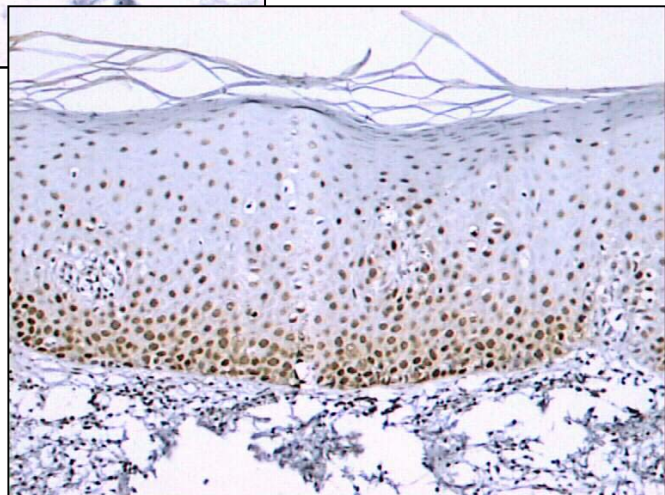
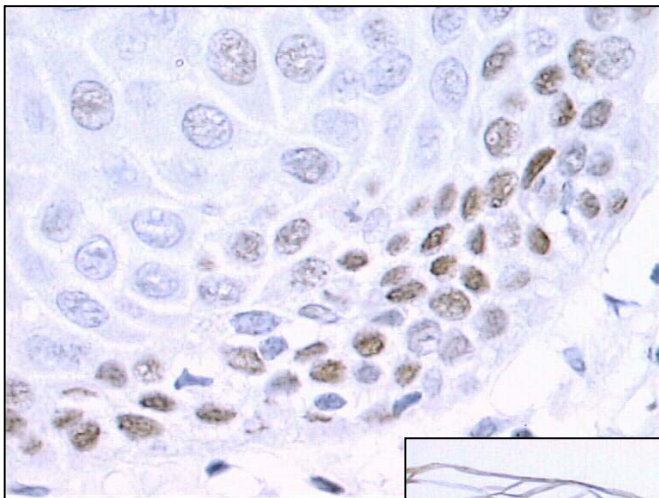


MELAINE DE ALMEIDA LAWALL

**EXPRESSÃO DO PCNA E p53 EM
LEUCOPLASIAS DE MUCOSA JUGAL
COM DIFERENTES GRAUS DE
QUERATINIZAÇÃO
(GRAUS I, II E III DE GRINSPAN)**



MELAINE DE ALMEIDA LAWALL

**EXPRESSÃO DO PCNA E p53 EM LEUCOPLASIAS DE MUCOSA
JUGAL COM DIFERENTES GRAUS DE QUERATINIZAÇÃO
(GRAUS I, II E III DE GRINSPAN)**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, Campus de Araçatuba, para obtenção do título de Mestre, pelo Curso de Pós-graduação em Odontologia.

Área de Concentração: Estomatologia.

Orientador: Prf. Dr. Marcelo Macedo Crivelini

Araçatuba

2003

DEDICATÓRIA

- A Deus, que me proporciona saúde, fé e companhia para transpor os obstáculos de minha vida.
- Aos meus pais, Claudinê do Valle Lawall e Maria de Lourdes de Almeida Lawall, meus maiores exemplos. Aqueles que me ensinaram a ver o mundo real e ao mesmo tempo a perseguir todos os meus sonhos.
- Aos meus irmãos Marisa, Júlio, Mônica e Augusto que apesar de distante, estiveram sempre presentes em cada passo do meu caminho.
- Ao meu querido namorado José Flavio Affonso de Almeida, que esteve do meu lado em todos os instantes me estimulando e auxiliando. Por todo amor e compreensão.

“Se ninguém te ama, minha alegria é te amar.

Se choras, quero consolar-te.

Se és fraco, dar-te-ei minha força.

Se ninguém precisa de ti, eu te procuro.

Se és inútil, eu não posso passar sem ti.”

J. Fernández Maraties

AGRADECIMENTOS

- Ao Professor Marcelo Macedo Crivelini, pela competência e eficiência com que conduziu a orientação deste trabalho.
- Aos Professores Renata Callestini, Norberto Perri Moraes, Glauco Issamu Miyahara, Alvimar Lima de Castro, Éder Ricardo Biazzola, Elerson Gaetti Jardim Júnior e Gilson Machado D'antonio, pelos ensinamentos transmitidos durante toda a minha jornada.
- Aos professores Ana Maria Pires Soubhia, Cléa Adas Saliba Garbin e Wilson Roberto Poi que foram grandes mestres e mais que isso, grandes amigos durante todo o curso.
- Ao professor Eloi Dezan Júnior, pela ajuda na realização do trabalho e pela amizade.

“Os professores ideais são os que se fazem de pontes, que convidam os alunos a atravessar e depois, tendo facilitado a travessia, desmoronam-se com prazer, encorajando-os a criarem as suas próprias pontes.”

- Aos funcionários do Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica, Elaine Cristina Francischini Ferreira, José Carlos de Mendonça Neto, José Marcelo Tramarim, Luzia Maria de Oliveira Francischini, Maria Aparecida Martins da Silva, Marli Barbosa dos Santos e Washington de Brito Martins, pela colaboração, carinho e ajuda inestimável que me prestaram, o meu especial agradecimento.
 - Aos amigos do curso de pós-graduação, que lutaram comigo nesta jornada, pelo espírito de solidariedade nos momentos difíceis e na expectativa de uma amizade duradoura.
 - Aos meus queridos Vera Lúcia Gomes Affonso de Almeida e Honor Affonso de Almeida, que foram verdadeiros pais durante todo esse tempo.
 - A minhas queridas amigas Thaís Gebrim Costa, Mirna Sato Nacano, Virgínia Ruiz Zimmer, Thaís Mara Manfrin e Livia Guimarães Zina que tanto me estimularam a lutar pela realização desse sonho.
 - À Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo – FAPESP – por ter viabilizado o desenvolvimento desse trabalho.
-

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS -----	8
LISTA DE TABELAS -----	9
LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS -----	10
1 INTRODUÇÃO -----	13
2 REVISÃO DA LITERATURA -----	16
2.1 Conceito e terminologia -----	16
2.2 Etiologia -----	19
2.3 Associação com <i>Candida sp.</i> -----	21
2.4 Epidemiologia -----	23
2.5 Aspectos Clínicos -----	23
2.6 Histopatologia -----	27
2.7 Classificação de Grinspan -----	33
2.8 Pré-malignidade e Transformação Maligna -----	33
2.8.1 AgNOR e transformação maligna -----	45
2.9 Imuno-histoquímica -----	47
2.9.1 p53 -----	47
2.9.2 PCNA -----	55
3 PROPOSIÇÃO -----	62
4 MATERIAL E MÉTODO -----	64
4.1 Seleção dos casos e análise morfológica -----	64
4.2 Imuno-histoquímica -----	65

5 RESULTADO	70
5.1 Morfologia	70
5.2 p53	71
5.3 PCNA	72
5.4 Análise Estatística	73
5.5 Tabelas	75
5.6 Figuras	78
6 DISCUSSÃO	85
7 CONCLUSÃO	98
8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	100
RESUMO	115
ABSTRACT.....	117

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Hiperqueratose em leucoplasia Grau I de Grinspan. H.E. 200x. -----	77
Figura 2 - Hiperqueratose em leucoplasia Grau II de Grinspan. H.E. 200x. -----	77
Figura 3 - Hiperparaqueratose e papilomatose em leucoplasia Grau III de Grinspan. H.E.50x. -----	78
Figura 4 - Expressão basal e parabasal do p53. Leucoplasia Grau I de Grinspan. 400x. -----	78
Figura 5 - Expressão basal e parabasal do p53. Leucoplasia Grau II de Grinspan. 400x. -----	79
Figura 6 - Expressão basal do p53. Leucoplasia Grau III de Grinspan. 400x. -----	79
Figura 7 - Marcação utilizada na contagem de células no epitélio de uma das leucoplasias (Grau I de Grinspan) com expressão do p53. 400x. -----	80
Figura 8 - Expressão do PCNA nas camadas basal, parabasal e espinhosa de leucoplasia Grau I de Grinspan. 200x. -----	80
Figura 9 - Expressão do PCNA nas camadas basal, parabasal e espinhosa de leucoplasia Grau II de Grinspan. 200x. -----	81
Figura 10- Expressão do PCNA restringindo-se às camadas basal e parabasal em leucoplasia Grau III de Grinspan. 100x. ----	81
Figura 11- Marcação utilizada na contagem de células no epitélio de uma das leucoplasias (Grau I de Grinspan) com expressão do PCNA. 200x. -----	82

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Anticorpos empregados _____	68
Tabela 2 - Dados clínicos referentes às lesões estudadas _____	75
Tabela 3 - Número de células coradas pelo p53 em extensão epitelial de aproximadamente 19.500 μm (Aumento de 400)_____	75
Tabela 4 - Número de células coradas pelo PCNA em extensão epitelial de aproximadamente 19.500 μm (Aumento de 400x)_____	76
Tabela 5 - Análise de variância do número de células coradas pelo p53_	76
Tabela 6 - Análise de variância do número de células coradas pelo PCNA _____	76

LISTA DE ABREVIATURAS E SÍMBOLOS

°C = graus Celsius

% = porcentagem

µm = micrômetro

AgNOR = do inglês “Argiophilic Nucleolar Organizer Region”, nome dado a técnica de impregnação das NORs pela prata (Ag)

bcl2= proteína bcl2

BSA = do inglês “Bovine serum albumine”, traduzido como albumina sérica bovina

D1 = ciclina D1

DNA = do inglês “Deoxyribonucleic acid”, traduzido como ácido desoxirribonucléico

DO-7 = anticorpo anti-p53

G1 = do inglês “Gap”, traduzido como intervalo G1. É o intervalo pós-mitótico e pré-síntese de DNA

G2 = do inglês “Gap”, traduzido como intervalo G2. É o intervalo durante o qual não ocorre síntese de DNA

GMC 7,07 = programa de computador

H&E = hematoxilina e eosina

H₂O₂ = dióxido de hidrogênio

HCl = cloreto de hidrogênio

KD = Kilo-dalton, unidade de peso molecular

Ki-67 = antígeno ki-67

MDM2 = gene MDM2

mM = mili-molar

NORs = do inglês “Nucleolar Organizer Regions”, traduzido como regiões organizadoras nucleolares

p16 = proteína p16

p27 = proteína p27

pRb = proteína Rb

p53 = proteína p53 ou gene p53

PC 10 = anticorpo anti-PCNA

PCNA = do inglês “Proliferating Cell Nuclear Antigen”, traduzido como antígeno nuclear de proliferação celular

pH = potencial hidrogeniônico

rRNA = do inglês “Ribosomic Ribonucleic Acid”, traduzido como ácido ribonucléico ribossômico

S = refere-se a fase do ciclo celular na qual ocorre a síntese do DNA

SABC = do inglês “Streptavidin-Biotin Complex”, traduzido como complexo Streptavidina-Biotina

Tris = Tris-hidroxi-metil-aminometano

USP = Universidade de São Paulo

W = watt

WHO = do inglês “World Health Organization”, traduzido como Organização Mundial da Saúde

INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

Certas alterações na mucosa bucal podem preceder o desenvolvimento do câncer e compõem o grupo das lesões denominadas “pré-malignas ou cancerizáveis”. Dentre essas lesões pré-malignas a mais comum é a leucoplasia. Leucoplasia é um termo eminentemente clínico, utilizado para definir lesões predominantemente brancas que não podem ser identificadas como outras doenças nem clínica, nem histologicamente. Grande parte dessas lesões felizmente não têm nenhum tipo de alteração morfológica pré-maligna. Contudo, existem lesões que sofrem o processo de malignização o que torna necessário o estudo mais aprofundado das mesmas.

O potencial de malignização das leucoplasias sempre esteve associado à presença ou ausência de displasia. Entretanto, a literatura vem comprovando que a avaliação das displasias é muito subjetiva e que leucoplasias com essas alterações nem sempre sofrem malignização enquanto outras, sem displasias, podem transformar-se em carcinomas. Assim, tornou-se interessante a busca de informações que identificassem alterações nas células epiteliais antes mesmo do desenvolvimento das displasias. Exemplo disso seria o uso imuno-histoquímico de biomarcadores que esclareçam o processo da carcinogênese e que contribuam para o desenvolvimento de parâmetros para o diagnóstico, prognóstico e tratamento das leucoplasias.

A técnica imuno-histoquímica com anticorpos específicos de proliferação celular ou malignização vem sendo amplamente empregada para melhorar nossos conhecimentos a respeito de lesões potencialmente malignas que ditam o desenvolvimento dos carcinomas, independente da presença de alterações morfológicas reconhecidas. Assim, estudamos a proteína p53 e PCNA, a fim de verificar se existe alguma correlação entre o grau de queratinização das leucoplasias e a expressão desses marcadores, sem que as lesões apresentem sinais de displasia.

REVISÃO DA LITERATURA

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Conceito e Terminologia

Atualmente, o conceito mais aceito de leucoplasia descreve a lesão como sendo uma mancha ou placa branca que não pode ser removida por raspagem e não pode ser caracterizada clínica ou histologicamente como outra doença, sendo um termo eminentemente clínico (WHO, 1978).¹⁰⁶

O termo leucoplasia foi usado durante anos de maneira ambígua, assumindo significado histológico para alguns autores e clínico para outros, o que proporcionou resultados e interpretações errôneas de diversos trabalhos (Áxell, 1987).¹

Schwimmer⁸⁵ em 1877, foi quem primeiro usou a denominação leucoplasia para descrever lesões esbranquiçadas anteriormente denominadas ictiose, tilose, ou psoríase bucal. Já em 1946/1947, Hobaek⁴² restringiu o uso do termo leucoplasia para aquelas lesões que se apresentavam como placas brancas de forma irregular com distribuição variada pela mucosa bucal, apresentando-se mais freqüentemente como lesão única.

Em 1954, Kollar et al.⁴⁸ sugeriram descontinuar o uso da palavra leucoplasia como termo diagnóstico e adotar a seguinte nomenclatura histológica para as lesões pré-neoplásicas e neoplásicas de aspecto esbranquiçado: 1) hiperplasia; 2) hiperqueratose simples; 3)

hiperqueratose complexa; 4) câncer intraepitelial e 5) carcinoma epidermóide.

Bernier,¹³ em 1955, sugeriu que a denominação leucoplasia fosse dada somente para lesões que apresentassem disceratose histologicamente, o que conotaria sua pré-malignidade, e sugeriu o termo “pachyderma oralis” na ausência do quadro histológico. Da mesma forma Shira,⁸⁹ em 1957, afirmou que o termo leucoplasia era utilizado para descrever lesões que na maioria das vezes representavam espessamentos benignos da mucosa, sem considerar sua conotação pré-maligna.

A utilização do termo leucoplasia somente no sentido clínico passou a ser mais amplamente aplicado após 1960 com Waldron & Shafer (1975),¹⁰³ apesar de ter sido sugerido anteriormente por outros autores.

Pindborg et al. (1963)⁷¹ conceituaram leucoplasia como uma lesão esbranquiçada que não pudesse ser removida por raspagem e nem ser diagnosticada como outra lesão. Silverman Junior & Rozen⁹⁰ em 1968, acrescentaram à definição de Pindborg et al. (1963)⁷¹ a impossibilidade das lesões desaparecerem mesmo com a remoção de agentes irritantes.

Em 1968, Lemmer & Shear⁵² utilizando o termo leucoplasia com sentido histológico, determinaram que em tais lesões a presença de displasia de discreta a severa seria critério essencial para seu

diagnóstico. Contrariando esse conceito, Califano & Caputo (1969)²⁰ descreveram as leucoplasias como manchas ou placas brancas sobre a mucosa oral, que não poderiam ser removidas por raspagem, não poderiam ser classificadas nem clínica nem histologicamente como outras enfermidades e que caracterizavam-se por hiperqueratose sem displasia celular. Já a WHO¹⁰⁶, em 1978, recomendou que o termo leucoplasia deveria ser usado somente para descrição clínica de placas ou manchas brancas que não pudessem ser caracterizadas clínica ou histologicamente como outra doença, e que o uso desse termo não poderia estar relacionado à presença ou ausência de displasia.

Em 1984, Axéll et al.² acrescentaram à definição da WHO¹⁰⁶ que as leucoplasias não poderiam ser associadas com nenhum agente causal físico ou químico, exceto o uso de tabaco. Determinaram que a descrição completa de uma lesão leucoplásica compreenderia características etiológicas, clínicas, topográficas e histológicas. Assim, classificaram as leucoplasias de acordo com seus fatores etiológicos em leucoplasias idiopáticas, aquelas que não possuíam fator etiológico definido e leucoplasias associadas ao tabaco, representadas por manchas ou placas esbranquiçadas associadas ao uso do tabaco ou resultantes desse hábito. As demais lesões que possuíssem uma causa local determinada receberiam o nome de acordo com seus fatores etiológicos conhecidos e não se chamariam leucoplasias, como por exemplo lesões friccionais, lesões associadas a restaurações dentais.

Posteriormente, em 1996, Axéll et al.³ alteraram sua definição de leucoplasia considerando apenas aquelas lesões predominantemente brancas da mucosa bucal que não pudessem ser caracterizadas como nenhuma outra doença definida. Além disso, criaram o diagnóstico provisório, que seria realizado a nível clínico, e o diagnóstico definitivo que requereria a exclusão de fatores etiológicos. Caso a lesão persistisse, haveria a necessidade de um exame histopatológico.

2.2 Etiologia

Em 1900, Paget⁶⁷ relacionou a leucoplasia ao uso do tabaco chamando-a de mancha branca do fumante. Já Butlin¹⁹ em 1855, considerou a “mancha do fumante” como um estágio precoce de uma lesão branca mais avançada denominada por ele como leucoma.

Diversos outros autores como Hobaek (1946/1947);⁴² Lemmer & Shear (1968);⁵² Mehta et al. (1969);⁶⁰ Pindborg (1971);⁶⁹ Waldron & Shafer (1975);¹⁰³ Bánóczy (1977);⁵ a WHO (1978);¹⁰⁶ Áxell et al. (1984);² Gupta et al. (1992)³⁹ e van Der Wall (1995)⁹⁹ associaram o fumo ao desenvolvimento de lesões leucoplásicas. Para Mehta et al. (1969)⁶⁰ a localização intra-oral dessas lesões variou de acordo com os hábitos tabagistas dos indivíduos, estando assim as lesões de mucosa labial associadas ao hábito de “hookli smoking” e as lesões de palato associadas ao hábito de fumar o cigarro ao contrário. Já para Bánóczy (1977)⁵ o fumo favorecia o desenvolvimento das leucoplasias, enquanto

fatores mecânicos, o álcool e diferenças de potencial elétrico atuariam como fatores etiológicos somente quando em associação.

A sífilis foi relatada como possibilidade etiológica das leucoplasias por Sturgis & Lund⁹³ em 1934, quando observaram a transformação maligna de 6 casos.

Fatores como consumo abusivo de álcool, sífilis, má higiene oral, próteses mal adaptadas, Síndrome de Plummer-Vinson, galvanismo e insuficiência renal ou hepática foram relacionados por Hobaek (1946/1947)⁴² ao desenvolvimento de lesões leucoplásicas. Pindborg (1971)⁶⁹ igualmente associou o aparecimento de leucoplasias às condições sistêmicas da sífilis e disfagia sideropênica (caracterizada pela deficiência de ferro – Síndrome de Plummer-Vinson), além da fibrose submucosa (associação a carcinógenos presentes no fumo e epitélio extremamente atrófico).

