

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA  
CAMPUS DE BOTUCATU**

**EXPRESSÃO DE APOPTOSE E ÓXIDO NÍTRICO SINTASE  
INDUTIVA EM QUEILITES ACTÍNICAS E CARCINOMAS  
ESPINOCELULARES DO LÁBIO INFERIOR: CORRELAÇÃO  
CLÍNICA, HISTOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA**

**Renata Aparecida Martinez Antunes Ribeiro Vieira**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP, para obtenção do título de Doutor em Patologia.

**BOTUCATU - SP**

**2010**

**UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA “JÚLIO DE MESQUITA FILHO”  
FACULDADE DE MEDICINA  
CAMPUS DE BOTUCATU**

**EXPRESSÃO DE APOPTOSE E ÓXIDO NÍTRICO SINTASE  
INDUTIVA EM QUEILITES ACTÍNICAS E CARCINOMAS  
ESPINOCELULARES DO LÁBIO INFERIOR: CORRELAÇÃO  
CLÍNICA, HISTOLÓGICA E IMUNOISTOQUÍMICA**

**Renata Aparecida Martinez Antunes Ribeiro Vieira**

**Orientador: Prof. Dr. Sílvio Alencar Marques**

**Co-Orientadora: Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mariangela Esther Alencar Marques e**

**Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliana Maria Minicucci**

Tese apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista - UNESP, para obtenção do título de Doutor em Patologia.

**BOTUCATU - SP**

**2010**

FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA SEÇÃO DE AQUIS. E TRAT. DA INFORMAÇÃO  
DIVISÃO TÉCNICA DE BIBLIOTECA E DOCUMENTAÇÃO - CAMPUS DE BOTUCATU - UNESP  
BIBLIOTECÁRIA RESPONSÁVEL: *ROSEMEIRE APARECIDA VICENTE*

Ribeiro-Vieira, Renata Aparecida Martinez Antunes.

Expressão de apoptose e óxido nítrico sintase indutiva em queilites actínicas e carcinomas espinocelulares do lábio inferior : correlação clínica, histológica e imunoistoquímica / Renata Aparecida Martinez Antunes Ribeiro Vieira. - Botucatu, 2010

Tese (doutorado) - Faculdade de Medicina de Botucatu, Universidade Estadual Paulista, 2010

Orientador: Sílvio Alencar Marques

Co-orientadores: Mariângela Esther Alencar Marques

Eliana Maria Minicucci

Capes: 40105008

1. Carcinoma de células escamosas. 2. Boca – Doenças. 3. Lábios.

Palavras-chave: Apoptose; Carcinoma espinocelular; Lábio; Óxido nítrico sintase indutiva; Queilite actínica.

# **Dedicatória**

Ao meu amado filho **Augusto**, razão maior do meu viver.

Ao meu marido **Renato Wagner Vieira**, grande homem e pai, que compreensivelmente soube preencher minhas longas ausências com muito afeto e serenidade.

À minha querida avó **Shirley**, que soube compreender meus anseios mesmo sem entender meu caminho. Obrigada por me auxiliar incansavelmente com os cuidados da casa e da família;

Aos meus pais **Airton e Susete**, pela honra de me concederem a vida e pelo incentivo constante;

Aos meus irmãos, **André e Michele**, que sempre torceram por mim, mesmo à distância;

À minha “amiga-irmã” **Veridiana Maria Brianezi Dignani de Moura**, pelo auxílio inestimável e imprescindível;

À minha querida cachorra **Branca** (*in memoriam*), companheira eterna, por todas as vezes que esperou por minha chegada tarde da noite, resguardando minha segurança, por todas as vezes que me fez companhia em longas madrugadas de trabalho e estudo e pela presença ausente do seu afago, do seu cheiro, do seu jeito de levantar as bochechas querendo “sorrir”:

Dedico este trabalho.

*“Que a força do medo que tenho  
Não me impeça de ver o que anseio.*

*Que a morte de tudo em que acredito  
Não me tape os ouvidos e a boca  
Porque metade de mim é o que eu grito  
Mas a outra metade é silêncio.*

*Que a música que ouço ao longe  
Seja linda ainda que tristeza.*

*Que as palavras que eu falo  
Não sejam ouvidas como prece e nem repetidas com fervor  
Apenas respeitadas  
Porque metade de mim é o que ouço  
Mas a outra metade é o que calo.*

*Que essa minha vontade de ir embora  
Se transforme na calma e na paz que eu mereço  
Que essa tensão que me corrói por dentro  
Seja um dia recompensada  
Porque metade de mim é o que eu penso mas a outra metade é um vulcão.*

*Que o medo da solidão se afaste, e que o convívio comigo mesmo se torne ao menos  
suportável.*

*Que o espelho reflita em meu rosto um doce sorriso  
Que eu me lembro ter dado na infância  
Por que metade de mim é a lembrança do que fui  
A outra metade eu não sei.*

*Que não seja preciso mais do que uma simples alegria  
Pra me fazer aquietar o espírito*

*E que o teu silêncio me fale cada vez mais*

*Porque metade de mim é abrigo*

*Mas a outra metade é cansaço.*

*Que a arte nos aponte uma resposta*

*Mesmo que ela não saiba*

*E que ninguém a tente complicar*

*Porque é preciso simplicidade pra fazê-la florescer.*

*E que a minha loucura seja perdoada*

*Porque metade de mim é amor*

*E a outra metade... também.”*

**Adaptada da letra da música “Metade”, de Oswaldo Montenegro.**

# **Agradecimentos**



À **Nossa Senhora Aparecida**, mãe de todas as horas;

À **minha família**, pelo amor, incentivo e compreensão.

À **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Silke Anna Theresa Webber**, pela colaboração, amizade, incentivo e presença constante;

Aos “moradores” do Anexo da Patologia: **Marise de Lourdes Marzo Solano, Meire França Martinez, Merielen Garcia Nascimento e Tony Fernando Grassi**, pela amizade, companheirismo, apoio, solidariedade e generosidade fraternas;

Ao meu amigo **João Francisco Lozano Luvizutto**, com o qual não só dividi o espaço físico da mesa de estudos, mas as incessantes dúvidas, as horas difíceis e muitos momentos de alegria. Suas piadas hilárias fizeram minha trajetória muito mais suave;

Ao meu amigo **Leandro Telles**, pela amizade incondicional, pelos conselhos oportunos, pela paciência e pelo amparo. Nossas longas conversas sempre me fazem enxergar a vida por outro prisma, mais transparente e, não raramente, mais brilhante.

À amiga **Jane Márcia de Almeida**, que sempre soube me ouvir e com seu silêncio me disse muitas coisas;

À amiga **Valéria Trindade**, que sempre falou muito e com alegria não permitiu que eu pensasse besteira;

Ao amigo **Marcelo Vieira**, pelos momentos de alegria.

Às secretárias e amigas do Programa de Pós-Graduação em Patologia **Tânia Andrade** e **Vânia do Amaral Soler**, que ocupam lugar distinto em meu coração, pela prontidão, humanismo, sensatez e delicadeza sempre prestados a mim.

Aos companheiros do **Rotaract Club de São Manuel**, especialmente ao companheiro **Raphael Antonio Reis Ribeiro**, pelo auxílio com os equipamentos eletrônicos que sempre teimam em dar pane;

Ao **Prof. Dr. Domingos Alves de Meira**, Diretor Técnico do S.A.E. e H. Dia, pelo incentivo e amizade. Sua dedicação ao trabalho, aos pacientes e ao ser humano são referências inestimáveis na minha vida.

À **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Márcia Guimarães da Silva**, Coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, grandiosa mulher, mãe e exímia profissional, pela atenção e solicitude constante;

Aos membros do **GEOOC - Grupo de Estudos de Oncologia Orocutânea**, do Departamento de Dermatologia e Radioterapia da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP, pelas sugestões oportunas.

A **Marcos Franchi**, técnico do laboratório de imunoistoquímica onde foi realizado esse trabalho, pelos ensinamentos, presteza e competência profissional;

Aos técnicos do Laboratório de Histologia I, especialmente a **Ronaldo de Moraes Correa, José Carlos Pedroso de Lima e Milena Pedroso Furtado**, pelo auxílio com o processamento das lâminas histológicas e pela atenção prestada.

Aos funcionários da Secretaria da Pós-Graduação, **Janete Aparecida Herculano Nunes Silva, Andrea Paula Longo Devidé, LÍlian Cristina Nadal Bianchi Nunes**, especialmente à **Nathanael Pinheiro Salles e Regina Célia Spadin**, pela dedicação e sensibilidade com que sempre atenderam às minhas solicitações;

Aos funcionários do Departamento de Dermatologia: **Luíza, Sarah, Eliete, Fernanda, Valdir e Levi**;

Aos funcionários do Bloco I que auxiliam o Ambulatório de Estomatologia: **Karen, Loucides, Maria de Lourdes, Selma, Jorge e Willian**, pelo profissionalismo e delicadeza;

Às colegas do **Centro de Saúde “Benedito de Souza” de Pratânia**, que de uma forma ou de outra, acreditando no meu esforço, cooperaram com este trabalho;

Aos funcionários e colegas do **Serviço de Atendimento Especializado e Hospital Dia “Domingos Alves Meira”**, pela compreensão e amizade;

Aos **pacientes** pela colaboração e confiança que tornou possível a realização deste trabalho.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico - CNPq** pela outorga da bolsa de doutorado (processo 142808/2006-7) e à **Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo - FAPESP** pelo auxílio pecuniário à pesquisa (processo 2009/52982-6).

E a todos que contribuíram direta ou indiretamente com este trabalho.

# **Agradecimentos Especiais**

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Sílvio Alencar Marques**, sinônimo de generosidade, verdadeiro mestre que, sobretudo, me faz a alma sorrir. Agradeço-te pela orientação segura e amiga, pelo exemplo de dedicação ao ensino, pesquisa e assistência médica que tanto contribuíram à minha formação e, principalmente, pela confiança a mim dispensada. Contigo, aprendi o que livros, artigos científicos ou pesquisas jamais me ensinariam.

À minha co-orientadora, **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Mariângela Esther Alencar Marques**, mais que uma grande pesquisadora, uma grande mulher. Seus conselhos valiosos e sua determinação foram imprescindíveis ao meu trabalho e me fizeram, certamente, um ser humano melhor. Obrigada pelos ensinamentos, pela atenção, paciência, perseverança e pelas horas incansáveis dedicadas ao saber.

À minha co-orientadora, **Prof<sup>a</sup>. Dr<sup>a</sup>. Eliana Maria Minicucci**, exímia profissional e ser humano inigualável. Obrigada pela dedicação amiga, por permitir e estimular meu crescimento, tratando-me sempre com afeição, respeito e interesse real em transmitir conhecimentos.

*“A cada dia que vivo, mais me convengo de que o desperdício da vida está no amor que não damos, nas forças que não usamos, na prudência egoísta que nada arrisca e que, esquivando-nos do sofrimento, perdemos também a felicidade.”*

**Carlos Drummond de Andrade**

# Índice



## Índice

<b>Índice de Figuras</b>	1
<b>Índice de Tabelas</b>	4
<b>Índice de Anexos e Apêndices</b>	6
<b>CAPÍTULO I</b>	
<b>1. Revisão de Literatura</b>	7
1.1. <i>Considerações Gerais</i>	7
1.2. <i>Carcinogênese</i>	7
1.2.1 <i>Radiações Ionizantes</i>	8
<b>2. Queilite Actínica</b>	10
2.1. <i>Definição</i>	10
2.2. <i>Etiologia</i>	10
2.3. <i>Características Clínicas</i>	11
2.4. <i>Características Histopatológicas</i>	12
2.5. <i>Tratamento</i>	13
<b>3. Carcinoma Espinocelular do Lábio</b>	14
3.1. <i>Definição e Epidemiologia</i>	14
3.2. <i>Etiologia</i>	15
3.3. <i>Evolução Clínica</i>	15
3.4. <i>Características Histopatológicas</i>	16

3.5.	<i>Estadiamento Clínico e Histológico</i>	17
3.6	<i>Fronte de Invasão</i>	17
3.7.	<i>Tratamento</i>	18
<b>4.</b>	<b>Marcadores Tumorais</b>	20
4.1.	<i>Apoptose</i>	20
4.2.	<i>Proteína p53</i>	21
4.3.	<i>Proteína p16</i>	22
4.4.	<i>Proteína p21</i>	24
4.5.	<i>Survivina</i>	24
4.6.	<i>Óxido Nítrico</i>	25
<b>5.</b>	<b>Referências</b>	27

## CAPÍTULO II

	<b>Artigo Científico 1. Queilite actínica e carcinoma espinocelular do lábio: características clínicas e histopatológicas e marcadores tumorais.</b>	42
	<b>Resumo</b>	42
<b>1.</b>	<b>Introdução</b>	43
<b>2.</b>	<b>Queilite Actínica</b>	43
	<i>Clínica</i>	44
	<i>Histopatologia</i>	44
	<i>Tratamento</i>	45

<b>3. Carcinoma Espinocelular do Lábio</b>	45
<i>Clínica</i>	46
<i>Histopatologia</i>	46
<i>Tratamento</i>	48
<b>4. Marcadores Tumorais</b>	48
<i>Proteína p53</i>	49
<i>Proteína p16</i>	49
<i>Proteína p21</i>	50
<i>Survivina</i>	50
<i>i-NOS</i>	51
<i>Bcl-2</i>	51
<i>Maspin</i>	52
<b>5. Conclusão</b>	53
<b>6. Referências</b>	53
<b>Tabelas e Figuras</b>	58

### **CAPÍTULO III**

<b>Artigo Científico 2. Queilite actínica: classificação clínica, correlação histológica e imunoistoquímica.</b>	61
<b>Resumo</b>	61
<b>Abstract</b>	62
<b>Introdução</b>	63

<b>Pacientes e métodos</b>	65
1. Estudo demográfico e de fototipo	66
2. Observação clínica	66
3. Biópsia	66
4. Critérios para o diagnóstico clínico e classificação da queilite actínica	66
5. Critérios para o diagnóstico histopatológico da queilite actínica:	67
6. Estudo imunoistoquímico	68
6.1 Análise estatística	69
<b>Resultados</b>	69
Estudo clínico e anatomopatológico	69
Estudo imunoistoquímico	70
<b>Discussão</b>	71
<b>Conclusão</b>	77
<b>Referências</b>	78

## **CAPÍTULO IV**

<b>Artigo Científico 3. Carcinoma espinocelular do lábio inferior: aspectos clínicos, histopatológicos e marcadores tumorais</b>	100
<b>Resumo</b>	100
<b>Abstract</b>	101
<b>Introdução</b>	102
<b>Pacientes e métodos</b>	105

Graduação histopatológica do CEC e do fronte de invasão	106
Imunoistoquímica	106
Análise estatística	107
<b>Resultados</b>	107
Estudo clínico e anatomopatológico	107
Estudo imunoistoquímico	108
<b>Discussão</b>	109
<b>Conclusão</b>	116
<b>Referências</b>	116
<b>CONCLUSÕES</b>	138
<b>ANEXOS E APÊNDICES</b>	139

## Índice de Figuras

### Capítulo I – Revisão de literatura

<b>Figura 1</b>	Papel da p16 e da CDK4/6 na regulação do ciclo celular.....	23
-----------------	---	----

### Capítulo II – Artigo Científico 1

<b>Figura 1</b>	Queilite actínica: edema do lábio inferior e apagamento dos limites do vermelhão do lábio. Edema, eritema e descamação do lábio superior.....	58
-----------------	---	----

<b>Figura 2</b>	Queilite actínica: hiperqueratose, atrofia da epiderme, displasia epitelial, elastose solar e vasodilatação. HE X 200.....	58
-----------------	--	----

<b>Figura 3</b>	Carcinoma espinocelular: lesão ulcerada, recoberta por crosta e de base infiltrada.....	59
-----------------	---	----

<b>Figura 4</b>	Carcinoma espinocelular bem diferenciado: invasão do tipo expansiva, com clara delimitação do fronte de invasão. HE X 100.....	59
-----------------	--	----

<b>Figura 5</b>	Carcinoma espinocelular pouco diferenciado: infiltração do estroma com fronte de invasão sem clara delimitação. Infiltrado inflamatório ativo e expressivo. HE X 200.....	59
-----------------	---	----

<b>Figura 6</b>	Carcinoma espinocelular pouco diferenciado: infiltração do estroma com blocos de células e células isoladas. Infiltrado linfoplasmocitário ativo. HE X 400.....	59
-----------------	---	----

<b>Figura 7</b>	Carcinoma espinocelular: clara delimitação do fronte de invasão de padrão expansivo com auxílio da imunomarcagem. Citoqueratina X 200.....	59
-----------------	--	----

<b>Figura 8</b>	Carcinoma espinocelular: clara delimitação de fronte de invasão de padrão infiltrativo com blocos de células. Citoqueratina X 200.....	59
-----------------	--	----

<b>Figura 9</b>	Papel da p16 e da CDK4/6 na regulação do ciclo celular.....	60
-----------------	---	----

### Capítulo III – Artigo Científico 2

<b>Figura 1</b>	Lábio com queilite actínica e lesão de cor branca.....	88
-----------------	--	----

<b>Figura 2</b>	Lábio com queilite actínica e lesão de característica branca com áreas interpostas de vermelho.....	88
<b>Figura 3</b>	Lábio com queilite actínica e presença clínica de edema/infiltração.....	88
<b>Figura 4</b>	Lábio com queilite actínica e presença clínica de úlcera.....	88
<b>Figura 5</b>	Lábio com queilite actínica e presença de aspecto clínico atrófico.....	91
<b>Figura 6</b>	Lábio com queilite actínica e presença clínica de descamação.....	91
<b>Figura 7</b>	Lábio com queilite actínica e aspecto clínico de perda de definição do contorno do vermelhão.....	91
<b>Figura 8</b>	Lábio com queilite actínica e presença clínica de fissuras.....	91
<b>Figura 9</b>	Lábio com queilite actínica e presença clínica de leucoplasia.....	91
<b>Figura 10</b>	Lábio com queilite actínica e presença clínica de crostas.....	91
<b>Figuras 11-A e -B</b>	Queilite actínica e presença histopatológica de hiperplasia, infiltrado inflamatório acentuado e vasodilatação (HE; 200x). Em maior aumento observa-se presença de hiperparaqueratose (HE; 400x).....	92
<b>Figura 12</b>	Queilite actínica e presença histopatológica de atrofia da camada espinhosa (HE; 100x).....	92
<b>Figura 13</b>	Queilite actínica e presença de pérola córnea intraepidérmica (HE; 400x).....	92
<b>Figura 14</b>	Queilite actínica e presença histopatológica de elastose solar (HE; 100x).....	93
<b>Figura 15</b>	Queilite actínica e presença histopatológica de úlcera (HE; 200x).....	93
<b>Figura 16</b>	Queilite actínica e presença displasia epitelial leve (HE; 400x).....	93
<b>Figura 17</b>	Queilite actínica e presença displasia epitelial moderada (HE; 400x).....	93
<b>Figuras 18-A e B</b>	Expressão imunoistoquímica da p53 na mucosa oral normal e queilite actínica.....	95
<b>Figuras 19-A e B</b>	Expressão imunoistoquímica da p21 na mucosa oral normal e queilite actínica.....	95
<b>Figuras 20-A e B</b>	Expressão imunoistoquímica da p16 na mucosa oral normal e queilite actínica.....	95
<b>Figuras</b>	Expressão imunoistoquímica da i-NOS na mucosa oral normal e queilite	

<b>21-A e B</b>	actínica.....	96
<b>Figuras 22-A e B</b>	Expressão imunoistoquímica da survivina na mucosa oral normal e queilite actínica.....	96

### Capítulo IV- Artigo Científico 3

<b>Figura 1</b>	Carcinoma espinocelular: lesão ulcerada, recoberta por crosta e com base infiltrada.....	130
<b>Figura 2</b>	Carcinoma espinocelular bem diferenciado: invasão do tipo expansiva, com clara delimitação do fronte de invasão. HE X 100.....	130
<b>Figura 3</b>	Carcinoma espinocelular pouco diferenciado: fronte de invasão infiltrativo, sem clara delimitação do tumor. Infiltrado inflamatório ativo e expressivo. HE X 200.....	130
<b>Figura 4</b>	Carcinoma espinocelular pouco diferenciado: fronte de invasão com blocos de células e células isoladas. Infiltrado linfoplasmocitário ativo. HE X 400.....	130
<b>Figuras 5-A e B</b>	Expressão imunoistoquímica da p53 na região do fronte de invasão e superfície tumoral respectivamente. X 200; X 100.....	131
<b>Figuras 6-A e B</b>	Expressão imunoistoquímica da p21 na região do fronte de invasão e superfície tumoral respectivamente. X 200.....	131
<b>Figuras 7-A e B</b>	Expressão imunoistoquímica da p16 na região do fronte de invasão e superfície tumoral respectivamente. X 200; X 100.....	131
<b>Figuras 8-A e B</b>	Expressão imunoistoquímica da i-NOS na região do fronte de invasão e superfície tumoral respectivamente. X 200; X 100.....	132
<b>Figuras 9-A e B</b>	Expressão imunoistoquímica da survivina na região do fronte de invasão e superfície tumoral respectivamente. X 200; X 100.....	132



## Índice de Tabelas

### Capítulo II - Artigo Científico 1

<b>Tabela 1</b>	Classificação dos tumores de cabeça e pescoço por estadios e formas de tratamento.....	58
-----------------	--	----

### Capítulo III- Artigo Científico 2

<b>Tabela 1</b>	Anticorpos primários utilizados na reação imunoistoquímica dos casos de queilite actínica e controles e suas especificações.....	87
<b>Tabela 2</b>	Correlação entre a classificação clínica segundo a gravidade da queilite actínica e a cor da lesão dos pacientes ao diagnóstico.....	89
<b>Tabela 3</b>	Correlação entre a classificação clínica segundo a gravidade da queilite actínica e a presença de edema/infiltração nos pacientes ao diagnóstico.....	89
<b>Tabela 4</b>	Correlação entre a classificação clínica segundo a gravidade da queilite actínica e a presença de úlcera/exulceração nos pacientes ao diagnóstico...	90
<b>Tabela 5</b>	Correlação entre intensidade das alterações histopatológicas da queilite actínica e a classificação clínica segundo a gravidade proposta.....	94
<b>Tabela 6</b>	Frequencia e porcentagem de células imunomarcadas na queilite actínica..	97
<b>Tabela 7</b>	Frequencia e porcentagem de células imunomarcadas na mucosa oral normal.....	97
<b>Tabela 8</b>	Análise comparativa da expressão imunoistoquímica da p21, p53, i-NOS e survivina na queilite actínica e mucosa oral normal.....	98
<b>Tabela 9</b>	Quadro demonstrativo dos marcadores que expressaram significância ( $p < 0,05$ ) da correlação do estudo imunoistoquímico dentro do mesmo grupo.....	99

## Capítulo IV- Artigo Científico 3

<b>Tabela 1</b>	Anticorpos primários utilizados na reação de imunistoquímica e suas especificações.....	133
<b>Tabela 2</b>	Estadiamento clínico (TNM) e grau de diferenciação histológica dos carcinomas espinocelulares do lábio inferior.....	133
<b>Tabela 3</b>	Frequencia e porcentagem de células imunomarcadas na mucosa oral normal.....	134
<b>Tabela 4</b>	Frequencia e porcentagem de células imunomarcadas na região do fronte de invasão do carcinoma espinocelular do lábio inferior.....	134
<b>Tabela 5</b>	Frequencia e porcentagem de células imunomarcadas na superfície do carcinoma espinocelular do lábio inferior.....	135
<b>Tabela 6</b>	Análise comparativa da expressão imunistoquímica da p21, p53, i-NOS e survivina no carcinoma espinocelular do lábio e mucosa oral normal	136
<b>Tabela 7</b>	Quadro demonstrativo dos marcadores que expressaram significância ( $p < 0,05$ ) da correlação do estudo imunistoquímico dentro do mesmo grupo.....	137

## Índice de Anexos e Apêndices

<b>Apêndice 1</b>	Dados demográficos, clínicos e histopatológicos dos pacientes com de queilite actínica.....	138
<b>Apêndice 2.</b>	Dados demográficos, clínicos e histopatológicos dos pacientes com carcinoma espinocelular do lábio.....	139
<b>Anexo I</b>	Aprovação do trabalho pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina de Botucatu - UNESP.....	140

# **Capítulo I**

## **Revisão de Literatura**

## 1. Revisão de Literatura

---

### *Considerações Gerais*

#### *Carcinogênese*

- *Radiações Ionizantes*

### 1.1. Considerações Gerais

Os cânceres de cabeça e pescoço representam 10% dos tumores malignos diagnosticados, sendo que aproximadamente 40% correspondem aos cânceres de boca<sup>(1)</sup>. O câncer de boca engloba os tumores do lábio e da cavidade bucal, o que o torna o sétimo mais frequente dentre os tumores malignos. A estimativa do Ministério da Saúde para o Brasil em 2010 é de 14.120 casos novos, sendo 10.330 em homens e 3.790 em mulheres. Dentre os estados brasileiros, São Paulo é o que apresenta maior estimativa, com 4.120 casos, seguido pelo Rio de Janeiro com 1.950 e Minas Gerais, com 1.180<sup>(2)</sup>.

O câncer de boca é considerado problema nacional de saúde pública. Os dados epidemiológicos e o prognóstico deste tumor permaneceram ruins e praticamente inalterados nas últimas décadas devido, entre outros fatores, ao estadió clínico avançado no momento do diagnóstico, o que acarreta tratamentos onerosos, agressivos e mutiladores, comprometendo a qualidade de vida dos pacientes<sup>(3)</sup>.

O câncer do lábio representa aproximadamente um quarto de todos os tumores não-cutâneos da região de cabeça e pescoço<sup>(4)</sup>. No Brasil, onde a exposição solar é intensa, o câncer do lábio assume significativa importância, já que os raios solares constituem o principal fator de risco para o desenvolvimento desse carcinoma.

### 1.2. Carcinogênese

Carcinogênese é um processo de múltiplas etapas constituído de iniciação, promoção, progressão e manifestação. A etapa de iniciação é caracterizada por lesão irreversível no DNA (mutação), induzida pela exposição a agentes genotóxicos, os quais podem ser químicos, físicos ou biológicos. A promoção é processo mais lento, reversível e que está associada à proliferação focal de células iniciadas. Os agentes

promotores, em geral, não são genotóxicos e atuam por mecanismos epigenéticos, alterando, principalmente, os sinais moleculares envolvidos no controle da proliferação celular<sup>(5)</sup>. A etapa da progressão é caracterizada, morfológicamente, por anaplasia e, biologicamente, por crescimento autônomo. Quando as células adquirem capacidade para invadir e metastizar, podendo as alterações ser evidenciadas clinicamente, estar-se-á diante da última etapa, a manifestação. Assim, todos os fatores que atuam em uma ou mais etapas do desenvolvimento neoplásico devem ser considerados para a estimativa de risco para carcinogênese<sup>(6, 7)</sup>.

Os principais fatores de riscos relacionados à origem e ao desenvolvimento do processo carcinogênico incluem a predisposição genética, os fatores ambientais e a interação entre ambos. Dentre os fatores ambientais, distinguem-se as radiações ionizantes<sup>(8)</sup>.

### **1.2.1. Radiações Ionizantes**

As radiações ionizantes fazem parte do espectro eletromagnético e são classificadas de acordo com seu comprimento de onda. Dentre elas, as radiações solares, denominadas de radiações ultravioletas (raios UV), são divididas em UVA (320-400nm), UVB (280-320nm) e UVC (100-280nm). Devido à destruição da camada de ozônio, os raios UVB têm aumentado progressivamente sua incidência sobre a terra, e estão intrinsecamente relacionados ao surgimento do câncer. Da mesma forma, tem ocorrido aumento da incidência dos raios UVC, que são potencialmente mais carcinogênicos do que os UVB<sup>(9)</sup>.

Os danos provocados pelas radiações ionizantes são causados por interação direta com moléculas alvo ou indiretamente, pela formação de elementos químicos ativos e altamente reativos, os radicais livres, os quais possuem alta afinidade por elétrons e pontes de hidrogênio de moléculas orgânicas, sendo o DNA o alvo principal<sup>(10, 11)</sup>.

As alterações genéticas do tipo cromossômica ou isocromatídica (envolvendo as duas cromátides) podem ocorrer nas células que estiverem nas fases G0 ou G1 e as aberrações do tipo cromatídica (envolvendo uma das cromátides) nas fases S e G2 do ciclo celular. Quando um tecido é continuamente exposto à radiação ionizante,

poderão ocorrer tanto aberrações cromossômicas como cromatídicas, uma vez que a quantidade relativa dessas aberrações depende do tipo, da dose, do tempo e da velocidade de exposição, bem como da sensibilidade das células nos vários estágios do ciclo celular<sup>(12)</sup>.

Alguns estudos mostram que baixas doses de radiação ionizante podem levar a adaptação do organismo e isto é atribuído à indução de mecanismos eficientes de reparo de lesões no DNA. Assim, a morte celular e as mutações gênicas ou cromossômicas, podem ser resultado da deficiência de mecanismos de reparo ou mesmo do reparo impreciso das lesões no DNA<sup>(13-16)</sup>.

## 2. Queilite Actínica

---

*Definição*

*Etiologia*

*Características Clínicas*

*Características Histopatológicas*

*Tratamento*

### 2.1. Definição

A queilite actínica (QA), também denominada de queilose solar, é processo inflamatório crônico que afeta os lábios inferiores em 95% dos casos, sendo causado pela exposição crônica às radiações solares ou à radiação ultravioleta artificial<sup>(17-19)</sup>. É considerada lesão pré-maligna, de alta morbidade e com potencial para desenvolvimento de carcinoma espinocelular invasivo<sup>(19-21)</sup>.

Afeta principalmente homens de pele clara com histórico de exposição solar crônica, particularmente de origem ocupacional, podendo ocorrer em qualquer idade<sup>(20, 22)</sup>. No entanto, as alterações clínicas são frequentemente observadas a partir da 5ª década, visto que os danos causados pela radiação solar mostram-se cumulativos com o passar dos anos<sup>(11)</sup>.

### 2.2. Etiologia

O principal fator etiológico é a exposição solar crônica, que quando associado a outros fatores carcinogênicos, entre eles o tabagismo, aumenta a probabilidade de malignização<sup>(23)</sup>.

Existem três padrões de exposição solar: o intermitente, que acomete principalmente trabalhadores de áreas cobertas, não adaptados ao sol e praticantes de atividades de recreação; o crônico, que acomete trabalhadores expostos ao meio ambiente que se submetem a exposição solar de forma contínua; e o padrão cumulativo, que engloba tanto a exposição intermitente quanto a crônica<sup>(22)</sup>.

Comparado à pele, onde 5% a 10% da radiação ultravioleta são refletidas e 70% são absorvidas principalmente pela melanina, o lábio apresenta menor proteção devido à presença de epitélio mais fino, delgada camada de queratina, menor



quantidade de melanina e menor secreção das glândulas sebáceas e sudoríparas, estando, assim, mais sujeito aos danos causados pelas radiações<sup>(18)</sup>.

Os raios UVB, os mais importantes na etiologia da QA, são considerados os responsáveis primários na indução de alterações no lábio inferior por serem intensamente absorvidos pelos ácidos nucléicos<sup>(18)</sup>. A maior parte dos danos é causada por alterações que impedem a transcrição da informação genética para o RNAm, bloqueando o mecanismo de duplicação do DNA, o que leva a diminuição da atividade mitótica, atrofia do epitélio e redução da capacidade fotoprotetora do lábio<sup>(24, 25)</sup>.

### 2.3. Características Clínicas

Clinicamente, observa-se perda da nitidez do contorno labial, atrofia da borda do vermelhão do lábio e escurecimento da interface vermelhão do lábio/pele da face. À medida que a lesão progride, áreas ásperas e escamosas desenvolvem-se nas porções mais ressecadas, as quais se tornam espessadas, particularmente quando se estendem para a linha úmida do lábio. Pode ocorrer ulceração focal crônica em um ou mais locais, bem como lesões leucoplásicas<sup>(26, 27)</sup>.

A leucoplasia, a mais frequente forma de QA e a mais comum das alterações que precede o carcinoma espinocelular na mucosa oral, é definida como placa branca de risco indefinido, excluindo-se outras enfermidades com potencialidade de transformação maligna<sup>(21, 28, 29)</sup>. Entretanto, há divergência na literatura em relação à frequência com que leucoplasias se convertem em carcinoma espinocelular, a qual é estimada ocorrer entre 1,4% a 36%, em período de 1 a 30 anos<sup>(30-33)</sup>.

Apesar da aparente facilidade do diagnóstico clínico precoce e dos meios preventivos conhecidos e disponíveis, vários fatores são atribuídos ao diagnóstico clínico tardio da QA. Destacam-se o desconhecimento dos pacientes sobre a importância da lesão, a ausência de dor, a associação a outras lesões que desapareceram ao longo da vida, a aparência clínica inicialmente inofensiva, a ausência de sintomas expressivos, bem como a falta de conhecimento de muitos profissionais que a consideram apenas como processo inflamatório. Por ocorrerem episódios agudos seguidos de remissão dos sinais e sintomas, muitos pacientes

mencionam as alterações labiais quando questionados, como parte do ônus da profissão, não a identificando como processo inflamatório crônico e as aceitando como parte do contexto da atividade exercida, tanto quanto ter as mãos calejadas ou a pele bronzeada<sup>(20, 34)</sup>.

Os casos diagnosticados clinicamente como QA, devem ser submetidos à biópsia para exame anatomopatológico<sup>(18, 35, 36)</sup>. A biópsia é recomendada para os casos de QA que apresentam perda de nitidez da linha de transição do vermelhão do lábio para a pele, alteração da consistência do lábio à palpação e alteração da espessura da semimucosa<sup>(34)</sup>.

#### **2.4. Características Histopatológicas**

As características histopatológicas da QA apresentam poucas variações, sendo a hiperqueratose (ou paraqueratose) e acantose aspectos universais, embora áreas de atrofia não sejam raras. Na lâmina própria encontram-se vasos sanguíneos, frequentemente dilatados, e com proeminência vascular decorrente do aumento do volume das células endoteliais e não de sua proliferação<sup>(37)</sup>.

O comprometimento do tecido conjuntivo, denominado de elastose solar, caracteriza-se como sinal patognomônico da QA, a qual pode ser evidenciada clinicamente por pele fina, enrugada e de coloração amarelada<sup>(38)</sup>. Ainda no derma, observa-se a presença de infiltrado inflamatório de intensidade que pode variar de leve, moderado a grave sendo composto, predominantemente, de linfócitos, mas também com distinta participação de plasmócitos e eosinófilos<sup>(39)</sup>.

O aspecto mais importante são as atipias que, gradualmente, se instalam no epitélio. Pode-se encontrar desde os graus mais leves de displasia epitelial até os mais graves, sendo que o potencial para o desenvolvimento do carcinoma invasivo aumenta proporcionalmente à gravidade dessa alteração. As atipias celulares mais graves podem estar associadas a quadros inflamatórios intensos, frequentemente observadas em QA ulceradas, situações que a distinção diagnóstica entre QA e carcinoma superficial torna-se ainda mais difícil. Importante salientar que as alterações histológicas da QA não são distribuídas de forma uniforme pelo vermelhão do lábio, mesmo nos casos em que a apresentação clínica é homogênea<sup>(40-42)</sup>.

## 2.5. Tratamento

A maioria das linhas terapêuticas da QA visa fundamentalmente à remoção ou destruição do epitélio alterado<sup>(22, 43)</sup>. As mais utilizadas incluem a vermelhectomia, a aplicação tópica de 5-fluoruracil (5-FU), a esfoliação química pelo uso do ácido tricloroacético, a crioterapia, a eletrocauterização, a ablação com laser de dióxido de carbono, a vaporização com laser de érbio: YAG, o acompanhamento com fotoproteção intensa local e mais recentemente, a utilização de imiquimode e terapia fotodinâmica<sup>(44-49)</sup>.

A vermelhectomia se evidencia como o tratamento de escolha por permitir revisão histopatológica de todo tecido removido, sendo considerada como biópsia excisional. Todas as outras opções de tratamento não produzem peça cirúrgica que permita avaliação anatomopatológica e consequente detecção da presença de possível tumor invasivo. No entanto, qualquer tratamento somente será efetivo se o paciente conscientizar-se da importância de proteger-se do sol, passando a utilizar chapéus e filtro solar labial rotineiramente, bem como comparecer às consultas periódicas para um efetivo controle clínico da doença<sup>(50)</sup>.

### 3. Carcinoma Espinocelular do Lábio

---

*Definição e Epidemiologia*

*Etiologia*

*Evolução Clínica*

*Características Histopatológicas*

*Estadiamento Clínico e Histológico*

*Tratamento*

#### 3.1. Definição e Epidemiologia

O câncer do lábio corresponde a 25% a 30% das neoplasias de boca diagnosticadas, sendo o carcinoma espinocelular (CEC) o tipo histológico mais comum, acometendo cerca de 95% dos casos<sup>(26, 51, 52)</sup>. Apresenta prevalência no lábio inferior vinte vezes maior que no lábio superior. O carcinoma de glândula salivar do lábio e outras neoplasias malignas são observados com pouca frequência<sup>(53, 54)</sup>.

Sua incidência é maior no sexo masculino na razão de 6:1 em relação ao feminino<sup>(55, 56)</sup>. Acomete principalmente indivíduos acima dos 50 anos, de cor branca, fototipos baixos e que exercem atividade profissional e/ou de lazer relacionada à exposição solar crônica<sup>(11, 57-59)</sup>. É incomum em indivíduos jovens, mas tem sido observado em pacientes transplantados renais submetidos à terapia imunossupressora e naqueles infectados pelo HIV<sup>(27, 56, 60, 61)</sup>.

Geralmente é diagnosticado em estágio precoce, apresentando índice de cura de 80 a 90% e taxa de mortalidade entre 10 a 15%. Quando do diagnóstico, menos de 2% dos pacientes apresentam linfonodos envolvidos<sup>(4, 27, 51)</sup>. As metástases quando ocorrem, são tardias e variam de 11 a 18%, e nestes casos a sobrevida média em cinco anos é reduzida para 25%<sup>(18, 35, 42, 46, 62-64)</sup>.

No Brasil, não há dados que mostrem sua incidência de forma isolada. Os dados estatísticos disponíveis e que devem ser considerados para este tipo de tumor são aqueles apresentados para o câncer de boca<sup>(65)</sup>.

### 3.2. Etiologia

Embora a radiação solar seja o fator de risco mais importante para o desenvolvimento de lesões no lábio, ela não se apresenta como única responsável. Associam-se o cigarro, o álcool, o HPV, a raça, a predisposição genética e familiar, imunossupressão e fatores socioeconômico<sup>(53, 66)</sup>.

Acredita-se que o álcool sozinho não esteja associado à fase iniciadora da carcinogênese bucal, e sim que ele possa promovê-la ao potencializar os efeitos carcinógenos do tabaco<sup>(67)</sup>. A ação sinérgica de ambas as substâncias tem a capacidade de potencializar em até 141,6 vezes o risco do desenvolvimento da neoplasia bucal<sup>(68)</sup>.

Outro importante fator a ser considerado são as deficiências nutricionais e dietas inadequadas, ricas em fontes formadoras de radicais livres, pois estes também são responsáveis por alterações no DNA. Sabe-se hoje que uma alimentação rica em proteínas A, E, C e B2 e alguns minerais como o cálcio, zinco e selênio, são considerados antagonistas dos radicais livres<sup>(69)</sup>. A dieta nutricional pobre em betacaroteno associada à exposição solar e ao fumo representa importante fator etiológico a ser considerado na carcinogênese labial<sup>(70)</sup>.

Estados de imunodeficiência têm importante papel no desenvolvimento de alguns tipos de câncer do trato aerodigestivo. Na população imunocomprometida pelo vírus da imunodeficiência humana (HIV) e naquela sob terapia imunossupressiva para o câncer ou transplante de órgãos há aumento do risco para o desenvolvimento de CEC de boca<sup>(27, 60)</sup>. Alguns estudos relatam risco relativo de 14 para câncer do lábio em homens e 117 para mulheres transplantadas, e outros relatam risco relativo de 3,1 para câncer do lábio em pacientes de ambos os sexos com aids, quando comparados à população geral<sup>(61, 71)</sup>.

### 3.3. Evolução clínica

O CEC do lábio é considerado doença de baixa agressividade e prognóstico favorável pela sua tendência de crescimento lento<sup>(72)</sup>. Inicialmente é assintomático, podendo ser difícil de distinguir das lesões de QA. Manifesta-se como placa leucoplásica ou eritroplásica, atrófica, exibindo fissuras persistentes com áreas de descamação ou crosta<sup>(73)</sup>. Em estágios avançados apresenta, frequentemente, dor

associada à úlcera crônica exsudativa que não cicatriza, de bordos endurecidos e de base infiltrada. Pode apresentar crescimento verrucoso exofítico, friável e sangrante. Localiza-se comumente nos terços laterais dos lábios, com diâmetro em torno de 2 cm<sup>(27, 72)</sup>.

### 3.4. Características Histopatológicas

O carcinoma espinocelular do lábio origina-se no epitélio displásico e pode manifestar-se, inicialmente, como leucoplasia, a qual faz parte de um grupo de lesões heterogêneas que histologicamente pode se apresentar como hiperqueratose, paraqueratose ou acantose, onde 5% a 15% delas são classificadas como displásicas<sup>(40, 74, 75)</sup>. Em 2003, a OMS classificou a displasia epitelial oral em leve, moderada, grave e carcinoma *in situ* (superficial), de acordo com a presença e gravidade de atipia celular e alterações baseadas na espessura da camada displásica quando comparada à espessura total do epitélio normal<sup>(76)</sup>.

