço costuma variar de 21% a 40% e para o melanoma maligno oral é de cerca de 15%, com sobrevivência média de 15%. O paciente com melanoma em gengiva geralmente apresenta uma sobrevida em 5 anos maior do que os pacientes com lesões localizadas em palato. Casos de recorrência podem ocorrer até 10-15 anos depois do primeiro tratamento e metástases à distância geralmente acometem ossos, cérebro, fígado e pulmões (30,32,34).

Histologicamente, tanto o melanoma cutâneo como o melanoma oral exibem melanócitos atípicos inicialmente na interface epitélio-tecido conjuntivo. Com a progressão da lesão, os melanócitos atípicos proliferam ao longo do epitélio, lateralmente ao longo da camada basal e também em profundidade no tecido conjuntivo. As células tumorais apresentam diversos graus de pleomorfismo nuclear e hipercromatismo e costumam exibir tamanho maior do que melanócitos normais. No melanoma superficialmente invasivo, costuma-se observar invasão em padrão “pagetoide”, com células tumorais individuais infiltrando camadas superiores do epitélio de superfície. Esse padrão microscópico se assemelha ao adenocarcinoma intraepitelial denominado doença de Paget cutânea. A fase em que as células melanomas se proliferam ao longo da camada basal é denominada fase de crescimento radial. Quando essas células se tornam capazes de invadir o tecido conjuntivo, denomina-se fase de crescimento vertical (11). Microscopicamente, o melanoma pode mimetizar outras neoplasias malignas com morfologia epitelióide ou fusiforme (por exemplo linfomas, rabiomiossarcoma e lesões metastáticas), principalmente quando apresenta pouca pigmentação melânica. Nesses casos, a positividade imuno-histoquímica para marcadores S-100, HMB45, Melan-A e MITF e negatividade para citoqueratinas é essencial para o diagnóstico (19,21).

2.3 O papel das proteínas CDK4, p16 e PTEN em lesões melanocíticas neoplásicas

O que se sabe até o momento é que a patogênese das lesões melanocíticas, em especial do melanoma, é controlada por diversas vias de sinalização. A partir de 2002, foi demonstrado que a via da MAP quinase (uma ativadora central da proliferação celular) está diretamente envolvida na patogênese de diversas neoplasias, incluindo nevos e melanomas (24). Além disso, alterações na fase G1/S do ciclo celular são consideradas fundamentais na patogênese e progressão do melanoma, assim como a participação de genes supressores de tumor como o PTEN.

O ciclo celular normal, que garante a replicação e divisão do DNA, consiste em etapas fortemente controladas conhecidas como: G1 (fase pré-sintética), S (síntese de DNA), G2 (fase pré-mitótica) e M (fase mitótica). As células quiescentes, que não entraram no ciclo celular, estão em G0. Para garantir a homeostasia tecidual e regular os processos de crescimento fisiológico, o ciclo celular tem múltiplos pontos de controle. A progressão do ciclo celular, em especial a transição da fase G1 para S, é regulada por proteínas denominadas ciclinas e enzimas associadas, as quinases dependentes de ciclina (CDKs). As CDKs ordenam a progressão das células através das várias fases do ciclo celular. Isso se dá através dos complexos CDKs-ciclinas que fosforilam proteínas-alvos cruciais, que impulsionam as células através do ciclo celular. Mais de 15 ciclinas já foram identificadas, sendo que as ciclinas D, E, A e B aparecem sequencialmente no ciclo celular e se ligam a uma ou mais CDKs. A atividade dos complexos CDK-ciclina é regulada pelos inibidores de CDK (CKIs), que atuam reforçando os pontos de controle do ciclo celular. Os pontos de controle garantem que as células com DNA ou cromossomos danificados não completem a replicação. Dentre as famílias de CKIs, existe um grupo composto por três proteínas: p21, p27 e p57 que inibem as CDKs amplamente. Enquanto outra família de CKIs apresenta efeitos seletivos sobre a CDK4; as proteínas dessa família, codificadas pelo gene CDKN2A, são p15, p16, p18 e p19 (também chamadas de proteínas INK4 [A a D]). Nesse contexto, a proteína p16 se liga à CDK4, bloqueando sua interação com a ciclina D1, um dos mecanismos que previne a entrada prematura das células na fase S e restringe a replicação celular a apenas uma por ciclo (35).

A replicação do DNA e consequente segregação cromossômica são processos suscetíveis a erros e danos, que podem ser induzidos por estresses genotóxicos endógenos, estímulos ambientais, agentes farmacológicos ou radioterapia. Qualquer dano ao DNA durante o ciclo celular ativa pontos

de checagem, que desencadeiam o sistema de reparo do DNA. Um gene importante para o controle do reparo do DNA é o PTEN (fosfatase e homólogo de tensina). O PTEN foi descrito em 1997 (36) como um importante supressor de tumor, através do antagonismo a proteínas tirosina quinases. Evidências indicam que o PTEN atua no ciclo celular regulando diversos pontos de checagem, incluindo as fases G1, S, G2 e M. A perda do PTEN em células-tronco embrionárias ou células progenitoras de células neurais promove a progressão do ciclo celular, com aceleração da transição G1-S. Esse gene atua na supressão do crescimento e sobrevivência celular de uma maneira fosfatase-dependente, através da regulação da via de sinalização PI3K/AKT (37). Mutações no PTEN já foram detectadas em diversas neoplasias malignas humanas, incluindo glioblastomas, câncer de mama, tireoide, próstata, endométrio e melanoma (37,38).

Pesquisas apontam que distúrbios na unidade funcional p16/ciclina D1/CDK4 também contribuem para a melanogênese descontrolada, conseqüentemente levando ao desenvolvimento de neoplasias. Mutações no locus CDKN2A/p16 foram reportadas em 22 a 78% dos melanomas. A perda da função do CDKN2A está relacionada à síndrome do melanoma familiar e pacientes com mutação desse gene tem 500 vezes mais chances de desenvolver um melanoma. Além disso cerca de 5 a 37% dos melanomas apresentam alterações genéticas na CDK4 e 10% a 18% possuem alterações na ciclina D1 (39).

A proteína p16 é uma das principais promotoras da parada de replicação por senescência em melanócitos, que ocorre principalmente em nevos melanocíticos mediada por mutações nos genes BRAF ou NRAS. A perda da atividade da proteína p16 através de mutações ou alterações epigenéticas (como a metilação) prejudica sua habilidade de promover senescência, levando a uma proliferação descontrolada (40).

O estudo de Fung et al. (41) demonstrou que a perda de p16 aumenta a replicação e a proliferação celular de melanócitos, aumentando seu ciclo replicativo. Além disso, os autores mostraram que a perda de p16 em nevos melanocíticos está diretamente relacionada ao acúmulo de marcadores de dano ao DNA. Diante disto, acredita-se que a perda de p16 facilita a patogênese de lesões melanocíticas através de uma proliferação continuada e seleção de melanócitos geneticamente instáveis (41).

Estudos imuno-histoquímicos em lesões melanocíticas cutâneas sugerem que a expressão das proteínas p16 e ciclina D1 podem ser eficazes para o diagnóstico diferencial entre melanomas e nevos melanocíticos, sendo que a ciclina D1 é frequentemente mais expressa em lesões malignas,

enquanto a p16 deixa de ser expressa nessas lesões, sendo identificada principalmente nas lesões benignas (42–45). Entretanto, uma revisão sistemática recente (46) demonstrou uma porcentagem de nevos melanocíticos cutâneos positivos para p16 variando entre 61% e 100%, enquanto casos de melanomas cutâneos apresentaram expressão positiva de p16 em 12% a 93% dos casos.

Apesar da interação direta de CDK4 com a proteína p16, a sua expressão imuno-histoquímica ainda é pouco conhecida em lesões melanocíticas. Em 2001, Georgieva et al. (47) demonstraram uma expressão imuno-histoquímica considerada moderada e uniforme em melanomas cutâneos primários e metastáticos e em nevos melanocíticos, sem diferenças entre esses grupos. Por sua vez, Bachmann et al. (48) estudaram 139 casos de melanomas cutâneos primários e 56 melanomas metastáticos e demonstraram expressão nuclear de CDK4 em 96% dos casos e expressão citoplasmática em 97% dessas lesões (48).

A expressão dessas proteínas ainda é pouco conhecida em lesões melanocíticas da cavidade oral. Recentemente, Chen et al. (49) demonstraram que uma elevada expressão imuno-histoquímica de p53 e p16 é capaz de predizer uma menor sobrevida em casos de melanoma mucoso de cabeça e pescoço, incluindo dois casos em cavidade oral. Em um estudo com 38 nevos intramucosos e 13 melanomas orais primários, foi observada uma elevada expressão de p16 nos casos de nevos, em comparação com as lesões malignas. Enquanto as proteínas ciclina D1 e p21 foram negativas em todos os casos benignos, enquanto nos casos de melanoma exibiram elevada expressão. Os autores concluíram que essas proteínas podem ser úteis para o diagnóstico diferencial entre lesões pigmentadas intraorais (50).

3 PROPOSIÇÃO

Esta pesquisa se propôs a realizar um estudo epidemiológico e morfológico das lesões melanocíticas focais da mucosa oral que receberam os diagnósticos de mácula melanótica, lentigo simples de mucosa, lentigo actínico, melanoacantoma, nevo melanocítico e melanoma oral no Serviço de Patologia Cirúrgica da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo, no período de janeiro de 2001 a setembro de 2019.

Os objetivos específicos do estudo foram:

1. Coletar as informações clínicas e demográficas dos pacientes diagnosticados com essas lesões;
2. Analisar suas respectivas características morfológicas e reclassificar os casos, conforme necessário;
3. Realizar estudo de imuno-histoquímica para as proteínas CDK4, p16, e PTEN em lesões melanocíticas focais neoplásicas (nevos melanocíticos e melanomas), de forma a observar e quantificar suas expressões nesse grupo de lesões.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Desenho do estudo e amostra

Esta pesquisa consistiu em um estudo descritivo e retrospectivo de corte transversal em uma série de casos de lesões melanocíticas focais da mucosa oral. A partir dos arquivos do Serviço de Patologia Cirúrgica da FOUSP, foram levantados os casos que, entre janeiro de 2001 e setembro de 2019, receberam os seguintes diagnósticos: mácula melanótica, nevo melanocítico, melanoacantoma, lentigo simples, lentigo actínico e melanoma. Os casos selecionados foram levantados a partir do número de registro subsequente ao último caso investigado no estudo de Sousa (15), realizado neste Serviço.

Neste estudo, apenas foram incluídos os casos que apresentaram lâminas histológicas coradas em hematoxilina e eosina ou material biológico armazenado em parafina, para confirmação do diagnóstico histopatológico, exceto para os casos de melanoma, que por se tratarem de lesões raras, foram incluídos mesmo que não apresentassem material para revisão. Para o estudo imuno-histoquímico a amostra se deu por conveniência e foram incluídos casos selecionados que apresentassem material suficiente armazenado em parafina.

4.2 Considerações éticas

Este estudo foi apreciado e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de odontologia da Universidade de São Paulo sob o parecer número 3.239.297 (Anexo A).

A pesquisa em questão não oferece nenhum tipo de risco nem danos aos sujeitos de pesquisa, pois o material utilizado para a obtenção e análise dos resultados consta de fragmentos de biópsias armazenados em parafina.

4.3 Estudo epidemiológico

Para caracterização demográfica dos casos estudados, os dados clínicos dos pacientes foram coletados nas suas respectivas fichas de encaminhamento de exame, que pertencem aos arquivos do Serviço de Patologia Cirúrgica da FOU SP. Foram obtidas informações clínicas referentes ao sexo, idade, cor da pele e características da lesão, como localização, tamanho e tempo de duração.

4.4 Estudo morfológico

Inicialmente, as lâminas histológicas coradas em hematoxilina e eosina previamente diagnosticadas mácula melanótica, nevo melanocítico, lentigo simples, lentigo actínico, melanoacantoma e melanoma, foram submetidas a análise sob microscopia de luz para confirmação do diagnóstico histopatológico.

O diagnóstico de mácula melanótica foi confirmado quando a lesão apresentava aumento na deposição de melanina na camada basal do epitélio, sem alterações epiteliais ou evidências de hiperplasia melanocítica, podendo apresentar queda de pigmento na lâmina própria e presença de melanófagos. Os casos de lentigo simples de mucosa foram confirmados mediante presença do aumento do número de melanócitos na camada basal do epitélio, ao longo de cristas epiteliais alongadas, com aumento da deposição de melanina nos melanócitos e queratinócitos adjacentes. Para o diagnóstico de lentigo actínico, a lesão deveria estar localizada em vermelhão de lábio, exibindo as mesmas características histopatológicas do lentigo simples de mucosa, além de exibir elastose solar. Por sua vez, o diagnóstico de melanoacantoma somente foi confirmado mediante aumento da proliferação de melanócitos de formato dendrítico tanto em camada basal como em camada espinhosa do epitélio de revestimento, exibindo também acantose epitelial.

Para os casos de nevos melanocíticos, devido a sua diversidade histológica, realizou-se um estudo morfológico mais aprofundado, no qual foram listadas os tipos de células névicas presentes (A, B ou C); células névicas predominantes; padrão de infiltração da lesão (tecas, lençóis, cordões ou células individuais); presença e quantidade de pigmentação das células; tipo de estroma tumoral;

profundidade de infiltração (zona papilar, zona reticular ou comprometida); presença de ulceração; simetria da lesão; infiltrado inflamatório; presença de mitoses; atipia celular e pleomorfismo nuclear.

As células névicas do tipo A foram identificadas a partir da sua morfologia ovoide ou epitelióide, com citoplasma amplo e geralmente exibindo acúmulo de melanina intracelular. As células névicas tipo B exibiam menos citoplasma, pouca pigmentação e núcleos amplos e arredondados, assemelhando-se a linfócitos. Por sua vez, as células névicas tipo C eram observadas mais profundamente na mucosa, caracterizando-se por morfologia fusiforme e alongada, semelhantes a células de Schwann ou fibroblastos.

Por fim, os casos foram classificados em: nevos juncionais (com proliferação de células névicas organizadas em tecas restritas ao epitélio de revestimento da mucosa); nevos intramucosos (com células névicas proliferando apenas no tecido conjuntivo); nevos compostos (presença de células névicas tanto em região juncional do epitélio, como em tecido conjuntivo); nevos azuis (células névicas de aspecto fusiforme e altamente pigmentadas proliferando em região mais profunda do tecido conjuntivo); nevos azuis combinados (nevos azuis associados a nevos compostos ou intramucosos); nevo displásico (nevo melanocítico composto com alteração arquitetural em região juncional e presença ou não de atipias citológicas, como pleomorfismo celular e nuclear, núcleos picnóticos e nucléolos evidentes).