Para Shafer et al. (1985)⁸⁶ a etiologia das leucoplasias era bastante variada, sendo o tabaco, álcool, irritação local, deficiências vitamínicas, distúrbios endócrinos e radiação ultravioleta os fatores mais responsabilizados pelo seu aparecimento.

Gupta et al. (1992)³⁹ através de um trabalho de prevenção de câncer oral com moradores rurais na Índia, puderam perceber que a diminuição do uso de tabaco levou a uma taxa de incidência de leucoplasias significativamente menor e conseqüentemente à uma diminuição do risco de câncer oral, visto que tais doenças estariam

intimamente relacionadas segundo o autor. Do mesmo modo, van Der Waal et al. (1997)¹⁰¹ afirmou que o abandono do hábito de fumar mostrou ser uma medida efetiva na diminuição da incidência de leucoplasias e conseqüentemente do câncer oral.

Löning et al. (1984)⁵⁶ através de um estudo realizado com papilomas e leucoplasias orais puderam verificar a presença do papiloma vírus nessas lesões o que levou-os a sugerir que agentes virais estariam envolvidos na etiologia de parte das lesões epiteliais escamosas.

Greer Junior et al. (1990)³⁶ estudaram a presença de DNA genômico do papilomavirus humano em lesões de boca através da hibridização “in situ”. Os autores encontraram presença maior do vírus nas lesões verrucosas benignas ou malignas e nas leucoplasias associadas ao fumo. Tais achados corroboram com aqueles obtidos por Lind et al. (1986)⁵⁴ e Löning et al. (1984).⁵⁶

2.3 Associação com *Candida sp.*

A candidose vem sendo associada ao desenvolvimento de lesões leucoplásicas há anos. Jepsen & Winther (1965)⁴⁴ identificaram a presença de *Candida sp.* em 91% das leucoplasias salpicadas, através de cultura e observação histopatológica. Após tratamento com antifúngico todas as lesões passaram a se apresentar como lesões esbranquiçadas, homogêneas com superfície ligeiramente enrugada.

Cawson (1966)²² observou a presença de hifas de *Candida sp.* em 15 das 138 leucoplasias que estava acompanhando. Segundo o autor, o papel exato desse fungo na produção das lesões não pôde ser definido o que o fez sugerir três hipóteses: a primeira, na qual a presença da *Candida sp.* poderia ser coincidência, não apresentando papel relevante na natureza patológica da lesão; a segunda, na qual a *Candida sp.* poderia ser responsável em parte, pelas alterações vistas; e a terceira, na qual a *Candida sp.* poderia ser a causa única, e a lesão poderia ser, de fato, um exemplo de candidíase crônica.

Roed-Petersen et al. (1970)⁷⁷ tentaram relacionar a presença de *Candida sp.* às leucoplasias com atipia epitelial. Os autores não encontraram esta associação embora tenham observado a presença desse fungo em 67% dos casos estudados. Pindborg (1971)⁶⁹ afirmou que as leucoplasias salpicadas ou nodulares poderiam estar associadas à infecção por *Candida sp.*

Em um estudo a respeito das alterações progressivas e regressivas apresentadas pelas leucoplasias, Bánóczy & Sugar (1975)⁹ encontraram altas taxas de mudanças entre os tipos clínicos naquelas lesões que apresentavam-se contaminadas por *Candida sp.* Em um outro estudo, Bánóczy (1977)⁵ encontrou 13,5% das lesões leucoplásicas contaminadas por *Candida sp.* Entre as lesões leucoplásicas erosivas, 61% apresentavam essa contaminação seguindo a mesma proporção apresentada pelo grupo de carcinomas. Esses achados confirmaram a

associação entre o tipo clínico da lesão e a contaminação por *Candida sp.* e ainda a relação com a displasia constatada através da análise histopatológica.

2.4 Epidemiologia

Mehta et al. (1969)⁶⁰ realizaram um estudo com 50.915 adultos habitantes rurais em quatro estados da Índia a fim de determinar as taxas de prevalência de câncer e leucoplasia nessa população. Segundo os autores, a prevalência das leucoplasias variou entre 0,2 a 4,9% entre os estados.

Bouquot & Gorlin (1986)¹⁵ realizaram um levantamento de lesões brancas queratóticas na população americana. Segundo os autores, as leucoplasias são as lesões normalmente mais diagnosticadas e as lesões queratóticas mais comuns, atingindo níveis de prevalência de 28,9/1.000 americanos com idade acima dos 35 anos e numa proporção de dois homens para cada mulher acometida.

Axéll (1987)¹ avaliando a ocorrência de leucoplasias e outras lesões orais em 20.333 adultos suíços encontraram uma prevalência de 3,6% de leucoplasias, predominantemente em homens na faixa etária de 55 a 64 anos.

2.5 Aspectos Clínicos

Hobaek (1946/1947)⁴² descreveu dois tipos clínicos de leucoplasias chamados: leucoplasia simples e leucoplasia verrucosa, onde o segundo tipo era simplesmente o desenvolvimento do primeiro. As lesões planas apresentavam-se ao nível da mucosa, com coloração branco-acinzentada, não infiltrativas à palpação, algumas vezes com a superfície ligeiramente enrugada e assintomáticas. Esse tipo de lesão poderia permanecer sem alterações por anos ou sofrer transição para o tipo verrucoso de forma natural. Assim, se tornariam lesões espessas, infiltrativas, com fissuras ou pequenas ulcerações em sua superfície, a qual se apresentaria papilomatosa e algumas vezes sintomática. Seriam lesões freqüentemente de língua, lábios ou mucosa jugal e acometeriam principalmente homens com idade variando entre 50 e 70 anos.

Sugár & Bánóczy (1969)⁹⁴ descreveram três tipos clínicos de leucoplasias: Tipo I - leucoplasia simples, apresentando-se histologicamente como mucosa queratinizada; Tipo II - leucoplasia verrucosa com proliferações verrucosas; Tipo III - leucoplasia erosiva, lesão branca com áreas eritematosas e erosivas.

Em 1965, Baroncelli & Questa¹¹ descreveram as leucoplasias como lesões crônicas que poderiam aparecer em várias regiões da boca (bochecha, língua, lábio, palato) e que se manifestariam na forma de placas brancas de superfície irregular, consistência firme, algumas vezes

ulcerada, apresentando tendência a confluir com aspecto de carta geográfica.

As leucoplasias foram descritas por Lemmer & Shear (1968)⁵² como lesões específicas pré-malignas, usualmente indolores, que apareciam em qualquer parte da mucosa, em pessoas de meia idade ou idosos, normalmente sobre a língua ou mucosa jugal. Essas lesões caracterizavam-se por manchas brancas de várias espessuras, as quais poderiam elevar-se por cima da mucosa circundante e apresentar textura áspera. As manchas poderiam ser de qualquer tamanho e uniformemente brancas ou seriam representadas por áreas opacas, entre as quais se veria a cor vermelha do tecido vascular que as rodeava. Ocasionalmente poderiam haver ulcerações e os casos avançados teriam a aparência de manchas delgadas, com fissuras brancas e secas.

Em 1971, Pindborg⁶⁹ subdividiu as leucoplasias em dois grupos: 1) leucoplasias homogêneas, que corresponderiam às lesões de aparência uniforme; 2) leucoplasias salpicadas, que corresponderiam às lesões caracterizadas pela ocorrência simultânea de placas brancas e vermelhas. As áreas vermelhas representariam regiões de atrofia epitelial, enquanto as áreas esbranquiçadas representariam regiões de hiperplasia epitelial.

Silverman Junior et al. (1976)⁹² acreditavam que a prevalência das leucoplasias aumentaria com a idade, estaria ligada ao hábito de fumar associado ou não ao consumo de outros produtos como “pan” ou “supari”

e era maior em homens devido à maior porcentagem de indivíduos desse sexo com hábitos orais de fumo. Além disso, a mucosa jugal foi o lugar de maior ocorrência das leucoplasias, seguida pela mucosa labial.

Para a WHO (1978)¹⁰⁶ as leucoplasias poderiam apresenta-se de diversas formas, variando de placas pequenas e circunscritas a placas extensas, envolvendo boa parte da mucosa oral. Sua aparência poderia ser variável, com superfície lisa ou enrugada, e algumas vezes, lesões com superfície lisa poderiam ser cortadas por pequenas rachaduras adquirindo o aspecto de barro rachado. Quanto à coloração poderiam ser brancas, amarelo-esbranquiçadas, ou acinzentadas, e quanto à forma poderiam ser homogêneas ou nodulares, ou ainda pontilhadas, mostrando proliferações exofíticas brancas em uma base vermelha.

Axéll et al. (1984)² classificaram as leucoplasias clinicamente em homogênea ou simples, nos casos de lesões uniformemente esbranquiçadas, com superfície lisa ou corrugada; e leucoplasias não-homogêneas aquelas que envolviam as eritroleucoplasias, as leucoplasias nodulares e as verrucosas. As eritroleucoplasias (leucoplasias erosivas) se caracterizariam por lesões que incluíam áreas eritematosas. As leucoplasias nodulares se apresentariam como lesões com projeções ligeiramente elevadas, arredondadas, esbranquiçadas ou vermelhas que poderiam ser descritas como grânulos ou nódulos. Já as leucoplasias verrucosas seriam lesões exofíticas com projeções irregulares, agudas e obtusas.

No estudo de Bouquot & Gorlin (1986)¹⁵, as leucoplasias atingiram principalmente o vermelhão do lábio e a mucosa jugal, e cerca de 7% das lesões apresentavam carcinoma invasivo inicial ou displasia severa microscopicamente.

van Der Waal (1995)⁹⁹ descreveu as leucoplasias como as lesões pré-malignas mais comuns da cavidade bucal. Segundo o autor, a leucoplasia alcançaria sua incidência máxima em adultos acima dos 50 anos de idade, sendo os homens afetados geralmente antes das mulheres.

Para Axéll et al. (1996)³ as variantes clínicas da leucoplasia seriam apenas as lesões homogêneas e as não-homogêneas. As lesões homogêneas deveriam apresentar-se predominantemente brancas, com aspecto uniforme, aparência delgada podendo exibir fendas superficiais e ainda superfície plana, enrugada ou corrugada com textura consistente em toda sua extensão. Já as lesões não-homogêneas deveriam apresentar-se predominantemente brancas ou brancas e vermelhas e poderiam ser irregularmente planas, ondulares ou exofíticas. As lesões nodulares possuiriam projeções elevadas, arredondadas, vermelhas e/ou brancas e as lesões exofíticas, projeções irregulares rombas ou pontiagudas.

2.6 Histopatologia

Hobaek (1946/1947)⁴² afirmou que os principais achados em uma lesão leucoplásica eram hiperplasia epitelial, acantose e um infiltrado inflamatório crônico no tecido conjuntivo subjacente, composto preferencialmente por plasmócitos e linfócitos.

Para Lemmer & Shear (1968)⁵² a presença de displasia de discreta a severa seria indispensável para o diagnóstico das leucoplasias.

A análise histológica de 723 leucoplasias de aspecto salpicado, realizada por Mehta et al. (1969)⁶⁰ permitiu constatar a prevalência de atipia epitelial em 59,1% dessas lesões, o que levou-os a concluir que tais lesões teriam maior probabilidade de sofrer transformação maligna.

Em 1971, Bánóczy⁴ avaliou 150 esfregaços citológicos de pacientes com leucoplasia oral diagnosticadas clinicamente, a fim de comparar os achados citológicos aos dados histológicos das amostras correspondentes, além de estudar a correlação entre os padrões histológicos de queratinização e os tipos clínicos da leucoplasia. Dos casos avaliados, 67 apresentavam hiperortoqueratose, 56 hiperparaqueratose e 27 áreas de para e ortoqueratose entremeadas. Hiperplasia epitelial foi observada em 86% dos casos de hiperparaqueratose, 60% dos casos de hiperorto e hiperparaqueratose associadas e em 42% dos casos de hiperortoqueratose, enquanto disceratose foi encontrada em 10% das hiperortoqueratoses e em 50%

das hiperparaqueratoses. Os autores encontraram hiperortoqueratose citológica em 72% das leucoplasias simples e 58% das verrucosas e hiperparaqueratose citológica em 77% das leucoplasias erosivas. A partir desses dados os autores concluíram que o tipo de queratinização pode ser definido por métodos citológicos e que as hiperparaqueratoses são vistas predominantemente em leucoplasias erosivas. Além disso, puderam constatar que carcinomas se desenvolveram preferencialmente a partir de leucoplasias com hiperparaqueratose.

Bánóczy & Csiba (1972)⁶ realizaram um estudo comparativo entre tipos clínicos e a estrutura histológica de 324 leucoplasias orais, durante um período médio de 8,6 anos, a fim de estabelecer as alterações histológicas que ocorrem nos vários tipos clínicos de leucoplasias (com atenção especial para o padrão de queratinização) e a tendência de cura das várias alterações histológicas no curso dos subseqüentes controles. Os autores puderam observar que os tipos de queratinização variaram de acordo com os tipos clínicos, ocorrendo orto e hiperortoqueratinização na maioria dos casos de leucoplasia simples e verrucosa, e para e hiperparaqueratinização principalmente nos casos de leucoplasia erosiva. Além disso, os autores constataram que enquanto 27% das leucoplasias com orto ou hiperortoqueratinização não sofreram alterações ou aumentaram de tamanho, isso ocorreu em 52% das leucoplasias com para ou hiperparaqueratinização. A partir desses dados, os autores concluíram que há uma certa relação entre as características clínicas e

histológicas das leucoplasias e que as características peculiares das leucoplasias podem ter valor diagnóstico e influenciar a terapia a ser aplicada.

Waldron & Shafer (1975)¹⁰³ através de um estudo longitudinal de 3.256 espécimes diagnosticadas clinicamente como leucoplasias, puderam observar que 7,6% dos casos analisados histologicamente eram carcinoma espinocelular, carcinoma “*in situ*” ou displasia severa e que 12,2% dos casos apresentavam displasia discreta à moderada. Isso levou-os a afirmar que o aspecto clínico das leucoplasias não é um dado seguro para prever os achados microscópicos dessas lesões, tornando as biópsias altamente indicadas. A incidência de alterações, variando de displasia a carcinoma, foi de 42,9% nas lesões de assoalho bucal, 24,2% nas lesões de língua e 24% nas lesões de lábio. A partir desses achados os autores puderam afirmar que a prática da observação clínica das leucoplasias sem biópsia pode ser perigosa, especialmente em lesões de assoalho de boca e língua, onde um número considerável apresenta alterações epiteliais significantes.

Bánóczy & Csiba (1976)⁷ a fim de definirem a ocorrência de displasias epiteliais em leucoplasias orais, avaliaram 500 cortes histológicos classificados clinicamente como leucoplasias, durante um período de avaliação de 6,3 anos em média. Puderam observar a presença de displasia em 24% dos casos, sendo essa representada principalmente pela estratificação irregular do epitélio e pela presença de

cristas interpapilares em forma de gota. Taxa elevada de displasias ocorreu na faixa etária acima dos 50 anos (72,5%), principalmente em homens (86,7%), em língua e lábio inferior, e em leucoplasias do tipo erosivo (68%). Essa alta taxa de displasia foi relacionada a fatores geográficos, ao fumo e a diferentes tipos de tratamento.

Para a WHO (1978)¹⁰⁶ as leucoplasias poderiam apresentar diversos aspectos histopatológicos, variando de discreta hiperqueratose associada a acantose até altos níveis de hiperqueratose associada a displasia. Nem sempre os achados histológicos podem ser associados aos achados clínicos.

Bánóczy et al.¹⁰, em 1980, correlacionaram as alterações ultraestruturais das leucoplasias com as variantes clínicas e microscópicas da lesão, constatando que as leucoplasias simples e verrucosas caracterizavam-se por abundante queratinização, aumento da quantidade de tonofibrilas, de grânulos de querato hialina e corpos de Odland, assim como sinais de disceratose. Em contraste, as lesões erosivas revelaram evidências de displasia como: defeitos na membrana basal, diminuição de hemidesmossomos, processos patológicos no citoplasma, perda de aderência intercelular, alterações do núcleo e nucléolo, mudanças degenerativas das mitocôndrias e arranjo característico dos ribossomos, assim como alterações características do carcinoma oral em algumas instâncias.

Fischman et al. (1982)³⁰ avaliando 153 leucoplasias diagnosticadas clinicamente constataram, através da biópsia, que 13% dos casos eram carcinomas. Entre os casos diagnosticados clinicamente como carcinoma constataram, através da biópsia, que 33% eram lesões benignas e 36% eram lesões pré-malignas, sugerindo que a biópsia fosse indispensável em todas as lesões suspeita.

Pindborg et al. (1985)⁷⁰ realizaram um exercício para verificar a subjetividade na avaliação de displasias epiteliais, através da exposição de 9 pôsteres com fotomicrografias, para que patologistas sugerissem o diagnóstico. Os autores puderam encontrar um número amplo de sugestões diagnósticas o que levou-os a afirmar que existe muita subjetividade na definição dos diagnósticos e que seria necessário a criação de um critério internacional de classificação das displasias epiteliais.

Para Axéll et al. (1996)³ os achados histológicos nas leucoplasias consistiam de variados tipos e graus de hiperqueratose, podendo a displasia estar ou não presente e sua severidade ser amplamente variável. Ainda segundo o autor, em uma descrição histopatológica era necessário evidenciar a presença de displasia e sua severidade.

van Der Wall et al. (2000)¹⁰⁰ criaram um novo método de classificação e sistema de estadiamento baseado apenas no tamanho das lesões e na histopatologia. Neste sistema focou-se a presença ou ausência de displasia, afim de promover relatos uniformes sobre

resultados de condutas e tratamentos de pacientes com leucoplasia oral. Nessa classificação as lesões foram separadas quanto ao tamanho em lesões de até 2 cm, de 2 a 4 cm e maiores do que 4 cm. Quanto ao aspecto histopatológico classificaram as lesões em: 1) lesões sem ou com discreta displasia, 2) lesões com displasia variando de discreta a moderada e 3) lesões com displasia de moderada a severa. Neste caso a biópsia seria indispensável para chegar ao resultado final.

2.7 Classificação de Grinspan

Para Grinspan (1973)³⁷ as leucoplasias seriam definidas a partir de um critério clínico-histopatológico. Clinicamente, as leucoplasias poderiam apresentar-se como lesões brancas ou esbranquiçadas que, semiologicamente, poderiam ser manchas (mudança de coloração sem relevo), queratoses (lesões brancas elevadas, com espessura) ou verrucosidades (elementos elevados, irregulares, papilomatosos). Essas lesões representariam os graus de leucoplasia I, II e III respectivamente. Histologicamente o Grau I teria hiperqueratose ou hiperparaqueratose e acantose discretas, no Grau II a queratinização e a acantose seriam mais acentuadas e o Grau III apresentaria papilomatose e queratinização acentuadas. As lesões displásicas não seriam leucoplasias e sim estágios iniciais de carcinomas “in situ”.

2.8 Pré-malignidade e Transformação Maligna

Hobaek (1946/1947)⁴² realizou um estudo com 1.272 pacientes com câncer oral onde pôde constatar que 16% dessas lesões desenvolveram-se a partir de leucoplasias, sendo a língua e a região sublingual as áreas mais afetadas. Para o autor, as lesões leucoplásicas deveriam ser consideradas as condições pré-cancerosas mais comuns da cavidade bucal.

