UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

NATÁLIA GALVÃO GARCIA

Citoqueratinas como biomarcadores preditivos para o câncer de lábio em pacientes com queilite actínica

BAURU
2013

NATÁLIA GALVÃO GARCIA

**Citoqueratinas como biomarcadores preditivos para o câncer de lábio em
pacientes com queilite actínica**

Dissertação apresentada a Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Mestre em Ciências Odontológicas Aplicadas, na área de concentração Patologia Bucal.

Orientadora: Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira

BAURU
2013

G165c Garcia, Natália Galvão
Citoqueratinas como biomarcadores preditivos
para o câncer de lábio em pacientes com queilite
actínica/ Natália Galvão Garcia– Bauru, 2013.
113 p. : il. ; 31cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de
Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Orientadora: Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a
reprodução total ou parcial desta dissertação/tese, por processos
fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Data:

Comitê de Ética da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP
Protocolo nº: 4146-2012
Data: 05 de março de 2012

DEDICATÓRIA

Aos meus pais,

Silvana Galvão e Marçal Lourençoní García, como reconhecimento de toda minha gratidão pelo sacrifício e renúncia dispendidos por vocês em toda minha vida, zelando sempre pela minha formação e pelo meu amadurecimento. Amo muito vocês!

Ao meu namorado,

Jussaro Alves Duque, presente de Deus em minha vida, que desde o primeiro momento esteve ao meu lado, me dando força e me apoiando na realização desse sonho. Te amo!

À minha orientadora,

Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira, que com sua orientação cuidadosa, exigente e atenciosa, diariamente me ensina a arte de ensinar.

Ao Prof. Dr. João Adolfo Costa Hanemann, minha maior fonte de inspiração.

AGRADECIMENTOS

Ao detentor da força maior, Deus, que me agraciou com a vida e com a liberdade de seguir meu destino, sempre presente em meu coração e guiando meus passos.

À minha mãe, Silvana Galvão, meu exemplo de vida, pelo amor inigualável, pela dedicação e apoio em todas as horas. Obrigada por ser sempre o meu porto seguro.

Ao meu pai, Marçal Lourençoní Garcia, pelo amor, incentivo e confiança depositada em mim nessa caminhada. Você foi essencial para que eu chegasse até aqui.

À minha irmã, Marcela Galvão Garcia, que mesmo estando longe, é sempre minha referência de amizade e companheirismo. Obrigada por encher minha vida de alegria.

Ao meu namorado, Jussaro Alves Duque, pelo amor, compreensão, incentivo e apoio durante esse período. Seu companheirismo foi fundamental para conclusão desse trabalho.

Ao companheiro fiel, Jimmy, meu anjinho de quatro patas, por sempre me receber repleto de alegria depois de um dia cheio e por sempre está ao meu lado em todos os momentos. Minha vida não seria a mesma sem você!

Aos meus avós, Vicente Galvão, Margarida Araújo Galvão, José Expedito Garcia e Deusolinda Lourençoní Garcia pelas orações, torcida e incentivo sempre.

Ao Eudes José Alves e todos os meus familiares, tios, tias, primos e primas, que de alguma forma contribuíram para a conclusão dessa etapa.

À minha orientadora, Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira, pelo exemplo de dedicação, doação e pela presença constante com seus inigualáveis ensinamentos. Que além de mentora e referência, tornou-se uma amiga muito especial. Obrigada pelo carinho, pelos conselhos, pelos ensinamentos e pela oportunidade a mim oferecida.

Ao Prof. Dr. João Adolfo Costa Hanemann, exemplo de ser humano e de profissional. Seus ensinamentos, sua dedicação e seu amor à profissão foram essenciais para que eu seguisse esse caminho. Obrigada pela amizade e pela confiança em mim depositada.

À Profa. Dra. Maria Aparecida Custódio Domínguez, médica patologista da Faculdade de Medicina de Botucatu, por tornar possível a realização desse trabalho. Obrigado por ter sempre nos recebido e por sua cordial atenção, por ter disponibilizado todo material utilizado neste estudo, pela disponibilidade e pelas considerações realizadas.

Ao médico patologista, Dr. Cléverson Teixeira Soares, pelas sugestões e contribuições concedidas ao trabalho. Obrigada pela disponibilidade sempre, e por todos os ensinamentos compartilhados.

À Eliana Maria Minicucci, pela prestatividade e disponibilidade sempre. Obrigada por ter me ajudado no estabelecimento da amostra desse trabalho.

Ao Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira, pelo auxílio e orientações durante o curso. Obrigada pela amizade e por fazer os dias no departamento serem mais alegres.

À Profa. Dra. Vanessa Soares Lara e ao Prof. Dr. Alberto Consolaro, pelos conhecimentos compartilhados nesse período.

À Suely Nonogaki, do Laboratório de Patologia do Centro de Tratamento e Pesquisa da Fundação Antônio Prudente, do Hospital do Câncer A. C. Camargo, pelas sugestões e principalmente pela ajuda na realização da técnica imuno-histoquímica.

Ao Prof. Dr. José Roberto Pereira Lauris, pelo auxílio na análise estatística desse trabalho.

Às funcionárias, Maria Cristina Carrara Filippi e Marina dos Santos Corrêa, por estarem sempre prontas para me ajudar e por me receberem sempre com tanto carinho e atenção.

À funcionária, Fátima Aparecida Silveira, por toda dedicação e ajuda na realização desse trabalho. Obrigada pelo carinho e consideração que sempre teve comigo.

Ao funcionário, do Departamento de Patologia da Faculdade Medicina de Botucatu, José Carlos Pedroso de Lima, pelo auxílio com o corte dos blocos de parafina.

Aos funcionários do Instituto de Anatomia Patológica de Bauru (ANATOMED) por todo suporte oferecido. Em especial, à Rose, Fábio, Daniel e Éverson que contribuíram de forma essencial para a conclusão desse trabalho.

Aos funcionários da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, por toda a eficácia.

Aos funcionários da Biblioteca da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, por todos os esclarecimentos e eficiência.

Aos meus amigos, Lorena Toledo Alves Sugawara e Eduardo Mítio Sugawara, pela amizade, cumplicidade e torcida. Obrigada por dividirem comigo os momentos de alegria, mas principalmente por tornarem meus dias difíceis mais amenos.

Às minhas amigas, Flávia Pires Ferreira e Patrícia Agresta por se fazerem presente, mesmo estando longe. Obrigada pela amizade e incentivo sempre.

Aos meus amigos, Eloísa Marchi dos Anjos Sória e Víctor Marques Sória, por toda amizade e por terem me acolhido com tanto carinho. Obrigada por fazerem meus dias mais felizes, aqui em Bauru.

À minha amiga, Mariana Rates Gonzaga Santos, por ter estado ao meu lado nesse período, compartilhando momentos especiais.

Ao meu amigo, Francisco Bárbara de Abreu Barros, pelo companheirismo e por tornar meus dias aqui em Bauru, mais divertidos.

Aos meus amigos, Alexandre Simões García e Diego Maurício Bravo Calderón, pela cumplicidade e companheirismo. Obrigada por sempre dividirem as tarefas comigo.

À minha amiga, Kellen Cristine Tjioe, por todo conhecimento compartilhado e por tornar o ambiente de trabalho, mais alegre e descontraído.

Aos amigos e colegas do curso, Ana Paula Madi, Ana Regina Cassaroto, Felipe Alavarce, Fernanda Monbrini Pigatti, Heliton Gustavo de Lima, Karen Henriette Pinke, Pepe Burgos, Rafaela Alves da Silva Alavarce, Regina Barrachi e Taiane Gardizani, pela boa convivência.

Às minhas vizinhas, Járede César Martins e Larissa Vasconcellos, por serem um pedacinho da minha família aqui em Bauru. Obrigada por todo carinho e atenção.

Às minhas vizinhas, Clóris Aznar, Fabíola Aznar, Flávia Coelho Zambeli, Graziela Perri, e Senda Charone e seus respectivos cães, por fazerem minhas tardes e meus finais de semana mais aconchegantes e alegres.

Às minhas amigas de Nepomuceno, Adriana Garcia Veiga, Janaína Lazarini, Isabella Petrini, Larissa Petrini, Lisa Maria Garcia Botega e Mariana Teixeira Villela, pela amizade que nem mesmo o tempo e a distância foram capazes de atrapalhar.

Aos meus amigos da faculdade, Adriano Oliveira, Aline Vieira, André Maída, Camila Chucrí, Lílian Esteves, Marcelo André Faria, Nácler Marinho, Patrícia Agresta e Thayane Silveira Mata Furtado, pela amizade e pelas boas lembranças.

Muito Obrigada!

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, na pessoa do **Prof. Dr. José Carlos Pereira**, diretor desta instituição.

À comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, na pessoa do **Prof. Dr. Paulo César Rodrigues Conti**.

À **Profa. Dra. Denise Tostes Oliveira**, coordenadora da Área de Concentração em Patologia Bucal do Programa de Pós-Graduação em Ciências Odontológicas Aplicadas da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo.

À Faculdade de Medicina de Botucatu, na pessoa da **Profa. Titular Silvana Artioli Schellini**, diretora da faculdade.

Ao Departamento de Otorrinolaringologia e Oftalmologia, da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, na pessoa da chefe do Departamento **Profa. Dra. Silke Anna Theresa Weber**.

Ao Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP na pessoa da chefe do Departamento **Profa. Dra. Maria Aparecida Custódio Domingues**.

A **CAPES**, pelo auxílio pecuniário.

“Temos nosso próprio tempo”
(Renato Russo)

RESUMO

A presença de áreas displásicas em queilites actínicas constitui um fator preditivo importante para o câncer de lábio. Entretanto, a determinação histopatológica da presença e intensidade da displasia epitelial nestas lesões continua sendo um aspecto subjetivo para os patologistas. O objetivo do presente estudo foi verificar em 45 queilites actínicas e 20 carcinomas espinocelulares (CECs) de lábio tratados no Departamento de Otorrinolaringologia e Oftalmologia, da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, a expressão imuno-histoquímica da citoqueratina 10 (CK10) e citoqueratina 13 (CK13) na região labial e comparar a expressão dessas citoqueratinas com o índice de proliferação celular determinado pela imunomarcção com o Ki-67. A intensidade da displasia epitelial nas queilites actínicas foi determinada em coloração de Hematoxilina e Eosina com base nos critérios definidos pela Organização Mundial da Saúde. A associação entre a expressão da CK10 e da CK13 nas queilites actínicas com e sem displasia e nos CECs foi calculada pelo teste do qui-quadrado ou teste exato de Fisher, com nível de significância de 5%. Os resultados demonstraram uma positividade para CK13 no vermelhão do lábio e mucosa labial, com perda de expressão nas áreas displásicas das queilites actínicas e marcação heterogênea nos CECs de lábio. A imunomarcção da CK10 foi observada no vermelhão do lábio e epiderme, com ausência total de expressão nas áreas displásicas e nos CECs de lábio. Houve uma associação estatisticamente significativa entre a expressão da CK10 nos CECs quando comparada às queilites actínicas com displasia epitelial ($p < 0,001$) e sem displasia epitelial ($p < 0,001$). Não houve diferença significativa ($p = 0,104$) no índice de proliferação celular, determinado pela imunomarcção do Ki-67, nas queilites actínicas sem e com displasia epitelial e nos carcinomas espinocelulares de lábio. Assim como também não houve associação, estatisticamente significativa, entre a expressão das citoqueratinas 13 e 10 e os altos índices de proliferação celular, determinados pelo Ki-67, nas queilites actínicas sem e com displasia epitelial. Esses resultados sugerem que as citoqueratinas 13 e 10 participam do processo de malignização das queilites actínicas sendo a expressão alterada ou ausente destes biomarcadores indicativa de áreas displásicas ou carcinoma espinocelular invasivo na região de lábio inferior.

Palavras-chave: Câncer de boca. Displasia epitelial. Citoqueratinas.

ABSTRACT

Cytokeratins as predictive biomarkers for lip cancer in patients with actinic cheilitis

The presence of dysplastic areas in actinic cheilitis is an important predictive factor for lip cancer. However, the histopathologic evaluation of the presence and severity of epithelial dysplasia in these lesions remains subjective. The aim of this study was to evaluate the immunohistochemical expression of cytokeratin 10 (CK10) and cytokeratin 13 (CK13) in labial region and compare the expression of these cytokeratins with the cell proliferation index, which was determined by Ki-67 immunostaining. The sample was constituted by 45 cases of actinic cheilitis and 20 of squamous cell carcinomas (SCC) of the lip treated at the Department of Otorhinolaryngology and Ophthalmology of Botucatu School of Medicine, UNESP. The severity of epithelial dysplasia in actinic cheilitis was determined by hematoxylin and eosin staining based on World Health Organization criteria. The association between the expression of CK10 and CK13 in actinic cheilitis with and without dysplasia and SCC was calculated by Chi-square test or Fisher's exact test, with significance level at 5%. The results showed positive correlation for CK13 in the lip vermilion and labial mucosa, with loss of expression in the dysplastic areas of actinic cheilitis, and heterogeneous positivity in SCC of the lip. There was a statistically significant association between the expression of CK10 in SCC and actinic cheilitis with epithelial dysplasia ($p < 0.001$) or without epithelial dysplasia ($p < 0.001$). There was not a statistically significant difference ($p=0.104$) for cell proliferation index in actinic cheilitis with and without dysplasia, and SCC. Furthermore, there was not a statistical association ($p>0.05$) between the expression of CK10 and CK13 and high cell proliferation index in actinic cheilitis with and without epithelial dysplasia. These results suggest that the cytokeratins 13 and 10 participate in the process of malignant transformation of actinic cheilitis, and absence or alteration of these biomarkers expression are indicative of dysplastic areas or invasive squamous cell carcinoma in the lower lip region.

Key words: Oral cancer. Epithelial dysplasia. Cytokeratins.

