

Renato Costa Franco Baldan

CORRELAÇÃO DA CANDIDOSE COM A  
ATIVIDADE PROLIFERATIVA EPITELIAL EM  
LEUCOPLASIAS DA MUCOSA JUGAL

Araçatuba  
2005

Renato Costa Franco Baldan

CORRELAÇÃO DA CANDIDOSE COM A  
ATIVIDADE PROLIFERATIVA EPITELIAL EM  
LEUCOPLASIAS DA MUCOSA JUGAL

Dissertação apresentada à  
Faculdade de Odontologia da  
Universidade Estadual Paulista  
"Júlio de Mesquita Filho", *Campus*  
de Araçatuba, para a obtenção do  
título de Mestre, pelo Curso de Pós  
Graduação em Odontologia. Área de  
Concentração: Estomatologia.

Orientador: **Prof Adj Marcelo Macedo Crivelini**

Araçatuba  
2005

- 
- Dedico este trabalho aos meus pais que sempre souberam que o ensino é uma arte de viver.
-

---

## Agradecimentos

Agradeço:

➤ Ao meu orientador, professor Marcelo Macedo Crivelini, por sua postura consciente.

➤ Aos professores Glauco Issanu Niyahara, Ana Maria Pires Soubhia, Elerson Gaetti Jardim Júnior, Renata Callestini Filipini, Norberto Perri Moraes, Alvimar Lima de Castro, Eder Ricardo Biazolla, Gilberto Aparecido Coclete, Idelmo Rangel Garcia Junior, Paulo Sérgio Perri de Carvalho, Eduardo Passos Rocha, Gilson Machado D'antônio, Leda Maria Pescinini Salzedas, por seus ensinamentos.

➤ Ao professor Wilson Roberto Poi, pelo respeito e reconhecimento conquistados através do exercício de uma amizade valiosa.

➤ Aos funcionários do Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica Elaine Cristina Francischini Ferreira, José Marcelo Tramarim, Luzia Maria de Oliveira Francischini, Maria Aparecida Martins da Silva, Marli Barbosa dos Santos, Miriam Regina Mouro Ferraz Lima, pelo excelente trabalho prestado a esta pesquisa.

➤ Às funcionárias da biblioteca Izamar da Silva Freitas, Alexandra Bento, Maria Claudia de Castro Benez, Isabel Pereira de Matos, Claudia Frare, Fátima Maria Metello Bertolucci, Ivone Rosa de Lima Munhoz, Luzia Anderlini, Jéssica Duberger Neves, Marina Alves Santos pela revisão das normas científicas e orientações na busca das referências que compõem minha pesquisa

---

- 
- Às funcionárias da secretaria de pós-graduação Valéria de Queiroz Marcondes Zagatto e Marina Midori Sakamoto Kawagoe, pela eficiência e bom humor no mundo metódico da burocracia.
  - Ao meu irmão Cláudio Costa Franco pelas oportunidades e bons conselhos.
  - Ao casal de amigos César Aurélio e Ana Carolina Zaze e seus familiares, pelo companheirismo sincero.
  - Aos amigos André Gimenes, Isabel Cristina Lui Poi, Flávia Furlaneto, Rodrigo Marinho, Henrique José Baldo de Toledo, Leandro Kawata, Thaís Mara Manfrin, Lívia Guimarães Zina, Alan Roger dos Santos Silva, Ana Carolina Ribeiro, Felipe Munhoz, Eduardo Augusto Tomazinho, Caio Vinícius Tomazinho, Henry Mascaros, Eric Marques Resende, Gracieli Prado Elias, pelos bons papos, incentivos e elogios culinários.
  - As pesquisadoras Claudia Misui Kanno e Melaine de Almeida Lawall pela contribuição técnica e científica que otimizaram o andamento desta pesquisa.
  - Aos meus alunos que são meu maior desafio.
  - Aos que acreditam que o ensino pode ir muito além do tecnicismo científico, mas ser um instrumento valioso de cidadania.
-

---

BALDAN, R. C. F. **Correlação da candidose com a atividade proliferativa epitelial em leucoplasias da mucosa jugal.** 2005. f  
Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2005

### **Resumo**

Tem sido descrito que cerca de 30% do total leucoplasias possui tendência à malignização, a uma taxa de 2,9% ao ano. O envolvimento concomitante de leucoplasias com *Candida albicans* tem sido relacionado a possíveis processos de malignidade, tornando este questionamento uma fonte de debate. O presente trabalho avaliou a expressão qualitativa de p 53, Ki-67, PCNA e AgNOR em leucoplasias associadas à Candidose. Não foram observadas diferenças significativamente estatísticas (Tukey test,  $p < 0,05$ ) no grupo corado por AgNOR. Esses resultados discutem a taxa de proliferação celular epitelial e, talvez, indícios de alterações genéticas malignas presentes nas leucoplasias associadas à Candidose.

Palavras-chaves: leucoplasia.candida.imunohistoquímica.

Autorizadas pelo Decs [www.bireme.br](http://www.bireme.br)

---

---

BALDAN, R. C. F. **Candidosis correlation with epithelial proliferative activity in leukoplakia from jugal mucosa.** 2005. f Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba, 2005.

### **Abstract**

It has been described that 30% of leukoplakia with tendencies to malignization, in a rate of 2,9% per year. The involvement of leukoplakia associated to *Candida albicans* has been related to possible process of malignity, witch makes this question a source of debate. The aim of this study was to evaluate the qualitative expression of p53, Ki-67, PCNA and AgNOR in leukoplakia related to Candidosis. It was't observated statistical diferences in the AgNOR group (F test,  $p < 0,05$ -ANOVA one-way). This results discuss a rate of celular epithelial proliferation and possibly genetic alterations present in leukoplakia related to Candidosis.