Kollar et al. (1954)⁴⁸ estabeleceram a seguinte descrição histológica para as lesões pré-neoplásicas e neoplásicas de aspecto esbranquiçado: 1) hiperplasia para aquelas lesões que envolvessem apenas um crescimento tecidual representado por uma camada espinhosa com espessura aumentada; 2) hiperqueratose simples para aquelas lesões microscopicamente representadas por um aumento excessivo na espessura das camadas granulosa e córnea, com ou sem componente inflamatório; 3) hiperqueratose complexa para aquelas lesões com hiperqueratose acompanhada por componente inflamatório e disceratose a qual ocorre nas camadas espinhosa e basal do epitélio com presença de células queratóticas únicas, células gigantes e hiperchromatismo nuclear na camada basal, 4) câncer intraepitelial representado por lesões com hiperqueratose e uma disceratose excessiva das camadas espinhosa e basal e 5) carcinoma epidermóide para aquelas lesões caracterizadas por uma invasão do tecido conjuntivo por

elementos epiteliais, hiperqueratose, disceratose acentuada e uma resposta inflamatória severa.

Segundo Waldron & Shafer (1975)¹⁰³ a grande diferença existente na literatura quanto a frequência de transformação malignas das leucoplasias era, em parte, devida a confusão existente na sua definição.

Pindborg et al. (1963)⁷¹ avaliaram alterações clínicas e histológicas de malignidade em 185 pacientes que apresentavam lesões leucoplásicas e constataram que das 35 lesões com aspecto clínico de leucoplasia salpicada, 51% apresentavam atipia epitelial e 14% eram carcinomas in situ. A maior incidência foi em homens numa idade média de 54 anos, em região de comissura labial. No mesmo ano, Renstrup (1963)⁷⁶ utilizando o conceito de leucoplasia de Pindborg et al. (1963)⁷¹, avaliou a atividade mitótica das leucoplasias classificadas histologicamente como hiperortoqueratoses ou hiperparaqueratoses, através da contagem do número de figuras mitóticas por unidade de comprimento de membrana basal, constatando uma atividade mitótica média quatro vezes maior no grupo de lesões com hiperparaqueratose.

Pindborg et al. (1968)⁷² avaliaram por um período médio de 3,7 anos um grupo de 248 pacientes com leucoplasias orais a fim de determinar o período de prevalência de transformações malignas. Observaram recorrência em 9,5% dos pacientes que sofreram remoção cirúrgica de suas lesões, desaparecimento completo das lesões em 20,1% dos casos, ausência de alterações em 45,3% das lesões

leucoplásicas e transformação maligna em 4,4% dos casos. Os autores concluíram que as leucoplasias são lesões reversíveis, que podem diminuir de tamanho ou mesmo desaparecer completamente. Além disso, constataram que cerca de 70% dos casos que sofreram transformação maligna eram do tipo leucoplasia salpicada, todos apresentavam atipia epitelial e esse processo ocorreu num período de um ano para cerca de 45% dos casos. Assim, concluíram que as leucoplasias do tipo salpicada estão mais freqüentemente relacionadas a atipias epiteliais e conseqüentemente mais sujeitas à transformação maligna e que esse processo tem um curso acelerado.

Silverman Junior & Rozen⁹⁰, em 1968, avaliaram 117 casos de leucoplasia a fim de relacionar os achados clínicos e histológicos com o desenvolvimento natural dessas lesões. Constataram que 10% dos casos diagnosticados clinicamente como leucoplasias eram carcinomas e 6% desenvolveram transformação maligna num período de até cinco anos. Segundo os autores, esses achados confirmaram o fato das lesões leucoplásicas poderem sofrer malignização. Para eles, o número de casos de transformação maligna poderia variar de acordo com a seleção dos pacientes e com o tempo de preservação, visto que diversos outros trabalhos apresentaram taxas de malignização diferentes.

Os fatores que poderiam favorecer a transformação maligna das leucoplasias foram estudados por Bánóczy & Súcar (1972)⁸ a partir da análise de 520 lesões orais durante um período médio de 8,7 anos.

Destas lesões 33,8% desapareceram, 25,3% aumentaram de tamanho, 26% não sofreram qualquer tipo de alteração, 9% espalharam-se e 5,9% sofreram transformação maligna. Os autores afirmaram que esses resultados poderiam ter sido influenciados pelo número de pacientes analisados, pelo período de observação e por fatores geográficos. Um maior risco para transformação maligna das leucoplasias parecia estar relacionado aos seguintes fatores: persistência das lesões, acometimento do sexo feminino, localização da lesão na margem ou base da língua, combinação de fatores irritantes como o tabaco, o uso excessivo de álcool, a diferença de potencial elétrico entre restaurações e o tipo da leucoplasia, sendo a lesão erosiva a que mais se relacionaria ao processo de malignização.

Bánóczy & Súcar (1975)⁹ a fim de avaliar a possibilidade e a frequência de mudanças entre os tipos clínicos de leucoplasias, e estudar os fatores que poderiam influenciar essas mudanças, acompanharam 520 pacientes com leucoplasias durante um período médio de 8,7 anos. Os autores puderam observar alterações regressivas (alteração de um tipo clínico considerado mais agressivo para um menos perigoso) em 9% dos casos e alterações progressivas em 3,7%. A mucosa labial foi a região mais atingida, mas a língua e o assoalho bucal sofreram apenas alterações progressivas (alteração de um tipo clínico considerado menos agressivo para um mais perigoso), levando os autores a sugerirem que seriam áreas de maior tendência à malignização. Além disso, os autores

encontraram altas taxas de alterações entre os pacientes tabagistas e entre aqueles que apresentavam lesões contaminadas por *Candida sp.* A partir desses dados, os autores afirmam que as leucoplasias erosivas têm maior tendência a sofrerem alterações progressivas e desenvolverem um carcinoma oral. Contudo, acreditaram que o desenvolvimento de leucoplasias simples para leucoplasias erosivas e carcinoma poderia ocorrer.

Bánóczy & Csiba (1976)⁷ verificaram taxa de malignização em 13,2% dos casos e um maior risco desse processo ocorrer nas leucoplasias localizadas na língua. Silverman Junior et al. (1976)⁹², em um estudo realizado com 6.718 trabalhadores industriais em Gujarat na Índia, obtiveram uma taxa de malignização de leucoplasias de 0,13% . Desses casos nenhum apresentava displasia na biópsia inicial e 5 casos diagnosticados clinicamente como leucoplasias apresentaram-se como carcinomas na análise microscópica. Os autores afirmaram que as leucoplasias deveriam ser diagnosticadas microscopicamente e acompanhadas cuidadosamente.

Bánóczy (1977)⁵ realizou acompanhamento de 670 pacientes com leucoplasia oral e concluiu que a transformação maligna dessas lesões estaria associada a fatores como idade e sexo do paciente, extensão e localização da lesão, infecção por *Candida sp.*, combinação entre fatores etiológicos, presença de displasia e métodos de tratamento.

Em um levantamento de 63 pacientes que apresentavam uma forma distinta de leucoplasia oral caracterizada por apresentar-se sempre em assoalho bucal ou ventre de língua, a fim de obter maiores informações sobre o risco de malignização desse tipo de queratose sublingual, Kramer et al. (1978)⁴⁹ constataram que 27% dos casos mostraram carcinoma na biópsia inicial e 15% sofreram transformação maligna num período de 1 a 19 anos. Os pacientes que apresentavam carcinoma na biópsia inicial estavam numa faixa etária de 40 a 74 anos (média 59,4 anos) e geralmente eram mulheres (1,3:1). Segundo os autores, alguns fatores clínicos observados como o aspecto nodular das lesões, poderiam indicar uma possível malignização e esse tipo de lesão deveria possuir um maior risco de sofrer transformação maligna.

Para a WHO (1978)¹⁰⁶ a taxa de malignização das leucoplasias orais encontra-se entre 3 a 6% e vem diminuindo devido a fatores como a mudança nos padrões da doença. Antigamente, muitos casos de leucoplasia eram associados à glossite sífilítica, e essa combinação era freqüentemente seguida por transformações malignas. Contudo, atualmente, lesões sífilíticas em mucosa oral raramente são encontradas devido ao controle dessa doença. Além disso, para a WHO¹⁰⁶ a variação na definição do termo leucoplasia e na aplicação do mesmo com conotações variadas, segundo cada autor, também levava a diferentes níveis de prevalência de transformação maligna.

Segundo Gupta et al. (1980)³⁸ é necessário levar-se em consideração, quando se estuda a taxa de transformação maligna de leucoplasias, a extensão das lesões, o tipo de população estudada e a abordagem terapêutica utilizada. Para Axéll et al. (1984)², a localização das lesões é importante porque lesões aparentemente similares em locais diferentes da mucosa oral poderiam apresentar diferente risco de malignização.

Duzentos e cinquenta e sete pacientes foram acompanhados por Silverman Junior et al. (1984)⁹¹ por um período médio de 7,2 anos, a fim de avaliar características clínicas e fatores associados à transformação maligna de leucoplasias orais. No diagnóstico inicial 235 lesões apresentavam hiperqueratose benigna e 22 apresentavam algum grau de displasia epitelial. Do total de casos, 17,5% sofreram um processo de malignização e 8 desses apresentavam displasia epitelial na biópsia inicial. A malignização foi observada em maior proporção nas mulheres, mas não apresentou relação com a idade dos pacientes. Além disso, algumas características pareciam aumentar o risco de malignização das lesões leucoplásicas, tais como componente eritematoso ou erosivo, aspecto verrucoso da lesão e a presença de displasia, devendo nestes casos serem submetidas a tratamento mais agressivo. Contudo, os autores acreditaram que lesões não displásicas também poderiam sofrer um processo de malignização.

Tommasi (1998)⁹⁵ relatou que a transformação maligna das leucoplasias, quando não removidas cirurgicamente, ocorreriam em 6% dos casos. Burkhardt (1985)¹⁸ afirmou que o grau de displasia de lesões presumivelmente pré-malignas seria o mais importante indicador de potencial maligno de uma leucoplasia. Contudo, lesões com aspecto histológico aparentemente inofensivo poderiam sofrer malignização.

Lind (1987)⁵³ através de um estudo retrospectivo sobre a incidência de transformação maligna em leucoplasias orais observou o desenvolvimento de carcinomas em 7% dos 157 casos de leucoplasias examinados. O autor afirmou que o exame histológico é indispensável, mas que o grau de displasia parece não ser confiável para servir como único parâmetro usado na previsão do desenvolvimento de um carcinoma.

Regezi & Sciubba (2000)⁷⁴ relataram que o risco de transformação neoplásica teria importância considerável conforme a região da cavidade oral afetada. Os autores observaram que 50% das leucoplasias de assoalho de boca, quando examinadas microscopicamente, caracterizaram-se por lesões displásicas, carcinoma in situ ou invasivo. As lesões de lábio e língua apresentaram tais alterações em 25% dos casos e, na área retromolar, em 10% dos casos.

Tyldesley (1995)⁹⁸ afirmou que o potencial de transformação maligna das leucoplasias não poderia ser visto com segurança. Todavia, o local e as características clínicas afetariam o prognóstico, enquanto as características histológicas seriam de suma importância para o

comportamento futuro das lesões. Para Castro et al. (2000)²¹ as leucoplasias Grau III de Grinspan, especialmente quando exibissem úlceras ou fissuras, possuiriam maior potencial de transformação maligna.

Segundo van Der Waal (1995)⁹⁹, a transformação maligna poderia ser prevista, até certo ponto, em função da aparência clínica, localização bucal e resultados histológicos da biópsia da lesão. O autor sugeriu que o tratamento deveria ser dirigido principalmente à eliminação dos possíveis fatores causais. No caso de lesões persistentes a remoção era o procedimento mais indicado, devendo os pacientes serem acompanhados durante toda a vida a fim de se detectar previamente possíveis recorrências.

Karabulut et al. (1995)⁴⁶ comparando as análises histológicas de 100 leucoplasias realizada por quatro patologistas, sendo dois patologistas gerais e dois bucais, puderam verificar altas taxas de discordância nos diagnósticos das displasias epiteliais (55 a 73%), comprovando a subjetividade existente na gradação de displasia de uma lesão.

Para Axéll et al. (1996)³ os resultados histopatológico de biópsias de leucoplasias deveriam incluir a presença ou ausência de displasia e sua severidade, visto o alto risco de malignização de lesões leucoplásicas com displasia. Entretanto, os autores admitiram que leucoplasias que não apresentam displasia em sua biópsia inicial deveriam sofrer transformação maligna.

van Der Wall et al. (1997)¹⁰¹ a partir de uma revisão de literatura sobre leucoplasias afirmaram que embora a displasia epitelial seja um fator importante no processo de malignização, deveria ser considerado que nem todas as lesões displásicas tornam-se malignas e que por outro lado lesões não displásicas poderiam sofrer malignização. A taxa anual de malignização das lesões leucoplásicas é variável nas diversas partes do mundo e o assoalho bucal e a língua são as áreas de maior potencial para sofrer um processo de malignização.

Através de um estudo longitudinal de 116 pacientes com leucoplasia, durante um período médio de 29 meses, Schepman et al. (1998)⁸⁴, observaram transformação maligna em 20 casos. Desses, 6 casos não apresentavam alteração displásicas na biópsia inicial. A partir desses achados, concluíram que as transformações malignas podem ocorrer em lesões que não apresentam displasia, sem ignorar a subjetividade existente no processo de gradação das displasias.

Wright (1998)¹⁰⁷ baseado em uma revisão sobre lesões pré-malignas afirmou que seis a dez mutações genéticas devem ocorrer antes das células tornarem-se malignas e que esse processo poderia levar anos, sendo esse período chamado de pré-maligno. As alterações pré-cancerosas à nível celular foram chamadas displasia, e essa displasia e a sua severidade foram considerados os fatores mais precisos para definir o potencial de malignidade de uma leucoplasia. O autor acreditava que lesões que não apresentavam evidência histológica de displasia poderiam

ser apenas observadas. Contudo, lesões não displásicas que persistiam por muito tempo deveriam ser consideradas pré-malignas e possuíam uma probabilidade maior de tornarem-se malignas do que a mucosa normal.

Schepman et al. (1999)⁸³ a fim de determinar a presença de leucoplasias em pacientes com carcinoma espinocelular oral avaliaram 100 pacientes diagnosticados histologicamente. Quarenta e sete por cento dos pacientes apresentaram carcinoma concomitantemente com leucoplasias. Desses, 36 apresentavam leucoplasia adjacente ao carcinoma, 8 apresentavam também leucoplasias em outros locais da boca e 11 apresentavam leucoplasias somente em outros locais da boca. Visto que 59% dos carcinomas poderiam ser precedidos ou estavam associados à leucoplasias, os autores sugeriram que uma detecção precoce e um manejo ativo dos pacientes com leucoplasia oral poderiam prevenir o desenvolvimento do câncer oral.

Para Warnakulasuriya (2000)¹⁰⁴ os métodos usados na avaliação de atipias e displasia são subjetivos, faltando-lhes sensibilidade para prever de maneira precisa quais lesões seriam potencialmente malignizáveis. Além disso, segundo ele, leucoplasias com displasia discreta ou sem evidências de displasia poderiam sofrer processo de malignização com o tempo.

2.8.1 AgNOR

As regiões nucleolares organizadoras (NORs) são alças de ácido desoxirribonucléico (DNA) encontradas no nucléolo que são transcritas para ácido ribonucléico (rRNA) e estão envolvidas na síntese de ribossomos e de proteínas (Rüschoff et al., 1989).⁷⁹ Nos humanos, as NORs estão localizadas no braço curto dos cromossomos acrocêntricos 13,14,15,21 e 22 (Ferguson-Smith & Handmaker, 1961).²⁹

Goodpasture & Bloom (1975)³⁴ observaram que certas proteínas relacionadas as NORs podiam ser demonstradas com o uso de um método de coloração pela prata. Tal método foi posteriormente modificado e ficou conhecido como técnica AgNOR (Ploton et al., 1986),⁷³ onde as proteínas argirofílicas podem ser vistas como pontos escuros no núcleo ou no nucléolo das células. Segundo Fakan & Hernandez-Verdun (1986),²⁸ o número de AgNORs no núcleo pode refletir a proliferação celular, a transformação maligna, a gradação tumoral, metástases tumorais, recorrências tumorais e o prognóstico de várias neoplasias.

Nunes (1991)⁶⁶ utilizando a contagem de NORs em leucoplasias orais, pôde observar pequenas variações nos diferentes diagnósticos histológicos. Segundo o autor uma possível explicação para esse fato, estaria na imprevisibilidade do comportamento biológico das leucoplasias. Assim, uma contagem maior ou menor de AgNORs poderia apontar para evolução ou regressão desta lesão, a despeito da gradação histológica.

Em 1993, Warnakulasuriya & Johnson¹⁰⁵ avaliaram a marcação de AgNORs em queratoses benignas, displasias epiteliais e carcinomas. Os autores encontraram diferenças expressivas no número médio de marcações entre os grupos de lesões, mas o mesmo não foi observado entre os grupos de lesões analisados individualmente.

Em 1994, Pillai et al.⁶⁸ utilizando a técnica de AgNOR avaliaram o número de regiões organizadoras nucleares em tecido normal, lesões pré-malignas e malignas da cavidade oral a fim de verificar seu potencial como um marcador biológico para progressão tumoral. Os autores encontraram números maiores de AgNORs em carcinomas do que em leucoplasias e tecido normal. Entre os tipos clínicos de leucoplasias as marcações menos expressivas foram encontradas em lesões homogêneas, enquanto marcações mais expressivas foram encontradas nos casos de leucoplasias salpicadas. Não foram observadas diferenças nas marcações de leucoplasias displásicas e não displásicas, mas essas diferenças existiram entre as lesões displásicas e o epitélio normal. Segundo os autores, ainda que uma significativa correlação entre o número de AgNORs e os vários estágios de progressão tumoral tenha sido observada, não foi observada diferença significativa entre os estágios individualmente.

Chattopadhyay et al. (1994)²⁴ avaliaram a reação da AgNOR em epitélio normal da mucosa jugal oral, leucoplasias orais e carcinomas espinocelulares. Os autores constataram um maior número de AgNORs

em leucoplasias, sendo as marcações menores e mais amplamente espalhadas nas lesões displásicas. Além disso, a marcação nos carcinomas também mostrou-se menor em tamanho, mais numerosa e dispersa pelo núcleo celular e com contorno mais irregular do que no epitélio normal. Os autores sugeriram que como as lesões tornam-se mais displásicas e em última instância malignas, o número de AgNORs tende a aumentar, as marcações tornarem-se mais amplamente dispersas pelo núcleo celular e seus tamanhos tendem a diminuir.

Tucci & Crivelini* demonstraram em leucoplasias de mucosa jugal Graus I, II, III de Grinspan, que houve diferença estatisticamente significativa entre o número de NORs encontrado nos casos de epitélio normal e leucoplasia Grau I, entre epitélio normal e leucoplasia Grau II e entre leucoplasia Grau III e as outras leucoplasias de Grinspan. As leucoplasias Grau I e II apresentaram maior atividade proliferativa comparando-se com o epitélio normal e leucoplasia Grau III, e a leucoplasia Grau III apresentou proliferação celular igual ao epitélio normal.