Os casos diagnosticados como melanoma deveriam apresentar proliferação de melanócitos atípicos na interface epitélio-tecido conjuntivo, ao longo da camada basal e também em profundidade no tecido conjuntivo. Essas células atípicas são caracterizadas por diversos graus de pleomorfismo nuclear e celular, além de hipercromatismo. Além disso, exibem mitoses atípicas e não apresentam graus de maturação evidentes como no nevo melanocítico. Caso as células atípicas estivessem proliferando apenas em região juncional do epitélio, em padrão de invasão radial ou “pagetoide”, o diagnóstico de melanoma in situ seria confirmado.

4.5 Estudo imuno-histoquímico

Para caracterização de uma amostra de nevos melanocíticos e melanomas orais foi avaliada a expressão imuno-histoquímica das proteínas CDK4, p16 e PTEN em 42 casos de nevo melanocítico (27 nevos intramucosos, 12 nevos compostos, dois nevos azuis combinados, um nevo junctional) e cinco casos de melanoma (quatro melanomas orais primários e um melanoma no qual uma possível origem metastática não pôde ser descartada).

Os espécimes incluídos em parafina foram submetidos a cortes histológicos de 3 µm de espessura, estendidos em lâminas de vidro previamente preparadas com adesivo à base de organosilano (3-aminopropyltriethoxy-silano, Sigma Chemical CO, St Louis, MO, USA). Os cortes seguiram para desparafinização em dois banhos de xilol, sendo o primeiro por 30 minutos e o segundo por 15 minutos, ambos a temperatura ambiente. A seguir, foi feita reidratação em cadeia descendente de etanóis, passando imediatamente para a remoção do pigmento formólico pela incubação em hidróxido de amônia a 10% em solução alcoólica, por 10 minutos. Após lavagem em água destilada, os cortes receberam os tratamentos de recuperação dos sítios antigênicos, feito pela imersão em solução de EDTA (1mM), pH 8,0, em banho aquecido a 95°C por 30 minutos.

Após o tratamento, os cortes foram lavados em água destilada e seguiram para a etapa de eliminação da peroxidase endógena tecidual, constituída 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 salina de Tris (Tris 50 mM, NaCl 150 mM) pH 7,6, solução tampão da reação. Seguiu-se a incubação dos anticorpos primários listados anteriormente, nas seguintes diluições: 1:300 (CDK4, clone D9G3E, Cell Signaling, Danvers, Massachusetts) 1:150 (p16, policlonal, Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EUA), e 1:100 (PTEN, clone SP170, Sigma-Aldrich, San Luis, Missouri, EUA). Os anticorpos foram incubados a 4° C em câmara úmida por 18 horas.

Na técnica de imuno-histoquímica foi empregado sistema do polímero marcado para todos os anticorpos conforme as especificações do fabricante (Envision™, Dako, Carpinteria, CA, EUA) e para a revelação da reação utilizou-se o cromógeno diaminobenzidina (DAKO Liquid DAB+, K3468) em incubação de 10 minutos e, após lavagem em água destilada para remoção de excessos, os cortes foram contracolorados com hematoxilina de Mayer. Após lavagem em água corrente, os

cortes foram desidratados em cadeia crescente de etanóis, diafanizados em xilol, montados com Tissue-Tek® Glass Mounting Medium (Sakura Finetek Europe B.V., The Netherlands) e examinados em microscopia de luz.

Para o anticorpo PTEN as reações imuno-histoquímicas foram realizadas também com o sistema de amplificação Envision fosfatase alcalina (Envision™ G|2 Doublestain system, Rabbit/Mouse, Dako, Carpinteria, CA, EUA), conforme especificado pelo fabricante. Para revelação da reação utilizou-se o cromógeno “Permanent Red” (Dako, Carpinteria, CA, EUA), que evidencia a reação através de coloração vermelha. Após incubação com o cromógeno as lâminas foram contraincoradas com hematoxilina de Carazzi e lavadas em água corrente. Em seguida, as lâminas foram montadas com glicerol e lamínulas de vidro.

Como controles positivos foram utilizados espécimes de pele normal para o anticorpo CDK4, amostras de carcinoma de orofaringe para o anticorpo p16 e de carcinoma epidermoide oral para o anticorpo PTEN. Além disso, como todos os anticorpos são positivos em epitélio de revestimento de mucosa, as reações foram observadas no epitélio adjacente às lesões estudadas. O controle negativo foi obtido pela omissão dos respectivos anticorpos primários.

4.6 Análise do perfil imuno-histoquímico

As reações imuno-histoquímicas foram avaliadas em microscopia de luz, de forma qualitativa e semi-quantitativa. Para os anticorpos p16 e CDK4 foram consideradas positivas as células que exibiram coloração acastanhada no núcleo, independente da intensidade de marcação. Em virtude desses marcadores apresentarem marcação nuclear, não houve dificuldade na interpretação entre pigmento de melanina e positividade imuno-histoquímica. Para o anticorpo PTEN, considerou-se positiva uma marcação citoplasmática de coloração vermelha. Em casos de nevos e melanomas com pouco pigmento melânico, as reações também foram observadas com o cromógeno castanho DAB.

As células névicas e as células tumorais do melanoma foram avaliadas em todas as áreas da lesão e os casos foram estratificados em quatro categorias: 0 (expressão negativa), 1 (<5% de

células imunomarcadas), 2 (5-50% de células imunomarcadas) e 3 (>50% de células imunomarcadas).

4.7 Análise dos dados

Após a coleta, os dados foram organizados em um banco informatizado, com o auxílio do programa Excel e do software SPSS, e submetidos inicialmente a análise descritiva. As variáveis qualitativas foram apresentadas na forma de frequências absolutas e relativas, enquanto as variáveis quantitativas foram descritas por meio de média e desvio-padrão. Para avaliar a associação e diferenças entre as variáveis, os dados foram submetidos aos testes estatísticos Exato de Fisher, teste de Razão de Verossimilhança, teste de Associação Linear, teste ANOVA one-way, teste *posthoc* de Tukey, teste de Friedman e teste de Kruskal-Wallis. Foi adotado nível de significância de 5% para todos os testes, sendo considerados significativos os valores de $p \leq 0,05$.

5 RESULTADOS

5.3 Estudo epidemiológico

Entre janeiro de 2001 e setembro de 2019, o Serviço de Patologia Cirúrgica da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo recebeu 64.695 amostras provenientes da região de cabeça e pescoço para análise histopatológica. Desses casos, 341 representavam lesões melanocíticas focais e receberam um dos diagnósticos de interesse deste estudo.

Cento e noventa e um casos foram diagnosticados como mácula melanótica, representando 0,3% de todas as lesões diagnosticadas neste serviço. Cento e doze casos receberam o diagnóstico de nevo melanocítico (0,17% de todas as lesões). Além disso, foram identificados nove casos de lentigo actínico (0,01% de todas as lesões) e 14 casos de lentigo simples de mucosa, representando 0,02% de todas as lesões. Doze casos de melanoma em cavidade oral/cabeça e pescoço foram diagnosticados no serviço no período estudado, representando 0,02% do total de casos. Apenas um caso recebeu o diagnóstico de melanoacantoma, representando somente 0,001% das lesões diagnosticadas.

- ***Mácula melanótica***

Os casos de mácula melanótica foram mais frequentes em pacientes mulheres (64,9%). A idade dos pacientes variou entre 7 e 80 anos, com uma média de 43,2 anos (desvio padrão de 18,4 anos). A maioria dos casos ocorreu em pacientes de cor da pele branca (64,4%), acometendo principalmente vermelhão de lábio/semimucosa (36,6%), caracterizando a mácula melanótica labial, seguido por mucosa jugal com 13,6%. Dos 69 casos de mácula melanótica labial, 15 estavam associados à lesão potencialmente maligna queilite actínica e 122 casos correspondiam à mácula melanótica oral (ocorrendo em mucosas não expostas à radiação solar).

A maior parte das lesões de mácula melanótica apresentou-se como uma mancha enegrecida, com tamanho variando entre 1 mm e 100 mm (média de 7,03 mm e desvio padrão de 11,9 mm). A duração relatada das lesões variou entre 1 mês e 50 anos, com uma média de 41,6 meses de duração (desvio padrão 83,1 meses). Entretanto, em 84 casos (44%) a duração da lesão era desconhecida.

Os resultados das variáveis clínicas e demográficas categóricas para os casos de mácula melanótica estão listados na Tabela 5.1.

Tabela 5.1 - Características clínicas e demográficos dos casos de mácula melanótica oral diagnosticados no Serviço de Patologia Cirúrgica da FOU SP no período de janeiro de 2001 a setembro de 2019

Parâmetro	Número de casos (%)
Sexo	
Masculino	67 (35,1%)
Feminino	124 (64,9%)
Idade	
0 - 10 anos	4 (2,1%)
11 - 20 anos	19 (9,9%)
21 - 30 anos	25 (13,1%)
31 - 40 anos	33 (17,3%)
41 - 50 anos	32 (16,8%)
51 - 60 anos	24 (12,6%)
61 - 70 anos	22 (11,5%)
71 - 80 anos	15 (7,9%)
81 - 90 anos	0 (0%)
> 90 anos	17 (8,9%)
Cor da pele	
Leucoderma	123 (64,4%)
Melanoderma	33 (17,3%)
Xantoderma	11 (5,8%)
Desconhecida	24 (12,6%)
Local anatômico da lesão	
Vermelhão de lábio (semimucosa)	69 (36,1%)
Mucosa jugal	26 (13,6%)
Lábio (mucosa)	25 (13,1%)
Palato	25 (13,1%)
Gengiva	20 (10,5%)
Rebordo alveolar	10 (5,2%)
Língua	4 (2,1%)
Trígono retromolar	3 (1,6%)
Assoalho bucal	2 (1%)
Fundo de sulco	1 (0,5%)
Freio labial	1 (0,5%)
Desconhecido	7 (3,7%)
Aspecto da lesão	
Mancha	86 (60,2%)
Nódulo/pápula	18 (9,4%)
Placa	11 (5,8%)
Desconhecido	76 (39,8%)
Coloração da lesão	
Acastanhada/enegrecida	147 (77%)
Arroxeadada/avermelhada	13 (6,8%)
Acinzentada	8 (4,2%)
Branca	7 (3,7%)
Cor de mucosa normal	2 (1%)
Desconhecida	14 (7,3%)
Total	191 (100%)

Fonte: a autora, a partir dos dados coletados no Serviço de Patologia Cirúrgica da FOU SP.

- ***Lentigo simples de mucosa***

Dos 14 casos diagnosticados como lentigo simples de mucosa, 8 (57,2%) ocorreram em mulheres. A idade dos pacientes variou entre 19 e 68 anos, com média de 46,5 anos (desvio padrão = 16,7 anos). Essas lesões aconteceram principalmente em palato (28,6%) e gengiva (28,6%). O principal aspecto clínico descrito foi o de mancha enegrecida. O tamanho da lesão variou entre 2 e 10 mm, com média de 5 mm (desvio padrão = 2,2 mm). A duração relatada foi de 1 mês a 8 anos (96 meses) e a média de duração foi de 23,2 meses (desvio padrão = 32,3 meses).

Os resultados das variáveis clínicas e demográficas categóricas para os casos de lentigo simples de mucosa estão listados na Tabela 5.2.

Tabela 5.2 - Características clínicas e demográficos dos casos de lentigo simples de mucosa diagnosticados no Serviço de Patologia Cirúrgica da FOUSP no período de janeiro de 2001 a setembro de 2019

Parâmetro	Número de casos (%)
Sexo	
Masculino	6 (42,8%)
Feminino	8 (57,2%)
Idade	
0 - 10 anos	0 (0%)
11 - 20 anos	1 (7,1%)
21 - 30 anos	2 (14,3%)
31 - 40 anos	2 (14,3%)
41 - 50 anos	1 (7,1%)
51 - 60 anos	2 (14,3%)
61 - 70 anos	5 (35,8%)
71 - 80 anos	0 (0%)
81 - 90 anos	0 (0%)
> 90 anos	1 (7,1%)
Cor da pele	
Leucoderma	10 (71,4%)
Melanoderma	2 (14,3%)
Desconhecida	2 (13,3%)
Local anatômico da lesão	
Palato	4 (28,6%)
Gengiva	4 (28,6%)
Rebordo alveolar	1 (7,1%)
Trígono retromolar	1 (7,1%)
Mucosa jugal	1 (7,1%)
Assoalho	1 (7,1%)
Desconhecido	2 (14,3%)
Aspecto da lesão	
Mancha	4 (28,6%)
Nódulo/pápula	1 (7,1%)
Verrucoso	1 (7,1%)
Desconhecido	8 (57,1%)
Coloração da lesão	
Enegrecida	8 (57,1%)
Branca	3 (21,5%)
Acinzentada	2 (14,3%)
Desconhecida	1 (7,1%)
Total	14 (100%)

Fonte: a autora, a partir dos dados coletados no Serviço de Patologia Cirúrgica da FOUSP.

- ***Lentigo actínico (lentigo solar)***

Dos casos diagnosticados como lentigo actínico, a maioria ocorreu em mulheres (66,6%) e 55,6% dos casos ocorreram em pacientes de cor da pele branca, com idade variando entre 11 e 69 anos (média de 47,1 anos, desvio padrão = 22,4 anos). A duração dessas lesões variou entre 6 meses e 7 anos (84 meses), com média de 45 meses (desvio padrão = 29,4 meses). Na maioria dos casos o aspecto clínico não foi informado e 33,3% dos casos de lentigo solar apresentava coloração acastanhada/enegrecida ao diagnóstico. O tamanho dessas lesões variou entre 3 mm e 15 mm, com média de 7,3 mm (desvio padrão = 3,8 mm).

Os resultados das variáveis clínicas e demográficas categóricas para os casos de lentigo solar estão listados na Tabela 5.3.

Tabela 5.3 - Características clínicas e demográficos dos casos de lentigo actínico diagnosticados no Serviço de Patologia Cirúrgica da FOUSP no período de janeiro de 2001 a setembro de 2019

Parâmetro	n(%)
Sexo	
Masculino	3 (33,3%)
Feminino	6 (66,7%)
Idade	
0 - 10 anos	0 (0%)
11 - 20 anos	1 (11,1%)
21 - 30 anos	2 (22,2%)
31 - 40 anos	0 (0%)
41 - 50 anos	1 (11,1%)
51 - 60 anos	2 (22,2%)
61 - 70 anos	3 (33,4%)
71 - 80 anos	0 (0%)
81 - 90 anos	0 (0%)
> 90 anos	0 (0%)
Local anatômico da lesão	
Vermelhão de lábio (semimucosa)	9 (100%)
Cor da pele	
Leucoderma	5 (55,6%)
Xantoderma	1 (11,1%)
Não informada	3 (33,3%)
Aspecto da lesão	
Mancha	1 (11,1%)
Placa	1 (11,1%)
Nódulo/pápula	1 (11,1%)
Não informado	6 (66,7%)
Coloração da lesão	
Acastanhada/enegrecida	3 (33,3%)
Arroxeadada/avermelhada	2 (22,2%)
Branca	2 (22,2%)
Acinzentada	1 (11,1%)
Total	9 (100%)

Fonte: a autora, a partir dos dados coletados no Serviço de Patologia Cirúrgica da FOUSP.