O carcinoma espinocelular caracteriza-se histopatologicamente por ilhas ou cordões invasivos de células epiteliais escamosas malignas. As células tumorais apresentam citoplasma eosinofílico abundante com núcleos grandes, muitas vezes intensamente corados (hipercromáticos) e aumento da relação núcleo-citoplasma. Podem ser observados queratinização individual das células, pérolas de queratina e graus variados de pleomorfismo celular e nuclear<sup>(27)</sup>.

A invasão é caracterizada pela extensão irregular do epitélio tumoral através da membrana basal em direção ao tecido conjuntivo do derma. Células escamosas epiteliais e ninhos ou ilhas de células são observados crescendo como entidades independentes, ou seja, sem ligação com o epitélio de superfície. Estas células podem se estender de maneira expansiva ou infiltrativa profundamente para o tecido adiposo subjacente, músculo, osso, vasos sanguíneos e linfáticos, causando a destruição tecidual. Frequentemente observa-se intensa resposta celular inflamatória ao epitélio invasor, e áreas focais de necrose podem estar presentes. O epitélio da lesão é capaz de induzir a formação de novos e pequenos vasos sanguíneos (angiogênese) e, ocasionalmente, produzir fibrose densa desmoplásica (alteração cirrosa)<sup>(27)</sup>.

### 3.5. Estadiamento Clínico e Histológico

O sistema TNM de estadiamento clínico e histopatológico tem sido o padrão de classificação adotado para caracterizar os tumores malignos, propor a terapia mais adequada e, assim, estimar a sobrevida dos pacientes<sup>(77)</sup>. O estadiamento clínico é estabelecido através dos exames clínico e de imagem da lesão. O estadiamento patológico (pTNM) é realizado por meio do exame histopatológico do tumor e/ou dos linfonodos regionais<sup>(78)</sup>.

A classificação histopatológica de malignidade proposta pela OMS baseia-se no grau de anaplasia ou diferenciação celular, agrupando essas neoplasias malignas em três categorias: pouco, moderadamente e bem diferenciadas. Os CEC de baixo grau, grau I ou bem diferenciados correspondem àqueles com arquitetura tecidual semelhante ao padrão normal de epitélio escamoso. Esses crescem lentamente e metastatizam tardiamente. Já os CEC pouco diferenciados caracterizam-se pelo predomínio de células imaturas, numerosas mitoses típicas e atípicas, muito pleomorfismo celular e nuclear, bem como pouca ou nenhuma produção de queratina. Esses crescem mais rápido, metastatizam precocemente e são chamados de alto grau, grau III, pobremente diferenciado ou anaplásico. Um tumor com aparência morfológica entre esses dois extremos é denominado de carcinoma moderadamente diferenciado ou grau II<sup>(78)</sup>.

Considerando que o padrão histopatológico do CEC de boca apresenta grande variação dentro da mesma lesão, Bryne et al. (1989) propuseram uma nova graduação histopatológica para estes tumores, dando início à graduação histológica do fronte de invasão, sendo esta denominação reservada para a área considerada a mais invasiva<sup>(79)</sup>.

### 3.6. Fronte de Invasão

O fronte de invasão corresponde à interface entre as células neoplásicas e o estroma, no limite mais profundo da invasão tumoral. É o local em que as células neoplásicas são mais agressivas e onde as alterações moleculares são mais evidentes, permitindo ser estudadas com precisão. Essa região é caracterizada pelo aumento da proliferação neoplásica, perda da coesão das proteínas da matriz e invasão local<sup>(80)</sup>.

O fronte de invasão sinaliza o grau de diferenciação histológico do tumor, ao considerar as características da invasão neoplásica e aqueles do microambiente do sítio de invasão. Vários são os tipos de células que compõe este sítio: células do sistema imune, como linfócitos, plasmócitos e células dendríticas, células inflamatórias, representadas por monócitos e granulócitos, além de miofibroblastos e células endoteliais envolvidos com a neovascularização. Assim, a agressividade do fronte de invasão tem sido considerada na composição de fatores prognóstico do câncer de boca<sup>(80)</sup>.

### 3.7. Tratamento

O tratamento do CEC do lábio é baseado no sistema TNM no qual os tumores são divididos em estadios<sup>(81)</sup>. Estadios I corresponde a tumores iniciais menores que 2 cm e estadio II a tumores entre 2 e 4 cm no maior diâmetro. Tais tumores são curáveis por cirurgia ou radioterapia, sendo a escolha do tratamento realizada em vista do resultado funcional e estético e, particularmente, pela experiência do cirurgião e do radioterapeuta. A abordagem cirúrgica é predominante e a investigação clínica de linfadenomegalia nas cadeias submandibulares, submentonianas e cervicais deve ser rotina. A sensibilidade da busca é aumentada com pesquisa por ultrassom nas lojas cervicais, bilateralmente.

O estadio III corresponde a tumores com mais de 4 cm no maior diâmetro e o estadio IV corresponde àqueles que invadem estruturas adjacentes. Estes são os que envolvem maior desafio terapêutico, tendo o prognóstico mais reservado. Nesses casos, o tratamento recomendado baseia-se na ressecção cirúrgica ampla, com controle intra-operatório das margens, associado à radioterapia adjuvante e esvaziamento linfonodal cervical. Atualmente, para tumores avançados tem-se utilizado, também, a quimioterapia associada à radioterapia e se necessário, a cirurgia de resgate. Os estudos de avaliação dos índices de recaída e de metástases após cinco anos de seguimento, em se utilizando o método cirúrgico de Mohs, mostram para o CEC do lábio índice de recorrência de 2,3% e de 7,6% de metástases. Métodos cirúrgicos convencionais e radioterapia proporcionaram índices de recorrência de 10,5% e 13,7% de metástases. A recorrência local está associada ao estadio inicial do



tumor, margem cirúrgica comprometida, profundidade de invasão acima de 5 mm, padrão do fronte de invasão e existência de invasão perineural. O índice de sobrevida após cinco anos encontra-se entre 90% a 100% para os estadios iniciais, não metastáticos. Quando há recorrência de metástases o índice de sobrevida após cinco anos varia de 30% a 70%<sup>(35, 56, 58, 62, 79-81)</sup>.

## 4. Marcadores Tumorais

---

*Apoptose*  
*Proteína p53*  
*Proteína p16*  
*Proteína p21*  
*Survivina*  
*Óxido Nítrico*

### 4.1. Apoptose

A morte celular programada foi descrita em 1828, no entanto, apenas em 1972 o termo apoptose foi introduzido, quando correlacionada a eventos fisiológicos e patológicos da célula e observadas nas neoplasias malignas<sup>(82-84)</sup>.

A apoptose caracteriza-se por apresentar evidentes alterações morfológicas da célula incluindo o enrugamento celular, a condensação da cromatina e subsequente fragmentação do DNA. Na membrana celular formam-se invaginações, o núcleo se rompe e as organelas mantêm-se intactas. A fragmentação da célula origina corpos apoptóticos circundados por membrana celular, contendo no seu interior algumas organelas e, às vezes, fragmentos de núcleo. Estes corpos apoptóticos são imediatamente reconhecidos e fagocitados por macrófagos ou células fagocitárias adjacentes<sup>(85, 86)</sup>.

A morte celular programada pode ocorrer através de duas vias principais. A via extrínseca, mediada pela ativação de receptores de morte celular localizados na membrana citoplasmática, sendo o ácido graxo sintase (Fas) e o fator de necrose tumoral (TNF) os mais conhecidos e a via intrínseca, mitocondrial, onde há liberação de fatores apoptogênicos como citocromo c, o fator indutor de apoptose (AIF), trifosfato de adenosina (ATP) e proteínas de choque térmico. Proteínas pró-apoptóticas e anti-apoptóticas da família do Bcl-2 regulam a via mitocondrial. Como resultado final de ambas as vias, ocorre a ativação das caspases e a quebra de substratos celulares específicos<sup>(86-88)</sup>.

Pela via extrínseca, ocorrerá a ativação de receptores de membrana que transmitirá sinais para o interior da célula ativando, inicialmente, a caspase-8 ou a

caspase-10. A via intrínseca, ativada por estresse celular, é mediada pela liberação de citocromo c pela mitocôndria, com sinalização e ativação da caspase-9. Essas duas vias desencadeiam a sinalização das caspases efetoras, as caspases-3, -6 e -7<sup>(86)</sup>.

A adequada regulação da apoptose é importante para o desenvolvimento e manutenção dos tecidos normais. Os distúrbios de indução da apoptose são considerados o evento inicial em alguns tipos de cânceres e doenças linfoproliferativas, permitindo que células malignas tenham maior sobrevivência e contribuindo para que ocorra expansão neoplásica<sup>(87, 89)</sup>.

Diversas vias regulatórias da apoptose mostram-se alteradas em lesões pré-malignas e malignas. A relação desordenada entre proliferação e morte celular pode, muitas vezes, prever a evolução e o comportamento destas lesões, além de fornecer informações importantes sobre a progressão tumoral e sobre a resposta às terapias contra o câncer.

#### 4.2. Proteína p53

A proteína p53, codificada pelo gene *TP53*<sup>1</sup>, consiste de fosfoproteína nuclear com peso molecular equivalente a 53KDa, que contém sequência de 393 aminoácidos. É uma das proteínas responsáveis pela manutenção da integridade do DNA<sup>(90)</sup>.

Mutações no gene *TP53* tornam a p53 incapaz de controlar a proliferação celular, resultando em reparo ineficiente do DNA e permitindo que muitas células expostas a agentes mutagênicos repliquem o material genético danificado, propagando, assim, as mutações incorporadas ao genoma<sup>(91, 92)</sup>. Embora uma única mutação não seja suficiente para transformar uma célula, a perda de função da p53 predispõe as células às mutações adicionais e à transformação maligna<sup>(93)</sup>.

Os genes regulados pela p53 são os envolvidos na parada do ciclo celular, apoptose e angiogênese<sup>(94)</sup>. Em condições de estresse, particularmente por indução de dano ao DNA, a proteína p53 selvagem promove a parada do ciclo celular na fase G1, permitindo, desta forma, o reparo do DNA danificado pelo agente mutagênico. Se,

---

<sup>1</sup> Segundo NYLANDER et al. (2000) o gene é identificado por letras maiúsculas e em itálico, enquanto a proteína, com letras minúsculas e regulares.

por algum motivo, este mecanismo falhar, a p53 sinalizará para a célula entrar em apoptose, impedindo, assim, que células mutadas se dividam<sup>(95-101)</sup>. As funções da proteína p53 são exercidas por sua capacidade transcricional que ativa uma série de genes envolvidos na regulação do ciclo celular. Assim, quando a célula é exposta à agressão genotóxica por agentes químicos ou radiação UV, o gene *TP53* ativa transcricionalmente o gene *TP21*, induzindo a síntese da proteína com o mesmo nome, cuja função é inibir a ação das quinases dependentes de ciclinas (CDK), fazendo com que as células parem na fase G1 do ciclo celular até que o DNA seja reparado. A seguir, a proteína p53 ativa o gene *GADD-45* que atua corrigindo a lesão do DNA. Assim que este for reparado, a proteína p53 é degradada pela ação da proteína mdm-2<sup>(102-104)</sup>.

Mutações no gene *TP53* levam à produção de proteína alterada, com meia vida longa, sem capacidade de se combinar com o DNA e que se acumula no núcleo celular, sendo facilmente visualizada por métodos imunoistoquímicos. A p53 selvagem, em contra partida, tem meia vida curta (6-20min), não se acumula em células normais, não é detectada por métodos imunoistoquímicos e tem mostrado induzir apoptose e inibição de crescimento, dependendo das circunstâncias fisiológicas<sup>(105, 106)</sup>.

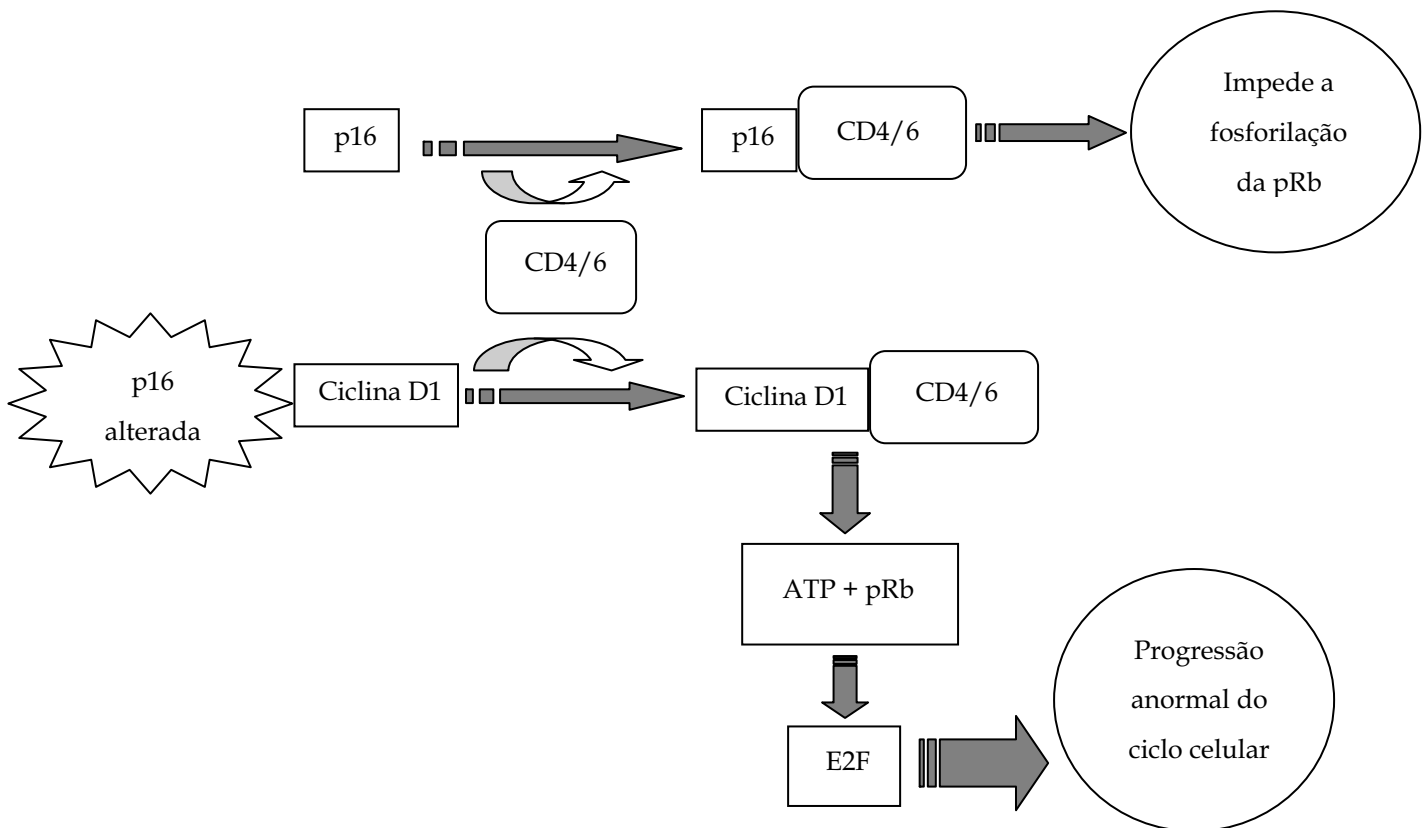
Anormalidades no gene *TP53* são as alterações moleculares mais comuns encontradas nas neoplasias humanas<sup>(107)</sup>. A expressão da proteína p53 no tecido bucal, revelada pela imunoistoquímica, tem sido associada ao grau de displasia epitelial bem como à progressão para carcinoma espinocelular de boca<sup>(105, 108-111)</sup>. Também, tem sido relatada expressão aumentada da p53 em CEC do lábio e QA<sup>(41, 112-115)</sup>. Contrariamente, alguns autores referem que a p53 não tem importância prognóstica para o CEC do lábio<sup>(116)</sup>.

### 4.3. Proteína p16

A proteína p16 é codificada pelo gene *TP16* (CDKN2a/INK4a), também conhecido como gene supressor tumoral inibidor das CDK. No ciclo celular normal esta proteína é capaz de se ligar às CDK 4 e 6, inibindo a fosforilação da proteína retinoblastoma (pRb). A pRb hipofosforilada inibe a entrada na fase S do ciclo celular

pela associação física com membros da família do fator de transcrição E2F. O complexo E2F-pRb ativado inibe a transcrição de genes-alvo que regulam a síntese de DNA. Com isso, temos a finalização dos processos do “ponto de checagem” G1-S do ciclo celular<sup>(117, 118)</sup>.

Quando ocorre disfunção da p16, a CDK4/6 pode ligar-se à ciclina D1 e formar o complexo CDK4/6 - ciclina D1, promovendo a fosforilação da pRb e liberando o fator de transcrição E2F, o qual acelera a transição da fase G1-S do ciclo celular, levando à instabilidade genômica (**Figura 1**). Desta forma, a p16 contribui para o escape dos “pontos de checagem” da senescência e apoptose e para a proliferação celular descontrolada. No entanto, há poucos estudos demonstrando a expressão da p16 em carcinomas labiais<sup>(119, 120)</sup>. Adicionalmente, até o presente momento não foram encontrados trabalhos que demonstrem sua expressão nas queilites actínicas.



**Figura 1.** Papel da p16 e da CDK4/6 na regulação do ciclo celular.

#### 4.4. Proteína p21

A proteína p21, produto do gene *TP21/WAF1*, membro da grande família dos genes supressores tumorais, é um inibidor de CDK essencial para o crescimento celular, diferenciação e apoptose. A expressão da p21 é regulada pela p53 em resposta a danos ao DNA. A partir daí, ocorre associação da p21 à CDK, impedindo a fosforilação de seus substratos e bloqueando a progressão do ciclo celular. Esta paralisação dá à célula tempo para reparar o DNA, impedindo assim a replicação de material genético danificado<sup>(121)</sup>.

A proteína p21 parece ser ativada em resposta a baixas doses de radiação UVB<sup>(122-124)</sup>. A expressão aumentada da p21 associada ao aumento da p53 tem sido relatada em pele exposta aos raios UVB e no fronte de invasão de carcinomas do lábio, bem como em lábios normais, no entanto essa associação foi perdida nas QA<sup>(115, 125, 126)</sup>. Em CEC de boca a expressão aumentada da p21 é considerada marcador de mal prognóstico e invasão tumoral<sup>(127)</sup>, e quando associada ao aumento da expressão da p53, sugere-se correlação com ocorrência de metástases linfonodais<sup>(128)</sup>.

#### 4.5. Survivina

A survivina faz parte das IAPs (*"inhibitor apoptosis proteins"*), família de proteínas capazes de bloquear a apoptose. Desde a sua descoberta em 1997, é considerada como importante marcador de malignidade e indicador prognóstico de resposta do câncer à terapêutica<sup>(129, 130)</sup>. Em tecidos adultos, há expressão em determinados tipos celulares, como células endoteliais e do timo, isto é, aquelas com potencial mitogênico, diferente dos tecidos embrionários em que a maioria a expressa regularmente<sup>(129, 131-135)</sup>. Acredita-se que a survivina seja importante no período de replicação da célula, porém não é essencial para a sobrevivência celular. Células adultas humanas não morrem na ausência da survivina, entretanto essa foi imprescindível para o processo de proliferação celular, contribuindo para a separação das cromátides-irmãs na mitose<sup>(136)</sup>. Por outro lado, a expressividade da survivina foi observada em diversas neoplasias, como o carcinoma nasofaríngeo, adenocarcinoma pancreático, linfomas não - Hodgkin de alto grau, carcinoma de células escamosas de pulmão, adenocarcinoma de mama, colorretal e próstata e

câncer gástrico<sup>(129, 137, 138)</sup>. Poucos estudos têm investigado a expressão de survivina em neoplasias bucais associando sua expressão a fenótipos tumorais mais agressivos e invasivos. Apesar disso, não foi encontrada associação entre expressão de survivina e idade, sexo, tamanho do tumor, presença de linfonodos comprometidos e metástases a distância<sup>(133, 139)</sup>. Ainda, não foram encontrados estudos que demonstrem a expressão dessa proteína em queilites actínicas e carcinomas espinocelulares do lábio.

#### 4.6. Óxido Nítrico

É bem estabelecido que a produção endógena de óxido nítrico pode desempenhar importante papel na progressão das células, de displasia à franca malignidade. O óxido nítrico é um radical gasoso reativo sintetizado pela enzima óxido nítrico sintase a partir do aminoácido L-arginina<sup>(140, 141)</sup>. Três isoformas de óxido nítrico sintase cálcio-dependentes já foram identificadas, sendo duas delas presentes fisiologicamente: a óxido nítrico sintase neural e a endotelial, responsáveis pela manutenção da homeostase dos sistemas nervoso e cardiovascular, respectivamente<sup>(141)</sup>. A terceira, uma proteína de peso molecular de 130 KDa, é sintetizada mediante estímulos patológicos específicos, tais como os processos inflamatórios e a progressão tumoral, sendo, por isso, denominada óxido nítrico sintase indutiva (iNOS) <sup>(142, 143)</sup>. Uma vez sintetizada, a iNOS produz altos níveis de óxido nítrico que reage rapidamente com o ânion superóxido presente nas células eucarióticas, resultando em ânion peroxi-nitrito, que por ser uma molécula altamente reativa, é capaz de gerar amplo espectro de lesões no DNA<sup>(144)</sup>.

Recentemente, a síntese de iNOS foi investigada na boca, e os resultados mostraram-na ausente na mucosa normal<sup>(145)</sup>. Contrariamente, demonstrou-se expressão aumentada de iNOS em lesões displásicas orais, sendo positivamente correlacionada com o grau de displasia epitelial. Nos carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço humanos e bolsa jugal de hamsters, a expressão de RNAm de iNOS foi predominantemente observada nas células tumorais. Esses resultados permitem constatar que o óxido nítrico favorece o crescimento tumoral, a angiogênese e

promove metástases<sup>(145-148)</sup>. Contudo, a importância da expressão de iNOS durante o processo de carcinogênese labial não foi relatada até o presente momento.



## 5. Referências

---

1. Thuler LCS, Rebelo MS. Epidemiologia do Câncer. In: Kowalski LP, Dib LL, Ikeda MK, Adde C, editors. Prevenção, Diagnóstico e Tratamento do Câncer Bucal. 1ª ed. São Paulo: Frontis Editorial; 1999. p. 1-9.
2. Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2009.
3. Cimardi ACBS, Fernandes APS. Câncer de boca: conhecimento e prática de cirurgiões- dentistas do Estado de Santa Catarina. RFO UPF. 2009;14(2):99-104.
4. Zitsch RP 3rd, Lee BW, Smith RB. Cervical lymph node metastases and squamous cell carcinoma of the lip. Head Neck. 1999 Aug;21(5):447-53.
5. Pitot HC. Multistage carcinogenesis--genetic and epigenetic mechanisms in relation to cancer prevention. Cancer Detect Prev. 1993;17(6):567-73.
6. Barrett JC. Mechanisms of multistep carcinogenesis and carcinogen risk assessment. Environ Health Perspect. 1993 Apr;100:9-20.
7. Nowell PC. Cytogenetic approaches to human cancer genes. Faseb J. 1994 Apr 1;8(6):408-13.
8. Zakrzewski SF. Chemical Carcinogenesis and Mutagenesis. In: Chadwick MJ, Shaw I, editors. Principles of Environmental Toxicology. Washington: CRC Press; 1991. p. 66-101.
9. Ministério da Saúde. INCA - Instituto Nacional de Câncer. Radiação Solar. [http://www1incagovbr/conteudo\\_view.asp?ID=21](http://www1incagovbr/conteudo_view.asp?ID=21) 2010 [cited 19/08/2010]; Available from: [http://www1.inca.gov.br/conteudo\\_view.asp?ID=21](http://www1.inca.gov.br/conteudo_view.asp?ID=21)
10. Ron E. Ionizing radiation and cancer risk: evidence from epidemiology. Radiat Res. 1998 Nov;150(5 Suppl):S30-41.

11. Ochsenius G, Ormeno A, Godoy L, Rojas R. [A retrospective study of 232 cases of lip cancer and pre cancer in Chilean patients. Clinical-histological correlation]. *Rev Med Chil.* 2003 Jan;131(1):60-6.
12. Touil N, Elhajouji A, Thierens H, Kirsch-Volders M. Analysis of chromosome loss and chromosome segregation in cytokinesis-blocked human lymphocytes: non-disjunction is the prevalent mistake in chromosome segregation produced by low dose exposure to ionizing radiation. *Mutagenesis.* 2000 Jan;15(1):1-7.
13. Boothman DA, Meyers M, Odegaard E, Wang M. Altered G1 checkpoint control determines adaptive survival responses to ionizing radiation. *Mutat Res.* 1996 Nov 4;358(2):143-53.
14. Little JB. Radiation-induced genomic instability. *Int J Radiat Biol.* 1998 Dec;74(6):663-71.
15. Wolff S. The adaptive response in radiobiology: evolving insights and implications. *Environ Health Perspect.* 1998 Feb;106 Suppl 1:277-83.
16. Festa Neto C. Sol e Melanoma. *Melanoma - Boletim Informativo do GBM.* São Paulo: Publicação trimestral do Grupo Brasileiro Multidisciplinar e Multicêntrico para Estudo de Melanoma – GBM; 2003. p. 3-4.
17. Picascia DD, Robinson JK. Actinic cheilitis: a review of the etiology, differential diagnosis, and treatment. *J Am Acad Dermatol.* 1987 Aug;17(2 Pt 1):255-64.
18. Kaugars GE, Pillion T, Svirsky JA, Page DG, Burns JC, Abbey LM. Actinic cheilitis: a review of 152 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1999 Aug;88(2):181-6.
19. Markopoulos A, Albanidou-Farmaki E, Kayavis I. Actinic cheilitis: clinical and pathologic characteristics in 65 cases. *Oral Dis.* 2004 Jul;10(4):212-6.
20. Main JH, Pavone M. Actinic cheilitis and carcinoma of the lip. *J Can Dent Assoc.* 1994 Feb;60(2):113-6.

21. Warnakulasuriya S, Johnson NW, van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med.* 2007 Nov;36(10):575-80.
22. Dufresne RG Jr, Curlin MU. Actinic cheilitis. A treatment review. *Dermatol Surg.* 1997 Jan;23(1):15-21.
23. Hecht SS. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. *Nat Rev Cancer.* 2003 Oct;3(10):733-44.
24. Scully C. Early recognition of oral cancer. *Br Dent J.* 1995 Feb 25;178(4):132.
25. Ben Slama L. [Precancerous lesions of the buccal mucosa]. *Rev Stomatol Chir Maxillofac.* 2001 Apr;102(2):77-108.
26. Regezi JA, Sciubba JJ. *Patologia Bucal e Correlações Clinicopatológicas.* 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.
27. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. *Patologia Oral & Maxilofacial.* 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanara Koogan; 2004.
28. Bouquot JE. Oral leukoplakia and erythroplakia: a review and update. *Pract Periodontics Aesthet Dent.* 1994 Aug;6(6):9-17; quiz 9.
29. Brennan M, Migliorati CA, Lockhart PB, Wray D, Al-Hashimi I, Axell T, et al. Management of oral epithelial dysplasia: a review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007 Mar;103 Suppl:S19 e1-2.
30. Cooke BE, Tapper-Jones L. Recognition of oral cancer. Causes of delay. *Br Dent J.* 1977 Feb 1;142(3):96-8.
31. Lee JJ, Hong WK, Hittelman WN, Mao L, Lotan R, Shin DM, et al. Predicting cancer development in oral leukoplakia: ten years of translational research. *Clin Cancer Res.* 2000 May;6(5):1702-10.

32. Warnakulasuriya S. Lack of molecular markers to predict malignant potential of oral precancer. *J Pathol*. 2000 Mar;190(4):407-9.
33. Kurokawa H, Yamashita Y, Takeda S, Tomoyose T, Funaki K, Takano H, et al. Relationship between epithelial dysplasia and the development of squamous cell carcinoma in oral leukoplakia. *Asian J Oral Maxillofac Surg*. 2002;14:197-201.
34. Aguiar SM. Contribuição ao estudo da queilite actínica: correlação anátomo-clínica. São Paulo: Faculdade de Medicina. USP; 1995.
35. Bentley JM, Barankin B, Lauzon GJ. Paying more than lip service to lip lesions. *Can Fam Physician*. 2003 Sep;49:1111-6.
36. Kornevs E, Skagers A, Tars J, Bigestans A, Lauskis G, Libermanis O. 5 year experience with lower lip cancer. *Stomatologija*. 2005;7(3):95-8.
37. Girard KR, Hoffman BL. Actinic cheilitis. Report of a case. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1980 Jul;50(1):21-4.
38. Lincoln EA. Sun-induced skin changes. *Prim Care*. 2000 Jun;27(2):435-45.
39. dos Santos JN, de Sousa SO, Nunes FD, Sotto MN, de Araujo VC. Altered cytokeratin expression in actinic cheilitis. *J Cutan Pathol*. 2003 Apr;30(4):237-41.
40. Pindborg JJ, Reichart PA, Smith CJ, Van der Waall I. WHO: Histological Typing of Cancer and Precancer of the Oral Mucosa. 2 ed. Berlin: Springer; 1997.
41. Martinez A, Brethauer U, Rojas IG, Spencer M, Mucientes F, Borlando J, et al. Expression of apoptotic and cell proliferation regulatory proteins in actinic cheilitis. *J Oral Pathol Med*. 2005 May;34(5):257-62.
42. Menta Simonsen Nico M, Rivitti EA, Lourenco SV. Actinic cheilitis: histologic study of the entire vermilion and comparison with previous biopsy. *J Cutan Pathol*. 2007 Apr;34(4):309-14.

43. Alamillos-Granados FJ, Naval-Gias L, Dean-Ferrer A, Alonso del Hoyo JR. Carbon dioxide laser vermilionectomy for actinic cheilitis. *J Oral Maxillofac Surg.* 1993 Feb;51(2):118-21.
44. Epstein E. Treatment of lip keratoses (actinic cheilitis) with topical fluorouracil. *Arch Dermatol.* 1977 Jul;113(7):906-8.
45. Robinson JK. Actinic cheilitis. A prospective study comparing four treatment methods. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 1989 Jul;115(7):848-52.
46. Abreu MA, Silva OM, Neto Pimentel DR, Hirata CH, Weckx LL, Alchorne MM, et al. Actinic cheilitis adjacent to squamous carcinoma of the lips as an indicator of prognosis. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2006 Nov-Dec;72(6):767-71.
47. Greenberg HL, Cohen JL, Rosen T, Orengo I. Severe reaction to 5% imiquimod cream with excellent clinical and cosmetic outcomes. *J Drugs Dermatol.* 2007 Apr;6(4):452-8.
48. Orenstein A, Goldan O, Weissman O, Winkler E, Haik J. A new modality in the treatment of actinic cheilitis using the Er:YAG laser. *J Cosmet Laser Ther.* 2007 Mar;9(1):23-5.
49. Rossi R, Assad GB, Buggiani G, Lotti T. Photodynamic therapy: treatment of choice for actinic cheilitis? *Dermatol Ther.* 2008 Sep-Oct;21(5):412-5.
50. Sanchez-Conejo-Mir J, Perez Bernal AM, Moreno-Gimenez JC, Camacho-Martinez F. Follow-up of vermilionectomies: evaluation of the technique. *J Dermatol Surg Oncol.* 1986 Feb;12(2):180-4.
51. Zitsch RP 3rd, Park CW, Renner GJ, Rea JL. Outcome analysis for lip carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1995 Nov;113(5):589-96.
52. Renner GJ, Zitsch RP 3rd. Cancer of the Lip. In: Myers E, Suen J, editors. *Cancer of the Head and Neck.* 3 ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company; 1996. p. 294-320.

53. Lindqvist C, Teppo L. Epidemiological evaluation of sunlight as a risk factor of lip cancer. *Br J Cancer*. 1978 Jun;37(6):983-9.
54. dos Santos LR, Cernea CR, Kowalski LP, Carneiro PC, Soto MN, Nishio S, et al. Squamous-cell carcinoma of the lower lip: a retrospective study of 58 patients. *Sao Paulo Med J*. 1996 Mar-Apr;114(2):1117-26.
55. Zitsch RP 3rd. Carcinoma of the lip. *Otolaryngol Clin North Am*. 1993 Apr;26(2):265-77.
56. Bilkay U, Kerem H, Ozek C, Gundogan H, Guner U, Gurler T, et al. Management of lower lip cancer: a retrospective analysis of 118 patients and review of the literature. *Ann Plast Surg*. 2003 Jan;50(1):43-50.
57. Chen J, Katz RV, Krutchkoff DJ, Eisenberg E. Lip cancer. Incidence trends in Connecticut, 1935-1985. *Cancer*. 1992 Oct 15;70(8):2025-30.
58. Veness MJ, Ong C, Cakir B, Morgan G. Squamous cell carcinoma of the lip. Patterns of relapse and outcome: Reporting the Westmead Hospital experience, 1980-1997. *Australas Radiol*. 2001 May;45(2):195-9.
59. Neville BW, Day TA. Oral cancer and precancerous lesions. *CA Cancer J Clin*. 2002 Jul-Aug;52(4):195-215.
60. Scully C. Oral manifestations associated with human immunodeficiency virus (HIV) infection in developing countries--are there differences from developed countries? *Oral Dis*. 2000 Nov;6(6):395.
61. Frisch M, Biggar RJ, Engels EA, Goedert JJ. Association of cancer with AIDS-related immunosuppression in adults. *Jama*. 2001 Apr 4;285(13):1736-45.
62. McGregor GI, Davis NL, Hay JH. Impact of cervical lymph node metastases from squamous cell cancer of the lip. *Am J Surg*. 1992 May;163(5):469-71.
63. Manganaro AM, Will MJ, Poulos E. Actinic cheilitis: a premalignant condition. *Gen Dent*. 1997 Sep-Oct;45(5):492-4.

64. Campisi G, Margiotta V. Oral mucosal lesions and risk habits among men in an Italian study population. *J Oral Pathol Med*. 2001 Jan;30(1):22-8.
65. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2007.
66. van der Wal KG, de Visscher JG. [A numb chin and bottom lip: a closer look at the symptoms]. *Ned Tijdschr Tandheelkd*. 1998 Sep;105(9):321-3.
67. MacPherson L, Myers MG. Invariance study of an adolescent survey-based smoking-related cognitions scale: examination across Hispanic and Caucasian groups. *Prev Med*. 2004 Nov;39(5):1026-35.
68. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Câncer de boca: manual para detecção de lesões suspeitas. 2 ed. Rio de Janeiro: INCA; 1996.
69. Winn DM. Diet and nutrition in the etiology of oral cancer. *Am J Clin Nutr*. 1995 Feb;61(2):437S-45S.
70. Lindqvist C, Teppo L, Pukkala E. Occupations with low risk of lip cancer show high risk of skin cancer of the head. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1981 Oct;9(5):247-50.
71. Birkeland SA, Storm HH, Lamm LU, Barlow L, Blohme I, Forsberg B, et al. Cancer risk after renal transplantation in the Nordic countries, 1964-1986. *Int J Cancer*. 1995 Jan 17;60(2):183-9.
72. Awde JD, Kogon SL, Morin RJ. Lip cancer: a review. *J Can Dent Assoc*. 1996 Aug;62(8):634-6.
73. Moy RL. Clinical presentation of actinic keratoses and squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol*. 2000 Jan;42(1 Pt 2):8-10.

74. Kramer IR, Lucas RB, Pindborg JJ, Sobin LH. Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1978 Oct;46(4):518-39.
75. Sudbo J, Reith A. The evolution of predictive oncology and molecular-based therapy for oral cancer prevention. *Int J Cancer.* 2005 Jun 20;115(3):339-45.
76. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. Lyon: IARC Press; 2005.
77. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. TNM: classificação de tumores malignos. 6 ed. Rio de Janeiro: INCA; 2004.
78. Patel SG, Shah JP. TNM staging of cancers of the head and neck: striving for uniformity among diversity. *CA Cancer J Clin.* 2005 Jul-Aug;55(4):242-58; quiz 61-2, 64.
79. Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Stene T, Bang G, Dabelsteen E. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med.* 1989 Sep;18(8):432-7.
80. Bankfalvi A, Piffko J. Prognostic and predictive factors in oral cancer: the role of the invasive tumour front. *J Oral Pathol Med.* 2000 Aug;29(7):291-8.
81. Costa Ade L, Pereira JC, Nunes AA, Arruda Mde L. [Correlation between TNM classification, histological grading and anatomical location in oral squamous cell carcinoma]. *Pesqui Odontol Bras.* 2002 Jul-Sep;16(3):216-20.
82. Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer.* 1972 Aug;26(4):239-57.
83. Carson DA, Ribeiro JM. Apoptosis and disease. *Lancet.* 1993 May 15;341(8855):1251-4.



84. Duke RC, Ojcius DM, Young JD. Cell suicide in health and disease. *Sci Am.* 1996 Dec;275(6):80-7.
85. Buja LM, Eigenbrodt ML, Eigenbrodt EH. Apoptosis and necrosis. Basic types and mechanisms of cell death. *Arch Pathol Lab Med.* 1993 Dec;117(12):1208-14.
86. Loro LL, Vintermyr OK, Johannessen AC. Cell death regulation in oral squamous cell carcinoma: methodological considerations and clinical significance. *J Oral Pathol Med.* 2003 Mar;32(3):125-38.
87. Fisher DE. Pathways of apoptosis and the modulation of cell death in cancer. *Hematol Oncol Clin North Am.* 2001 Oct;15(5):931-56, ix.
88. Zimmermann KC, Green DR. How cells die: apoptosis pathways. *J Allergy Clin Immunol.* 2001 Oct;108(4 Suppl):S99-103.
89. Deveraux QL, Schendel SL, Reed JC. Antiapoptotic proteins. The bcl-2 and inhibitor of apoptosis protein families. *Cardiol Clin.* 2001 Feb;19(1):57-74.
90. May P, May E. Twenty years of p53 research: structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene.* 1999 Dec 13;18(53):7621-36.
91. Rotter V, Prokocimer M. p53 and human malignancies. *Adv Cancer Res.* 1991;57:257-72.
92. Almog N, Rotter V. An insight into the life of p53: a protein coping with many functions! Review of the 9th p53 Workshop, Crete, May 9-13, 1998. *Biochim Biophys Acta.* 1998 Nov 26;1378(3):R43-54.
93. Lavieille JP, Righini C, Reyt E, Brambilla C, Riva C. Implications of p53 alterations and anti-p53 antibody response in head and neck squamous cell carcinomas. *Oral Oncol.* 1998 Mar;34(2):84-92.
94. Levine AJ. p53, the cellular gatekeeper for growth and division. *Cell.* 1997 Feb 7;88(3):323-31.

95. Culotta E, Koshland DE, Jr. p53 sweeps through cancer research. *Science*. 1993 Dec 24;262(5142):1958-61.
96. Lane DP. Cancer. A death in the life of p53. *Nature*. 1993 Apr 29;362(6423):786-7.
97. Williams AC, Browne SJ, Yeudal WA, Paterson IC, Marshall CJ, Lane DP, et al. Molecular events including p53 and k-ras alterations in the in vitro progression of a human colorectal adenoma cell line to an adenocarcinoma. *Oncogene*. 1993 Nov;8(11):3063-72.
98. Steller H. Mechanisms and genes of cellular suicide. *Science*. 1995 Mar 10;267(5203):1445-9.
99. Thompson TC, Park SH, Timme TL, Ren C, Eastham JA, Donehower LA, et al. Loss of p53 function leads to metastasis in ras+myc-initiated mouse prostate cancer. *Oncogene*. 1995 Mar 2;10(5):869-79.
100. Hale AJ, Smith CA, Sutherland LC, Stoneman VE, Longthorne VL, Culhane AC, et al. Apoptosis: molecular regulation of cell death. *Eur J Biochem*. 1996 Feb 15;236(1):1-26.
101. Raybaud-Diogene H, Tetu B, Morency R, Fortin A, Monteil RA. p53 overexpression in head and neck squamous cell carcinoma: review of the literature. *Eur J Cancer B Oral Oncol*. 1996 May;32B(3):143-9.
102. Morgan SE, Kastan MB. p53 and ATM: cell cycle, cell death, and cancer. *Adv Cancer Res*. 1997;71:1-25.
103. Prives C. Signaling to p53: breaking the MDM2-p53 circuit. *Cell*. 1998 Oct 2;95(1):5-8.
104. Nylander K, Dabelsteen E, Hall PA. The p53 molecule and its prognostic role in squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Oral Pathol Med*. 2000 Oct;29(9):413-25.

105. Kurokawa H, Matsumoto S, Murata T, Yamashita Y, Tomoyose T, Zhang M, et al. Immunohistochemical study of syndecan-1 down-regulation and the expression of p53 protein or Ki-67 antigen in oral leukoplakia with or without epithelial dysplasia. *J Oral Pathol Med.* 2003 Oct;32(9):513-21.
106. Kozomara R, Jovic N, Magic Z, Brankovic-Magic M, Minic V. p53 mutations and human papillomavirus infection in oral squamous cell carcinomas: correlation with overall survival. *J Craniomaxillofac Surg.* 2005 Oct;33(5):342-8.
107. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.* 1994 Sep 15;54(18):4855-78.
108. Vera-Sempere FJ, Navarro-Hervas M. P53 suppressor gene overexpression in oral cancer. *Med Oral.* 1997 Nov-Dec;2(5):283-96.
109. Cruz IB, Snijders PJ, Meijer CJ, Braakhuis BJ, Snow GB, Walboomers JM, et al. p53 expression above the basal cell layer in oral mucosa is an early event of malignant transformation and has predictive value for developing oral squamous cell carcinoma. *J Pathol.* 1998 Apr;184(4):360-8.
110. Sulkowska M, Famulski W, Chyczewski L, Sulkowski S. Evaluation of p53 and bcl-2 oncoprotein expression in precancerous lesions of the oral cavity. *Neoplasma.* 2001;48(2):94-8.
111. Okazaki Y, Tanaka Y, Tonogi M, Yamane G. Investigation of environmental factors for diagnosing malignant potential in oral epithelial dysplasia. *Oral Oncol.* 2002 Sep;38(6):562-73.
112. Crosthwaite N, Teale D, Franklin C, Foster GA, Stringer BM. p53 protein expression in malignant, pre-malignant and non-malignant lesions of the lip. *J Clin Pathol.* 1996 Aug;49(8):648-53.
113. Neto Pimentel DR, Michalany N, Alchorne M, Abreu M, Borra RC, Weckx L. Actinic cheilitis: histopathology and p53. *J Cutan Pathol.* 2006 Aug;33(8):539-44.