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

- FIGURAS

- Figura 1 - Sistemas utilizados para obtenção do índice de proliferação celular, baseado na imunomarcacão castanha dos núcleos pelo Ki-67. Em A, imagem capturada de um determinado campo microscópico no programa de aquisicão e análise de imagens (Axiovision 4.6, ZEISS). Em B, marcação dos núcleos positivos (verde) e dos núcleos negativos (vermelho) usando as ferramentas do programa Paint (Windows) 57
- Figura 2 - Características microscópicas das queilites actínicas. Em A e B, queilite actínica com displasia leve (grau I) com alteraçã da arquitetura epitelial restrita ao terço inferior e presença de uma discreta atipia celular. Em C e D, queilite actínica com displasia moderada (grau II) com alteraçã da arquitetura epitelial estendendo ao terço médio, presença de moderado pleomorfismo e hiper Cromatismo celular, e formaçã de pérola córnea. Em E e F, queilite actínica com displasia intensa (grau III), com mais de 2/3 do epitélio apresentando alteraçã da arquitetura epitelial, presença de atipia celular caracterizada por pleomorfismo intenso, cristas epiteliais em forma de gota e aumento das mitoses. (Hematoxilina e Eosina; A, C e E = 200X ; B, D e F = 400x)..... 67
- Figura 3 - Em A e B, queilite actínica sem displasia epitelial com epitélio hiperplásico e hiperortoqueratinizado e, presença de transformaçã basofílica do colágeno. Em C e D, queilite actínica com displasia intensa (grau III) com alteraçã da arquitetura epitelial, perda da estratificaçã, cristas epiteliais em forma de gota, intenso pleomorfismo e presença de mitoses atípicas (Hematoxilina e Eosina; A e C = 200x; B e D = 400x)..... 71
- Figura 4 - Carcinoma espinocelular de lábio; Em A e C, observar a continuidade entre o epitélio de revestimento do lábio e o carcinoma invasivo. Em B e D, detalhes do padrão de invasã tumoral com ilhotas e cordões grossos, intensa queratinizaçã e intenso infiltrado inflamatório mononuclear envolvendo o tumor (Hematoxilina e Eosina; A e C = 200x; B e D = 400x)..... 73
- Figura 5 - Expressã da citoqueratina 13 nas queilites actínicas sem displasia e com displasia epitelial. Em A e B, observar a forte expressã da citoqueratina 13 em todas as camadas do epitélio do vermelhão do lábio da queilite actínica sem displasia epitelial. Em C e D, observar a imunomarcacão focal e heterogênea da citoqueratina 13 nas camadas espinhosa e granulosa do epitélio da queilite actínica displásica. (Imuno-histoquímica: anti-CK13; A

e C = 100x e B e D = 200x).....	79
Figura 6 - Expressão da citoqueratina 10 nas queilites actínicas sem displasia e com displasia epitelial. Em A e B, observar a imunomarcagem nas camadas espinhosa e granulosa do epitélio e a ausência de expressão nas camadas basal e suprabasal da queilite actínica sem displasia. Em C e D, notar a área de transição com expressão de citoqueratina 10 nas camadas espinhosa e granulosa do vermelhão do lábio e ausência de imunomarcagem nas regiões displásicas da queilite actínica. (Imuno-histoquímica: anti-CK10, A e C = 100x, B e D = 200x).....	81
Figura 7 - Expressão das citoqueratinas 13 e 10 nos carcinomas espinocelulares de lábio. Em A e B, a expressão da citoqueratina 13 foi heterogênea em algumas ilhotas e cordões tumorais, com perda de expressão nas pérolas córneas. Em C e D, observar a completa negatividade da citoqueratina 10 no carcinoma espinocelular de lábio. (Imuno-histoquímica: anti-CK13 e anti-CK10; A e C = 100x e B e D = 200x).....	83
Figura 8 - Expressão do Ki-67 nas queilites actínicas sem e com displasia epitelial e nos carcinomas espinocelulares de lábio. Em A (queilite actínica sem displasia), observar um discreto número de células positivas restritas à camada basal. Em B (queilite actínica com displasia), verificar um número significativo de células positivas na camada basal e suprabasal. Em C (carcinoma espinocelular de lábio), notar um número expressivo de células positivas no front de invasão tumoral. (Imuno-histoquímica: anti-Ki-67; A, B e C = 200x).....	89
- GRÁFICOS	
Gráfico 1 - Distribuição numérica das queilites actínicas sem displasia, com diferentes graus de displasia epitelial (leve, moderada e intensa) e dos carcinomas espinocelulares de lábio em relação ao índice de proliferação celular determinado pela expressão do Ki-67	86

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição das características demográficas e clínicas dos pacientes portadores de queilite actínica e carcinoma espinocelular de lábio. Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, SP, 2006 a 2011.....	62
Tabela 2 - Distribuição das 45 queilites actínicas de acordo com as características microscópicas analisadas em Hematoxilina e Eosina. Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, SP, 2006 a 2011.....	64
Tabela 3 - Características microscópicas utilizadas para a graduação da displasia epitelial das 33 queilites actínicas, segundo a classificação da Organização Mundial de Saúde, (GALE et al. 2005). Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, SP, 2006 a 2011.....	65
Tabela 4 - Distribuição da expressão das citoqueratinas 13 (CK13) e 10 (CK10) nas 45 queilites actínicas sem e com displasia epitelial. Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, SP, 2006 a 2011.....	76
Tabela 5 - Distribuição da expressão das citoqueratinas 13 (CK13) e 10 (CK10) nos diferentes epitélios da pele, do vermelhão do lábio e da mucosa labial adjacente aos carcinomas espinocelulares de lábio. Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, SP, 2006 a 2011.....	78
Tabela 6 - Associação entre a expressão das citoqueratinas 13 (CK13) e 10 (CK10) nas queilites actínicas com ou sem displasia epitelial e nos carcinomas espinocelulares de lábio. Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, SP, 2006 a 2011.....	78
Tabela 7 - Distribuição das queilites actínicas com e sem displasia e dos carcinomas espinocelulares de lábio em relação ao índice de proliferação celular determinado pela expressão de Ki-67. Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, SP, 2006 a 2011.....	86
Tabela 8 - Associação entre o alto índice de proliferação celular (Ki-67>25% de células epiteliais positivas) e a expressão da CK13 e da CK10 nas queilites actínicas sem e com displasia epitelial. Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, SP, 2006 a 2011.....	87

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

%	porcentagem
°C	grau Celsius
<	menor
=	igual
+	positivo
-	negativo
nº	número
µm	micrometro
CEC	carcinoma espinocelular
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos
CK	citoqueratina
CK10	citoqueratina 10
CK13	citoqueratina 13
CIS	carcinoma in situ
DAB	<i>Diaminobenzidine Tetrahydrochloride</i>
FOB	Faculdade de Odontologia de Bauru
HE	hematoxilina e Eosina
H ₂ O ₂	peróxido de Hidrogênio
h	hora
Ki 67	Kiel 67
MIB 1	antígeno Ki-67
mL	mililitro
mM	milimol
p	nível descritivo do teste exato de Fisher
PAS	ácido periódico de Schiff
PBS	phosphate buffered saline (solução salina fosfatada tamponada)
pH	concentração hidrogeniônica
QA	queilite actínica
QASD	queilite actínica sem displasia
QACD	queilite actínica com displasia
RNA	ácido ribonucléico
RNAm	ácido ribonucleico mensageiro
RT-PCR	reação em cadeia da polimerase por transcrição reversa
SP	Estado de São Paulo
UNESP	Universidade Estadual Paulista
USP	Universidade de São Paulo
X ²	qui-quadrado

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	21
2	REVISÃO DE LITERATURA	27
2.1	QUEILITE ACTÍNICA	29
2.2	DISPLASIA EPITELIAL	30
2.3	CITOQUERATINAS	32
2.3.1	Citoqueratinas 10 e 13	34
2.3.2	Expressão das citoqueratinas 10 e 13 em lesões displásicas e em carcinomas espinocelulares de boca	35
2.4	KI-67	39
3	PROPOSIÇÃO	43
4	CASUÍSTICA E MÉTODOS	47
4.1	POPULAÇÃO DE ESTUDO E SELEÇÃO DA AMOSTRA	49
4.2	REGISTRO DE DADOS CLÍNICOS E MICROSCÓPICOS	49
4.3	ANÁLISE MICROSCÓPICA	50
4.3.1	Graduação da displasia epitelial	50
4.3.2	Método imuno-histoquímico	52
4.3.3	Avaliação imuno-histoquímica das citoqueratinas	54
4.3.4	Avaliação imuno-histoquímica do anticorpo anti-Ki-67	54
4.4	ANÁLISE ESTATÍSTICA	58
4.5	AQUISIÇÃO DAS FOTOMICROGRAFIAS	58
4.6	COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP)	58

5	RESULTADOS	59
5.1	CASUÍSTICA	61
5.2	CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO	61
5.3	ANÁLISE MICROSCÓPICA	63
5.3.1	Caracterização das queilites actínicas em Hematoxilina e Eosina	63
5.3.2	Caracterização dos carcinomas espinocelulares de lábio em Hematoxilina e Eosina	69
5.3.3	Expressão das citoqueratinas nas queilites actínicas e carcinomas espinocelulares de lábio	75
5.3.4	Associação das citoqueratinas CK10 e CK13 entre as queilites actínicas e os carcinomas espinocelulares de lábio	77
5.3.5	Análise do índice de proliferação celular nas queilites actínicas e carcinoma espinocelular de lábio	85
6	DISCUSSÃO	91
7	CONCLUSÕES	101
	REFERÊNCIAS	105
	ANEXO	111

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

A presença de áreas displásicas no epitélio da mucosa bucal de algumas lesões está frequentemente associada à progressão do câncer de boca (BOUQUOT; SPEIGHT; FARTHING, 2006). Estas lesões foram denominadas de “lesões orais potencialmente malignas”. Entretanto, o valor prognóstico da displasia epitelial nestas lesões orais é difícil de ser determinado. Atualmente, nenhum marcador molecular provou ter valor prognóstico significativo e nenhum deles foi avaliado em grandes estudos prospectivos nestas lesões de boca (BOUQUOT; SPEIGHT; FARTHING, 2006; SPEIGHT, 2010).

A graduação da displasia no epitélio bucal baseia-se na combinação das alterações arquiteturais com perda da maturação e da estratificação normal associada à presença de atipia celular (GALE et al., 2005). Sua identificação microscópica pelo patologista, frequentemente, é realizada em coloração de hematoxilina e eosina, e a subjetividade no estabelecimento desta graduação tem provocado consideráveis variações inter e intra-observadores (BOUQUOT; SPEIGHT; FARTHING, 2006; KUJAN et al., 2007; WARKANAKYLASURIYA et al., 2008; SPEIGHT, 2010).

Em 2008, Warnakylasuriya et al. (2008), revisaram os sistemas de classificação da displasia epitelial na boca e, concluíram que a determinação histopatológica do potencial de malignidade de lesões como leucoplasia e eritroplasia permanece uma área de difícil diagnóstico para o patologista. Segundo os autores, embora a maioria dos patologistas reconheça e adote os critérios para graduar a displasia epitelial, existe uma grande variabilidade na interpretação de sua presença, no grau e significância dos critérios individuais estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde.

A displasia epitelial pode ser observada, também, em algumas queilites actínicas, lesões que, frequentemente, afetam o vermelhão do lábio inferior de

indivíduos de pele clara, cujas alterações epiteliais são induzidas pela radiação solar prolongada (WOOD et al., 2011; JADOTTE; SCHWARTZ, 2012; VIEIRA et al., 2012).

A queilite actínica é o resultado da expansão clonal de queratinócitos com alterações moleculares e genéticas induzidas pela radiação ultra-violeta, sendo considerada em alguns casos, como o início de um carcinoma escamoso *in situ* (NICO; RIVITTI; LOURENÇO, 2007; WOOD et al., 2011). Além de provocar danos ao DNA das células, a radiação solar, principalmente os raios ultravioletas do tipo B, causam alterações na atividade normal do Ki-67, do bcl-2, da cicloxigenase, do fator de crescimento de fibroblasto e das citoqueratinas (JADOTTE; SCHWARTZ, 2012).

Embora não existam informações precisas sobre a prevalência de transformação maligna da queilite actínica, a presença e a intensidade da displasia epitelial aumenta a chance da progressão desta lesão para o câncer de lábio (NICO; RIVITTI; LOURENÇO, 2007; VIEIRA et al., 2012) e portanto, constitui um fator preditivo importante na determinação do risco de carcinoma em lesões de queilite actínica (KUJAN et al., 2007).

Clinicamente, muitas queilites actínicas são acompanhadas de ulceração e microscopicamente, observa-se um intenso infiltrado inflamatório justaepitelial (NICO; RIVITTI; LOURENÇO, 2007; WOOD et al., 2011; JADOTTE; SCHWARTZ, 2012; VIEIRA et al., 2012), fatores estes, que dificultam a análise pelo patologista, da presença e intensidade da displasia epitelial. Assim sendo, nas últimas décadas, a busca de marcadores moleculares, que possam auxiliar na avaliação microscópica dos diferentes graus de displasias em lesões potencialmente malignas, incluindo as queilites actínicas, continua sendo o foco de diversas pesquisas (SANTOS et al., 2003; GIRES et al., 2006; FILLIES et al., 2007; OHTA et al., 2010; SCHAAIJ-VISSER et al., 2010; SAKAMOTO et al., 2011; IDA-YONEMOCHI et al., 2012; KITAMURA et al., 2012; KOBAYASHI et al., 2012).

Dentre os biomarcadores envolvidos no processo de transformação maligna epitelial destacam-se as citoqueratinas, filamentos intermediários que identificam modificações no citoesqueleto das células epiteliais displásicas (GIRES et al., 2006; FILLIES et al., 2007; SAWANT et al., 2011), sendo envolvidas na migração e na transdução de sinais intracelulares (FILLIES et al., 2007).

As citoqueratinas 10 (CK10) e 13 (CK13) vêm sendo utilizadas como marcadores que permitem a diferenciação entre um epitélio normal e um epitélio displásico de lesões potencialmente malignas (GIRES et al., 2006; FILLIES et al., 2007; KITAMURA et al., 2012).

A maioria dos trabalhos descritos na literatura analisa o comportamento das citoqueratinas em epitélios displásicos de leucoplasias e carcinomas espinocelulares. Autores como Gires et al. (2006) e Fillies et al. (2007) compararam o padrão de expressão de algumas citoqueratinas, entre elas a CK13 e a CK10, em carcinomas espinocelulares, e leucoplasias com e sem displasia. Baseados nos resultados obtidos, e após observar que houve perda da expressão da CK13 e da CK10 à medida que se aproximava das áreas displásicas, os autores sugeriram que o padrão de expressão dessas citoqueratinas é indicativo do prognóstico de lesões potencialmente malignas como as leucoplasias. Também Kitamura et al. (2012), avaliaram o padrão de expressão da CK13 nos epitélios displásicos de leucoplasias e carcinomas espinocelulares e, concluíram que essa citoqueratina é de grande valia para avaliação da transformação maligna de lesões cancerizáveis.

Além das citoqueratinas, algumas investigações recentes tem analisado a proliferação celular determinada pela expressão do Ki-67 nos epitélios das lesões potencialmente malignas, sugerindo que o aumento da população de células proliferantes, na camada suprabasal do epitélio bucal, constitui um marcador útil na identificação de altos graus de displasia (GONZALES-MOLES et al., 2000; TAKEDA et al., 2006; GONZALES-MOLES et al., 2010; MONTEBUGNOLI et al., 2011).

Embora existam algumas evidências da associação da expressão das citoqueratinas e do índice de proliferação do epitélio da mucosa bucal com os diferentes graus de displasia epitelial, poucos estudos foram encontrados sobre a expressão destes biomarcadores em queilites actínicas. Assim sendo, neste estudo pretende-se investigar a expressão das citoqueratinas associadas aos índices de proliferação celular do epitélio da região labial como fator preditivo para o risco do câncer de lábio em lesões potencialmente malignas, como as queilites actínicas.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 QUEILITE ACTÍNICA

A queilite actínica é uma lesão crônica potencialmente maligna que envolve o vermelhão do lábio inferior. Sua etiologia está associada frequentemente à exposição prolongada aos raios solares, principalmente a radiação ultra-violeta B (UVB) (MARKOPOULOS; ALBANIDOU-FARMAKI; KAYAVIS, 2004; NICO; RIVITTI; LOURENÇO, 2007; CAVALCANTE; ANBINDER; CARVALHO, 2008; WOOD et al., 2011; JADOTTE; SCHWARTZ, 2012; VIEIRA et al., 2012). Em países tropicais como o Brasil, onde muitos trabalhadores como agricultores, lavradores, pescadores, marinheiros, entre outros, ficam longos períodos expostos diariamente ao sol, sem a adequada proteção labial, a prevalência da queilite actínica é bastante significativa (NICO; RIVITTI; LOURENÇO, 2007; CAVALCANTE; ANBINDER; CARVALHO, 2008).