- ***Melanoacantoma***

O único caso diagnosticado como melanoacantoma ocorreu em gengiva de paciente do sexo feminino, 59 anos de idade, leucoderma. A lesão apresentava aspecto de mancha enegrecida, 5 mm de diâmetro e 30 dias de duração.

- ***Nevo melanocítico***

Os casos de nevos melanocíticos orais ocorreram mais comumente em pacientes mulheres (66,8%). A idade ao diagnóstico variou entre 6 anos e 78 anos (média de 36,3 anos e desvio padrão de 17,2 anos). Essa lesão acometeu principalmente pessoas de cor da pele branca (63,1%) e ocorreu mais em região de palato (37,5%), seguida por mucosa jugal (25%). Os casos de nevos melanocíticos foram descritos principalmente como manchas (27,9%), seguidos por nódulos/pápulas (17,1%), de coloração predominantemente enegrecida ou acastanhada (73,9%) entretanto cerca de 50% dos casos estudados não tiveram seu aspecto clínico descrito na ficha.

O tamanho dos casos de nevos melanocíticos variou entre 1 mm e 100 mm de diâmetro, com uma média de 5,6 mm (desvio padrão de 17,2 mm). A duração variou entre 1 mês e 720 meses (60 anos), com média de 86,1 meses (desvio padrão de 123,7 meses).

Os resultados das variáveis clínicas e demográficas categóricas para os casos de mácula melanótica estão listados na Tabela 5.4.

Tabela 5.4 - Características clínicas e demográficos dos casos de nevos melanocíticos orais diagnosticados no Serviço de Patologia Cirúrgica da FOUSP no período de janeiro de 2001 a setembro de 2019

Parâmetro	Número de casos (%)
Sexo	
Masculino	35 (31,2%)
Feminino	74 (66,8%)
Idade	
0 - 10 anos	1 (5,4%)
11 - 20 anos	19 (17%)
21 - 30 anos	19 (17%)
31 - 40 anos	24 (21,4%)
41 - 50 anos	20 (17,9%)
51 - 60 anos	13 (11,6%)
61 - 70 anos	4 (3,6%)
71 - 80 anos	4 (3,6%)
81 - 90 anos	0 (0%)
> 90 anos	3 (2,7%)
Cor da pele	
Leucoderma	71 (63,1%)
Melanoderma	18 (16,2%)
Xantoderma	8 (7,2%)
Desconhecida	15 (13,5%)
Local anatômico da lesão	
Palato	42 (37,5%)
Mucosa jugal	28 (25%)
Lábio (mucosa)	22 (19,6%)
Rebordo alveolar	6 (5,3%)
Vermelhão de lábio (semimucosa)	5 (4,5%)
Trígono retromolar	4 (3,6%)
Gengiva	3 (2,7%)
Assoalho bucal	1 (0,9%)
Desconhecida	1 (0,9%)
Aspecto da lesão	
Mancha	33 (29,4%)
Nódulo/pápula	19 (16,9%)
Placa	4 (3,6%)
Verrucosa	1 (0,9%)
Desconhecido	55 (49,1%)
Coloração da lesão	
Enegrecida/acastanhada	83 (74,1%)
Arroxeadada/avermelhada	9 (8%)
Acinzentada	5 (4,5%)
Cor de mucosa normal	4 (3,6%)
Branca	2 (1,8%)
Desconhecida	9 (8%)
Total	112 (100%)

Fonte: a autora, a partir dos dados coletados no Serviço de Patologia Cirúrgica da FOUSP.

- ***Melanoma***

Dos doze casos de melanoma em cabeça e pescoço identificados, a distribuição por sexo apresentou razão 1:1. Essa lesão ocorreu mais frequentemente em pacientes brancos (66,7%). A maioria dos casos ocorreu em rebordo alveolar (25%), palato (25%) e gengiva (25%). Em um caso, a localização anatômica é desconhecida, sabendo-se apenas que se trata de uma lesão em mucosa oral. A idade dos pacientes variou entre 29 e 78 anos, com média de 56,4 anos e desvio padrão de 14,5 anos. O tamanho da lesão variou entre 12 mm e 100 mm, com média de 44,1 mm e desvio padrão de 32,7 mm. A duração foi de no mínimo 20 dias e no máximo 84 meses (7 anos), com média de 17,1 meses e desvio padrão de 32,8 meses.

Os resultados das variáveis clínicas e demográficas categóricas para os casos de melanoma estão listados na Tabela 5.5.

Tabela 5.5 - Características clínicas e demográficos dos casos de melanoma estudados diagnosticados no Serviço de Patologia Cirúrgica da FOUSP no período de janeiro de 2001 a setembro de 2019

Parâmetro	n(%)
Sexo	
Masculino	6 (50%)
Feminino	6 (50%)
Idade	
0 - 10 anos	0 (0%)
11 - 20 anos	0 (0%)
21 - 30 anos	1 (8,3%)
31 - 40 anos	0 (0%)
41 - 50 anos	3 (25%)
51 - 60 anos	3 (25%)
61 - 70 anos	1 (8,3%)
71 - 80 anos	3 (25%)
81 - 90 anos	0 (0%)
> 90 anos	0 (0%)
Desconhecida	1 (8,3%)
Cor da pele	
Leucoderma	8 (66,7%)
Melanoderma	2 (16,7%)
Xantoderma	1 (8,3%)
Desconhecida	1 (8,3%)
Local anatômico da lesão	
Rebordo alveolar	3 (25%)
Gengiva	3 (25%)
Palato	3 (25%)
Lábio (mucosa)	1 (8,3%)
Mucosa jugal	1 (8,3%)
Desconhecido	1 (7,1%)
Aspecto da lesão	
Nódulo/ulcerado	1 (8,3%)
Mancha	1 (8,3%)
Nódulo/pápula	1 (8,3%)
Desconhecido	9 (75%)
Coloração da lesão	
Enegrecida/acastanhada	6 (50%)
Avermelhada	1 (8,3%)
Branca	1 (8,3%)
Desconhecida	4 (33,3%)
Total	12 (100%)

Fonte: a autora, a partir dos dados coletados no Serviço de Patologia Cirúrgica da FOUSP.

- ***Comparação dos dados clínicos e demográficos entre as lesões estudadas***

No geral, desconsiderando-se as informações desconhecidas, todas as lesões estudadas foram mais comuns em mulheres (65,5%) de cor da pele branca (74%). O principal aspecto clínico relado foi de mancha (67,6%), com coloração enegrecida/acastanhada (80,7%). Não foi observada diferença estatisticamente significativa entre essas variáveis.

As lesões melanocíticas focais ocorreram principalmente em vermelhão/semimucosa de lábio (25,6%), seguida por palato (22,8%), mucosa jugal (17,3%), mucosa labial (14,2%), gengiva (9,2%), rebordo alveolar (5,2%), trígono retromolar (2,5%), assoalho bucal (1,3%), língua (1,3%), fundo de sulco (0,3%) e freio labial (0,3%). Os casos de mácula melanótica foram mais comuns em vermelhão de lábio, enquanto os nevos melanocíticos ocorreram mais em palato. Quando comparadas as distribuições entre local acometido e diagnóstico da lesão, observamos uma associação estatisticamente significativa ($p=0,03$). Os resultados das comparações entre as variáveis categóricas estão listados na Tabela 5.6.

A idade dos pacientes diagnosticados com lesões melanocíticas focais variou de 6 a 80 anos, com média de 41,7 anos e desvio padrão de 18,5 anos. Quando comparados os grupos entre si, observamos maior média de idade em pacientes com melanoma, e essa diferença foi estatisticamente significativa ($p=0,002$). Após o teste *post hoc* observou-se que a diferença significativa entre as médias de idade encontrava-se na comparação entre mácula melanótica e melanoma ($p = 0,04$) e entre nevo melanocítico e melanoma ($p = 0,0008$). A distribuição de idade entre as lesões estudadas pode ser visualizada no Gráfico 1.

Em relação à duração das lesões, os casos de nevo melanocítico apresentaram maior média (86,1 meses), seguida por lentigo solar (45 meses) e mácula melanótica com média de 41,6 meses, entretanto, muitos casos de mácula melanótica (44%) tinham sua duração desconhecida. Os casos de melanoma apresentaram menor média de duração até o momento do diagnóstico (15 meses). A diferença entre a duração das lesões foi estatisticamente significativa ($p=0,02$). A média de duração das lesões é observada no Gráfico 2.

Quanto ao tamanho, a maioria das lesões apresentava-se pequena ao diagnóstico, com médias de tamanho variando em 5 mm e 7,3 mm. Apenas os casos de melanoma apresentaram um tamanho maior quando comparados às outras lesões (média de 49,7 mm), e essa diferença foi

estatisticamente significativa ($p < 0,0001$). O Gráfico 3 mostra a distribuição de tamanho entre as lesões estudadas. Os resultados das comparações entre as variáveis numéricas estão listados na Tabela 5.7.

Tabela 5.6 - Comparação das variáveis clínicas e demográficas categóricas entre as lesões estudadas

Variáveis	Mácula melanótica	Nevo melanocítico	Lentigo simples de mucosa	Lentigo solar	Melanoma	<i>p</i>	Frequência (%)
Sexo							
Feminino	124	74	8	6	6	0,60 ^a	218 (65,5%)
Masculino	67	35	6	3	6		117 (35,5%)
Cor de pele							
Leucoderma	123	71	10	5	8	0,65 ^a	217 (74%)
Melanoderma	33	18	2	1	2		56 (18,9%)
Xantoderma	11	8	0	3	1		23 (7,1%)
Aspecto da lesão							
Mancha	86	32	4	1	1	0,16 ^a	124 (67,7%)
Nódulo/pápula	18	19	1	1	1		40 (21,8%)
Placa	11	4	0	1	0		16 (8,7%)
Úlcera	0	0	0	0	1		1 (0,5%)
Verrucosa	0	1	1	0	0		2 (1,3%)
Coloração da lesão							
Enegrecida/acastanhada	147	83	8	3	6	0,64 ^a	247 (79,9%)
Cor de mucosa normal	2	4	0	0	0		6 (1,9%)
Arroxeadada/avermelhada	13	9	0	3	1		26 (8,5%)
Acinzentada	8	5	2	1	0		16 (5,2%)
Branca	7	2	3	1	1		14 (4,5%)
Local anatômico da lesão							
Lábio (semimucosa)	69	5	0	9	0	0,03 ^b	83 (25,6%)
Palato	25	42	4	0	3		74 (22,8%)
Mucosa jugal	26	28	1	0	1		56 (17,3%)
Lábio (mucosa)	23	22	0	0	1		46 (14,2%)
Gengiva	20	3	4	0	3		30 (9,2%)
Rebordo alveolar	10	3	1	0	3		17 (5,2%)
Trígono retromolar	3	4	1	0	0		8 (2,5%)
Assoalho bucal	2	1	1	0	0		4 (1,3%)
Língua	4	0	0	0	0		4 (1,3%)
Fundo de sulco	1	0	0	0	0		1 (0,3%)
Freio labial	1	0	0	0	0		1 (0,3%)

^a Valor de *p* para o Teste de Razão de Verossimilhança. ^b Valor de *p* para o Teste de associação linear.

Fonte: a autora.

Gráfico 5.1 Box-plot mostrando a idade mínima e máxima e a média de idade (em anos) entre as lesões melanocíticas estudadas.

Fonte: a autora.

Gráfico 5.2 Box-plot da média e desvio padrão da duração (em meses) das lesões melanocíticas estudadas.

Fonte: a autora.

Gráfico 5.3 Box-plot da média e desvio padrão do tamanho das lesões melanocíticas estudadas.

Fonte: a autora.

Tabela 5.7 - Comparação das variáveis clínicas e demográficas numéricas entre as lesões estudadas

Variáveis	Mácula melanótica	Nevo melanocítico	Lentigo simples de mucosa	Lentigo solar	Melanoma	p	Teste post hoc
Idade em anos - μ, $\pm$	43,2 $\pm$ 18,4	36,3 $\pm$ 17,2	46,5 $\pm$ 16,7	47,1 $\pm$ 22,4	56,4 $\pm$ 14,5	0,002 ^a	Mácula x melanoma – p = 0,04* Nevo x melanoma p = 0,0008*
Duração em meses - μ, $\pm$	41,6 $\pm$ 83,1	86,1 $\pm$ 123,7	23,2 $\pm$ 32,3	45 $\pm$ 29,4	17,6 $\pm$ 32,8	0,02 ^a	Mácula x nevo – p = 0,02
Tamanho em mm - μ, $\pm$	7,03 $\pm$ 11,9	5,6 $\pm$ 17,2	5 $\pm$ 2,2	7,3 $\pm$ 3,8	44,1 $\pm$ 32,7	< 0,0001 ^a	Todas as lesões x melanoma – p < 0,0001*

^a Valor de p para o Teste ANOVA one-way. * Valor de p para o Teste de Tukey.

μ - média. $\pm$ - desvio-padrão

Fonte: a autora.

5.2 Estudo morfológico

• *Mácula melanótica*

O levantamento inicial resultou em 196 casos de mácula melanótica, 12 casos foram excluídos por falta de material para análise e 3 casos foram reclassificados como lentigo simples de mucosa. Ao exame histopatológico, confirmou-se que as lesões diagnosticadas como mácula melanótica apresentavam deposição de melanina na camada basal do epitélio, por vezes exibindo incontinência pigmentar e melanófagos em região justaepitelial. Como comentado anteriormente, 15 casos de mácula melanótica labial e estavam associados ao diagnóstico de queilite actínica, com

presença de elastose solar e displasia epitelial. Exemplos de máculas melanóticas são observados na figura 5.1

- ***Lentigo simples de mucosa e lentigo actínico (lentigo solar)***

Em relação aos casos de lentigo simples de mucosa, o levantamento indicou 37 casos que receberam esse diagnóstico e 1 caso diagnosticado como lentigo actínico. Desses casos 5 não apresentavam material para estudo, 11 casos foram reclassificados como mácula, 2 casos se tratavam de nevos juncionais e 8 casos foram reclassificados como lentigo actínico. Histologicamente, os casos de lentigo simples de mucosa demonstraram um aumento no número de melanócitos (células claras) na camada basal do epitélio, com alongamento das cristas epiteliais e aumento na quantidade de deposição de melanina. Para os casos de lentigo solar essas mesmas características foram identificadas, associadas a presença de elastose solar na zona reticular do vermelhão de lábio e com ausência de atipias celular e de figuras de mitose, excluindo o diagnóstico de queilite actínica. Exemplos de lentigo simples de mucosa e lentigo actínico são observados na figura 5.1

Figura 5.1 – Aspectos morfológicos de mácula melanótica, lentigo simples de mucosa e lentigo solar. a) Fotomicrografia em menor aumento exibindo mácula melanótica labial associada a queilite actínica (100x); (b) Detalhe de mácula melanótica labial exibindo pigmentação melânica na camada basal (400x); (c) Fotomicrografia em menor aumento mostrando lentigo simples de mucosa exibindo alongamento das cristas epiteliais (100x); (d) Lentigo simples de mucosa em maior detalhe, exibindo hiperplasia melanocítica ao longo da camada basal (400x). (e) Fotomicrografia em menor aumento exibindo lentigo actínico, com alongamento das cristas epiteliais e área de elastose solar (100X). (f) Maior detalhe de lentigo actínico exibindo hiperplasia melanocítica ao longo da camada basal (400x). Hematoxilina e eosina.