114. Caly DN, Cheter EZ, Rapoport A, Torloni H, Nonogaki S. P53 expression in squamous cell carcinoma of the lip. *Rev Col Bras Cir.* 2007;34(2):92-7.
115. Horta MC, de Assis LA, de Souza AF, de Araujo VC, Gomez RS, Aguiar MC. p53 and p21WAF1/CIP1 overexpression at the invasive front of lower lip squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2007 Feb;36(2):88-92.
116. Garcia-Montesinos-Perea B, Val-Bernal JF, Saiz-Bustillo R. Epidermoid carcinoma of the lip: an immunohistochemical study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2005 Nov-Dec;10(5):454-61.
117. Todd R, Hinds PW, Munger K, Rustgi AK, Opitz OG, Suliman Y, et al. Cell cycle dysregulation in oral cancer. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002;13(1):51-61.
118. Ai L, Stephenson KK, Ling W, Zuo C, Mukunyadzi P, Suen JY, et al. The p16 (CDKN2a/INK4a) tumor-suppressor gene in head and neck squamous cell carcinoma: a promoter methylation and protein expression study in 100 cases. *Mod Pathol.* 2003 Sep;16(9):944-50.
119. Yang W, Lin Z, Li L, Zhang G. [Expression of VEGF, EGFR, p16 in lip cancers and oral squamous cell carcinomas and their clinic significance]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 2002 Mar;37(2):99-101.
120. Tokman B, Gultekin SE, Sezer C, Alpar R. The expression of p53, p16 proteins and prevalence of apoptosis in oral squamous cell carcinoma. Correlation with mode of invasion grading system. *Saudi Med J.* 2004 Dec;25(12):1922-30.
121. Scully C, Field JK, Tanzawa H. Genetic aberrations in oral or head and neck squamous cell carcinoma (SCCHN): 1. Carcinogen metabolism, DNA repair and cell cycle control. *Oral Oncol.* 2000 May;36(3):256-63.
122. el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell.* 1993 Nov 19;75(4):817-25.

123. Li G, Ho VC. p53-dependent DNA repair and apoptosis respond differently to high- and low-dose ultraviolet radiation. *Br J Dermatol*. 1998 Jul;139(1):3-10.
124. Al-Mohanna MA, Al-Khalaf HH, Al-Yousef N, Aboussekhra A. The p16INK4a tumor suppressor controls p21WAF1 induction in response to ultraviolet light. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(1):223-33.
125. Ponten F, Berne B, Ren ZP, Nister M, Ponten J. Ultraviolet light induces expression of p53 and p21 in human skin: effect of sunscreen and constitutive p21 expression in skin appendages. *J Invest Dermatol*. 1995 Sep;105(3):402-6.
126. Martinez A, Brethauer U, Borlando J, Spencer ML, Rojas IG. Epithelial expression of p53, mdm-2 and p21 in normal lip and actinic cheilitis. *Oral Oncol*. 2008 Sep;44(9):878-83.
127. Nemes JA, Nemes Z, Marton IJ. p21WAF1/CIP1 expression is a marker of poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2005 May;34(5):274-9.
128. Yanamoto S, Kawasaki G, Yoshitomi I, Mizuno A. p53, mdm2, and p21 expression in oral squamous cell carcinomas: relationship with clinicopathologic factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002 Nov;94(5):593-600.
129. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med*. 1997 Aug;3(8):917-21.
130. Yamamoto T, Tanigawa N. The role of survivin as a new target of diagnosis and treatment in human cancer. *Med Electron Microsc*. 2001 Dec;34(4):207-12.
131. Grossman D, Kim PJ, Blanc-Brude OP, Brash DE, Tognin S, Marchisio PC, et al. Transgenic expression of survivin in keratinocytes counteracts UVB-induced apoptosis and cooperates with loss of p53. *J Clin Invest*. 2001 Oct;108(7):991-9.
132. Reed JC. The Survivin saga goes in vivo. *J Clin Invest*. 2001 Oct;108(7):965-9.

133. Lo Muzio L, Pannone G, Staibano S, Mignogna MD, Rubini C, Mariggio MA, et al. Survivin expression in oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2003 Dec 15;89(12):2244-8.
134. Johnson ME, Howerth EW. Survivin: a bifunctional inhibitor of apoptosis protein. *Vet Pathol*. 2004 Nov;41(6):599-607.
135. Zaffaroni N, Pennati M, Daidone MG. Survivin as a target for new anticancer interventions. *J Cell Mol Med*. 2005 Apr-Jun;9(2):360-72.
136. Yang D, Welm A, Bishop JM. Cell division and cell survival in the absence of survivin. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2004 Oct 19;101(42):15100-5.
137. Miyachi K, Sasaki K, Onodera S, Taguchi T, Nagamachi M, Kaneko H, et al. Correlation between survivin mRNA expression and lymph node metastasis in gastric cancer. *Gastric Cancer*. 2003;6(4):217-24.
138. Xiang Y, Yao H, Wang S, Hong M, He J, Cao S, et al. Prognostic value of Survivin and Livin in nasopharyngeal carcinoma. *Laryngoscope*. 2006 Jan;116(1):126-30.
139. Lo Muzio L, Farina A, Rubini C, Pezzetti F, Stabellini G, Laino G, et al. Survivin as prognostic factor in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer Lett*. 2005 Jul 8;225(1):27-33.
140. Bredt DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1990 Jan;87(2):682-5.
141. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J*. 1994 Mar 1;298 ( Pt 2):249-58.
142. Palmer RM, Ashton DS, Moncada S. Vascular endothelial cells synthesize nitric oxide from L-arginine. *Nature*. 1988 Jun 16;333(6174):664-6.

143. Ambs S, Bennett WP, Merriam WG, Ogunfusika MO, Oser SM, Khan MA, et al. Vascular endothelial growth factor and nitric oxide synthase expression in human lung cancer and the relation to p53. *Br J Cancer*. 1998 Jul;78(2):233-9.
144. Nguyen T, Brunson D, Crespi CL, Penman BW, Wishnok JS, Tannenbaum SR. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 1992 Apr 1;89(7):3030-4.
145. Rosbe KW, Prazma J, Petrusz P, Mims W, Ball SS, Weissler MC. Immunohistochemical characterization of nitric oxide synthase activity in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1995 Nov;113(5):541-9.
146. Brennan PA, Palacios-Callender M, Zaki GA, Spedding AV, Langdon JD. Does type II nitric oxide synthase expression correlate with cellular proliferation in oral squamous cell carcinoma and dysplasia? *Head Neck*. 2001 Mar;23(3):217-22.
147. Brennan PA, Palacios-Callender M, Umar T, Tant S, Langdon JD. Expression of type 2 nitric oxide synthase and p21 in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2002 Apr;31(2):200-5.
148. Yuk-Kwan C, Shui-Sang H, Li-Min L. The mRNA expression of inducible nitric oxide synthase in DMBA-induced hamster buccal-pouch carcinomas: an in situ RT-PCR study. *Int J Exp Pathol*. 2002 Jun;83(3):133-7.

## **Capítulo II**

### **Artigo Científico 1**



## Artigo Científico 1

### Artigo submetido aos Anais Brasileiros de Dermatologia

**Queilite actínica e carcinoma espinocelular do lábio: características clínicas e histopatológicas e marcadores tumorais.**

**Actinic cheilitis and lower lip squamous cell carcinoma: clinical and histological characteristics and tumor markers.**

Renata Aparecida Martinez Antunes Ribeiro-Vieira, Eliana Maria Minicucci, Mariangela Esther Alencar Marques, Sílvio Alencar Marques

**RESUMO:** Queilite actínica é a principal lesão pré neoplásica do lábio. O carcinoma espinocelular do lábio é incluído nas estatísticas brasileiras junto aos cânceres de boca e em conjunto representam 40% dos carcinomas de cabeça e pescoço. Há certo desconhecimento médico e odontológico quanto aos fatores relacionados à carcinogênese e progressão de tumores bucais. Genes de supressão tumoral e proteínas regulatórias de proliferação celular exercem importante papel na evolução da queilite actínica para carcinoma espinocelular e influenciam o comportamento biológico destas lesões, o que torna imprescindível o conhecimento e a investigação de marcadores de diagnóstico e prognóstico.

**PALAVRAS-CHAVE:** Queilite actínica; Carcinoma espinocelular; Ciclina D1; p53, bcl-2, i-NOS.

**SUMMARY:** Actinic cheilitis is the principal potentially malignant disorders of the lip. In Brazilian, lip squamous cell carcinoma represent 40% of head and neck malignance tumors, and it is included in the official statistics together of oral cancer. There are medical and odontological unknowledgeable about carcinogenesis and oral cancer. Tumor suppressor genes and cell proliferation regulatory proteins are important for the development of actinic cheilitis and lip squamous cell carcinoma, therefore, is essential the knowledge and research about of tumors markers for diagnostic and prognostic of these pathology.

**KEYWORDS:** Actinic cheilitis, Squamous cell carcinoma, Cyclin D1, p53, bcl-2, i-NOS

## INTRODUÇÃO

Os cânceres de cabeça e pescoço representam 10% do total dos tumores malignos diagnosticados sendo que aproximadamente 40% deles correspondem aos cânceres de boca.<sup>1</sup> O câncer de boca engloba aqueles do lábio e da cavidade bucal. A estimativa do Ministério da Saúde para o Brasil em 2010 é de 14.120 casos novos de cânceres de boca, sendo 10.330 em homens.<sup>1</sup>

A queilite actínica (QA) é considerada desordem potencialmente maligna com probabilidade de desenvolvimento para carcinoma espinocelular (CEC) invasivo do lábio. Há divergências em relação à frequência com que a QA se converte em CEC. A análise morfológica deste tipo de lesão é subjetiva e não é suficiente para predizer, com segurança, quais lesões irão evoluir para um carcinoma oral.<sup>2,3</sup>

Devido à alta incidência de QA e CEC do lábio na população brasileira em geral, ausência de diagnóstico clínico precoce e da dificuldade no diagnóstico histopatológico preciso, o presente artigo tem como objetivos revisar as características clínicas e histopatológicas e o papel dos genes de supressão tumoral envolvidos na etiopatogenia dessas lesões e, ainda, contribuir para o melhor entendimento dos mecanismos envolvidos no processo de carcinogênese do lábio.

### 1. Queilite Actínica

A queilite actínica é processo inflamatório crônico que afeta, em 95% dos casos, os lábios inferiores, causado pela exposição prolongada às radiações solares ou à radiação ultravioleta artificial.<sup>4</sup> É considerada lesão pré-maligna e de alta morbidade.<sup>4-6</sup> Afeta indivíduos de pele clara com histórico de exposição solar crônica, podendo ocorrer em qualquer idade.<sup>7-9</sup> No entanto, as alterações clínicas são frequentemente observadas a partir da 5ª década, visto que os danos causados pela radiação solar mostram-se cumulativos com o passar dos anos. O tabagismo aumenta a probabilidade de evolução da queilite actínica para franca neoplasia.<sup>8</sup>

Comparada à pele, na qual 5% a 10% da radiação ultravioleta são refletidas e 70% são absorvidas principalmente pela melanina, o lábio apresenta menor proteção devido ao epitélio mais fino, delgada camada de queratina, menor quantidade de melanina e menor secreção das glândulas sebáceas e sudoríparas, estando, portanto, mais sujeito aos danos causados pelas radiações.<sup>7</sup>

### ***Clínica***

Observa-se perda da nitidez do contorno labial, atrofia da borda do vermelhão do lábio e escurecimento da interface vermelhão do lábio/pele da face (Figura 1). À medida que a lesão progride, áreas ásperas e escamosas desenvolvem-se, as quais se tornam espessadas, particularmente quando se estendem para a linha úmida do lábio. Pode ocorrer ulceração focal crônica em um ou mais locais, bem como lesões leucoplásicas.<sup>10</sup>

A leucoplasia, a mais frequente forma de QA e a mais comum das alterações que precede o carcinoma espinocelular na mucosa oral, é definida como placa branca de risco de transformação indefinido.<sup>10,11</sup> Há divergência na literatura em relação à frequência de transformação para CEC, com estimativas entre 1,4% a 36%, em período de 1 a 30 anos.<sup>10-12</sup>

Apesar da facilidade do diagnóstico clínico precoce e dos meios preventivos conhecidos e disponíveis, vários fatores são atribuídos ao diagnóstico clínico tardio da QA, tais como o desconhecimento da lesão, a ausência de dor, a aparência clínica inicialmente inofensiva, bem como a falta de conhecimento de muitos profissionais que a consideram apenas como processo inflamatório crônico.<sup>13</sup> Por ocorrerem episódios agudos seguidos de remissão dos sinais e sintomas, muitos pacientes associam as alterações labiais ao ônus da profissão, não a identificando como um processo inflamatório crônico e as aceitando como parte do contexto da atividade exercida, tanto quanto ter as mãos calejadas ou a pele bronzeada. A biópsia é recomendada para os casos de QA que apresentam perda de nitidez da linha de transição do vermelhão do lábio para a pele, alteração da consistência do lábio à palpação, alteração da espessura da semi-mucosa e presença de ulceração.<sup>13</sup>

### ***Histopatologia***

A hiperqueratose (ou paraqueratose) e acantose são aspectos universais, embora áreas de atrofia não sejam raros (Figura 2). Na lâmina própria encontram-se vasos sanguíneos, frequentemente dilatados, e com proeminência vascular decorrente do aumento do volume das células endoteliais e não de sua proliferação. A presença da elastose solar caracteriza-se como sinal frequente e importante. Ainda na derme, observa-se a presença de infiltrado inflamatório de intensidade que pode variar de leve a grave sendo composto, predominantemente, de linfócitos, mas também com distinta participação de plasmócitos e eosinófilos. A atipia dos queratinócitos é o aspecto mais importante e que gradualmente se instala no epitélio. Pode-se encontrar desde os graus mais leves de displasia epitelial até os mais graves, sendo que o potencial para o desenvolvimento do carcinoma invasivo aumenta proporcionalmente à gravidade dessa alteração. As atipias celulares mais graves podem estar associadas a quadros inflamatórios intensos, comumente observadas nas lesões ulceradas, situações nas quais a

distinção diagnóstica entre QA e carcinoma superficial torna-se ainda mais difícil.<sup>14</sup> Importante salientar que as alterações histológicas da QA não são distribuídas de forma uniforme pelo vermelhão do lábio, mesmo nos casos em que a apresentação clínica é homogênea.<sup>14</sup>

### **Tratamento**

As principais terapêuticas da QA visam remoção ou destruição do epitélio alterado e incluem a vermelhectomia, a aplicação tópica de 5-fluoracil (5-FU), a esfoliação química pelo uso do ácido tricloroacético, a crioterapia, a eletrocauterização, a ablação com laser de CO<sub>2</sub>, o acompanhamento com fotoproteção intensa local e mais recentemente, a utilização de imiquimode, terapia fotodinâmica e YAG-laser.<sup>15-19</sup>

A vermelhectomia é o tratamento de escolha por permitir revisão histopatológica de todo tecido removido, sendo considerada como biópsia excisional. Todas as outras opções de tratamento não produzem peça cirúrgica que permitam avaliação anatomopatológica e consequente detecção da presença de possível tumor invasivo<sup>14-16</sup> No entanto, qualquer tratamento somente será efetivo se o paciente se conscientizar da importância da fotoproteção, bem como da aderência às consultas periódicas para efetivo controle clínico da doença.

## **2. Carcinoma Espinocelular do Lábio**

No Brasil, o câncer do lábio assume papel importante nos índices epidemiológicos, no entanto, não há dados nacionais que mostrem sua incidência de forma isolada. Os dados estatísticos disponíveis e que devem ser considerados para este tipo de tumor são aqueles apresentados para o câncer de boca.<sup>1</sup>

O câncer do lábio corresponde a 25% a 30% das neoplasias de boca diagnosticados, sendo o carcinoma espinocelular o tipo histológico mais comum, correspondendo a 95% dos casos, com prevalência no lábio inferior vinte vezes maior que no lábio superior.<sup>20,21</sup> Apresenta maior incidência no sexo masculino na razão de 6:1 em relação ao feminino e acomete principalmente indivíduos acima dos 50 anos, de fototipos baixos e que exercem atividade profissional e/ou de lazer relacionada à exposição solar crônica.<sup>10,20,21</sup> É incomum em indivíduos jovens, mas tem sido observado em jovens transplantados renais ou naqueles infectados pelo HIV.<sup>10,22,23</sup>

Quando diagnosticado em estágio precoce, apresenta índice de cura de 80 a 90% e taxa de mortalidade entre 10% e 15%.<sup>24</sup> As metástases quando ocorrem, são tardias e variam de 11 a 18%, e nestes casos a sobrevida média em cinco anos é reduzida para 25%.<sup>24-26</sup>

A radiação ultravioleta (UV) tem aumentado progressivamente sua incidência sobre a terra, sendo considerada a responsável primária na indução de alterações no lábio inferior devido à sua intensa absorção pelos ácidos nucléicos. A maior parte dos danos é causada pela UVB e decorre de alterações que impedem a transcrição da informação genética para o RNAm, bloqueando o mecanismo de duplicação do DNA, o que leva do ponto de vista molecular à diminuição da atividade mitótica e, do ponto de vista clínico à atrofia do epitélio e redução da capacidade fotoprotetora do lábio.<sup>4</sup> Esses danos são causados por interação direta com moléculas alvo ou indiretamente pela formação dos radicais livres, os quais possuem alta afinidade por elétrons e pontes de hidrogênio, sendo o DNA o alvo principal.<sup>5</sup>

Quando um tecido é continuamente exposto à radiação ionizante, poderá sofrer tanto aberrações cromossômicas como cromatídicas, envolvendo duas ou uma das cromátides, respectivamente, uma vez que a quantidade relativa dessas alterações depende do tipo, da dose, do tempo e da velocidade de exposição, bem como da sensibilidade das células afetadas nos vários estágios do ciclo celular e da capacidade de reparo do DNA.<sup>5,6</sup>

Embora a radiação solar seja o fator de risco mais importante para o desenvolvimento de lesões no lábio, ela não é única. Associam-se o tabagismo, o consumo abusivo do álcool, o HPV, a raça, a predisposição genética e familiar, estados de imunossupressão, dietas pobres e fatores socioeconômicos.<sup>27-31</sup>

### ***Clínica***

O CEC do lábio é considerado doença de baixa agressividade e prognóstico favorável pela sua tendência de crescimento lento. Inicialmente é assintomático, podendo ser difícil de distinguir de lesões de QA. Manifesta-se como placa leucoplásica ou eritroplásica, atrófica, exibindo fissuras persistentes com áreas de descamação ou crosta. Progressivamente estabelece-se lesão ulcerada de base infiltrada e limites nítidos. Em estágios avançados apresentam dor associada à úlcera exsudativa, de bordos endurecidos, de base infiltrada, que não cicatriza (Figura 3). Pode apresentar crescimento verrucoso exofítico, friável e sangrante.<sup>10,31</sup> A palpação com dedos concomitantes na face mucosa interna e cutânea externa auxilia a delimitar a verdadeira profundidade clínica da lesão.<sup>31</sup>

### ***Histopatologia***

O carcinoma espinocelular do lábio caracteriza-se histopatologicamente por ilhas ou cordões invasivos de células epiteliais escamosas malignas. As células tumorais apresentam citoplasma eosinofílico abundante com núcleos grandes, muitas vezes hipercromáticos e aumento da relação núcleo-citoplasma. Podem ser observados queratinização individual das células, pérolas de queratina e graus variados de pleomorfismo celular e nuclear.

A invasão é caracterizada pela extensão irregular do epitélio tumoral através da membrana basal em direção do tecido conjuntivo do derma. Células escamosas epiteliais e ninhos ou ilhas de células são observados crescendo sem ligação com o epitélio de superfície. Estas células podem se estender de maneira expansiva ou infiltrativa profundamente para o tecido adiposo subjacente, músculo, osso, vasos sanguíneos e linfáticos, causando a destruição tecidual (Figuras 4, 5 e 6). Frequentemente observa-se intensa resposta celular inflamatória, predominantemente linfocitária, ao epitélio invasor e áreas focais de necrose. O crescimento da neoplasia é capaz de induzir angiogênese e, ocasionalmente, produzir resposta de fibrose densa desmoplásica.<sup>31</sup>

A classificação histopatológica de malignidade proposta pela OMS baseia-se no grau de anaplasia ou diferenciação celular, agrupando essas neoplasias malignas em três categorias: pouco, moderadamente e bem diferenciadas.<sup>32-34</sup> Os CEC de baixo grau, grau I ou bem diferenciados correspondem àqueles com arquitetura tecidual semelhante ao padrão normal de epitélio escamoso. Essas neoplasias crescem lentamente e metastatizam tardiamente. Já os CEC pouco diferenciados, alto grau, grau III, pobremente diferenciados ou anaplásicos caracterizaram-se pelo predomínio de células imaturas, numerosas mitoses, pleomorfismo celular e nuclear expressivos, pouca ou nenhuma produção de queratina, crescimento rápido e metástases precoces. Um tumor com aparência morfológica entre esses dois extremos é denominado de carcinoma moderadamente diferenciado ou grau II.<sup>32-34</sup>

Considerando que o padrão histopatológico do CEC de boca apresenta grande variação dentro da mesma lesão, Bryne et al (1989) propuseram uma nova graduação histopatológica, dando início à graduação histológica do fronte de invasão, sendo esta denominação reservada para a área do tumor considerada a mais invasiva.<sup>35</sup>

O fronte de invasão tumoral corresponde ao ponto de maior invasão das células neoplásicas no tecido conjuntivo, ou seja, à interface entre células tumorais e o estroma no limite mais profundo da invasão tumoral. É o local em que as células neoplásicas são mais agressivas e as alterações moleculares são mais evidentes, permitindo serem estudadas com maior precisão. Essa região é caracterizada pelo aumento da proliferação neoplásica, perda da coesão das proteínas da matriz e invasão local (Figuras 7 e 8). Vários são os tipos celulares compõe esse sítio: células do sistema imune, células inflamatórias, além de miofibroblastos e células endoteliais envolvidos com a neovascularização.<sup>36</sup>

O fronte de invasão sinaliza o grau de diferenciação histológico do tumor, ao considerar as características da invasão neoplásica e aqueles do microambiente do sítio de invasão. A agressividade das células do fronte de invasão e sua interação com o

microambiente extracelular podem ser considerados na composição de fatores de prognóstico.<sup>36</sup>

### **Tratamento**

O tratamento do CEC do lábio é baseado no sistema TNM, no qual “T” representa o tamanho do tumor, “N” a presença ou ausência de metástase em linfonodos regionais e “M” a presença ou ausência de metástase à distância.<sup>34</sup>

Estádios I (tumores menores que 2 cm) e II (entre 2 e 4 cm) são curáveis por cirurgia ou radioterapia, sendo a escolha do tratamento baseada no resultado funcional e estético esperado. Estádios III (tumores maiores que 4 cm) e IV (que invadem estruturas adjacentes) são os grandes desafios. O tratamento recomendado é a cirurgia associada à radioterapia e esvaziamento cervical. Tem-se utilizado, também, a quimioterapia associada à radioterapia e cirurgia pelo método de Mohs (Tabela 1) e quando necessário, a cirurgia de resgate.

Estudos de seguimento após cirurgia de Mohs mostraram índice de recorrência de 2,3% e 7,6% de metástases em cinco anos.<sup>24-26</sup> Métodos cirúrgicos convencionais e radioterapia proporcionaram índices de recorrência de 10,5% e 13,7% de metástases para o mesmo período de acompanhamento.<sup>25,37</sup> A recorrência local está associada ao estádio inicial do tumor, margem cirúrgica comprometida, invasão histológica acima de 5 mm, padrão do fronte de invasão e existência de invasão perineural.<sup>37</sup> O índice de sobrevida após cinco anos é de 90% a 100% para os estádios iniciais sem metástases detectáveis. Quando há ocorrência de metástases ao diagnóstico o índice de sobrevida cai para 25% a 70% dos casos.<sup>25,34-37</sup>

### **3. Marcadores Tumorais**

Os distúrbios na indução da apoptose (morte celular programada) são considerados o evento inicial para desenvolvimento de cânceres e doenças linfoproliferativas, ao permitir que células malignas tenham sobrevida e chance de multiplicação.

Diversas vias regulatórias da apoptose mostram-se alteradas em lesões pré-malignas e malignas. A relação desordenada entre proliferação e morte celular pode, muitas vezes, prever a evolução e o comportamento destas lesões, além de fornecer informações sobre progressão tumoral e sobre a resposta às terapias contra o câncer.

Desta forma, a identificação de marcadores tumorais é importante e necessária para se definir com maior precisão o prognóstico da doença. Contudo, não há um único marcador universalmente aceito, e sim um painel com número limitado de genes e proteínas.

### **Proteína p53**

A proteína p53 é uma das proteínas responsáveis pela manutenção da integridade do DNA. Mutações no gene *TP53* tornam a p53 incapaz de controlar a proliferação celular, resultando em reparo ineficiente do DNA e permitindo que muitas células expostas a agentes mutagênicos repliquem o material genético danificado, propagando as mutações incorporadas ao genoma. Embora uma única mutação não seja suficiente para transformar a célula, a perda de função da p53 predispõe as células às mutações adicionais e à transformação maligna.<sup>40</sup>

Os genes regulados pela p53 são os envolvidos na parada do ciclo celular, apoptose e angiogênese. Em condições de estresse, particularmente por indução de dano no DNA, a proteína p53 selvagem promove a parada do ciclo celular na fase G1, permitindo, desta forma, o reparo do material genético danificado pelo agente mutagênico. Se, por algum motivo, este mecanismo falhar, a p53 sinalizará para a célula entrar em apoptose, impedindo, assim, que células que sofreram mutação se dividam. As funções da proteína p53 são exercidas por sua capacidade transcricional que ativa uma série de genes envolvidos na regulação do ciclo celular. Portanto, quando a célula é exposta à agressão genotóxica por agentes químicos ou por radiação UV, o gene *TP53* ativa transcionalmente o gene *TP21*, induzindo a síntese da proteína com o mesmo nome, cuja função é inibir a ação das quinases dependentes de ciclinas (CDK), fazendo com que as células parem na fase G1 do ciclo celular até que o DNA seja reparado. A seguir, a proteína p53 ativa o gene *GADD-45* que atua corrigindo a lesão do DNA. Assim que esta for reparada, a proteína p53 é degradada pela ação da proteína mdm-2.<sup>41</sup> A p53 selvagem tem meia vida curta (6-20min), não se acumula em células normais, não sendo detectada por métodos imunoistoquímicos.

Mutações no gene *TP53* levam à produção de proteína p53 alterada, com meia vida longa, sem capacidade de se combinar com o DNA e que se acumula no núcleo celular, sendo facilmente visualizada por métodos imunoistoquímicos

Anormalidades no gene *TP53* são as alterações moleculares mais comuns encontradas nas neoplasias humanas. Sugere-se que o *TP53* esteja mutado em mais de 90% dos CEC da pele e em mais de 50% dos carcinomas basocelulares.<sup>42</sup> A expressão da proteína p53 no tecido bucal, revelada pela imunoistoquímica, associa-se positivamente ao grau de displasia epitelial bem como à progressão para carcinoma espinocelular de boca.<sup>42-44</sup> Também, tem sido relatada expressão aumentada da p53 em CEC do lábio e nas lesões de queilite actínica.<sup>43-45</sup>

### **Proteína p16**

A proteína p16 é codificada pelo gene *TP16* (CDKN2a/INK4a), também conhecido como gene supressor tumoral inibidor das CDK. No ciclo celular normal esta proteína é capaz



de se ligar às CDK 4 e 6, inibindo a fosforilação da proteína retinoblastoma (pRb). A pRb hipofosforilada inibe a entrada da célula na fase S do ciclo celular pela associação física com membros da família do fator de transcrição E2F. O complexo E2F-pRb ativado reprime a transcrição de genes-alvo que regulam a síntese de DNA com consequente ativação do sistema de checagem (checkpoint) na transição G1-S do ciclo celular.<sup>46</sup>

Quando ocorre disfunção da p16, a CDK4/6 pode ligar-se à ciclina D1 e formar o complexo CDK4/6 - ciclina D1, promovendo a fosforilação da pRb e liberando o fator de transcrição E2F, o qual acelera a transição da fase G1-S do ciclo celular, levando à instabilidade genômica (Figura 9).<sup>46</sup> Assim, a p16 contribui para o escape dos “checkpoints” da senescência e apoptose e para a proliferação celular descontrolada.

A expressão da p16 é anormal em grande parte dos tumores sólidos. Em carcinomas primários, a inativação somática do *TP16* (deleção ou mutação) tem sido relatada principalmente em cânceres de pâncreas e esôfago, glioblastoma e leucemia linfoblástica aguda de células T. Além disso, outros tumores, incluindo os de cabeça e pescoço, mama, cólon e tumores de bexiga, com aparente exons do *TP16* normais, frequentemente não expressam a proteína.

### ***Proteína p21***

A proteína p21, produto do gene *TP21/WAF1*, é membro da família dos genes supressores tumorais. Atua como inibidor de CDK essenciais para o crescimento celular, diferenciação e apoptose. A expressão da p21 é regulada pela p53 em resposta a danos no DNA. A partir daí, ocorre associação da p21 à CDK, impedindo a fosforilação de seus substratos e bloqueando a progressão do ciclo celular. Esta paralisação dá à célula tempo para reparar o DNA, impedindo assim a replicação de material genético danificado.<sup>47</sup>

A proteína p21 é ativada em resposta a baixas doses de radiação UVB. A expressão aumentada da p21 associada ao aumento da p53 tem sido detectada na pele exposta aos raios UVB e no fronte de invasão de carcinomas de lábio, bem como em lábios normais, no entanto essa associação foi perdida na QA.<sup>48</sup> Em CEC de boca, a expressão aumentada da p21 é considerada marcador de mal prognóstico e invasão tumoral, e quando associada ao aumento da expressão tecidual da p53, sugere-se correlação com a ocorrência de metástases linfonodais.<sup>49</sup>

### ***Survivina***

A survivina faz parte da família das IAPs (“inhibitor apoptosis proteins”). Desde a sua descoberta em 1997, é considerada como importante marcador de malignidade e também indicador prognóstico de resposta do câncer à terapêutica.<sup>50</sup> Acredita-se que a survivina seja

importante no período de replicação da célula, porém não é essencial para a sobrevivência celular. Células adultas não morrem na ausência da survivina, entretanto a mesma é imprescindível para o processo de proliferação celular, contribuindo para a separação das cromátides-irmãs na mitose. Por outro lado, a imunomarcagem aumentada da survivina foi observada em diversas neoplasias, como linfomas não - Hodgkin de alto grau, carcinoma nasofaríngeo, carcinoma de células escamosas de pulmão, adenocarcinoma pancreático, de mama, colorretal, próstata e câncer gástrico.<sup>50</sup> Estudos sobre a expressão de survivina em neoplasias bucais associam a imunomarcagem a fenótipos tumorais mais agressivos e invasivos. Apesar disso, não foi encontrada associação entre expressão de survivina em CEC de boca e tamanho do tumor, grau de displasia, presença de linfonodos comprometidos e metástases à distância.<sup>51</sup>

### ***i-NOS***

A produção endógena de óxido nítrico pode desempenhar importante papel na progressão das células, de displasia à franca malignidade. O óxido nítrico é um radical gasoso reativo sintetizado pela enzima óxido nítrico-sintase a partir do aminoácido L-arginina. Três isoformas de óxido nítrico-sintase cálcio-dependentes já foram identificadas, sendo duas delas presentes fisiologicamente: a óxido nítrico-sintase neural e a endotelial, responsáveis pela manutenção da homeostase dos sistemas nervoso e cardiovascular, respectivamente. A terceira, uma proteína de peso molecular de 130 kda, é sintetizada mediante estímulos específicos tais como processos inflamatórios e progressão tumoral, sendo denominada óxido nítrico-sintase indutiva (i-NOS).<sup>52</sup> Uma vez sintetizada, a i-NOS produz altos níveis de óxido nítrico que reage rapidamente com o ânion superóxido presente nas células eucarióticas, resultando em ânion peroxi-nitrito, que por ser uma molécula altamente reativa é capaz de gerar amplo espectro de lesões no DNA.<sup>53</sup>

A síntese de i-NOS demonstrou-se ausente na mucosa normal da boca. Entretanto, demonstrou-se expressão aumentada de i-NOS em lesões displásicas orais, sendo positivamente correlacionada com o grau de displasia epitelial.<sup>54</sup> Nos carcinomas espinocelulares de cabeça e pescoço humanos e experimental da bolsa jugal de hamsters, a expressão de RNAm de i-NOS foi predominantemente observada nas células tumorais. Esses resultados permitem constatar que o óxido nítrico favorece o crescimento tumoral, a angiogênese e promove metástases.<sup>55</sup>

### ***Proteína bcl-2***

A família bcl-2 (B-cell lymphoma 2) consiste de proteínas antiapoptose (bcl-2, bcl-x1, bcl-w, bfl-1, bcl-1, mcl-1, a-1) e proteínas pró-apoptose (bax, bak, bcl-xs, bad, bid, bik, hrk), que participam da via intrínseca da apoptose e estão localizadas na membrana mitocondrial do

envelope nuclear ou no retículo endoplasmático.<sup>56,57</sup> Altos níveis de bcl-2 previne a ocorrência de apoptose e sua expressão aumentada está associada ao curso clínico agressivo de neoplasias, resistência à quimioterapia ou radioterapia e menor sobrevida.<sup>57,58</sup> Por outro lado, altos níveis de bax resultam em indução de apoptose e melhor comportamento clínico da neoplasia.<sup>57,58</sup> Na boca, o epitélio displásico e o epitélio de borda de lesão do CEC mostram forte imunomarcção para bcl-2, enquanto bax é pouco expressa. Também, há significativa imunomarcção de bcl-2 nos casos de CEC indiferenciados. Já nos bem diferenciados há imunomarcção mais expressiva para bax.<sup>56-58</sup>

Alguns estudos demonstraram expressão aumentada de bcl-2 em queilite actínica quando comparada à mucosa oral normal e diminuída quando comparada à mucosa labial normal, ao contrário de bax que não se mostrou alterada, embora com tendência estatística a exibir imunomarcção mais acentuada no epitélio displásico da queilite actínica. Tais achados sugerem que a radiação ultravioleta pode modular a expressão de bcl-2 na queilite actínica, induzindo mecanismos pró-apoptóticos como tentativa de eliminar os efeitos nocivos causados pela exposição solar.<sup>56,57</sup>

### ***Maspin***

Maspin (mammary serine protease inhibitor) ou serpin B5 é proteína pertencente à grande família das proteínas serpin (serine protease inhibitor) que compreendem proteínas inibidoras de proteases.<sup>59</sup> A maspin tem função relacionada à supressão tumoral, inibição da angiogênese e inibição da invasão e metastatização do tumor. Ou seja, a expressão de maspin no tecido se correlaciona inversamente com o comportamento maligno da neoplasia. Em princípio, a maspin está expressa em células normais, e com expressão reduzida ou ausente em células displásicas e tumorais, respectivamente, podendo ser utilizada como marcador de prognóstico de invasão tumoral. Em carcinoma de mama e carcinoma de próstata a imunodeteção de maspin está relacionada ao melhor prognóstico. O mesmo já foi observado em relação ao CEC de cabeça e pescoço e CEC da língua.

Em queilite actínica a imunomarcção da maspin é inversamente proporcional ao grau de displasia celular das células da epiderme.<sup>59</sup> Portanto, a maspin poderia ser útil na avaliação do prognóstico evolutivo da queilite actínica. Em relação ao CEC do lábio observou-se intensa imunomarcção da maspin, tanto na neoplasia em si, em praticamente todas as células, quanto no epitélio adjacente ao tumor.<sup>59</sup> Esse achado, de certa forma paradoxal, sugere a necessidade de investigações adicionais quanto à imunomarcção e o papel da maspin na queilite actínica e CEC do lábio.

## CONCLUSÃO

Do exposto, os autores salientam a frequência e a importância da queilite actínica como desordem potencialmente maligna, que com constantemente é negligenciada por pacientes e profissionais da área médica e odontológica. Demonstram a conexão do câncer do lábio com a existência prévia da queilite actínica, a importância do diagnóstico precoce no prognóstico e chamam a atenção para a gravidade do carcinoma espinocelular do lábio quando diagnosticado em estádios III-IV. Salientam ainda a importância do conhecimento e o estudo dos marcadores tumorais para a compreensão da história natural do câncer do lábio. E, ainda, sugerem o papel da imunomarcção em casos de queilite actínica com maior grau de displasia histológica como auxiliar no prognóstico desta enfermidade.

## REFERÊNCIAS

- 1 Brasil. Ministério da Saúde. Instituto Nacional de Câncer. Estimativa 2010: incidência de câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA. 2009.
- 2 Shiu MN, Chen THH. Intervention efficacy and malignant transformation to oral cancer among patients with leukoplakia (review). *Oncol Rep.* 2003;10:1683-92.
- 3 Carinci F, Lo Muzio L, Piattelli A, et al. Genetic portrait of mild and severe lingual dysplasia. *Oral Oncol.* 2005; 41:365-374.
- 4 Ron E. Ionizing radiation and cancer risk: evidence from epidemiology. *Radiat Res* 1998; 150: S30-41.
- 5 Biaglow JE. The effects of ionizing radiation on mammalian cells. In: *Radiation Chemistry: principles and applications* (Farhataziz, Rogers MAJ, eds). New York: VHC Publishers. 1987; 527-63.
- 6 Boothman DA, Meyers M, Odegaard E et al. Altered G1 checkpoint control determines adaptive survival responses to ionizing radiation. *Mutat Res* 1996; 358: 143-53.
- 7 Picascia DD, Robinson JK. Actinic cheilitis: a review of the etiology, differential diagnosis, and treatment. *J Am Acad Dermatol* 1987; 17: 255-64.
- 8 Warnakulasuriya S, Johnson NW, van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med* 2007; 36: 575-80.
- 9 Markopoulos A, Albanidou-Farmaki E, Kayavis I. Actinic cheilitis: clinical and pathologic characteristics in 65 cases. *Oral Dis* 2004; 10: 212-6.

- 10 Ochsenius G, Ormeno A, Godoy L et al. [A retrospective study of 232 cases of lip cancer and pre cancer in Chilean patients. Clinical-histological correlation], Vol. 131. 2003.
- 11 Bouquot JE. Oral leukoplakia and erythroplakia: a review and update. *Pract Periodontics Aesthet Dent* 1994; 6: 9-17; quiz 9.
- 12 Lee JJ, Hong WK, Hittelman WN et al. Predicting cancer development in oral leukoplakia: ten years of translational research. *Clin Cancer Res* 2000; 6: 1702-10.
- 13 Cooke BE, Tapper-Jones L. Recognition of oral cancer. Causes of delay. *Br Dent J* 1977; 142: 96--8.
- 14 Menta Simonsen Nico M, Rivitti EA, Lourenco SV. Actinic cheilitis: histologic study of the entire vermilion and comparison with previous biopsy. *J Cutan Pathol* 2007; 34: 309-14.
- 15 Robinson JK. Actinic cheilitis. A prospective study comparing four treatment methods. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg* 1989; 115: 848-52.
- 16 Sanchez-Conejo-Mir J, Perez Bernal AM, Moreno-Gimenez JC et al. Follow-up of vermilionectomies: evaluation of the technique. *J Dermatol Surg Oncol* 1986; 12: 180
- 17 Orenstein A, Goldan O, Weissman O et al. A new modality in the treatment of actinic cheilitis using the Er:YAG laser. *J Cosmet Laser Ther* 2007; 9: 23-5.
- 18 Greenberg HL, Cohen JL, Rosen T et al. Severe reaction to 5% imiquimod cream with excellent clinical and cosmetic outcomes. *J Drugs Dermatol.* 2007; 6:452-8
- 19 Rossi R, Assad GB, Buggiani G, Lotti T. Photodynamic therapy: treatment of choice for actinic cheilitis? *Dermatol Ther.* 2008; 21: 412-5.
- 20 dos Santos LR, Cernea CR, Kowalski LP et al. Squamous-cell carcinoma of the lower lip: a retrospective study of 58 patients. *Sao Paulo Med J* 1996; 114: 1117-26.
- 21 Zitsch RP, 3rd, Park CW, Renner GJ et al. Outcome analysis for lip carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg* 1995; 113: 589-96.
- 22 Scully C. Oral manifestations associated with human immunodeficiency virus (HIV) infection in developing countries--are there differences from developed countries? *Oral Dis* 2000; 6: 395.
- 23 Frisch M, Biggar RJ, Engels EA et al. Association of cancer with AIDS-related immunosuppression in adults. *Jama* 2001; 285: 1736-45.
- 24 Bilkay U, Kerem H, Ozek C et al. Management of lower lip cancer: a retrospective analysis of 118 patients and review of the literature. *Ann Plast Surg* 2003; 50: 43-50.