2.9 Imuno-histoquímica

2.9.1 p53

O gene supressor de tumor p53 localiza-se no braço curto do cromossomo humano 17, na posição 17p13,1 e codifica uma proteína que está envolvida na síntese e reparo do DNA, na plasticidade genômica, na

*TUCCI, R., CRIVELINI, M. M. AgNOR em leucoplasias de mucosa jugal grau I, II e III de Grinspan. (No Prelo)

morte celular programada e na regulação negativa do ciclo celular (Donehower & Bradley, 1993;²⁷ Greenblatt et al., 1994).³⁵ Nas células normais o gene p53 age como guardião do genoma, percebendo danos ao DNA e evocando uma resposta protetora tanto para bloquear o ciclo celular quanto para induzir apoptoses nas células afetadas (Lane, 1992).⁵¹

Mutações no gene p53 estão entre as alterações genéticas mais freqüentes associadas com as neoplasias humanas (Greenblatt et al., 1994).³⁵ A proteína p53 tem uma curta vida-média e não pode ser detectada por métodos imuno-histoquímicos. Entretanto, as mutações no gene p53 freqüentemente resultam em um produto genético mais estável que pode ser facilmente detectado por imunocoloração, por isso coloração positiva para p53 tem sido proposta como um indicador indireto dessas mutações (Bennett et al., 1991).¹²

Girod et al. (1993)³¹ avaliaram 64 lesões pré-neoplásicas e 85 lesões neoplásicas a fim de determinar o papel do gene p53 na carcinogênese da mucosa oral. O grau de displasia das lesões foi relacionada à expressão de níveis detectáveis da proteína p53 mutada, visto que das 39 lesões não displásicas somente 21% mostraram expressão detectável da p53 enquanto 36% das lesões displásicas mostraram positividade para p53. Os autores concluíram que as mutações do p53 estão relacionadas com o aumento da displasia.

Nishioka et al. (1993)⁶⁵ compararam a expressão da proteína p53 com a marcação para o antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA)

em leucoplasias e carcinomas orais. Não encontraram expressão da proteína p53 em epitélio normal, contrastando com expressão positiva para p53 em menos de 10% das lesões leucoplásicas e em aproximadamente metade dos carcinomas. Encontraram também altas taxas de p53 em carcinomas com expressão de PCNA em mais de 40% das células e um ligeiro aumento na positividade da p53 em lesões mais indiferenciadas. Esses resultados indicaram uma possível relação entre a expressão da proteína p53, o crescimento celular e os achados histopatológicos de malignidade.

Girod et al. (1994)³² relacionaram a expressão da proteína p53 e do antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) em 265 amostras de tecido de mucosa normal, potencialmente maligna, maligna e metastática da mucosa. Os dados apresentados sugeriram que a mutação do gene p53 é um evento inicial na carcinogênese da mucosa orofaríngea e que está correlacionada, assim como a expressão do PCNA, ao aumento da displasia e perda de diferenciação. Segundo os autores a expressão da p53 poderia ser melhor indicador de malignização, visto que a expressão do PCNA também estaria ligada à proliferação celular benigna induzida por inflamação, como constatado nos casos de líquen plano.

Sauter et al. (1994)⁸² através da detecção imuno-histoquímica da expressão aumentada da proteína p53 em tecido normal, lesões pré-invasivas e invasivas do trato aerodigestivo superior, constataram que essa expressão elevada apareceu nas lesões iniciais e aumentou

gradualmente de acordo com o aumento do grau de atipia visto na progressão das neoplasias. Foi observado também que a expressão da proteína p53 em displasias discretas e moderadas estava limitada à camada basal, enquanto nas displasias severas e carcinomas invasivos a marcação nuclear era vista nas camadas mais superficiais do epitélio, as quais eram compostas por células atípicas. Para os autores estes resultados mostram que as alterações da proteína p53 estão associadas à transformação maligna e não necessariamente à progressão a um estágio mais avançado de malignidade.

Shin et al. (1994)⁸⁸ com o objetivo de identificar um biomarcador para o processo de desenvolvimento do câncer de cabeça e pescoço, estudaram a expressão imuno-histoquímica da proteína p53 em carcinomas espinocelular e nos tecidos normais e lesões pré-malignas adjacentes à esses tumores. Além disso, procuraram determinar se a expressão da proteína p53 aumentava antes do desenvolvimento tumoral e como poderiam detectar essa expressão precocemente. Foi constatado um aumento progressivo na expressão da proteína p53 nas lesões pré-malignas adjacentes aos tumores, acompanhando a progressão tecidual de normal para hiperplasia, displasia e carcinoma. Estes achados suportaram o conceito de processo seqüencial de tumorigênese de cabeça e pescoço e levaram os autores à concluir que alterações na expressão da proteína p53 podem ser úteis biomarcadores na avaliação

do risco de desenvolvimento do câncer em tecido normal ou lesões pré-malignas expostos a agentes carcinogênicos.

Regezi et al. (1995),⁷⁵ a fim de determinar a história natural da expressão da proteína p53 em displasias epiteliais e em carcinomas “in situ”, realizaram biópsias seqüenciais em pacientes que apresentaram lesões recorrentes. Foi constatada expressão positiva da p53 em 6 das 13 displasias analisadas, e destas, 3 progrediram para carcinomas invasivos p53 positivos. Dos 6 carcinomas iniciais, 4 eram p53 positivos. A partir destes resultados os autores sugeriram que a expressão da p53 parece ser persistente, servindo como um marcador de prognóstico para essas lesões. Caso essa super expressão seja reflexo de uma mutação genética, os autores acreditaram tratar-se de um evento irreversível. Além disso, o aparecimento de queratinócitos normais p53 positivos adjacentes à neoplasias mostrou que a expressão da p53 pode ocorrer antes das alterações morfológicas.

Kannan et al. (1996)⁴⁵ estudaram a relação existente entre a expressão do p53 e do Ki67 em tecido normal, lesões leucoplásicas, displásicas ou não, e em neoplasias da mucosa oral. Foi constatada expressão intensa de Ki67 e p53 em 45% das lesões não displásicas. Contudo, houve uma alta expressão de Ki67 em 58% das lesões displásicas, enquanto houve expressão intensa de p53 em somente 14% das displasias. As lesões leucoplásicas não displásicas foram classificadas em não proliferativas (hiperqueratoses) e proliferativas

(hiperplásicas), sendo que entre as lesões não proliferativas mais de 25% das células foram Ki67 positivas em 35% dos casos e p53 positivas em 48% dos casos. Já entre as lesões proliferativas, 85% foram fortemente positivas para o Ki67 mas nenhuma das lesões mostrou expressão elevada para p53. A partir desses achados os autores concluíram que, os marcadores apresentaram uma relação inversa em relação a condição proliferativa das lesões leucoplásicas. Além disso, não foi possível determinar se a expressão positiva do p53 observada foi resultado da mutação do p53 ou do acúmulo de p53 normal induzido por carcinógenos presentes no tabaco, visto que todos os pacientes faziam uso desse produto.

Em 1997, Rowley et al.⁷⁸ avaliaram a expressão da proteína p53 em lesões displásicas e carcinomas da cavidade oral. Positividade para proteína p53 foi encontrada em todos os graus histológicos do carcinoma assim como nos diferentes graus das displasias com frequência similar. 71% dos casos de carcinoma invasivo que desenvolveram-se a partir de leucoplasias pré-existentes já apresentavam super expressão da proteína p53 no estágio de leucoplasia. De acordo com os resultados os autores sugeriram que a proteína p53 poderia ter um papel inicial no desenvolvimento do carcinoma oral. Contudo, acreditavam que o mecanismo pelo qual as leucoplasias se transformam em carcinomas não é inteiramente dependente das alterações genéticas do p53.

A expressão da proteína p53 como um marcador para determinar o potencial de malignização foi avaliado por Murti et al.⁶³ em 1998, através da análise de 90 casos de lesões pré malignas de pacientes que faziam uso de “betel” ou tabaco. Os autores sugeriram que a expressão da proteína p53 em lesões associadas ao uso do tabaco não teve relação significativa com sua provável transformação, visto que não houve como determinar se a imuno-reatividade encontrada nas amostras refletia a presença da proteína p53 mutante estável ou a estabilização do tipo selvagem da proteína através da ligação com produtos de outros genes, como o MDM2. Para os autores não foi possível concluir que a expressão da p53 sirva como um biomarcador de risco para o desenvolvimento do câncer.

Cruz et al. (1998)²⁶ avaliaram a expressão suprabasal da proteína p53 em lesões bucais potencialmente malignas e carcinomas que se desenvolveram a partir delas em um período de 16 anos. A expressão da proteína p53 em mucosa normal e lesões benignas ficou restrita a camada basal e foi relacionada a resposta fisiológica das células a estresses genotóxicos. Foi encontrada marcação suprabasal em lesões potencialmente malignas e houve transformação maligna em 6 dos 7 casos que apresentavam esse tipo de marcação. Esse dados podem refletir um processo irreversível na carcinogênese. Além disso, duas lesões negativas para p53 desenvolveram carcinoma no período de acompanhamento o que levou os autores a sugerir que o padrão de

expressão do p53 era importante para determinação do prognóstico de lesões pré-malignas, contudo a ausência de níveis detectáveis de p53 não excluía a possibilidade da transformação maligna.

Saranath et al. (1999),⁸¹ estudando a mutação do p53 em câncer e leucoplasias orais induzidos pelo hábito de mascar fumo, constataram que 27% das leucoplasias mostraram aumento de expressão do p53, o que caracterizou essa proteína como um valioso biomarcador na identificação do potencial de malignização dessas lesões.

Saito et al. (1999)⁸⁰ estudaram as proteínas associadas ao ciclo celular p16, p27, pRb, p53 e Ki67, em lesões malignas e pré-malignas a fim de identificar anormalidades no ciclo celular associadas à expressão dessas proteínas. Os autores constataram aumento no número de células p53 positivas das lesões hiperplásicas para displásicas até carcinomas ou seja, com a progressão da carcinogênese oral, embora essa positividade nem sempre indicasse uma mutação genética.

Chiang et al. (2000)²⁵ avaliaram a expressão do p53 em lesões pré-malignas associadas ao fumo e ao hábito de mascar Areca. Foi encontrada positividade para p53 em 60% dos casos de fibrose submucosa, 40% das hiperqueratoses e 70% das displasias. Em 8% das fibroses submucosa, 25% dos queratinócitos apresentavam-se corados, enquanto em 40% das displasias mais de 50% dos queratinócitos mostravam-se corados. Nenhuma das hiperqueratoses mostrou mais de 25% dos queratinócitos corados. Tais resultados sugeriram ligação entre

o aumento da expressão do p53 com as alterações displásicas das células epiteliais, evidenciando o papel do p53 na carcinogênese oral. Para os autores a super expressão da proteína p53 poderia representar a presença de mutações do gene p53, ou ser uma resposta à danos não específicos causados por agentes danosos ao DNA presentes na noz Areca ou no cigarro ou em ambos.

Segundo Warnakulasuriya (2000)¹⁰⁴ o p53, quando usado como único marcador, foi ineficiente para predizer o desenvolvimento de um tumor em indivíduos com alto risco de malignização.

2.9.2 PCNA

O antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) é uma proteína nuclear ácida de 36-KD, associada ao ciclo celular, agindo como um co-fator da DNA polimerase delta (Bravo et al., 1987).¹⁷ Sua distribuição no ciclo celular aumenta durante a fase G1, alcançando um pico na interface entre as fases G1 e S, diminuindo durante a fase G2, e alcançando níveis baixos na fase M e em células inativas, níveis esses detectáveis para a imuno-histoquímica, o que o torna um marcador útil para células em proliferação (Celis & Celis, 1985;²³ Kurki et al., 1988;⁵⁰ Tsai & Jin, 1995).⁹⁶

Segundo Mathews et al. (1984)⁵⁸ os níveis de PCNA foram particularmente proeminentes em células alteradas ou tumorais e diminuíram acentuadamente em células inativas. Em seu estudo os autores puderam constatar que a síntese máxima do PCNA parece

coincidir com seu acúmulo no nucléolo, precedendo o pico de síntese do DNA. Ainda segundo eles, a disponibilidade de anticorpos mono-específicos para o PCNA poderia facilitar a exploração dessa conexão com o nucléolo, com a divisão e transformação celular.

Bravo et al. (1987)¹⁷ verificaram, em um estudo sobre a distribuição nuclear do PCNA, que essa proteína era firmemente regulada durante o ciclo celular com um aumento claro no final da fase G1 e início da fase S, e que poderia ser um importante componente de eventos que levariam à replicação do DNA e/ou divisão celular.

McCormick & Hall (1992)⁵⁹ avaliando o comportamento do PCNA como um marcador da proliferação celular afirmaram que seu uso exige uma análise cuidadosa em função de alguns fatores que poderiam influenciar no seu padrão de marcação como fatores técnicos como o tipo de fixação, a associação do PCNA com o processo de reparo do DNA e a expressão do PCNA devido a ação de fatores de crescimento em células que não estão em ciclo.

Mittal et al. (1993)⁶¹ avaliaram a expressão basal e suprabasal do PCNA em 20 casos de epitélio escamoso ectocervical normal, 11 casos de metaplasia escamosa e 5 casos de atrofia epitelial. Segundo os autores, a porcentagem de células coradas da camada basal aumentou progressivamente das lesões atróficas para o epitélio normal, condilomatoso e displásico, o que os fez sugerir que essa avaliação poderia ser de valor para o diagnóstico de casos complexos.

Shin et al. (1993)⁸⁷ avaliaram o padrão de expressão do PCNA em tumores de cabeça e pescoço e em epitélio normal, hiperplásico e displásico adjacente à esses tumores, utilizando epitélio normal como controle. Os autores observaram um aumento do número de células positivas para PCNA com a progressão de epitélio normal para maligno. Além disso, observaram uma heterogeneidade na expressão do PCNA em lesões do mesmo subgrupo histológico, sugerindo que a expressão da proteína poderia adicionar informações biológicas à avaliação histológica de rotina. Os autores encontraram ainda, marcação suprabasal do PCNA principalmente em lesões displásicas, carcinomas in situ e carcinomas invasivos. A partir desses achados, os autores sugeriram que as lesões pré-malignas, particularmente as displásicas, têm praticamente o mesmo grau de atividade proliferativa que o tumor adjacente, o que levaria a crer que muitas das alterações deveriam ocorrer antes do desenvolvimento do tumor. Assim, os autores concluíram que o PCNA poderia ser um biomarcador útil para melhor entender os vários estágios da carcinogênese dos tumores de cabeça e pescoço.

Huang et al. (1994)⁴³ a fim de determinar se existia relação entre a expressão suprabasal do PCNA com características iniciais de pré-malignidade, avaliaram 169 lesões orais, incluindo 28 carcinomas in situ, 82 displasias epiteliais, 21 atipias epiteliais e 38 hiperplasias epiteliais típicas. Foi observada expressão suprabasal do PCNA em 40% das lesões reativas hiperplásicas benignas, 56,25% das atipias, 61,64% das

displasias e 64% dos carcinomas in situ. Esses dados levaram os autores à sugerir que lesões com padrão de expressão basal do PCNA têm maior probabilidade de serem benignas, enquanto aquelas com padrão de expressão suprabasal têm maior chances de serem pré-malignas, sendo por isso o padrão de expressão do PCNA de valor na determinação do potencial de malignização das lesões leucoplásicas.

Tsuji et al. (1995)⁹⁷ através do estudo de 75 lesões bucais, sendo 50 carcinomas espinocelulares, 14 leucoplasias e 11 adenomas pleomórficos, avaliaram a relação entre a expressão do PCNA e do p53. Os autores encontraram discreta expressão do PCNA e do p53 em leucoplasias e uma maior expressividade dessas proteínas nos carcinomas. A partir desses achados, os autores sugeriram que haveria uma relação estreita entre as proteínas PCNA e p53 e que ambas poderiam ser indicadores do potencial maligno da mucosa oral.

Kobayashi et al. (1995)⁴⁷ avaliaram a atividade proliferativa de leucoplasias não displásicas, displasias epiteliais e carcinomas através da expressão do PCNA, da expressão de AgNORs e da frequência de figuras mitóticas. Os autores encontraram padrões variados de expressão do PCNA nas lesões displásicas; correlação entre os índices de expressão do PCNA e os índices mitóticos confirmando a diferença entre as frações de proliferação celular existentes entre as diferentes amostras de displasia. Não encontraram significantes diferenças entre o número de AgNORs entre as lesões displásicas e não displásicas. A partir desses

achados, os autores afirmaram que a atividade proliferativa é intensificada com o aumento do grau de displasia das lesões. Comparando esses resultados com critérios histológicos estabelecidos pela OMS os autores puderam afirmar que a atividade proliferativa está relacionada a severidade das lesões displásicas.

Martinez-Lara et al. (1996)⁵⁷ a fim de observar a expressão do PCNA em mucosa normal, lesões orais benignas, displasias epiteliais e em epitélio adjacente à tumores, assim como avaliar a relação entre a expressão suprabasal do PCNA e seu aparecimento em displasias epiteliais, selecionou 43 amostras teciduais de diferentes locais da cavidade oral. Encontraram expressão exclusivamente basal em todos os casos de mucosa normal e em 13 casos de hiperplasia benigna. Expressão basal e suprabasal do PCNA foi observada em 4 casos de hiperplasia e em todos os casos diagnosticados histologicamente como displasias e todos os casos de epitélio displásico adjacente à tumor. A partir desses achados, os autores concluíram que a expressão suprabasal do PCNA poderia ser um marcador em displasias epiteliais iniciais sem sinais histopatológicos.

Birchall et al. (1997)¹⁴ avaliaram a presença de apoptose, mitose e a marcação de bcl-2 e PCNA em amostras de epitélio bucal normal, hiperplásico, displasias e carcinomas. Constataram um aumento progressivo do número de mitoses nos casos de displasia e carcinomas. Entretanto, encontraram dissociação da expressão do PCNA com o

número de mitoses, sugerindo que essa expressão poderia ser devido ao envolvimento da proteína no reparo do DNA. Observaram uma maior expressão de PCNA em lesões hiperplásicas o que levou-os a sugerir um aumento nas taxas de reparação do DNA nesse tipo de lesões.

Liu & Klein-Szanto (2000)⁵⁵ através da análise da expressão do PCNA, Ki-67 e ciclina D1, observaram um aumento da proliferação celular em leucoplasias orais relacionado ao grau de displasia. Segundo os autores, displasias severas poderiam ser claramente diferenciadas de displasias discretas e epitélio oral normal pela presença de células proliferativas nas camadas celulares superficiais, acima ou superficiais à camada parabasal. Todos os biomarcadores foram considerados satisfatórios, mas o Ki-67 foi visto como o mais indicado para esse tipo de estudo devido a sua marcação intensa e seu uso generalizado na coloração de cortes histológicos de lesões de outros locais do corpo.

PROPOSIÇÃO

3 PROPOSIÇÃO

A literatura tem evidenciado que o tecido epitelial componente das leucoplasias possui maior risco de transformação maligna e maior atividade proliferativa conforme presente displasia ou esteja localizado em regiões de risco como o assoalho bucal e língua. No entanto, lesões histologicamente inocentes também podem sofrer esta transformação independente de suas localizações. A proposta dessa pesquisa é avaliar através da detecção imuno-histoquímica do PCNA e p53, a atividade proliferativa epitelial das leucoplasias sem displasia, e fora das áreas de maior risco, correlacionando os resultados com a quantidade de queratina produzida na lesão.