Fonte: a autora.

- ***Melanoacantoma***

Apenas um caso foi diagnosticado como melanoacantoma e o diagnóstico foi confirmado após análise morfológica. Esse caso exibia acantose epitelial com presença de melanócitos dendríticos espalhados pela camada espinhosa do epitélio e queda de pigmento melânico na lâmina própria.

- ***Nevo melanocítico***

Para os nevos melanocíticos, 121 casos receberam esse diagnóstico no primeiro levantamento, entretanto, 11 casos não possuíam material adequado para análise. Histologicamente, os casos de nevos melanocíticos apresentaram diversos padrões de organização celular, com tipos diferentes de células névicas e quantidade de pigmentação variada. Esses casos foram avaliados separadamente e suas características morfológicas foram listadas na tabela 5.8.

Observou-se que o subtipo mais comum de nevo melanocítico foi o nevo intramucoso (45%), seguido por nevo composto (24,3%), nevo azul (20,7%), nevo azul combinado com nevo intramucoso (4,5%) e nevo juncional (3,6%). Além disso, foram identificados um caso de nevo azul combinado com nevo composto (0,9%) e um caso de nevo composto displásico (0,9%).

Todos os tipos de células névicas (A, B, C) estiveram presentes em 70,3% dos casos (Gráfico 5.6). Enquanto 19,8% dos casos apresentaram apenas células tipo C, sendo que todos esses casos correspondiam ao nevo azul. Em relação ao tipo de célula névica predominante, 38,7% dos casos não apresentaram predominância de um tipo celular, enquanto 32,4% exibiram uma quantidade maior de células névicas tipo A e B, e 22,5% dos casos tinham predominância da célula névica tipo C; novamente, que correspondiam a nevos azuis ou nevos azuis combinados.

Diversos padrões de arranjo das células névicas foram observados entre os nevos melanocíticos, sendo identificadas células que se organizavam em tecas (ninhos), lençóis, cordões e células individuais. Cada nevo melanocítico geralmente apresentava uma mistura desses padrões,

sendo que o arranjo mais comum foi o que combinava tecas, lençóis e células individuais (27%), seguido pela combinação de cordões e células individuais (18%). Os casos de nevos azuis apresentavam principalmente arranjo em cordões e células individuais combinados, enquanto os casos de nevos juncionais apresentavam apenas o padrão em tecas. A distribuição do padrão de arranjo celular para cada subtipo de nevo está demonstrada no gráfico 5.4.

A maioria dos casos de nevos melanocíticos apresentaram pigmentação de melanina nas células névicas, sendo apenas quatro casos (3,6%) totalmente amelanóticos e 18 (16,2%) casos com menos de 5% de células névicas pigmentadas (gráfico 5.7). A deposição de melanina nas células névicas geralmente se dava da forma clássica, com maior deposição nas células tipo A mais superficiais. Entretanto, 35 (31,5%) dos casos mostraram mais de 50% das células névicas pigmentadas, sendo que a maioria desses casos (n=29) eram de nevos azuis.

A profundidade de proliferação das células névicas esteve restrita à zona reticular da mucosa oral na maioria dos casos (61,3%), entretanto, em 33,3% a avaliação de profundidade estava comprometida, provavelmente devido a lesão não ter sido removida completamente. O estroma das lesões era constituído por tecido conjuntivo denso em todos os casos, não tendo sido observadas outras alterações. A grande maioria das lesões apresentou-se de forma simétrica, sendo notados apenas dois casos assimétricos. Nenhuma das lesões apresentou área de ulceração, entretanto, em dois casos esse aspecto não pode ser avaliado devido a ausência de epitélio de revestimento suficiente para análise. Em 97,3% dos casos o infiltrado inflamatório era escasso. Nenhum caso estudado apresentou figuras de mitose. Apenas um caso apresentou células névicas com atipia celular e pleomorfismo nuclear evidente e este caso foi diagnosticado como nevo composto displásico.

Em relação à localização anatômica dessas lesões, tanto os nevos intramucosos como nevos compostos ocorreram predominantemente em mucosa jugal e palato, entretanto não houve diferença estatística entre os sítios anatômicos. Já os nevos azuis foram mais comuns em palato, seguido por mucosa labial. A distribuição dos subtipos de nevos melanocíticos orais de acordo com sua localização está demonstrada no gráfico 5.5.

Em relação a idade dos pacientes, tamanho da lesão e duração, não foram observadas diferenças estatisticamente significantes entre as médias para cada subtipo de nevo melanocítico. Os dados destas comparações estão sumarizados na Tabela 5.9. Exemplos dos subtipos de nevos melanocíticos são observados nas figuras 5.2, 5.3 e 5.4.

Figura 5.2 – Aspectos morfológicos de nevos melanocíticos. a) Fotomicrografia em menor aumento exibindo nevo juncional oral (100x); (b) Detalhe de nevo juncional oral exibindo proliferação de células névicas em tecas restritas à camada basal do epitélio (400x); (c) Fotomicrografia em menor aumento mostrando nevo composto oral (100x); (d) Detalhe de nevo composto oral exibindo proliferação de células névicas em camada basal de epitélio e em tecido conjuntivo (400x). (e) Fotomicrografia em menor aumento exibindo nevo intramucoso oral (100X). (f) Detalhe de nevo intramucoso oral exibindo proliferação de células névicas restritas ao tecido conjuntivo (400x). Hematoxilina e eosina.

Fonte: a autora.

Figura 5.3 – Aspectos morfológicos de nevos azuis. (a) Fotomicrografia em menor aumento exibindo nevo azul oral (100x); (b) Detalhe de nevo azul oral exibindo proliferação de células névicas fusiformes altamente pigmentadas (400x); (c) Fotomicrografia em menor aumento exibindo nevo azul combinado com nevo intramucoso (100x); (d) Detalhe de nevo azul combinado com nevo intramucoso exibindo proliferação de células névicas ovóides e fusiformes, com pigmento melânico em região mais profunda (400x). Hematoxilina e eosina.

Fonte: a autora.

Figura 5.4 – Aspectos morfológicos do nevo melanocítico composto displásico (a) Fotomicrografia em menor aumento exibindo nevo melanocítico composto displásico em mucosa oral (100x); (b) Detalhe de nevo melanocítico composto displásico proliferação lentiginosa de células névicas atípicas (400x). Hematoxilina e eosina.

Fonte: a autora.

- ***Melanoma***

Os casos que receberam o diagnóstico de melanoma foram incluídos na sua totalidade, independente de apresentarem material para análise ou não, devido a sua raridade. Oito casos apresentavam lâminas em hematoxilina e eosina para estudo e os outros 4 casos foram analisados através do seu laudo técnico anatomopatológico.

Dos 8 casos analisados, 6 tratavam-se de melanomas primários invasivos, com proliferação de melanócitos atípicos em região juncional do epitélio, de forma radial, e também na profundidade do tecido conjuntivo, com crescimento vertical. As células neoplásicas apresentavam morfologia ora epitelióide, ora ovoide ou plasmocitoide, com diversos graus de atipia celular e nuclear, figuras de mitose aberrantes e áreas exibindo finos grânulos de melanina. Esses casos exibiam proliferação desorganizada das células, sem evidências de maturação celular e áreas de úlcera.

Outro caso exibia proliferação de melanócitos epitelióides ou dendríticos atípicos com núcleos basofílicos, cromatina dispersa, nucléolos evidentes, citoplasmas de limites imprecisos e intensamente pigmentados. Essas células exibiam aumento da relação núcleo citoplasma e proliferavam em arranjos de tecas irregulares nas camadas mais superiores do epitélio de

revestimento e também em camada basal, com aspecto lentiginoso e disseminação pagetoide. Esse caso recebeu o diagnóstico de melanoma *in situ*.

Um dos casos não possuía informações clínicas suficientes em relação ao seu local de acometimento e apresentava grandes dimensões, sem epitélio de revestimento evidente, com proliferação de células atípicas ora pequenas, ovoides, com cromatina frouxa ou hipercromatismo nuclear, ora plasmocitoides. Essas células se organizavam predominantemente em lençol e por vezes tecas, com áreas de aspecto de pseudorosetas. Frequentemente, eram observados depósitos de pigmentos acastanhados de melanina. Nesse caso não foi possível descartar uma possível origem metastática dessa lesão.

Os outros quatro casos que não apresentavam lâminas histológicas para análise foram descritos nos laudos técnicos anatomopatológicos como melanomas primários, exibindo as mesmas características descritas anteriormente. Um dos casos se tratava de um melanoma amelanótico. Exemplos de melanoma oral são observados na figura 5.5.

Figura 5.5 – Aspectos morfológicos do melanoma oral. (a) Fotomicrografia em menor aumento exibindo melanoma em mucosa oral (100x); (b) Detalhe de melanoma oral, exibindo melanócitos atípicos altamente pigmentados proliferando em epitélio e tecido conjuntivo (HE/400x); (c) Fotomicrografia em menor aumento de melanoma em mucosa oral exibindo proliferação em lençol de melanócitos atípicos (100x); (d) Detalhe de melanoma em mucosa oral exibindo melanócitos atípicos epitelioides, com poucas áreas de deposição melânica (400x); Hematoxilina e eosina.

Fonte: a autora.

Tabela 5.8 - Características morfológicas dos casos de nevos melanocíticos diagnosticados no Serviço de Patologia Cirúrgica da FOU SP no período de janeiro de 2001 a setembro de 2019

Parâmetro	Número de casos (%)
Subtipo histológico	
Nevo intramucoso	50 (44,6%)
Nevo composto	27 (24,1%)
Nevo azul	23 (20,5%)
Nevo azul combinado com nevo intramucoso	5 (4,5%)
Nevo juncional	5 (4,5%)
Nevo azul combinado com nevo composto	1 (0,9%)
Nevo composto displásico	1 (0,9%)
Tipos de células névicas presentes	
A, B, C	78 (69,6%)
A, B	5 (4,5%)
C	22 (19,6%)
A	5 (4,5%)
B, C	3 (2,7%)
Tipos de células névicas predominantes	
Sem predominância	43 (38,4%)
A, B	36 (32,1%)
C	25 (22,3%)
A	8 (7,2%)
Padrão de organização das células névicas	
Tecas, lençóis e células individuais	30 (26,8%)
Cordões e células individuais	20 (17,8%)
Tecas e células individuais	18 (16%)
Tecas e lençóis	16 (14,3%)
Tecas, cordões e células individuais	9 (8%)
Lençóis e células individuais	7 (6,3%)
Células individuais	6 (5,4%)
Tecas	6 (5,4%)
Quantidade de pigmento melânico	
0%	4 (3,6%)
1-5%	18 (16,1%)
6-25%	42 (37,5%)
26-50%	13 (11,6%)
>50%	35 (31,2%)
Profundidade da proliferação celular	
Restrita ao epitélio	5 (4,5%)
Zona reticular	68 (60,7%)
Submucosa	2 (1,8%)
Comprometida (não removida completamente)	37 (33%)
Estroma	
Tecido conjuntivo denso	112 (100%)
Simetria da lesão	
Simétrica	110 (98,2%)
Assimétrica	2 (1,8%)

continua

conclusão

Ulceração	
Ausente	110 (98,2%)
Não avaliada (epitélio não representativo)	2 (1,8%)
Infiltrado inflamatório	
Escasso	109 (97,3%)
Moderado	3 (2,7%)
Mitoses	
Ausente	112 (100%)
Atipia celular	
Ausente	110 (98,2%)
Presente	1 (1,8%)
Pleomorfismo nuclear	
Ausente	110 (98,2%)
Presente	1 (1,8%)
Total	112 (100%)

Fonte: a autora.

Gráfico 5.4. Distribuição dos padrões de arranjo celular em cada subtipo de nevo melanocítico oral, referente aos casos diagnosticados no Serviço de Patologia Cirúrgica da FOU SP no período de janeiro de 2001 a setembro de 2019

Fonte: a autora.

Gráfico 5.5. Distribuição dos subtipos de nevos melanocíticos orais de acordo com sua localização anatômica, referente aos casos diagnosticados no Serviço de Patologia Cirúrgica da FOU SP no período de janeiro de 2001 a setembro de 2019

Fonte: a autora.

Gráfico 5.6. Distribuição dos tipos de células névicas presentes nos nevos melanocíticos orais diagnosticados no Serviço de Patologia Cirúrgica da FOU SP no período de janeiro de 2001 a setembro de 2019

Fonte: a autora.

Gráfico 5.7. Distribuição da porcentagem de pigmento melânico presente nos nevos melanocíticos orais diagnosticados no Serviço de Patologia Cirúrgica da FOU SP no período de janeiro de 2001 a setembro de 2019

Fonte: a autora.

Tabela 5.9 - Comparação das variáveis clínicas e demográficas numéricas entre os subtipos de nevos melanocíticos, diagnosticados no Serviço de Patologia Cirúrgica da FOU SP no período de janeiro de 2001 a setembro de 2019

Variáveis	Nevo intramucoso	Nevo composto	Nevo azul	Nevo azul combinado	Nevo juncional	Nevo composto displásico*	p
Idade em anos - μ, $\pm$	34,1 $\pm$ 15,9	34,8 $\pm$ 18,1	43,1 $\pm$ 14,8	43,3 $\pm$ 25,7	16,3 $\pm$ 10,7	40	0,09^a
Duração em meses - μ, $\pm$	92 $\pm$ 110,4	115,6 $\pm$ 197,3	44,7 $\pm$ 70,2	72 $\pm$ 50,9	–	–	0,39^a
Tamanho em mm - μ, $\pm$	5,9 $\pm$ 14,3	4,1 $\pm$ 2,1	7,3 $\pm$ 10,9	3,4 $\pm$ 1,1	7,5 $\pm$ 8,4	5	0,92^a

Fonte: a autora.

^a Valor de p para o Teste ANOVA one-way. *Apenas um caso identificado. – Duração desconhecida. μ - média. $\pm$ - desvio-padrão.