Clinicamente, a queilite actínica afeta principalmente homens adultos com idade entre 40 e 80 anos e se manifesta como uma descamação do vermelhão do lábio com presença de eritema, erosões e sangramento intermitente em casos mais graves (MARKOPOULOS; ALBANIDOU-FARMAKI; KAYAVIS, 2004; CAVALCANTE; ANBINDER; CARVALHO, 2008; JADOTTE; SCHWARTZ, 2012; VIEIRA et al., 2012).

Microscopicamente, a queilite actínica caracteriza-se por inflamação crônica do tecido conjuntivo, transformação basofílica das fibras colágenas e elásticas e aumento da espessura de queratina; quase sempre associadas à hiperplasia ou atrofia epitelial (NICO; RIVITTI; LOURENÇO, 2007; WOOD et al., 2011; JADOTTE; SCHWARTZ, 2012; VIEIRA et al., 2012;).

Embora não existam informações precisas sobre a prevalência de transformação maligna da queilite actínica, a presença de displasia epitelial, caracterizada por alterações estruturais do epitélio e atipias celulares, aumenta a

chance da progressão desta lesão para o câncer de lábio (NICO; RIVITTI; LOURENÇO, 2007; VIEIRA et al., 2012). Em muitas destas lesões as características clínicas não refletem com exatidão o quadro microscópico. Assim sendo, alguns autores recomendam a vermelhonectomia como a forma de tratamento mais adequada para a identificação de alterações epiteliais displásicas (JADOTTE; SCHWARTZ, 2012; VIEIRA et al., 2012;). Portanto, a identificação microscópica dos diferentes graus de displasia consiste em um fator preditivo importante na determinação do risco de carcinoma a partir da queilite actínica (KUJAN et al., 2007).

2.2 DISPLASIA EPITELIAL

Como a displasia epitelial está intimamente associada com a probabilidade da evolução de uma lesão de queilite actínica para um carcinoma espinocelular, sua classificação deve ser a mais precisa possível (KUJAN et al., 2007; WARNAKULASURIYA et al., 2008).

Com base nos critérios definidos pela Organização Mundial de Saúde, (GALE et al., 2005), a seguinte graduação da displasia epitelial foi estabelecida:

- **Displasia leve (grau I):** proliferação das células da camada basal e suprabasal restrita ao terço inferior do epitélio. A atipia e o pleomorfismo celular são discretos, e as alterações estruturais são mínimas. As mitoses não são proeminentes e quando presentes se localizam na camada basal.
- **Displasia moderada (grau II):** proliferação de células atípicas no terço médio do epitélio. Alterações como hipercromatismo e pleomorfismo podem estar presentes. Há um aumento no número de mitoses. As alterações estruturais, como perda da polaridade basal podem ser observadas até metade do epitélio.
- **Displasia intensa (grau III) ou Carcinoma in situ:** proliferação anormal da camada basal em mais de 2/3 do epitélio. As alterações citológicas e estruturais são bastante proeminentes. As mitoses se

localizam na camada basal e também na camada suprabasal. As alterações estruturais são intensas, podendo observar perda completa da estratificação e cristas anormais em forma de gotas, podendo significar os sinais de uma possível invasão do conjuntivo.

Porém, mesmo com essa classificação proposta pela Organização Mundial da Saúde para os diferentes graus de displasia, o diagnóstico microscópico desta alteração epitelial na boca ainda é bastante variável, pois é baseado em critérios subjetivos (BOUQUOT; SPEIGHT; FARTHING, 2006; WARNAKYLASURIYA et al., 2008; SPEIGHT, 2010). Devido a essa subjetividade no diagnóstico e na classificação microscópica, a displasia epitelial tem sido tema de diversas discussões entre pesquisadores do mundo todo visando um maior consenso entre os patologistas e principalmente o estabelecimento de prognósticos mais consistentes das lesões potencialmente malignas na boca (WARNAKYLASURIYA et al., 2008; SPEIGHT, 2010).

Além da subjetividade do diagnóstico final, outros pontos como, o fato de que nem todas as lesões displásicas sofrem malignização e ainda, a existência de carcinomas escamosos que se desenvolveram a partir de lesões displásicas faz com que aumente ainda mais a discussão sobre a importância da displasia epitelial no processo de malignização (REIBEL, 2003). Isso faz com que haja uma grande dificuldade na determinação do prognóstico das lesões de queilite actínica. E gera uma necessidade de buscar marcadores moleculares que possam auxiliar no estabelecimento de um diagnóstico mais preciso (SPEIGHT, 2010).

Portanto, nas últimas décadas, a busca de marcadores moleculares, que possam auxiliar na avaliação microscópica dos diferentes graus de displasias em lesões potencialmente malignas como as queilites actínicas, vem sendo o foco de diversas pesquisas (BOUQUOT; SPEIGHT; FARTHING, 2006; SPEIGHT, 2010).

Dentre os biomarcadores investigados, destacam-se as citoqueratinas (SAWANT et al., 2011), marcadores proteicos que identificam modificações no citoesqueleto das células epiteliais displásicas (GIRES et al., 2006; FILLIES et al., 2007; SAWANT et al., 2011).

2.3 CITOQUERATINAS

As citoqueratinas (CKs) são filamentos intermediários constituintes do citoesqueleto das células epiteliais. Elas possuem alto grau de especificidade tecidual, de conservação e de resistência à degradação, em adição à grande fidelidade de expressão e antigenicidade, o que as tornam ferramentas úteis para o diagnóstico e prognóstico das lesões malignas (SAWANT et al., 2011). Atualmente as citoqueratinas são divididas em dois grupos: as do tipo I, ácidas com baixo peso molecular, incluindo as CK de 9 a 23, e as do tipo II, básicas com alto peso molecular, CK de 1 a 8 (ALMEIDA, 2004; FILIES et al., 2006).

A expressão das CKs varia entre os epitélios em seus diferentes estágios de desenvolvimento e durante o seu curso terminal de diferenciação. Ainda, durante a transformação maligna do tecido epitelial, o padrão de expressão das CKs costuma ser mantido, podendo ser de utilidade diagnóstica (CHU; WEISS, 2002; NIKITAKIS et al., 2004). A maioria das diferenças encontradas pode ser explicada pela composição celular mais complexa da lesão maligna (CHU; WEISS, 2002).

Dessa forma, a análise imuno-histoquímica da expressão de CKs pode ser considerada uma ferramenta útil na identificação e diferenciação dos vários tipos de epitélio e suas origens, assim como na distinção de diferentes tipos celulares dentro de um mesmo tecido (NIKITAKIS et al., 2004).

No epitélio da mucosa bucal, a expressão das citoqueratinas se mostra bastante diferenciada quando se compara as regiões queratinizadas (lábios, gengiva, dorso da língua e palato duro), com as regiões não-queratinizadas (mucosas labial e jugal, face ventral da língua e palato mole) (CHU; WEISS, 2002). As células da camada basal expressam as CKs 5 e 14 em todo o epitélio da cavidade bucal, sendo este queratinizado ou não. A CK19 também pode ser detectada nas células basais das regiões não-queratinizadas, o que não ocorre nas regiões queratinizadas. Em relação às células da camada suprabasal do epitélio, as regiões não-queratinizadas apresentam expressão das CKs 4 e 13, enquanto as células das regiões queratinizadas expressam as CKs 1, 2, 10 e 11 (CHU; WEISS, 2002; ALMEIDA, 2004; NIKITAKIS et al., 2004).

Particularmente na região do lábio humano, Barret et al. (2005) analisaram pela imuno-histoquímica a expressão das citoqueratinas 1, 4, 5, 8, 10, 13, 14, 18 e 19 no lábio inferior de 31 cadáveres. O lábio foi dividido em quatro regiões: ortoqueratinizada epiderme, ortoqueratinizado vermelhão, região intermediária com perda de anexos cutâneos e revestida por um epitélio estratificado escamoso paraqueratinizado e sem estrato granuloso e região de mucosa labial. Os resultados mostraram que o padrão de CK alterou na região intermediária do lábio com perda gradual de CK1 e CK10 a partir da pele, e de CK4, 13 e 19 a partir da mucosa bucal. Na região da epiderme, observaram expressão basal de CK5 e CK14, suprabasal de CK1 e CK10, negatividade de CK4 e CK3, sendo a CK19 positiva apenas nos folículos pilosos. A área do vermelhão do lábio manteve um fenótipo semelhante à epiderme, com exceção das CK5 e CK14 que estiveram presentes em todo o epitélio. A região intermediária mostrou distribuição de CK5 e CK14 na camada basal e suprabasal. A forte expressão suprabasal de CK1 e CK10, observada na epiderme e vermelhão, diminuiu ou foi abruptamente perdida na zona intermediária e estavam ausentes no epitélio da mucosa labial. Também a forte expressão suprabasal de CK4/13 no epitélio da mucosa labial foi gradualmente ou abruptamente perdida na zona intermediária, sendo o vermelhão e a epiderme negativa para estas citoqueratinas. Na mucosa labial detectou-se consistentemente a expressão basal de CK5, 14 e 19, com variável marcação suprabasal, algumas vezes atingindo todo o epitélio. Além disso, a forte marcação de CK4 e 13 foi restrita as camadas suprabasais, com negatividade para a CK10 neste epitélio da mucosa labial. As outras CKs incluindo a 7, 8, 18 e 20 foram negativas no epitélio estratificado escamoso com exceção da marcação das células de Merkel identificadas em 18 lábios. Os autores concluíram que, em relação às citoqueratinas o epitélio do vermelhão do lábio consiste em uma área de transição com fenótipo único e características tanto da epiderme como da mucosa labial. Sugeriram ainda que, as alterações na composição do epitélio estratificado escamoso afetam a cor do vermelhão do lábio.

2.3.1 Citoqueratinas 10 e 13

As citoqueratinas 10 (CK10) e 13 (CK13) são marcadores utilizados em muitos estudos para diferenciarem o epitélio normal de um epitélio displásico. Além disso, algumas investigações recentes têm sugerido que essas citoqueratinas podem ser também utilizadas para avaliação da progressão maligna em lesões potencialmente malignas com displasia (GIRES et al., 2006; FILLIES et al., 2007; KITAMURA et al., 2012).

A expressão característica da citoqueratinas 10 (CK10) pode ser observada nas camadas suprabasais da epiderme (ALMEIDA, 2004). Na região do lábio, é expressa nas camadas espinhosa e granulosa da região da pele e do vermelhão, podendo também ser expressa na camada córnea. Na zona de transição entre o vermelhão do lábio e a mucosa bucal a expressão da CK10 vai diminuindo, sendo totalmente negativa na região da mucosa bucal (BARRET et al., 2005).

A citoqueratina 13 (CK13) é específica para a mucosa bucal, sendo expressa nas camadas suprabasais do epitélio (KITAMURA et al., 2012). Em mucosa bucal normal, a CK13 é negativa na camada basal e fortemente expressa nas camadas suprabasais (GIRES et al., 2006; SANTOS et al., 2003). Na região do lábio, ela mantém essa forte expressão na região de mucosa labial e vai diminuindo no epitélio da zona de transição e do vermelhão do lábio, até ser totalmente negativa na epiderme (BARRET et al., 2005).

Tanto a CK10, quanto a CK13 se comportam da mesma forma no epitélio displásico e/ou no epitélio tumoral, podendo ocorrer como uma expressão não homogênea de aspecto fraco ou até mesmo, como uma expressão negativa (GIRES et al., 2006; FILLIES et al., 2007; OHTA et al., 2010; SCHAAIJ-VISSER et al., 2010; SAKAMOTO et al., 2011; IDA-YONEMOCHI et al., 2012; KITAMURA et al., 2012;). Esse padrão de expressão dessas citoqueratinas, deixa claro sua relação com o processo de malignização (GIRES et al., 2006; FILLIES et al., 2007; OHTA et al., 2010; SAKAMOTO et al., 2011; KITAMURA et al., 2012).

2.3.2 Expressão das citoqueratinas 10 e 13 em lesões displásicas e em carcinomas espinocelulares de boca

Muitas investigações foram realizadas com o intuito de mostrar que a expressão das citoqueratinas 10 e 13 exerce um papel importante no prognóstico de lesões potencialmente malignas (SANTOS et al., 2003; GIRES et al., 2006; FILLIES et al., 2007; OHTA et al., 2010; SCHAAIJ-VISSER et al., 2010; SAKAMOTO et al., 2011; IDA-YONEMOCHI et al., 2012; KITAMURA et al., 2012; KOBAYASHI et al., 2012).

Em 2003, Santos et al. (2003) investigaram em seu estudo, o padrão de expressão das citoqueratinas nas queilites actínicas com e sem displasia. Foram usadas as citoqueratinas: CK7, CK8, CK10, CK13, CK14, CK16, CK18 e CK19. Entre os resultados obtidos, verificou-se que a CK10 foi positiva na maioria da amostra, principalmente nas camadas suprabasais e em alguns espécimes foi expressa apenas na camada córnea. A CK13 também foi positiva na maioria da amostra, sendo expressa principalmente nas camadas espinhosa e granulosa, e em que alguns espécimes sua marcação foi focal na camada espinhosa. Além disso, foi expressa na camada basal em apenas um espécime e foi negativa quando havia hiperqueratose. Os autores concluíram que a expressão das citoqueratinas não está relacionada com o grau de displasia das queilites actínicas.

Posteriormente, Gires et al. (2006) compararam o padrão de expressão e especificidade da CK8, CK13 e Ki-67 em carcinomas espinocelulares, mucosa bucal normal e leucoplasias. Seus resultados mostraram forte expressão de CK8 nos carcinomas de cabeça e pescoço e nas áreas displásicas das leucoplasias, além da negatividade para os tecidos saudáveis e para áreas hiperplásicas das leucoplasias. A CK13 foi expressa nas áreas hiperplásicas e também em tecidos saudáveis, além de ter sido expressa de forma heterogênea nos carcinomas. O Ki-67 foi utilizado para marcar as células epiteliais em proliferação. Com base nesses resultados, os autores concluíram que esses marcadores são eficientes na diferenciação de um epitélio normal e um epitélio displásico.

No ano seguinte, Fillies et al. (2007) procuraram avaliar o padrão de expressão de algumas citoqueratinas em epitélio de leucoplasia com e sem displasia e também no epitélio de carcinomas espinocelulares de boca. Foram utilizados os seguintes marcadores: CK5-6, CK8/18, CK1, CK10, CK14 e CK19. Os resultados apresentaram uma expressão positiva desses marcadores, porém o nível de expressão não diferiu para a grande maioria dos espécimes. Baseados nos resultados obtidos, e após observar que houve perda da expressão da CK10 à medida que se aproximava das áreas displásicas, os autores sugeriram que o padrão de expressão dessa citoqueratina é indicativo do prognóstico de lesões potencialmente malignas como as leucoplasias.