- 25 Bentley JM, Barankin B, Lauzon GJ. Paying more than lip service to lip lesions. *Can Fam Physician* 2003; 49: 1111-6.
- 26 McGregor GI, Davis NL, Hay JH. Impact of cervical lymph node metastases from squamous cell cancer of the lip. *Am J Surg* 1992; 163: 469-71.
- 27 Abreu MA, Silva OM, Neto Pimentel DR et al. Actinic cheilitis adjacent to squamous carcinoma of the lips as an indicator of prognosis. *Braz J Otorhinolaryngol* 2006; 72: 767-71
- 28 Winn DM. Diet and nutrition in the etiology of oral cancer. *Am J Clin Nutr* 1995; 61: 437S-45S.
- 29 Lindqvist C, Teppo L, Pukkala E. Occupations with low risk of lip cancer show high risk of skin cancer of the head. *Community Dent Oral Epidemiol* 1981; 9: 247-50.
- 30 Birkeland SA, Storm HH, Lamm LU et al. Cancer risk after renal transplantation in the Nordic countries, 1964-1986. *Int J Cancer* 1995; 60: 183-9.
- 31 Awde JD, Kogon SL, Morin RJ. Lip cancer: a review. *J Can Dent Assoc* 1996; 62: 634-6.
- 32 Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Instituto Nacional do Câncer. TNM: classificação de tumores malignos. 6º ed. Rio de Janeiro. INCA. 2004.
- 33 Patel SG, Shah JP. TNM staging of cancers of the head and neck: striving for uniformity among diversity. *CA Cancer J Clin* 2005; 55: 242-58; quiz 61-2, 64.
- 34 Costa Ade L, Pereira JC, Nunes AA et al. [Correlation between TNM classification, histological grading and anatomical location in oral squamous cell carcinoma]. *Pesqui Odontol Bras* 2002; 16: 216-20.
- 35 Bryne M, Koppang HS, Lilleng R et al. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med* 1989; 18: 432-7.
- 36 Bankfalvi A, Piffko J. Prognostic and predictive factors in oral cancer: the role of the invasive tumour front. *J Oral Pathol Med* 2000; 29: 291-8.
- 37 Veness MJ, Ong C, Cakir B et al. Squamous cell carcinoma of the lip. Patterns of relapse and outcome: Reporting the Westmead Hospital experience, 1980-1997. *Australas Radiol* 2001; 45: 195-9.
- 38 Zimmermann KC, Green DR. How cells die: apoptosis pathways. *J Allergy Clin Immunol* 2001; 108: S99-103.

- 39 Loro LL, Vintermyr OK, Johannessen AC. Cell death regulation in oral squamous cell carcinoma: methodological considerations and clinical significance. *J Oral Pathol Med* 2003; 32: 125-38.
- 40 Rotter V, Prokocimer M. p53 and human malignancies. *Adv Cancer Res* 1991; 57: 257-72.
- 41 Prives C. Signaling to p53: breaking the MDM2-p53 circuit. *Cell* 1998; 95: 5-8.
- 42 Boukamp P. Non-melanoma skin cancer: what drives tumor development and progression? *Carcinogenesis* 2005; 26: 1657-67.
- 43 Cruz IB, Snijders PJ, Meijer CJ et al. p53 expression above the basal cell layer in oral mucosa is an early event of malignant transformation and has predictive value for developing oral squamous cell carcinoma. *J Pathol* 1998; 184: 360-8.
- 44 Crosthwaite N, Teale D, Franklin C et al. p53 protein expression in malignant, pre-malignant and non-malignant lesions of the lip. *J Clin Pathol* 1996; 49: 648-53.
- 45 Neto Pimentel DR, Michalany N, Alchorne M et al. Actinic cheilitis: histopathology and p53. *J Cutan Pathol* 2006; 33: 539-44.
- 46 Ai L, Stephenson KK, Ling W et al. The p16 (CDKN2a/INK4a) tumor-suppressor gene in head and neck squamous cell carcinoma: a promoter methylation and protein expression study in 100 cases. *Mod Pathol* 2003; 16: 944-50.
- 47 Horta MC, de Assis LA, de Souza AF et al. p53 and p21WAF1/CIP1 overexpression at the invasive front of lower lip squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2007; 36: 88-92.
- 48 Martinez A, Brethauer U, Borlando J et al. Epithelial expression of p53, mdm-2 and p21 in normal lip and actinic cheilitis. *Oral Oncol* 2008; 44: 878-83.
- 49 Nemes JA, Nemes Z, Marton IJ. p21WAF1/CIP1 expression is a marker of poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2005; 34: 274-9.
- 50 Yamamoto T, Tanigawa N. The role of survivin as a new target of diagnosis and treatment in human cancer. *Med Electron Microsc* 2001; 34: 207-12.
- 51 Lo Muzio L, Farina A, Rubini C et al. Survivin as prognostic factor in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer Lett* 2005; 225: 27-33.
- 52 Ambs S, Bennett WP, Merriam WG et al. Vascular endothelial growth factor and nitric oxide synthase expression in human lung cancer and the relation to p53. *Br J Cancer* 1998; 78: 233-9.
- 53 Nguyen T, Brunson D, Crespi CL et al. DNA damage and mutation in human cells exposed to nitric oxide in vitro. *Proc Natl Acad Sci U S A* 1992; 89: 3030-4.

- 54 Brennan PA, Palacios-Callender M, Zaki GA et al. Does type II nitric oxide synthase expression correlate with cellular proliferation in oral squamous cell carcinoma and dysplasia? *Head Neck* 2001; 23: 217-22.
- 55 Brennan PA, Palacios-Callender M, Umar T et al. Expression of type 2 nitric oxide synthase and p21 in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg* 2002; 31: 200-5.
- 56 Martinez A, Brethauer U, Rojas IG. et al. Expression of apoptotic and cell proliferation regulatory proteins in actinic cheilitis. *J Oral Pathol Med.* 2005; 34:257-62.
- 57 Lee JK, Kim JH, Nam KT, Lee SH. Molecular events associated with apoptosis and proliferation induced by ultraviolet-B radiation in the skin of hairless mice. *J Dermatol Sci.* 2003; 32: 171–9.
- 58 Jordan RC, Catzavelo GC, Barrett AW, Speight PM. Differential expression of bcl-2 and bax in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1996; 32: 394–400.
- 59 Fontes A, Sousa SM, Santos E, Martins MT. The severity of epithelial dysplasia is associated with loss of maspin expression in actinic cheilitis. *J Cutan Pathol.* 2009; 36: 1151-56.



**Tabela 1 - Classificação dos tumores de cabeça e pescoço por estadios e formas de tratamento.**

Estadio do Tumor	Tamanho do tumor	Metástase em linfonodos	Metástase à distância	Formas de tratamento
I	T <sub>1</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>	Cirurgia ou radioterapia
II	T <sub>2</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>	Cirurgia ou radioterapia
III	T <sub>3</sub>	N <sub>0</sub>	M <sub>0</sub>	Ressecáveis: cirurgia + radioterapia
	T <sub>1</sub>	N <sub>1</sub>	M <sub>0</sub>	Irressecáveis: radioterapia, se necessário cirurgia de resgate; radioterapia + quimioterapia, se necessário cirurgia de resgate.
	T <sub>2</sub>	N <sub>1</sub>	M <sub>0</sub>	
T <sub>3</sub>	N <sub>1</sub>	M <sub>0</sub>		
IV	T <sub>4</sub>	N <sub>0</sub> , N <sub>1</sub>	M <sub>0</sub>	Idem estadio III
	Qualquer T	N <sub>2a,b,c</sub> , N <sub>3</sub>	M <sub>0</sub>	
	Qualquer T	Qualquer N	M <sub>1</sub>	

T<sub>1</sub> - tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão; T<sub>2</sub> - tumor com mais de 2 cm até 4 cm; T<sub>3</sub> - tumor com mais de 4 cm; T<sub>4</sub> - tumor invade as estruturas adjacentes. N<sub>0</sub> - ausência de metástase em linfonodos regionais; N<sub>1</sub>- linfonodo homo-lateral, único ≤ 3 cm; N<sub>2a</sub>- linfonodo homo-lateral, único > 3-6 cm; N<sub>2b</sub>- linfonodo homo-lateral, múltiplo ≤ 6 cm; N<sub>2c</sub>- linfonodo bilateral, contra-lateral, ≤ 6 cm; N<sub>3</sub>- linfonodo > 6 cm. M<sub>0</sub> ausência de metástase à distância; M<sub>1</sub> presença de metástase à distância.



Figura 1. Queilite actínica: edema do lábio inferior e apagamento dos limites do vermelhão do lábio. Edema, eritema e descamação do lábio superior.

Figura 2. Queilite actínica: hiperqueratose, atrofia da epiderme, displasia epitelial, elastose solar e vasodilatação. HE X 200.

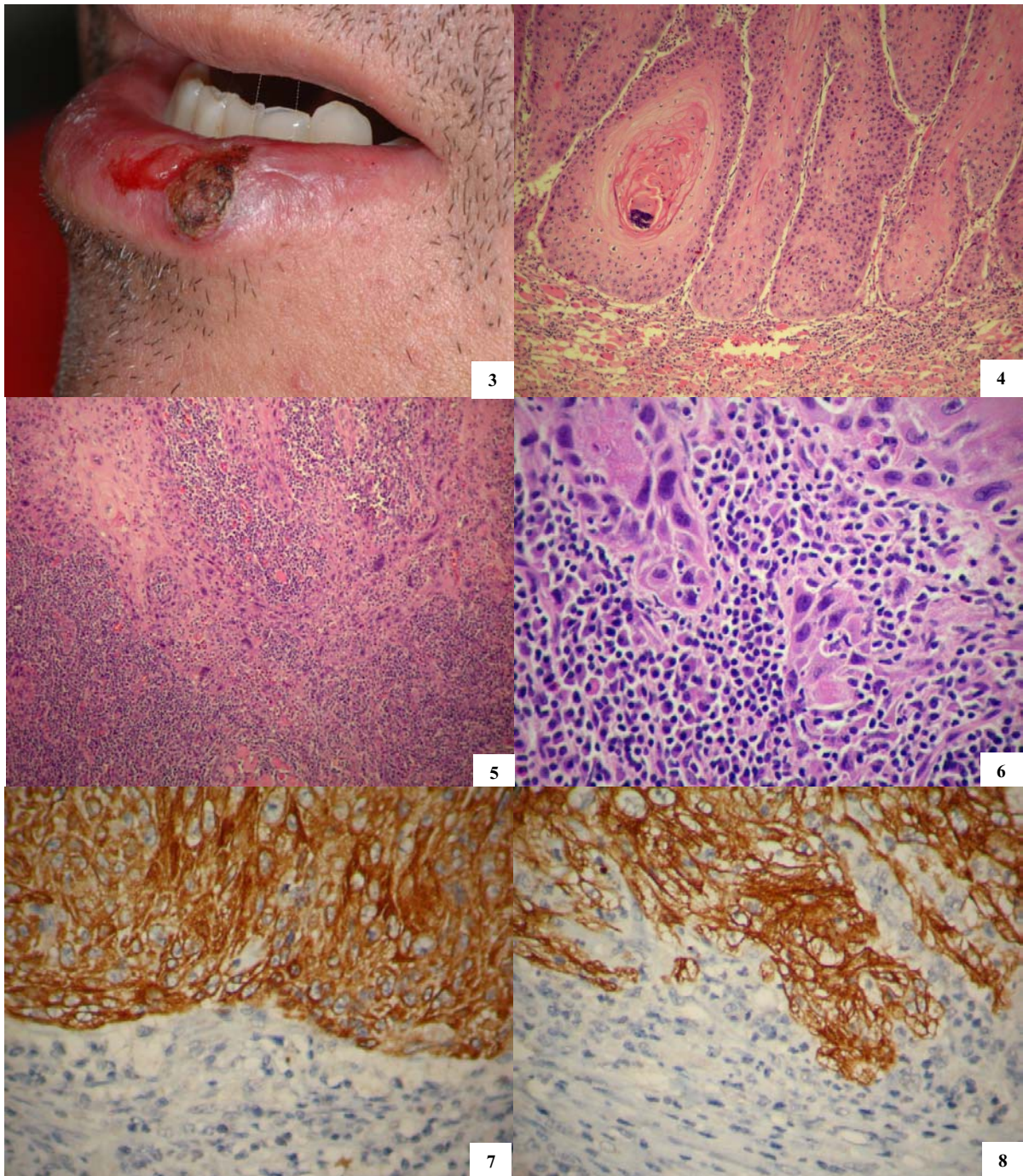


Figura 3. Carcinoma espinocelular: lesão ulcerada, recoberta por crosta e de base infiltrada.

Figura 4. Carcinoma espinocelular bem diferenciado: invasão do tipo expansiva, com clara delimitação do fronte de invasão. HE X 100.

Figura 5. Carcinoma espinocelular pouco diferenciado: infiltração do estroma com fronte de invasão sem clara delimitação. Infiltrado inflamatório ativo e expressivo. HE X 200.

Figura 6. Carcinoma espinocelular pouco diferenciado: infiltração do estroma com blocos de células e células isoladas. Infiltrado linfoplasmocitário ativo. HE X 400.

Figura 7. Carcinoma espinocelular: clara delimitação do fronte de invasão de padrão expansivo com auxílio da imunomarcagem. Citoqueratina X 200.

Figura 8. Carcinoma espinocelular: clara delimitação de fronte de invasão de padrão infiltrativo com blocos de células. Citoqueratina X 200

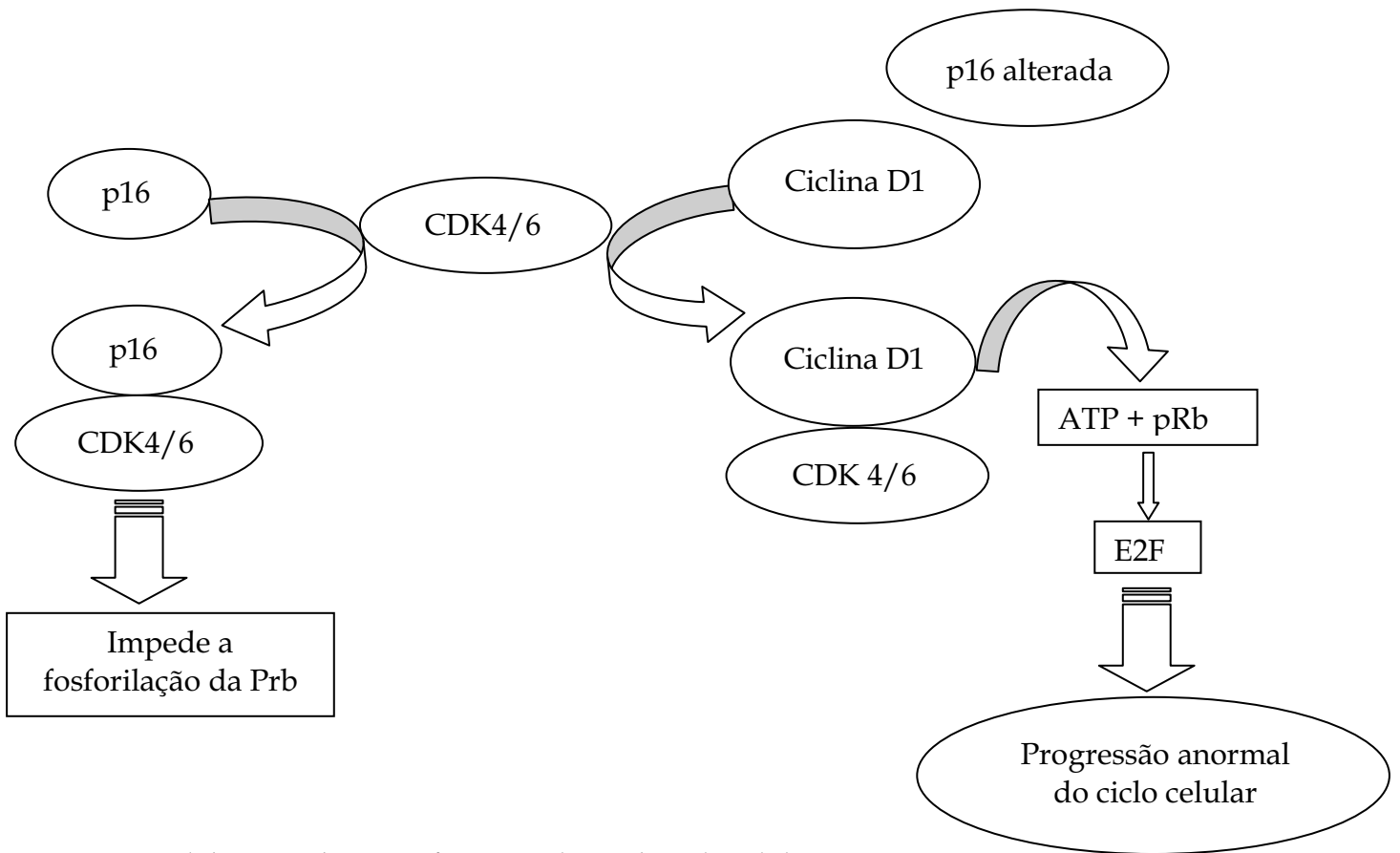


Figura 9. Papel da p16 e da CDK4/6 na regulação do ciclo celular.

## **Capítulo III**

### **Artigo Científico 2**

## **Artigo Científico 2**

### **Artigo a ser submetido ao periódico Oral Oncology**

**Queilite actínica: classificação clínica, correlação histológica e imunoistoquímica.**

**Actinic cheilitis: clinical classification, histological and immunohistochemical correlation.**

Renata Aparecida Martinez Antunes Ribeiro-Vieira, Eliana Maria Minicucci, Mariangela Esther Alencar Marques, Sílvio Alencar Marques

### **RESUMO**

Diversos estudos sobre desordens potencialmente malignas têm sido realizados objetivando definir suas características histopatológicas e com isto obter informações mais precisas sobre a evolução e o prognóstico dessas alterações. Existe grande dificuldade de se correlacionar o aspecto clínico da queilite actínica (QA) com o grau correspondente de alterações histológicas, o que contribui para subestimar a importância dessas lesões levando ao seu diagnóstico tardio. O objetivo desse estudo foi avaliar as características clínico patológicas da QA e sua correlação com a expressão imunoistoquímica de proteínas envolvidas na apoptose como a p53, p21, p16, survivina, bem como a expressão de i-NOS, além de propor classificação de gravidade clínica para essas lesões. Foram avaliados 31 casos de QA e 29 casos de mucosa oral normal. Os fototipos de I-III constituíram 97,2% da amostra, com predomínio do sexo masculino e profissões relacionadas à exposição solar crônica. A presença de vasodilatação foi o único achado histológico que se correlacionou com a gravidade clínica. Displasia epitelial e elastose solar estiveram presentes em grande parte da amostra, independente da gravidade clínica. Houve aumento da imunoexpressão da p53, p21,

i-NOS e survivina citoplasmática, o que evidencia o papel destas proteínas nos eventos iniciais da carcinogênese labial, sugerindo o alto risco de transformação maligna nas lesões avaliadas.

**PALAVRAS-CHAVE:** Queilite actínica; Apoptose; p53; p21; p16; Survivina; i-NOS

## **SUMMARY**

For information about evolution and prognostic of potential malignant disorders researches have available histopathological characteristics of this lesion. One of the most important cause of late diagnose of is the difficulty to correlate the clinical aspects of the actinic cheilitis (AC) with the histological abnormalities. The objective of this study was propose a classification of AC based of clinical severity and to evaluated the clinical and histopathological characteristics of AC and the correlation with the immunohistochemical expression of the proteins evolved with apoptosis p53, p21, p16, survivina and i-NOS. Thirty one cases of AC and 29 cases of normal oral mucosa were available. There were masculine predominance, 97,2% of the cases were skin phototypes I-III, and the professions related of chronic sun exposition. The clinical severity was correlated of vasodilatation. Epithelial dysplasia and solar elastose were present independent of clinical severity. It was observed increased of immunoexpression of p53, p21, i-NOS e cytoplasmatic survivina. These results suggest the role of these proteins in initial stage of labial carcinogenesis.

**KEYWORDS:** Actinic cheilitis; Apoptosis; p53; p21; p16; Survivin; i-NOS.

## **Introdução**

Os cânceres de cabeça e pescoço representam 10% dos tumores malignos diagnosticados, sendo que aproximadamente 40% correspondem aos cânceres de boca<sup>(1)</sup>. O câncer de boca engloba os tumores do lábio e os da cavidade bucal, o que o torna o sétimo mais frequente dentre os tumores malignos. Os dados epidemiológicos e o prognóstico deste tumor permaneceram ruins e praticamente inalterados nas últimas décadas devido ao estadió clínico avançado no momento do diagnóstico, o que acarreta tratamentos onerosos, agressivos e mutiladores, comprometendo a qualidade de vida dos pacientes<sup>(2)</sup>. Esses dados mantêm os cânceres de boca como problema de saúde pública no Brasil.

O carcinoma espinocelular (CEC) do lábio representa aproximadamente um quarto de todos os tumores de mucosa/semimucosa da região de cabeça e pescoço<sup>(3)</sup>, assumindo especial importância nos países onde a exposição solar é intensa e a composição étnica da população o favorece, já que a intensidade da radiação ultravioleta e fototipos baixos se constituem nos principais fatores de risco para o desenvolvimento desse carcinoma.

A queilite actínica (QA) é lesão pré-maligna do lábio, precursora do carcinoma espinocelular do lábio, particularmente do lábio inferior, causada pela exposição crônica à radiação ultravioleta presente na luz solar. A QA ocorre principalmente em homens de pele clara com histórico de exposição de origem ocupacional. Pode ocorrer em qualquer idade, no entanto, as alterações clínicas são mais frequentemente observadas a partir da 5ª década. Embora o principal fator etiológico seja a exposição solar crônica, outros fatores carcinogênicos, entre eles o tabagismo, aumentam a probabilidade de evolução da QA para o CEC do lábio<sup>(4)</sup>.

Os aspectos clínicos da QA são variáveis podendo apresentar perda da nitidez do contorno labial, atrofia da borda do vermelhão do lábio e escurecimento da interface vermelhão do lábio/pele da face. Com a progressão da lesão observam-se áreas ásperas e escamosas. Pode ocorrer ulceração focal crônica em um ou mais locais, bem como lesões leucoplásicas<sup>(5, 6)</sup>. A leucoplasia é uma das mais frequentes expressões clínicas da QA e a mais comum das alterações que precede o carcinoma espinocelular do lábio, sendo definida como placa branca de risco de transformação maligna<sup>(7-9)</sup>. Entretanto, há divergência na literatura em

relação à frequência com que leucoplasias se convertem em carcinoma espinocelular, a qual é estimada entre 1,4% a 36%, em período de 1 a 30 anos<sup>(10-13)</sup>.

Apesar da aparente facilidade do diagnóstico clínico e dos meios preventivos conhecidos e disponíveis para a população de risco, vários fatores são atribuídos ao diagnóstico clínico tardio da QA, entre eles o desconhecimento médico e odontológico quanto à potencialidade de transformação maligna da lesão. Outro fator, também preponderante, é a interpretação de caráter benigno que os pacientes imputam ao quadro, interpretando-o como algo inerente à exposição profissional crônica ao sol e que gera apenas desconforto e aspecto inestético.

Os achados histológicos principais incluem a hiperqueratose, hiperplasia, atrofia, elastose solar, infiltrado inflamatório que pode variar de discreto a intenso e vasodilatação. É importante salientar que diferentes áreas em um mesmo corte histológico exibem lesões mais pronunciadas, locais denominados de “hot spot lesions” onde as possibilidades de existência de displasia grave, carcinoma espinocelular *in situ* e mesmo carcinoma espinocelular microinvasivo devam ser consideradas.

O carcinoma do lábio apresenta distinta etiopatogênese e epidemiologia e apesar dos fatores de riscos para essa neoplasia serem bem reconhecidos, poucos estudos tem investigado a base molecular do seu desenvolvimento<sup>(14-16)</sup>. O câncer se origina do acúmulo de alterações genéticas e/ou epigenéticas que promovem situações de desequilíbrio entre o controle do crescimento celular e apoptose, o qual é regulado por uma série de genes e proteínas, dentre elas a p53, a p16, a p21, a i-NOS e a survivina.

Anormalidades no gene *TP53* são as alterações moleculares mais comuns encontradas nas neoplasias humanas<sup>(17)</sup>. A expressão da proteína p53 no tecido bucal, revelada pela imunohistoquímica, tem sido associada ao grau de displasia epitelial bem como à progressão para carcinoma espinocelular de boca<sup>(18-22)</sup>. Também, tem sido relatada expressão aumentada da p53 em CEC do lábio e QA<sup>(23-27)</sup>.

A proteína p16 é codificada pelo gene *TP16* (CDKN2a/INK4a), também conhecido como gene supressor tumoral inibidor das quinases dependentes de ciclinas (CDK) que contribui para o escape dos “pontos de checagem” da senescência e apoptose e para a proliferação celular descontrolada. No entanto, há poucos estudos demonstrando a expressão da p16 na carcinogênese labial e não há relatos na literatura que abordem a expressão da p16 na queilite actínica.

A proteína p21, produto do gene supressor tumoral *TP21/WAF1*, é um inibidor de CDK essencial para o crescimento celular, diferenciação e apoptose. A expressão da p21 é



regulada pela p53 em resposta a danos ao DNA. A expressão aumentada da p21 associada ao aumento da p53 tem sido relatada em pele exposta aos raios UVB e no fronte de invasão de carcinomas do lábio, bem como em lábios normais, mas não nas QA<sup>(27-29)</sup>. No entanto, há dados escassos na literatura abordando a expressão dessa proteína na queilite actínica.

A survivina é proteína inibidora da apoptose considerada como marcador de malignidade e indicador de prognóstico. Estudos a associam a fenótipos tumorais mais agressivos e invasivos<sup>(30, 31)</sup>. No entanto, ainda, não foram encontrados estudos que demonstrem a expressão dessa proteína em queilites actínicas e mesmo nos carcinomas espinocelulares do lábio. Outra proteína de interessante investigação é a óxido nítrico sintase indutiva (i-NOS), pois a produção endógena de óxido nítrico pode desempenhar importante papel na progressão das células, de displasia à franca malignidade. O óxido nítrico é um radical gasoso reativo sintetizado pela enzima óxido nítrico sintase a partir do aminoácido L-arginina<sup>(32, 33)</sup>. A síntese de i-NOS mostrou-se ausente quando pesquisada na mucosa normal da boca<sup>(34)</sup>. Porém, demonstrou-se aumentada em lesões displásicas orais, sendo positivamente correlacionada com o grau de displasia epitelial<sup>(34)</sup>, o que motiva o seu estudo nas lesões de queilite actínica.

Poucos são os estudos que associam os achados clínicos da QA e a gravidade dos mesmos com seus correspondentes histopatológicos e imunoistoquímicos. Os autores se propuseram a estudar as características clínicas, histopatológicas e imunoistoquímicas da QA no sentido de estabelecer parâmetros de correlação histológica frente a determinadas características clínicas ou conjunto delas; e ainda de associar a presença de imunomarcção de determinados marcadores tumorais com alterações histológicas e clínicas.

### **Pacientes e métodos**

Trata-se de estudo observacional, transversal, de pacientes com QA diagnosticados clinicamente no ambulatório de Estomatologia do Departamento de Dermatologia e Radioterapia da Faculdade de Medicina de Botucatu da Universidade Estadual Paulista (FMB-Unesp). Os fatores de exclusão à participação no estudo foram: a história de tabagismo, vigente no presente ou nos últimos 10 anos antecedentes à consulta<sup>(35)</sup> e, o estado de imunossupressão, independente da etiologia. Todos os pacientes incluídos no estudo deram seu consentimento por inscrito, pós-informados. O presente trabalho foi aprovado na Comissão de Ética em Pesquisa da FMB - Unesp, onde está registrado sob número de protocolo 2.900. Igualmente foi aprovado e recebeu subsídios para sua elaboração da agência de fomentos – Fapesp, sob número 2009/52982-6.

As etapas do estudo constituíram-se em:

### **1. Estudo demográfico e de fototipo:**

Foram estudadas as variáveis demográficas segundo sexo, idade e atividade profissional /ocupação, e a definição, por único pesquisador, do fototipo do paciente segundo a classificação de Fitzpatrick<sup>(36)</sup>.

### **2. Observação clínica:**

Os pacientes foram consultados e estudados no período de abril de 2007 a abril de 2008, sendo o critério de seleção a presença de lesão compatível com QA. Os pacientes que preencheram os critérios de inclusão e exclusão eram fotografados e forneciam dados para o preenchimento do protocolo de investigação.

### **3. Biópsia:**

Os pacientes foram submetidos à biópsia para confirmação do diagnóstico e estudo das variáveis histopatológicas e imunoistoquímicas. Foram retirados dois fragmentos tipo “shaving” que incluíram toda a espessura do epitélio e porção do cório da lesão clinicamente suspeita e da mucosa controle.

Os fragmentos de lesão de QA (31 pacientes) e de mucosa labial normal adjacente (29 pacientes) foram obtidos no mesmo momento cirúrgico e sob mesmo ato anestésico.

Todos os espécimes foram fixados em formalina tamponada a 10%, processados e incluídos em parafina, para confecção de cortes histológicos com espessura de 4µm. O processamento histotécnico seguiu as etapas básicas para a coloração de hematoxilina e eosina (HE). A avaliação das lâminas, coradas em HE ou imunomarcadas, foi realizada através de microscópio óptico por três observadores de forma concomitante, segundo protocolo de interesse.

### **4. Critérios para o diagnóstico clínico e classificação da queilite actínica:**

Para os estudos de correlação clínica-histopatológica os pacientes foram avaliados segundo a presença das alterações da mucosa labial fotoexposta, de acordo com roteiro descrito abaixo:

- Alterações de cor da lesão: branca ou branca com áreas intermediadas de vermelho.
- Alterações da superfície da lesão: exulcerada e/ou ulcerada ou não ulcerada.
- Aspecto da lesão, podendo ocorrer uma ou mais características simultaneamente e subdivididas em:
  - Atrófico: aspecto apergaminhado, sem brilho;
  - Descamativo: esfoliação espontânea, difusa ou localizada;

- Perda de definição do vermelhão do lábio: ausência parcial ou completa de delimitação entre a contigüidade da pele e o vermelhão do lábio inferior;
- Presença de fissura: solução de continuidade linear, superficial ou profunda disposta perpendicularmente ao maior eixo do lábio;
- Presença de edema / infiltração: aumento de volume e/ou consistência do lábio à palpação;
- Presença de crosta: concreção de coloração amarelada ou avermelhada;
- Presença de leucoplasia: área esbranquiçada, não removível mecanicamente, podendo ser bem delimitada ou apresentar limites imprecisos.

A partir da identificação das características clínicas acima citadas, utilizou-se o conceito de gravidade clínica das lesões, definidas em leve, moderada ou grave, segundo:

- Leve, equivalente à presença de até três alterações clínicas;
- Moderada, equivalente à presença de quatro a cinco alterações clínicas;
- Grave, equivalente à presença de pelo menos seis alterações clínicas das descritas acima.

##### **5. Critérios para o diagnóstico histopatológico da queilite actínica:**

Baseado em Markopoulos (2004)<sup>(37)</sup> e Abreu (2006)<sup>(38)</sup>, as alterações histopatológicas analisadas segundo a presença e a intensidade da alteração, para posterior correlação com os aspectos clínicos da QA, foram:

- Hiperqueratose,
- Paraqueratose/ortoqueratose,
- Hiperplasia da epiderme,
- Atrofia da epiderme,
- Ulceração,
- Displasia epitelial, a contar da camada imediatamente superior à camada basal,
- Número de mitoses, a contar da camada imediatamente superior à camada suprabasal,
- Número de células em apoptose, a contar da camada imediatamente superior à camada suprabasal,
- Elastose solar,
- Infiltrado inflamatório na derme,
- Vasodilatação.

Conforme a presença e intensidade dessas alterações, os achados histológicos foram classificadas segundo critério de gravidade de 0 a 3, sendo: (0) sem alteração, (1) alteração leve, (2) moderada, (3) grave. Foi considerado para análise todo o corte histológico presente na lâmina e analisadas de forma concomitante por três observadores.

## 6. Estudo imunoistoquímico:

Para a reação imunoistoquímica foram utilizados imunomarcadores das proteínas p53, p16, p21, survivina e i-NOS (**Tabela 1**) em cortes de 3µm. A peroxidase endógena foi bloqueada em solução de peróxido de hidrogênio a 3% por 10 minutos, sendo utilizado o CINTec Kit (Ref. 9511 - MTM Laboratories AG, Heidelberg, Germany) para o p16. Em seguida foi realizada a recuperação antigênica pelo calor, utilizando-se câmara de pressão (Pascal – DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA) onde as lâminas, submersas em solução de ácido cítrico 0,01mM pH 6.0 permaneceram por 15 minutos. A recuperação antigênica para o p16 foi realizada em tampão TRIS/EDTA, pH 9 (CINTec Kit Ref. 9511 - MTM Laboratories AG, Heidelberg, Germany), entre 95-99°C, em banho-maria por 10 minutos. Os cortes, então, receberam os anticorpos primários previamente diluídos, permanecendo incubados por 18 horas em câmara úmida a 4°C, com exceção do p16 (pronto para uso) que permaneceu incubado por 30 minutos. Logo após, os cortes foram incubados com anticorpos secundário e terciário por 30 minutos cada um, à temperatura ambiente (ADVANCE HRP Detection System - DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA e CINTec Kit Ref. 9511 - MTM Laboratories AG, Heidelberg, Germany). Como revelador, foi utilizado o cromógeno 3,3-diaminobenzidina (DAB) (DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA e CINTec Kit Ref. 9511 - MTM Laboratories AG, Heidelberg, Germany) e para contra coloração, hematoxilina de Harris. Os cortes foram lavados em água corrente por 5 minutos e desidratados em cadeia ascendente de etanol. Foi realizada a diafanização em xilol e montagem da lâmina em resina sintética. Para controle negativo foi omitido o anticorpo primário e para o controle positivo foram utilizados espécimes previamente estudados e de referência do laboratório do Departamento de Patologia da FMB - Unesp.

Após a imunomarcção, foram avaliadas todas as lâminas dos casos de QA e casos controle. A presença e expressão da imunomarcção foram definidas por método semiquantitativo, sob observação de todo o corte representativo da lâmina, em aumento de 200X, por três avaliadores de forma concomitante e sua avaliação dada pelo padrão predominante. A leitura da imunomarcção recebeu valores equivalentes à: valor 0 – ausência de imunomarcção ou imunomarcção  $\leq$  5% das células do corte examinado; valor 1 – presença de imunomarcção em até 25% das células; valor 2 – presença de imunomarcção de

26% a 50% das células; valor 3 - presença de imunomarcagem de 51% a 75% das células; e, valor 4 - presença de imunomarcagem > 75% das células. Foram consideradas como positivas todas as células tumorais com coloração castanha intranuclear e/ou citoplasmática, independente da intensidade da imunomarcagem<sup>(39)</sup>.

### 6.1. Análise estatística:

Foi utilizado o Software SAS for Windows versão 9.2 para análise dos dados. Para associação entre as variáveis clínicas e histopatológicas da QA foi utilizado o teste Exato de Fisher e coeficiente de Correlação de Spearman. Os mesmos testes foram utilizados para associação entre os imunomarcadores e as variáveis clínicas e histopatológicas. Para a comparação múltipla dos anticorpos nas camadas epiteliais e nos grupos foi utilizado o modelo linear generalizado assumindo distribuição Poisson e o teste para a diferença dos mínimos quadrados médios, assumindo  $p < 0,05$ .

## Resultados

### Estudo clínico e anatomopatológico

Foram estudados 31 fragmentos de QA e 29 fragmentos de mucosa oral normal. Os dados referentes aos registros completos dos mesmos estão apresentados no **apêndice 1**, segundo dados demográficos, clínicos e histopatológicos.

A média de idade dos pacientes foi de  $61,93 \pm 12,45$  anos (mínimo de 28 e máximo de 80 anos). Houve predominância do sexo masculino, sendo 25 homens (80,65%) e seis mulheres (19,35%).

Segundo o critério de gravidade clínica utilizado, 15 (48,39%) lesões foram classificadas como QA leve, nove (29,03%) como QA moderada e sete (22,58%) como QA grave. Não houve associação significativa entre a classificação clínica das queilites actínicas, segundo a gravidade, e o sexo dos pacientes ( $p = 0,5029$ ).

Em relação ao fototipo, foram observados dois (6,45%) pacientes de fototipo I, 14 (45,16%) pacientes de fototipo II, 14 (45,16%) pacientes de fototipo III e um (3,23%) paciente de fototipo IV. Não houve associação significativa entre a classificação clínica das queilites actínicas, segundo a gravidade, e o fototipo dos pacientes ( $p = 0,8502$ ).

As atividades profissionais exercidas pela absoluta maioria dos pacientes foram àquelas associadas à exposição solar, entre elas, lavrador, tratorista, pedreiro, carpinteiro e serviços gerais.

Do ponto de vista clínico, indivíduos com queilites actínicas de classificação mais grave associaram-se às lesões de cor branca e vermelha ( $p = 0,0129$ ) (**Figuras 1 e 2**) (**Tabela**

2), às lesões com edema/infiltração ( $p=0,0017$ ) (**Figura 3**) (**Tabela 3**) e às lesões ulceradas/exulceradas ( $p<0,001$ ) (**Figura 4**) (**Tabela 4**).

As demais características clínicas (aspecto atrófico, descamativo, perda de definição do vermelhão do lábio, presença de leucoplasia, fissura e crosta) não apresentaram associação estatisticamente significativa com a classificação clínica segundo a gravidade proposta (**Figuras 5 a 10**).

Não se detectou associação entre as características clínicas da QA segundo o critério de gravidade e a intensidade das alterações histopatológicas analisadas e o número de mitoses ( $p=0,0925$ ). Os achados histológicos estão ilustrados nas **figuras de 11 a 17**. No entanto, a presença de vasodilatação ( $p=0,0349$ ) correlacionou-se com QA mais grave (**Tabela 5**).

Segundo o grau de displasia, sete (22,58%) lesões foram classificadas como leves, 23 (74,19%) moderadas e uma (3,23%) grave. As alterações histopatológicas (hiperqueratose, ortoqueratose, paraqueratose, hiperplasia, atrofia, elastose solar, infiltrado inflamatório, vasodilatação, presença de úlcera e número de mitoses e apoptoses) não apresentaram associação estatisticamente significativa com o grau de displasia epitelial.

### **Estudo imunoistoquímico**

Algumas lâminas foram impossibilitadas de analisar por problemas técnicos. A frequência e porcentagem das células imunomarcadas na QA e mucosa normal estão dispostas de acordo com o escore de imunopositividade para cada anticorpo (**Tabela 6 e 7**).

A imunomarcção da p21 foi detectada de forma mais expressiva na camada parabasal da mucosa oral normal e da QA, mas foi quantificada, assim como a p53 na camada basal/parabasal e suprabasal. A imunexpressão da i-NOS foi quantificada em todo o fragmento da QA e mucosa oral normal. A survivina foi encontrada tanto no núcleo dos queratinócitos quanto no seu citoplasma e, portanto recebeu escores para ambas as imunomarcções em todos os grupos estudados.

Não foi observada associação entre os anticorpos (p53, p16, p21, survivina e i-NOS) expressos na QA e a classificação clínica segundo a gravidade proposta, bem como entre os anticorpos e o grau de displasia.

Em relação à associação entre os imunomarcadores e as alterações clínicas e histopatológicas, a expressão de i-NOS na QA correlacionou-se com ortoqueratose ( $p=0,0238$ ) e a expressão de survivina correlacionou-se com a presença clínica de exulceração ( $p=0,0421$ ).

Foi observada associação estatisticamente significativa para a expressão de p53 ( $p=0,0055$ ) (**Figuras 18-A e B**) e p21 ( $p<0,0001$ ) (**Figuras 19–A e B**) da camada suprabasal da QA em relação à camada suprabasal da mucosa normal. As expressões das mesmas proteínas na camada basal da QA e da mucosa normal foram significativas em relação à camada suprabasal do mesmo grupo ( $p<0,0001$ ).

Não houve expressão da p16 tanto na QA quanto na mucosa oral normal (score = 0). Foram encontradas apenas células isoladas e esparsas imunomarcadas pela p16, localizadas na camada basal do epitélio, as quais por vezes eram agrupadas em pequenas áreas focais (**Figuras 20–A e B**).

A expressão de i-NOS ( $p=0,0186$ ) (**Figuras 21–A e B**) e survivina citoplasmática ( $p=0,0039$ ) (**Figura 22-A e B**) na QA foram significativas em relação à mucosa normal (**Tabela 8 e 9**).

A expressão da p21 foi significativa em relação à p53 na camada basal da QA ( $p=0,0435$ ). As expressões de p53, p21 e survivina nuclear na camada basal da QA e mucosa normal apresentaram correlação estatisticamente significativa em relação à expressão de i-NOS do mesmo grupo ( $p<0,0001$ ). Também foram observadas expressões significativas de p53 e p21 na camada basal da QA e da mucosa normal e da i-NOS em relação à expressão citoplasmática e nuclear da survivina ( $p<0,05$ ) (**Tabela 8 e 9**).

Na mucosa normal, observamos expressões significativas de p53 na camada suprabasal, i-NOS e survivina nuclear e citoplasmática em relação à expressão de p21 na camada suprabasal ( $p<0,05$ ). Essa expressão significativa em relação à p21 também foi observada com a survivina nuclear e citoplasmática da QA ( $p<0,05$ ). Ainda, as expressões nuclear e citoplasmática de survivina na mucosa oral e survivina citoplasmática na QA foram significativas em relação à expressão de p53 ( $p<0,05$ ) (**Tabela 8 e 9**). Nas lesões pré-malignas não foi encontrada diferença significativa entre a expressão nuclear e citoplasmática.

## Discussão

Diversos estudos sobre lesões pré-malignas têm sido realizados objetivando definir os critérios histopatológicos dessas enfermidades, além de obter informações mais precisas sobre a evolução e o prognóstico dessas alterações. A proporção de casos que evoluirão para câncer labial a partir da QA não é conhecida, mas a associação das lesões pré-malignas com seu potencial de malignização é bem explorada e deve ser levada em consideração no prognóstico<sup>(40)</sup>. Os sinais iniciais da QA são sutis e o grau de alteração clínica não é rotineiramente correlacionado à intensidade do dano tecidual observado no exame

histopatológico, sendo este de extrema importância para o seu diagnóstico precoce e o tratamento adequado<sup>(41)</sup>.