MATERIAL E MÉTODO

4 Material e Método

4.1 Seleção dos casos e análise morfológica

Os casos estudados foram dos arquivos do Serviço de Histopatologia, do Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica da Faculdade de Odontologia “Campus” de Araçatuba - UNESP. Selecionou-se 24 lâminas de hiperparaqueratose e hiperortoqueratose, as quais haviam recebido diagnóstico de leucoplasia, sendo 8 casos de leucoplasia Grau I, 8 casos de leucoplasia Grau II e 8 casos de leucoplasia Grau III, segundo Grinspan (1973).³⁷ A seleção procurou reunir amostras exclusivamente de mucosa jugal, sem displasia epitelial .

As lâminas coradas pelo método hematoxilina e eosina (H&E) foram submetidas a estudo histológico em microscopia de luz. Dois examinadores avaliaram os cortes seguindo os critérios histológicos definidos por Grinspan (1973)³⁷ para o diagnóstico das lesões. São eles:

Grau I: ortoqueratose e/ou paraqueratose e acantose;

Grau II: maior grau de queratinização;

Grau III: queratose acentuada e papilomatoses.

Foi realizada coloração de Metanamina prata para verificar a presença de *Candida sp.* nas amostras.

4.2 Imuno-histoquímica

Em todos os casos a avaliação das proteínas p53 e PCNA foi feita com a técnica imuno-histoquímica pelo método da Streptavidina-Biotina (SABC, do inglês Streptavidina-Biotin Complex), acompanhada por análise qualitativa dos resultados através da microscopia de luz.

Todas as amostras foram fixadas em formol 10% e emblocadas em parafina. A reação foi realizada em secções teciduais de 4 micrômetros de espessura estendidas em lâminas de vidro previamente limpas, preparadas com adesivo à base de 3-aminopropyltriethoxy-silano (Organosilano). Em seguida os cortes foram submetidos aos seguintes passos:

- 1) desparafinização em xilol à 60°C por 30 minutos;
 - 2) desparafinização em xilol à temperatura ambiente por 20 minutos;
 - 3) hidratação em cadeia descendente de etanol, a partir de 3 passagens em etanol absoluto, seguido por etanol 95, 80 e 70, durante 5 minutos cada;
 - 4) remoção do pigmento formólico através de imersão em solução de hidróxido de amônio a 10% por 10 minutos;
 - 5) lavagem em água corrente por 10 minutos;
 - 6) duas passagens em água destilada;
 - 7) recuperação antigênica, através de tratamento dos cortes em microondas. As amostras foram colocadas em cubas contendo solução de ácido cítrico 10 mM (pH 6,0) e levadas no forno de
-

microondas durante 12 minutos (ciclos de 4 minutos) em potência de 900W, completando a solução tampão quando necessário;

- 8) resfriamento do material;
 - 9) lavagem em água corrente por 10 minutos;
 - 10) duas passagens em água destilada;
 - 11) bloqueio da peroxidase endógena tecidual, através de duas passagens de 5 minutos em solução de peróxido de hidrogênio (H_2O_2) 20 volumes em metanol (1:1, v/v);
 - 12) lavagem em água corrente por 10 minutos;
 - 13) duas passagens em água destilada;
 - 14) duas lavagens em solução tampão Tris-HCl, pH 7,4 (Tris-hidroxi-metilaminometano);
 - 15) incubação dos anticorpos primários à 4°C, nas condições especificadas na Tabela 1, diluídos em tampão Tris-HCl, pH 7,4, contendo 1% de albumina sérica bovina, acrescida de azida sódica a 0,1% (BSA);
 - 16) duas lavagens em tampão Tris-HCl, por 5 minutos cada;
 - 17) incubação com anticorpo secundário biotinilado por 30 minutos à temperatura ambiente, diluído em tampão Tris-HCl, pH 7,4;
 - 18) lavagem em solução tampão Tris-HCl pH 7,4 por 10 minutos com duas trocas;
 - 19) incubação com complexo Streptavidina-Biotina por 30 minutos à temperatura ambiente, diluído em tampão Tris-HCl, pH 7,4;
-

- 20) lavagem em solução tampão Tris-HCl pH 7,4 por 10 minutos com duas trocas;
- 21) revelação da reação com solução cromógena de diaminobenzidina (3,3'-diaminobenzidina) a 0,03% adicionada de 0,6 ml de H₂O₂ (20 volumes) por 3 minutos em câmara escura;
- 22) lavagem em água corrente por 10 minutos;
- 23) duas passagens em água destilada;
- 24) contra coloração com hematoxilina de Mayer por 5 minutos;
- 25) lavagem em água corrente por 10 minutos;
- 26) duas passagens em água destilada;
- 27) desidratação com etanol em cadeia ascendente;
- 28) diafanização em xilol;
- 29) montagem em resina Permont

Utilizou-se como controle positivo das reações o carcinoma espinocelular com padrão de marcação já conhecido. No controle negativo o anticorpo primário foi substituído por solução BSA a 1%, diluída em tampão TRIS, pH 7,4.

Foi realizada contagem das células coradas utilizando-se o programa Leica Qwin (Image Processing and Analysis System), em uma área selecionada aleatoriamente, com extensão epitelial de aproximadamente 19.500 μm , sempre no aumento de 400 vezes para ambos os marcadores. Esses dados foram submetidos à análise estatística.

Tabela 1 – Anticorpos empregados

Especificidade	Clone	Diluição	Tempo de Incubação
PCNA*	PC-10	1:600	Overnight
p53*	DO-7	1:75	Overnight

* Dako Corporation, Carpinteria,

RESULTADO

5 RESULTADO

A relação entre o diagnóstico histológico, o sexo e a idade do paciente está descrita na Tabela 2. Houve uma predominância do sexo masculino em nossa amostragem (59%) sobre o feminino (41%).

A idade dos pacientes variou entre 22 a 69 anos com uma média de 47,8 anos (47,9 para as mulheres e 47,8 para os homens). Entre os três Graus a média de idade foi de 48,7 anos no Grau I, 44,5 anos no Grau II e 50,2 anos no Grau III.

As lesões ocorreram em 92% dos casos em indivíduos da raça branca.

5.1 Morfologia

Na microscopia de luz as hiperqueratoses das leucoplasias, coradas em H.E., foram separadas em Grau I, II e III de acordo com os critérios estabelecidos por Grinspan (1973).³⁷ Assim, as oito manchas brancas que compunham o Grau I apresentavam-se histologicamente como epitélio estratificado pavimentoso com hiperortoqueratinização ou hiperparaqueratinização discretas (Figura 1). O Grau II correspondeu a oito lesões papulares exibindo epitélio com hiperqueratinização mais acentuada (Figura 2). E por último, no Grau III observavam-se oito lesões verrucosas com hiperqueratinização acentuada e papilomatose nas características histopatológicas (Figura 3).

5.2 p53

A marcação da proteína p53 foi variável nas leucoplasias com diferentes graus de queratinização.

No Grau I foi observada marcação nas camadas basal e parabasal do epitélio em cinco amostras e três foram negativas para o p53. Apenas uma amostra apresentou quantidade maior de células da camada parabasal positivas (Figura 4).

As leucoplasias que formavam o Grau II apresentaram epitélio com marcação muito semelhante às lesões do Grau I, com positividade em camada basal e parabasal em seis das oito amostras (Figura 5). As duas outras amostras apresentaram marcação apenas na camada basal.

Dentre as lesões que compunham o Grau III, duas apresentaram epitélio com marcação expressiva nas células da camada basal e parabasal, assemelhando-se às lesões dos Graus I e II. Em quatro amostras houve marcação discreta de poucas células da camada basal em áreas dispersas do epitélio (Figura 6), enquanto outras duas foram negativas para o p53. Subjetivamente o p53 teve menor expressão no Grau III em relação aos Graus I e II.

Os núcleos celulares apresentavam-se corados em castanho quando marcados pela proteína p53, com dispersão variável pelas camadas inferiores do epitélio.

A contagem das células foi realizada utilizando-se o programa Leica Qwin (Image Processing and Analysis System), em uma área

selecionada aleatoriamente, com extensão epitelial de aproximadamente 19.500 μm , sempre no aumento de 400 vezes (Figura 7).

A contagem de núcleos corados pelo p53 está expressa na Tabela 3. Esses dados foram submetidos a análise de variância para detectar diferenças entre os Graus I, II e III (Tabela 5).

5.3 PCNA

A proteína PCNA foi observada nos três graus de leucoplasia.

A marcação foi expressiva nas camadas basal e parabasal nos oito espécimes de leucoplasia do Grau I, sendo que sete apresentaram também diversas células da camada espinhosa alta (próximas à superfície) com marcação positiva (Figura 8).

As lesões do Grau II apresentaram marcação semelhante às lesões de Grau I, com expressividade para a proteína nas camadas basal, parabasal e espinhosa em todas as amostras. Três dessas amostras apresentavam marcação na camada espinhosa praticamente até a superfície do epitélio, algumas vezes envolvendo a camada granulosa (Figura 9).

Já a maior parte das leucoplasias do Grau III apresentavam marcação nas camadas basal e parabasal e em poucas células da camada espinhosa (Figura 10). Apenas uma das oito amostras apresentou marcação em várias células da camada espinhosa.

A marcação da proteína PCNA foi observada nos núcleos celulares como coloração castanha, e também apresentou dispersão variável pelas camadas do epitélio. À semelhança da expressão do p53, subjetivamente o PCNA apresentou-se menos freqüente no Grau III em relação aos Graus I e II.

A contagem das células foi realizada utilizando-se o programa Leica Qwin (Image Processing and Analysis System), em uma área selecionada aleatoriamente, com extensão epitelial de aproximadamente 19.500 μm , sempre no aumento de 400 vezes (Figura 11).

A contagem de núcleos corados está expressa na Tabela 4. Esses dados foram submetidos a análise de variância para detectar diferenças entre os Graus I, II e III (Tabela 6).

5.4 Análise Estatística

Os dados originais das tabelas 3 e 4 foram submetidos à uma bateria de testes preliminares através do programa estatístico GMC 7,07 elaborado pelo Prof. Titular Dr. Geraldo Maia Campos, da disciplina de Patologia da Faculdade de Odontologia de Ribeirão Preto - USP, com a finalidade de decidir sobre que tipo de estatística deveria ser empregada, paramétrica ou não paramétrica.

Para o p53 os testes de normalidade realizados com os dados originais de número de células coradas indicam tratar-se de uma distribuição não normal. Realizou-se, então a transformação dos dados em Raiz quadrada ($\text{dado}+1/2$), e testou-se novamente a normalidade da distribuição amostral. A análise do conjunto de resultados obtidos nesses testes preliminares levou à conclusão de que a Raiz quadrada ($\text{dado}+1/2$), passa a ser normal, o que autoriza aplicação da estatística paramétrica.

Dos testes paramétricos, o que melhor se adequa ao nosso modelo matemático é a Análise de Variância a um fator de variação, o número de células coradas que pode ser visto na Tabela 5. Através da Análise de Variância não foi constada diferença estatística entre o número de células coradas ($P = 12,713\%$) para os três graus da lesão.

Para o PCNA a análise dos dados originais mostrou tratar-se de uma distribuição amostral normal, o que nos levou a aplicação da estatística paramétrica através da Análise de Variância a um fator de variação, o número de células coradas que pode ser visto na Tabela 6. Através da Análise de Variância não foi constada diferença estatística entre o número de células coradas ($P = 5,599\%$)

Em função da grande diferença apresentada entre as médias do número de células coradas nos Graus I e III, realizou o teste de Tukey onde chegou-se a um valor crítico para a diferença ao nível de 5% de 136,89. Como a diferença entre as médias do número de células coradas é de 130,37, pode-se inferir que há uma tendência do Grau I apresentar

um maior número de células coradas que o Grau III caso a amostra seja maior.

5.5 TABELAS

Tabela 2 – Dados clínicos referentes as lesões estudadas

Amostra	Idade	Sexo	Raça
1	50	F	B
2	33	M	B
3	56	M	B
4	44	F	B
5	44	F	B
6	52	F	B
7	64	M	B
8	47	M	B
9	46	F	B
10	37	F	B
11	22	M	N
12	52	M	B
13	46	M	B
14	39	F	B
15	53	F	B
16	61	M	B
17	34	M	N
18	49	M	B
19	45	M	B
20	51	F	B
21	33	M	B
22	63	F	B
23	58	M	B
24	69	M	B

Tabela 3 – Número de células coradas (p53) em extensão epitelial de aproximadamente 19.500 μm (Aumento de 400X)

Amostra	Grau I	Grau II	Grau III
1	13	8	0
2	9	38	0
3	8	6	16
4	18	53	17
5	10	8	8
6	0	49	22
7	0	14	9
8	0	1	4

Tabela 4 - Número de células coradas (PCNA) em extensão epitelial de aproximadamente 19.500 μm (Aumento de 400X)

Amostra	Grau I	Grau II	Grau III
1	366	201	34
2	193	387	145
3	344	256	374
4	104	267	66
5	365	290	237
6	345	340	146
7	559	279	164
8	218	280	285

Tabela 5 – Análise de variância do número de células coradas (p53)

Fonte de variação	G.L.	Soma dos quadrados	Quadrado médio	"F"	Prob.(HO)
Entre Graus	2	14,8041	7,4020	2,26	12,713%
Resíduo	21	68,6385	3,2685		
Varição total	23	83,4426			

Tabela 6 – Análise de variância do número de células coradas (PCNA)

Fonte de variação	G.L.	Soma dos quadrados	Quadrado médio	"F"	Prob.(HO)
Entre Graus	2	76928,6250	38464,3125	3,29	5,599%
Resíduo	21	245637,3750	11697,0176		
Varição total	23	322566,0000	-		

5.6 FIGURAS

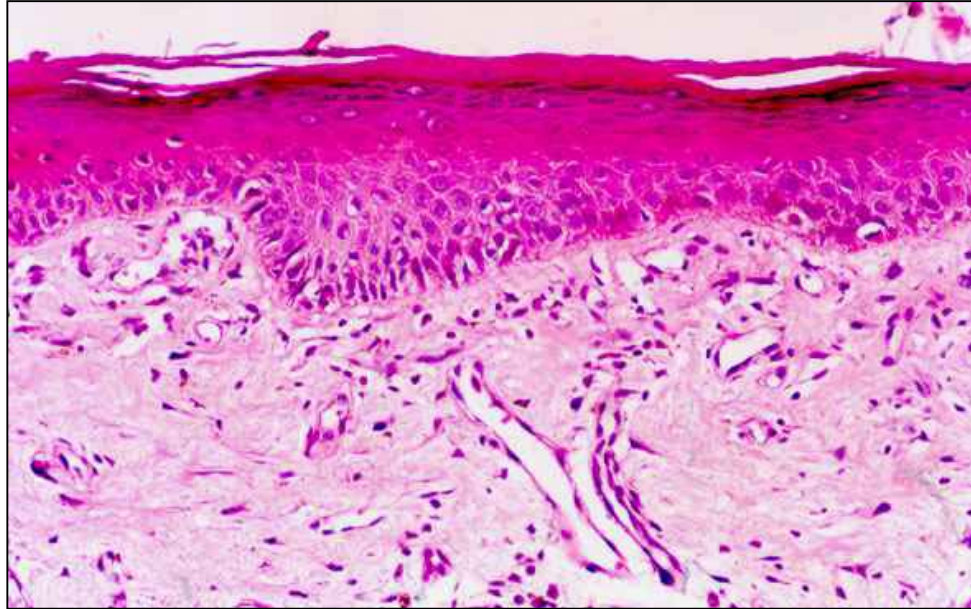


FIGURA 1 – Hiperqueratose em leucoplasia Grau I de Grinspan. **H.E. 200x.**

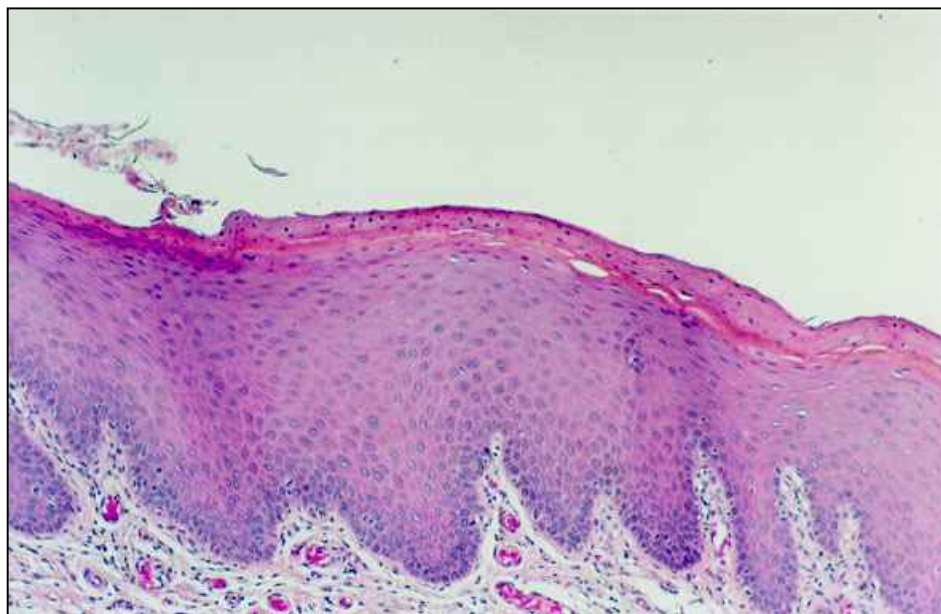


FIGURA 2 – Hiperqueratose em leucoplasia Grau II de Grinspan. **H.E. 200x.**



FIGURA 3 - Hiperparaqueratose e papilomatose em leucoplasia Grau III de Grinspan. H.E. 50x.

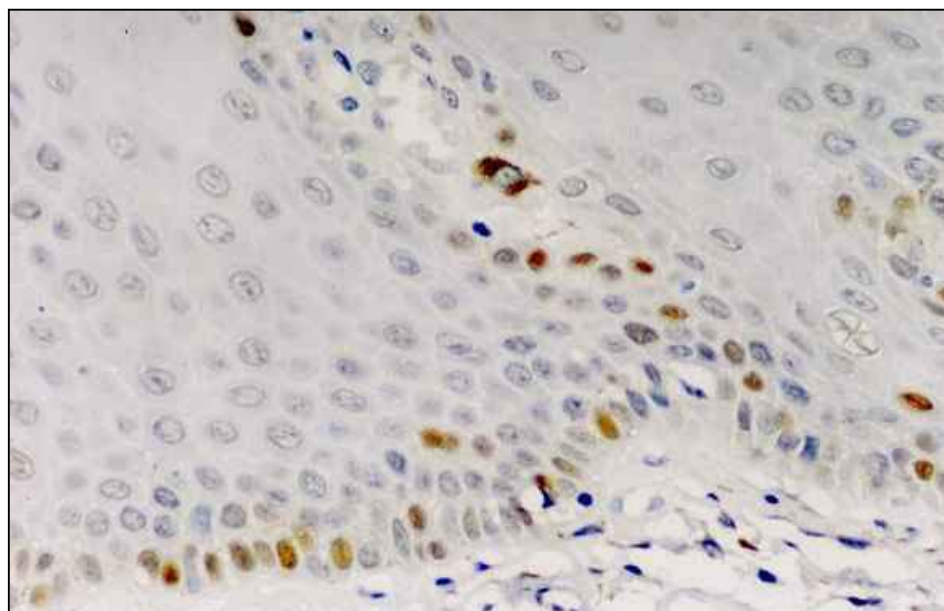


FIGURA 4 - Expressão basal e parabasal do p53. Leucoplasia Grau I de Grinspan 400X.