5.4 Estudo imuno-histoquímico

Para o estudo imuno-histoquímico, as proteínas CDK4, p16 e PTEN foram avaliadas de forma semi-quantitativa em 42 casos de nevos melanocíticos (27 nevos intramucosos, 12 nevos compostos, dois nevos azuis combinados, um nevo juncional) e cinco casos de melanoma (sendo quatro melanomas orais primários e um melanoma de origem incerta).

O anticorpo CDK4 exibiu expressão nuclear escore 2 (6%-50%) em 20 (47,6%) casos de nevos melanocíticos e expressão escore 3 (>50%) em 22 (52,4%) casos. Nos melanomas, essa expressão foi categorizada como escore 3 (>50%) em todos os casos estudados. Não houve associação estatística entre as lesões estudadas e a expressão de CDK4 (Tabela 5.10).

O anticorpo p16 apresentou baixa expressão imuno-histoquímica nuclear nos casos de nevos melanocíticos orais, sendo que 2 (4,8%) foram completamente negativos (escore 0) e 40 (95,2%) apresentaram marcação positiva em menos de 5% das células tumorais (escore 1). Nos casos de melanoma, a expressão imuno-histoquímica de p16 foi notavelmente maior, com todos os casos exibindo escore 2 (6%-50% das células tumorais positivas). Para a comparação estatística, os dois casos de nevos que apresentaram p16 negativo (escore 0) foram agrupados aos casos com expressão imuno-histoquímica menor que 5% (escore 1). Observou-se associação estatisticamente significativa entre as lesões estudadas e os escores de marcação de p16 (Tabela 5.10).

O anticorpo PTEN apresentou alta expressão citoplasmática e por vezes nuclear e citoplasmática (escore 3, >50% das células imunopositivas) em 41 (97,6%) dos casos de nevos melanocíticos orais. Apenas um caso apresentou expressão de PTEN escore 2 (6%-50% das células imunopositivas). Todos os casos de melanoma apresentaram expressão de PTEN escore 3 (>50%) e essa marcação foi predominantemente nuclear e citoplasmática. Não houve associação estatística entre as lesões estudadas e a expressão de PTEN (Tabela 5.10).

Para efeitos de comparação estatística entre as proteínas estudadas, os escores de marcação imuno-histoquímica de 0 a 3 foram considerados como uma variável quantitativa discreta e os testes de Friedman e de Kruskal-Wallis foram realizados. Observou-se uma diferença estatisticamente significativa entre a expressão das proteínas estudadas, tanto em nevos melanocíticos quanto em melanomas. Estes dados estão resumidos na Tabela 5.11.

Não foram observadas associações entre os subtipos de nevos melanocíticos e a expressão imuno-histoquímica das proteínas estudadas.

Exemplos das reações imuno-histoquímicas em nevos melanocíticos e melanomas podem ser observados nas figuras 5.6 e 5.7.

Tabela 5.10 – Comparação da expressão imuno-histoquímica de PTEN, CDK4 e p16 entre nevos melanocíticos e melanoma orais diagnosticados no Serviço de Patologia Cirúrgica da FOUSP no período de janeiro de 2001 a setembro de 2019

	PTEN		p	CDK4		p	p16		p
	6-50%	>50%		6-50%	>50%		0/1-5%	6-50%	
Nevo melanocítico	1	41	1,00 ^a	20	22	0,06	42	0	<0,0001
Melanoma	0	5		0	5		0	5	

^a Valor de p para o Teste Exato de Fisher

Fonte: a autora.

Tabela 5.11 – Expressão imuno-histoquímica de PTEN, CDK4 e p16 em nevos melanocíticos e melanoma orais diagnosticados no Serviço de Patologia Cirúrgica da FOUSP no período de janeiro de 2001 a setembro de 2019

	PTEN	CDK4	p16	p
Nevo melanocítico				
0 (negativo)	0	0	2 (4,8%)	<0,0001 ^a
1 (1-5%)	0	0	40 (95,2%)	
2 (6-50%)	1 (2,4%)	20 (47,6%)	0	
3 (>50%)	41 (97,6%)	22 (52,4%)	0	
Melanoma				
0 (negativo)	0	0	0	0,001 ^b
1 (1-5%)	0	0	0	
2 (6-50%)	0	0	5 (100%)	
3 (>50%)	5 (100%)	5 (100%)	0	

^a Valor de p para o Teste de Friedman. ^b Valor de p para o Teste de Kruskal-Wallis.

Fonte: a autora.

Figura 5.6 – Fotomicrografias com exemplos da imunexpressão dos marcadores estudados em nevos melanocíticos orais. (a-f) DAB, (g,h) Permanent red®. (a) CDK4, imunexpressão nuclear e citoplasmática (100x); (b) CDK4 (400x); (c) p16, imunexpressão nuclear (100x); (d) p16 (400x) (e) PTEN, imunexpressão nuclear e citoplasmática (100x); (f) PTEN (400x); (g) PTEN, imunexpressão citoplasmática (100x); (h) PTEN (400x).

Fonte: a autora.

Figura 5.7 – Fotomicrografias com exemplos da imunoexpressão dos marcadores estudados em melanomas orais. (a-e) DAB, (f) Permanent red®. (a,b) CDK4, imunoexpressão nuclear e citoplasmática (400x); (c,d) p16, imunoexpressão nuclear e citoplasmática (400x); (e) PTEN, imunoexpressão nuclear e citoplasmática (400x); (f) PTEN, imunoexpressão citoplasmática (400x).

Fonte: a autora.

6 DISCUSSÃO

Este estudo surgiu com a necessidade de conhecer mais profundamente a morfologia e epidemiologia das lesões focais relacionadas aos melanócitos da mucosa oral, que, por se tratarem de condições incomuns, podem gerar dúvidas no momento do diagnóstico histopatológico, principalmente para patologistas ainda inexperientes. Essas lesões incluem mácula melanótica oral e labial, nevo melanocítico, melanoacantoma, lentigo simples de mucosa, lentigo solar e melanoma oral. Espera-se, com esta pesquisa, contribuir para uma melhor compreensão e diagnóstico mais acurado dessas desordens.

Em mucosa oral, a presença de pigmentação e a produção alterada de melanina está relacionada a fatores genéticos, metabólicos, endócrinos, químicos ou físicos; entretanto, a etiologia de muitas pigmentações orais permanece incerta (51). Poucos estudos avaliaram as lesões melanocíticas focais de boca de forma independente e, em geral, as pesquisas relataram a frequência total dessas lesões em conjunto com condições pigmentadas não melanocíticas — apesar de suas diferentes etiologias — ou relatam apenas um grupo específico de lesões melanocíticas orais, como os nevos ou melanomas. Neste estudo não foram consideradas as lesões pigmentadas não melanocíticas, como a tatuagem por amálgama, nem as lesões melanocíticas de etiologia conhecida, como a hipermelanose do fumante, a melanose racial ou as pigmentações multifocais sabidamente causadas por distúrbios endócrinos, como as da doença de Addison. Entretanto, é preciso reconhecer a limitação de se realizar um estudo retrospectivo, no qual as informações foram coletadas a partir das fichas clínicas preenchidas e enviadas pelos profissionais responsáveis pela biópsia. Mediante isto, nem todas as informações demográficas relacionadas aos casos estudados estavam disponíveis.

Deve-se destacar que um estudo epidemiológico semelhante foi conduzido neste mesmo Serviço, no período entre 1970 e 2001 (15). Para evitar viés entre as comparações, optou-se por incluir apenas os casos diagnosticados após o último registro investigado por este autor.

O presente estudo demonstrou um total de 341 lesões melanocíticas focais em mucosa oral e labial, diagnosticadas num período de 18 anos, dentre 64.695 espécimes recebidos para análise histopatológica no Serviço de Patologia Cirúrgica da FOUSP, representando um total de 0,53% de

todas as lesões avaliadas. Infelizmente, esses casos não representam a totalidade de casos diagnosticados como alguma das doenças de interesse deste estudo, devido a ausência de material para estudo morfológico. De toda forma, apenas 28 casos foram excluídos, o que não afeta significativamente os resultados deste estudo. A frequência de lesões melanocíticas focais de mucosa oral esteve de acordo com os resultados já descritos previamente na literatura, comprovando a natureza incomum dessas desordens (13,15,16).

A lesão melanocítica focal mais frequente dentre as estudadas foi a mácula melanótica, representando 56% de todas as lesões estudadas, corroborando o descrito na literatura (13,15,16). Apesar de serem mais comuns que outras pigmentações orais, a real frequência de máculas melanóticas pode estar subestimada, já que nem sempre são submetidas a biópsia e encaminhadas para exame histopatológico. Isso pode ocorrer porque algumas máculas são diagnosticadas apenas com avaliação clínica e histórico médico do paciente (16).

Este estudo comprovou a maior frequência da mácula melanótica em pacientes do sexo feminino, achado já descrito em estudos anteriores (13,14,16,18). Pesquisadores sugerem que alterações hormonais no estrógeno poderiam possivelmente justificar surgimento de lesões melanocíticas em mulheres, entretanto essa relação ainda não foi comprovada (16). Assim como nesses estudos, a idade dos pacientes no momento do diagnóstico variou consideravelmente, acometendo principalmente pacientes na quinta década de vida e leucodermas. Esse achado, apesar de relevante, deve ser tratado com cautela, principalmente em estudos conduzidos no Brasil, por se tratar de um país com elevada miscigenação racial. Neste sentido, não é possível afirmar que todos os pacientes declarados como de cor branca eram realmente leucodermas. Outra limitação é que a ficha de exame anatomopatológico deste Serviço não conta com a opção “feoderma/pardo”, o que pode induzir o profissional a assinalar a opção “leucoderma/branco”.

O tamanho médio relatado dessa lesão foi de 7,03 mm, semelhante aos achados descritos previamente (14) e um pouco maior do que o relatado por outros estudos (16,18), que observaram que as máculas menores do que 5 mm. A duração da lesão reportada pelos pacientes variou entre 1 mês a 50 anos, entretanto, esse número não necessariamente indica o tempo exato do aparecimento da lesão e sim há quanto tempo o paciente notou a presença da lesão antes de procurar atendimento. Ainda assim, a duração da lesão era desconhecida ou não relatada em 44% dos casos diagnosticados com mácula melanótica. A literatura aponta que as máculas melanóticas têm

duração relatada de “vários meses” a “vários anos”(18), comprovando o comportamento indolente e curso completamente benigno dessas lesões.

O principal sítio de acometimento de máculas melanóticas foi o vermelhão de lábio (36,1%), corroborando os dados descritos previamente (13,14,16,18). A etiologia das máculas melanóticas orais e labiais é desconhecida e pode representar processos fisiológicos ou reativos, entretanto, a maior ocorrência de máculas melanóticas em lábio indica uma relação com a exposição à radiação ultravioleta (UV) do Sol. Dentro deste contexto, este estudou demonstrou que 15 casos de mácula melanótica labial estavam associados à lesão potencialmente maligna queilite actínica, que sabidamente está diretamente relacionada com a exposição crônica à radiação UV. Dessa forma, o número de máculas melanóticas labiais pode ser maior do que o aqui descrito, já que mais casos diagnosticados como queilite actínica podem estar associados a essa lesão. Todavia, para estimar esse número corretamente, todos os cerca de 1000 casos diagnosticados neste Serviço nos últimos 18 anos como queilite actínica precisariam ser revisados histologicamente, entretanto, esse não era o escopo deste trabalho.

Em relação às outras lesões melanocíticas orais não neoplásicas, observou-se apenas 14 casos de lentigo simples de mucosa nesta amostra. O diagnóstico dessas lesões em mucosa oral é controverso e alguns autores citam que os lentigos simples são exclusivos de pele (11). Todavia, assim como as outras lesões pigmentadas focais ocorrem tanto em pele quanto em mucosas, acredita-se que o diagnóstico de lentigo simples de mucosa deva ser considerado para lesões que apresentam alongamento das cristas epiteliais, com proliferação melanocítica aumentada na camada basal e aumento da pigmentação melânica nos melanócitos e queratinócitos adjacentes. Os casos observados neste estudo acometeram ligeiramente mais mulheres brancas, com aspecto clínico semelhante ao das máculas melanóticas (manchas enegrecidas/acastanhadas) e ocorreram principalmente em palato e gengiva.

A literatura recente não cita casos de lentigo simples em mucosa oral, entretanto, em um estudo (52) que revisou todos os casos de lesões melanocíticas orais no Instituto de Patologia das Forças Armadas (AFIP) os pesquisadores identificaram 11 casos compatíveis como lentigo simples de mucosa, dentre 135 lesões melanocíticas estudadas. Entretanto, os autores não relataram os dados clínicos específicos para essas lesões, inviabilizando a possibilidade comparações (52). Em uma revisão de 6 casos denominados “hiperplasia melanocítica da mucosa oral”, Buchner et al. (53) relataram dois casos diagnosticados como lentigo simples de mucosa, sendo um caso

localizado em região de mucosa labial e vermelhão de lábio e o outro em gengiva, ambos em pacientes jovens do sexo feminino.

O estudo (15) realizado anteriormente em nosso Serviço identificou 29 casos de lentigo simples de mucosa na amostra estudada. O autor relatou que os casos de lentigo simples foram mais comuns em lábio inferior e superior, entretanto, o estudo não menciona se os casos estavam localizados em mucosa labial ou vermelhão de lábio; também não é citada se existia associação com a elastose solar, então não possível desconsiderar que alguns desses casos se tratem na verdade de lentigo actínico. No presente estudo, 8 casos que originalmente receberam o diagnóstico de lentigo simples de mucosa foram reclassificados como lentigo actínico, por estarem localizados em vermelhão de lábio e associados à elastose solar.

O fato do presente estudo e da pesquisa de Sousa (15) terem sido conduzidos no mesmo serviço de diagnóstico traz à tona o questionamento de como essas lesões são diagnosticadas em outros centros, e se são diagnosticadas como máculas melanóticas ou sob outro termo relacionado à proliferação ou hiperplasia melanocítica.

Apesar de serem lesões benignas e semelhantes à mácula melanótica, o diagnóstico correto de lentigo simples é importante, principalmente porque essas lesões exibem hiperplasia melanocítica, ao contrário das máculas nas quais se observa apenas um aumento na deposição de melanina. Devido à raridade dessas lesões, não é possível prever seu comportamento clínico; pesquisadores, no entanto, sugerem que possam ser lesões precursoras de nevos juncionais (11,21). Ressalta-se que, na presente amostra, dois casos diagnosticados previamente como lentigo simples de mucosa foram reclassificados como nevo juncional, já que apresentavam proliferação de células melanocíticas organizadas em tecas. Este achado pode ter ocorrido após aprofundamento dos cortes para realização de novas lâminas para estudo histopatológico e, portanto, as tecas poderiam não estar presentes nos cortes examinados pelos patologistas durante o diagnóstico inicial. Além disso, três casos originalmente diagnosticados como mácula melanótica foram reclassificados como lentigo simples de mucosa. Diante disso, sugere-se que, frente a espécimes com suspeita de hiperplasia melanocítica na camada basal do epitélio, o material seja aprofundado para análise mais detalhada da lesão.