Os principais fatores etiológicos relacionados ao desenvolvimento das lesões pré-malignas da boca são o tabaco, o álcool e a exposição solar no caso da lesão labial. Outras etiologias, como o envolvimento genético, a dieta e intempéries climáticas como o frio e o vento são também mencionadas<sup>(15, 16)</sup>. Embora a etiologia do câncer de boca seja multifatorial, a principal etiologia do carcinoma de lábio é, claramente, a radiação ultravioleta<sup>(42)</sup>. Conseqüentemente, o câncer de lábio bem como a QA devem ser estudadas separadamente das lesões intra-orais.

Diferentemente dos carcinomas intra-buciais, os localizados no lábio têm relação direta com a profissão e os hábitos do paciente, visto que trabalhadores de área rural ou urbana com fotoexposição crônica e pessoas com atividades de lazer expostas periodicamente ao sol são as que apresentam maior fator de risco<sup>(15, 43-46)</sup>. Em concordância com a literatura, nosso estudo mostrou que 96,77% dos indivíduos apresentaram fototipos baixos, ou seja, cor de pele clara (6,45% fototipo I, 45,16% fototipo II, 45,16% fototipo III e 3,23% fototipo IV), todos com história profissional de exposição solar crônica.

O sexo masculino predominou na série de casos estudada (80,6%) o que é concorde com o esperado. Embora tenha sido observado aumento da incidência no sexo feminino ao longo dos anos, os homens continuam sendo os mais acometidos tanto pelas lesões de QA quanto pelas de CEC de lábio<sup>(15, 41, 44, 46-49)</sup>. A diferença de incidência entre os sexos sugere divergências na duração da exposição à radiação solar e na interação entre vários fatores de risco relacionados à carcinogênese. Atividades profissionais menos expostas a fatores climáticos, número menor de fumantes e o uso de protetores labiais, inclusive presentes em alguns batons, são dados relevantes apresentados pelas mulheres que podem justificar essa diferença<sup>(15, 43, 49)</sup>.

A idade média dos pacientes com QA foi de 61,93±12,45 anos. O tempo necessário para as alterações induzidas pelo sol levar ao desenvolvimento do câncer do lábio varia aproximadamente de 20 a 30 anos, podendo ocorrer em menor tempo em alguns pacientes<sup>(41)</sup>, justificando sua incidência maior na população a partir 5ª década de vida.

Existe grande dificuldade de se correlacionar o aspecto clínico com o grau correspondente de alterações histológicas das lesões do lábio, o que contribui para subestimar a importância dessas lesões levando, portanto, ao diagnóstico tardio da QA e do CEC<sup>(50-53)</sup>. No presente trabalho, 48,4% dos pacientes avaliados apresentaram, no momento do exame



clínico, queilites consideradas leves e apenas 22,6% características clínicas muito evidentes ou exacerbadas.

As lesões clinicamente descritas como de cor branca e vermelha bem como a presença de úlcera/exulceração e edema/infiltração foram mais evidentes e estatisticamente associadas aos indivíduos com QA de classificação clínica mais grave. Portanto, com base no presente trabalho, o perfil de gravidade clínica da queilite reúne os aspectos acima citados.

Em relação às características histológicas, a única associação estatística observada foi entre gravidade clínica e intensidade da vasodilatação. Ao contrário do esperado não foi observado associação entre o grau de displasia e a graduação clínica proposta. Pode ter contribuído para essa aparente discrepância o pequeno número de casos de QA de caráter grave estudadas, apenas sete casos (22,6%), ou seja, a displasia epitelial de intensidade moderada a grave esteve presente em quase todos os tipos clínicos de QA, independente da aparência da gravidade clínica observada. Seria esperado que os casos mais graves de queilite concentrassem os casos de displasia epitelial mais intensa. Esse achado reveste-se de especial importância, pois demonstra que lesões com aparência clínica de menor gravidade pode ocultar compromisso histológico importante e em vias de plena malignização. Ainda, O mesmo pode-se dizer da intensidade da elastose solar, presente de forma moderada a grave em 87,0% dos casos, mas com distribuição que não se associou especificamente aos casos mais graves clinicamente. Essas duas variáveis reúnem, em teoria, particular interesse, pois traduzem a intensidade da fotoagressão.

Estudo de revisão das alterações histopatológicas de 152 casos de QA realizada por Kaugars et al. (1999)<sup>(41)</sup> demonstrou que existem cinco fatores de significância em relação à gravidade das alterações epiteliais, quais sejam: espessura da camada de queratina, acantose, degeneração basofílica e inflamação do colágeno e presença de infiltrado perivascular. A frequência e intensidade destas alterações teriam relação direta com o grau de displasia epitelial, a qual esteve presente em 52% de forma leve, 23% moderada, 12% grave, 11,2% associada a carcinoma *in situ* e 1,3% a carcinomas invasivos.

Mais próximo ao observado no presente trabalho foram os achados de Cavalcante et al. (2008)<sup>(54)</sup> que avaliaram 29 pacientes com QA. Naquele estudo, a presença de displasia leve apresentou incidência de 10,34%, enquanto que os casos de displasia moderada e grave obtiveram, respectivamente, 27,59% e 62,07% de frequência, somando, portanto, 89,7% de displasia moderada a grave; superiores aos 77,5% aqui observados. Tal diferença pode ser consequente à composição da amostra com predominância de casos clínicos mais graves no referido trabalho.

No trabalho de Markopoulos et al (2004)<sup>(37)</sup> a displasia leve foi encontrada em 27,7% dos casos e as alterações que variaram de displasia moderada a carcinoma espinocelular em 72,3% dos casos, muito próximo ao encontrado no presente relato.

Como observado nos diferentes estudos e ainda que não tenha se correlacionado com os casos clínicos considerados mais graves, a intensidade da displasia epitelial sinaliza para a necessidade de acompanhamento clínico contínuo desses pacientes, aliada à educação e conscientização da importância de protegerem-se do sol. Pode-se também inferir que apenas a avaliação clínica possa não fornecer todos os elementos necessários à interpretação do caso e de seu prognóstico, ou seja, faz-se necessária a biópsia e a correlação anátomo-clínica para melhor condução dos pacientes.

A displasia epitelial oral tem interpretações subjetivas devido a diferentes observações histológicas<sup>(22)</sup>. Portanto, achados histopatológicos de displasia não são suficientes para prever a progressão de malignização, uma vez que a biópsia não representa toda a lesão, assim como a análise histopatológica depende da avaliação da lesão como um todo<sup>(55)</sup>. Assim, estudos com biomarcadores tornam-se relevantes e necessários para avaliar com maior objetividade o comportamento das lesões potencialmente malignas, como a QA<sup>(12)</sup>.

A expressão da proteína p53 e mutação no gene *TP53* têm sido observadas nas displasias epiteliais<sup>(56, 57)</sup> e sua detecção vem sendo demonstrada como bom marcador imunoistoquímico em eventos iniciais da carcinogênese da região de cabeça e pescoço e até mesmo em locais onde não se identificam alterações histopatológicas<sup>(19, 58-60)</sup>. Estudos mostraram expressão da p53 em epitélios com significativa distância do sítio primário do tumor e em lesões pré-malignas<sup>(19, 58-60)</sup>. O valor prognóstico da imunoexpressão da p53 também tem sido descrito em margens cirúrgicas livres de tumor, sendo correlacionada com a recorrência das neoplasias<sup>(60, 61)</sup>.

De acordo com Cruz et al. (1998, 2000)<sup>(19, 60)</sup>, a detecção da p53 em tecidos bucais normais restringe-se à camada basal e nas outras camadas do epitélio se expressa em baixas concentrações ou está ausente. Sua expressão intensa nas células suprabasais sugere sua alteração e possível malignização do tecido.

Estudos de imunoexpressão da p53 em tecidos normais expostos a radiação UV tem sido controversos<sup>(62)</sup>. Nossos resultados mostraram que para as amostras do grupo controle, a expressão da p53 nas células da camada basal foi maior que na suprabasal, o que pode ser explicado pela alta sensibilidade da técnica. Resultados semelhantes foram encontrados por Fabbrocini et al. (2000)<sup>(56)</sup> e Khan et al. (2009)<sup>(63)</sup>, enquanto Crosthwaite et al. (1996)<sup>(23)</sup> não encontraram expressão da p53 em lábio normal.

Nossos resultados mostraram expressão aumentada de p53 na camada suprabasal da QA em relação à mucosa oral normal, resultados concordantes com a literatura e que evidenciam o papel desta proteína nos eventos iniciais da carcinogênese labial, sugerindo o alto risco de transformação maligna das lesões avaliadas, a despeito da associação com gravidade clínica observada<sup>(24)</sup>. A imunomarcagem da p53 na QA por vezes apresentou áreas focais mais fortemente coradas, indicando, provavelmente, processo de malignização nessas regiões, apesar de não ter sido constatada associação estatisticamente significativa entre a imunoe expressão da proteína nas camadas basal e suprabasal e o grau de displasia das QA.

A p21 bloqueia a progressão do ciclo celular e é ativada em resposta a baixas doses de UVB<sup>(64-66)</sup>. Martínez et al. (2008)<sup>(29)</sup> não identificaram expressão significativa da p21 entre QA e mucosa normal, resultados não compatíveis com os observados neste trabalho, que encontrou aumento da imunoe expressão da p21 na camada suprabasal da QA em relação à mucosa normal.

A transcrição da proteína p21 é controlada por mecanismos p53-dependentes e independentes, ou de ambas as formas, pelo oncogene *Ras* ativado<sup>(67)</sup>. Cabe ressaltar, no entanto, que o gene *TP21* normalmente não apresenta mutações nas neoplasias humanas<sup>(68)</sup>. A expressão aumentada da p21 em associação ao aumento da p53 tem sido relatada em peles expostas aos raios ultravioletas<sup>(27, 28)</sup>. Martínez et al. (2008)<sup>(29)</sup> ainda observaram associação entre expressão de p21 e p53 na mucosa normal, mas essa associação foi perdida na QA. Apesar de encontrarem a p53 aumentada na QA quatro vezes em relação ao lábio normal, não houve aumento da p21, dados discordantes dos encontrados em nossos resultados que identificaram aumento tanto da p53 quanto da p21 na QA em relação à mucosa oral normal.

A inativação do gene *TP16* é um evento frequentemente encontrado em muitos tipos de neoplasias malignas e sua identificação imunistoquímica tem sido utilizada para a avaliação de fatores preditivos e prognósticos do CEC de boca<sup>(69-72)</sup>. Em nosso estudo, foi observada ausência de imunoe expressão da p16 em todos os grupos estudados. Esse relato já havia sido constatado por outros autores que utilizaram o mesmo anticorpo monoclonal, relatando que esse anticorpo não pode detectar a p16 em epitélios estratificados pavimentosos normais<sup>(73, 74)</sup>. Alguns estudos sobre lesões pré malignas que não puderam diferenciar lesões displásicas de não displásicas<sup>(74, 75)</sup> reforçam nossos resultados, onde constatamos que a p16 não se mostrou bom marcador para QA e para a transformação maligna. Contrariamente, Nakahara et al. (2000)<sup>(76)</sup> observaram imunoe expressão da p16 em mucosa oral normal e leucoplasias. Nosso controle positivo imunomarcado nos garante a exatidão do método. Além disso, foram observadas poucas células na camada basal da QA imunomarcadas pela p16, as

quais provavelmente correspondem a melanócitos, que além de nos servir como controle positivo interno da qualidade de coloração, se caracterizam como células dendríticas sabidamente coradas por essa proteína<sup>(77)</sup>.

O óxido nítrico parece exercer ação tanto promotora quanto inibidora na carcinogênese, sendo associado à angiogênese e progressão tumoral nos tumores humanos<sup>(78)</sup>. A mutação no *TP53* pode resultar na ativação da i-NOS. Além disso, a exposição prolongada ao óxido nítrico induz o acúmulo da p53, que tentaria proteger as células dos danos oxidativos pela indução de apoptose<sup>(79)</sup>, o que explicaria a correlação entre a expressão de p53 e i-NOS encontrados nesse estudo. Alguns trabalhos mostraram a expressão aumentada de i-NOS nas displasias orais e sua correlação com a gravidade dessas lesões<sup>(80, 81)</sup>. Contrariamente, nossos resultados não mostraram correlação entre as lesões pré-malignas e o grau de displasia epitelial. Foi observada expressão aumentada de i-NOS na QA em relação à mucosa normal, evidenciando esta proteína como importante marcador de lesões potencialmente malignas. Adicionalmente, a i-NOS se correlacionou com a expressão de survivina nuclear e citoplasmática na QA.

A survivina é uma proteína que inibe a apoptose e regula a divisão celular, sendo indetectável na maioria dos tecidos normais adultos, mas podendo ser observada tanto no núcleo quanto no citoplasma das células neoplásicas. Sugere-se que a survivina nuclear atue no controle a divisão celular, enquanto que a survivina citoplasmática seja citoprotetora<sup>(82)</sup>. A expressão de survivina tem sido observada em diversas lesões pré-malignas ou estágios iniciais do câncer, incluindo pólipo colônico, adenoma pancreático e Doença de Bowen<sup>(83, 84)</sup>.

A survivina pode ser controlada negativamente pela p53 através de mecanismos envolvendo inibidores da apoptose, assim, a alta frequência de mutações do gene *TP53* nos cânceres humanos poderia explicar a expressão desregulada da survivina em diversos tipos de tumores e sua ausência nos tecidos vizinhos normais<sup>(30, 85)</sup>. Em nossos estudos foi observada correlação entre a expressão de p53 e survivina citoplasmática e nuclear, tanto nas lesões pré-malignas quanto na mucosa oral normal.

Em estudos de Khan et al. (2000)<sup>(62)</sup> a expressão survivina foi detectada em 44% das lesões pré-malignas, não sendo encontrada nos tecidos normais. Os autores também detectaram que 18% das lesões pré-malignas co-expressaram p53 e survivina, apesar de não ter sido encontrada correlação significativa entre as duas proteínas. Os autores não identificaram correlação entre survivina e p53 com os parâmetros clínico-patológicos e sugeriram que a p53 possa não ser a principal contribuinte na desregulação da survivina no câncer de boca.

Nossos resultados apontaram correlação entre a expressão de survivina e presença clínica de úlcera/exulceração e apesar de não ter sido associada à gravidade clínica proposta e ao grau de displasia da QA, sua expressão citoplasmática aumentada em relação à mucosa normal indica risco de transformação neoplásica nessas lesões. Nossos estudos estão de acordo com Lo Muzio et al. (2003)<sup>(86)</sup> que realizaram estudo longitudinal e identificaram a imunexpressão da survivina em 33% de lesões pré-malignas que não sofreram progressão tumoral, 94% de lesões pré-malignas envolvidas com CEC de boca e 100% dos CEC que progrediram dessas lesões pré-malignas, havendo correlação significativa entre os grupos, mas não encontrando associação significativa entre a expressão de survivina e o grau de displasia das lesões pré-malignas.

Jane et al. (2006)<sup>(87)</sup> encontraram expressão de survivina na maioria das leucoplasias estudadas e não a observaram na mucosa oral normal, relatando que a expressão da proteína poderia ser resultado da transformação displásica no epitélio oral. Contrariamente, nossos resultados detectaram a imunexpressão da survivina nuclear e citoplasmática em todos os grupos estudados, inclusive na mucosa oral normal. Importante ressaltar que não houve diferença estatística entre a survivina citoplasmática e nuclear no presente estudo.

## **Conclusão**

Os fototipos de I-III constituíram 97,2% da amostra e confirmaram a suscetibilidade da pele clara à ocorrência da queilite actínica. O sexo masculino e profissões relacionadas à exposição solar confirmaram os dados observados na literatura. Lesões de padrão eritematoso, com presença de ulceração/exulceração, edema e infiltração foram marcadores clínicos de gravidade. A presença de vasodilatação foi o único achado histológico que se correlacionou com a gravidade clínica. Displasia epitelial e elastose solar estiveram presentes em praticamente todos os casos, independente da gravidade clínica.

A expressão aumentada de p53, p21, i-NOS e survivina citoplasmática na QA evidenciam o papel destas proteínas nos eventos iniciais da carcinogênese labial, sugerindo o alto risco de transformação maligna das lesões avaliadas, a despeito da associação com gravidade clínica e com o grau de displasia epitelial. Estudos que mostrem o mecanismo de ação destas proteínas bem como dos seus respectivos genes na carcinogênese labial são necessários para complementar nossos resultados.

## Referências

1. Thuler LCS, Rebelo MS. Epidemiologia do Câncer. In: Kowalski LP, Dib LL, Ikeda MK, Adde C, editors. Prevenção, Diagnóstico e Tratamento do Câncer Bucal. 1ª ed. São Paulo: Frontis Editorial; 1999. p. 1-9.
2. Cimardi ACBS, Fernandes APS. Câncer de boca: conhecimento e prática de cirurgiões-dentistas do Estado de Santa Catarina. RFO UPF. 2009;14(2):99-104.
3. Zitsch RP 3rd, Lee BW, Smith RB. Cervical lymph node metastases and squamous cell carcinoma of the lip. Head Neck. 1999 Aug;21(5):447-53.
4. Hecht SS. Tobacco carcinogens, their biomarkers and tobacco-induced cancer. Nat Rev Cancer. 2003 Oct;3(10):733-44.
5. Regezi JA, Sciubba JJ. Patologia Bucal e Correlações Clinicopatológicas. 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.
6. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. Patologia Oral & Maxilofacial. 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanara Koogan; 2004.
7. Bouquot JE. Oral leukoplakia and erythroplakia: a review and update. Pract Periodontics Aesthet Dent. 1994 Aug;6(6):9-17; quiz 9.
8. Brennan M, Migliorati CA, Lockhart PB, Wray D, Al-Hashimi I, Axell T, et al. Management of oral epithelial dysplasia: a review. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2007 Mar;103 Suppl:S19 e1-2.
9. Warnakulasuriya S, Johnson NW, van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. J Oral Pathol Med. 2007 Nov;36(10):575-80.
10. Cooke BE, Tapper-Jones L. Recognition of oral cancer. Causes of delay. Br Dent J. 1977 Feb 1;142(3):96-8.

11. Lee JJ, Hong WK, Hittelman WN, Mao L, Lotan R, Shin DM, et al. Predicting cancer development in oral leukoplakia: ten years of translational research. *Clin Cancer Res*. 2000 May;6(5):1702-10.
12. Warnakulasuriya S. Lack of molecular markers to predict malignant potential of oral precancer. *J Pathol*. 2000 Mar;190(4):407-9.
13. Kurokawa H, Yamashita Y, Takeda S, Tomoyose T, Funaki K, Takano H, et al. Relationship between epithelial dysplasia and the development of squamous cell carcinoma in oral leukoplakia. *Asian J Oral Maxillofac Surg*. 2002;14:197-201.
14. Douglass CW, Gammon MD. Reassessing the epidemiology of lip cancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1984 Jun;57(6):631-42.
15. de Visscher JG, van der Waal I. Etiology of cancer of the lip. A review. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1998 Jun;27(3):199-203.
16. Moore S, Johnson N, Pierce A, Wilson D. The epidemiology of lip cancer: a review of global incidence and aetiology. *Oral Dis*. 1999 Jul;5(3):185-95.
17. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res*. 1994 Sep 15;54(18):4855-78.
18. Vera-Sempere FJ, Navarro-Hervas M. P53 suppressor gene overexpression in oral cancer. *Med Oral*. 1997 Nov-Dec;2(5):283-96.
19. Cruz IB, Snijders PJ, Meijer CJ, Braakhuis BJ, Snow GB, Walboomers JM, et al. p53 expression above the basal cell layer in oral mucosa is an early event of malignant transformation and has predictive value for developing oral squamous cell carcinoma. *J Pathol*. 1998 Apr;184(4):360-8.
20. Sulkowska M, Famulski W, Chyczewski L, Sulkowski S. Evaluation of p53 and bcl-2 oncoprotein expression in precancerous lesions of the oral cavity. *Neoplasma*. 2001;48(2):94-8.

21. Okazaki Y, Tanaka Y, Tonogi M, Yamane G. Investigation of environmental factors for diagnosing malignant potential in oral epithelial dysplasia. *Oral Oncol.* 2002 Sep;38(6):562-73.
22. Kurokawa H, Matsumoto S, Murata T, Yamashita Y, Tomoyose T, Zhang M, et al. Immunohistochemical study of syndecan-1 down-regulation and the expression of p53 protein or Ki-67 antigen in oral leukoplakia with or without epithelial dysplasia. *J Oral Pathol Med.* 2003 Oct;32(9):513-21.
23. Crosthwaite N, Teale D, Franklin C, Foster GA, Stringer BM. p53 protein expression in malignant, pre-malignant and non-malignant lesions of the lip. *J Clin Pathol.* 1996 Aug;49(8):648-53.
24. Martinez A, Brethauer U, Rojas IG, Spencer M, Mucientes F, Borlando J, et al. Expression of apoptotic and cell proliferation regulatory proteins in actinic cheilitis. *J Oral Pathol Med.* 2005 May;34(5):257-62.
25. Neto Pimentel DR, Michalany N, Alchorne M, Abreu M, Borra RC, Weckx L. Actinic cheilitis: histopathology and p53. *J Cutan Pathol.* 2006 Aug;33(8):539-44.
26. Caly DN, Cheter EZ, Rapoport A, Torloni H, Nonogaki S. P53 expression in squamous cell carcinoma of the lip. *Rev Col Bras Cir.* 2007;34(2):92-7.
27. Horta MC, de Assis LA, de Souza AF, de Araujo VC, Gomez RS, Aguiar MC. p53 and p21WAF1/CIP1 overexpression at the invasive front of lower lip squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2007 Feb;36(2):88-92.
28. Ponten F, Berne B, Ren ZP, Nister M, Ponten J. Ultraviolet light induces expression of p53 and p21 in human skin: effect of sunscreen and constitutive p21 expression in skin appendages. *J Invest Dermatol.* 1995 Sep;105(3):402-6.
29. Martinez A, Brethauer U, Borlando J, Spencer ML, Rojas IG. Epithelial expression of p53, mdm-2 and p21 in normal lip and actinic cheilitis. *Oral Oncol.* 2008 Sep;44(9):878-83.
30. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med.* 1997 Aug;3(8):917-21.



31. Yamamoto T, Tanigawa N. The role of survivin as a new target of diagnosis and treatment in human cancer. *Med Electron Microsc.* 2001 Dec;34(4):207-12.
32. Bredt DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Jan;87(2):682-5.
33. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J.* 1994 Mar 1;298 ( Pt 2):249-58.
34. Rosbe KW, Prazma J, Petrusz P, Mims W, Ball SS, Weissler MC. Immunohistochemical characterization of nitric oxide synthase activity in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1995 Nov;113(5):541-9.
35. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. *Falando Sobre Câncer da Boca.* Rio de Janeiro: INCA; 2002.
36. Sampaio SAP, Rivitti EA. *Dermatologia Básica.* 3 ed. São Paulo: Editora Artes Médicas; 2008.
37. Markopoulos A, Albanidou-Farmaki E, Kayavis I. Actinic cheilitis: clinical and pathologic characteristics in 65 cases. *Oral Dis.* 2004 Jul;10(4):212-6.
38. Abreu MA, Silva OM, Neto Pimentel DR, Hirata CH, Weckx LL, Alchorne MM, et al. Actinic cheilitis adjacent to squamous carcinoma of the lips as an indicator of prognosis. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2006 Nov-Dec;72(6):767-71.
39. Nylander K, Dabelsteen E, Hall PA. The p53 molecule and its prognostic role in squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Oral Pathol Med.* 2000 Oct;29(9):413-25.
40. Awde JD, Kogon SL, Morin RJ. Lip cancer: a review. *J Can Dent Assoc.* 1996 Aug;62(8):634-6.
41. Kaugars GE, Pillion T, Svirsky JA, Page DG, Burns JC, Abbey LM. Actinic cheilitis: a review of 152 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1999 Aug;88(2):181-6.
42. Anderson DL. Cause and prevention of lip cancer. *J Can Dent Assoc (Tor).* 1971 Apr;37(4):138-42.

43. LaRiviere W, Pickett AB. Clinical criteria in diagnosis of early squamous cell carcinoma of the lower lip. *J Am Dent Assoc.* 1979 Dec;99(6):972-7.
44. Chen J, Katz RV, Krutchkoff DJ, Eisenberg E. Lip cancer. Incidence trends in Connecticut, 1935-1985. *Cancer.* 1992 Oct 15;70(8):2025-30.
45. Main JH, Pavone M. Actinic cheilitis and carcinoma of the lip. *J Can Dent Assoc.* 1994 Feb;60(2):113-6.
46. dos Santos LR, Cernea CR, Kowalski LP, Carneiro PC, Soto MN, Nishio S, et al. Squamous-cell carcinoma of the lower lip: a retrospective study of 58 patients. *Sao Paulo Med J.* 1996 Mar-Apr;114(2):1117-26.
47. Lindqvist C, Teppo L. Epidemiological evaluation of sunlight as a risk factor of lip cancer. *Br J Cancer.* 1978 Jun;37(6):983-9.
48. Veness MJ, Ong C, Cakir B, Morgan G. Squamous cell carcinoma of the lip. Patterns of relapse and outcome: Reporting the Westmead Hospital experience, 1980-1997. *Australas Radiol.* 2001 May;45(2):195-9.
49. Ochsenius G, Ormeno A, Godoy L, Rojas R. [A retrospective study of 232 cases of lip cancer and pre cancer in Chilean patients. Clinical-histological correlation]. *Rev Med Chil.* 2003 Jan;131(1):60-6.
50. Waldron CA, Shafer WG. Leukoplakia revisited. A clinicopathologic study 3256 oral leukoplakias. *Cancer.* 1975 Oct;36(4):1386-92.
51. Cataldo E, Doku HC. Solar cheilitis. *J Dermatol Surg Oncol.* 1981 Dec;7(12):989-95.
52. Picascia DD, Robinson JK. Actinic cheilitis: a review of the etiology, differential diagnosis, and treatment. *J Am Acad Dermatol.* 1987 Aug;17(2 Pt 1):255-64.
53. Menta Simonsen Nico M, Rivitti EA, Lourenco SV. Actinic cheilitis: histologic study of the entire vermilion and comparison with previous biopsy. *J Cutan Pathol.* 2007 Apr;34(4):309-14.
54. Cavalcante AS, Anbinder AL, Carvalho YR. Actinic cheilitis: clinical and histological features. *J Oral Maxillofac Surg.* 2008 Mar;66(3):498-503.

55. van Houten VM, Leemans CR, Kummer JA, Dijkstra J, Kuik DJ, van den Brekel MW, et al. Molecular diagnosis of surgical margins and local recurrence in head and neck cancer patients: a prospective study. *Clin Cancer Res.* 2004 Jun 1;10(11):3614-20.
56. Shin DM, Kim J, Ro JY, Hittelman J, Roth JA, Hong WK, et al. Activation of p53 gene expression in premalignant lesions during head and neck tumorigenesis. *Cancer Res.* 1994 Jan 15;54(2):321-6.
57. Shahnava SA, Regezi JA, Bradley G, Dube ID, Jordan RC. p53 gene mutations in sequential oral epithelial dysplasias and squamous cell carcinomas. *J Pathol.* 2000 Mar;190(4):417-22.
58. Nees M, Homann N, Discher H, Andl T, Enders C, Herold-Mende C, et al. Expression of mutated p53 occurs in tumor-distant epithelia of head and neck cancer patients: a possible molecular basis for the development of multiple tumors. *Cancer Res.* 1993 Sep 15;53(18):4189-96.
59. Raybaud-Diogene H, Tetu B, Morency R, Fortin A, Monteil RA. p53 overexpression in head and neck squamous cell carcinoma: review of the literature. *Eur J Cancer B Oral Oncol.* 1996 May;32B(3):143-9.
60. Cruz IB, Meijer CJ, Snijders PJ, Snow GB, Walboomers JM, van Der Waal I. p53 immunoexpression in non-malignant oral mucosa adjacent to oral squamous cell carcinoma: potential consequences for clinical management. *J Pathol.* 2000 Jun;191(2):132-7.
61. Brennan JA, Boyle JO, Koch WM, Goodman SN, Hruban RH, Eby YJ, et al. Association between cigarette smoking and mutation of the p53 gene in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med.* 1995 Mar 16;332(11):712-7.
62. Khan Z, Tiwari RP, Mulherkar R, Sah NK, Prasad GB, Shrivastava BR, et al. Detection of survivin and p53 in human oral cancer: correlation with clinicopathologic findings. *Head Neck.* 2009 Aug;31(8):1039-48.
63. Fabbrocini G, Russo N, Pagliuca MC, Delfino M, Staibano S, Molea G, et al. p53, cyclin-D1, PCNA, AgNOR expression in squamous cell cancer of the lip: a multicenter study. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2000 Aug;16(4):172-7.

64. el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell*. 1993 Nov 19;75(4):817-25.
65. Yanamoto S, Kawasaki G, Yoshitomi I, Mizuno A. p53, mdm2, and p21 expression in oral squamous cell carcinomas: relationship with clinicopathologic factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002 Nov;94(5):593-600.
66. Al-Mohanna MA, Al-Khalaf HH, Al-Yousef N, Aboussekhra A. The p16INK4a tumor suppressor controls p21WAF1 induction in response to ultraviolet light. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(1):223-33.
67. Gartel AL, Tyner AL. Transcriptional regulation of the p21((WAF1/CIP1)) gene. *Exp Cell Res*. 1999 Feb 1;246(2):280-9.
68. Shiohara M, el-Deiry WS, Wada M, Nakamaki T, Takeuchi S, Yang R, et al. Absence of WAF1 mutations in a variety of human malignancies. *Blood*. 1994 Dec 1;84(11):3781-4.
69. Pande P, Mathur M, Shukla NK, Ralhan R. pRb and p16 protein alterations in human oral tumorigenesis. *Oral Oncol*. 1998 Sep;34(5):396-403.
70. Lin SC, Chang KW, Chang CS, Liu TY, Tzeng YS, Yang FS, et al. Alterations of p16/MTS1 gene in oral squamous cell carcinomas from Taiwanese. *J Oral Pathol Med*. 2000 Apr;29(4):159-66.
71. Nakahara Y, Shintani S, Mihara M, Ueyama Y, Matsumura T. High frequency of homozygous deletion and methylation of p16(INK4A) gene in oral squamous cell carcinomas. *Cancer Lett*. 2001 Feb 26;163(2):221-8.
72. Tsai CH, Yang CC, Chou LS, Chou MY. The correlation between alteration of p16 gene and clinical status in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2001 Oct;30(9):527-31.
73. Eleuterio J, Jr., Giraldo PC, Goncalves AK, Cavalcante DI, de Almeida Ferreira FV, Mesquita SM, et al. Prognostic markers of high-grade squamous intraepithelial lesions: the role of p16INK4a and high-risk human papillomavirus. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2007;86(1):94-8.

74. Buajeeb W, Poomsawat S, Punyasingsh J, Sanguansin S. Expression of p16 in oral cancer and premalignant lesions. *J Oral Pathol Med.* 2009 Jan;38(1):104-8.
75. Bradley KT, Budnick SD, Logani S. Immunohistochemical detection of p16INK4a in dysplastic lesions of the oral cavity. *Mod Pathol.* 2006 Oct;19(10):1310-6.
76. Nakahara Y, Shintani S, Mihara M, Kiyota A, Ueyama Y, Matsumura T. Alterations of Rb, p16(INK4A) and cyclin D1 in the tumorigenesis of oral squamous cell carcinomas. *Cancer Lett.* 2000 Nov 10;160(1):3-8.
77. Zhang H, Rosdahl I. Deletion in p16INK4a and loss of p16 expression in human skin primary and metastatic melanoma cells. *Int J Oncol.* 2004 Feb;24(2):331-5.
78. Thomsen LL, Miles DW. Role of nitric oxide in tumour progression: lessons from human tumours. *Cancer Metastasis Rev.* 1998 Mar;17(1):107-18.
79. Ho YS, Wang YJ, Lin JK. Induction of p53 and p21/WAF1/CIP1 expression by nitric oxide and their association with apoptosis in human cancer cells. *Mol Carcinog.* 1996 May;16(1):20-31.
80. Brennan PA, Palacios-Callender M, Zaki GA, Spedding AV, Langdon JD. Does type II nitric oxide synthase expression correlate with cellular proliferation in oral squamous cell carcinoma and dysplasia? *Head Neck.* 2001 Mar;23(3):217-22.
81. Brennan PA, Umar T, Wilson AW, Mellor TK. Expression of type 2 nitric oxide synthase and vascular endothelial growth factor in oral dysplasia. *J Oral Maxillofac Surg.* 2002 Dec;60(12):1455-60.
82. Stauber RH, Mann W, Knauer SK. Nuclear and cytoplasmic survivin: molecular mechanism, prognostic, and therapeutic potential. *Cancer Res.* 2007 Jul 1;67(13):5999-6002.
83. Gianani R, Jarboe E, Orlicky D, Frost M, Bobak J, Lehner R, et al. Expression of survivin in normal, hyperplastic, and neoplastic colonic mucosa. *Hum Pathol.* 2001 Jan;32(1):119-25.
84. Satoh K, Kaneko K, Hirota M, Masamune A, Satoh A, Shimosegawa T. Expression of survivin is correlated with cancer cell apoptosis and is involved in the development of human pancreatic duct cell tumors. *Cancer.* 2001 Jul 15;92(2):271-8.

85. Mirza A, McGuirk M, Hockenberry TN, Wu Q, Ashar H, Black S, et al. Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway. *Oncogene*. 2002 Apr 18;21(17):2613-22.
86. Lo Muzio L, Pannone G, Leonardi R, Staibano S, Mignogna MD, De Rosa G, et al. Survivin, a potential early predictor of tumor progression in the oral mucosa. *J Dent Res*. 2003 Nov;82(11):923-8.
87. Jane C, Nerurkar AV, Shirsat NV, Deshpande RB, Amrapurkar AD, Karjodkar FR. Increased survivin expression in high-grade oral squamous cell carcinoma: a study in Indian tobacco chewers. *J Oral Pathol Med*. 2006 Nov;35(10):595-601.

**Tabela 1: Anticorpos primários utilizados na reação imunoistoquímica dos casos de queilite actínica e controles e suas especificações.**

<b>Anticorpo</b>	<b>Clone</b>	<b>Fabricante</b>
anti-p53	Monoclonal clone DO-7	DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA
anti-p21	Monoclonal clone SX118	DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA
anti-p16	Monoclonal CINtek Histology Kit Clone E6H4	MTM Laboratories AG, Heidelberg, Germany
anti-survivina	Policlonal	Thermo Fisher Scientific -Lab Vision – NeoMarkers, Fremont, CA, USA
anti-iNOS	Policlonal de Coelho	Thermo Fisher Scientific -Lab Vision - NeoMarkers, Fremont, CA, USA



**Figura 1.** Lábio com queilite actínica e lesão de cor branca.

**Figura 2.** Lábio com queilite actínica e lesão de característica branca com áreas interpostas de vermelho.

**Figura 3** – Lábio com queilite actínica e presença clínica de edema / infiltração.

**Figura 4** – Lábio com queilite actínica e presença clínica de úlcera.



**Tabela 2. Correlação entre a classificação clínica segundo a gravidade da queilite actínica e a cor da lesão dos pacientes ao diagnóstico.**

	Cor da lesão		Total
	Lesão branca	Lesão branca e vermelha	
Queilite actínica leve	8 (25,81%)	7 (22,58%)	15 (48,39%)
Queilite actínica moderada	1 (3,23%)	8 (25,81%)	9 (29,03%)
Queilite actínica grave	0 (0,00%)	7 (22,58%)	7 (22,58%)
<b>Total</b>	9 (29,03%)	22 (70,97%)	31 (100,00%)

$p=0,0129$

**Tabela 3. Correlação entre a classificação clínica segundo a gravidade da queilite actínica e a presença de edema/infiltração nos pacientes ao diagnóstico.**

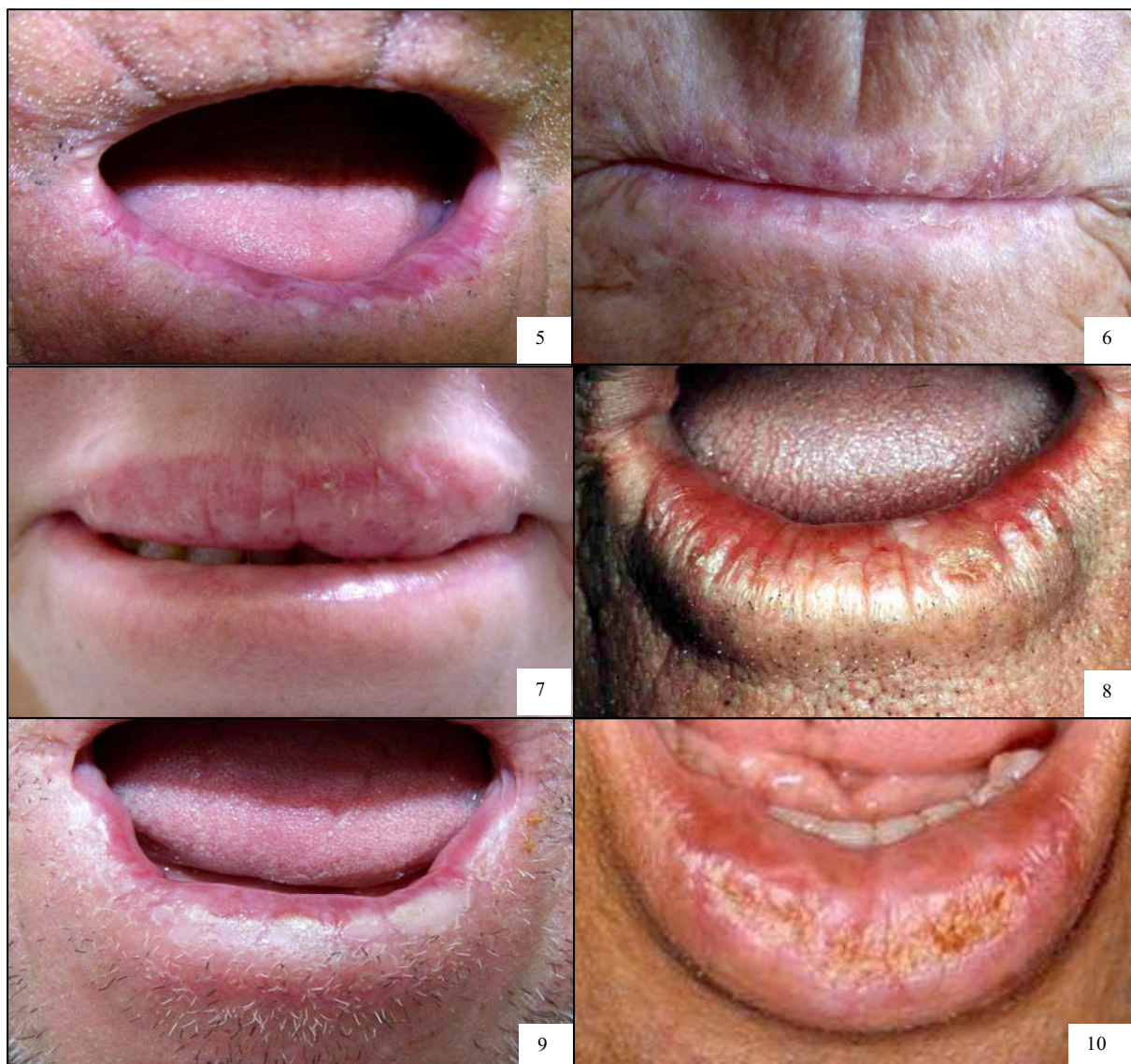
	Presença de	Ausência de	Total
	edema/infiltração	edema/infiltração	
Queilite actínica leve	4 (12,90%)	11 (35,48%)	15 (48,39%)
Queilite actínica moderada	7 (22,58%)	2 (6,45%)	9 (29,03%)
Queilite actínica grave	7 (22,58%)	0 (0,00%)	7 (22,58%)
<b>Total</b>	18 (58,06%)	13 (41,94%)	31 (100,00%)

$p = 0,0017$

**Tabela 4. Correlação entre a classificação clínica segundo a gravidade da queilite actínica e a presença de úlcera/exulceração nos pacientes ao diagnóstico.**

	<b>Presença de úlcera/exulceração</b>	<b>Ausência de úlcera/exulceração</b>	<b>Total</b>
<b>Queilite actínica leve</b>	0 (0%)	15 (48,39%)	15 (48,39%)
<b>Queilite actínica moderada</b>	1 (3,23%)	8 (25,81%)	9 (29,03%)
<b>Queilite actínica grave</b>	6 (19,35%)	1 (3,23%)	7 (22,58%)
<b>Total</b>	7 (22,58%)	24 (77,42%)	31 (100,00%)

*p*<0,0001



**Figura 5** – Lábio com queilite actínica e presença de aspecto clínico atrófico.

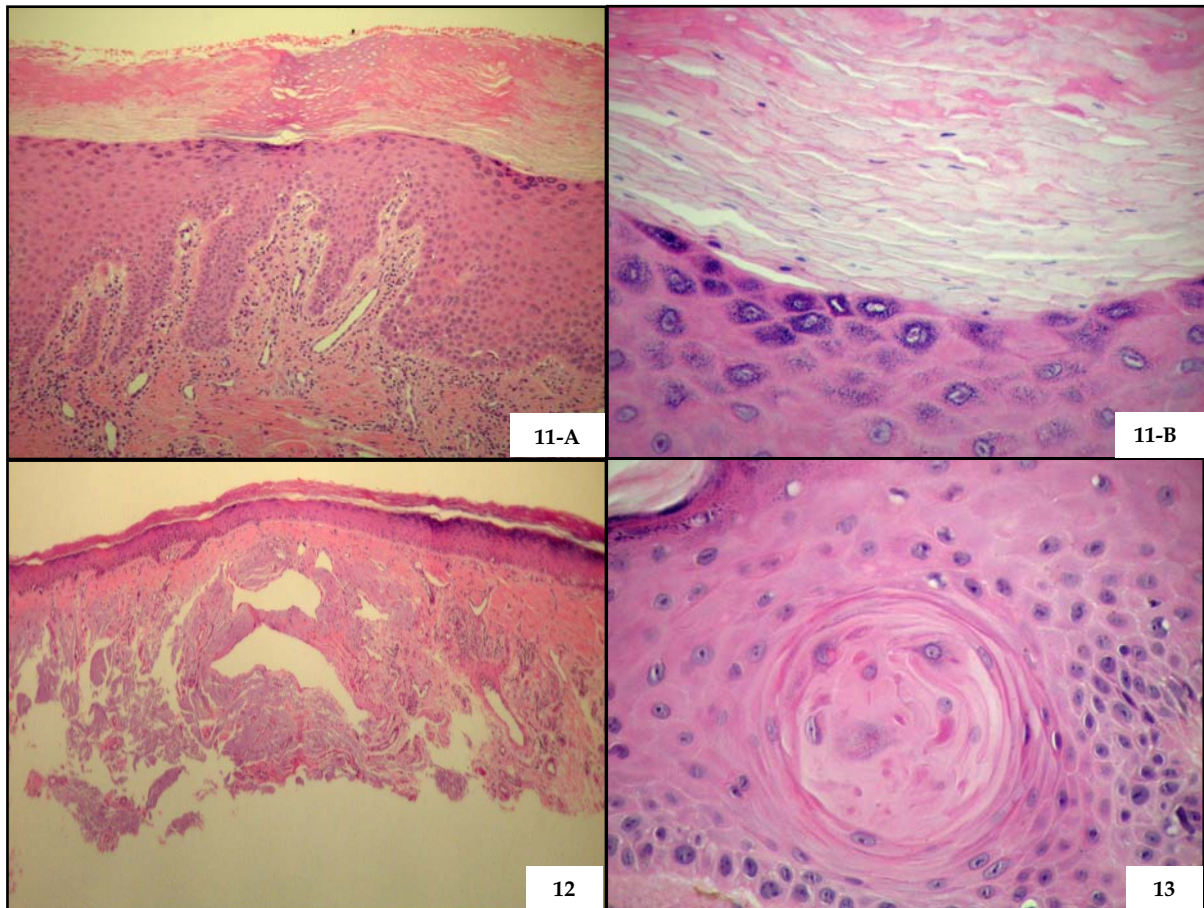
**Figura 6** – Lábio com queilite actínica e presença clínica de descamação.