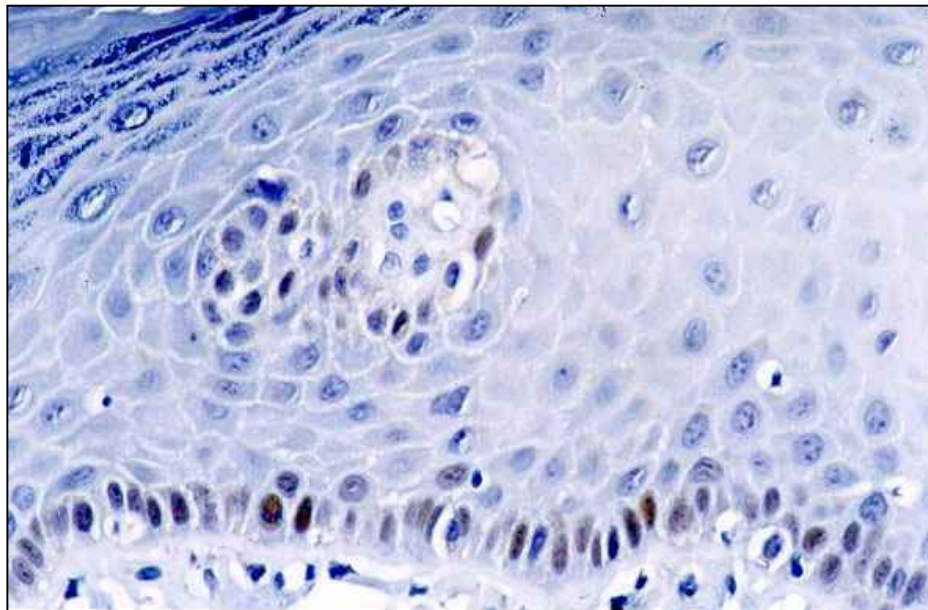


FIGURA 5 - Expressão basal e parabasal do p53. Leucoplasia Grau II de Grinspan. 400x.

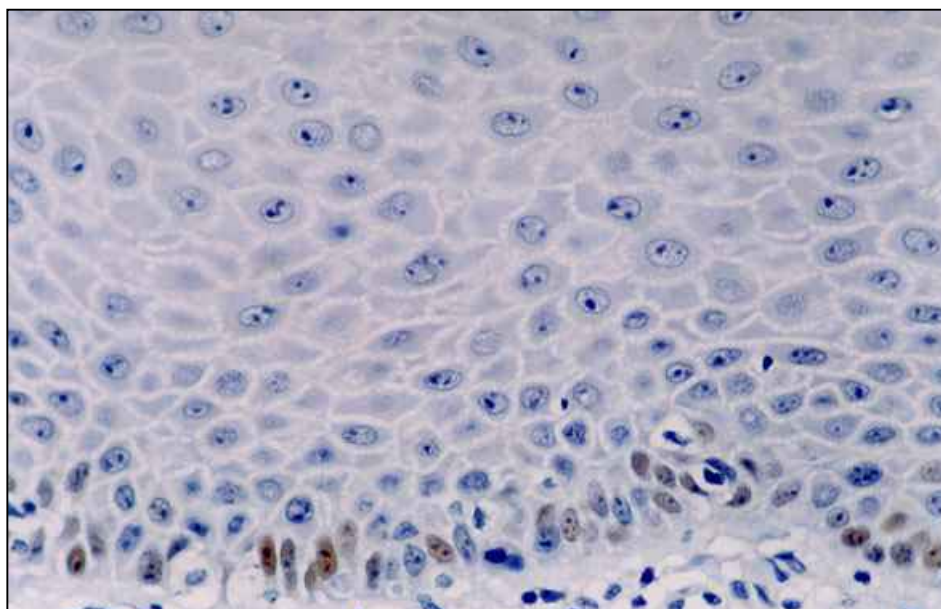


FIGURA 6 - Expressão basal do p53. Leucoplasia Grau III de Grinspan. 400x.

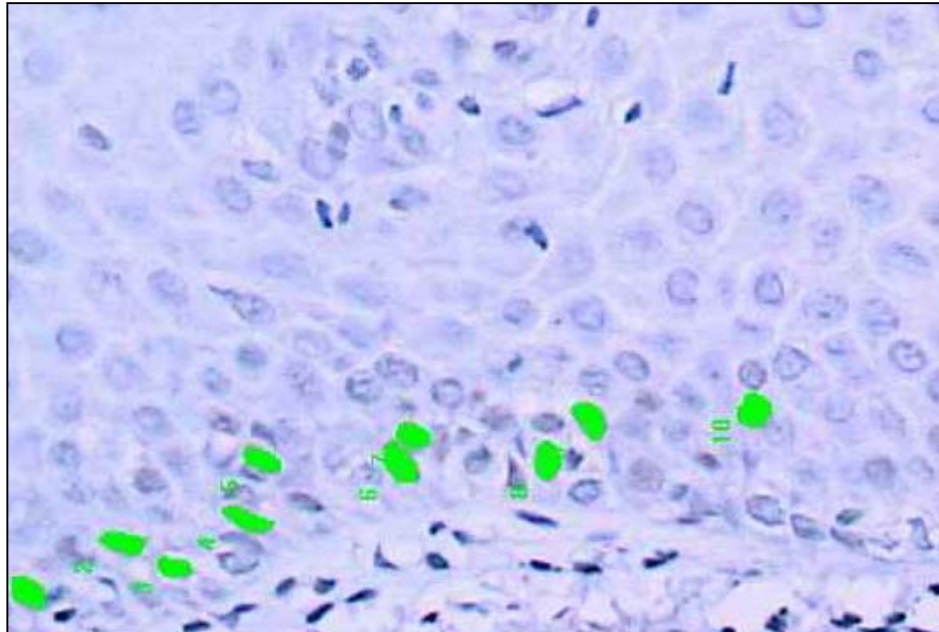


FIGURA 7 - Marcação utilizada na contagem de células no epitélio de uma das leucoplasias (Grau I de Grinspan) com expressão do p53. **400x**.

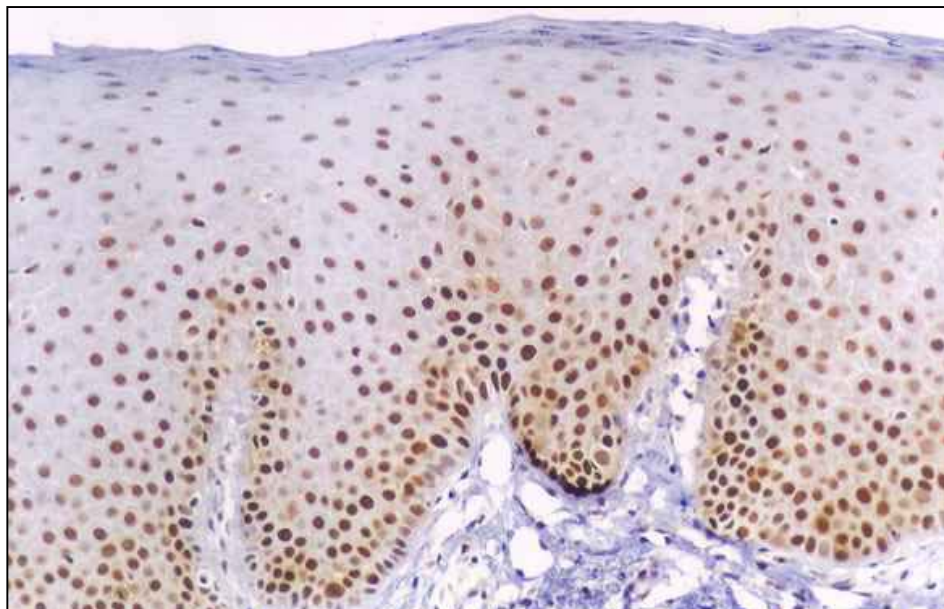


FIGURA 8 - Expressão do PCNA nas camadas basal, parabasal e espinhosa de leucoplasia Grau I de Grinspan. **200x**.

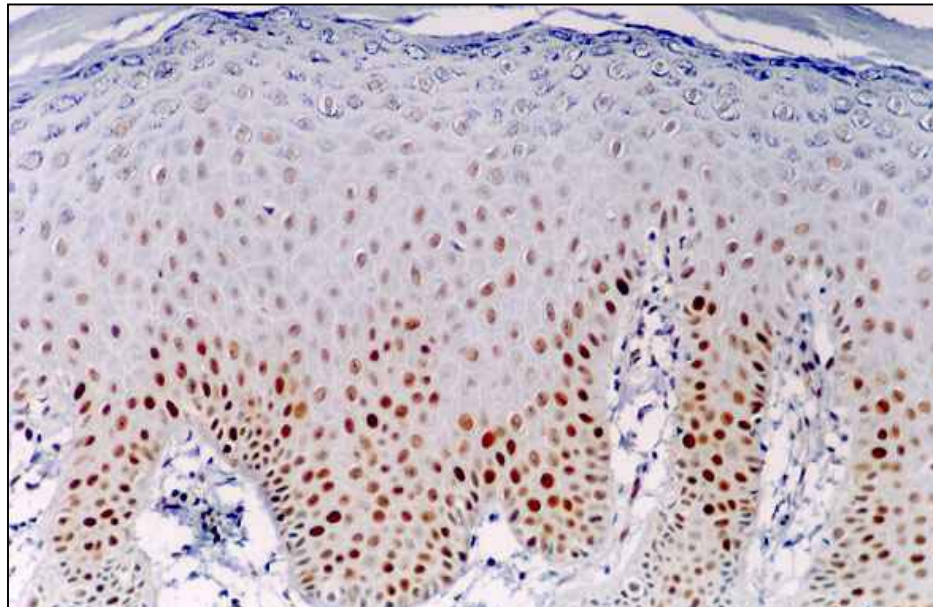


FIGURA 9 - Expressão do PCNA nas camadas basal, parabasal e espinhosa de leucoplasia Grau II de Grinspan. **200x.**

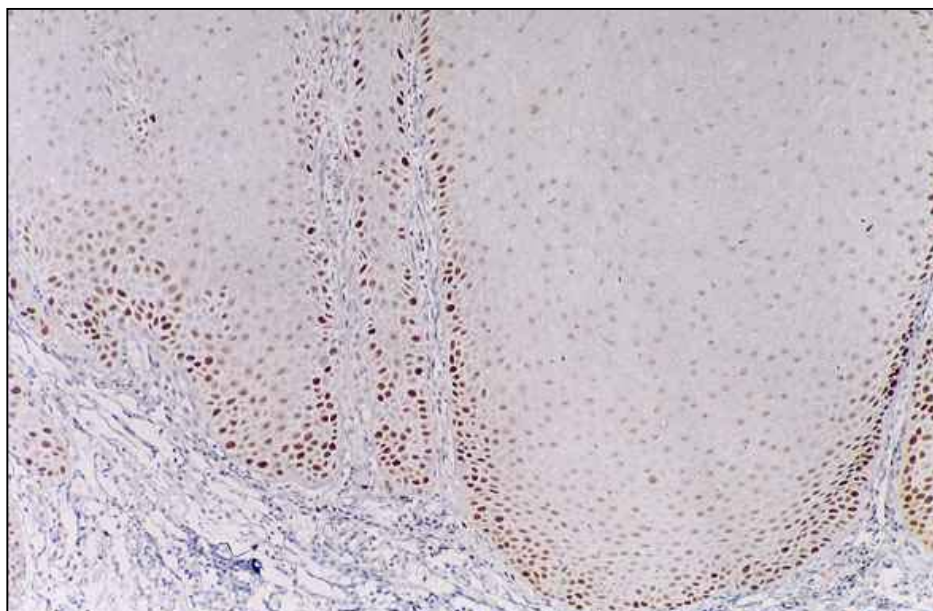


FIGURA 10 - Expressão do PCNA restringindo-se às camadas basal e parabasal em leucoplasia Grau III de Grinspan. **100x.**

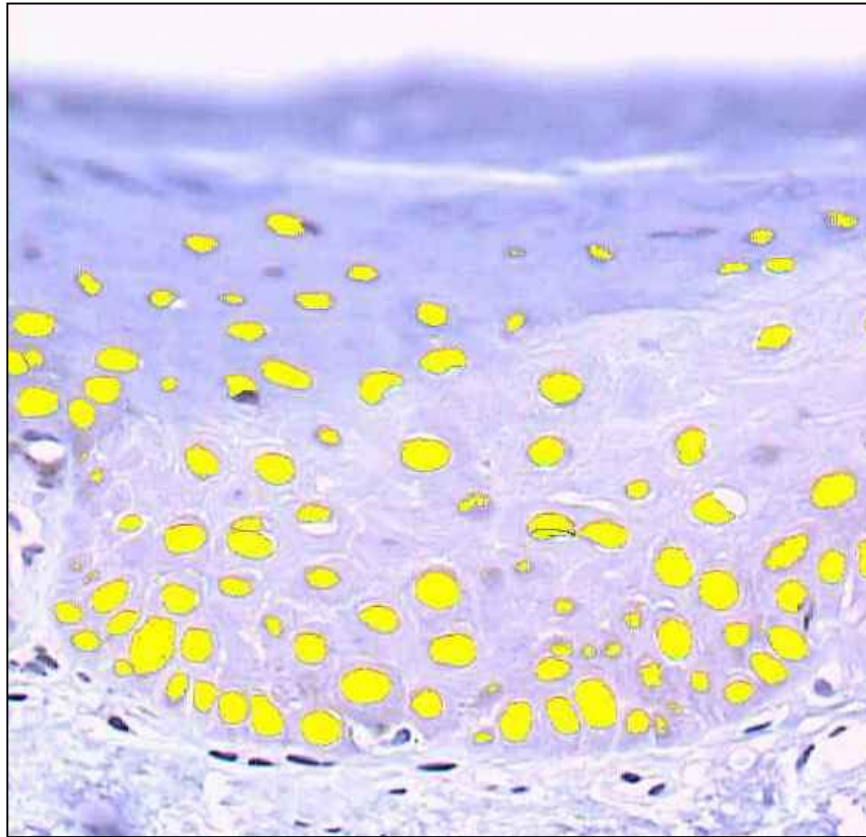


FIGURA 11 - Marcação utilizada na contagem de células no epitélio de uma das leucoplasias (Grau I de Grinspan) com expressão do PCNA. **200x**.

DISCUSSÃO

6 DISCUSSÃO

A terminologia utilizada para designar lesões leucoplásicas é um assunto controverso que causa até hoje dúvidas e problemas na interpretação de trabalhos. Atualmente, o termo leucoplasia vem sendo mais amplamente utilizado apenas com sentido clínico, para descrever aquelas lesões caracterizadas como placas ou manchas esbranquiçadas que não podem ser removidas por raspagem ou não podem ser caracterizadas como outras doenças nem clínica nem histologicamente (WHO, 1978).¹⁰⁶

Diversos fatores são associados à etiologia das leucoplasias como o tabaco, o consumo abusivo de álcool, fatores mecânicos, diferenças de potencial elétrico entre restaurações, próteses mal adaptadas, má higiene oral, deficiências vitamínicas, distúrbios endócrinos, radiação ultravioleta e a presença do papiloma vírus.

O papel do fumo na etiologia das leucoplasias foi amplamente descrito na literatura e segundo Gupta et al. (1992)³⁹ e van Der Wall (1997)¹⁰¹ a diminuição do uso deste levaria a uma diminuição da incidência dessas lesões. Dentre nossos 24 casos, 10 eram provenientes de consultório particular e por isso não tivemos acesso aos dados dos prontuários a respeito do uso do fumo. Dos casos provenientes da Faculdade, sete eram pacientes fumantes e sete eram não fumantes. Assim, não podemos relacionar o desenvolvimento dessas lesões ao uso do tabaco pelo pequeno número de amostras e informações parciais.

A *Candida sp.* é associada ao desenvolvimento das leucoplasias, ocorrendo principalmente em lesões de aspecto salpicado (Jepsen & Winther, 1965;⁴⁴ Pindborg, 1971).⁶⁹ Para Bánóczy (1977)⁵ esse fungo estaria relacionado à displasia constatada histologicamente nos casos de leucoplasia erosiva. Em nosso trabalho tivemos o cuidado de descartar lesões com candidose para evitar que a presença do fungo pudesse eventualmente influenciar a expressão imuno-histoquímica do p53 e PCNA. Contudo, a *Candida sp.* foi encontrada em todos os oito casos de leucoplasia do Grau III, que apresentavam hiperqueratinização intensa e papilomatose, porém nenhum deles apresentava alterações displásicas. Não foi possível descartamos estas lesões pelo limitado número de amostras de nossos arquivos. Esse achado pode, no entanto levar à suspeita de que a *Candida sp.* seria responsável por parte das alterações encontradas no epitélio, como a papilomatose, indo de acordo com o proposto por Kollar et al. (1954).⁴⁸ Outra possibilidade seria o fato de leucoplasias verrucosas (Grau III de Grinspan) favorecerem a infecção oportunista da *Candida sp.* no local. As lesões dos Graus I e II não apresentavam fungo na avaliação histoquímica.

As leucoplasias podem apresentar aspectos clínicos muito variados indo desde simples manchas esbranquiçadas, uniformes e indolores, até placas espessas ou mesmo lesões vegetantes de aspecto verrucoso ou papilomatoso. Diversos autores como Sugar & Bánóczy (1969),⁹⁴ Pindborg (1971)⁶⁹ e Axéll (1984)² propuseram classificações de

acordo com o aspecto clínico para essas lesões. Entretanto, não se chegou ainda a uma classificação padrão utilizada mundialmente, que facilitaria o estudo das mesmas.

Sabe-se hoje que as leucoplasias têm comportamento biológico imprevisível influenciado por vários fatores. Dentre esses fatores, a localização é muito importante, visto que lesões aparentemente similares em diferentes locais da mucosa oral podem apresentar diferentes riscos de transformação maligna (Áxéll, 1984).² Hobaek (1946/1947);⁴² Lemmer & Shear (1968);⁵² Silverman Junior et al. (1976);⁹² Bouquot & Gorlin (1986)¹⁵ citaram a mucosa jugal como um dos sítios de maior incidência das lesões leucoplásicas, área essa de baixo risco de transformação maligna. Por este motivo estudamos as lesões com essa localização, evitando assim displasias epiteliais ou alterações microscópicas de malignidade que, provavelmente, estariam presentes mais freqüentemente em áreas de risco como língua e assoalho bucal.

A idade é um outro fator relacionado com o desenvolvimento das lesões leucoplásicas, que são encontradas principalmente em indivíduos em uma faixa etária mais elevada. Em nosso trabalho, as lesões foram encontradas em pacientes com idade média de 47,8 anos, estando de acordo com os dados de van Der Wall (1995),⁹⁹ que descreveu as leucoplasias preferencialmente em pacientes acima de 40 anos, chegando ao maior número em pacientes com mais de 50 anos de idade.