Em 2010, Ohta et al. (2010) considerando que a coloração de Lugol tem sido amplamente utilizada para detectar alterações malignas no colo do útero e no esôfago, em seu estudo, examinaram áreas displásicas adjacentes a carcinomas espinocelulares de boca. Foram examinadas 20 displasias epiteliais adjacentes a carcinomas espinocelulares utilizando para isso, a coloração de Lugol, HE e PAS, e ainda a técnica imuno-histoquímica para CK13 e o Ki-67. Os resultados mostraram que, assim como a coloração de Lugol, a CK13 foi expressa homogeneamente nas áreas normais e com displasia leve. Por outro lado, nas displasias moderada, intensa ou carcinoma *in situ*, a coloração de Lugol não foi expressa e houve perda de expressão de CK13. O Ki-67 também teve seu comportamento diferente nas áreas com e sem displasia. A coloração de PAS foi limitada ou não encontrada nas áreas coradas pelo Lugol. Portanto, os autores concluíram que a diminuição da produção de glicogénio causada por alterações da diferenciação e da proliferação celular associadas com as alterações malignas podem resultar em falta de coloração de Lugol nas regiões com displasia moderada, intensa ou carcinoma *in situ*.

Ainda no ano de 2010, Schaaij-Visser et al. (2010) investigaram a expressão das citoqueratinas 4 e 13, por meio da técnica imuno-histoquímica, em leucoplasias com e sem displasia epitelial, buscando confirmar se a perda de expressão dessas proteínas poderia predizer uma possível transformação maligna. Os resultados mostraram uma perda de expressão das CK4 e CK13 nas áreas com hiperqueratose e nas áreas displásicas. A partir desses resultados obtidos, os autores concluíram que apesar de mostrarem uma perda de expressão nas regiões displásicas, esses marcadores não predizem uma transformação maligna.

Em 2011, Sakamoto et al. (2011) procuraram identificar os subtipos de citoqueratinas relevantes que poderiam estar associadas com a patogênese de neoplasias epiteliais orais. Para isso, as expressões de todos os subtipos de citoqueratinas foram examinadas por análise de microarray do DNA de 43 carcinomas espinocelulares de boca. A expressão imuno-histoquímica da maioria das citoqueratinas foi examinada em 100 tumores e no epitélio bucal displásico. Muitas alterações na expressão das citoqueratinas foram observadas e houve, significativamente, diminuição da citoqueratina 4 e citoqueratina 13. A expressão aberrante da CK4 e CK13 foi associada com alterações morfológicas no epitélio bucal alterado. Os experimentos com cultura de células tranfectadas com vários subtipos de citoqueratinas sugeriram que as alterações na expressão das citoqueratinas podem causar alterações na forma e movimento das células. Os autores concluíram que a expressão aberrante da CK4 e CK13, que são citoqueratinas relacionadas à diferenciação dos queratinócitos orais, indica desregulação da diferenciação epitelial nos carcinomas espinocelulares e nas regiões displásicas do epitélio bucal. Sugeriram ainda que, estas citoqueratinas, especialmente a CK4, podem ser úteis para o diagnóstico patológico. Propuseram também que, a aberrante expressão de CK4 e CK13, associadas a diminuição concomitante de outras CKs, pode ser um dos fatores responsáveis pelas alterações morfológicas no epitélio alterado.

Posteriormente, em 2012, Ida-Yonemochi et al. (2012) considerando que a perda da expressão da CK13 é um dos critérios mais importantes para o diagnóstico diferencial entre um carcinoma *in situ* (CIS) e uma lesão não-maligna na mucosa bucal, buscaram elucidar o mecanismo molecular para que ocorra essa perda de expressão. Para isso, foram comparados os perfis imuno-histoquímicos da CK13 e da CK16 (que não é expressa em epitélio normal, mas está aumentada em CIS) com os níveis de RNAm por hibridização *in situ*, em cortes incluídos em parafina de 23 carcinomas *in situ* de língua. A técnica de PCR com transcriptase reversa foi também realizada usando amostras de RNA extraídos por meio de microdissecção a laser do epitélio em cortes parafinados de 7 tumores. Mesmo com a confirmação do aumento dos níveis proteico e da expressão genética de CK16 nos CIS dos sete tumores, a perda de CK13 foi associada com os níveis reprimidos do RNAm somente de 4 espécimes. Com base nestes resultados, os autores

concluíram que a perda de CK13 ocorreu parcialmente devido a diminuição dos níveis de sua expressão genética, porém pode ter ocorrido também devido a eventos pós-translacionais desconhecidos.

Também em 2012, Kitamura et al. (2012) avaliaram a expressão imuno-histoquímica das citoqueratinas 13 e 17 em 105 carcinomas espinocelulares e em 108 leucoplasias bucais. Além disso, foi feita uma correlação da expressão das CKs com variáveis clínico-patológicas. Por meio da técnica de PCR com transcriptase reversa, foram analisados os níveis de RNAm em algumas linhagens de células. Os resultados mostraram que CK13 foi positiva em apenas alguns dos carcinomas espinocelulares de boca, enquanto a CK17 foi positiva na grande maioria destes tumores, sendo significativamente expressa nos tumores bem diferenciados quando comparada com a expressão nos tumores moderados e poucos diferenciados. Nas leucoplasias, a CK13 mostrou positividade nas leucoplasias sem displasia, enquanto CK17 foi expressa naquelas com displasia. Com base nesses resultados, os autores concluíram que a expressão de CK17 pode ser associada com a diferenciação e a malignidade dos CECs e que a combinação do padrão CK17/CK13 pode ser útil na avaliação da transformação maligna de lesões cancerizáveis.

Ainda em 2012, Kobayashi et al. (2012) analisaram focos de displasia apresentando ortoqueratose com o objetivo de determinarem se essas regiões poderiam ser consideradas entidades histopatológicas distintas. Foram analisados 282 espécimes de 200 pacientes portadores de carcinoma espinocelular, ou carcinoma *in situ*. Considerando a displasia com hiperortoqueratose, foram identificados 84 focos na amostra de carcinoma. Para avaliação foi utilizada a técnica imuno-histoquímica com os anticorpos: CK10, CK13, CK17, CK19 e Ki-67. Os resultados mostraram que a maioria das células dos focos de displasia com ortoqueratose foram positivas para CK10 e negativas para as outras citoqueratinas. Além disso, o número de células positivas para o Ki-67 foi maior nessas regiões quando comparado com as regiões epiteliais com padrão de normalidade. Os autores concluíram que essas regiões de displasia com ortoqueratose podem ser consideradas uma variante distinta de displasia epitelial relacionada com o processo de malignização.

A presente revisão de literatura confirma que, embora a expressão das citoqueratinas tenha sido investigada em lesões bucais potencialmente malignas

como as leucoplasias, em queilite actínica apenas um estudo foi encontrado (SANTOS et al., 2003).

2.4 KI-67

Além das modificações no citoesqueleto expressas pelas citoqueratinas, outras alterações celulares podem ser encontradas nas lesões potencialmente malignas, como a ruptura da homeostase da proliferação celular (GONZALES-MOLES et al., 2000; JADOTTE; SCHWARTZ, 2012)

Logo, sendo o Ki-67 uma proteína essencial para a proliferação celular e que pode ser encontrado em todas as fases do ciclo celular (G1, S, G2 e M), muitos estudos o utilizam como marcador de proliferação celular para a determinação do índice de proliferação nos tumores (GONZALES-MOLES et al., 2000; BROWN; GATTER, 2002).

Entretanto, estudos recentes têm enfatizado não apenas o índice de proliferação celular, mas também têm analisado a expressão desse marcador nas células da camada suprabasal do epitélio. Pois, sabe-se que as células da camada basal são responsáveis pela renovação do epitélio, pois, encontram-se em um processo contínuo de proliferação. Cada célula progenitora divide-se assimetricamente em uma célula-filha com capacidade idêntica de proliferação e em outra célula com um número limitado de divisões, que irá produzir uma população de células que podem sofrer diferenciação nas três primeiras camadas suprabasais. Considerando que é preciso cerca de cinco eventos oncogênicos para a transformação maligna de uma célula normal, torna-se necessário que as células permaneçam por um longo período de tempo no epitélio para que possam acumular alterações oncogênicas e se transformem em um clone maligno. Logo, acredita-se que a expressão do Ki-67 nessas células alteradas localizadas na camada suprabasal, seja um indicativo da presença de alterações displásicas que podem vir a originar um tumor (GONZALES-MOLES; SCULLY; RUIZ-AVILA, 2012).

No ano de 2000, Gonzales-Moles et al. (2000) procuraram avaliar em seu estudo a expressão do Ki-67 na camada suprabasal associada a presença de displasia epitelial. Para isso foi utilizado uma amostra de 74 epitélios não neoplásicos adjacentes a carcinomas espinocelulares bucais, sendo 19 epitélios normais, 38 epitélios hiperplásicos e 37 epitélios displásicos (20 com displasia leve, 12 com displasia moderada e 5 com displasia intensa). A expressão do Ki-67 foi analisada através da técnica imuno-histoquímica. Os resultados mostraram que em todos os epitélios com displasia moderada e intensa foi observada maior expressão de Ki-67 na camada suprabasal. Os autores concluíram que a intensidade da expressão do Ki-67 na camada suprabasal está diretamente relacionada com o grau de displasia do epitélio.

Em 2006, Takeda et al. (2006) avaliaram a expressão do Ki-67 e do p63 nas diferentes camadas epiteliais de 66 espécimes de displasia epitelial bucal. Nos resultados foi verificado que o índice de proliferação determinado pela expressão do Ki-67 na camada basal e na suprabasal mostrou uma diferença significativa entre os espécimes com displasia epitelial leve e os espécimes com displasia epitelial intensa. Portanto, os autores concluíram que a distribuição das células em proliferação nas camadas epiteliais podem fornecer informações úteis para a classificação da displasia epitelial.

Posteriormente, em 2008, Martínez et al. (2008) avaliaram a expressão das proteínas p53, bax e bcl-2, e ainda do marcador de proliferação Ki-67, em 13 casos de queilite actínica, 7 de vermelhão de lábio normal e 6 casos de mucosa bucal não exposta à radiação solar. Entre outros resultados, observaram que a expressão do Ki-67 nos espécimes de queilite actínica e no vermelhão de lábio normal foi bem mais significativa do que sua expressão em mucosa bucal não exposta ao sol. Logo, concluíram que a radiação solar por si só estimula a proliferação celular, aumentando o risco de uma transformação maligna.

Em 2010, Gonzales-Moles et al. (2010) analisaram a proliferação celular nas diferentes camadas do epitélio adjacente à carcinomas espinocelulares. Foram analisados 83 carcinomas espinocelulares de boca pela técnica imuno-histoquímica para o anticorpo anti-Ki-67. Os resultados mostraram que a expressão do Ki-67 foi maior nas células da camada suprabasal dos epitélios adjacentes do que nos epitélios dos controles. Os autores concluíram que o aumento da proliferação de

células epiteliais na camada suprabasal pode indicar que há um risco dessa área sofrer malignização.

No ano seguinte, Montebugnoli et al. (2011) buscaram determinar se a proliferação celular intensa pode ser encontrada em áreas consideradas normais, localizadas em áreas distantes de um carcinoma espinocelular de boca e, se esse estado proliferativo estava associado com o prognóstico do tumor. Para isso foram utilizados 42 carcinomas espinocelulares de boca, e as áreas distantes do tumor foram analisadas por meio da expressão imuno-histoquímica do Ki-67. Os resultados mostraram altos índices proliferativos de Ki-67 em áreas distantes de 13 carcinomas espinocelulares de boca. Dentre os pacientes com carcinoma espinocelular de boca, quatro desenvolveram reicidiva durante o acompanhamento. Com base nos resultados, os autores sugeriram que uma porcentagem significativa de áreas distantes de carcinomas espinocelulares que apresenta estado proliferativo aumentado estão associadas a um prognóstico ruim.

Com base nessa revisão de literatura, pretende-se contribuir com a identificação de biomarcadores preditivos para o câncer de lábio em pacientes portadores de lesões potencialmente malignas, como as queilites actínicas.

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

A partir da análise de 45 queilites actínicas com diferentes graus de displasia epitelial e de 20 carcinomas espinocelulares de lábio inferior, propôs-se:

- avaliar a expressão imuno-histoquímica da citoqueratina 10 (CK10) e citoqueratina 13 (CK13) nos epitélios não-neoplásicos e neoplásicos da região labial;
- verificar se existe associação entre a expressão destas citoqueratinas com a presença de displasia epitelial e/ou câncer de lábio e com o índice de proliferação celular, determinado pela imunomarcagem do Ki-67;
- contribuir com a identificação de biomarcadores preditivos para o câncer de lábio em pacientes portadores de lesões potencialmente malignas, como as queilites actínicas.

4 Casuística e Métodos

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 POPULAÇÃO DE ESTUDO E SELEÇÃO DA AMOSTRA

A população de estudo foi constituída por 45 pacientes portadores de queilite actínica com e sem displasia e 20 pacientes portadores de carcinoma espinocelular de lábio inferior, submetidos ao tratamento no Departamento de Otorrinolaringologia e Oftalmologia, da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, no período de 2006 a 2011.

Após a obtenção da autorização dos pacientes a partir do Termo de Consentimento Livre e Esclarecido, as biopsias, do arquivo do Departamento de Patologia da mesma instituição, foram selecionadas utilizando-se os seguintes critérios de inclusão:

- pacientes com queilite actínica com e sem displasia e/ou câncer de lábio, com diagnóstico confirmado por exame histopatológico;
- pacientes submetidos a cirurgia como tratamento inicial;
- fragmentos de tumor suficiente para análise microscópica;
- disponibilidade dos respectivos blocos de parafina.

4.2 REGISTRO DE DADOS CLÍNICOS E MICROSCÓPICOS

As informações clínicas e microscópicas, referentes aos pacientes e à peça cirúrgica, foram obtidas a partir das requisições de registro das biópsias pertencentes ao Departamento de Patologia, da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP. Estes registros incluíam clinicamente, a identificação do paciente, gênero, idade, ocupação quando presente e, microscopicamente, o diagnóstico da biópsia e a presença ou não de displasia.

4.3 ANÁLISE MICROSCÓPICA

4.3.1 Graduação da displasia epitelial

A classificação das alterações epiteliais e a graduação de malignidade do epitélio das queilites actínicas e/ou da mucosa bucal adjacente aos carcinomas de lábio foi realizada de acordo com os critérios da Organização Mundial de Saúde, (GALE et al. 2005), baseados no grau de queratinização, no pleomorfismo nuclear e na atividade mitótica das células malignas, como descrito a seguir:

- **Hiperplasia:** aumento do número de células da camada espinhosa (acantose) e/ou na basal, porém sem atipia celular;
- **Displasia leve (grau I):** alteração da arquitetura epitelial limitada ao terço inferior do epitélio com presença de atipia celular;
- **Displasia moderada (grau II):** alteração da arquitetura epitelial estendendo ao terço médio com atipia celular;
- **Displasia intensa (grau III) ou carcinoma in situ:** alterações da arquitetura epitelial atingindo toda ou quase toda espessura do epitélio, associadas à acentuada atipia celular com presença de figuras de mitose e/ou mitoses atípicas;

Foram consideradas alterações da arquitetura epitelial:

- ❖ estratificação irregular do epitélio;
- ❖ perda da polaridade das células basais;
- ❖ cristas epiteliais em forma de gota;
- ❖ aumento do número de figuras mitóticas;
- ❖ mitoses superficiais atípicas;
- ❖ queratinização prematura de células individuais (disqueratose);
- ❖ pérolas de queratina no interior das cristas epiteliais.