A mesma questão se aplica para os casos de lentigo solar, tendo em vista que a literatura disponível não comenta a ocorrência dessas lesões em vermelhão de lábio. Acredita-se que esses casos são diagnosticados primariamente como queilite actínica, já que estão associados à presença

de elastose solar. Porém, essas lesões não exibem alterações arquiteturais e citológicas, apenas um aumento da proliferação melanocítica na camada basal das cristas epiteliais. Desta forma, assim como para as máculas melanóticas labiais, o número de casos de lentigo solar é provavelmente subestimado. Frente a casos que exibem elastose solar e algum grau de displasia epitelial — mesmo que também demonstrem características de lentigo actínico — o patologista tende a priorizar o diagnóstico de queilite actínica, por se tratar de uma desordem potencialmente maligna, e acaba desconsiderando o diagnóstico secundário de lentigo actínico ou mácula melanótica, por não apresentarem comportamento clínico de risco.

Neste estudo apenas um caso foi diagnosticado como melanoacantoma, representando 0,001% de todas as lesões diagnosticadas neste Serviço e 0,3% das lesões melanocíticas focais em mucosa oral. A frequência de melanoacantoma dentre as lesões melanocíticas orais relatada na literatura variou entre 0,9% (13) a 1,3% (16). Outros estudos não relataram casos de melanoacantoma nas amostras investigadas, comprovando a raridade dessa lesão em mucosa oral (15,17,52,54).

No que diz respeito às neoplasias melanocíticas orais, os nevos melanocíticos foram os mais frequentes, compreendendo 32,8% de todas as lesões melanocíticas estudadas. A frequência de nevos melanocíticos orais dentre as lesões pigmentadas em diferentes amostras varia entre 11,8% (13) a 40,8% (16). A frequência de nevos melanocíticos dentre as lesões orais e maxilofaciais diagnosticadas neste Serviço foi de 0,17%. A literatura reporta frequências de nevos melanocíticos orais variando entre 0,1% (13) a 0,27% (16).

Assim como as máculas melanóticas, os nevos melanocíticos ocorreram mais frequentemente em mulheres leucodermas, comprovando a maior frequência para esse sexo e cor da pele, concordando com pesquisas realizadas previamente (13,16,27,55,56). Essas lesões foram diagnosticadas principalmente em pacientes na quarta década de vida, com uma idade média de 36,3 anos, o que está de acordo com relatos prévios (13,55,56).

Ainda em concordância com estudos anteriores, a maioria dos nevos melanocíticos apresentava-se como uma lesão pequena, com menos de 1 cm de diâmetro e geralmente de coloração acastanhada/enegrecida (16,55,56). Apesar de ser uma lesão predominantemente pequena, foi identificado neste estudo um caso com 10 cm de diâmetro ocorrendo em mucosa labial de paciente negra de 9 anos de idade. Em casos como esse, o diagnóstico clínico pode ser desafiador

e incluir outras neoplasias ou processos proliferativos, como a lesão periférica de células gigantes e o granuloma piogênico, dentre os diagnósticos diferenciais.

Os nevos melanocíticos orais desta amostra ocorreram mais frequentemente em palato e mucosa jugal, em concordância com os resultados relatados anteriormente (13,16,55,56). Apenas um estudo (27) relatou que a segunda localização mais comum para essas lesões era o fundo de sulco, com um total de 29 casos. Não obstante, o presente estudo não observou nenhum caso de nevo melanocítico ocorrendo na região de fundo de sulco.

Quanto aos aspectos histopatológicos, este estudo demonstrou que o nevo intramucoso foi o subtipo mais comum em mucosa oral, seguido por nevo azul. Esses resultados corroboram os descritos na literatura (13,16,27,55,56). Por sua vez, os nevos juncionais são infrequentes na mucosa oral (56) e neste estudo apenas 5 casos foram observados.

Os nevos displásicos são ainda mais raros em mucosa oral, tendo sido observado apenas um caso nesta amostra. Esse caso consistia em um nevo composto, apresentando menos de 5% de células pigmentadas, localizado em mucosa jugal de paciente do sexo feminino. As células névicas exibiam pleomorfismo celular e nuclear, por vezes binucleadas, exibindo alguns núcleos picnóticos e eventualmente, nucléolos evidentes. Em relação à arquitetura, o caso apresentava proliferação lentiginosa de melanócitos da camada basal, entretanto, exibia um padrão de maturação organizado e ausência de figuras de mitose. Ferreira et al. (55) demonstraram a presença de dois nevos intraorais displásicos na amostra estudada, curiosamente esses casos consistiam em nevos juncionais displásicos.

Por serem raros em cavidade oral, o comportamento biológico dos nevos displásicos é desconhecido. Buchner et al. (13) relataram 5 casos de “proliferação melanocítica atípica oral” dentre 773 lesões pigmentadas de mucosa oral. Esses autores utilizaram essa designação para indicar lesões de difícil diagnóstico que apresentavam um aumento no número de melanócitos com morfologia alterada na interface epitélio/tecido conjuntivo, mas nas quais as alterações não eram intensas o suficiente para justificar o diagnóstico de melanoma *in situ*. Diante dos poucos relatos de nevos melanocíticos displásicos ou de proliferação melanocítica atípica em cavidade oral, o diagnóstico histopatológico dessas lesões permanece desafiador e os critérios para diagnóstico ainda não estão estabelecidos de forma clara.

A literatura relata que os nevos intramucosos e nevos azuis são os mais frequentes em mucosa oral, ocorrendo principalmente em mucosa jugal e palato (13,55,56). Essa mesma

distribuição foi observada no estudo atual. Observou-se, na literatura prévia, que os nevos compostos também são mais frequentes em mucosa jugal (13,16,27,55,56).

Nesta amostra, os nevos juncionais foram diagnosticados em pacientes mais jovens, com média de 16,3 anos, quando comparados com nevos intramucosos (média de 34,1 anos), nevos compostos (média de 34,8 anos) e nevos azuis (média de 43,3 anos). Essa diferença entre faixas etárias também foi observada por outros estudos (13,16,55). Essa observação pode sugerir que os nevos juncionais realmente evoluam para nevos compostos e por isso não sejam diagnosticados em pessoas mais velhas, assim como proposto na literatura, entretanto essa relação ainda precisa ser elucidada (11). Quanto ao tamanho e a duração relatada da lesão, não foram observadas diferenças entre os subtipos de nevos melanocíticos.

Dentre as lesões melanocíticas de boca, a mais preocupante é o melanoma oral, por se tratar de uma neoplasia bastante agressiva e de prognóstico sombrio. Felizmente, os melanomas primários de mucosa oral são lesões raras e apenas 12 casos foram diagnosticados nesta amostra, com uma frequência total de 0,02% de todas as lesões diagnosticadas neste Serviço e 3,52% das lesões melanocíticas focais de boca. Essa frequência foi um pouco maior do que a observada em estudos anteriores (13,16). Isto pode ter ocorrido devido ao Serviço de Patologia Cirúrgica da FOU SP ser um centro de referência em patologia oral e maxilofacial e receber amostras provenientes de todo o país para análise ou consulta. Por sua vez, um estudo de 1970 (52) reportou um total impressionante de 42 casos de melanoma oral em uma amostra de 135 lesões melanocíticas orais coletadas na AFIP. As diferenças nessas frequências podem ter ocorrido devido a AFIP ter sido um centro de referência de diagnóstico em patologia nos Estados Unidos no setor militar.

Neste estudo, as lesões de melanoma oral ocorreram com distribuição igual entre homens e mulheres, de cor da pele branca, acometendo principalmente rebordo alveolar, gengiva e palato. Esses pacientes encontravam-se principalmente nas 5^a, 6^a e 8^a décadas de vida, com média de 56,4 anos. Essas lesões ocorreram principalmente em palato e rebordo alveolar e se apresentavam principalmente como lesões escurecidas ou acastanhadas, conforme observado por estudos prévios (13,16).

Comparativamente, os casos de melanoma oral ocorreram em pacientes mais velhos do que pacientes com máculas melanóticas e os nevos melanocíticos. Apesar disso, uma paciente com 27 anos de idade foi diagnosticada com melanoma *in situ* em gengiva. Casos de melanoma oral

primário em pacientes com 22 e 27 anos de idade também já foram relatados na literatura (13,57). Esses casos ressaltam que apesar do melanoma oral ser uma lesão diagnosticada principalmente em pacientes mais velhos, é preciso estar atento à sua ocorrência em adultos jovens.

Em relação ao tamanho e duração das lesões melanocíticas orais, observou-se que os melanomas apresentavam maior tamanho e menor média de duração quando comparados às lesões melanocíticas orais benignas. Este fato justifica-se pela agressividade do melanoma oral, que geralmente apresenta-se como uma lesão de tamanho e pigmentação irregular, que pode exibir crescimento rápido e áreas de ulceração, o que leva os pacientes a buscarem atendimento profissional mais rapidamente. Notou-se, ainda, que as máculas melanóticas tiveram um menor tempo de duração quando comparadas aos nevos melanocíticos. Como a maioria das máculas melanóticas ocorreram principalmente em vermelhão de lábio, ao contrário dos nevos que ocorreram mais em palato e mucosa jugal, é justificável que pacientes tenham buscado atendimento mais rápido, por se tratar de uma área em que a estética pode estar comprometida.

No estudo morfológico, as lesões estudadas apresentavam características morfológicas condizentes com seus diagnósticos, com exceção daquelas que foram reclassificadas como máculas melanóticas, nevos juncionais, lentigo simples de mucosa e lentigo actínico, conforme abordado anteriormente.

Este estudo observou a organização morfológica de todos os 112 nevos melanocíticos identificados na amostra. A maioria dos casos avaliados apresentou características morfológicas usuais, com presença das células névicas tipo A, B e C. Um achado interessante foi que um terço dos casos estudados tinha a profundidade comprometida, o que pode ter ocorrido devido à realização de biópsia incisional ou remoção incompleta da lesão. Outro ponto a ser ressaltado foi que 18 casos apresentavam menos de 5% de células pigmentadas e 4 casos eram completamente amelanóticos, isso justifica algumas lesões terem sido descritas como arroxeadas/avermelhadas, acinzentadas, brancas ou com cor de mucosa normal. Nestes casos, tanto o diagnóstico clínico quanto histopatológico pode ser desafiador. Para tanto, estudos de imuno-histoquímica são recomendados para identificar a origem da lesão. Os marcadores mais recomendados na literatura e também utilizados neste Serviço são S-100, Melan-A e HMB45.

Para o estudo imuno-histoquímico, a presente pesquisa avaliou a expressão de três proteínas importantes para o ciclo celular e supressão tumoral: CDK4, p16 e PTEN. Esse estudo foi realizado

somente em casos de nevo melanocítico e melanoma oral, por se tratarem de lesões melanocíticas neoplásicas.

Observou-se elevada expressão de CDK4 tanto em nevos melanocíticos como em melanomas orais. Apesar de estar diretamente relacionada à p16, esta é uma proteína ainda pouco investigada em lesões melanocíticas de uma forma geral e sua expressão não foi relatada em lesões melanocíticas de mucosa oral. A expressão imuno-histoquímica de CDK4 é tipicamente nuclear e já foi descrita como positiva em queratinócitos da mucosa oral normal, assim como em displasias orais, líquen plano e carcinoma epidermoide oral (58,59). Diante disto, o epitélio de revestimento da mucosa presente nos casos analisados no presente estudo foi utilizado como controle positivo interno.

Todos os casos de nevos melanocíticos apresentaram expressão de CDK4 escore 2 (6%-50% das células marcadas) ou escore 3 (>50% das células marcadas), e não houve diferenças entre as expressões entre os subtipos histológicos de nevos melanocíticos. Os 5 casos de melanoma estudados apresentaram CDK4 com escore 3. Curiosamente, a maioria dos casos de nevos melanocíticos e todos os melanomas apresentaram expressão imuno-histoquímica de CDK4 tanto nuclear quanto citoplasmática. De forma semelhante, outro estudo (47) relatou uma expressão moderada de CDK4 em casos de melanomas cutâneos primários e metastáticos e nevos melanocíticos cutâneos. Os autores citaram que todos os nevos melanocíticos apresentavam expressão de CDK4 em mais de 5% das células, sendo a maioria entre 26%-50%. Entretanto, a localização dessa expressão imuno-histoquímica não foi relatada (47). Em um estudo com 139 melanomas cutâneos agressivos, pesquisadores (48) demonstraram expressão nuclear de CDK4 em 96% dos casos e expressão citoplasmática em 95%. Desses casos, 56% apresentaram expressão nuclear de CDK4 considerada alta e apenas 6 casos (4%) foram negativos.

Por outro lado, uma pesquisa que avaliou a expressão de CDK4 em nevos melanocíticos cutâneos, nevos de Spitz e melanomas cutâneos, relatou completa ausência de expressão dessa proteína nas lesões benignas estudadas (60). Em contraste, 58% dos casos de melanomas estudados por Wang et al. (60) exibiram elevada expressão nuclear e citoplasmática de CDK4. Todavia, estes autores relatam que nenhuma expressão nuclear de CDK4 foi identificada em controle de pele normal, o que pode justificar a ausência dessa proteína nos casos de nevos melanocíticos. Essas discrepâncias podem ter ocorrido também por particularidades do anticorpo utilizado, que foi policlonal nos estudos de Wang et al. (60) e de Bachmann et al. (48) e monoclonal na presente

pesquisa, assim como no estudo de Georgieva et al. (47), embora tenham utilizado um clone diferente.

Recentemente, pesquisadores demonstraram em células HeLa que a proteína CDK4, durante a transição entre metáfase e anáfase, é degradada pelo ciclossomo/complexo promotor de anáfase (APC/C), enquanto a sua proteína reguladora ciclina D1 permanece intacta. Além disso, foi provado que na fase G1 subsequente, CDK4 volta a se acumular e transita entre citoplasma e núcleo para facilitar a importação de ciclina D1 e que sem CDK4 a ciclina D1 não consegue entrar no núcleo. Portanto, mutações que desequilibrem a interação entre essas duas proteínas prejudicam o funcionamento correto de CDK4 (61). Esses resultados podem justificar a expressão citoplasmática de CDK4 nos casos de nevos melanocíticos e melanomas estudados e indicam uma possível desregulação dessa proteína na patogênese dessas lesões.