Histologicamente o epitélio pode se apresentar de diversas formas, variando desde discreta hiperqueratose associada à acantose, até altos níveis de hiperqueratose associada à displasia (WHO, 1978).¹⁰⁶ Sabe-se hoje, que a presença da displasia epitelial e sua intensidade são achados importantes para prever o potencial de malignização das lesões leucoplásicas. Nestas condições são observadas cristas interpapilares bulbosas ou em forma de gota, perda de polaridade (perda da maturação progressiva em direção à superfície), pérolas de ceratina ou epiteliais (esferas de células disceratóticas), e perda da coesão celular típica (Neville et al., 1998).⁶⁴ Entretanto, a existência de subjetividade na análise dessas alterações torna esse critério falível (Karabulut et al., 1995;⁴⁶ Warnakulasuriya, 2000).¹⁰⁴ Além disso, a presença de displasia nem sempre indica a transformação maligna e sua ausência não impede que a mesma ocorra (Cruz et al., 1998).²⁶ Tudo isso somado ao fato de lesões sem alterações displásicas sofrerem transformação maligna com o tempo, (Bánóczy & Súgar, 1975;⁹ Áxell et al., 1996;³ van Der Wall et al., 1997;¹⁰¹ Schepman et al., 1998)⁸⁴ torna necessária a utilização de outros critérios para prever alterações desse tipo.

Procuramos através da imuno-histoquímica um marcador de potencial de malignização para as leucoplasias utilizando o PCNA e o p53 e atentando às hiperqueratoses. Acreditamos na possibilidade destes marcadores evidenciarem alterações sub-microscópicas de malignidade

no epitélio de leucoplasias cito e histomorfologicamente normais (sem displasia), como na maioria das lesões de mucosa jugal.

O p53 é um gene supressor de tumores que age como um guardião do genoma, percebendo danos ao DNA e evocando uma resposta protetora bloqueando o ciclo celular e induzindo a apoptose nas células afetadas (Lane, 1992).⁵¹ Quando essa proteína sofre mutações torna-se inativa e por vezes acumula-se dentro das células. Assim as células não teriam seu DNA reparado, nem seriam eliminadas através da apoptose prosseguindo com a replicação do DNA danificado, o que resultaria em mais mutações, rearranjo dos cromossomos e anaploidia (Moll & Schramm, 1998).⁶² Isso nos leva a afirmar que a perda da função do p53 parece ser um evento chave e inicial na formação dos carcinomas orais.

A expressão imuno-histoquímica da proteína p53 foi observada em 19 dos nossos 24 espécimes. Destes, cinco eram do Grau I, oito do Grau II e seis do Grau III. A marcação das lesões dos Graus I e II e de três lesões do Grau III foi muito semelhante, com positividade em várias células da camada basal e em algumas da camada parabasal. Cinco amostras do Grau III porém, apresentaram marcação em raras células da camada basal, marcação essa restrita a algumas áreas das lesões. Estatisticamente não houve diferença significativa na expressão da proteína p53 nos três grupos estudados, o que nos leva a sugerir que as diferenças no grau de queratinização das lesões não pode ser

considerada como um dado significativo para prever o potencial de malignização dessas lesões, como suspeitava Castro et al. (2000),²¹ pelo menos no estudo desta proteína. Entretanto, em relação à epitélios normais, que segundo a literatura praticamente não expressam esta proteína, a frequência de detecção foi muito maior.

O tipo de queratinização apresentado pelas leucoplasias é um fator relacionado ao potencial de malignização dessas lesões. Para Renstrup (1963)⁷⁶ as lesões com hiperparaqueratose apresentavam atividade mitótica maior que aquelas com hiperortoqueratose, e para Bánóczy (1971)⁴ carcinomas se desenvolveram preferencialmente de lesões hiperparaqueratóticas o que confere às mesmas certo grau de intranqüilidade. Apesar disso, não observamos à microscopia de luz diferenças entre o padrão de expressão do p53 nas lesões com os diferentes tipos de queratinização (hiperpara ou hiperortoqueratinização), não podendo por isso afirmar que haja qualquer diferença de potencial de malignização entre as lesões com essas variações histológicas. Em nossas amostras as leucoplasias exibiam ambos os tipos de hiperqueratose.

Regezi et al. (1995)⁷⁵ afirmaram que expressão da proteína p53 poderia ocorrer em células normais antes das alterações morfológicas, o que justificaria a expressão da mesma em nossas lesões que não apresentam alterações displásicas. Segundo Shin et al. (1994)⁸⁸ e Sauter et al. (1994),⁸² a expressão da p53 aumentaria gradativamente,

acompanhando a progressão tecidual de normal para hiperplasia, displasia e carcinoma. Estes achados corroboraram com nossos resultados, visto que encontramos maior número de células coradas nas leucoplasias do que a literatura descreve no epitélio oral normal, contribuindo para o conceito de processo seqüencial de tumorigênese (Saito et al., 1999).⁸⁰ Segundo a literatura (Cruz et al., 1998)²⁶ a marcação do p53 está restrita a células da camada basal, o que foi encontrado por nós em 5 amostras. A constatação de um número maior de células positivas para o p53 nas leucoplasias é um indício de que este epitélio já possui alterações direcionadas a transformação maligna. As alterações do p53 parecem ser eventos iniciais na carcinogênese oral, ocorrendo antes de alterações fenotípicas grosseiras, visto que as amostras do estudo realizado por Cruz et al. (1998)²⁶ apresentaram expressão suprabasal da proteína p53 em mucosa histologicamente normal, precedendo o desenvolvimento subsequente de displasia moderada a carcinoma espinocelular. Esses dados justificaram a expressão suprabasal da proteína p53 encontrada em nossas amostras de leucoplasia sem alterações displásicas. Além disso, corroboraram para nossa suspeita de que alterações sub-microscópicas possam ocorrer antes de alterações morfológicas perceptíveis.

Apoiamos com isso a sugestão que a expressão da p53 seria um biomarcador útil na evidenciação do risco de desenvolvimento do câncer

nas leucoplasias. Contudo, se o risco de malignização é maior ou não ainda não seria possível avaliar.

Para Hall & Lane (1994)⁴⁰ o número de células marcadas poderia ser mais relevante que a intensidade da reação na avaliação dos resultados. Isso porque consideraram que marcações fortemente positivas encontradas ocasionalmente em algumas lesões poderiam representar apenas o acúmulo normal da p53 em resposta a agentes genotóxicos como o fumo (Kannan et al., 1996)⁴⁵ e não teriam relação com a anormalidade do gene p53. Em nossos resultados a marcação esparsa encontrada em algumas leucoplasias, principalmente do Grau III, talvez pudesse ser justificada por esse acúmulo normal e estas lesões terem menor risco de malignização em relação às outras.

Boyle et al. (1993)¹⁶ afirmaram que o pico de ocorrência de mutações no gene p53 acontece mais tarde na progressão da malignidade, estando presente somente em lesões com atipia intensa e em carcinomas *in situ*. Esses dados estão em desacordo os resultados de nosso trabalho, visto que nenhuma lesão apresentou atipia e várias foram positivas para p53. O aprimoramento da técnica imuno-histoquímica e o desenvolvimento de novos clones do antígeno p53 podem justificar as diferenças nestes resultados.

Um contraponto nesta discussão do significado da expressão da proteína p53 está nas considerações de Murti et al. (1998)⁶³ e Cruz et al. (1998).²⁶ O anticorpo utilizado em nosso trabalho (p53 (DO-7, Dako))

reconhece tanto a proteína mutada como a proteína selvagem com estabilização aumentada através da ligação com produtos de outros genes, como descrito por Murti et al. (1998).⁶³ Assim para esses autores não se poderia afirmar que o p53 seria um biomarcador de risco para o desenvolvimento do câncer e sua presença ou ausência não deveria ser considerada para prever o curso de lesões potencialmente malignas na mucosa bucal (Cruz et al., 1998).²⁶ Por outro lado, em concordância com nossa discussão, Regezi et al. (1995)⁷⁵ e Cruz et al. (1998)²⁶ consideraram a expressão da proteína p53 um evento persistente, podendo funcionar como fator prognóstico nas lesões pré-maligna e como fator auxiliar na identificação de pacientes com alto risco para desenvolvimento de carcinomas.

Como estatisticamente não houve diferença na expressão da proteína p53 nos grupos estudados em que houve variação apenas na quantidade de queratinização não podemos afirmar que o aumento da queratinização nas lesões leucoplásicas seja um fator indicativo de um maior potencial carcinogênico.

A taxa de proliferação celular nos tecidos tem sido considerada uma importante indicadora da agressividade de lesões. Acredita-se que a proliferação desregulada possa ser uma alteração importante que sinaliza transformações pré-malignas (Hall et al., 1990).⁴¹ Por isso, utilizamos também o PCNA em nosso estudo para avaliar a atividade proliferativa e conseqüentemente associá-la ao potencial de malignização de

leucoplasias com diferentes graus de queratinização. O PCNA é uma proteína auxiliar da DNA polimerase alfa, que tem um importante papel na replicação e reparação do DNA durante o ciclo celular (Girod et al., 1998).³³ Na carcinogênese oral, a expressão de marcadores de proliferação como o PCNA correlaciona-se relativamente bem com a classificação histológica da mucosa normal e lesões benignas e malignas da mucosa oral.

Entretanto, McCormick & Hall (1992)⁵⁹ afirmam que é necessário realizar uma análise criteriosa da expressão do PCNA quando usado para avaliar a proliferação celular, visto que sua expressão pode ser influenciada por fatores técnicos, pode ser induzida por fatores de crescimento ou pode ser resultante da participação do mesmo no processo de reparo do DNA.

Em nosso estudo observamos expressão do PCNA em todas as lesões. No Grau I, sete amostras apresentaram marcação em várias células da camada basal, parabasal e da camada espinhosa do epitélio, apenas uma das amostras apresentou pouca marcação na camada espinhosa. No Grau II, à semelhança do anterior, todas as amostras mostraram marcação em várias células da camada basal, parabasal e espinhosa do epitélio. Já no Grau III, o predomínio foi de positividade apenas nas camadas basal e parabasal, com somente uma das amostras exibindo células da camada espinhosa PCNA positivas.

Apesar de constatarmos variação de expressão na análise histopatológica ao microscópio, estatisticamente a diferença não foi significativa. Assim, matematicamente também não podemos relacionar o grau de queratinização das leucoplasias com uma maior ou menor atividade proliferativa celular. Mas suspeitamos que aquelas lesões do Grau III com papilomatose sejam discretamente mais inocentes do que as demais, visto que o teste de Tukey nos permitiu inferir que há uma tendência das lesões de Grau I apresentarem um maior número de células coradas que as lesões de Grau III caso nossa amostra fosse maior. Portanto, o que há muito se pensava que lesões verrucosas e com acantose têm maior probabilidade de sofrerem transformação maligna (Castro et al., 2000)²¹ não tem sido comprovado imuno-histoquimicamente com marcadores de malignidade.

Tucci & Crivelini* em seu estudo sobre AgNOR em leucoplasias demonstrou estatisticamente que leucoplasias Grau I e II eram mais proliferativas que as lesões de Grau III, que por sua vez assemelhavam-se ao epitélio normal. Nossos resultados imuno-histoquímicos não demonstram essa mesma relação. Entretanto, subjetivamente o padrão de expressão do PCNA assemelha-se aquele descrito por esses autores, com marcação semelhante em leucoplasias de Graus I e II, e marcação ligeiramente mais discreta em lesões de Grau III.

Martinez-Lara et al. (1996)⁵⁷ sugeriram que a expressão suprabasal do PCNA poderia funcionar como um marcador em displasias

*TUCCI, R., CRIVELINI, M. M. AgNOR em leucoplasias de mucosa jugal grau I, II e III de Grinspan. (No Prelo)

iniciais, sem sinais histológicos. Esse relato está de acordo com nossa suspeita, como discutido anteriormente com o p53, da existência de alterações sub-microscópicas histoquímicas precedendo as alterações histológicas visíveis ao microscópio e ainda justificariam a expressão suprabasal do PCNA visualizada em nossas amostras.

Segundo Huang et al. (1994)⁴³ as lesões com padrão de expressão suprabasal do PCNA têm maior chance de serem pré-malignas do que as lesões com padrão de expressão basal. As amostras analisadas em nosso estudo apresentaram o padrão de expressão suprabasal do PCNA, o que poderia sugerir indícios de malignização ou relação com o reparo do DNA, como sugerido por Birchall et al. (1997)¹⁴ e van Diest et al. (1998).¹⁰² Assim, trata-se de um epitélio diferente, em estado mórbido preocupante, bioquimicamente alterado, porém morfológicamente normal. Esse fato já é suficiente para reforçar o real significado clínico da leucoplasia que não deve ser interpretada como uma alteração simples hiperqueratótica do epitélio da mucosa bucal, mas como uma lesão potencialmente perigosa. Aliás, nossos resultados em última análise confirmam o que a experiência clínica já evidenciava no tocante à cautela do clínico frente a estas lesões. Porém, ainda não é possível obter informações mais precisas do maior ou menor risco de transformação maligna utilizando imuno-marcadores, pelo menos aqueles existentes no mercado. Contudo, representa um método promissor de pesquisa para se chegar a este objetivo.

CONCLUSÃO

7 CONCLUSÃO

- A maior parte das leucoplasias de mucosa jugal, em seus diferentes graus de queratinização, apresentou expressão de p53 e PCNA.
 - O p53 foi detectado na camada basal e parabasal e o PCNA em praticamente todas as camadas epiteliais das lesões leucoplásicas estudadas.
 - A marcação do p53 e PCNA foi histologicamente e estatisticamente semelhante dentre os três graus de leucoplasia estudados, apesar do Grau III exibir marcação mais discreta em uma análise subjetiva.
 - De acordo com os marcadores estudados, não existe diferença de atividade proliferativa celular entre leucoplasias de mucosa jugal com diferentes graus de queratinização e sem displasia epitelial, porém mostra tratar-se de epitélios com alterações sub-microscópicas direcionadas à transformação maligna e aumento da atividade proliferativa celular.
-

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- 1 AXÉLL, T. Occurrence of leukoplakia and some other oral white lesions among 20,333 adults Swedish people. *Community Dent. Oral Epidemiol.*, v.15, n.1, p.46-51, 1987.
- 2 AXÉLL, T. et al. International seminar on oral leukoplakia and associated lesions related to tobacco habits: Lund University, Malmo, sweden, June 27-30. *Community Dent. Oral Epidemiol.*, v.12, n.3, p.145-54, 1984.
- 3 AXÉLL, T. et al. Oral white lesions with special reference to precancerous and tobacco-related lesions: conclusions of an international symposium held in Uppsala, Sweden, May 18-21 1994. *J. Oral Pathol. Med.*, v.25, n.2, p.49-54, 1996.
- 4 BÁNÓCZY, J. Cytological study of the keratinization pattern in oral leukoplakia. *J. Dent. Res.*, v.50, n.6, p.1562-6, 1971.
- 5 BÁNÓCZY, J. Follow-up studies in oral leukoplakia. *J. Maxillofac. Surg.*, v.5, n.1, p.69-75, 1977.
- 6 BÁNÓCZY, J., CSIBA, A. Comparative study of the clinical picture and histopathologic structure of oral leukoplakia. *Cancer*, v.29, n.5, p.1230-4, 1972.
- 7 BÁNÓCZY, J., CSIBA, A. Ocurrence of epithelial dysplasia in oral leukoplakia: Analysis and follow-up study of 12 cases. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, v.42, n.6, p.766-74, 1976.

- 8 BÁNÓCZY, J., SUGÁR, L. Longitudinal studies in oral leukoplakias. *J. Oral Pathol.*, v.1, n.6, p.265-72, 1972.
 - 9 BÁNÓCZY, J., SÚGÁR, L. Progressive and regressive changes in Hungarian oral leukoplakias in the course of longitudinal studies. *Community Dent. Oral Epidemiol.*, v.3, n.4, p.194-7, 1975.
 - 10 BÁNÓCZY, J., JUHÁSZ, J., ALBRECHT, M. Ultrastructure of different clinical forms of oral leukoplakia. *J. Oral. Pathol.*, v.9, n.1, p.41-53, 1980.
 - 11 BARONCELLI, G., QUESTA, L. Il problema terapeutico delle leucoplasie del cavo orale. *Rev. Ital. Stomat.*, v.20, n.10, p.1290-1306, 1965.
 - 12 BENNETT, W. P. et al. Archival analysis of p53 genetic and protein alterations in chinese esophageal cancer. *Oncogene*, v.6, n.10, p.1779-84, 1991.
 - 13 BERNIER, J. L. *The managemnet of oral disease*. St. Louis: Mosby, 1955 apud SHIRA, R. B. Diagnosis of common lesions of the oral cavity. *J Oral Surg.*, v.15, n.2, p.95-119, 1957.
 - 14 BIRCHALL, M. A. et al. Apoptosis, mitosis, PCNA and bcl-2 in normal, leukoplakic and malignant epithelia of human oral cavity: prospective, in vivo study. *Oral Oncol.*, v.33, n.6, p.419-25, 1997.
-

- 15 BOUQUOT, J. E., GORLIN, R. J. Leukoplakia, lichen planus, and other oral keratoses in 23,616 white Americans over the age of 35 years. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, v.61, n.4, p.373-81, 1986.
- 16 BOYLE, J. O. et al. The incidence of mutations increases with progression of the head and neck cancer. *Cancer Res.*, v.53, n.19, p.4477-80, 1993.
- 17 BRAVO, R. et al. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase – delta. *Nature*, v.326, n.6112, p.515-7, 1987.
- 18 BURKHARDT, A. Advanced methods in the evaluation of premalignant lesions and carcinomas of the oral mucosa. *J. Oral Pathol.*, v.14, n.10, p.751-78, 1985.
- 19 BUTLIN, H. T. *Diseases of the tongue*. Philadelphia: Lea Brothers, 1855. chap 9. apud MCCARTHY, P. L., SHKLAR, G. *Diseases of the oral mucosa: diagnosis, management, therapy*. New York: McGraw-Hill, 1964. p.98-113.
- 20 CALIFANO, A., CAPUTO, R. La leukoplaia. *Inf. Derm.*, v.80, p.47, 1969 apud GRINSPAN, D. Enfermidades propias de las mucosas In:____., *Enfermidades de la boca: semiologia, patologia, clinica y terapeutica de la mucosa bucal*. Buenos Aires: Mundi,1973. cap. p.1465-517.
- 21 CASTRO, A. L. et al. *Estomatologia*. 3.ed. São Paulo: Ed. Santos, 2000. 235p.
-

- 22 CAWSON, R. A. Chronic oral candidiasis and leukoplakia. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, v.22, n.5, p.582-91, 1966.
- 23 CELIS, J. E., CELIS, A. Cell cycle-dependent variations in the distribution of the nuclear protein cyclin proliferating cell nuclear antigen in cultured cells: subdivision of S phase. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, v.82, n.10, p.3262-6, 1985.
- 24 CHATTOPADHYAY, A., CHAWDA, J. G., DOSHI, J. J. Silver-binding nucleolar organizing regions: a study of oral leukoplakia and squamous cell carcinoma. *Int. J. Oral. Maxillofac. Surg.*, v.23, n.6, pt.1, p.374-7, 1994.
- 25 CHIANG, C. et al. Expression of p53 protein in oral submucous fibrosis, oral epithelial hiperkeratosis, and oral epithelial dysplasia. *J. Formos. Med. Assoc.*, v.99, n.3, p.229-34, 2000.
- 26 CRUZ, I. B. et al. p53 expresion 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.*, v.184, n.4, p.360-8, 1998.
- 27 DONEHOWER, L. A., BRADLEY, A. The tumor supressor p53. *Biochim. Biophys Acta.*, v.1155, n.2, p.181-205, 1993.
- 28 FAKAN, S., HERNANDEZ-VERDUN, D. The nucleolus and the nucleolar organizer regions. *Biol. Cell*, v.56, n.3, p.189-206, 1986.
-