Foram consideradas alterações celulares no epitélio:

- ❖ alteração no tamanho do núcleo (anisonucleose);
- ❖ alteração na forma do núcleo (pleomorfismo nuclear);
- ❖ alteração no tamanho da célula (anisocitose);
- ❖ alteração na forma da célula (pleomorfismo celular);
- ❖ alteração na relação núcleo/citoplasma;
- ❖ núcleo com tamanho aumentado;
- ❖ figuras de mitose atípicas;
- ❖ aumento no número e tamanho dos nucléolos.

A análise microscópica das alterações epiteliais e a graduação de malignidade do epitélio do vermelhão do lábio na região das queilites actínicas, corados em Hematoxilina e eosina, foi realizada por dois examinadores (NGG e DTO) sem o conhecimento prévio dos dados clínicos dos pacientes, utilizando-se um microscópio óptico binocular (Axioskop 2 Plus, Zeiss), contendo uma objetiva de 40X.

Nas queilites actínicas, além da classificação da displasia epitelial, também foram avaliados os seguintes critérios:

- ❖ transformação basofílica do colágeno;
- ❖ ulceração;
- ❖ epitélio hiperplásico e/ou atrófico;
- ❖ epitélio ortoqueratinizado e/ou paraqueratinizado;
- ❖ infiltrado inflamatório polimorfonuclear focal ou difuso e sua intensidade (leve, moderada e intensa);
- ❖ infiltrado inflamatório mononuclear focal ou difuso e sua intensidade (leve, moderada e intensa);

4.3.2 Método imuno-histoquímico

Nove cortes microscópicos de 3 µm de espessura foram obtidos das queilites actínicas com e sem displasia e dos carcinomas espinocelulares de lábio, fixados em formalina e adequadamente preparados para coloração imuno-histoquímica.

A marcação imuno-histoquímica da amostra seguiu o protocolo utilizado no Instituto de Anatomia Patológica de Bauru (ANATOMED), como descrito a seguir:

- Desparafinização das lâminas em estufa a 65°C por 24 horas; imersão das mesmas por três vezes em xilol a 60°C por 10 minutos cada e, em seguida, em quatro cubas de álcool absoluto por 30 segundos cada;
- Lavagem das lâminas em água corrente e destilada;
- **Anticorpo primário anti-Ki-67** – a recuperação antigênica foi feita em tampão de citrato de sódio 10mM pH6,0 em panela de pressão (Pascal S2800, Dako) preenchida com 450mL de água destilada, tampada e aquecida até a temperatura de 121°C, durante 30 segundos. A panela foi desligada e esperou-se sua refrigeração gradual até a temperatura de 90°C. Em seguida as lâminas foram retiradas da panela e esperou-se 45 minutos para seu resfriamento, antes de continuar a reação imuno-histoquímica;
- **Anticorpo primário anti-CK13 e anti-CK10** – a recuperação antigênica foi feita em tampão de citrato de sódio 10mM pH6,0 em panela de pressão (Pascal S2800, Dako) preenchida com 450mL de água destilada, tampada e aquecida até a temperatura de 118°C, durante 3 minutos. A panela foi desligada e esperou-se sua refrigeração gradual até a temperatura de 90°C. Em seguida as lâminas foram retiradas da panela e esperou-se 45 minutos para seu resfriamento, antes de continuar a reação imuno-histoquímica;
- O bloqueio da peroxidase endógena foi realizado com a incubação dos cortes em solução de 3% Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂), com 2 trocas de 10 minutos cada.
- Lavagem das lâminas em água destilada;

- Disposição das lâminas na bandeja e retirada do excesso de água destilada com o auxílio de um sugador;
- Delimitação dos cortes com caneta hidrofóbica (Dako Pen S2002, Dako);
- Incubação dos espécimes em câmara úmida a 4°C, por 18h, com os seguintes anticorpos primários monoclonais:
 - Citoqueratina 13 – CK13 (Clone KS-1A3, Genetex-USA), diluição 1:100;
 - Citoqueratina 10 – CK10 (Clone LHP1, Novocastra-Reino Unido), diluição 1:400;
 - Anti-Ki-67 (Clone MIB-1 M7240, Dako), diluição de 1:100;
- Lavagem das lâminas em tampão PBS por 2 vezes seguidas;
- Incubação com o anticorpo secundário ADVANCE™HRP Link (Complexo AB, Dako) por um período de 30 minutos em temperatura ambiente;
- Lavagem das lâminas em tampão PBS por 3 vezes seguidas;
- Incubação das lâminas em solução substrato: 3'3 *Diaminobenzidine Tetrahydrochloride* (DAB); 1mL de H₂O₂ a 6% (água oxigenada 20 volumes), 100mL de PBS, por 5 minutos a 37°C ao abrigo da luz;
- Lavagem em água corrente e água destilada por 3 minutos;
- Coloração das lâminas em Hematoxilina de Harris por 3 minutos;
- Lavagem em água corrente e destilada durante 3 minutos;
- Desidratação dos espécimes em concentrações graduais de álcool (80%, 95% e absoluto) em 2 trocas de 30 segundos cada, imersão em soluções de xilol 4 vezes, por 30 segundos cada;
- Montagem das lâminas com a utilização de resina (Entellan Neu, Merck) e lamínulas.

Utilizou-se como controle positivo para os anticorpos anti-CK13 e anti-CK10 um corte de tonsila também previamente corada durante a padronização da diluição dos anticorpos. E como controle negativo, um corte do mesmo tecido com a omissão dos anticorpos primários. Para o anticorpo primário anti-Ki-67 foi utilizado como controle positivo um corte de carcinoma espinocelular em lábio previamente

corado durante a padronização da diluição do anticorpo e, como controle negativo, um corte do mesmo tecido com a omissão do anticorpo primário.

4.3.3 Avaliação imuno-histoquímica das citoqueratinas

A avaliação da expressão imuno-histoquímica das citoqueratinas nas queilites actínicas e nos CECs de boca, foi realizada por meio de um microscópio óptico binocular (Axioskop 2 Plus, ZEISS), por dois observadores diferentes (NGG e DTO).

Nas queilites actínicas e nos carcinomas espinocelulares de boca, a avaliação da expressão imuno-histoquímica da CK10 e CK13, foi feita por regiões. Foram avaliadas as camadas (basal, espinhosa, granulosa e córnea) da pele, as camadas (basal, espinhosa, granulosa e córnea) do vermelhão do lábio, camada basal e espinhosa da mucosa labial e área tumoral (carcinoma invasivo).

A positividade ou não das citoqueratinas também foi verificada nas áreas de displasia epitelial das queilites actínicas displásicas e nos carcinomas espinocelulares de lábio, principalmente na região do *front* de invasão tumoral.

4.3.4 Avaliação imuno-histoquímica do anticorpo anti-Ki-67

A avaliação da expressão imuno-histoquímica do anticorpo anti-Ki-67, na amostra de queilites actínicas e de carcinomas espinocelulares de lábio, foi realizada por meio de um sistema computadorizado de captura de imagens de campos consecutivos na região epitelial. As imagens foram adquiridas a partir de uma câmera de digital de alta resolução (AxioCam, MRc, ZEISS) acoplada a um microscópio óptico binocular (Axioskop 2 Plus, ZEISS) contendo uma objetiva de 40X. A câmera apresentava-se conectada a um microcomputador (Pentium IV, INTEL) contendo um programa de aquisição e análise de imagens (Axiovision, 4.6, ZEISS) (Figura 1A).

Os campos microscópicos foram obtidos, nas amostras de carcinomas, na região do *front* de invasão tumoral e nas amostras de queilites actínicas, nas regiões de displasia e regiões adjacentes, tomando sempre o cuidado de capturar a maior área de células epiteliais e de não deixar nenhuma célula repetida por campo.

A contagem das células imunomarcadas pelo Ki-67 foi realizada sempre no mesmo ambiente, apropriadamente escurecido e utilizando o mesmo computador (Dual Core, ACER). As imagens foram visualizadas e marcadas utilizando-se o programa Paint do Windows, e quando necessário, foi feito o uso da ferramenta de zoom (Figura 1B).

A atividade proliferativa celular, expressa pela coloração acastanhada nuclear do anticorpo Ki-67 nos carcinomas e nas queilites actínicas foi quantificada num total de 1000 células em cada espécime obtendo-se a porcentagem de células epiteliais positivas

Com base nos valores percentuais medianos do índice de proliferação celular encontrados nas queilites actínicas sem displasia, a amostra foi dicotomizada em dois grupos: menor ou igual a 25% e com valores maiores que 25%.

- $\leq 25\%$ células positiva para o Ki-67;
- $> 25\%$ células positivas para o Ki-67;

Figura 1 - Sistemas utilizados para obtenção do índice de proliferação, baseado na imunomarcacão castanha dos núcleos pelo Ki-67. Em A, imagem capturada de um determinado campo microscópico no programa de aquisição e análise de imagens (Axiovison 4.6, ZEISS). E em B, marcação dos núcleos positivos (verde) e dos núcleos negativos (vermelho) usando as ferramentas do programa Paint (Windows).

4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

As análises estatísticas foram realizadas utilizando-se o programa estatístico para microcomputador SPSS for Windows versão 13.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, EUA).

Para a correlação da expressão da CK13 e CK10 entre os grupos de queilite actínica com e sem displasia, foi usado o teste exato de Fisher. Entretanto, para a correlação dos mesmos marcadores, porém, entre os grupos de queilite actínica com e sem displasia com o grupo de carcinoma espinocelular de lábio, foi usado o teste qui-quadrado (χ^2), com um nível de significância de 5% ($p \leq 0,05$).

Também foi usado o teste qui-quadrado (χ^2) para verificação da distribuição do índice de proliferação entre os três grupos analisados. E o teste exato de Fisher para a associação entre o alto índice de proliferação celular e a expressão da CK13 e da CK10 nas queilites actínicas sem e com displasia epitelial.

4.5 AQUISIÇÃO DAS FOTOMICROGRAFIAS

As fotomicrografias apresentadas neste trabalho foram obtidas por meio do mesmo sistema de aquisição e análise de imagens (Axiovision 4.6, ZEISS) utilizadas para avaliação imuno-histoquímica.

4.6 COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA (CEP)

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP, em reunião no dia 05 de Março de 2012, sob o nº de Protocolo 4146-2012 (ANEXO 1).

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 CASUÍSTICA

A amostra foi constituída por 45 pacientes portadores de queilite actínica com e sem displasia e 20 pacientes portadores de carcinoma espinocelular de lábio inferior, submetidos ao tratamento no Departamento de Otorrinolaringologia e Oftalmologia, da Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, no período de 2006 a 2011.

Neste capítulo, são apresentadas as distribuições percentuais das características demográficas e microscópicas da amostra analisada. Microscopicamente foram avaliadas algumas características teciduais e celulares em coloração de rotina, ou seja, em Hematoxilina e Eosina, bem como a expressão epitelial de algumas citoqueratinas e o índice de proliferação celular, ambos identificados pela técnica imuno-histoquímica.

5.2 CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO

A maior frequência de queilite actínica e de carcinoma espinocelular de lábio foi detectada em pacientes do gênero masculino (77,8% para as QA e 60,0% para os CECs). A idade mínima observada entre os pacientes portadores de queilite actínica foi 33 anos e a máxima 82. Nos pacientes portadores de carcinoma espinocelular, a idade mínima observada foi 49 anos e a máxima 87. A média das idades dos pacientes de queilite actínica e carcinoma espinocelular de lábio foi de 60 anos, sendo esse valor utilizado na Tabela 1.

Em relação aos fatores de risco, foi avaliada a exposição ocupacional dos pacientes portadores de queilite actínica, sendo que, a maioria (53,3%) apresentava

uma ocupação relacionada à exposição prolongada ao sol. Entretanto, em 42,2% dos pacientes, a ocupação registrada não envolvia exposição constante ou prolongada ao sol e em 4,5% da amostra não havia registro do tipo de ocupação do paciente (Tabela 1).

Para os pacientes portadores de carcinoma espinocelular, não foi possível avaliar a ocupação e ou os fatores de risco para a neoplasia, pois, estas informações, não foram registradas nas requisições das biopsias.

Tabela 1 - Distribuição das características demográficas e clínicas dos pacientes portadores de queilite actínica e carcinoma espinocelular de lábio. Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, SP, 2006 a 2011.

Variável	Queilite Actínica N (%)	CEC N (%)
Gênero		
Masculino	35 (77,8%)	12 (60,0%)
Feminino	10 (22,2%)	8 (40,0%)
Idade		
≤ 60 anos	20 (46,6%)	10 (50,0%)
> 60 anos	23 (53,4%)	10 (50,0%)
Ocupação		
Desconhecida (não relatada)	2 (4,5%)	20 (100%)
Com exposição prolongada ao sol	24 (53,3%)	-
Outros*	19 (42,2%)	-
Total	45 (100%)	20 (100%)

CEC: Carcinoma espinocelular de boca; *Outros – ocupações que não envolviam exposição constante e/ou prolongada ao sol.

5.3 ANÁLISE MICROSCÓPICA

5.3.1 Caracterização das queilites actínicas em Hematoxilina e Eosina

Como a grande maioria das queilites actínicas foi obtida de biopsias de vermelhonectomia, as características celulares e teciduais das 45 queilites actínicas, coradas em Hematoxilina e Eosina, foram analisadas na região do vermelhão do lábio.

O epitélio de revestimento do vermelhão do lábio apresentava-se hiperplásico em 84,5% da amostra, atrófico em 15,5% e com áreas de ulceração em 8,8% dos espécimes. A presença de ortoqueratina foi observada em 64,5% da amostra, entretanto, em 35,5% das queilites actínicas notou-se também áreas intercaladas de paraqueratina. Em 26,6% das queilites actínicas o epitélio não apresentava displasia epitelial, entretanto, em 73,4% observou-se a displasia epitelial, sendo leve em 24,4%, moderada em 31,0% e intensa em 18,0% dos espécimes, como ilustrado na Tabela 2.

A transformação basofílica do colágeno foi verificada na grande maioria das queilites actínicas (95,6%). Além disso, foi observado também o tipo, a distribuição e a intensidade do infiltrado inflamatório, tanto polimorfonuclear, quanto mononuclear. Focos de infiltrado inflamatório polimorfonuclear foram identificados em 11,0% dos espécimes, sendo discreto em 4,4%, moderado em 2,2% e intenso em 4,4% das queilites actínicas. Um infiltrado inflamatório mononuclear também foi verificado com disposição focal em 64,4% das queilites actínicas, sendo discreto em 28,8%, moderado em 33,3% e intenso em 17,7% dos espécimes analisados (Tabela 2).