**Figura 7** – Lábio com queilite actínica e aspecto clínico de perda de definição do contorno do vermelhão.

**Figura 8** – Lábio com queilite actínica e presença clínica de fissuras.

**Figura 9** – Lábio com queilite actínica e presença clínica de leucoplasia.

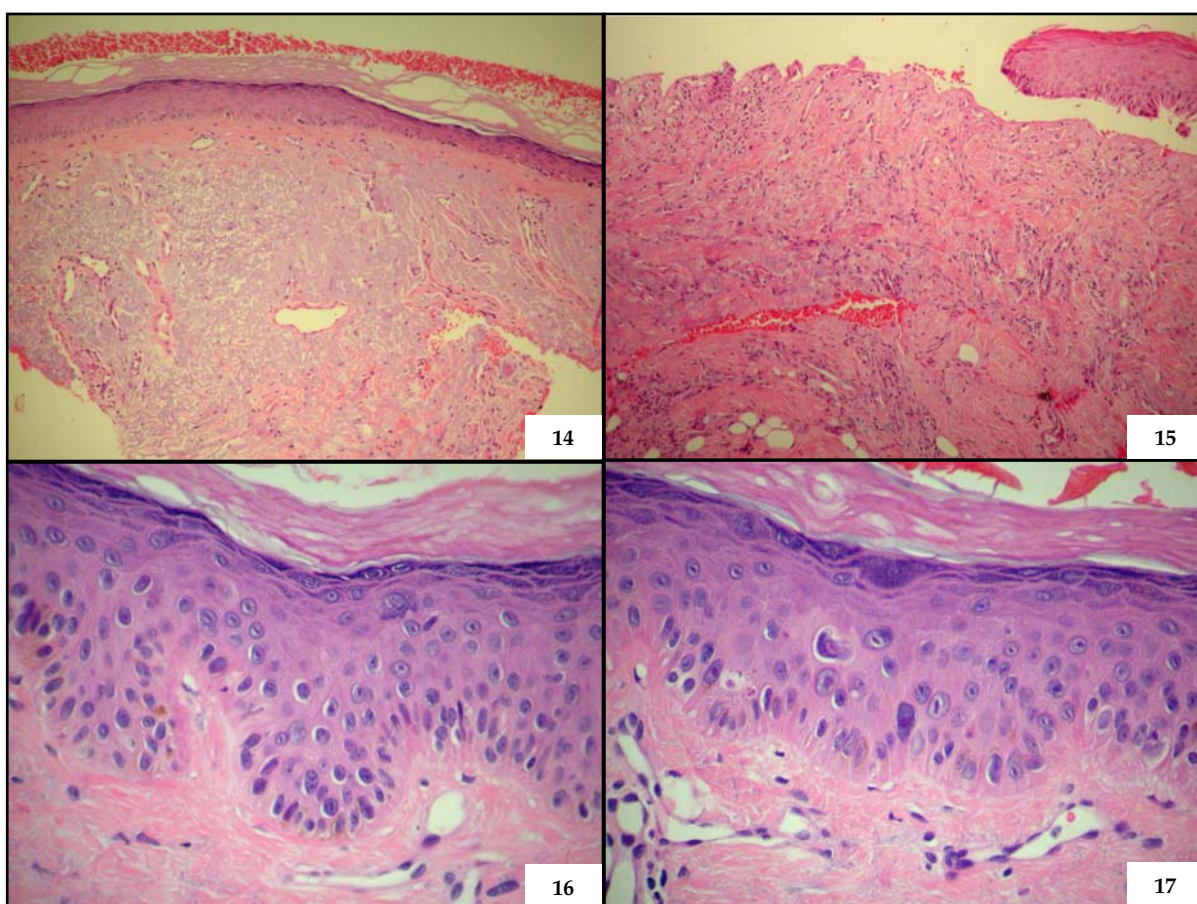
**Figura 10** – Lábio com queilite actínica e presença clínica de crostas.



**Figuras 11-A e -B** – Queilite actínica e presença histopatológica de hiperplasia, infiltrado inflamatório acentuado e vasodilatação (HE; 200x). Em maior aumento observa-se presença de hiperparaqueratose (HE; 400x).

**Figura 12** – Queilite actínica e presença histopatológica de atrofia da camada espinhosa (HE; 100x).

**Figura 13** – Queilite actínica e presença de pérola córnea intraepidérmica (HE; 400x).



**Figura 14** – Queilite actínica e presença histopatológica de elastose solar (HE; 100x).

**Figura 15** – Queilite actínica e presença histopatológica de úlcera (HE; 200x).

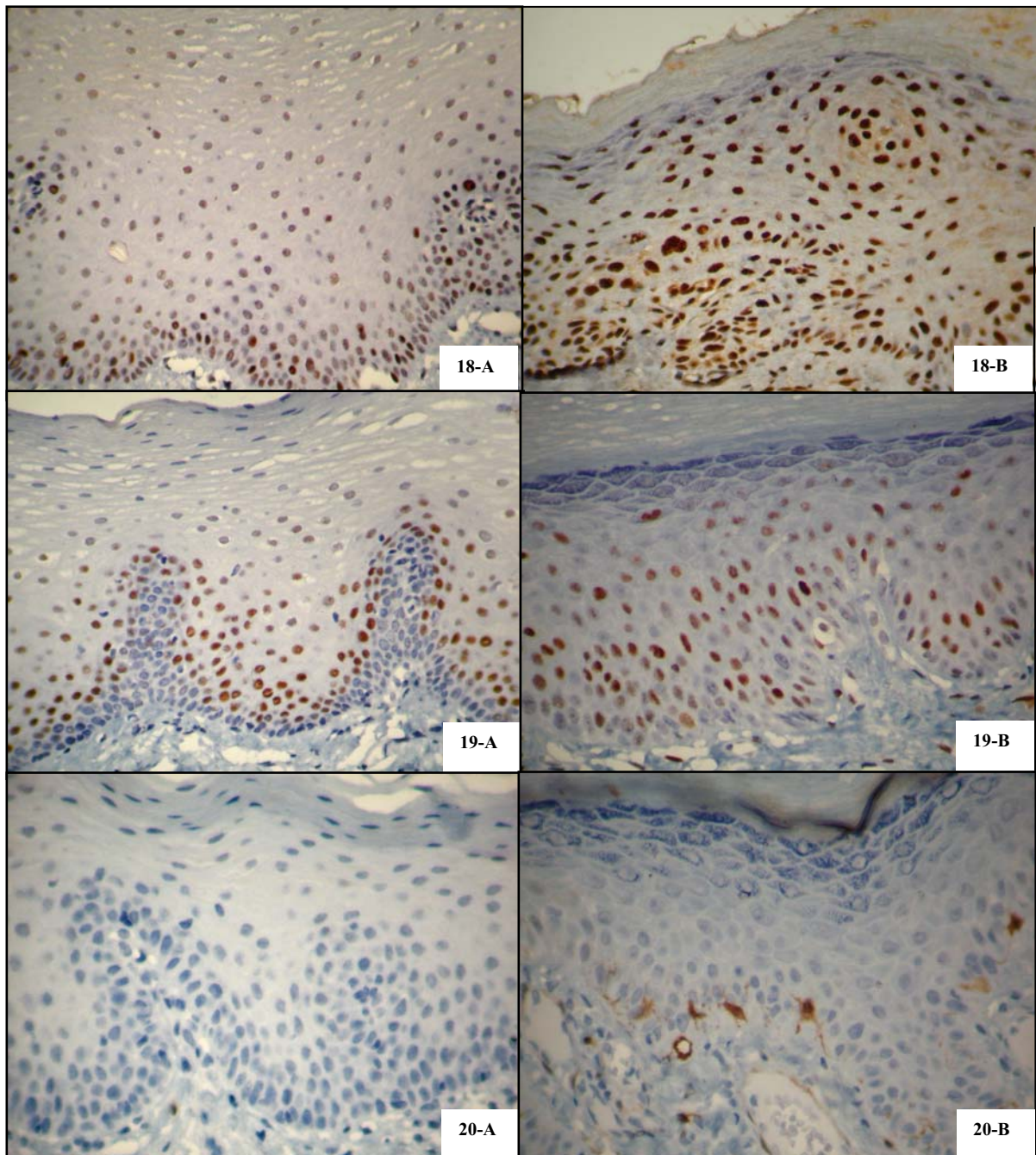
**Figura 16** – Queilite actínica e presença displasia epitelial leve (HE; 400x).

**Figura 17** – Queilite actínica e presença displasia epitelial moderada (HE; 400x).

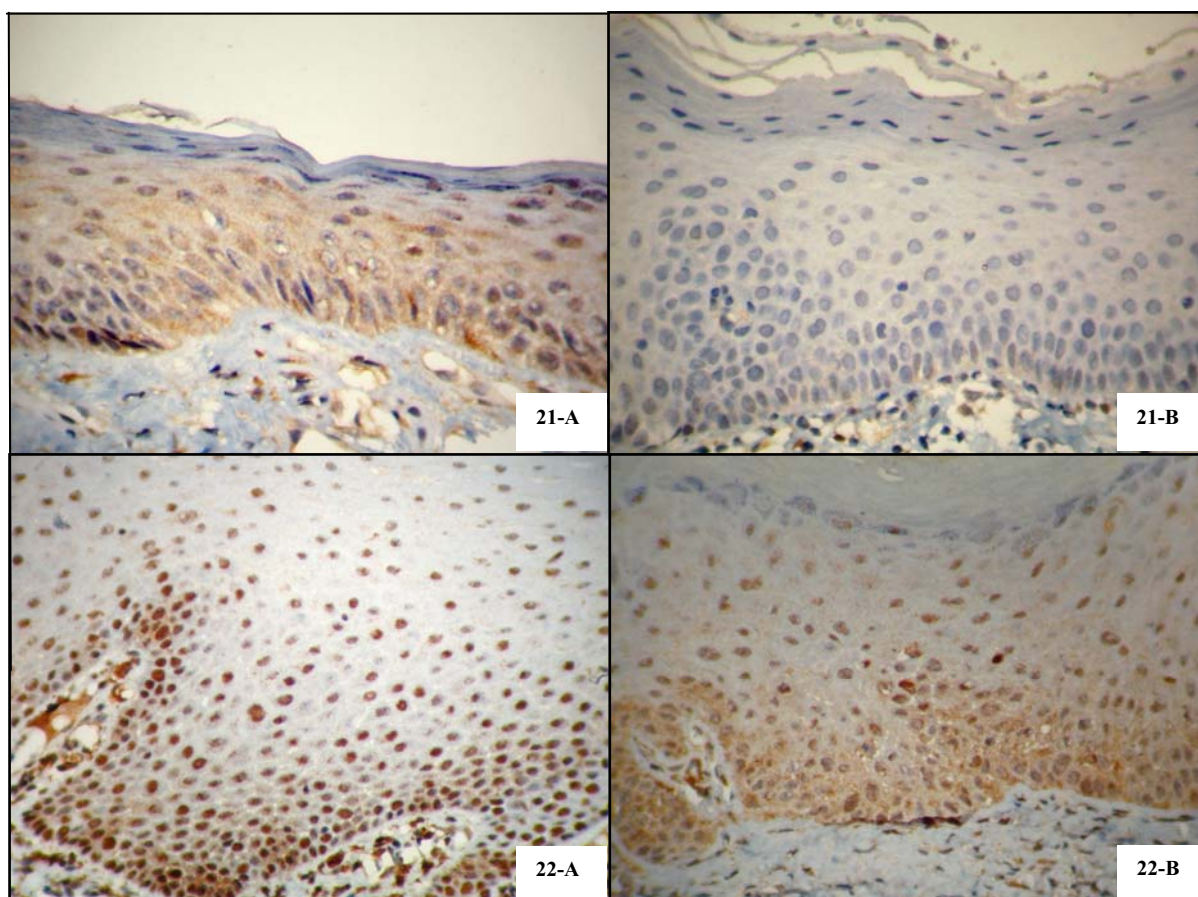
**Tabela 5. Correlação entre intensidade das alterações histopatológicas da queilite actínica e a classificação clínica segundo a gravidade proposta.**

Alterações Histológicas	Intensidade das Alterações Histopatológicas				Associação com a Classificação Clínica*
	Nula=0	Leve=1	Moderada=2	Grave=3	
<b>Hiperqueratose</b>	0 (0%)	12 (38,71%)	17 (54,84%)	2 (6,45%)	p=0.5236
<b>Paraqueratose</b>	8 (25,8%)	17 (54,84%)	6 (19,35%)	0 (0%)	p=0.3494
<b>Ortoqueratose</b>	2 (6,45%)	11 (35,48%)	16 (51,61%)	2 (6,45%)	p=0.7290
<b>Hiperplasia</b>	4 (12,90%)	8 (25,81%)	14 (45,16%)	5 (16,13%)	p=0.7813
<b>Atrofia</b>	9 (29,03%)	12 (38,71%)	8 (25,81%)	2 (6,45%)	p=0.8460
<b>Displasia Epitelial</b>	0 (0%)	7 (22,58%)	23 (74,19%)	1 (3,23%)	p=0.3347
<b>Elastose solar</b>	1 (3,23%)	3 (9,68%)	20 (64,52%)	7 (22,58%)	p=0.9150
<b>Infiltrado Inflamatório</b>	9 (29,03%)	12 (38,71%)	7 (22,58%)	3 (9,68%)	p=0.8479
<b>Vasodilatação</b>	3 (9,68%)	18 (58,06%)	10 (32,26%)	0 (0%)	p=0.0349

\*Classificação clínica: leve, moderada e grave (Tabela 2)



**Figuras 18-A e B.** Expressão imunoistoquímica da p53 na mucosa oral normal e queilite actínica.  
**Figuras 19-A e B.** Expressão imunoistoquímica da p21 na mucosa oral normal e queilite actínica.  
**Figuras 20-A e B.** Expressão imunoistoquímica da p16 na mucosa oral normal e queilite actínica.



**Figuras 21-A e B.** Expressão imunoistoquímica da i-NOS na mucosa oral normal e queilite actínica.

**Figuras 22-A e B.** Expressão imunoistoquímica da survivina na mucosa oral normal e queilite actínica.



**Tabela 6. Frequencia e porcentagem de células imunomarcadas na queilite actínica**

ESCORE	Frequencia e porcentagem de queilite actínicas imunomarcadas						
	i-NOS	p21 basal	p21 suprabasal	p53 basal	p53 suprabasal	Survivina citoplasma	Survivina núcleo
<b>0</b>	1 (3,23%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	1 (3,45%)	2 (6,90%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)
<b>1</b>	8 (25,81%)	0 (0,00%)	6 (20,0%)	1 (3,45%)	3 (10,34%)	3 (10,0%)	6 (20,0%)
<b>2</b>	18 (58,06%)	0 (0,00%)	20 (66,67%)	1 (3,45%)	12 (41,38%)	4 (13,33%)	8 (26,67%)
<b>3</b>	2 (6,45%)	0 (0,00%)	4 (13,33%)	2 (6,90%)	9 (31,03%)	18 (60,0%)	11 (36,67%)
<b>4</b>	2 (6,45%)	30 (100%)	0 (0,00%)	24 (82,76%)	3 (10,34%)	5 (16,67%)	5 (16,67%)
<b>TOTAL</b>	31 (100%)	30 (100%)	30 (100%)	29 (100%)	29 (100%)	30 (100%)	30 (100%)

**Tabela 7. Frequencia e porcentagem de células imunomarcadas na mucosa oral normal**

ESCORE	Imunomarcadores						
	i-NOS	p21 basal	p21 suprabasal	p53 basal	p53 suprabasal	Survivina citoplasma	Survivina núcleo
<b>0</b>	3 (10,34%)	1 (3,57%)	1 (3,57%)	1 (3,57%)	1 (3,57%)	1 (3,70%)	1 (3,70%)
<b>1</b>	11 (37,93%)	0 (0,00%)	26 (92,80%)	0 (0,00%)	6 (21,43%)	1 (3,70%)	1 (3,70%)
<b>2</b>	13 (44,83%)	0 (0,00%)	1 (3,57%)	2 (7,14%)	19 (67,86%)	13 (48,15%)	7 (25,93%)
<b>3</b>	2 (6,90%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	2 (7,14%)	11 (40,74%)	15 (55,56%)
<b>4</b>	0 (0,00%)	27 (96,43%)	0 (0,00%)	25 (89,29%)	0 (0,00%)	1 (3,70%)	3 (11,11%)
<b>TOTAL</b>	29 (100%)	28 (100%)	28 (100%)	28 (100%)	28 (100%)	27 (100%)	27 (100%)

**Tabela 8. Análise comparativa da expressão imunoistoquímica da p21, p53, i-NOS e survivina na queilite actínica e mucosa oral normal**

Grupos de estudo	Imunomarcadores (Média±DP)				
	Camadas epiteliais	p21	p53	i-NOS	Survivina
Normal	Basal	3,86±0,76 <sup>a;3;4;5</sup>	3,71±0,90 <sup>a;3;4;5</sup>	1,48±0,78 <sup>6</sup>	Núcleo 2,67±0,88 <sup>3;6;7</sup>
	Suprabasal	1,00±0,27	1,79±0,63 <sup>6</sup>		Citoplasma 2,37±0,79 <sup>3;6;7</sup>
QA	Basal	4,00±0,00 <sup>a;2;3;4;5</sup>	3,62±0,98 <sup>a;3;4;5</sup>	1,87±0,85 <sup>b;4;5</sup>	Núcleo 2,50±0,79 <sup>3;6</sup>
	Suprabasal	1,93±0,58 <sup>a</sup>	2,28±1,03 <sup>a</sup>		Citoplasma 2,83±0,83 <sup>c;6;7</sup>

QA: queilite actínica; DP: desvio padrão.

<sup>a</sup> $p < 0,05$  em relação à camada suprabasal da mucosa normal do mesmo imunomarcador;

<sup>b</sup> $p < 0,05$  em relação à mucosa normal do mesmo imunomarcador;

<sup>c</sup> $p < 0,05$  em relação ao citoplasma da mucosa normal do mesmo imunomarcador;

<sup>d</sup> $p < 0,05$  em relação à camada suprabasal do mesmo grupo e no mesmo imunomarcador;

<sup>e</sup> $p < 0,05$  em relação à imunoexpressão da p53 do mesmo grupo;

<sup>f</sup> $p < 0,05$  em relação à imunoexpressão da i-NOS do mesmo grupo

<sup>g</sup> $p < 0,05$  em relação à imunoexpressão citoplasmática da survivina do mesmo grupo;

<sup>h</sup> $p < 0,05$  em relação à imunoexpressão nuclear de survivina do mesmo grupo;

<sup>i</sup> $p < 0,05$  em relação à imunoexpressão da p21 na camada suprabasal do mesmo grupo;

<sup>j</sup> $p < 0,05$  em relação à imunoexpressão da p53 na camada suprabasal do mesmo grupo

**Tabela 9. Quadro demonstrativo dos marcadores que expressaram significância ( $p < 0,05$ ) da correlação do estudo imunohistoquímico dentro do mesmo grupo**

Grupos de estudo	Camadas epiteliais				Imunomarcadores		
	p21	p53	i-NOS	i-NOS	Núcleo	Citoplasma	Survivina
<b>Normal</b>	<b>Basal</b>	i-NOS; Survivina núcleo e citoplasma	i-NOS; Survivina núcleo e citoplasma	p21 suprabasal			p21 suprabasal; p53 suprabasal; i-NOS
	<b>Suprabasal</b>						p21 suprabasal; p53 suprabasal; i-NOS
<b>QA</b>	<b>Basal</b>	p53; i-NOS; Survivina núcleo e citoplasma	i-NOS; Survivina citoplasma	Survivina núcleo e citoplasma	<b>Núcleo</b>		p21 suprabasal; i-NOS
	<b>Suprabasal</b>				<b>Citoplasma</b>		p21 suprabasal; p53 suprabasal

QA: queilite actínica

## **Capítulo IV**

### **Artigo Científico 3**

## Artigo Científico 3

### Artigo a ser submetido ao periódico Oral Oncology

#### **Carcinoma espinocelular do lábio inferior: aspectos clínicos, histopatológicos e marcadores tumorais**

#### **Lower lip squamous cell carcinoma: clinical and histological characteristics and tumor markers.**

Renata Aparecida Martinez Antunes Ribeiro-Vieira, Eliana Maria Minicucci, Mariangela Esther Alencar Marques, Sílvio Alencar Marques

#### **Resumo**

Distúrbios na expressão de proteínas associadas a apoptose participam do desenvolvimento e progressão de diversos tumores malignos, inclusive do carcinoma espinocelular do lábio. O objetivo desse estudo foi avaliar as características clínico-patológicas do câncer do lábio e sua correlação com a expressão imunohistoquímica de proteínas envolvidas na apoptose como a p53, p21, p16, survivina, bem como a expressão de i-NOS. Foram avaliados 21 casos de carcinoma espinocelular do lábio inferior e 29 casos de mucosa oral normal. Os tumores com estadios clínicos mais avançados apresentaram maior espessura e maior número de mitoses. As neoplasias com frente de invasão infiltrativo também foram as mais espessas, com predomínio de resposta inflamatória ativa e presença de plasmócitos. A imunexpressão das proteínas p53, p21 e i-NOS no CEC do lábio foram significativas em relação à mucosa oral normal. A imunexpressão da survivina apresentou-se diminuída nos carcinomas. Não houve diferença significativa na expressão das proteínas no frente de invasão e na superfície tumoral. Também não foi observada diferença entre a expressão nuclear e citoplasmática da survivina. A expressão de i-NOS e survivina nuclear correlacionaram-se com a resposta inflamatória ativa no frente de invasão tumoral, sugerindo maior agressividade neoplásica. Na superfície do carcinoma a imunexpressão da p21

correlacionou-se com o estadiamento clínico e a expressão de survivina citoplasmática foi significativamente maior nos carcinomas com infiltrado inflamatório intenso e predomínio de infiltrado inflamatório linfocitário. A expressão da p16 não se mostrou significativa. Assim, sugerimos que as expressões da p53, p21, survivina e i-NOS podem estar alteradas nas fases iniciais da carcinogênese labial, podendo ser importantes marcadores de malignidade.

**Palavras-chave:** Carcinoma espinocelular do lábio; Apoptose; p53; p21; p16; Survivina; i-NOS.

### **Abstract**

Abnormalities of expression of the proteins associated of apoptosis were related with the development of labial squamous cell carcinoma (SCC). The objective of this study was to evaluated the clinical-pathological of labial SCC and the correlation with the immunohistochemical expression of the proteins evolved with apoptosis p53, p21, p16, survivina and i-NOS. Twenty-one specimens of lip SCC and 29 cases of normal mucosa were available. The advanced clinical status presented higher thickness and number of mitosis. The SCC with infiltrative invasive front showed more thickness with the predominance of active inflammatory and plasmocytes. The immunoexpression of the proteins p53, p21 e i-NOS in the labial SCC were significance in relation of normal oral mucosa. The immunoexpression of survivin presented decreased in the SCC. There was not difference in the expression of the proteins in the invasive front and tumoral surface. It was not observed difference between expressions nuclear and cytoplasmatic survivin. The i-NOS and nuclear survivine expression were correlated with active inflammatory than in the tumoral invasive front suggest the most aggressively of tumor. In the surface of SCC the immunoexpression of p21 correlated with the clinical status, and the cytoplasmatic survivine expression was higher in the SCC with intense inflammatory infiltrate and predominance of linfocitary inflammatory infiltrate. The expression of p16 was not significant. We suggest that the expression of p53, p21, survivina e i-NOS could be altered in the early stage of labial carcinogenesis. These proteins could be important of malignant markers.

**Keywords:** Squamous cell carcinoma; Apoptosis; p53; p21; p16; Survivin; i-NOS.

## Introdução

O câncer do lábio corresponde de 25% a 30% do total das neoplasias de boca diagnosticadas, sendo o carcinoma espinocelular (CEC) o tipo histológico mais comum<sup>(1-3)</sup>. Apresenta maior incidência no lábio inferior, principalmente, em indivíduos acima dos 50 anos, pele clara e com fotoexposição crônica, com maior frequência no sexo masculino na razão de 6:1 em relação ao feminino<sup>(4, 5)</sup>. O CEC do lábio em comparação com os da cavidade oral, geralmente é diagnosticado em estádios iniciais, o que faz com que seu prognóstico seja de 80% a 90% de cura. Em comparação com CEC de pele o CEC de boca, incluindo o de lábio, é mais agressivo, e possíveis fatores para tal diferença seria a falta de tecido celular subcutâneo e o rico suprimento de vasos linfáticos<sup>(6)</sup>. Ao diagnóstico, menos de 2% dos pacientes possuem linfonodos envolvidos<sup>(7)</sup>. As metástases quando ocorrem, são tardias e variam de 11 a 18%<sup>(6, 8-12)</sup>, e nestes casos a sobrevida média em cinco anos é reduzida para 25%<sup>(13)</sup>.

No Brasil, não há dados que mostrem a incidência do CEC do lábio de forma isolada. Os dados estatísticos disponíveis e que devem ser considerados para este tipo de tumor são aqueles apresentados para o câncer de boca<sup>(14)</sup>.

Embora a radiação solar seja o fator de risco mais importante para o desenvolvimento de lesões no lábio, cigarro, álcool, os vírus HPV e HIV, predisposição genética e familiar, imunossupressão e fatores socioeconômicos são fatores que podem ser adjuvantes ou determinantes<sup>(15, 16)</sup>.

O CEC inicia-se no vermelhão do lábio podendo invadir a pele adjacente, o músculo orbicular, a comissura labial e o nervo mentoniano. A invasão perineural não é comum, e segundo Byers (1978)<sup>(17)</sup>, esta poderá ocorrer em 2% dos casos, estando associada a lesões recorrentes, de grande diâmetro, com invasão mandibular e histologia de carcinoma pobremente diferenciado. A disseminação linfática se faz para linfonodos submentonianos, submandibulares e, posteriormente, para linfonodos cervicais.

O CEC do lábio é considerado doença de baixa agressividade e prognóstico favorável pela sua tendência ao crescimento lento<sup>(18)</sup>. A lesão inicial é inespecífica, assintomática, podendo ser difícil de distinguir das lesões de queilite actínica. A lesão inicial pode corresponder a uma placa leucoplásica ou eritoplásica, atrófica, superficialmente ulcerada ou com fissuras, recoberta por descamação ou crosta<sup>(19)</sup>. As lesões bem definidas apresentam dor associada à úlcera crônica exsudativa que não cicatriza, de base infiltrada, com bordos

endurecidos e recoberta por escamocrostas. Pode apresentar-se friável e sangrante com crescimento verrucoso e exofítico (**Figura 1**).

Histologicamente o CEC do lábio origina-se no epitélio alterado que pode se apresentar como hiperqueratose, paraqueratose ou acantose, no qual de 5% a 15% das lesões são classificadas como displásicas<sup>(20-22)</sup>. Por sua vez, a displasia epitelial oral é classificada em leve, moderada, grave e carcinoma *in situ*, de acordo com a presença e gravidade de atipia celular, de alteração da arquitetura do epitélio e em alterações na espessura do epitélio displásico quando comparada à espessura total do epitélio normal<sup>(23)</sup>.

O carcinoma espinocelular caracteriza-se histopatologicamente por ilhas ou cordões invasivos de células epiteliais escamosas malignas. As células tumorais apresentam citoplasma eosinofílico abundante com núcleos grandes, muitas vezes intensamente corados (hipercromáticos) e aumento da relação núcleo-citoplasma. Podem ser observados queratinização individual das células, pérolas de queratina e graus variados de pleomorfismo celular e nuclear<sup>(7)</sup>.

A invasão se caracteriza pela projeção de epitélio tumoral para a derme e de ninhos ou ilhas de células crescendo no derma como entidades independentes, ou seja, sem ligação com o epitélio de superfície. A invasão do tumor se faz de maneira expansiva ou infiltrativa podendo atingir o tecido adiposo subjacente, vasos sanguíneos e linfáticos, músculo e osso, causando a destruição tecidual. Frequentemente se observa intensa resposta celular inflamatória ao epitélio invasor e áreas focais de necrose podem estar presentes. A invasão tumoral é capaz de induzir angiogênese e, ocasionalmente, produzir reação densa, desmoplásica, do estroma<sup>(7)</sup>.

O estadiamento clínico do câncer de boca é definido através do sistema TNM, o qual é estabelecido através dos exames clínico e de imagem. O estadiamento histopatológico (pTNM) é realizado por meio do exame do tumor e dos linfonodos regionais<sup>(24)</sup>.

A classificação histopatológica de malignidade proposta pela OMS baseia-se no grau de anaplasia ou diferenciação celular, agrupando as neoplasias malignas em três categorias: pouco, moderadamente e bem diferenciadas. Os CEC de baixo grau, grau I ou bem diferenciados, correspondem àqueles com arquitetura tecidual semelhante ao padrão normal de epitélio escamoso e formação de pérolas de queratina. Correspondem clinicamente àqueles que crescem lentamente e metastatizam tardiamente. Já os CEC pouco diferenciados caracterizaram-se pelo predomínio histológico de células imaturas, numerosas mitoses típicas e atípicas, pleomorfismo celular e nuclear, bem como pouca ou nenhuma produção de queratina e são denominados de alto grau, grau III, pobremente diferenciado ou anaplásico.



Correspondem clinicamente àqueles de crescimento agressivo com metástases precoces. Os CEC com morfológica entre esses dois extremos é denominado de carcinoma moderadamente diferenciado ou grau II<sup>(24)</sup>.

Bryne et al. (1989)<sup>(25)</sup> propuseram uma nova graduação histopatológica para os CEC da boca, baseando na constatação de que o padrão histopatológico pode apresentar grande variação dentro da mesma lesão, criando o conceito e dando grande importância ao denominado frente de invasão, sendo esta denominação reservada para a área considerada a mais invasiva do tumor.

O frente de invasão corresponde à interface entre as células neoplásicas e o estroma, no limite mais profundo da invasão tumoral. É o local em que as células neoplásicas são mais agressivas e onde as alterações moleculares são mais evidentes, permitindo serem estudadas com precisão. A composição e a interação das células neoplásicas com a resposta inflamatória e imune e a presença de neovascularização são fatores que partilham da definição da agressividade do frente e influem na composição de fatores do prognóstico do câncer de boca<sup>(26)</sup>.

O prognóstico do câncer de lábio depende do estadiamento clínico do tumor; mas o que observamos é que pacientes com o mesmo estadio clínico respondem de formas diferentes a mesma terapêutica. Portanto, na busca de critérios de prognóstico e de marcadores tumorais que nos possam fornecer dados mais precisos do comportamento do tumor, tem sido considerados alguns fatores tais como: a intensidade da resposta imune frente ao tumor, o tipo de células presente no infiltrado inflamatório e sua interação com o padrão de invasão<sup>(27)</sup>; bem como a expressão tecidual de genes supressores tumorais e a expressão de proteínas regulatórias da apoptose<sup>(28)</sup>. A informação da característica histológica do frente de invasão, a correlação entre marcadores anti e pró-apoptose podem também fornecer subsídios para terapêutica e prognóstico. Contudo, não há um único marcador universalmente aceito, e sim um painel com número limitado de genes e proteínas que podem exercer papel relevante na progressão tumoral.

A proteína p53, a qual é codificada pelo gene *TP53*, é responsável pela manutenção e integridade do DNA. É a proteína mais expressa nos cânceres humanos<sup>(29)</sup>, inclusive no CEC de lábio. Porém há autores que relatam que a p53 não tem importância prognóstica para este tipo de tumor<sup>(30)</sup>. A proteína p16 é codificada pelo gene *TP16* (CDKN2a/INK4a), também conhecido como gene supressor tumoral inibidor das quinases dependentes de ciclinas (CDK), no entanto, há poucos estudos demonstrando a expressão do p16 em carcinoma labial<sup>(31, 32)</sup>

A proteína p21, produto do gene supressor tumoral *TP21* /WAF1, é um inibidor de CDK, que é essencial para o crescimento celular, diferenciação e apoptose. A expressão da p21 é regulada pela p53 em resposta a danos ao DNA. Em CEC de boca a expressão aumentada da p21 é considerada marcador de mal prognóstico e invasão tumoral<sup>(33)</sup>. A expressão aumentada da p21 associada ao aumento da p53 tem sido relatada em pele exposta aos raios UVB e no fronte de invasão de carcinomas do lábio<sup>(34-36)</sup>.

A survivina é uma proteína inibidora da apoptose considerada como marcador de malignidade e indicador de prognóstico. Estudos a associam a fenótipos tumorais mais agressivos e invasivos, porém, não se identificou associação entre survivina e tamanho do tumor, grau de displasia, presença de linfonodos comprometidos e metástases a distância<sup>(37, 38)</sup>.

O óxido nítrico é um radical gasoso reativo sintetizado pela enzima óxido nítrico sintase a partir do aminoácido L-arginina<sup>(39, 40)</sup>. Estudos têm demonstrado que a óxido nítrico sintase indutiva (i-NOS) favorece o crescimento tumoral, a angiogênese e promove metástases<sup>(41-44)</sup>.

Em relação às proteínas survivina e i-NOS não há estudos que demonstrem suas expressões na carcinogênese do CEC do lábio.

Frente a essas observações, os autores estudaram as características clínicas, histopatológicas e imunoistoquímicas do carcinoma espinocelular do lábio com ênfase no fronte de invasão, correlacionando as variáveis entre si e com um grupo controle.

### **Pacientes e métodos**

Foram selecionadas no período de 01/01/2005 a 19/05/2009, dos arquivos de biópsias do Departamento de Patologia da Faculdade de Medicina de Botucatu-UNESP, 21 amostras de CEC de lábio. Através da análise dos prontuários foi obtido o estadiamento clínico do tumor (TNM), e os casos foram divididos em estádios. Os fatores de exclusão à participação no estudo foram: a história de tabagismo, vigente no presente ou nos últimos 10 anos antecedentes à consulta<sup>(45)</sup> e, o estado de imunossupressão, independente da etiologia. O presente trabalho foi aprovado na Comissão de Ética em Pesquisa da FMB-Unesp, onde está registrado sob número de protocolo 2.900. Igualmente foi aprovado e recebeu subsídios para sua elaboração da agência de fomentos – Fapesp, sob número 2009/52982-6. O grupo controle foi constituído de 29 fragmentos, obtidos por biópsia de mucosa labial normal não exposta à radiação UV.

### **Gradação histopatológica do CEC e do fronte de invasão**

O grau de diferenciação do CEC do lábiol foi baseado no sistema de gradação histológica de malignidade da Organização Mundial da Saúde (OMS)<sup>(23)</sup>, no qual divide os tumores em Grau 1 (bem diferenciado), Grau 2 (moderadamente diferenciado) e Grau 3 (pouco diferenciado) de acordo com o tipo e características celulares.

A gradação histológica do fronte de invasão foi baseada nos critérios propostos por Bryne et al. (1989)<sup>(46)</sup> nos quais foram analisadas a resposta inflamatória do hospedeiro, e estas foram classificadas em: (0) ausência de resposta inflamatória, (1) leve, (2) moderada e (3) intensa; presença de infiltrado inflamatório ativo (que permeia e invade os blocos tumorais) ou passivo (presente apenas no limite do fronte de invasão). Também foi avaliada a composição do infiltrado inflamatório em relação à presença de plasmócitos, linfócitos e eosinófilos e graduada em: (0) ausente, (1) infiltrado leve, (2) moderado, (3) intenso. Ainda, foi avaliado o padrão de invasão do fronte tumoral que foi classificado em expansivo, infiltrativo sem células isoladas ou infiltrativo com células isoladas. Adicionalmente foi mensurada a espessura máxima do tumor, medida em mm, e realizada a contagem do número de mitoses e apoptoses com em três campos histológicos.

### **Imunoistoquímica**

Para a reação imunoistoquímica foram utilizados imunomarcadores das proteínas p53, p16, p21, survivina e i-NOS (**Tabela 1**) em cortes de 3µm. A peroxidase endógena foi bloqueada em solução de peróxido de hidrogênio a 3% por 10 minutos, sendo utilizado o CINtec Kit (Ref. 9511 - MTM Laboratories AG, Heidelberg, Germany) para o p16. Em seguida foi realizada a recuperação antigênica pelo calor, utilizando-se câmara de pressão (Pascal – DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA) onde as lâminas, submersas em solução de ácido cítrico 0,01mM pH 6.0 permaneceram por 15 minutos. A recuperação antigênica para o p16 foi realizada em tampão TRIS/EDTA, pH 9 (CINtec Kit Ref. 9511 - MTM Laboratories AG, Heidelberg, Germany), entre 95-99oC, em banho-maria por 10 minutos Os cortes, então, receberam os anticorpos primários previamente diluídos, permanecendo incubados por 18 horas em câmara úmida a 4°C, com exceção do p16 (pronto para uso) que permaneceu incubado por 30 minutos. Logo após, os cortes foram incubados com anticorpos secundário e terciário por 30 minutos cada um, à temperatura ambiente (ADVANCE HRP Detection System - DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA e CINtec Kit Ref. 9511 - MTM Laboratories AG, Heidelberg, Germany). Como revelador, foi utilizado o cromógeno 3,3-diaminobenzidina (DAB) (DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA e CINtec Kit Ref. 9511 -

MTM Laboratories AG, Heidelberg, Germany) e para contra coloração, hematoxilina de Harris. Os cortes foram lavados em água corrente por 5 minutos e desidratados em cadeia ascendente de etanol. Foi realizada a diafanização em xilol e montagem da lâmina em resina sintética. Para controle negativo foi omitido o anticorpo primário e para o controle positivo foram utilizados espécimes previamente estudados e de referência do laboratório do Departamento de Patologia da FMB-Unesp.

Após a imunomarcação, foram avaliadas todas as lâminas de CEC e casos controle. A presença e expressão de imunomarcação foram definidas por método semi-quantitativo, sob observação de três campos histológicos, em aumento de 200x, por três avaliadores de forma concomitante e sua avaliação dada pela média dos valores observados, na superfície do tumor e no fronte de invasão tumoral. A leitura da imunomarcação recebeu valores equivalentes à: valor 0 – ausência de imunomarcação ou imunomarcação  $\leq 5\%$  das células do corte examinado; valor 1 – presença de imunomarcação em até 25% das células; valor 2 – presença de imunomarcação de 26% a 50% das células; valor 3 - presença de imunomarcação de 51% a 75% das células; e, valor 4 - presença de imunomarcação  $> 75\%$  das células. Foram consideradas como positivas todas as células tumorais com coloração castanha intranuclear e/ou citoplasmática, independente da intensidade da imunomarcação<sup>(47)</sup>.

### **Análise estatística**

Foi utilizado o Software SAS for Windows versão 9.2 para análise dos dados. Para associação entre as variáveis clínicas e histopatológicas do CEC foi utilizado o teste Exato de Fisher e coeficiente de Correlação de Spearman. Os mesmos testes foram utilizados para associação entre os imunomarcadores e as variáveis clínicas e histopatológicas. Para a comparação múltipla dos anticorpos nas camadas epiteliais e nos grupos foi utilizado o modelo linear generalizado assumindo distribuição Poisson e o teste para a diferença dos mínimos quadrados médios, assumindo  $p < 0,05$ .