- 29 FERGUSON-SMITH, M. A., HANDMAKER, S. D. Observations on satellited human chromosomes. *Lancet*, v.2, n.721, p.638-40, 1961.
- 30 FISCHMAN, S. T. et al. Correlative clinico-pathological evaluation of oral premalignancy. *J. Oral Pathol.*, v.11, n.4, p.283-9, 1982.
- 31 GIROD, S. C., KRUEGER, G., PAPE, H.D. p53 and Ki 67 expression in preneoplastic and neoplastic lesions of oral mucosa. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, v.22, n.5, p.285-8, 1993.
- 32 GIROD, S. C., PAPE, H.D., KRUEGER, G.R. p53 and PCNA expression in carcinogenesis of the oropharyngeal mucosa. *Eur. J. Cancer B. Oral Oncol.*, v.30B, n.6, p.419-23, 1994.
- 33 GIROD, S. C. et al. Proliferative activity and loss of function of tumour suppressor genes as 'biomarkers' in diagnosis and prognosis of benign and preneoplastic oral lesions and oral squamous cell carcinoma. *Br. J. Oral Maxillofac. Surg.*, v.36, n.4, p.252-60, 1998.
- 34 GOODPASTURE, C., BLOOM, S. E. Visualization of nucleolar organizer regions in mammalian chromosomes using silver staining. *Chromosoma*, v.53, n.1, p.37-50, 1975.
- 35 GREENBLATT, M. S. et al. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.*, v.54, n.18, p.4855-78, 1994.
-

- 36 GREER JUNIOR., R. D., EVERSOLE, L. R., CROSBY, L. K. Detection of human papillomavirus-genomic DNA in oral epithelial dysplasias, oral smokeless tobacco-associated leukoplakias, and epithelial malignancies. *J. Oral Maxillofac. Surg.*, v.48, n.11, p.1201-5, 1990.
- 37 GRINSPAN, D. Enfermidades propias de las mucosas In:____., *Enfermidades de la boca: semiologia, patologia, clinica y terapeutica de la mucosa bucal*. Buenos Aires: Mundi,1973. p.1465-517.
- 38 GUPTA, P. C. et al. Incidence rates of cancer and natural history of oral precancerous lesions in a 10-year follow-up study of Indian villagers. *Community Dent. Oral Epidemiol.*, v.8, n.6, p.283-333, 1980.
- 39 GUPTA, P. C. et al. Primary prevention trial of oral cancer in India: a 10-year follow-up study. *J. Oral Pathol. Med.*, v.21, n.10, p.433-9, 1992.
- 40 HALL, P. A., LANE, D. P. p53 in tumour pathology: can we trust immunohistochemistry?: revisited! *J. Pathol.*, v.172, n.1, p.1-4, 1994.
- 41 HALL, P. A. et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J. Pathol.*, v.162, n.4, p.285-94, 1990.
-

- 42 HOBÆK, A. Leukoplakia oris. *Acta. Odontol. Scand.*, v.7, p.61-91, 1946/1947.
- 43 HUANG, W. Y. F. et al. Histopathologic evaluation of proliferating cell nuclear antigen (PC10) in oral epithelial hiperplasias and premalignant lesions. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, v.78, n.6, p.748-54, 1994.
- 44 JEPSEN, A., WINTHER, J. E. Mycotic infection in oral leukoplakia. *Acta. Odontol. Scand.*, v.23, n.3, p.239-56, 1965.
- 45 KANNAN, S. et al. Expression of p53 in leukoplakia and squamous cell carcinoma of the oral mucosa: correlation with expression of Ki67. *Clin. Molecular Pathol.*, v.49, n.3, p.170-5, 1996.
- 46 KARABULUT, A. et al. Observer variability in the histologic assessment of oral premalignant lesions. *J. Oral Pathol. Med.*, v.24, n.5, p.198-200, 1995.
- 47 KOBAYASHI, I. et al. The proliferate activity in oral epithelial dysplasia analyzed by proliferating cell nuclear antigen immunostaining and argyrophilic nucleolar organizer region staining. *Hum. Pathol.*, v.26, n.8, p.907-13, 1995.
- 48 KOLLAR, J. A. et al. Leukoplakia. *J. Am. Dent. Assoc.*, v.49, n.5, p.538-48, 1954.
- 49 KRAMER, I. R. H., EL-LABBAN, N., LEE, K. W. The clinical features and risk of malignant transformation in sublingual keratosis. *Br. Dent. J.*, v.144, n.6, p.171-80, 1978.
-

- 50 KURKI, P., OGATA, K., TAN, E. M. Monoclonal antibodies to proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin as probes for proliferating cells by immunofluorescence microscopy and flow cytometry. *J. Immunol. Methods*, v.109, n.1, p.49-59, 1988.
- 51 LANE, D. P. Cancer. p53, guardian of the genome. *Nature*, v.358, n.6381, p.15-6, 1992.
- 52 LEMMER, J., SHEAR, M. Precancerous and cancerous lesions of the mouth. *J. Dent. Assoc. South. Afr.*, v.23, n.9, p.274-85, 1968.
- 53 LIND, P. O. Malignant transformation in oral leukoplakia. *Scand. J. Dent. Res.*, v.95, n.6, p.449-55, 1987.
- 54 LIND, P. O. et al. Local immunoreactivity and human papillomavirus (HPV) in oral precancer and cancer lesions. *Scand. J. Dent. Res.*, v.94, n.5, p.419-26, 1986.
- 55 LIU, S. C., KLEIN-SZANTO, A. J. P. Markers of proliferation in normal and leukoplakic oral epithelia. *Oral Oncol.*, v.36, n.2, p.145-51, 2000.
- 56 LÖNING, T. H. et al. Occurrence of papillomavirus structural antigens in oral papillomas and leukoplakias. *J. Oral. Pathol.*, v.13, n.2, p.155-65, 1984.
- 57 MARTINEZ-LARA, I. et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) as a marker of dysplasia in oral mucosa. *Acta. Stomatol. Belg.*, v.93, n.1, p.29-32, 1996.
-

- 58 MATHEWS, M. B. et al. Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. *Nature*, v.309, n.24, p.374-6, 1984.
- 59 McCORMICK, D., HALL, P. A. The complexities of proliferating cell nuclear antigen. *Histopathology*, v.21, n.6, p.591-4, 1992.
- 60 MEHTA, F. S. et al. Epidemiologic and histologic study of oral cancer and leukoplakia of 50,915 villagers in India. *Cancer*, v.24, n.4, p.832-49, 1969.
- 61 MITTAL, K. R., DEMOPOULOS, R. I., GOSWAMI, S. Proliferating cell nuclear antigen (cyclin) expression in normal and abnormal cervical squamous epithelia. *Am. J. Surg. Pathol.*, v.17, n.2, p.117-22, 1993.
- 62 MOLL, U. M., SCHRAMM, L. M. p53: an acrobat in tumorigenesis. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, v.9, n.1, p.23-37, 1998.
- 63 MURTI, P. R. et al. p53 expression in oral precancer as a marker for malignant potential. *J. Oral Pathol. Med.*, v.27, n.5, p.191-6, 1998.
- 64 NEVILLE, B.W. et al. *Patologia Oral & Maxilofacial*. 1.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 1998. 705p.
- 65 NISHIOKA, H. et al. Immunohistochemical detection of p53 oncoprotein in human oral squamous cell carcinomas and leukoplakias: comparison with proliferating cell nuclear antigen staining and correlation with clinicopathological findings. *Oncology*, v.50, n.6, p.426-9, 1993.
-

- 66 NUNES, F. D. *Leucoplasia bucal: aspectos morfológicos, imunohistoquímicos e histoquímicos*. São Paulo, 1991. 83p. Tese (Doutorado em Patologia Bucal) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo.
- 67 PAGET, J. Diseases of the tongue. London, 1900 apud HOBÆK, A. Leukoplakia oris. *Acta Odontol. Scand.*, v.7, p.61-91, 1946-1947.
- 68 PILLAI, K. R. et al. Argyrophilic nucleolar organizer regions in the evaluation of tumour progression in the oral mucosa: correlation with tissue pathology. *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, v.120, n.12, p. 723-6, 1994.
- 69 PINDBORG, J. J. Oral leukoplakia. *Aust. Dent. J.*, v.16, n.2, p.83-93, 1971.
- 70 PINDBORG, J. J., REIBEL, J., HOLMSTRUP, P. Subjectivity in evaluating oral epithelial dysplasia, carcinoma in situ and initial carcinoma. *J. Oral Pathol.*, v.14, n.9, p.698-708, 1985.
- 71 PINDBORG, J. J. et al. Studies in oral leukoplakias V. Clinical and histologic signs of malignancy. *Act. Odontol. Scand.*, v.21, p.407-14, 1963.
- 72 PINDBORG, J. J. et al. Studies in oral leukoplakia: A preliminary report on the period prevalence of malignant transformation in leukoplakia based on a follow-up study of 248 patients. *J. Amer. Dent. Assoc.*, v.76, n.4, p.767-71, 1968.
-

- 73 PLOTON, D. et al. Improvement in the staining and in the visualization of the argyrophilic proteins of the nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem. J.*, v.18, n.1, p.5-14, 1986.
- 74 REGEZI, J. A., SCIUBBA, J. J. *Patologia bucal: correlações clinicopatológicas*. 3.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2000. 475p.
- 75 REGEZI, J. A. et al. p53 protein expression in sequential biopsy of oral dysplasias and in situ carcinomas. *J. Oral Pathol. Med.*, v.24, n.1, p.18-22, 1995.
- 76 RENSTRUP, G. Studies in oral leukoplakias. IV. Mitotic activity in oral leukoplakias. A preliminary report. *Acta Odontol. Scand.*, v.21, p.333-40, 1963.
- 77 ROED-PETERSEN, B., RENSTRUP, G., PINDBORG, J. J. Candida in oral leukoplakias. *Scand. J. Dent. Res.*, v.78, n.4, p.323-8, 1970.
- 78 ROWLEY, H. et al. An immunohistochemical analysis of p53 protein expression in premalignant and malignant tissues of the oral cavity. *Clin. Otolaryngol.*, v.22, n.1, p.23-9, 1997.
- 79 RÜSCHOFF, J. et al. Nucleolar organizer regions (NORs): basic concepts and practical application in tumor pathology. *Path. Res. Pract.*, v.185, n.6, p.878-85, 1989.
-

- 80 SAITO, T., NAKAJIMA, T., MOGI, K. Immunohistochemical analysis of cell cycle-associated proteins p16, pRb, p53, p27 and Ki67 in oral cancer and precancer with special reference to verrucous carcinomas. *J. Oral Pathol. Med.*, v.28, n.5, p.226-32, 1999.
- 81 SARANATH, D. et al. p53 inactivation in chewing tobacco-induced oral cancers and leukoplakias from India. *Oral Oncol.*, v.35, n.3, p.242-50, 1999.
- 82 SAUTER, E. R. et al. p53 is overexpressed in fifty percent of pre-invasive lesions of head and neck epithelium. *Carcinogenesis*, v.15, n.10, p.2269-74, 1994.
- 83 SCHEPMAN, E. H. et al. Concomitant leukoplakia in patients with oral squamous cell carcinoma. *Oral Dis.*, v.5, n.3, p.206-9, 1999.
- 84 SCHEPMAN, E. H. et al. Malignant transformation of oral leukoplakia: a follow-up study of a hospital-based population of 166 patients with oral leukoplakia from the Netherlands. *Oral Oncol.*, v.34, n.4, p.270-5, 1998.
- 85 SCHWIMMER. Leukoplakia buccalis. *Vierteljahrsschr. Derm.*, p.511, 1877, apud HOBÆK, A. Leukoplakia oris. *Acta Odontol. Scand.*, v.7, p.61-91, 1946-1947.
- 86 SHAFER, W. G., HINE, M., LEVY, B. *Tratado de patologia bucal*. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1985. p.80-212.
-

-
- 87 SHIN, D. M. et al. Sequential increases in proliferating cell nuclear antigen expression in head and neck tumorigenesis: a potential biomarker. *J. Nat. Cancer Inst.*, v.85, n.12, p.971-8, 1993.
- 88 SHIN, D. M. et al. Activation of p53 gene expression in premalignant lesions during head and neck tumorigenesis. *Cancer Res.*, v.54, n.2, p.321-6, 1994.
- 89 SHIRA, R, B. Diagnosis of common lesions of the oral cavity. *J. Oral Surg.*, v.15, n.2, p.95-119, 1957.
- 90 SILVERMAN JUNIOR., S., ROZEN, R. D. Observations on the clinical characteristics and natural history of oral leukoplakia. *J. Am. Dent. Assoc.*, v.76, n.4, p.772-7, 1968.
- 91 SILVERMAN JUNIOR., S., GORSKY, M., LOZADA, F. Oral leukoplakia and malignant transformation: a follow-up study of 257 patients. *Cancer*, v.53, n.3, p.563-8, 1984.
- 92 SILVERMAN JUNIOR., S. et al. Malignant transformation and natural history of oral leukoplakia in 57,518 industrial workers of Gujarat, India. *Cancer*, v.38, n.4, p.1790-5, 1976.
- 93 STURGIS, S. N., LUND, C. C. Leukoplakia buccalis and keratosis labiais. *N. Engl. J. Med.*, v. 210, p.996-1006, 1934.
- 94 SÚGAR, L., BÁNÓCZY, J. Follow-up studies in oral leukoplakia. *World Health Organ.*, v. 41, n.2, p.289-93, 1969 apud BÁNÓCZY, J. Follow-up studies in oral leukoplakia. *J. Maxillofac. Surg.*, v.5, n.1, p.69-75, 1977.
-

- 95 TOMMASI, A. F. *Diagnóstico em patologia bucal*. 2.ed. São Paulo: Pancast, 1998. 664p.
- 96 TSAI, S-T., JIN, Y-T. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in oral squamous cell carcinomas. *J. Oral Pathol. Med.*, v.24, n.7, p.313-5, 1995.
- 97 TSUJI, T. et al. The significance of PCNA and p53 protein in some oral tumors. *Int. J. Oral Maxillofac. Surg.*, v.24, n.3, p.221-5, 1995.
- 98 TYLDESLEY, W. R. *Atlas colorido de medicina bucal*. 2.ed. São Paulo: Artes Médicas, 1995. 256p.
- 99 VAN DER WALL, I. Diagnóstico y tratamiento de lesiones precancerosas. *FDI World*, v. 4, n. 2, p.6-9, 1995.
- 100 VAN DER WALL, I., SCHEPMAN, K. P., VAN DER MEIJ, E. H. A modified classification and staging system for oral leukoplakia. *Oral Oncol.*, v.36, n.3, p.264-6, 2000.
- 101 VAN DER WALL, I. et al. Oral leukoplakia: a clinicopathological review. *Oral Oncol.*, v.33, n.5, p.291-301, 1997.
- 102 VAN DIEST, P. J., BRUGAL, G., BAAK, J. P. A. Proliferation markers in tumours: interpretation and clinical value. *J. Clin. Pathol.*, v.51, n.10, p.716-24, 1998.
- 103 WALDRON, C. A., SHAFER, W. G. Leukoplakia revisited: a clinicopathologic study 3256 oral leukoplakias. *Cancer*, v.36, n.4, p.1386-92, 1975.
-

- 104 WARNAKULASURIYA, S. Lack of molecular markers to predict malignant potencial of oral precancer. *J. Pathol.*, v.190, n.4, p.407-9, 2000.
- 105 WARNAKULASURIYA, K. A. A. S., JOHNSON, N. W. Nucleolar organiser region (NOR) distribution as a diagnostic marker in oral keratosis, dysplasia and squamous cell carcinoma. *J. Oral. Pathol. Med.*, v.22, n.2, p.77-81, 1993.
- 106 WORLD HEALTH ORGANIZATION. Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, v.46, n.4, p.528-39, 1978.
- 107 WRIGHT, B. J. M. A review and update of oral precancerous lesions. *Tex. Dent. J.*, v.115, n.6, p.15-9, 1998.
-

LAWALL,, M. A. *Expressão do PCNA e p53 em leucoplasias de mucosa jugal com diferentes graus de queratinização (Graus I, II e III de Grinspan)*. Araçatuba, 2003. 118p. Dissertação Mestrado em Odontologia – Faculdade de Odontologia. Universidade Estadual Paulista.

RESUMO

As leucoplasias são lesões orais que podem apresentar vários aspectos clínicos e histológicos e são associadas a malignidade geralmente quando apresentam alterações displásicas. Contudo, essas transformações podem ocorrer em lesões sem displasia que apresentam aspecto clínico inocente. Por esse motivo nossa proposta foi estudar a expressão imuno-histoquímica do p53 e PCNA em leucoplasias sem displasias, buscando correlacionar os resultados apenas com o grau de queratinização epitelial. Para isso foram utilizados as leucoplasias Grau I, II e III de Grinspan, num total de 24 lesões, todas localizadas em mucosa jugal.

A maior parte das leucoplasias, em seus diferentes graus de queratinização, apresentou expressão de p53 e PCNA. A marcação do p53 restringiu-se às camadas basal e parabasal, enquanto a do PCNA ocorreu em praticamente todas as camadas epiteliais. O padrão de expressão desses marcadores foi histologicamente e estatisticamente semelhante entre as lesões com esta variação de queratinização. Ficou

evidente que os epitélios não displásicos das leucoplasias possuem sinais sub-microscópicos de alterações direcionadas à transformação maligna e o grau de queratinização não se correlacionou ao maior risco desse acontecimento.

Palavras-chave: Leucoplasia; imunohistoquímica; genes p53; antígeno nuclear de célula em proliferação (PCNA).

LAWALL,, M. A. *Expression of PCNA and p53 in leukoplakias of bucal mucosa with different degree of keratinization (Degree I, II and III of Grinspan)*. Araçatuba, 2003. 118p. Dissertação Mestrado em Odontologia – Faculdade de Odontologia. Universidade Estadual Paulista.

ABSTRACT

Leukoplakias are oral lesions that may have many clinical and histologic aspects and they are usually associated with malignancy when dysplastic alterations are shown. However, these transformations may occur in non dysplastic lesions that show harmless clinical aspect. For this reason, our proposal was to study the p53 and PCNA immunohistochemical expression in no dysplastic leukoplakias, trying to correlate the results with the epithelial keratinization degree only. For this, 24 leykoplakias were used, lesions with degree I, II and III of Grinspan, all located in buccal mucosa.

Most of the leukoplakias showed p53 and PCNA expression in their different keratinization degrees. The p53 marking were confined at basal and parabasal layer, while the PCNA marking occurred in practically all epithelia layers. The expression pattern of these markers were histologically and estatistically similar between the lesions with this keratinization variation. It was evident that non dysplastic epithelium of leukoplakias have no visible signs of the alterations at the microscope which leads to malignant transformation, and that the keratinization degree did not correlate to greater risk of this event.

Keywords: Leukoplakia; immunohistochemistry; genes p53; proliferating cell nuclear antigen (PCNA).