A classificação da intensidade da displasia epitelial seguiu os critérios estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde, (GALE et al. 2005), com base nas alterações da arquitetura epitelial e da morfologia celular. Os critérios que foram avaliados estão descritos na Tabela 3. Com base nestes critérios microscópicos, as queilites actínicas foram classificadas em três grupos: queilite actínica com displasia leve (grau I), queilite actínica com displasia moderada (grau II) e queilite actínica com displasia intensa (grau III) (Figura 2).

Tabela 2 - Distribuição das 45 queilites actínicas de acordo com as características microscópicas analisadas em Hematoxilina e Eosina. Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, SP, 2006 a 2011.

Características Microscópicas	Queilite Actínica N (%)
Epitélio do vermelhão do lábio	
Hiperplásico	38 (84,5%)
Atrófico	7 (15,5%)
Ulceração presente	4 (8,8%)
Ulceração ausente	41 (91,1%)
Queratinização	
Ortoqueratinizado	29 (64,5%)
Ortoqueratinizado/paraqueratinizado	16 (35,5%)
Displasia epitelial	
Ausente	12 (26,6%)
Leve	11 (24,4%)
Moderada	14 (31,0%)
Intensa	8 (18,0%)
Transformação basofílica do colágeno	
Presente	43 (95,6%)
Ausente	2 (4,4%)
Infiltrado Inflamatório- Polimorfonuclear	
Discreto	2 (4,4%)
Moderado	1 (2,2%)
Intenso	2 (4,4%)
Infiltrado Inflamatório- Mononuclear	
Ausente	9 (20,2%)
Discreto	13 (28,8%)
Moderado	15 (33,3%)
Intenso	8 (17,7%)
Total	45 (100%)

N: número de queilites actínicas.

Tabela 3 - Características microscópicas utilizadas para a graduação da displasia epitelial das 33 queilites actínicas displásicas, segundo a classificação da Organização Mundial de Saúde, (GALE et al. 2005). Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, SP, 2006 a 2011.

Estruturas Analisadas	Queilite Actínica com displasia N (%)
Alteração da arquitetura epitelial	
Limitada ao 1/3 da camada inferior	11 (33,3%)
Extensão para 1/3 da camada média	14 (42,5%)
Extensão para 1/3 da camada superior	8 (24,2%)
Estratificação irregular	18 (54,5%)
Perda da polaridade	27 (81,8%)
Cristas em forma de gota	22 (66,6%)
Mitoses atípicas	25 (75,7%)
Disqueratoses	21 (63,6%)
Pérolas de queratina	3 (9,0%)
Tamanho do núcleo alterado	21 (63,6%)
Forma do núcleo alterado	26 (78,7%)
Tamanho das células alterado	25 (75,7%)
Forma das células alterada	30 (90,9%)
Alteração núcleo/citoplasma	22 (66,6%)
Nucléolos alterados	31(93,9%)
Hipercromatismo	17 (51,5%)
Total	33(100%)

N: número de queilites actínicas

Figura 2 – Características microscópicas das queilites actínicas. Em A e B, queilite actínica com displasia leve (grau I) com alteração da arquitetura epitelial restrita ao terço inferior e presença de uma discreta atipia celular. Em C e D, queilite actínica com displasia moderada (grau II) com alteração da arquitetura epitelial estendendo ao terço médio, presença de moderado pleomorfismo e hipercromatismo celular, e formação de pérola córnea. Em E e F, queilite actínica com displasia intensa (grau III) com mais de 2/3 do epitélio apresentando alteração da arquitetura epitelial, presença de atipia celular caracterizada por pleomorfismo intenso, cristas epiteliais em forma de gota e aumento das mitoses. (Hematoxilina e Eosina; A, C e E = 200X; B, D e F = 400x).

Um total de 26,6% das queilites actínicas foi classificado com ausência de displasia epitelial como ilustrado nas Figuras 3A e 3B. Microscopicamente, observou-se frequentemente um epitélio com hiperortoqueratinização, camada granulosa bem evidenciada, hiperplasia, com estratificação epitelial normal e sem atipia celular. Subjacente, no tecido conjuntivo, a transformação basofílica do colágeno estava presente, porém sem associação com infiltrado inflamatório crônico.

Nas queilites actínicas com displasia leve as alterações estruturais estavam restritas ao 1/3 inferior do epitélio sendo a atipia celular e o pleomorfismo discretos. Nas queilites actínicas com displasia moderada notou-se alterações na arquitetura epitelial que atingiam 1/3 médio do epitélio, com atipia celular e pleomorfismo mais acentuados, perda da polaridade basal, presença de disqueratoses e mitoses atípicas. O grupo de queilite actínica com displasia intensa mostrou alterações estruturais que atingiam o 1/3 superior do epitélio, a atipia celular e o pleomorfismo eram intensos com presença de mitoses atípicas e cristas epiteliais em forma de gota, conforme ilustrado na Figura 3C e 3D.

5.3.2 Caracterização dos carcinomas espinocelulares de lábio em Hematoxilina e Eosina

Os carcinomas espinocelulares de lábio analisados neste estudo eram tumores bem diferenciados (T1N0M0), caracterizados microscopicamente por intensa queratinização, discretos pleomorfismo nuclear, leve a moderada figuras de mitoses e presença de moderado a intenso infiltrado inflamatório mononuclear. A continuidade do tumor com o epitélio de revestimento do lábio foi constantemente observada. Na maioria dos tumores, o padrão de invasão observado foi constituído por cordões grossos e ilhotas de células neoplásicas (Figuras 4A e 4D), como pode ser observado na Figura 4.

Figura 3 - Em A e B, queilite actínica sem displasia epitelial com epitélio hiperplásico e hiperortoqueratinizado e, presença de transformação basofílica do colágeno. Em C e D, queilite actínica com displasia intensa (grau III) com alteração da arquitetura epitelial, perda da estratificação, cristas epiteliais em forma de gota, intenso pleomorfismo celular e presença de mitoses atípicas (Hematoxilina e Eosina; A e C = 200x; B e D = 400x).

Figura 4 - Carcinoma espinocelular de lábio; Em A e C, observar a continuidade entre o epitélio de revestimento do lábio e o carcinoma invasivo. Em B e D, detalhes do padrão de invasão tumoral com ilhotas e cordões grossos, intensa queratinização e intenso infiltrado inflamatório mononuclear envolvendo o tumor (Hematoxilina e Eosina; A e C = 200x; B e D = 400x).

5.3.3 Expressão das citoqueratinas nas queilites actínicas e nos carcinomas espinocelulares de lábio

As expressões das citoqueratinas 13 (CK13) e 10 (CK10) nas queilites actínicas foram avaliadas na área do vermelhão do lábio, mucosa labial e epiderme, quando presente.

A grande maioria das queilites actínicas (97,8%) mostrou expressão para a CK13, sendo 73,3% destas com displasia epitelial e 24,5% sem displasia epitelial (Tabela 4).

A imunomarcção da CK13 foi intensa principalmente na camada espinhosa e granulosa do epitélio do vermelhão do lábio (Figura 5A e 5B) e da mucosa labial, com marcação menos intensa ou até mesmo, ausente na camada basal. Foi verificado também que, na presença de ortoqueratinização, a marcação tornava-se mais heterogênea. Aproximando-se da região da epiderme, a marcação foi se tornando mais fraca, até ser totalmente negativa. Nas áreas displásicas houve perda da expressão da CK13 e a marcação variava de acordo com o grau de displasia, ou seja, quanto mais intensa a displasia epitelial, menos focos de células epiteliais mantinham a expressão de CK13 (Figuras 5C e 5D).

A citoqueratina 10 teve um comportamento semelhante à CK13 apresentando positividade em 82,2% das queilites actínicas. Destas, 26,7% não apresentavam displasia epitelial enquanto que 55,5% possuíam algum grau de displasia epitelial. Em 17,8% das queilites actínicas com displasia epitelial a imunomarcção foi negativa para a citoqueratina 10 (Tabela 4 e Figura 6A e 6B).

Assim como para a CK13, foi verificado que a CK10 teve expressão positiva principalmente na camada espinhosa e granulosa do vermelhão do lábio, porém, mostrou-se totalmente negativa na mucosa labial. Além disso, também foi expressa positivamente na camada espinhosa e granulosa da epiderme, com ausência total de expressão nas áreas displásicas, como pode ser observado nas Figuras 6C e 6D.

Não houve diferença significativa entre a expressão da CK13 ($p=0,266$) e de CK10 ($p=0,086$), na região do vermelhão do lábio, das queilites actínicas com e sem displasia epitelial, como descrito na Tabela 4.

Tabela 4 - Distribuição da expressão das citoqueratinas 13 (CK13) e 10 (CK10) nas 45 queilites actínicas sem e com displasia epitelial. Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, SP, 2006 a 2011.

Queilite actínica	CK13 N (%)			CK10 N (%)		
	(+)	(-)	<i>p</i>	(+)	(-)	<i>p</i>
Sem displasia	11 (24,5%)	1 (2,2%)	0,266	12 (26,7%)	0 (0%)	0,086
Com displasia	33 (73,3%)	0 (0%)		25 (55,5%)	8 (17,8%)	
Total	45 (100%)			45 (100%)		

N: número de queilites actínicas; *p*: nível descritivo do teste exato de Fisher.

Nos carcinomas espinocelulares de lábio as expressões das citoqueratinas foram avaliadas no epitélio da pele, do vermelhão do lábio e da mucosa labial separadamente, além da região do *front* de invasão do carcinoma espinocelular.

A expressão da CK13 foi observada em apenas 10% do epitélio cutâneo (epiderme), em 95% do epitélio do vermelhão do lábio e em 100% do epitélio da mucosa labial. Essa expressão positiva foi verificada principalmente na camada espinhosa do vermelhão do lábio e da mucosa labial. Na região do carcinoma espinocelular de lábio, a marcação, na maioria das vezes, era focal, e mostrava-se ausente nas células periféricas e pérolas de queratina, quando presente (Figuras 7A e 7B).

Com relação à citoqueratina 10 (CK10) houve expressão na grande maioria dos epitélios da pele (95% dos espécimes), e em 30% dos epitélios do vermelhão do lábio (Tabela 5). Nesses epitélios, foram observadas marcações positivas na camada espinhosa, e em alguns espécimes, estendendo-se para camada granulosa. Entretanto, no epitélio da mucosa labial e nos carcinomas espinocelulares de lábio, não se observou a expressão da CK10, como ilustrado nas Figuras 7C e 7D.

5.3.4 Associação das citoqueratinas CK10 e CK13 entre as queilites actínicas e os carcinomas espinocelulares de lábio

A expressão das citoqueratinas nas queilites actínicas com e sem displasia epitelial e nos carcinomas espinocelulares de lábio foi comparada, estatisticamente, pelo teste do qui-quadrado com nível de significância de 5%, como descrito na Tabela 6.

Não houve diferenças significativas entre a expressão das citoqueratinas CK13 ($p=0,267$) e CK10 ($p=0,087$) nas queilites actínicas sem e com displasia epitelial (Tabela 6).

Quando se comparou a expressão da CK13 entre as queilites actínicas com displasia ($p=0,377$) ou sem displasia epitelial ($p=1,000$) e o carcinoma espinocelular de lábio também não se observou diferenças estatisticamente significativas, como ilustrado na Tabela 6.

Entretanto, observou-se uma associação estatisticamente significativa da expressão da CK10 nos carcinomas espinocelulares de boca quando comparada às queilites actínicas com displasia epitelial ($p<0,001$) e sem displasia epitelial ($p<0,001$) (Tabela 6). Todas as queilites actínicas sem displasia epitelial e 76% daquelas com displasia epitelial mostraram positividade para citoqueratina 10 sendo esta expressão ausente em todos os carcinomas de lábio (Tabela 6 e Figuras 7C e 7D).

Tabela 5 - Distribuição da expressão das citoqueratinas 13 (CK13) e 10 (CK10) nos diferentes epitélios da pele, do vermelhão do lábio e da mucosa labial adjacente aos carcinomas espinocelulares de lábio. Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, SP, 2006 a 2011.

Epitélios	CK13		CK10	
	N (%)		N (%)	
	(+)	(-)	(+)	(-)
Pele*(T=12)	2 (10,0%)	10 (90,0%)	11 (95,0%)	1 (5,0%)
Vermelhão do lábio (T=20)	19 (95,0%)	1 (5,0%)	6 (30,0%)	14 (70,0%)
Mucosa labial (T=20)	20 (100%)	0 (0%)	0 (0%)	20(100%)
CEC (T=20)	19 (95,0%)	1 (5,0%)	0 (0%)	20 (100%)

N: número de carcinomas espinocelulares de lábio.*Incluído apenas os 12 espécimes que apresentavam epiderme. T: total de espécimes analisados. CEC: carcinoma espinocelular.

Tabela 6 - Associação entre a expressão das citoqueratinas 13 (CK13) e 10 (CK10) nas queilites actínicas com e sem displasia epitelial e nos carcinomas espinocelulares de lábio. Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, SP, 2006 a 2011.

CKs	QASD (n=12)		QACD (n=33)		CEC (n=20)		QASD x QACD	QACD x CEC	QASD x CEC
	(+)	(-)	(+)	(-)	(+)	(-)			
CK13	11	1	33	0	19	1	p=0,267	p=0,377	p=1,000
CK10	12	0	25	8	0	20	p=0,087	p<0,001*	p<0,001*

CKs: citoqueratinas; CK13: citoqueratina 13; CK10: citoqueratina 10; QASD: queilite actínica sem displasia; QACD: queilite actínica com displasia; CEC: carcinoma espinocelular de lábio; n: número de espécimes analisadas, p: nível descritivo do teste qui-quadrado. p<0,001*: estatisticamente significante.

Figura 5 – Expressão da citoqueratina 13 nas queilites actínicas sem displasia e com displasia epitelial. Em A e B, observar a forte expressão da citoqueratina 13 em todas as camadas do epitélio do vermelhão do lábio da queilite actínica sem displasia epitelial. Em C e D, observar a imunomarcagem focal e heterogênea da citoqueratina 13 nas camadas espinhosa e granulosa do epitélio da queilite actínica displásica. (Imuno-histoquímica: anti-CK13; A e C = 100x e B e D = 200x).

Figura 6 – Expressão da citoqueratina 10 nas queilites actínicas sem displasia e com displasia epitelial. Em A e B, observar a imunomarcção nas camadas espinhosa e granulosa do epitélio e a ausência de expressão nas camadas basal e suprabasal da queilite actínica sem displasia. Em C e D, notar a área de transição com expressão da citoqueratina 10 nas camadas espinhosa e granulosa do vermelhão do lábio e ausência de imunomarcção nas regiões displásicas da queilite actínica. (Imuno-histoquímica: anti-CK10, A e C = 100x, B e D = 200x).

Figura 7 – Expressão das citoqueratinas 13 e 10 nos carcinomas espinocelulares de lábio. Em A e B, a expressão da citoqueratina 13 foi heterogênea em algumas ilhotas e cordões tumorais, com perda de expressão nas pérolas córneas. Em C e D, observar a completa negatividade da citoqueratina 10 no carcinoma espinocelular de lábio. (Imunohistoquímica: anti-CK13 e anti-CK10; A e C = 100x e B e D= 200x).