Dentre as proteínas inibidoras de ciclinas dependentes de quinases (CDKIs) uma das mais estudadas em lesões melanocíticas, em especial o melanoma, é a proteína p16. Isso ocorre em parte pela relação direta de alterações no cromossomo 9p21, que inclui o gene CDKN2A que sintetiza p16, ao melanoma familiar. O papel de p16 na patogênese de melanomas parece estar associado à indução de senescência celular, mantida pelas vias p53/p21 e p16/pRb (41,62). Em dermatopatologia, o uso de um painel de imuno-histoquímica com p16/HMB45/Ki-67 tem sido relatado como eficiente na distinção entre lesões melanocíticas benignas e malignas, sendo que a expressão de p16 frequentemente está aumentada em nevos melanocíticos ou nevos de Spitz, quando comparados aos casos de melanoma (42,63,64).

Em relação à p16, este estudo demonstrou uma expressão imuno-histoquímica muito baixa dessa proteína em casos de nevos melanocíticos, sendo que 40 casos apresentaram menos de 5% de células névicas p16-positivas (escore 1) e 2 casos foram completamente negativos (escore 0). Todos os casos estudados apresentaram queratinócitos positivos no epitélio de revestimento, servindo como controle positivo interno. Os 5 casos de melanoma estudados exibiram p16 escore 2 (6%-50%) das células positivas, e 3 em desses casos a expressão imuno-histoquímica de p16 foi nuclear e citoplasmática.

Uma revisão sistemática recente sumarizou os dados de 42 estudos relatando a expressão imuno-histoquímica de p16 dentre diferentes lesões melanocíticas cutâneas. Os autores observaram que a expressão de p16 foi considerada positiva em 61% a 100% dos casos de nevos melanocíticos, enquanto essa expressão foi positiva em 12% a 93% dos casos de melanomas, e em casos de

melanomas metastáticos a expressão de p16 foi positiva entre 0% e 71%. Todavia, os autores não relatam quais critérios foram utilizados para determinar a positividade da análise imuno-histoquímica, já que cada estudo utiliza diferentes metodologias. De toda forma, o estudo relatou que parecia haver uma tendência à diminuição na expressão de p16 entre lesões melanocíticas benignas e melanomas avançados (especialmente lesões metastáticas), mas concluíram que esta proteína sozinha não é suficiente para distinguir entre lesões melanocíticas benignas e malignas (46).

Apenas um estudo (50) relatou a expressão de p16 em nevos melanocíticos e melanomas orais, sendo que os autores observaram uma expressão imuno-histoquímica nuclear em mais de 70% das células névicas em todos os casos de nevos melanocíticos da amostra, enquanto que dentre os 13 casos de melanomas orais, apenas um apresentou expressão de p16 positiva em cerca de 35% das células.

Neste estudo, apesar de p16 ter sido positiva em 95,2% dos nevos melanocíticos, essa expressão foi considerada baixa (<5% das células positivas), enquanto que em melanomas a expressão imuno-histoquímica de p16 foi mais elevada (6%-50% das células positivas). Essa discordância entre nossos resultados e os relatados anteriormente podem ter ocorrido em decorrência do uso de anticorpo policlonal na sua forma fosforilada (Anti-Phospho-p16-INK4a, Sigma-Aldrich). A maioria dos estudos relatados utilizaram anticorpos monoclonais não fosforilados para p16 (46,50).

A fosforilação envolve a adição de grupamentos fosfato às proteínas e é essencial para ativação de vias que regulam a sinalização e crescimento celulares. O papel da fosforilação da proteína p16 em lesões melanocíticas ainda é desconhecido, entretanto, uma pesquisa recente em nível molecular demonstrou que o peróxido de hidrogênio induz a fosforilação de p16 em fibroblastos, o que aumenta sua afinidade de ligação com CDK4, podendo induzir senescência celular e apoptose (65). Diante disso, sugere-se que em nevos melanocíticos orais a proteína p16 encontra-se pouco fosforilada e que em melanomas orais a forma fosforilada dessa proteína é mais frequente. Entretanto, novos estudos utilizando a forma não fosforilada dessa proteína precisariam ser realizados para comprovar essa relação.

A proteína PTEN, por sua vez, possui a capacidade de desfosforilar grupamentos fosfatos tanto em substratos proteicos como lipídicos, regulando negativamente a via de sinalização PI3K/Akt. A expressão de PTEN leva à parada de crescimento celular em G1 e indução de apoptose

em diversas linhagens celulares, incluindo linhagens de melanoma (37,38). Neste estudo observou-se uma elevada expressão de PTEN em todos os casos de nevos melanocíticos orais, assim como nos 5 casos de melanoma estudados. Essa expressão foi predominantemente citoplasmática nos nevos melanocíticos, entretanto, 3 casos apresentaram também expressão nuclear e, em melanomas orais, a expressão nuclear e citoplasmática foi observada em 4 dos 5 casos.

A expressão de PTEN em queratinócitos da mucosa oral normal e da epiderme é relatada como moderada a alta e predominantemente citoplasmática (66,67), assim como o observado na periferia da lesão que apresentava área de mucosa normal, o que serviu como controle positivo interno no presente estudo. Outros pesquisadores (67) também relataram elevada expressão de PTEN em nevos melanocíticos cutâneos, incluindo nevos displásicos, sendo que menos de um terço dos 39 casos não apresentaram expressão nuclear desta proteína. Além disso, esses autores demonstraram que um terço dos casos de melanomas cutâneos primários apresentavam expressão difusa de PTEN, enquanto alguns casos exibiam áreas de perda da expressão dessa proteína e outros eram completamente negativos. Não obstante, outro estudo demonstrou expressão de PTEN completamente negativa em 41 casos de nevos melanocíticos cutâneos e positiva no citoplasma na maioria dos casos de melanoma primário e de lesões metastáticas (68). Em lesões melanocíticas oculares, a expressão de PTEN foi predominantemente nuclear e mais elevada em nevos oculares do que em melanomas oculares (69).

Apesar de ser uma proteína que atua no citoplasma, existem evidências histológicas e bioquímicas que PTEN possa existir também no núcleo, sendo que melanócitos não neoplásicos podem apresentar forte expressão nuclear e citoplasmática dessa proteína (70). Entretanto, em amostras de melanomas cutâneos metastáticos, a expressão nuclear de PTEN é virtualmente inexistente e em melanomas primários poucos casos mantêm a expressão nuclear (71). Outro estudo (71) aponta que apenas um terço dos melanomas cutâneos primários apresentam inativação do PTEN, contra dois terços dos melanomas metastáticos, sugerindo que a inativação do PTEN é um evento tardio, relacionado com a progressão do melanoma e não com a sua iniciação.

Em síntese, as proteínas CDK4, p16 e PTEN apresentaram expressões imuno-histoquímicas semelhantes nos subtipos de nevos melanocíticos analisados. Ressalta-se aqui a dificuldade em realizar estudos de imuno-histoquímica em casos de nevo azul, devido a alta quantidade de pigmento melânico acumulado tanto em citoplasma celular, como por vezes sobreposto ao núcleo, devido ao corte histológico. Esses casos foram inicialmente submetidos a tratamento de

“bleaching” de melanina com permanganato de potássio, porém, devido aos tamanhos pequenos dos cortes, a maioria era perdida durante o tratamento. Por esse motivo optou-se por excluir os casos de nevo azul do estudo imuno-histoquímico. Do mesmo modo, não há relatos na literatura de expressão de marcadores em nevo azul, provavelmente devido à dificuldade de interpretação das reações.

De modo geral, a expressão de p16 foi significativamente diferente entre nevos melanocíticos orais e melanomas orais. Assim como a expressão de CDK4 e PTEN foi inversamente proporcional à expressão de p16 em ambas as lesões estudadas. Estes resultados indicam uma possível desregulação entre a quinase CDK4 e sua proteína inibidora p16 em nevos melanocíticos orais. Já a proteína PTEN demonstrou elevada expressão na maior parte da amostra estudada, indicando sua possível participação no desenvolvimento de lesões melanocíticas neoplásicas da mucosa oral. No entanto, estes resultados devem ser interpretados com cautela, principalmente em melanomas orais, devido ao número limitado de casos incluídos neste estudo.

7 CONCLUSÕES

Com base nos resultados desta pesquisa, conclui-se que:

- A lesão melanocítica focal mais frequente em boca foi a mácula melanótica, seguida por nevo melanocítico;
- Essas lesões ocorreram principalmente em mulheres leucodermas, nas 4ª e 5ª décadas de vida e se apresentavam frequentemente como manchas escurecidas ou acastanhadas;
- As máculas melanóticas foram mais comuns em vermelhão de lábio, enquanto os nevos melanocíticos ocorreram mais frequentemente em palato e mucosa jugal;
- Lentigo simples de mucosa, lentigo actínico, melanoacantoma e melanoma são lesões raras em mucosa oral;
- As proteínas CDK4 e PTEN apresentam expressão imuno-histoquímica elevada em nevos melanocíticos e melanomas orais;
- A proteína p16 na sua forma fosforilada apresenta baixa expressão imuno-histoquímica em nevos melanocíticos orais e expressão moderada em melanomas orais.

REFERÊNCIAS¹

1. Gaeta GM, Satriano RA, Baroni A. Oral pigmented lesions. *Clin Dermatol*. 2002 May-June;20(3):286–8.
2. Tarakji B, Umair A, Prasad D, Altamimi MA. Diagnosis of oral pigmentations and malignant transformations. *Singapore Dent J*. 2014[citado];35c:39–46. Disponível em: www.elsevier.com/locate/sdj%5Cnwww.sciencedirect.com
3. Alawi F. Pigmented lesions of the oral cavity. An update. *Dent Clin North Am*. 2013 Oct;57(4):699–710. doi: 10.1016/j.cden.2013.07.006
4. d'Ischia M, Wakamatsu K, Cicoira F, Di Mauro E, Garcia-Borron JC, Commo S, et al. Melanins and melanogenesis: From pigment cells to human health and technological applications. *Pigment Cell Melanoma Res*. 2015 Sep;28(5):520–44. doi: 10.1111/pcmr.12393
5. Feller L, Chandran R, Kramer B, Khammissa RAG, Altini M, Lemmer J. Melanocyte biology and function with reference to oral melanin hyperpigmentation in HIV-Seropositive Subjects. *AIDS Res Hum Retroviruses*. 2014 Sep[citado];30(9):837–43. Disponível em: <http://online.liebertpub.com/doi/abs/10.1089/aid.2014.0062>
6. Fernandes D, Ferrisse TM, Navarro CM, Massucato EMS, Onofre MA, Bufalino A. Pigmented lesions on the mucosa: A wide range of diagnoses. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2015 Apr;119(4):374–8. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.oooo.2014.11.015>
7. Müller S. Melanin-associated pigmented lesions of the oral mucosa: Presentation, differential diagnosis, and treatment. *Dermatol Ther*. 2010 May-Jun;23(3):220–9. doi: 10.1111/j.1529-8019.2010.01319.x.
8. Solano F. Melanins: skin pigments and much more—types, structural models, biological functions, and formation routes. *New J Sci [Internet]*. 2014 [citado];2014:1–28. Disponível

¹ De acordo com estilo Vancouver.

em: <http://www.hindawi.com/journals/njos/2014/498276/>

9. Borovansky J. History of melanosome research. In: Borovansky J, Riley PA, editors. *Melanins and melanosomes: biosynthesis, biogenesis, physiological, and pathological functions*. 1st ed. [local desconhecido]. Wiley-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA; 2011.
10. D'Mello SA, Finlay GJ, Baguley BC, Askarian-Amiri ME. Signaling pathways in melanogenesis. *Int J Mol Sci*. 2016 Jul;17(7):1–18. doi: 10.3390/ijms17071144.
11. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Chi AC. *Patologia oral e maxilofacial*. 4. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2016.
12. Neville BW, Allen CM, Damm DD, Al. E. *Patologia oral e maxilofacial*. 3a. Rio de Janeiro: Elsevier Ltd; 2009.
13. Buchner A, Merrell PW, Carpenter WM. Relative frequency of solitary melanocytic lesions of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med* [Internet]. 2004 Oct [citado];33(9):550–7. Disponível em: papers3://publication/doi/10.1111/j.1600-0714.2004.00238.x
14. Kaugars GE, Heise AP, Riley WT, Abbey LM, Svirsky JA. Oral melanotic macules. A review of 353 cases. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol*. 1993 Jul;76(1):59–61.
15. Sousa FB. Estudo epidemiológico, histológico e imuno-histoquímico de lesões pigmentadas relacionadas aos melanócitos da mucosa bucal [tese]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo; 2002.
16. Tavares TS, Meirelles DP, Aguiar MCF, Caldeira PC. Pigmented lesions of the oral mucosa : A cross - sectional study of 458 histopathological specimens. *Oral Dis*. 2018 Nov;24:1484–91. doi: 10.1111/odi.12924
17. Hassona Y, Sawair F, Al-karadsheh O, Scully C. Prevalence and clinical features of pigmented oral lesions. *Int J Dermatol*. 2016 Nov.;55:1005–13.
18. Buchner A, Hansen LS. Melanotic macule of the oral mucosa. A clinicopathologic study of 105 cases. *Oral Surg, Oral Med Oral Pathol*. 1979 Sep;48(3):244–9.

19. Shen ZY, Liu W, Bao ZX, Zhou ZT, Wang LZ. Oral melanotic macule and primary oral malignant melanoma: Epidemiology, location involved, and clinical implications. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2011 Jul;112(1):e21–5. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.tripleo.2011.02.040>
20. Meleti M, Vescovi P, Mooi WJ, van der Waal I. Pigmented lesions of the oral mucosa and perioral tissues: a flow-chart for the diagnosis and some recommendations for the management. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2008 May;105(5):606–16. doi: 10.1016/j.
21. Elder DE, Johnson Jr. B, Elenitsas R. *Lever's Histopathology of the Skin*, 9th Edition. 9th ed. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins; 2005.
22. Hafner C, Stoehr R, van Oers JMM, Hofstaedter F, Klein C, Landthaler M, et al. The absence of BRAF , FGFR3 , and PIK3CA mutations differentiates lentigo simplex from melanocytic nevus and solar lentigo. *J Invest Dermatol*. 2009 Nov;129(11):2730–5. doi:10.1038/jid.2009.146.
23. Contreras E, Carlos R. Oral melanoacanthosis (melanoachantoma): report of a case and review of the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2005 Jan;10(1).
24. Damsky WE, Bosenberg M. Melanocytic nevi and melanoma: Unraveling a complex relationship. *Oncogene*. 2017 Oct;36(42):5771–92. doi: <http://dx.doi.org/10.1038/onc.2017.189>
25. Karram S, Novy M, Saroufim M, Loya A, Taraif S, Houreih MA, et al. Predictors of BRAF mutation in melanocytic nevi: Analysis across regions with different UV radiation exposure. *Am J Dermatopathol*. 2013 Jun;35(4):412–8. doi: 10.1097/DAD06013e3182db181.
26. Takata M, Saida T. Genetic alterations in melanocytic tumors. *J Dermatol Sci*. 2006 Jul;43(1):1–10.
27. Meleti M, Mooi WJ, Casparie MK, van der Waal I. Melanocytic nevi of the oral mucosa - No evidence of increased risk for oral malignant melanoma: An analysis of 119 cases. *Oral Oncol*. 2007 Nov;43(10):976–81.