## **Resultados**

### **Estudo clínico e anatomopatológico**

Foram estudados 21 fragmentos de CEC de lábio e 29 fragmentos de mucosa oral normal. Os dados referentes às amostras estão apresentados no **Apêndice 2**.

Todos os indivíduos da amostra eram brancos e exerciam atividades profissionais associadas à exposição solar, entre elas, lavrador, tratorista, pedreiro, marceneiro, carpinteiro e serviços gerais. A média de idade foi de  $62,40 \pm 16,63$  anos (mínimo de 89 e máximo de 35

anos). Houve predominância do sexo masculino, sendo 15 homens (71,43%) e seis mulheres (28,47%). Segundo grupamento para o estadiamento clínico (TNM), 17 (80,95%) lesões foram classificadas no estadio I, três (14,29%) no estadio II e um (4,76%) no estadio IV.

Os CEC do lábio foram graduados histologicamente em graus 1 e 2, não havendo nenhum a que fosse atribuído o grau 3. Não houve associação estatisticamente significativa entre o estadiamento clínico e o grau de diferenciação dos CEC ( $p=0.3797$ ) (**Tabela 2**), bem como associação entre o estadiamento clínico e as características histopatológicas avaliadas (intensidade da resposta inflamatória do hospedeiro, tipo de infiltrado inflamatório, composição do infiltrado inflamatório, padrão de invasão neoplásica) (**Figura 2**). O grau de diferenciação histológico também foi analisado perante as variáveis histológicas e não foram encontradas significância estatísticas ( $p>0,005$ ).

A média de espessura dos tumores foi de  $3,80\pm 3,03$ mm (mínimo de 0,60mm e máximo de 15,0mm). Os tumores com estadios clínicos mais avançados apresentaram maior espessura ( $p=0,0012$ ) e maior número de mitoses ( $p=0,0054$ ). No entanto, não foram observadas associações entre a diferenciação tumoral, a espessura do tumor, o fronte de invasão e o estadiamento clínico. Nos tumores com fronte de invasão infiltrativo (**Figuras 3 e 4**) observamos as maiores espessuras ( $p=0,0317$ ), predomínio de resposta inflamatória ativa ( $p=0,0117$ ) e presença de plasmócitos ( $p=0,0411$ ).

### Estudo imunoistoquímico

Algumas lâminas foram impossibilitadas de analisar por problemas técnicos. A frequência e porcentagem das células imunomarcadas no CEC e mucosa normal estão dispostas de acordo com o escore de imunopositividade para cada anticorpo (**Tabela 3, 4 e 5**).

No fronte de invasão tumoral foi observada correlação entre a resposta inflamatória ativa, a expressão de i-NOS ( $p=0,0452$ ) e a expressão de survivina nuclear ( $p=0,0458$ ). Também foi observada aumento da expressão de i-NOS na superfície do CEC em tumores com estadios clínicos mais avançados, apesar da correlação não apresentar-se significativa ( $p=0,0544$ ). Na superfície do carcinoma a imunexpressão da p21 correlacionou-se com o estadiamento clínico ( $p=0,0474$ ); e a expressão de survivina citoplasmática foi significativamente maior nos carcinomas com infiltrado inflamatório intenso ( $p=0,0084$ ) e predomínio de infiltrado inflamatório linfocitário ( $p=0,0330$ ).

A expressão da p53 (**Figuras 5-A e B**) e p21 (**Figuras 6-A e B**), tanto no fronte de invasão quanto na superfície do CEC foi maior que na camada suprabasal da mucosa normal ( $p<0,0001$ ). Ambas as proteínas mostraram aumento significativo na camada basal da mucosa

oral em relação à camada suprabasal ( $p < 0,05$ ). Houve correlação entre as expressões da p21, p53 e i-NOS no fronte de invasão e na superfície do CEC com a expressão citoplasmática da survivina ( $p < 0,05$ ). Na mucosa oral normal foi observada correlação entre a imunoeexpressão da p21, p53 com a survivina citoplasmática e nuclear e com a i-NOS ( $p < 0,05$ ). Nesse mesmo grupo ainda observamos a expressão aumentada da survivina nuclear e citoplasmática em relação a i-NOS, p21 e p53 da camada suprabasal. A expressão da p53 se correlacionou com as expressões da i-NOS, da p21 e da survivina nuclear tanto no fronte de invasão quanto na superfície do carcinoma e na mucosa normal ( $p < 0,05$ ). Não houve expressão da p16 no carcinoma ou na mucosa normal (**Figuras 7-A e B**). Foi observada aumento da imunoeexpressão de i-NOS (**Figuras 8-A e B**) no fronte de invasão e na superfície do CEC em relação à mucosa normal ( $p < 0,05$ ). A expressão citoplasmática da survivina foi maior na mucosa normal em relação ao fronte de invasão e à superfície do carcinoma ( $p < 0,0001$ ) (**Figuras 9-A e B**). A expressão nuclear da survivina no fronte de invasão foi maior que expressão de i-NOS e p21 no mesmo grupo ( $p < 0,05$ ) e maior que a expressão nuclear de survivina na superfície do carcinoma ( $p = 0,0118$ ). Ainda, a expressão de i-NOS e p53 da camada suprabasal foi maior que a expressão de p21 ( $p < 0,05$ ) (**Tabela 6 e 7**).

## Discussão

Embora a etiologia do câncer de boca seja multifatorial, a principal etiologia do carcinoma de lábio é, claramente, a radiação ultravioleta<sup>(48)</sup>. Consequentemente, o câncer de lábio deve ser estudado separadamente das lesões intra-orais, embora não sejam encontrados dados estatísticos que mostrem sua incidência de forma isolada<sup>(14)</sup>. Diferentemente dos carcinomas intra-bucais, os localizados no lábio têm relação direta com a profissão e os hábitos do paciente, visto que trabalhadores de área rural ou urbana com fotoexposição crônica e pessoas com atividades de lazer expostas periodicamente ao sol são as que apresentam maior fator de risco<sup>(49-53)</sup>. Em concordância com a literatura, o grupo de pacientes estudados mostrou associação de casos de CEC com indivíduos de fototipos baixos, já que 100% dos paciente declararam ter cor de pele branca. Ainda, todos os pacientes declararam exercer profissão ou ter hábitos relacionados à exposição solar.

O sexo masculino predominou na série de casos estudada (71,43%) o que é concorde com o esperado. Embora tenha sido observado aumento da incidência no sexo feminino ao longo dos anos, os homens continuam sendo os mais acometidos pelas de CEC de lábio<sup>(10, 15, 50, 52-55)</sup>. A diferença de incidência entre os sexos sugere divergências na duração da exposição à radiação solar e na interação entre vários fatores de risco relacionados à carcinogênese.

Atividades profissionais menos expostas a fatores climáticos, número menor de fumantes e o uso de protetores labiais, inclusive presentes em alguns batons, são dados relevantes apresentados pelas mulheres que podem justificar essa diferença<sup>(49, 53, 55)</sup>.

A idade média dos pacientes com CEC no presente estudo foi de 62 anos, ou seja, incidência ao diagnóstico entre a 5ª e 6ª década de vida. O tempo necessário para as alterações induzidas pelo sol levar ao desenvolvimento do câncer do lábio varia aproximadamente de 20 a 30 anos, podendo ocorrer em menor tempo em alguns pacientes<sup>(10)</sup>, justificando sua incidência maior na população a partir 50 anos de idade.

Existe grande dificuldade de se correlacionar o aspecto clínico com o grau correspondente de alterações histológicas das lesões do lábio, o que contribui para subestimar a importância dessas lesões e, portanto, para o diagnóstico tardio do CEC do lábio<sup>(12, 56-58)</sup>.

Segundo agrupamento para o estadiamento clínico (TNM), 17 (80,95%) lesões foram classificadas no estadiamento I, três (14,29%) no estadiamento II e um (4,76%) no estadiamento IV. Os CEC do lábio foram graduados histologicamente em graus 1 e 2, não havendo nenhum a que fosse atribuído o grau 3. Não houve associação estatisticamente significativa entre o estadiamento clínico e o grau de diferenciação dos CEC ( $p=0.3797$ ), resultados condizentes aos encontrados por Abreu et al. (2004)<sup>(13)</sup> que constataram relação entre o tamanho do tumor e o grau de diferenciação histológica somente nos graus II e III, referindo que independentemente do tamanho do tumor, muitos apresentaram grau I.

A resposta imune desempenha papel importante na progressão do câncer. Chaves et al. (2002)<sup>(59)</sup> mostraram que a análise da composição do infiltrado inflamatório peritumoral não pode ser apenas quantitativa. Os autores observaram que os distúrbios no balanço imunológico não se relacionavam necessariamente com o número de células de defesa, e sim resultam de falha na função, regulação ou migração de uma população de células do sistema imune para o local do tumor. Resultados estes semelhantes ao do nosso trabalho, no qual não encontramos associação entre a intensidade do infiltrado inflamatório e o frente de invasão tumoral ou a superfície do carcinoma. No entanto, nos CEC com frente de invasão infiltrativo foi observada presença significativa de resposta inflamatória ativa e predominância de infiltrado plasmocitário. Também observamos que os frentes de invasão infiltrativos nos estadios clínicos avançados, correlacionaram-se com os tumores de maior espessura, sendo que estes apresentaram maior número de mitoses, sugerindo maior agressividade neoplásica.

Os eosinófilos desempenham importantes atividades funcionais no processo de interação entre os tecidos normal e o neoplásico maligno, através de reações de citotoxicidade mediada por proteínas, pela produção e liberação de radicais livres ou pela atuação como

células efectoras de atividades anti-neoplásicas<sup>(60-71)</sup>. Diversas pesquisas têm mostrado que a presença e o número de eosinófilos nas regiões limítrofes dos tumores epiteliais malignos humanos, incluindo os da boca, atuam como fatores importantes para o fenômeno tanto de progressão como de destruição de células neoplásicas, sobrevida e metástase. Assim, pela avaliação dos resultados contraditórios, fica evidente que complexas interações celulares e moleculares entre as células do infiltrado inflamatório e o parênquima neoplásico maligno são determinantes para a expressão ou não de uma efetiva resposta anti-neoplásica<sup>(60-71)</sup>. No entanto, nosso estudo não encontrou diferenças estatisticamente significativas entre a presença de eosinófilos e o tamanho do tumor, bem como entre essa células e a graduação histológica do CEC.

O CEC do lábio apresenta distinta etiopatogênese e epidemiologia e apesar dos fatores de riscos para essa neoplasia serem bem reconhecidos, poucos estudos tem investigado a base molecular do seu desenvolvimento<sup>(53, 72, 73)</sup>. O câncer se origina do acúmulos de alterações genéticas e/ou epigenéticas que promovem situações de desequilíbrio entre o controle do crescimento celular e apoptose, o qual é regulado por uma série de genes e proteínas, dentre elas a p53, a p16, a p21, a i-NOS e a survivina.

Mutações no *TP53* são as anormalidades genéticas mais comuns encontradas em CEC de cabeça e pescoço. Estudos têm demonstrado que o espectro mutacional do TP53 é diferente entre o CEC de boca e o de lábio<sup>(74)</sup>. Enquanto os tumores intra-bucais apresentam danos no DNA causadas principalmente pelo tabaco, a mutação do *TP53* em tumores de lábio revela a participação da radiação UV<sup>(74)</sup>. A importância das alterações na via regulatória da p53 para o desenvolvimento do CEC do lábio, como a sua imunopositividade, está geralmente associada à presença de mutação do *TP53*, embora possa também, ocorrer na sua ausência<sup>(29, 47)</sup>. Além disso, as mutações que resultam em deleção ou truncamento da proteína não causam seu acúmulo e conseqüente ausência de detecção por imunistoquímica.

Com o objetivo de evidenciar o potencial marcador da p53 no desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço, Shin et al. (1994)<sup>(75)</sup> analisaram através da imunistoquímica 33 espécimes de CEC que continham áreas de epitélio normal adjacente ao tumor, hiperplasia e/ou displasia epitelial. A expressão da proteína foi observada em 45% dos carcinomas, 21% dos epitélios adjacentes normais, 27% das hiperplasias e 45% das displasias epiteliais. A análise quantitativa da imagem da imunomarcagem demonstrou aumento progressivo da expressão da p53 de acordo com a evolução da lesão. Quanto à localização das imunomarcagens, os autores relataram que nos casos de epitélio normal essas se restringiram à camada basal do epitélio, enquanto que, nas hiperplasias e nas displasias epiteliais a



expressão expandiu-se para a camada parabasal e suprabasal, concluindo, assim, que a expressão da proteína pode estar alterada nas fases iniciais da carcinogênese da região de cabeça e pescoço.

De acordo com Cruz et al. (1998, 2000)<sup>(76, 77)</sup>, a detecção da p53 em tecidos bucais normais restringe-se à camada basal e nas outras camadas do epitélio se expressa em baixas concentrações ou está ausente. Sua expressão intensa nas células suprabasais sugere sua alteração e possível malignização do tecido.

Estudos de imunexpressão da p53 em tecidos normais expostos a radiação UV tem sido controversos<sup>(78)</sup>. Nossos resultados mostraram que para as amostras do grupo controle, a expressão da p53 nas células da camada basal foi maior que na suprabasal, o que pode ser explicado pela alta sensibilidade da técnica. Resultados semelhantes foram encontrados por Fabbrocini et al. (2000)<sup>(56)</sup> e Khan et al. (2009)<sup>(79)</sup>, enquanto Crosthwaite et al. (1996)<sup>(80)</sup> não encontraram expressão da p53 em lábio normal.

Alguns trabalhos mostraram aumento da expressão da proteína p53 tanto nos carcinomas do lábio quanto nas áreas fotoexpostas cronicamente<sup>(79)</sup>, como também, correlação entre a p53 e a perda de diferenciação celular nos tumores labiais<sup>(81)</sup>. Ao contrário, Montesinos-Perea et al. (2004)<sup>(30)</sup> não encontraram valor prognóstico da p53 para o CEC do lábio levando em conta áreas fotoexpostas e tumor, o que também foi observado em nosso estudo.

Uma das descobertas mais promissoras em relação aos fatores prognósticos do CEC de boca foi o reconhecimento de que o fronte de invasão pode refletir melhor o comportamento tumoral<sup>(82, 83)</sup>. Os limites anatômicos bem demarcados do lábio inferior faz da avaliação do fronte do CEC mais fácil que de outras regiões, principalmente quando os espécimes são obtidos de ressecções cirúrgicas com margens livres<sup>(35)</sup>. Estudos mostraram que a expressão da p53 é mais elevada no fronte de invasão do CEC do lábio<sup>(35)</sup> e de boca<sup>(84)</sup> do que no tumor como um todo. Em nosso trabalho, o CEC foi avaliado na região do fronte de invasão e na superfície tumoral, e apesar da imunexpressão da p53 ter sido maior no fronte, não foi estatisticamente significativa em relação à superfície do tumor. No entanto, nossos resultados apontaram o aumento da imunexpressão da p53 no CEC de lábio, tanto na região do fronte de invasão quanto na superfície do carcinoma em relação à camada suprabasal da mucosa normal, sugerindo que essa proteína possa ser um importante marcador neoplásico na carcinogênese do lábio inferior.

A p21 bloqueia a progressão do ciclo celular e é ativada em resposta a baixas doses de UVB<sup>(85-87)</sup>. A expressão aumentada da p21 em associação com o aumento da p53 tem sido

relatada tanto em peles expostas aos raios ultravioletas quanto no fronte de invasão tumoral em CEC de lábio<sup>(34, 35)</sup> e tem-se sugerido que essa proteína sozinha possa não ser suficiente para realizar a parada do ciclo celular e inibir o crescimento tumoral<sup>(35)</sup>. No CEC de boca a superexpressão da p21 tem sido associada à invasão tumoral e ao prognóstico desfavorável, e em associação ao aumento da p53 foi correlacionada com presença de metástases ganglionares<sup>(33, 88)</sup>. Em nosso estudo observamos aumento significativo da p21 no fronte de invasão e superfície tumoral em relação à camada suprabasal da mucosa normal. No entanto não foi observado aumento significativo da imunexpressão da p21 no fronte de invasão em relação à superfície do tumor. Esses dados não condizem com os resultados encontrados por Horta et al. (2007)<sup>(35)</sup> que mostraram que a imunexpressão da p21 é significativamente maior no fronte de invasão do que no restante do tumor, reforçando a hipótese de que essa região seria responsável pelo comportamento neoplásico. Apesar dos autores terem encontrado aumento da expressão de p53 e p21 no CEC do lábio, não encontraram correlação entre essas proteínas no fronte de invasão, indicando que as mesmas podem participar de atividade biológica do controle do ciclo celular por vias moleculares independentes. Nossos resultados identificaram expressão aumentada da p53 em relação a p21 tanto no fronte de invasão quanto na superfície tumoral. Também foi observada correlação significativa da imunexpressão da p21 entre a superfície do tumor e o estadió clínico do CEC de lábio.

A inativação do gene *TP16* é um evento frequentemente encontrado em muitos tipos de neoplasias malignas e sua identificação imunoistoquímica tem sido utilizada para a avaliação de fatores preditivos e prognósticos do CEC de boca<sup>(89-92)</sup>. Pande et al. (1998)<sup>(89)</sup> demonstraram relação direta entre a ausência da p16 e o estadiamento clínico dos pacientes com CEC de boca. Contrariamente, estudos demonstraram ausência de relação entre a imunexpressão de p16 e o estadiamento clínico do CEC de boca, relatando que a presença de mutações no gene *TP16* parece representar evento mais decisivo para os estágios iniciais da carcinogênese oral, ao invés de determinar o comportamento clínico das lesões e alterações morfológicas encontradas na região do fronte de invasão tumoral<sup>(93, 94)</sup>. Adicionalmente, trabalhos mostram associação significativa entre a expressão de p53 e p16 com piores índices de sobrevida para pacientes com câncer de boca<sup>(95, 96)</sup>. De-Paula et al. (2006)<sup>(97)</sup> não encontraram associação entre a imunexpressão da p16 e p53 com ocorrência de metástases regionais, tamanho clínico das lesões e gravidade do fronte de invasão tumoral, sugerindo que não há correlação significativa entre essas proteínas e o CEC de boca. Em nosso estudo, foi observada ausência de imunexpressão em todos os grupos estudados. O controle positivo imunomarcado nos garante a exatidão do método em nosso trabalho. A ausência da p16 já

tinha sido descrita por outros autores que utilizaram o mesmo anticorpo monoclonal, relatando que esse marcador não pode detectar a p16 em epitélios estratificados pavimentosos normais<sup>(98-102)</sup>. Contrariamente, Nakahara et al. (2000)<sup>(103)</sup> observaram imunoposição da p16 em mucosa oral normal e leucoplasias, entretanto, observaram ausência da p16 nos CEC de boca.

Vários produtos pró-inflamatórios foram identificados como mediadores da supressão da apoptose, promoção da angiogênese, proliferação, invasão tumoral e metástase. Entre eles encontra-se a i-NOS, a qual tem sido apontada como possível marcador biológico da progressão tumoral, por ter sido encontrada em diversos tumores<sup>(104, 105)</sup>. Condizente com alguns estudos, não encontramos associação entre a expressão de i-NOS e o estadiamento clínico ou grau de diferenciação tumoral<sup>(106)</sup>. Contrariamente, alguns autores correlacionaram a proteína com metástases regionais e estadiamento clínico do tumor, mas não com a diferenciação tumoral<sup>(107)</sup>. Em nosso estudo foi observado aumento significativo da imunoposição de i-NOS no fronte de invasão tumoral com resposta inflamatória ativa. A expressão aumentada de i-NOS tanto no fronte de invasão quanto na superfície tumoral foi significativa em relação a mucosa oral normal, evidenciando seu importante papel na carcinogênese labial. Também foi observada correlação entre a imunoposição de i-NOS e a survivina citoplasmática no fronte de invasão e superfície tumoral. Ainda, no fronte invasivo foi observada correlação entre a imunoposição de i-NOS e p21. Concordante com a literatura, a expressão de p53 se correlacionou com i-NOS no fronte de invasão<sup>(106)</sup>, mas também foi observada na superfície do CEC.

A survivina é uma proteína que inibe a apoptose e regula a divisão celular, sendo indetectável na maioria dos tecidos normais adultos, mas podendo ser observada tanto no núcleo quanto no citoplasma das células neoplásicas. Sugere-se que a survivina nuclear atue no controle a divisão celular, enquanto que a survivina citoplasmática seja citoprotetora<sup>(108)</sup>. A localização intracelular da survivina em células tumorais e sua importância como marcador de prognóstico foram analisadas em muitos estudos, embora com conclusões contraditórias. Alguns trabalhos demonstraram que a expressão aumentada de survivina citoplasmática está associada a prognóstico desfavorável em vários tipos de carcinomas, inclusive no CEC de cabeça e pescoço e a survivina nuclear possa estar relacionada a metástases ganglionares e baixo índice de sobrevivência<sup>(109-118)</sup>.

A survivina pode ser controlada negativamente pela p53 através de mecanismos envolvendo inibidores da apoptose, assim, a alta frequência de mutações do gene *TP53* nos

cânceres humanos poderia explicar a expressão desregulada da survivina em diversos tipos de tumores e sua ausência nos tecidos vizinhos normais<sup>(119, 120)</sup>.

Em estudos de Khan et al. (2000)<sup>(78)</sup> a expressão survivina foi detectada em 72% dos CEC, em 44% das lesões pré-malignas e ausente nos tecidos normais. Os autores também detectaram que 28% dos CEC e 18% das lesões pré-malignas co-expressaram p53 e survivina, apesar de não ter sido encontrada correlação significativa entre as duas proteínas. Foi observado aumento da survivina em relação a p53 quando se comparou o CEC com a lesão pré-maligna e com a mucosa normal. Os autores não identificaram correlação entre survivina e p53 com os parâmetros clínico-patológicos e sugeriram que a p53 possa não ser a principal contribuinte na desregulação da survivina no câncer de boca.

Jane et al. (2006)<sup>(117)</sup> correlacionaram o aumento da expressão da survivina nos CEC de boca com o grau de diferenciação do tumor e observaram que a localização nuclear da survivina esteve relacionada aos tumores pobremente diferenciados, o que vai de encontro aos estudos de Lu et al. (2004)<sup>(121)</sup> e Grabowski et al. (2003)<sup>(122)</sup> que correlacionaram expressão nuclear da survivina com prognóstico desfavorável em câncer de pulmão e esôfago, respectivamente.

Qi et al. (2010)<sup>(123)</sup> encontraram expressão aumentada de survivina tanto no núcleo quanto no citoplasma das células de CEC de cabeça e pescoço, as quais foram correlacionadas com a progressão do tumor, incluindo aumento da proliferação celular, indiferenciação tumoral e presença de metástases ganglionares.

Kim et al. (2010)<sup>(124)</sup>, ao realizarem análise clínica-patológica da carcinogênese oral em hamsters, relataram significativa correlação entre a expressão de survivina e metástases ganglionares, bem como entre a proliferação tumoral. No entanto, não encontraram associação entre a expressão da proteína e a diferenciação neoplásica, a densidade dos vasos sanguíneos e o estadió clínico do tumor, o que vai de encontro aos nossos resultados que não detectaram correlação significativa entre a expressão nuclear ou citoplasmática da survivina com o estadió clínico e com o grau de diferenciação tumoral tanto no fronte de invasão quanto na superfície do carcinoma.

Em nosso estudo foi observada imunoexpressão aumentada da survivina nuclear no fronte de invasão dos CEC que apresentaram resposta inflamatória ativa, demonstrando maior agressividade tumoral. Ainda, houve aumento da survivina citoplasmática da superfície do carcinoma nos tumores com resposta inflamatória mais intensa, com significativa presença de linfócitos. No fronte de invasão foi observada correlação entre a survivina citoplasmática e a p21, bem como entre a survivina nuclear, a p21 e a imunoexpressão da i-NOS.

### **Conclusão**

A expressão da p16 não se mostrou significativa no câncer de lábio. As expressões da p53, p21, survivina e i-NOS estão alteradas nas fases iniciais da carcinogênese labial, podendo ser importantes marcadores de malignidade. Estudos que mostrem o mecanismo de ação destas proteínas bem como dos seus respectivos genes no CEC labial são necessários para complementar nossos resultados.

### **Referências**

1. Zitsch RP 3rd, Park CW, Renner GJ, Rea JL. Outcome analysis for lip carcinoma. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1995 Nov;113(5):589-96.
2. Renner GJ, Zitsch RP 3rd. Cancer of the Lip. In: Myers E, Suen J, editors. *Cancer of the Head and Neck.* 3 ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company; 1996. p. 294-320.
3. Regezi JA, Sciubba JJ. *Patologia Bucal e Correlações Clinicopatológicas.* 3ª ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.
4. Zitsch RP 3rd. Carcinoma of the lip. *Otolaryngol Clin North Am.* 1993 Apr;26(2):265-77.
5. Bilkay U, Kerem H, Ozek C, Gundogan H, Guner U, Gurler T, et al. Management of lower lip cancer: a retrospective analysis of 118 patients and review of the literature. *Ann Plast Surg.* 2003 Jan;50(1):43-50.
6. Bentley JM, Barankin B, Lauzon GJ. Paying more than lip service to lip lesions. *Can Fam Physician.* 2003 Sep;49:1111-6.
7. Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. *Patologia Oral & Maxilofacial.* 2ª ed. Rio de Janeiro: Guanara Koogan; 2004.
8. McGregor GI, Davis NL, Hay JH. Impact of cervical lymph node metastases from squamous cell cancer of the lip. *Am J Surg.* 1992 May;163(5):469-71.

9. Manganaro AM, Will MJ, Poulos E. Actinic cheilitis: a premalignant condition. *Gen Dent*. 1997 Sep-Oct;45(5):492-4.
10. Kaugars GE, Pillion T, Svirsky JA, Page DG, Burns JC, Abbey LM. Actinic cheilitis: a review of 152 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1999 Aug;88(2):181-6.
11. Campisi G, Margiotta V. Oral mucosal lesions and risk habits among men in an Italian study population. *J Oral Pathol Med*. 2001 Jan;30(1):22-8.
12. Menta Simonsen Nico M, Rivitti EA, Lourenco SV. Actinic cheilitis: histologic study of the entire vermilion and comparison with previous biopsy. *J Cutan Pathol*. 2007 Apr;34(4):309-14.
13. Abreu MA, Silva OM, Neto Pimentel DR, Hirata CH, Weckx LL, Alchorne MM, et al. Actinic cheilitis adjacent to squamous carcinoma of the lips as an indicator of prognosis. *Braz J Otorhinolaryngol*. 2006 Nov-Dec;72(6):767-71.
14. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Atenção à Saúde. Coordenação de Prevenção e Vigilância de Câncer. Estimativas 2008: Incidência de Câncer no Brasil. Rio de Janeiro: INCA; 2007.
15. Lindqvist C, Teppo L. Epidemiological evaluation of sunlight as a risk factor of lip cancer. *Br J Cancer*. 1978 Jun;37(6):983-9.
16. van der Wal KG, de Visscher JG. [A numb chin and bottom lip: a closer look at the symptoms]. *Ned Tijdschr Tandheelkd*. 1998 Sep;105(9):321-3.
17. Byers RM, O'Brien J, Waxler J. The therapeutic and prognostic implications of nerve invasion in cancer of the lower lip. *Int J Radiat Oncol Biol Phys*. 1978 Mar-Apr;4(3-4):215-7.
18. Awde JD, Kogon SL, Morin RJ. Lip cancer: a review. *J Can Dent Assoc*. 1996 Aug;62(8):634-6.

19. Moy RL. Clinical presentation of actinic keratoses and squamous cell carcinoma. *J Am Acad Dermatol*. 2000 Jan;42(1 Pt 2):8-10.
20. Kramer IR, Lucas RB, Pindborg JJ, Sobin LH. Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1978 Oct;46(4):518-39.
21. Pindborg JJ, Reichart PA, Smith CJ, Van der Waall I. WHO: Histological Typing of Cancer and Precancer of the Oral Mucosa. 2 ed. Berlin: Springer; 1997.
22. Sudbo J, Reith A. The evolution of predictive oncology and molecular-based therapy for oral cancer prevention. *Int J Cancer*. 2005 Jun 20;115(3):339-45.
23. Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. Lyon: IARC Press; 2005.
24. Patel SG, Shah JP. TNM staging of cancers of the head and neck: striving for uniformity among diversity. *CA Cancer J Clin*. 2005 Jul-Aug;55(4):242-58; quiz 61-2, 64.
25. Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Stene T, Bang G, Dabelsteen E. New malignancy grading is a better prognostic indicator than Broders' grading in oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med*. 1989 Sep;18(8):432-7.
26. Bankfalvi A, Piffko J. Prognostic and predictive factors in oral cancer: the role of the invasive tumour front. *J Oral Pathol Med*. 2000 Aug;29(7):291-8.
27. da Silveira EJ, Miguel MC, Lima KC, Freitas Rde A, de Moraes Mde L, Queiroz LM. Analysis of local immunity in squamous cell carcinoma of the tongue and lower lip. *Exp Mol Pathol*. Feb;88(1):171-5.
28. Boukamp P. Non-melanoma skin cancer: what drives tumor development and progression? *Carcinogenesis*. 2005 Oct;26(10):1657-67.

29. Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.* 1994 Sep 15;54(18):4855-78.
30. Garcia-Montesinos-Perea B, Val-Bernal JF, Saiz-Bustillo R. Epidermoid carcinoma of the lip: an immunohistochemical study. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2005 Nov-Dec;10(5):454-61.
31. Yang W, Lin Z, Li L, Zhang G. [Expression of VEGF, EGFR, p16 in lip cancers and oral squamous cell carcinomas and their clinic significance]. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi.* 2002 Mar;37(2):99-101.
32. Tokman B, Gultekin SE, Sezer C, Alpar R. The expression of p53, p16 proteins and prevalence of apoptosis in oral squamous cell carcinoma. Correlation with mode of invasion grading system. *Saudi Med J.* 2004 Dec;25(12):1922-30.
33. Nemes JA, Nemes Z, Marton IJ. p21WAF1/CIP1 expression is a marker of poor prognosis in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2005 May;34(5):274-9.
34. Ponten F, Berne B, Ren ZP, Nister M, Ponten J. Ultraviolet light induces expression of p53 and p21 in human skin: effect of sunscreen and constitutive p21 expression in skin appendages. *J Invest Dermatol.* 1995 Sep;105(3):402-6.
35. Horta MC, de Assis LA, de Souza AF, de Araujo VC, Gomez RS, Aguiar MC. p53 and p21WAF1/CIP1 overexpression at the invasive front of lower lip squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2007 Feb;36(2):88-92.
36. Martinez A, Brethauer U, Borlando J, Spencer ML, Rojas IG. Epithelial expression of p53, mdm-2 and p21 in normal lip and actinic cheilitis. *Oral Oncol.* 2008 Sep;44(9):878-83.
37. Lo Muzio L, Pannone G, Staibano S, Mignogna MD, Rubini C, Mariggio MA, et al. Survivin expression in oral squamous cell carcinoma. *Br J Cancer.* 2003 Dec 15;89(12):2244-8.



38. Lo Muzio L, Farina A, Rubini C, Pezzetti F, Stabellini G, Laino G, et al. Survivin as prognostic factor in squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer Lett.* 2005 Jul 8;225(1):27-33.
39. Brecht DS, Snyder SH. Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin-requiring enzyme. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 1990 Jan;87(2):682-5.
40. Knowles RG, Moncada S. Nitric oxide synthases in mammals. *Biochem J.* 1994 Mar 1;298 ( Pt 2):249-58.
41. Rosbe KW, Prazma J, Petrusz P, Mims W, Ball SS, Weissler MC. Immunohistochemical characterization of nitric oxide synthase activity in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Otolaryngol Head Neck Surg.* 1995 Nov;113(5):541-9.
42. Brennan PA, Palacios-Callender M, Zaki GA, Spedding AV, Langdon JD. Does type II nitric oxide synthase expression correlate with cellular proliferation in oral squamous cell carcinoma and dysplasia? *Head Neck.* 2001 Mar;23(3):217-22.
43. Brennan PA, Palacios-Callender M, Umar T, Tant S, Langdon JD. Expression of type 2 nitric oxide synthase and p21 in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2002 Apr;31(2):200-5.
44. Yuk-Kwan C, Shui-Sang H, Li-Min L. The mRNA expression of inducible nitric oxide synthase in DMBA-induced hamster buccal-pouch carcinomas: an in situ RT-PCR study. *Int J Exp Pathol.* 2002 Jun;83(3):133-7.
45. Brasil. Ministério da Saúde. Secretaria de Assistência à Saúde. Instituto Nacional de Câncer. *Falando Sobre Câncer da Boca.* Rio de Janeiro: INCA; 2002.
46. Bryne M, Boysen M, Alfsen CG, Abeler VM, Sudbo J, Nesland JM, et al. The invasive front of carcinomas. The most important area for tumour prognosis? *Anticancer Res.* 1998 Nov-Dec;18(6B):4757-64.

47. Nylander K, Dabelsteen E, Hall PA. The p53 molecule and its prognostic role in squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Oral Pathol Med.* 2000 Oct;29(9):413-25.
48. Anderson DL. Cause and prevention of lip cancer. *J Can Dent Assoc (Tor).* 1971 Apr;37(4):138-42.
49. LaRiviere W, Pickett AB. Clinical criteria in diagnosis of early squamous cell carcinoma of the lower lip. *J Am Dent Assoc.* 1979 Dec;99(6):972-7.
50. Chen J, Katz RV, Krutchkoff DJ, Eisenberg E. Lip cancer. Incidence trends in Connecticut, 1935-1985. *Cancer.* 1992 Oct 15;70(8):2025-30.
51. Main JH, Pavone M. Actinic cheilitis and carcinoma of the lip. *J Can Dent Assoc.* 1994 Feb;60(2):113-6.
52. dos Santos LR, Cernea CR, Kowalski LP, Carneiro PC, Soto MN, Nishio S, et al. Squamous-cell carcinoma of the lower lip: a retrospective study of 58 patients. *Sao Paulo Med J.* 1996 Mar-Apr;114(2):1117-26.
53. de Visscher JG, van der Waal I. Etiology of cancer of the lip. A review. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1998 Jun;27(3):199-203.
54. Veness MJ, Ong C, Cakir B, Morgan G. Squamous cell carcinoma of the lip. Patterns of relapse and outcome: Reporting the Westmead Hospital experience, 1980-1997. *Australas Radiol.* 2001 May;45(2):195-9.
55. Ochsenius G, Ormeno A, Godoy L, Rojas R. [A retrospective study of 232 cases of lip cancer and pre cancer in Chilean patients. Clinical-histological correlation]. *Rev Med Chil.* 2003 Jan;131(1):60-6.
56. Waldron CA, Shafer WG. Leukoplakia revisited. A clinicopathologic study 3256 oral leukoplakias. *Cancer.* 1975 Oct;36(4):1386-92.
57. Cataldo E, Doku HC. Solar cheilitis. *J Dermatol Surg Oncol.* 1981 Dec;7(12):989-95.

58. Picascia DD, Robinson JK. Actinic cheilitis: a review of the etiology, differential diagnosis, and treatment. *J Am Acad Dermatol*. 1987 Aug;17(2 Pt 1):255-64.
59. Chaves ACM, Ramalho L, Santa'Ana Filho M. Evaluation of tumor infiltrating lymphocyte in oral squamous cell carcinoma. *R Fac Odontol Porto Alegre*. 2002;43(2):60-4.
60. Pretlow TP, Keith EF, Cryar AK, Bartolucci AA, Pitts AM, Pretlow TG, 2nd, et al. Eosinophil infiltration of human colonic carcinomas as a prognostic indicator. *Cancer Res*. 1983 Jun;43(6):2997-3000.
61. Lowe D, Fletcher CD, Gower RL. Tumour-associated eosinophilia in the bladder. *J Clin Pathol*. 1984 May;37(5):500-2.
62. Goldsmith MM, Cresson DH, Askin FB. The prognostic significance of stromal eosinophilia in head and neck cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1987 Apr;96(4):319-24.
63. Wong DT, Weller PF, Galli SJ, Elovic A, Rand TH, Gallagher GT, et al. Human eosinophils express transforming growth factor alpha. *J Exp Med*. 1990 Sep 1;172(3):673-81.
64. Goldsmith MM, Belchis DA, Cresson DH, Merritt WD, 3rd, Askin FB. The importance of the eosinophil in head and neck cancer. *Otolaryngol Head Neck Surg*. 1992 Jan;106(1):27-33.
65. Schleimer RP, Sterbinsky SA, Kaiser J, Bickel CA, Klunk DA, Tomioka K, et al. IL-4 induces adherence of human eosinophils and basophils but not neutrophils to endothelium. Association with expression of VCAM-1. *J Immunol*. 1992 Feb 15;148(4):1086-92.
66. Tepper RI, Coffman RL, Leder P. An eosinophil-dependent mechanism for the antitumor effect of interleukin-4. *Science*. 1992 Jul 24;257(5069):548-51.
67. Tepper RI. The eosinophil-mediated antitumor activity of interleukin-4. *J Allergy Clin Immunol*. 1994 Dec;94(6 Pt 2):1225-31.

68. Samoszuk M. Eosinophils and human cancer. *Histol Histopathol.* 1997 Jul;12(3):807-12.
69. Hung K, Hayashi R, Lafond-Walker A, Lowenstein C, Pardoll D, Levitsky H. The central role of CD4(+) T cells in the antitumor immune response. *J Exp Med.* 1998 Dec 21;188(12):2357-68.
70. Wong DT, Bowen SM, Elovic A, Gallagher GT, Weller PF. Eosinophil ablation and tumor development. *Oral Oncol.* 1999 Sep;35(5):496-501.
71. Dorta RG. Eosinofilia tecidual como fator de prognóstico em carcinomas espinocelulares de boca. Bauru: Faculdade de Odontologia de Bauru - USP; 2000.
72. Douglass CW, Gammon MD. Reassessing the epidemiology of lip cancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1984 Jun;57(6):631-42.
73. Moore S, Johnson N, Pierce A, Wilson D. The epidemiology of lip cancer: a review of global incidence and aetiology. *Oral Dis.* 1999 Jul;5(3):185-95.
74. Ostwald C, Gogacz P, Hillmann T, Schweder J, Gundlach K, Kundt G, et al. p53 mutational spectra are different between squamous-cell carcinomas of the lip and the oral cavity. *Int J Cancer.* 2000 Oct 1;88(1):82-6.
75. Shin DM, Kim J, Ro JY, Hittelman J, Roth JA, Hong WK, et al. Activation of p53 gene expression in premalignant lesions during head and neck tumorigenesis. *Cancer Res.* 1994 Jan 15;54(2):321-6.
76. Cruz IB, Snijders PJ, Meijer CJ, Braakhuis BJ, Snow GB, Walboomers JM, et al. p53 expression above the basal cell layer in oral mucosa is an early event of malignant transformation and has predictive value for developing oral squamous cell carcinoma. *J Pathol.* 1998 Apr;184(4):360-8.

77. Cruz IB, Meijer CJ, Snijders PJ, Snow GB, Walboomers JM, van Der Waal I. p53 immunoexpression in non-malignant oral mucosa adjacent to oral squamous cell carcinoma: potential consequences for clinical management. *J Pathol.* 2000 Jun;191(2):132-7.
78. Khan Z, Tiwari RP, Mulherkar R, Sah NK, Prasad GB, Shrivastava BR, et al. Detection of survivin and p53 in human oral cancer: correlation with clinicopathologic findings. *Head Neck.* 2009 Aug;31(8):1039-48.
79. Fabbrocini G, Russo N, Pagliuca MC, Delfino M, Staibano S, Molea G, et al. p53, cyclin-D1, PCNA, AgNOR expression in squamous cell cancer of the lip: a multicenter study. *Photodermatol Photoimmunol Photomed.* 2000 Aug;16(4):172-7.
80. Crosthwaite N, Teale D, Franklin C, Foster GA, Stringer BM. p53 protein expression in malignant, pre-malignant and non-malignant lesions of the lip. *J Clin Pathol.* 1996 Aug;49(8):648-53.
81. Caly DN, Cheter EZ, Rapoport A, Torloni H, Nonogaki S. P53 expression in squamous cell carcinoma of the lip. *Rev Col Bras Cir.* 2007;34(2):92-7.
82. Bryne M, Koppang HS, Lilleng R, Kjaerheim A. Malignancy grading of the deep invasive margins of oral squamous cell carcinomas has high prognostic value. *J Pathol.* 1992 Apr;166(4):375-81.
83. Kurokawa H, Zhang M, Matsumoto S, Yamashita Y, Tomoyose T, Tanaka T, et al. The high prognostic value of the histologic grade at the deep invasive front of tongue squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2005 Jul;34(6):329-33.
84. Piffko J, Bankfalvi A, Tory K, Fuzesi L, Bryne M, Ofner D, et al. Molecular assessment of p53 abnormalities at the invasive front of oral squamous cell carcinomas. *Head Neck.* 1998 Jan;20(1):8-15.
85. el-Deiry WS, Tokino T, Velculescu VE, Levy DB, Parsons R, Trent JM, et al. WAF1, a potential mediator of p53 tumor suppression. *Cell.* 1993 Nov 19;75(4):817-25.