5.3.5 Análise do índice de proliferação celular nas queilites actínicas e nos carcinomas espinocelulares de lábio

O índice de proliferação celular nas queilites actínicas e na região do *front* de invasão dos carcinomas espinocelulares de lábio, foi determinado pela expressão acastanhada dos núcleos das células epiteliais imunomarcados pelo Ki-67, encontra-se descrito na Tabela 7 e ilustrado na Figura 8.

Com base nos valores percentuais medianos do índice de proliferação celular encontrados nas queilites actínicas sem displasia, a amostra foi dicotomizada em dois grupos: menor ou igual a 25% e com valores maiores que 25% de células epiteliais positivas, sendo este último considerado um alto índice de proliferação celular.

Na Tabela 7, encontra-se a distribuição percentual do índice de proliferação celular, baseado na expressão do Ki-67, nos carcinomas espinocelulares de lábio e nas queilites actínicas sem e com displasia epitelial. As queilites actínicas com displasia epitelial e os carcinomas espinocelulares de lábio apresentaram alto índice de proliferação celular (> 25% de células epiteliais positivas para o Ki-67).

No Gráfico 1 encontra-se a distribuição numérica do índice de proliferação celular nos 20 carcinomas espinocelulares de lábio, nas 12 queilites actínicas sem displasia (QASD) e nas 33 queilites actínicas com displasia epitelial classificadas em leve (QADL), moderada (QADM) e intensa (QADI). Nota-se que a maioria dos carcinomas espinocelulares de lábio e das queilites com displasia epitelial apresentou alto índice de proliferação celular (Ki-67>25% de células positivas) (Gráfico 1).

Entretanto, para análise estatística, as queilites actínicas com displasia (independente do grau) foram incluídas em um único grupo. Não houve diferenças significativas entre o alto e baixo índice de proliferação celular nas queilites com displasia, sem displasia e nos carcinomas espinocelulares de lábio, como pode ser observado na Tabela 7.

Tabela 7 - Distribuição das queilites actínicas com e sem displasia e dos carcinomas espinocelulares de lábio em relação ao índice de proliferação celular determinado pela expressão de Ki-67. Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, SP, 2006 a 2011.

Ki-67	QASD N (%)	QACD N (%)	CEC N (%)	P
≤ 25%	6 (50%)	6 (18,2%)	6 (30%)	p=0,104
> 25%	6 (50%)	27 (81,8%)	14 (70%)	
Total	12	33	20	

QASD = queilite actínica sem displasia; QACD = queilite actínica com displasia; CEC = carcinoma espinocelular de lábio. *p*: nível descritivo do teste qui-quadrado.

QASD = queilite actínica sem displasia; QADL = queilite actínica com displasia leve; QADM = queilite actínica com displasia moderada; QADI = queilite actínica com displasia intensa; CEC = carcinoma espinocelular de lábio.

Gráfico 1 - Distribuição numérica das queilites actínicas sem displasia, com diferentes graus de displasia epitelial (leve, moderada e intensa) e dos carcinomas espinocelulares de lábio em relação ao índice de proliferação celular determinado pela expressão do Ki-67.

Na Tabela 8, o alto índice de proliferação celular (>25% de células epiteliais positivas) nas queilites actínicas foi associado com a expressão das citoqueratinas 13 e 10. Não houve diferença significativa na expressão da citoqueratina 13 ($p=0,335$) e da citoqueratina 10 ($p=0,563$) entre as queilites actínicas sem displasia e com displasia epitelial.

Tabela 8 – Associação entre o alto índice de proliferação celular (Ki-67>25% de células epiteliais positivas) e a expressão da CK13 e da CK10 nas queilites actínicas sem e com displasia epitelial. Faculdade de Medicina de Botucatu, UNESP, SP, 2006 a 2011.

	QASD	QACD	<i>p</i>
Ki-67>25%/CK13(+)	5	26	$p=0,335$
Ki-67>25%/CK13(-)	1	1	
Ki-67>25%/CK10(+)	6	21	$p=0,563$
Ki-67>25%/CK10(-)	0	6	
Total	6	27	

CK13 = citoqueratina 13; CK10 = citoqueratina 10; QASD = queilite actínica sem displasia epitelial; QACD = queilite actínica com displasia epitelial. *p*. nível descritivo do teste exato de Fisher.

Figura 8 – Expressão do Ki-67 nas queilites actínicas sem e com displasia epitelial e nos carcinomas espinocelulares de lábio. Em A (queilite actínica sem displasia), observar um discreto número de células positivas restritas à camada basal. Em B (queilite actínica com displasia), verificar um número significativo de células positivas na camada basal e suprabasal. Em C (carcinoma espinocelular de lábio), notar um número expressivo de células positivas no *front* de invasão tumoral. (Imuno-histoquímica: anti-Ki-67; A, B e C = 200x).

6 Discussão

6 DISCUSSÃO

Embora não existam informações precisas sobre a prevalência de transformação maligna da queilite actínica, a presença e a intensidade da displasia epitelial aumenta a chance da progressão desta lesão para o câncer de lábio (NICO; RIVITTI; LOURENÇO, 2007; VIEIRA et al, 2012).

Mesmo sendo amplamente utilizado, o termo “queilite actínica” é considerado inadequado por alguns autores, pois, afirmam que a queilite actínica não é uma condição inflamatória, e sim, em muitos pacientes, o início de um carcinoma escamoso *in situ* formado pela expansão clonal dos queratinócitos, induzida pela radiação solar (NICO; RIVITTI; LOURENÇO, 2007; WOOD et al., 2011; JADOTTE; SCHWARTZ, 2012). Sendo a radiação solar um fator etiológico da queilite actínica, ocupações que envolvem exposição prolongada ao sol são consideradas fatores de risco bastante relevantes (NICO; RIVITTI; LOURENÇO, 2007; CAVALCANTE; ANBINDER; CARVALHO, 2008).

No presente estudo, os dados clínicos e demográficos da população analisada revelaram um padrão já conhecido desta lesão no Brasil e no mundo, ou seja, a maioria dos pacientes com queilite actínica era do gênero masculino (77,7%) com idade acima de 40 anos, cuja ocupação envolvia exposição prolongada ao sol (Tabela 1), confirmando os achados de outros trabalhos da literatura (MARKOPOULOS; ALBANIDOU-FARMAKI; KAYAVIS, 2004; CAVALCANTE; ANBINDER; CARVALHO, 2008; JADOTTE; SCHWARTZ, 2012; VIEIRA et al., 2012). Essa predileção pelo gênero masculino vem sendo justificada pela ausência de proteção labial adequada, por parte dos homens, quando comparada às mulheres (CAVALCANTE; ANBINDER; CARVALHO, 2008).

Assim como os pacientes com queilite actínica, os pacientes com carcinoma espinocelular de lábio, também mostraram uma predileção pelo gênero masculino (60%), sendo a idade mínima detectada de 49 anos (Tabela 1).

Clinicamente, mesmo com a presença de eritemas, ulcerações ou sangramento intermitente (MARKOPOULOS; ALBANIDOU-FARMAKI; KAYAVIS, 2004; CAVALCANTE; ANBINDER; CARVALHO, 2008; JADOTTE; SCHWARTZ, 2012; VIEIRA et al., 2012), o diagnóstico clínico de uma queilite actínica pode não ser compatível com o diagnóstico microscópico.

Em nosso estudo, todas as queilites actínicas analisadas foram obtidas a partir de vermelhonectomia realizada no Departamento de Otorrinolaringologia e Oftalmologia, da Faculdade de Medicina de Botucatu – UNESP e previamente diagnosticadas pelo Departamento de Patologia da mesma instituição. A vermelhonectomia é considerada como a melhor forma de tratamento para estas lesões (NICO; RIVITTI; LOURENÇO, 2007; VIEIRA et al., 2012), sendo adotada por alguns profissionais visando um diagnóstico microscópico mais preciso das queilites actínicas, particularmente no que se refere à presença de áreas com displasia epitelial (JADOTTE; SCHWARTZ, 2012; VIEIRA et al., 2012).

Do ponto de vista microscópico, também verificamos em nossa amostra as principais características associadas ao diagnóstico das queilites actínicas no lábio inferior, como a transformação basofílica das fibras colágenas, a hiperplasia epitelial com hiperortoqueratose ou hiperparaqueratose e a presença do infiltrado inflamatório crônico justaepitelial (Tabela 2). Este quadro microscópico foi semelhante aquele encontrado em outros trabalhos da literatura (NICO; RIVITTI; LOURENÇO, 2007; WOOD et al., 2011; JADOTTE; SCHWARTZ, 2012; VIEIRA et al., 2012).

A identificação e a classificação microscópica do grau de displasia epitelial nas queilites actínicas, no presente estudo, foram baseadas nas alterações estruturais e citológicas do epitélio, critérios estes estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (GALE et al., 2005). Com base nestes critérios, verificamos que 24,4% das queilites actínicas apresentavam displasia epitelial leve, 31,0% moderada e 18,0% intensa (Tabela 2). A displasia epitelial intensa, no presente trabalho, foi considerada sinônimo de carcinoma *in situ* (CIS).

Assim como em outras lesões de boca (BOUQUOT; SPEIGHT; FARTHING, 2006; KUJAN et al., 2007; WARNAKYLASURIYA et al., 2008; SPEIGHT, 2010), a interpretação da presença ou a graduação da intensidade da displasia epitelial nas queilites actínicas permanece como um dos critérios subjetivos

de grande variabilidade entre os patologistas. Mesmo adotando os mesmos critérios morfológicos, esta discrepância inter ou intra-observadores da displasia epitelial em lesões da boca tem sido foco de muitas discussões entre os pesquisadores (BOUQUOT; SPEIGHT; FARTHING, 2006; KUJAN et al., 2007; WARNAKYLASURIYA et al., 2008; SPEIGHT, 2010), visando um consenso maior no estabelecimento do prognóstico das lesões potencialmente malignas.

Especificamente nas queilites actínicas, as atipias celulares mais intensas podem estar associadas com intenso infiltrado inflamatório, quase sempre observado em lesões ulceradas, o que pode dificultar a identificação de um carcinoma *in situ* (VIEIRA et al., 2012). Portanto, de acordo com Speight (2010) e Vieira et al. (2012), considerando que a graduação de displasia epitelial em lesões de boca, incluindo aquelas observadas em queilites actínicas, é bastante subjetiva, existe a necessidade de se buscar marcadores moleculares que possam auxiliar no estabelecimento de um diagnóstico microscópico mais preciso destas alterações epiteliais. Assim sendo, a concepção do presente estudo foi estabelecida com o intuito de contribuir com o conhecimento da expressão de biomarcadores, como as citoqueratinas 10 e 13, em lesões potencialmente malignas como as queilites actínicas.

A expressão destas citoqueratinas 10 e 13 vem sendo amplamente investigada em lesões malignas da mucosa bucal (GIRES et al., 2006; FILLIES et al., 2007; OHTA et al., 2010; SCHAAIJ-VISSER et al., 2010; SAKAMOTO et al., 2011; IDA-YONEMOCHI et al., 2012; KITAMURA et al., 2012; KOBAYASHI et al., 2012), porém poucos estudos foram realizados em queilites actínicas (SANTOS et al., 2003).

A análise imuno-histoquímica da positividade das CKs foi realizada, separadamente, nos diferentes epitélios da região do lábio inferior, ou seja, região da pele, região do vermelhão do lábio e região da mucosa labial. A expressão imuno-histoquímica das CKs nas diferentes camadas epiteliais: basal, espinhosa, granulosa e córnea, seguiu basicamente os critérios do trabalho de Barret et al (2005) que descreveram a expressão de diversas citoqueratinas em 31 lábios inferiores oriundos de cadáveres humanos. Para a realização das análises estatísticas foram consideradas as marcações da região do vermelhão do lábio

inferior. Nos carcinomas espinocelulares de lábio, as CKs foram avaliadas nas regiões do *front* de invasão tumoral.

No lábio inferior, a expressão da CK13 foi observada em apenas 10% do epitélio cutâneo (epiderme), em 95% do epitélio do vermelhão do lábio e em 100% do epitélio da mucosa labial (Tabela 5).

A grande maioria das queilites actínicas mostrou expressão para a CK13, sendo, a maior parte destas, com displasia epitelial (Tabela 4). A imunomarcação da CK13 foi verificada, principalmente, na camada espinhosa e granulosa do epitélio do vermelhão do lábio e da mucosa labial, com marcação menos intensa ou até mesmo ausente, na camada basal (Figuras 5A e 5B). Foi verificado também que, na presença de hiperortoqueratinização, a marcação tornava-se mais heterogênea. Nas áreas displásicas houve perda da expressão da CK13 e a marcação variava de acordo com o grau de displasia, ou seja, quanto mais intensa a displasia epitelial, menos focos de células epiteliais mantinham a expressão de CK13 (Figuras 5C e 5D). Nos carcinomas espinocelulares de lábio, a expressão de CK13, na maioria das vezes, era focal, e mostrava-se ausente nas células periféricas e pérolas de queratina, quando presente (Figuras 7A e 7B).

Os resultados descritos acima reforçam aqueles de outros autores que demonstraram que a perda da expressão da CK13 no epitélio da mucosa bucal displásica parece acompanhar o processo de transformação maligna (GIRES et al., 2006; OHTA et al. 2010; SAKAMOTO et al., 2011; IDA-YONEMOCHI et al., 2012; KITAMURA et al., 2012).

Confirmando os resultados de Kitamura et al. (2012) em leucoplasias bucais e em carcinomas espinocelulares de boca, nós também observamos que a expressão de CK13 é fortemente expressa em epitélio da mucosa labial e diminui consistentemente em áreas displásicas e em carcinomas espinocelulares invasivos.

A positividade heterogênea e até mesmo a perda de expressão da CK13 que verificamos nos carcinomas espinocelulares de lábio, estão em concordância com os resultados de Gires et al. (2006) que, após analisarem a imunomarcação da CK13 em carcinomas espinocelulares e leucoplasias de boca, concluíram que esse marcador é eficiente na diferenciação entre um epitélio normal e um epitélio displásico.

Particularmente, em queilites actínicas com diferentes graus de displasia, o estudo de Santos et al. (2003) mostrou que a CK13 foi expressa nas camadas suprabasais do epitélio do lábio porém não conseguiram associar esta expressão com as alterações displásicas. Também Schaij-Visser et al. (2010) ao investigarem a expressão das citoqueratinas 4 e 13, em leucoplasias com e sem displasia epitelial, afirmaram que, mesmo com redução destas CKs em áreas displásicas, esses marcadores não predizem uma transformação maligna em boca.

Portanto, o significado clínico de nossos resultados e a confirmação da expressão de CK13 como fator preditivo de malignização na região do lábio inferior necessita ser melhor investigada em outros estudos prospectivos.

Não houve diferença significativa entre a expressão da CK13 ($p=0,266$) nas queilites actínicas com e sem displasia epitelial (Tabela 4). Entretanto, mesmo sem diferença estatística significativa e avaliando os resultados com base nas diferenças numéricas entre a expressão positiva e negativa para a CK13, notamos que a maioria das queilites actínicas com displasia apresentou perda de expressão da CK13.