28. Clark WH, Reimer RR, Greene M, Ainsworth AM, Mastrangelo MJ. Origin of familial malignant melanomas from heritable melanocytic lesions. *Arch Dermatol*. 1978 May;114(5):732–8.
29. Rosendahl CO, Grant-kels JM, Que SKT. Dysplastic nevus: Fact and fiction. *J Am Dermatology*. 2015 Sep;73(3):507–12. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.jaad.2015.04.029>
30. Meleti M, Leemans RC, Mooi WJ, Vescovi P, van der Wall I. Oral malignant melanoma: A review of the literature. *Oral Onco*. 2007;43:116–21.
31. Ascierto PA, Accorona R, Botti G, Farina D, Fossati P, Gatta G, et al. Mucosal melanoma of the head and neck. *Crit Rev Oncol / Hematol*. 2017 Apr;112:136–52. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.critrevonc.2017.01.019>
32. Mohan M, Sukhadia VY, Pai D, Bhat S. Oral malignant melanoma: Systematic review of literature and report of two cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2013 Oct;116(4):e247–54. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.oooo.2011.11.034>
33. Sortino-Rachou AM, Cancela M de C, Voti L, Curado MP. Primary oral melanoma: Population-based incidence. *Oral Oncol*. 2009 Mar;45(3):254–8. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.oraloncology.2008.04.015>
34. Barker BF, Carpenter WM, Daniel TE, Kahn MA, Leider AS, Lozada-Nur F, et al. Oral mucosal melanomas: The WESTOP Banff workshop proceedings Histopathologic results. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1997 Jun;83(6):672–9.
35. Kumar V, Abbas AK, Aster JC. Robbins Patologia Básica. 9th ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2013.
36. Li J, Yen C, Liaw D, Podsypanina K, Bose S, Wang SI, et al. PTEN, a putative protein tyrosine phosphatase gene mutated in human brain, breast , and prostate cancer. *Science*. 1997 Mar;275(5308):1943–8.
37. Brandmaier A, Hou S, Shen WH, Medicine WC. Cell cycle control by PTEN. *J Mol Biol*. 2017 Jul;429(15):2265–77. doi: 10.1016/j.jmb.2017.06.004. doi: 10.1016/j.jmb.2017.06.004.

38. Worby CA, Dixon JE. PTEN. *Annu Rev Biochem.* 2014;83:641–9. doi: 10.1146/annurevbiochem-082411-113907.
39. Miller DM, Flaherty KT. Cyclin-dependent kinases as therapeutic targets in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2014 May;27(3):351–65. doi:10.1111/pcmr.12211.
40. Pavey S, Spoorri L, Haass NK, Gabrielli B. DNA repair and cell cycle checkpoint defects as drivers and therapeutic targets in melanoma. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2013 Nov;26(6):805–16. doi: 10.1111/pcmr.12136.
41. Fung C, Pupo GM, Scolyer RA, Kefford RF, Rizos H. p16-INK4a deficiency promotes DNA hyper-replication and genetic instability in melanocytes. *Pigment Cell Melanoma Res.* 2013 Mar;26(2):236–46. doi: 10.1111/pcmr.12062.
42. Uguen A, Talagas M, Costa S, Duigou S, Bouvier S, De Braekeleer M, et al. A p16-Ki-67-HMB45 immunohistochemistry scoring system as an ancillary diagnostic tool in the diagnosis of melanoma. *Diagn Pathol.* 2015 Oct;10(1):1–10. doi: <http://dx.doi.org/10.1186/s13000-015-0431-9>
43. Donigan JM, De Luca J, Lum C. Cyclin D1 and p16 expression in blue Nevi and malignant melanoma. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2017 Feb;25(2):91–4. doi: 10.1097/PAI0000000000000276.
44. Al Dhaybi R, Agoumi M, Gagné I, McCuaig C, Powell J, Kokta V. P16 Expression: A marker of differentiation between childhood malignant melanomas and Spitz nevi. *J Am Acad Dermatol.* 2011 Aug;65(2):357–63. doi: 10.1016/j.jaad.2010.07.031.
45. Harms PW, Hocker TL, Zhao L, Chan MP, Andea AA, Wang M, et al. Loss of p16 expression and copy number changes of CDKN2A in a spectrum of spitzoid melanocytic lesions. *Hum Pathol.* 2016 Dec;58:152–60. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.humpath.2016.07.029>
46. Koh SS, Cassarino DS. Immunohistochemical expression of p16 in melanocytic lesions. *Arch Pathol Lab Med.* 2018 Jul;142:815–28. doi: 10.5858/arpa.2017-0435-RA.

47. Georgieva J, Sinha P, Schadendorf D. Expression of cyclins and cyclin dependent kinases in human benign and malignant melanocytic lesions. *J Clin Pathol*. 2001 Mar;54(3):229–35.
48. Bachmann IM, Straume O, Akslen LA. Altered expression of cell cycle regulators Cyclin D1, p14, p16, CDK4 and Rb in nodular melanomas. *Int J Oncol*. 2004 Dec;25(6):1559–65.
49. Chen H, Li Y, Long Y, Tang E, Wang R, Huang K, et al. Increased p16 and p53 protein expression predicts poor prognosis in mucosal melanoma. *Oncotarget* [Internet]. 2017 Jun;8(32):53226–33. doi: 10.18632/oncotarget.18367.
50. de Andrade BAB, León JE, Carlos R, Delgado-Azañero W, Mosqueda-Taylor A, de Almeida OP. Immunohistochemical expression of p16, p21, p27 and Cyclin D1 in oral nevi and melanoma. *Head Neck Pathol*. 2012 Sep;6(3):297–304. doi: 10.1007/s12105-012-0334-y.
51. Gondak RO, da Silva-Jorge R, Jorge J, Lopes MA, Vargas PA. Oral pigmented lesions: Clinicopathologic features and review of the literature. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2012 Nov;17(6): e919-24. doi: 10.4317/medoral.17679.
52. Trodahl JN, Sprague WG. Benign and malignant melanocytic lesions of the oral mucosa. *Cancer*. 1970 Apr;25(4):812–23.
53. Buchner A, Merrell PW, Hansen LS, Leider AS, San Francisco C. Melanocytic hyperplasia of the oral mucosa. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1991 Jun;71(1):58–62.
54. De Giorgi V, Sestini S, Bruscino N, Janowska A, Grazzini M, Rossari S, et al. Prevalence and distribution of solitary oral pigmented lesions: A prospective study. *J Eur Acad Dermatology Venereol*. 2009 Nov;23(11):1320–3. doi: 10.1111/j.1468-3083.2009.03186.x.
55. Ferreira L, Jham B, Assi R, Readinger A. Oral melanocytic nevi: a clinicopathologic study of 100 cases. *Oral Surgery, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2015 Sep;120(3):358–67. doi: <http://dx.doi.org/10.1016/j.oooo.2015.05.008>
56. Buchner A, Leider AS, Carpenter WM, Buchner A, As L, Pw M, et al. Melanocytic nevi of the oral mucosa: a clinicopathologic study of 130 cases from northern California. *J Oral Pathol Med*. 1990 May;19(5):197–201.

57. Smith MH, Bhattacharyya I, Cohen DM, Islam NM, Fitzpatrick SG, Montague LJ, et al. Melanoma of the oral cavity : an analysis of 46 new cases with emphasis on clinical and histopathologic characteristics. *Head Neck Pathol.* 2016 Sep;10(3):298–305. doi: 10.1007/s12105-016-0693-x.
58. Poomsawat S, Buajeeb W, Khovidhunkit S, Punyasingh J. Alteration in the expression of cdk4 and cdk6 proteins in oral cancer and premalignant lesions. *J Oral Pathol Med.* 2010 Nov;39(10):793–9. doi: 10.1111/j.1600-0714.2010.00909-x.
59. Goel S, Khurana N, Marwah A, Gupta S. Expression of cdk4 and p16 in Oral Lichen Planus. *J Oral Maxillofac Res.* 2015;6(2):2–8.
60. Wang Y-L, Uhara H, Yamazaki T, Nikaido T, Saida T. Immunohistochemical detection of CDK4 and in cutaneous malignant melanoma. *Br J Dermatol.* 1996 Feb;134(2):269–76.
61. Chen H, Xu X, Wang G, Zhang B, Wang G, Xin G, et al. CDK4 protein is degraded by anaphase-promoting complex / cyclosome in mitosis and reaccumulates in early G 1 phase to initiate a new cell cycle in HeLa cells. *J Biol Chem.* 2017 Jun;780(25):10131–41. doi: 10.1074/jbc.M116.773226.
62. Czajkowski R, Drewa T, Wozniak A, Krzyzyska-Malinowska E. Cell cycle in sporadic melanoma. *Int J Dermatol.* 2002 Sep;41(9):550–6.
63. Uguen A, Uguen M, Guibourg B, Talagas M, Marcorelles P, de Braekeleer M. The p16-Ki-67-HMB45 immunohistochemistry scoring system is highly concordant with the fluorescent in situ hybridization test to differentiate between melanocytic nevi and melanomas. *Appl Immunohistochem Mol Morphol.* 2018 Jul;26(6):361–7. doi: 10.1097/PAI.0000000000000428.
64. Garola R, Singh V. Utility of p16-Ki-67-HMB45 score in sorting benign from malignant Spitz tumors. *Pathol - Res Pract.* 2019 Oct; 215(10): 152550. doi: <https://doi.org/10.1016/j.prp.2019.152550>
65. Lu Y, Ma W, Li Z, Lu J, Wang X. The interplay between p16 serine phosphorylation and arginine methylation determines its function in modulating cellular apoptosis and senescence. *Sci Rep.* 2017 Jan;7: 41390. doi: 10.1038/srep41390.

66. Jasphin SSR, Desai D, Pandit S, Gonsalves NM, Nayak PB, Iype A. Immunohistochemical expression of phosphatase and tensin homolog in histologic gradings of oral squamous cell carcinoma. *Contemp Clin Dent*. 2019 Oct-Dec;7(4):524–8.
67. Tsao H, Mihm MC, Sheehan C. PTEN expression in normal skin, acquired melanocytic nevi, and cutaneous melanoma. *J Am Acad Dermatology*. 2003 Nov;49(5):865–72.
68. Slipicevic A, Holm R, Nguyen MTP, Bøhler PJ, Davidson B, Flørenes VA. Expression of activated Akt and PTEN in malignant relationship with clinical outcome. *Am J Clin Pathol*. 2005 Oct;124(4):528–36.
69. Westekemper H, Karimi S, Susskind D, Anastassiou G, Freistuhler M, Steuhl K, et al. Expression of HSP 90, PTEN and Bcl-2 in conjunctival melanoma. *Br J Ophthalmol*. 2011;95(6):853–8. doi: 10.1136/bjo.2010.183939.
70. Zhou X, Hampel H, Thiele H, Gorlin RJ, Hennekam RCM, Parisi M, et al. Association of germline mutation in the PTEN tumour suppressor gene and Proteus and Proteus-like syndromes Unexpected healing of cutaneous ulcers in a short child. *Lancet*. 2001 Jul;358(9290):210–1.
71. Whiteman DC, Zhou X, Cummings MC, Pavey S, Hayward NK, Eng C. Nuclear PTEN expression and clinicopathologic features in a population-based series of primary cutaneous melanoma. *Int J Cancer*. 2002 May;99(1):63–7.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

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

Título da Pesquisa: Lesões melanocíticas focais da mucosa oral e região maxilofacial: estudo epidemiológico, morfológico e imuno-histoquímico

Pesquisador: Marília Trierveiler Martins

Área Temática:

Versão: 1

CAAE: 10231519.8.0000.0075

Instituição Proponente: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 3.239.297

Apresentação do Projeto:

"Esta pesquisa consistirá em um estudo descritivo e retrospectivo de corte transversal em uma série de casos de lesões melanocíticas focais da mucosa oral e região maxilofacial. A amostra do estudo se dará por conveniência e serão incluídos todos os casos que apresentarem material emblocado em parafina suficiente para o estudo morfológico e imuno-histoquímico."

Objetivo da Pesquisa:

O objetivo é pertinente, pois os pesquisadores irão compilar todas as lesões focais de origem melanocítica diagnosticadas no Serviço de Patologia Cirúrgica da Faculdade de Odontologia de Universidade de São Paulo, no período de 2000 a 2018, e analisar as suas respectivas características clínicas e histopatológicas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos são mínimos. Benefícios são para a área de conhecimento.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

Trata-se de pesquisa de alto nível pois irá elencar as diferenças e semelhanças entre as lesões de mucosa oral e de pele da região maxilofacial e contribuir para o diagnóstico diferencial entre mácula melanótica, lentigo, melanoacantoma, nevo melanocítico e melanoma.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Todos os documentos foram apresentados.

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227
Bairro: Cidade Universitária **CEP:** 05.508-900
UF: SP **Município:** SAO PAULO
Telefone: (11)3091-7960 **Fax:** (11)3091-7814 **E-mail:** cepfo@usp.br

Continuação do Parecer: 3.239.297

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final, utilizando-se da opção "Enviar Notificação" (descrita no Manual "Submeter Notificação", disponível na Central de Suporte - canto superior direito do site www.saude.gov.br/plataformabrasil).

Qualquer alteração no projeto original deve ser apresentada "emenda" a este CEP, de forma objetiva e com justificativas para nova apreciação.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências.

Considerações Finais a critério do CEP:

Este parecer foi elaborado baseado nos documentos abaixo relacionados:

Tipo Documento	Arquivo	Postagem	Autor	Situação
Informações Básicas do Projeto	PB_INFORMAÇÕES_BÁSICAS_DO_PROJETO_1316453.pdf	22/03/2019 09:32:02		Aceito
Projeto Detalhado / Brochura Investigador	Projeto_completo.pdf	22/03/2019 09:31:42	Marília Trierveiler Martins	Aceito
Declaração de Manuseio Material Biológico / Biorepositório / Biobanco	Acervo_autorizacao.pdf	22/03/2019 09:31:00	Marília Trierveiler Martins	Aceito
Declaração de Instituição e Infraestrutura	Autorizacao_lab.pdf	22/03/2019 09:30:47	Marília Trierveiler Martins	Aceito
Folha de Rosto	FR_assinada.pdf	22/03/2019 09:30:31	Marília Trierveiler Martins	Aceito

Situação do Parecer:

Aprovado

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

USP - FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Continuação do Parecer: 3.239.297

SAO PAULO, 02 de Abril de 2019

Assinado por:
Alyne Simões Gonçalves
(Coordenador(a))

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SAO PAULO

Telefone: (11)3091-7960

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br