86. Li G, Ho VC. p53-dependent DNA repair and apoptosis respond differently to high- and low-dose ultraviolet radiation. *Br J Dermatol*. 1998 Jul;139(1):3-10.
87. Al-Mohanna MA, Al-Khalaf HH, Al-Yousef N, Aboussekhra A. The p16INK4a tumor suppressor controls p21WAF1 induction in response to ultraviolet light. *Nucleic Acids Res*. 2007;35(1):223-33.
88. Yamamoto T, Tanigawa N. The role of survivin as a new target of diagnosis and treatment in human cancer. *Med Electron Microsc*. 2001 Dec;34(4):207-12.
89. Pande P, Mathur M, Shukla NK, Ralhan R. pRb and p16 protein alterations in human oral tumorigenesis. *Oral Oncol*. 1998 Sep;34(5):396-403.
90. Lin SC, Chang KW, Chang CS, Liu TY, Tzeng YS, Yang FS, et al. Alterations of p16/MTS1 gene in oral squamous cell carcinomas from Taiwanese. *J Oral Pathol Med*. 2000 Apr;29(4):159-66.
91. Nakahara Y, Shintani S, Mihara M, Ueyama Y, Matsumura T. High frequency of homozygous deletion and methylation of p16(INK4A) gene in oral squamous cell carcinomas. *Cancer Lett*. 2001 Feb 26;163(2):221-8.
92. Tsai CH, Yang CC, Chou LS, Chou MY. The correlation between alteration of p16 gene and clinical status in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2001 Oct;30(9):527-31.
93. Matsuda H, Konishi N, Hiasa Y, Hayashi I, Tsuzuki T, Tao M, et al. Alterations of p16/CDKN2, p53 and ras genes in oral squamous cell carcinomas and premalignant lesions. *J Oral Pathol Med*. 1996 May;25(5):232-8.
94. El-Naggar AK, Lai S, Clayman GL, Zhou JH, Tucker SA, Myers J, et al. Expression of p16, Rb, and cyclin D1 gene products in oral and laryngeal squamous carcinoma: biological and clinical implications. *Hum Pathol*. 1999 Sep;30(9):1013-8.

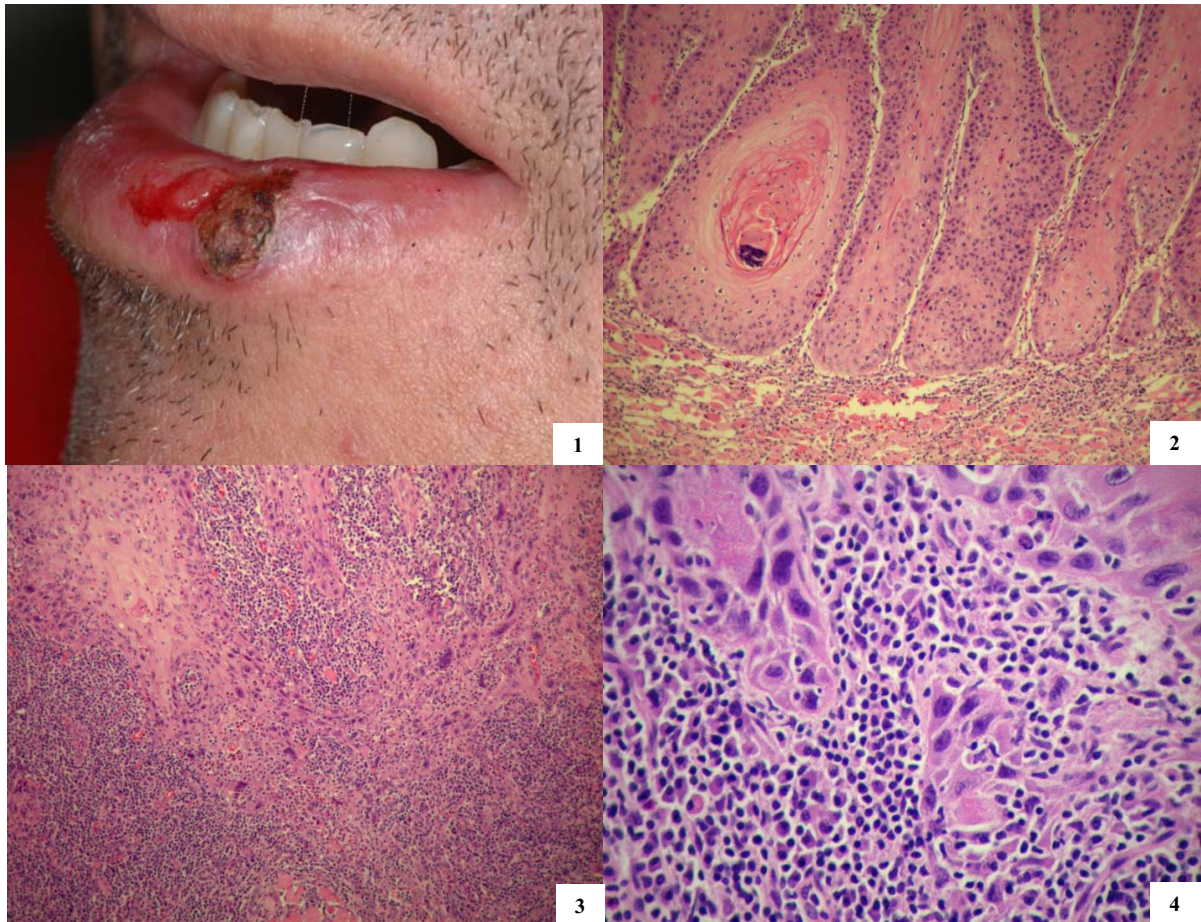
95. Jayasurya R, Sathyan KM, Lakshminarayanan K, Abraham T, Nalinakumari KR, Abraham EK, et al. Phenotypic alterations in Rb pathway have more prognostic influence than p53 pathway proteins in oral carcinoma. *Mod Pathol*. 2005 Aug;18(8):1056-66.
96. Sathyan KM, Sailasree R, Jayasurya R, Lakshminarayanan K, Abraham T, Nalinakumari KR, et al. Carcinoma of tongue and the buccal mucosa represent different biological subentities of the oral carcinoma. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2006 Sep;132(9):601-9.
97. De-Paula AMB, Cardoso SV, Gomez RS. Immunolocalization of TP53 e p16<sup>CDKN</sup> tumour suppressor genes proteins in invasive front of oral epidermoid carcinoma. *J Bras Patol Med Lab*. 2006;42(4):285-91.
98. Poi MJ, Yen T, Li J, Song H, Lang JC, Schuller DE, et al. Somatic INK4a-ARF locus mutations: a significant mechanism of gene inactivation in squamous cell carcinomas of the head and neck. *Mol Carcinog*. 2001 Jan;30(1):26-36.
99. Rocco JW, Sidransky D. p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. *Exp Cell Res*. 2001 Mar 10;264(1):42-55.
100. Natarajan E, Saeb M, Crum CP, Woo SB, McKee PH, Rheinwald JG. Co-expression of p16(INK4A) and laminin 5 gamma2 by microinvasive and superficial squamous cell carcinomas in vivo and by migrating wound and senescent keratinocytes in culture. *Am J Pathol*. 2003 Aug;163(2):477-91.
101. Eleuterio J, Jr., Giraldo PC, Goncalves AK, Cavalcante DI, de Almeida Ferreira FV, Mesquita SM, et al. Prognostic markers of high-grade squamous intraepithelial lesions: the role of p16INK4a and high-risk human papillomavirus. *Acta Obstet Gynecol Scand*. 2007;86(1):94-8.
102. Buajeeb W, Poomsawat S, Punyasingh J, Sanguansin S. Expression of p16 in oral cancer and premalignant lesions. *J Oral Pathol Med*. 2009 Jan;38(1):104-8.

103. Nakahara Y, Shintani S, Mihara M, Kiyota A, Ueyama Y, Matsumura T. Alterations of Rb, p16(INK4A) and cyclin D1 in the tumorigenesis of oral squamous cell carcinomas. *Cancer Lett.* 2000 Nov 10;160(1):3-8.
104. Thomsen LL, Miles DW. Role of nitric oxide in tumour progression: lessons from human tumours. *Cancer Metastasis Rev.* 1998 Mar;17(1):107-18.
105. Ekmekcioglu S, Ellerhorst JA, Mumm JB, Zheng M, Broemeling L, Prieto VG, et al. Negative association of melanoma differentiation-associated gene (mda-7) and inducible nitric oxide synthase (iNOS) in human melanoma: MDA-7 regulates iNOS expression in melanoma cells. *Mol Cancer Ther.* 2003 Jan;2(1):9-17.
106. Brennan PA, Palacios-Callender M, Umar T, Hughes D, Spedding AV, Zaki GA, et al. Correlation between type II nitric oxide synthase and p53 expression in oral squamous cell carcinoma. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2000 Dec;38(6):627-32.
107. Sappayatosok K, Maneerat Y, Swasdison S, Viriyavejakul P, Dhanuthai K, Zwang J, et al. Expression of pro-inflammatory protein, iNOS, VEGF and COX-2 in oral squamous cell carcinoma (OSCC), relationship with angiogenesis and their clinico-pathological correlation. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2009 Jul;14(7):E319-24.
108. Stauber RH, Mann W, Knauer SK. Nuclear and cytoplasmic survivin: molecular mechanism, prognostic, and therapeutic potential. *Cancer Res.* 2007 Jul 1;67(13):5999-6002.
109. Kawasaki H, Altieri DC, Lu CD, Toyoda M, Tenjo T, Tanigawa N. Inhibition of apoptosis by survivin predicts shorter survival rates in colorectal cancer. *Cancer Res.* 1998 Nov 15;58(22):5071-4.
110. Adida C, Haioun C, Gaulard P, Lepage E, Morel P, Briere J, et al. Prognostic significance of survivin expression in diffuse large B-cell lymphomas. *Blood.* 2000 Sep 1;96(5):1921-5.
111. Tanaka K, Iwamoto S, Gon G, Nohara T, Iwamoto M, Tanigawa N. Expression of survivin and its relationship to loss of apoptosis in breast carcinomas. *Clin Cancer Res.* 2000 Jan;6(1):127-34.



112. Lo Muzio L, Staibano S, Pannone G, Mignogna MD, Mariggio A, Salvatore G, et al. Expression of the apoptosis inhibitor survivin in aggressive squamous cell carcinoma. *Exp Mol Pathol*. 2001 Jun;70(3):249-54.
113. Sui L, Dong Y, Ohno M, Watanabe Y, Sugimoto K, Tokuda M. Survivin expression and its correlation with cell proliferation and prognosis in epithelial ovarian tumors. *Int J Oncol*. 2002 Aug;21(2):315-20.
114. Li F, Yang J, Ramnath N, Javle MM, Tan D. Nuclear or cytoplasmic expression of survivin: what is the significance? *Int J Cancer*. 2005 Apr 20;114(4):509-12.
115. Lin CY, Hung HC, Kuo RC, Chiang CP, Kuo MY. Survivin expression predicts poorer prognosis in patients with areca quid chewing-related oral squamous cell carcinoma in Taiwan. *Oral Oncol*. 2005 Jul;41(6):645-54.
116. Marioni G, Bedogni A, Giacomelli L, Ferraro SM, Bertolin A, Facco E, et al. Survivin expression is significantly higher in pN+ oral and oropharyngeal primary squamous cell carcinomas than in pN0 carcinomas. *Acta Otolaryngol*. 2005 Nov;125(11):1218-23.
117. Jane C, Nerurkar AV, Shirsat NV, Deshpande RB, Amrapurkar AD, Karjodkar FR. Increased survivin expression in high-grade oral squamous cell carcinoma: a study in Indian tobacco chewers. *J Oral Pathol Med*. 2006 Nov;35(10):595-601.
118. Engels K, Knauer SK, Metzler D, Simf C, Struschka O, Bier C, et al. Dynamic intracellular survivin in oral squamous cell carcinoma: underlying molecular mechanism and potential as an early prognostic marker. *J Pathol*. 2007 Apr;211(5):532-40.
119. Ambrosini G, Adida C, Altieri DC. A novel anti-apoptosis gene, survivin, expressed in cancer and lymphoma. *Nat Med*. 1997 Aug;3(8):917-21.
120. Mirza A, McGuirk M, Hockenberry TN, Wu Q, Ashar H, Black S, et al. Human survivin is negatively regulated by wild-type p53 and participates in p53-dependent apoptotic pathway. *Oncogene*. 2002 Apr 18;21(17):2613-22.

121. Lu B, Gonzalez A, Massion PP, Shyr Y, Shaktour B, Carbone DP, et al. Nuclear survivin as a biomarker for non-small-cell lung cancer. *Br J Cancer*. 2004 Aug 2;91(3):537-40.
122. Grabowski P, Kuhnel T, Muhr-Wilkenshoff F, Heine B, Stein H, Hopfner M, et al. Prognostic value of nuclear survivin expression in oesophageal squamous cell carcinoma. *Br J Cancer*. 2003 Jan 13;88(1):115-9.
123. Qi G, Kudo Y, Ando T, Tsunematsu T, Shimizu N, Siriwardena SB, et al. Nuclear Survivin expression is correlated with malignant behaviors of head and neck cancer together with Aurora-B. *Oral Oncol*. Apr;46(4):263-70.
124. Kim YH, Kim SM, Kim YK, Hong SP, Kim MJ, Myoung H. Evaluation of survivin as a prognostic marker in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. May;39(5):368-75.

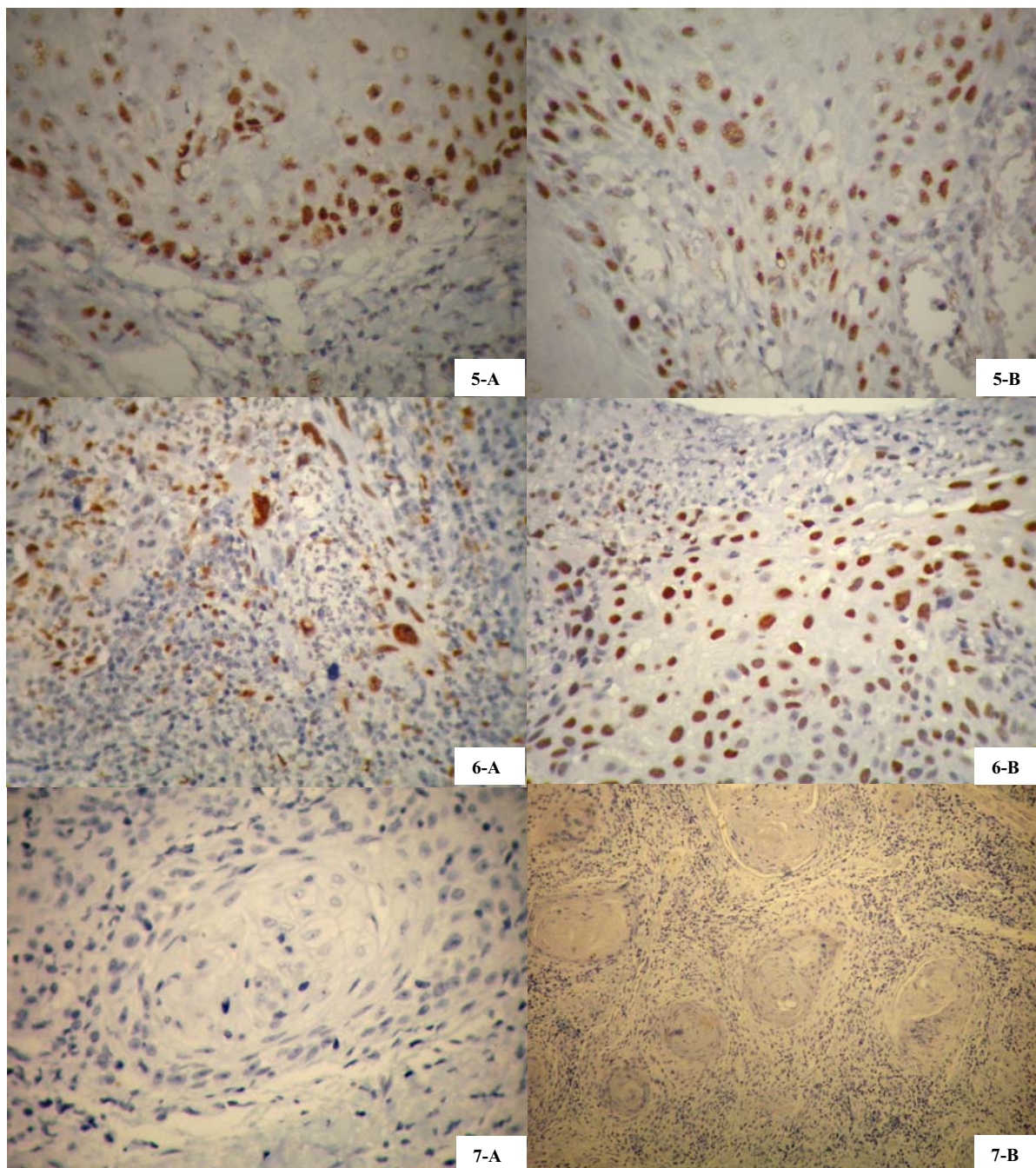


**Figura 1.** Carcinoma espinocelular: lesão ulcerada, recoberta por crosta e com base infiltrada.

**Figura 2.** Carcinoma espinocelular bem diferenciado: invasão do tipo expansiva, com clara delimitação do fronte de invasão. HE X 100.

**Figura 3.** Carcinoma espinocelular pouco diferenciado: fronte de invasão infiltrativo, sem clara delimitação do tumor. Infiltrado inflamatório ativo e expressivo. HE X 200.

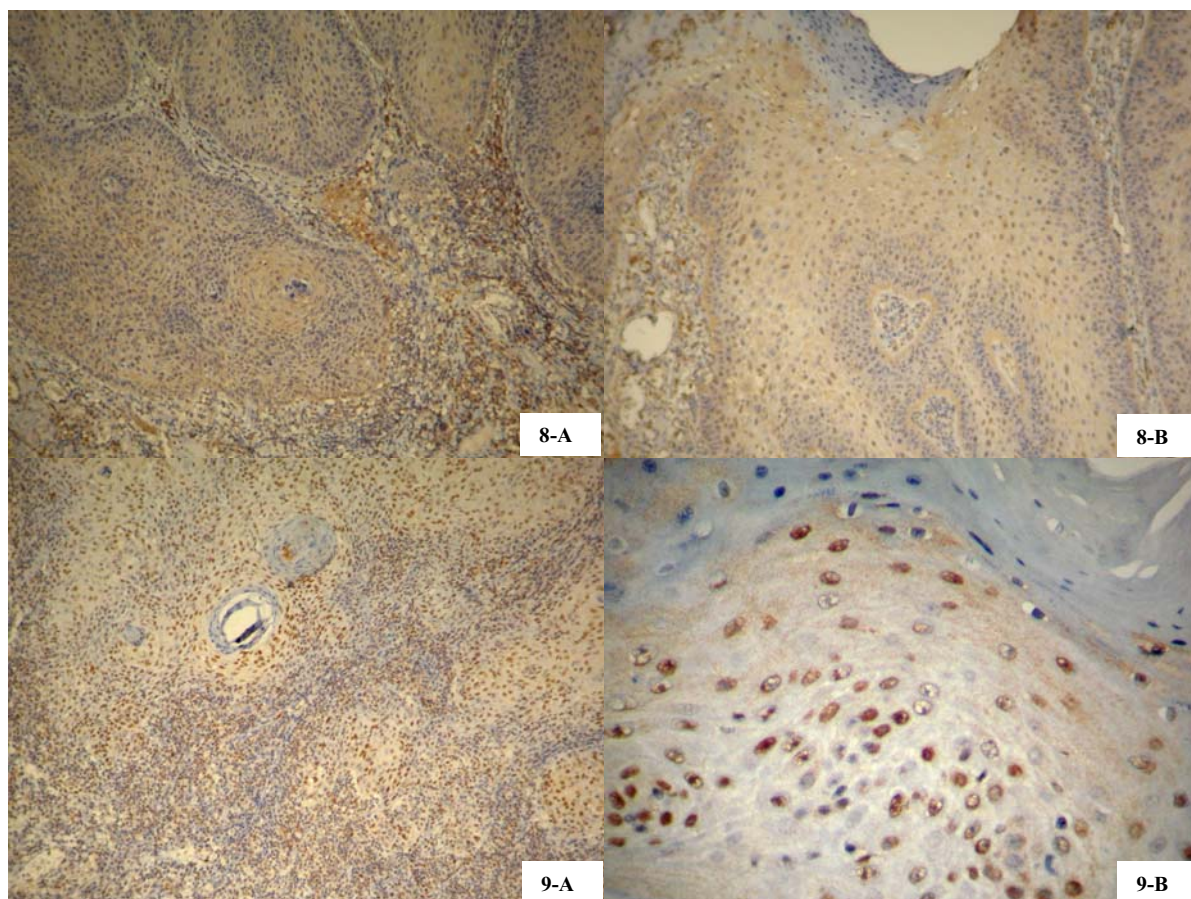
**Figura 4.** Carcinoma espinocelular pouco diferenciado: fronte de invasão com blocos de células e células isoladas. Infiltrado linfoplasmocitário ativo. HE X 400.



**Figuras 5-A e B.** Expressão imunoistoquímica da p53 na região do frente de invasão e superfície tumoral respectivamente. X 200; X 100.

**Figuras 6-A e B.** Expressão imunoistoquímica da p21 na região do frente de invasão e superfície tumoral respectivamente. X 200.

**Figuras 7-A e B.** Expressão imunoistoquímica da p16 na região do frente de invasão e superfície tumoral respectivamente. X 200; X 100.



**Figuras 8-A e B.** Expressão imunohistoquímica da i-NOS na região do fronte de invasão e superfície tumoral respectivamente.

**Figuras 9-A e B.** Expressão imunohistoquímica da survivina na região do fronte de invasão e superfície tumoral respectivamente.

**Tabela 1. Anticorpos primários utilizados na reação de imunoistoquímica e suas especificações**

<b>Anticorpo</b>	<b>Clone</b>	<b>Código do catálogo</b>	<b>Diluição</b>	<b>Fabricante</b>
Anti-p53	Monoclonal clone DO-7	M7001-1	1:100	DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA
Anti-p21	Monoclonal clone SX118	M7202-129	1:300	DakoCytomation, Carpinteria, CA, USA
Anti p-16	Monoclonal CINtek Histology Kit Clone E6H4	9511	RTU	MTM Laboratories AG, Heidelberg , Germany
Anti-survivina	Policlonal de coelho	71G4B7E	1:600	Cell Signaling Technology Danvers, MA, USA
Anti-iNOS	Policlonal de coelho	RB-9242-P1	1:200	Thermo Fisher Scientific -Lab Vision - NeoMarkers, Fremont , CA, USA

**Tabela 2. Estadiamento clínico (TNM) e grau de diferenciação histológica dos carcinomas espinocelulares do lábio inferior**

<b>Estadios clínicos</b>	<b>Diferenciação tumoral</b>		
	<b>Grau 1</b>	<b>Grau 2</b>	<b>Total</b>
<b>Estadio clínico I</b>	10 (47,62%)	7 (33,33%)	17 (80,95%)
<b>Estadio clínico II</b>	1 (4,76%)	2 (9,52%)	3 (14,29%)
<b>Estadio clínico III</b>	0 (0,00%)	1 (4,76%)	1 (4,76%)
<b>Total</b>	11 (52,38%)	10 (47,62%)	21 (100,00%)

**Tabela 3. Frequencia e porcentagem de células imunomarcadas na mucosa oral normal**

Escore	Imunomarcadores						
	i-NOS	p21 basal	p21 suprabasal	p53 basal	p53 suprabasal	Survivina citoplasma	Survivina núcleo
<b>0</b>	3 (10,34%)	1 (3,57%)	1 (3,57%)	1 (3,57%)	1 (3,57%)	1 (3,70%)	1 (3,70%)
<b>1</b>	11 (37,93%)	0 (0,00%)	26 (92,80%)	0 (0,00%)	6 (21,43%)	1 (3,70%)	1 (3,70%)
<b>2</b>	13 (44,83%)	0 (0,00%)	1 (3,57%)	2 (7,14%)	19 (67,86%)	13 (48,15%)	7 (25,93%)
<b>3</b>	2 (6,90%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	2 (7,14%)	11 (40,74%)	15 (55,56%)
<b>4</b>	0 (0,00%)	27 (96,43%)	0 (0,00%)	25 (89,29%)	0 (0,00%)	1 (3,70%)	3 (11,11%)
<b>TOTAL</b>	29 (100%)	28 (100%)	28 (100%)	28 (100%)	28 (100%)	27 (100%)	27 (100%)

**Tabela 4. Frequencia e porcentagem de células imunomarcadas na região do fronte de invasão do carcinoma espinocelular do lábio inferior**

Escore	Imunomarcadores				
	i-NOS	p21	p53	Survivina citoplasma	Survivina núcleo
<b>0</b>	0 (0,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	1 (5,00%)	0 (0,00%)
<b>1</b>	6 (30,0%)	9 (45,0%)	1 (5,00%)	17 (85,0%)	0 (0,00%)
<b>2</b>	2 (10,0%)	7 (35,0%)	4 (20,0%)	1 (5,00%)	6 (30,0%)
<b>3</b>	12 (60,0%)	4 (20,0%)	7 (35,0%)	1 (5,00%)	14 (70,0%)
<b>4</b>	0 (0,00%)	0 (0,00%)	8 (40,0%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)
<b>TOTAL</b>	20 (100,0%)	20 (100,0%)	20 (100,0%)	20 (100,0%)	20 (100,0%)

**Tabela 5. Frequencia e porcentagem de células imunomarcadas na superfície do carcinoma espinocelular do lábio inferior**

Escore	Imunomarcadores				
	i-NOS	p21	p53	Survivina citoplasma	Survivina núcleo
<b>0</b>	0 (0,00%)	0 (0,00%)	0 (0,00%)	5 (25,0%)	1 (5,00%)
<b>1</b>	5 (30,0%)	5 (25,0%)	2 (10,0%)	12 (50,0%)	3 (15,0%)
<b>2</b>	7 (35,0%)	11 (55,0%)	4 (20,0%)	1 (5,00%)	9 (45,0%)
<b>3</b>	7 (35,0%)	3 (15,0%)	8 (40,0%)	2 (10,0%)	5 (25,0%)
<b>4</b>	0 (0,00%)	1 (5,00%)	6 (30,0%)	0 (0,00%)	2 (10,0%)
<b>TOTAL</b>	19 (100,0%)	20 (100,0%)	20 (100,0%)	20 (100,0%)	20 (100,0%)



**Tabela 6. Análise comparativa da expressão imunoistoquímica da p21, p53, i-NOS e sobrevivina no carcinoma espinocelular do lábio e mucosa oral normal**

Grupos de estudo	Imunomarcadores (Média±DP)				
	Camadas epiteliais	p21	p53	i-NOS	Sobrevivina
Normal	Basal	3,86±0,76 <sup>c; d; *; 3; 2; 6</sup>	3,71±0,90 <sup>c; d; *; 3; 2; 6</sup>	1,48±0,78 <sup>7</sup>	Núcleo 2,67±0,88 <sup>3; 7; 8</sup>
	Suprabasal	1,00±0,27	1,79±0,63 <sup>7</sup>		Citoplasma 2,37±0,79 <sup>e; f; 3; 7; 8</sup>
CEC	Fronte de invasão	1,78±0,69 <sup>*; 2</sup>	3,09±0,80 <sup>*; 2; 3; 4; 6</sup>	2,28±0,82 <sup>b; 2; 4</sup>	Núcleo 2,68±0,48 <sup>5; 4; 3</sup>
	Superfície	2,03±0,759 <sup>*; 2</sup>	2,89±0,89 <sup>*; 2; 3; 4; 6</sup>	2,09±0,85 <sup>b; 2</sup>	Citoplasma 1,17±0,61
					Núcleo 2,22±0,90
					Citoplasma 1,03±0,88

CEC: carcinoma espinocelular do lábio; DP: desvio padrão.

\*  $p < 0,05$  em relação à camada suprabasal da mucosa normal do mesmo imunomarcador;

<sup>b</sup>  $p < 0,05$  em relação à mucosa normal do mesmo imunomarcador;

<sup>c</sup>  $p < 0,05$  em relação ao fronte de invasão do mesmo imunomarcador;

<sup>d</sup>  $p < 0,05$  em relação à superfície do carcinoma do mesmo imunomarcador;

<sup>e</sup>  $p < 0,0001$  em relação à imunoexpressão citoplasmática do fronte de invasão do mesmo imunomarcador;

<sup>f</sup>  $p < 0,0001$  em relação à imunoexpressão citoplasmática da superfície do carcinoma do mesmo imunomarcador;

<sup>2</sup>  $p < 0,05$  em relação à imunoexpressão citoplasmática da sobrevivina do mesmo grupo;

<sup>3</sup>  $p < 0,05$  em relação à imunoexpressão da i-NOS do mesmo grupo

<sup>4</sup>  $p < 0,05$  em relação à imunoexpressão da p21 do mesmo grupo;

<sup>5</sup>  $p = 0,0118$  em relação à imunoexpressão nuclear de sobrevivina da superfície do carcinoma;

<sup>6</sup>  $p < 0,05$  em relação à imunoexpressão nuclear de sobrevivina do mesmo grupo;

<sup>7</sup>  $p < 0,05$  em relação à imunoexpressão da p21 na camada suprabasal do mesmo grupo;

<sup>8</sup>  $p < 0,0001$  em relação à imunoexpressão da p53 na camada suprabasal do mesmo grupo.

**Tabela 7. Quadro demonstrativo dos marcadores que expressaram significância ( $p < 0,05$ ) da correlação do estudo imunoistoquímico dentro do mesmo grupo**

Grupos de estudo	Imunomarcadores				
	Camadas epiteliais	p21	p53	i-NOS	Survivina
Normal	Basal	i-NOS; Survivina núcleo e citoplasma	i-NOS; Survivina núcleo e citoplasma	p21 suprabasal	Núcleo p21 suprabasal; p53 suprabasal; i-NOS
	Suprabasal		p21		Citoplasma p21 suprabasal; p53 suprabasal; i-NOS
CEC	Fronte de invasão		i-NOS; p21; Survivina núcleo e citoplasma	p21; Survivina citoplasma	Núcleo p21; i-NOS
	Superfície	Survivina citoplasma	i-NOS; p21; Survivina núcleo e citoplasma	Survivina citoplasma	Citoplasma p21

CEC: carcinoma espinocelular do lábio

## **Conclusões**

## CONCLUSÕES

1. Os fototipos de I-III constituíram 97,2% da amostra e confirmaram a suscetibilidade da pele clara à ocorrência da queilite actínica.
2. O sexo masculino e profissões relacionadas à exposição solar confirmaram os dados observados na literatura para a queilite actínica e para o carcinoma espinocelular do lábio.
3. Lesões de padrão eritematoso, com presença de ulceração/exulceração, edema e infiltração foram marcadores clínicos de gravidade para a queilite actínica.
4. A presença de vasodilatação foi o único achado histológico que se correlacionou com a gravidade clínica da queilite actínica.
5. Displasia epitelial e elastose solar estiveram presentes em praticamente todos os casos, independente da gravidade clínica da queilite actínica.
6. Os tumores com estadios clínicos mais avançados apresentaram maior espessura e maior número de mitoses.
7. As neoplasias com frente de invasão infiltrativo foram as mais espessas, com predomínio de resposta inflamatória ativa e presença de plasmócitos.
8. Não houve diferença significativa na expressão das proteínas no frente de invasão e na superfície tumoral.
9. Também não foi observada diferença entre a expressão nuclear e citoplasmática da survivina.
10. A expressão da p16 não se mostrou significativa na queilite actínica e no câncer de lábio.
11. A expressão aumentada da p53, p21, survivina e i-NOS evidenciam o papel destas proteínas nos eventos iniciais da carcinogênese labial, podendo ser importantes marcadores de malignidade.

# **Anexos**

## Apêndice 1. Dados demográficos, clínicos e histopatológicos dos pacientes com de queilite actínica

Dados clínicos

Dados histológicos

Nº	Sexo	Id	Foto- tipo	Prof.	Cor lesão	Atrof.	Desc.	Perda def	Leuco- plasia	Fis.	Edema	Crosta	Úlcera/ Exulc.		Hipq.	Para.	Orto.	Hippl.	Atrof.	Displ.	Elas.	Inf.	Vasod.	Úlce.	Mit.
													Crosta	Exulc.											
3	M	70	II	1	2	1	2	1	1	1	2	2	2	2	1	1	1	2	1	1	2	0	0	0	
4	F	71	III	1	1	1	1	1	2	2	2	2	2	2	1	1	1	1	0	1	2	1	1	0	
6	M	72	III	2	1	1	2	1	2	2	1	2	2	2	2	1	2	2	1	2	2	2	1	0	
7	M	53	II	2	2	1	1	1	1	1	1	2	1	3	3	1	3	3	1	1	2	0	1	0	
8	M	28	IV	3	2	2	2	2	1	1	1	2	2	2	1	0	1	1	0	1	1	1	2	0	
9	M	70	II	1	2	1	2	1	1	2	2	2	2	2	2	0	2	2	1	2	2	1	2	0	
10	M	63	II	6	1	1	2	1	1	2	2	2	2	2	2	1	2	2	1	1	2	2	1	0	
11	M	59	II	2	2	1	2	1	1	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	2	3	0	0	0	
12	M	70	III	1	2	1	2	1	1	2	1	2	2	2	2	1	2	2	1	2	2	1	1	0	
14	M	64	II	3	2	1	2	1	1	2	1	2	1	3	2	2	2	2	1	2	3	1	1	0	
16	M	54	II	4	1	1	2	1	2	2	1	2	2	2	1	1	1	1	0	2	3	1	1	0	
17	M	73	II	1	2	1	2	1	1	2	2	2	2	2	3	0	3	3	0	2	0	3	2	0	
18	M	80	II	1	2	1	2	1	1	2	1	2	1	3	2	2	2	2	0	3	2	2	1	0	
19	M	72	III	1	1	1	2	1	2	2	2	2	2	2	1	1	1	2	0	1	2	0	1	0	
20	F	60	III	1	1	1	2	1	1	2	2	2	2	2	1	1	1	3	1	2	3	1	2	0	
21	M	70	III	2	2	1	2	1	1	2	1	2	2	2	1	1	1	2	1	2	2	0	2	0	
22	M	64	III	1	1	1	2	1	1	2	1	2	2	2	2	0	2	2	2	2	3	0	2	0	
23	M	43	III	3	2	1	2	1	2	1	1	1	3	1	0	1	1	2	0	2	2	0	1	0	
24	M	73	II	5	1	1	2	1	2	2	1	2	1	2	2	1	2	3	0	2	1	2	2	0	
25	M	65	II	7	2	1	1	1	2	2	1	2	2	2	2	2	2	3	3	2	3	1	1	0	
26	F	68	I	8	2	1	2	1	1	2	1	2	1	3	2	0	2	2	1	2	2	2	1	0	
27	M	41	III	3	2	1	2	1	1	2	2	2	2	1	2	1	2	2	1	1	2	1	2	0	
28	M	72	II	9	2	1	2	1	2	2	2	2	2	2	0	2	2	1	3	2	2	1	2	0	
29	M	63	III	2	1	1	2	1	1	2	2	2	2	1	1	1	1	2	2	2	2	3	2	0	
30	M	63	III	6	2	1	2	1	1	2	1	2	2	3	2	2	0	2	0	2	2	1	1	0	
31	M	50	III	1	2	1	2	1	1	2	1	2	1	3	2	1	2	1	2	2	2	3	1	0	
32	M	70	III	2	2	1	2	1	1	2	1	2	2	2	1	1	1	0	2	2	1	2	1	0	
33	M	75	III	1	2	1	2	1	1	2	2	2	2	1	1	1	0	0	2	2	2	0	1	0	
34	F	35	I	2	2	1	2	1	1	2	1	2	2	2	2	1	2	2	2	2	3	0	1	0	
35	F	49	II	2	2	1	2	1	1	1	2	2	1	2	1	0	1	2	1	2	2	2	1	1	
36	F	60	II	8	2	1	2	1	1	2	1	2	2	2	2	2	2	2	1	0	2	2	1	0	

Legenda: Id: idade; Sexo (M: masculino; F: feminino); Fototipo(I: ruivo, II: loiro - olhos claros, III: moreno - pele clara, IV: moreno - pele escura; V: mulato, VI negro); Prof: profissão (1: lavrador aposentado, 2: lavrador, 3: tratorista, 4: pedreiro, 5: serviços gerais aposentado, 6: serviços gerais, 7: carpinteiro, 8: prendas domésticas, 9: guarda noturno aposentado); Cor da lesão (1: branca, 2: branca e vermelha); Atrof: atrofia; Desc: descamação\*; Perda Defini: perda definição\*; Leucoplasia\*: Edema\*; Crosta\*: Úlcera/exulc: úlcera/exulceração\*; Grav. Clínica: gravidade clínica\*; Hipq: hiperparaqueratose\*; Para: paraqueratose\*; Orto: ortoqueratose\*; Hippl: hiperplasia\*; Atrof: atrofia\*; Displ: displasia\*; Inf: infiltrado inflamatório\*; Vasod: vasodilatação\*; Úlce: ulceração\*; Mit: mitose (quantidade de células em 3 campos). \* 0 ausente, 1 presença, 2 ausência. \*\* 0 nula, 1 leve, 2 moderada, 3 grave.

## Apêndice 2. Dados demográficos, clínicos e histopatológicos dos pacientes com carcinoma espinocelular do lábio.

Dados clínicos										Dados histológicos									
Nº	Sexo	Cor	Idade	Profissão	TNM	Estadio	Grad. Histo.	Resp. Infl.	Intens. Infl.	Plasmócitos	Linfócitos	Eosinófilos	Espessura mm	Fronte invasão	Apoptoses	Mitoses			
4	M	1	47	2	T1N0M0	I	G2	1	3	3	1	1	2,1	2	1	4			
7	M	1	77	4	T1N0M0	I	G1	1	3	0	3	1	4,7	1	3	3			
8	M	1	73	1	T2N0M0	II	G1	2	2	1	2	1	4,55	1	56	6			
12	M	1	46	3	T1N0M0	I	G1	1	3	3	3	2	2,8	2	30	3			
13	M	1	40	4	T1N0M0	I	G1	1	3	3	1	0	0,75	1	6	1			
17	F	1	66	8	T1N0M0	I	G2	1	3	3	3	1	2,7	2	8	4			
18	F	1	89	1	T1N0M0	I	G2	2	1	1	1	0	0,6	1	1	3			
19	M	1	50	5	T1N0M0	I	G1	1	3	2	3	1	1,2	1	3	3			
20	F	1	74	2	T1N0M0	I	G1	1	2	1	2	1	2,2	1	3	1			
23	M	1	75	1	T1N0M0	I	G2	1	3	3	1	1	1,6	2	2	13			
27	M	1	76	1	T1N0M0	I	G1	1	2	1	2	1	5	2	22	1			
31	F	1	56	8	T1N0M0	I	G2	2	2	1	2	1	2	1	16	22			
32	M	1	67	1	T4N1Mx	IV A	G2	1	3	3	2	0	15	2	9	5			
33	M	1	47	7	T1N0M0	I	G2	1	3	2	3	2	6	2	11	7			
34	M	1	77	1	T1N0M0	I	G2	1	2	2	2	0	4,1	2	31	9			
36	M	1	41	9	T1N0M0	I	G1	1	2	2	2	0	3,1	2	12	14			
37	F	1	80	8	T1N0M0	I	G1	2	2	2	2	0	3,5	1	16	29			
45	M	1	35	3	T1N0M0	I	G1	1	3	3	2	1	4	2	17	14			
46	M	1	51	6	T2N0M0	II	G2	1	3	2	3	1	5,3	2	10	4			
48	M	1	49	2	T1N0M0	I	G1	1	2	2	2	0	2,6	2	40	23			
49	F	1	85	8	T2N0M0	II	G2	1	3	3	2	1	6	2	147	0			

Legenda: Sexo (M: masculino; F: feminino); Cor (1 branco); Profissão (1: lavrador aposentado, 2: lavrador, 3: tratador, 4: pedreiro, 5: serviços gerais aposentado, 6: serviços gerais, 7: carpinteiro, 8: prendas domésticas, 9: guarda noturno aposentado); TNM (T1: tumor com 2 cm ou menos em sua maior dimensão; T2: tumor maior que 2 cm e até 4 cm; T4: tumor invade as estruturas adjacentes. N0: ausência de metástase em linfonodos regionais; N1: linfonodo homo-lateral, único = 3 cm; M0: ausência de metástase à distância; Mx: metástase não pode ser avaliada); Estadio (I: T1N0M0, II: T2N0M0, IV: T4a, N1, N2 ou N3, M0, Mx). Grad. Histo: Graduação Histológica (G1: bem diferenciado, G2: moderadamente diferenciado); Resp. Infi: Resposta Inflamatória (1: ativa; 2: passiva); Intens. Infi: Intensidade Inflamatória\*; Plasmócitos\*, Linfócitos\*, Eosinófilos\*; Fronte de invasão (1: expansivo, 2: infiltrativo sem células isoladas, 3: infiltrativo com células isoladas); Apoptose (quantidade de células em 3 campos); Mitose (quantidade de células em 3 campos). \* 1: leve, 2: moderada, 3: intensa.



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 coordenação: tsarden@fmb.unesp.br



Registrado no Ministério da Saúde em 30 de abril de 2007

Botucatu, 03 de novembro de 2008

Of. 494/08-CEP

Ilustríssimo Senhor  
Prof. Dr. Silvio Alencar Marques  
Departamento de Dermatologia da


Prezado Dr. Silvio,

De ordem do Senhor Coordenador deste CEP, informo que o Projeto de Pesquisa "Expressão da apoptose e óxido nítrico em quelites actínicas e carcinomas espinocelulares do lábio inferior", a ser conduzido por Renata Aparecida Martinez Antunes Ribeiro Vieira, orientada por Vossa Senhoria, Co-orientada pela Profª Drª Mariângela Esther Alencar Marques, com a colaboração do Dr. Daniel Araki Ribeiro, recebeu do relator parecer favorável, aprovado em reunião de 04/08/2.008.

A recomendação contida no ofício 332/2008 foi satisfatoriamente atendida.

Situação do Projeto: **APROVADO**. Apresentar Relatório Final de Atividades ao final da execução deste projeto.

Atenciosamente,

  
Alberto Santos Capelluppi  
Secretário do CEP.