A citoqueratina 10 teve um comportamento semelhante à CK13 apresentando positividade para a maioria das queilites actínicas (Tabela 4), porém, sem diferença estatisticamente significativa ($p=0,086$), entre as lesões sem displasia e com displasia epitelial. A CK10 teve expressão positiva principalmente na camada espinhosa e granulosa do vermelhão do lábio, porém, mostrou-se totalmente negativa na mucosa labial e nas áreas displásicas (Figuras 6C e 6D). Estes resultados reforçam aqueles de Fillies et al. (2007) ao sugerirem que a ausência de expressão da CK10 está associada com a presença de displasia epitelial em lesões potencialmente malignas como as leucoplasias bucais.

Nos outros epitélios da região do lábio avaliados, foi possível verificar que houve expressão de CK10 na grande maioria dos epitélios da pele, e em alguns dos epitélios do vermelhão do lábio (Tabela 5). Nesses epitélios, foi observada marcação positiva na camada espinhosa, e em alguns espécimes, estendendo-se para camada granulosa. Entretanto, no epitélio da mucosa labial e nos carcinomas espinocelulares de lábio, não se observou a expressão da CK10 (Figuras 7C e 7D).

Nossos resultados confirmaram alguns achados de Santos et al. (2003) que verificaram a expressão de CK10 nas camadas espinhosa, granulosa e córnea da maioria das queilites actínicas com displasia, porém em 14,7% esta expressão foi ausente. Segundo os autores, a expressão de CK10 nos casos estudados foi diferente da que ocorre na mucosa labial normal e a presença da CK10 nas camadas intermediárias do epitélio apoia a idéia de que um processo de queratinização alterado está ocorrendo. Além disso, concluíram que a expressão da CK10 foi independente do grau de displasia, o que contrasta com nossos resultados onde observamos uma ausência desta expressão nas queilites actínicas com displasia mais intensa.

No presente estudo, foi observada uma associação estatisticamente significativa entre a expressão da CK10 nos carcinomas espinocelulares de lábios e nas queilites actínicas com displasia epitelial ($p < 0,001$) e nas queilites actínicas sem displasia epitelial ($p < 0,001$) (Tabela 6). A interpretação destes resultados confirma a expressão da CK10 como um biomarcador do processo de malignização das células epiteliais, ou seja, sua expressão vai sendo reduzida com o aumento das alterações citológicas e estruturais observadas nas áreas displásicas sendo totalmente negativa nos carcinomas espinocelulares de lábio (Tabela 6 e Figuras 7C e 7D).

Com o intuito de comparar a expressão das citoqueratinas nas queilites actínicas e nos carcinomas espinocelulares de lábio com o índice de proliferação celular dessas lesões, foi utilizada a imunomarcacão com o Ki-67.

Baseado nos valores percentuais medianos do índice de proliferação celular encontrados nas queilites actínicas sem displasia, a amostra foi dicotomizada em dois grupos: menor ou igual a 25% (considerado baixo índice de proliferação celular) e com valores maiores que 25% (considerado alto índice de proliferação celular). A maioria das queilites actínicas com displasia (81,8%) e dos carcinomas espinocelulares de lábio (70%) apresentou alto índice de proliferação celular (Tabela 7).

Alguns estudos prévios descreveram o aumento do número total de células epiteliais proliferantes em displasias epiteliais e carcinomas espinocelulares de boca, determinados a partir da imunomarcacão do Ki-67, inclusive sugerindo que o aumento da população de células proliferantes, na camada suprabasal do epitélio

bucal, constitui um marcador útil na identificação de altos graus de displasia (GONZALES-MOLES et al., 2000; TAKEDA et al., 2006; GONZALES-MOLES et al., 2010; MONTEBUGNOLI et al., 2011).

Em nosso estudo, não foi possível confirmar os resultados dos autores acima descritos (GONZALES-MOLES et al., 2000; TAKEDA et al., 2006; GONZALES-MOLES et al., 2010; MONTEBUGNOLI et al., 2011), pois o índice de proliferação celular foi determinado a partir da contagem de 1000 células epiteliais e, portanto as regiões epiteliais adjacentes às áreas displásicas também foram incluídas na contagem. Além disso, deve ser ressaltado que as queilites actínicas sem displasia também apresentavam hiperplasia epitelial. Esses dois aspectos poderiam explicar a ausência de diferença estatística entre as queilites actínicas com e sem displasia epitelial e no CEC, no que se refere ao índice de proliferação celular.

Quando tentamos verificar se existia associação entre a expressão das citoqueratinas CK13 e CK10 e os altos índices de proliferação celular das queilites actínicas com e sem displasia, verificamos que esta associação não foi estatisticamente significativa (Tabela 8).

Provavelmente, se a contagem das células imunomarcadas pelo Ki-67 tivesse ficado restrita às áreas displásicas poderíamos observar com maior exatidão esse aumento da população celular proliferante. Entretanto, essa restrição nos campos microscópicos contendo displasia epitelial ou no número de células avaliadas, não foi realizada porque poderia comprometer o estabelecimento do índice de proliferação celular, diminuindo muito o número total de células contadas.

Mesmo com algumas limitações, este estudo é pioneiro na análise da expressão da CK10 e da CK13 em associação com índice de proliferação celular, determinado pela expressão do Ki-67, em queilites actínicas com e sem displasia epitelial e em carcinomas espinocelulares de lábio. Baseado em nossos resultados, concluímos que as citoqueratinas 13 e 10 participam do processo de malignização das queilites actínicas sendo a expressão alterada ou ausente destes biomarcadores indicativa de áreas displásicas ou carcinoma espinocelular invasivo na região de lábio inferior.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

A análise dos 45 queilites actínicas com e sem displasia epitelial e 20 carcinomas espinocelulares de lábio demonstrou:

- uma expressão positiva da CK13 no vermelhão do lábio e na mucosa labial, contrastando com ausência desta expressão na epiderme da região do lábio inferior;
- uma expressão positiva da CK10 nas camadas espinhosa e granulosa do vermelhão do lábio e da epiderme da região do lábio inferior, contrastando com ausência desta na região de mucosa labial;
- uma perda de expressão da CK13 e uma ausência total de expressão da CK10 nas áreas displásicas das queilites actínicas;
- uma expressão heterogênea da CK13 e uma ausência total de expressão da CK10 nos carcinomas de lábio;
- uma associação estatisticamente significativa da expressão da CK10 nos carcinomas espinocelulares de lábio quando comparada às queilites actínicas com displasia epitelial ($p < 0,001$) e sem displasia epitelial ($p < 0,001$);
- uma ausência de associação entre o alto índice de proliferação e a expressão da CK13 e da CK10 nas queilites actínicas sem e com displasia.

Estes resultados sugerem que as citoqueratinas 13 e 10 participam do processo de malignização das queilites actínicas, sendo a expressão alterada ou ausente destes biomarcadores indicativa da presença de áreas displásicas nessas lesões potencialmente malignas.

Referências

REFERÊNCIAS

ALMEIDA, H. L. Cytokeratins. **An bras Dermatol**, v.79, n.2, p.135-145. Mar. 2004.

BARRETT, A.W. et al. The differentiation profile of the epithelium of the human lip. **Arch Oral Biol**, v.50, n.4, p.431-38, Apr. 2005.

BOUQUOT, J.; SPEIGHT, P. M.; FARTHING, P. M. Epithelial Dysplasia of the Oral Mucosa – diagnostic problems and prognostic features. **Current Diagnostic Pathology**, v.12, p.11-12, 2006.

BROWN, D. C.; GATTER, K. C. Ki67 protein: the immaculate deception? **Histopathology**, v.40, n.1, p.2-11, Jan. 2002.

CAVALCANTE, A. S. R.; ANBINDER, A. L.; CARVALHO, Y. R. Actinic Cheilitis: Clinical and Histological Features. **J Oral Maxillofac Surg**, v.66, n.3, p.498-503, Mar. 2008.

CHU, P.G.; WEISS, L.M. Keratin expression in human tissues and neoplasms. **Histopathology**, v.40, n.5, p.403-39. May. 2002.

FILIES, T. et al. Cytokeratin alteration in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. **Oncology reports**, v.18, n.3, p.639-43. Sep. 2007.

GALE, N. et al. Epithelial precursor lesions. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and genetics: head and neck tumours. Lyon: IARC Press; 2005.

GONZALES - MOLES, M. A. et al. Suprabasal expression of Ki-67 antigen as a marker for the presence and severity of oral epithelial dysplasia. **Head Neck**, v.22, n.7, p.658-61. Oct. 2000.

GONZALEZ - MOLES, M.A. et al. Ki-67 expression in non-tumour epithelium adjacent to oral cancer as risk marker for multiple oral tumours. **Oral Diseases**, v.16, n.1, p.68-75. Jan. 2010.

GONZALEZ - MOLES, M.A.; SCULLY, C.; RUIZ-AVILA, I. Molecular findings in oral premalignant fields: update on their diagnostic and clinical implications. **Oral Dis**, v.18, n.1, p.40-7. Jan. 2012.

GIRES, O. et al. CK 8 correlates with malignancy in leukoplakia and carcinomas of the head and neck. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.343, n.1, p.252-59. Apr. 2006.

JADOTTE, Y.T.; SCHWARTZ, R.A. Solar cheilosis: An ominous precursor: part I. Diagnostic insights. **J Am Acad Dermatol**, v.66, n.2, p.173-84. Feb. 2012.

IDA - YONEMOCHI, H. et al. Loss of keratin 13 in oral carcinoma in situ: a comparative study of protein and gene expression levels using paraffin sections. **Mod Pathol**, v.25, n.6, p.784-94. Jun. 2012.

KITAMURA, R. et al. Association of cytokeratin 17 expression with differentiation in oral squamous cell carcinoma. **J Cancer Res Clin Oncol**, v.138, n.8, p.1299-310. Aug. 2012.

KOBAYASHI, T. et al. Keratin 10-positive orthokeratotic dysplasia: a new leukoplakia-type precancerous entity of the oral mucosa. **Histopathology**, v.61, n.5, p.910-20, Nov. 2012.

KUJAN, O. et al. Why oral histopathology suffers inter-observer variability on grading oral epithelial dysplasia: An attempt to understand the sources of variation. **Oral Oncology**, v.43, n.3, p.224-231, Mar. 2007.

MARKOPOULOS, A.; ALBANIDOU – FARMAKI, E.; KAYAVIS, I. Actinic cheilitis: clinical and pathologic characteristics in 65 cases. **Oral Dis**, v.10, n.4, p.212-16. Jul. 2004.

MARTÍNEZ, A. et al. Epithelial expression of p53, mdm-2 and p21 in normal lip and actinic cheilitis. **Oral Oncol**, v.44, n.9, p.878-83. Sep. 2008.

MONTEBUGNOLI, L. et al. Ki-67 from clinically and histologically "normal" distant mucosa as prognostic marker in early-stage (T1-T2N0) oral squamous cell carcinoma: a prospective study. **J Oral Maxillofac Surg**, v. 69, n.10, p.2579-84. Oct. 2011.

NIKITAKIS, N.G. et al. Immunohistochemical expression of cytokeratins 7 and 20 in malignant salivary gland tumors. **Mod Pathol**, v.17, n.4, p.407-15. Apr. 2004.

NICO, M. M. S.; RIVITTI, E. A.; LOURENÇO, V. Actinic cheilitis: histologic study of the entire vermillion and comparison with previous biopsy. **J Cutan Pathol**, v.34, n.4, p.309-14. Apr. 2007.

NOGUCHI, S. et al. Expression of cytokeratin 13 and 17 in tongue squamous cell carcinoma and epithelial dysplasia. **Asian Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v.23, n.2, p.53-58. May. 2011.

OHTA K, et al. Histopathological evaluation including cytokeratin 13 and Ki-67 in the border between Lugol stained and unstained areas. **Oncol Rep**, v.24, n.1, p.9–14. Jul. 2010.

REIBEL, J. Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. **Crit Rev Oral Biol Med**, v.14, n.1, p.47-62. Jan. 2003.

SAKAMOTO, K. et al. Down-regulation of keratin 4 and keratin 13 expression in oral squamous cell carcinoma and epithelial dysplasia: a clue for histopathogenesis. **Histopathology**, v.58, n.4, p.531-42. Mar. 2011.

SANTOS, J. N. et al. Altered cytokeratin expression in actinic cheilitis. **J Cutan Pathol**, v.30, n.4, p.237-41, Apr. 2003.

SAWANT, S. S. et al. Prognostic value of tissue polypeptide antigen in oral squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, v.47, n.2, p.114-20. Feb. 2011

SCHAAIJ-VISSER, T.B.M. et al. Evaluation of cornulin, keratin 4, keratin 13 expression and grade of dysplasia for predicting malignant progression of oral leukoplakia. **Oral Oncology**, v.46, n.2, p.123-127. Feb. 2010.

SPEIGHT, P. M. An overview of the classification and predictive value of oral epithelial dysplasia. 2010. Disponível em: <<http://www.iaop.com/docs/epithelial%20dysplasia.pdf>>. Acesso em: 18 nov. 2011.

TAKEDA, T. et al. Immunohistological evaluation of Ki-67, p63, CK19 and p53 expression in oral epithelial dysplasias. **J Oral Pathol Med**, v.35, n.6, p.369-75. Jul. 2006.

VIEIRA, R.A.M.A.R. et al. Actinic cheilitis and squamous cell carcinoma of the lip: clinical, histopathological and immunogenetic aspects. **An Bras Dermatol**, v.87, n.1, p.105-14. Jan. 2012.

WARNAKULASURIYA, S. et al. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. **J Oral Pathol Med**, v.37, n.3, p.127-133, Mar. 2008.

WOOD, N.H. et al. Actinic Cheilits: A case report and review of the literature. **Eur J Dent**, v.5, n.1, p.101-06, Jan. 2011.

Anexo

Anexo 1 – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa (CEP) da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista.

**Universidade Estadual Paulista
Faculdade de Medicina de Botucatu**

Distrito Rubião Junior, s/nº - Botucatu - S.P.
CEP: 18.618-970
Fone/Fax: (0xx14) 3811-6143
e-mail secretaria: capellup@fmb.unesp.br
e-mail coordenadoria: tsarden@fmb.unesp.br

Registrado no Ministério da Saúde
em 30 de abril de 1997

Botucatu, 05 de março de 2012

Of. 75/2012

Ilustríssima Senhora
Prof^a Dr^a Denise Tostes Oliveira
A/C. Eliana Maria Miniccuci
Departamento de Dermatologia da
Faculdade de Medicina de Botucatu

Prezada Dras Denise e Eliana,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa (**Protocolo CEP 4146-2012**) "**Citoqueratinas como biomarcadores preditivos para o câncer de lábio em pacientes com queilite actínica**", a ser conduzido por Natália Galvão Garcia, orientada por Vossa Senhoria, com a colaboração de Eliana Maria Minicucci, Maria Aparecida Custódio Domingues e Silke Anna Thereza Webber, recebeu do relator **parecer favorável**, aprovado em reunião de 05/03/2012.

Situação do Projeto: **APROVADO**. Os pesquisadores deverão apresentar ao CEP ao final da execução do Projeto o "**Relatório Final de Atividades**".

Atenciosamente,

Alberto Santos Capelluppi
Secretário do CEP