Keywords: leukoplakia.candida.immunohistochemical.

Approved by Decs [www.bireme.br](http://www.bireme.br)

---

## Lista de Figuras

Figura 1 – Aspecto histológico da leucoplasia oral sem *Candida* **Hematoxilina-eosina (100x).**

Figura 2 – Aspecto histológico da leucoplasia oral com *Candida* – **Metanamina-prata. (100x).**

Figura 3 – NORs na camada basal e parabasal de epitélio normal – **AgNOR (1000x).**

Figura 4 – NORs na camada basal e para basal da leucoplasia com *Candida* - **AgNOR (1000x).**

Figura 5 – NORs na camada basal e para basal da leucoplasia sem *Candida* - **AgNOR (1000x).**

Figura 6 – Expressão do p53 na camada basal e parabasal de epitélio normal - **Streptavidina-biotina (400x).**

Figura 7 - Expressão do p53 na camada basal e parabasal da leucoplasia com *Candida* - **Streptavidina-biotina (400x)**

Figura 8 - Expressão do p53 na camada basal e parabasal da leucoplasia sem *Candida* - **Streptavidina-biotina (400x).**

Figura 9 – Expressão do PCNA na camada basal e parabasal de epitélio normal - **Streptavidina-biotina (400x).**

Figura 10 – Expressão do PCNA na camada basal e parabasal da leucoplasia com *Candida* e fraca marcação na camada espinhosa - **Streptavidina-biotina (400x).**

Figura 11 - Expressão do PCNA na camada basal e parabasal da leucoplasia sem *Candida* e fraca marcação na camada espinhosa - **Streptavidina-biotina (400x).**

Figura 12 - Expressão do ki67 em algumas células da camada basale parabasal de epitélio normal - **Streptavidina-biotina (400x).**

Figura 13 - Expressão do ki67 em algumas células basal e parabasal da leucoplasia com *Candida* - **Streptavidina-biotina (400x).**

Figura 14- Expressão do ki67 em algumas células na camada basal e parabasal da leucoplasia sem *Candida* – **Streptavidina-biotina (400x).**

Figura 15- Distribuição do número médio de NORs no queratinócitos dos epitélios dos grupos I, II, III do material estudado.

Figura 16- Distribuição das áreas médias de NORs no queratinócitos dos epitélios dos grupos I, II, III do material estudado.

---

## **Lista de Tabelas**

Tabela 1- Anticorpos monoclonais utilizados

Tabela 2 – Grupos para o estudo de área média das NORs.

Tabela 3- Análise de valores em área média das NORs.

Tabela 4- Análise de variância (ANOVA) pelo teste F, referente à NORs

Tabela 5- Grupos para o estudo numérico das NORs.

Tabela 6- Análise de valores dos números médios das NORs

Tabela 7.- Análise de variância (ANOVA) pelo teste F, referente às  
NORs

---

---

## Lista de Abreviaturas

°C = graus Celsius

% = porcentagem

µm = micrômetro

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

ANOVA= do inglês “Analysis of Variance” – Análise de Variância

bcl2= proteína bcl2

B23= nucleolinas B23

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

BMA =N-metil-benzil-amina

C23=nucleolinas 23

CD3d= glicoproteína transmembranal 3d

CD34= glicoproteína transmembranal CD34

D1 = ciclina D1

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

DFF45= do inglês “DNA Fragmentation Factor 45”- Fator de fragmentação do DNA 45

G1 = grupo contendo amostras de epitélio normal

GII = grupo de leucoplasias sem *Candida*

GIII = grupo de leucoplasias com *Candida*

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 a qual não ocorre síntese de DNA

H&E = hematoxilina e eosina

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> = dióxido de hidrogênio

HCl = cloreto de hidrogênio

IgG= imunoglobulina G

KD = Kilo-Dalton, unidade de peso molecular

---

---

Ki-67 = antígeno ki-67

LeicaQW= programa computacional Leica Qwin para captura de imagens

NBMA =N-nitroso-N-metil-benzil-amina

NaNO<sub>2</sub>= nitrito de sódio

MDM2 = gene MDM2

mM = mili-molar

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

p16 = proteína p16

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

UNESP= Universidade Estadual Paulista

VEFG= do inglês “Vascular endothelial growth factors” - fator de crescimento endotelial vascular

W = watt

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

---

---

## SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	
2	REVISÃO DA LITERATURA	
2.1	Conceito e Terminologia	
2.2	Etiologia	
2.3	Características Clínicas	
2.4	Histopatologia	
2.5	Candidose	
2.6	Tratamento	
2.7	Marcações Histoquímicas e Imunoistoquímicas no Estudo da Pré-Malignidade e Transformação Maligna das Leucoplasias	
2.7.1	p53	
2.7.2	PCNA	
2.7.3	ki67	
2.7.4	Pré-Malignidade e Transformação Maligna das Leucoplasias	
2.8	AgNOR	45
3.	PROPOSIÇÃO	47
4.	MATERIAL E MÉTODO	49
4.1	Seleção dos casos	49
4.2	Imunohistoquímica	51
4.3	AgNOR	58

---

---

4.4. Análise Quantitativa e Morfométrica

5 RESULTADO

5.1 Morfologia

5.2 AgNOr

5.3 p53

5.4. PCNA

5.5 Ki67

5.6 Análise Estatística ( AgNOR

5.7 Tabelas

5.8 Figuras

6 DISCUSSÃO

7 CONCLUSÃO

REFERÊNCIAS

---

---

## **Introdução**

Alterações na mucosa oral podem preceder o desenvolvimento do câncer e compõem um grupo das lesões denominadas “pré-malignas ou cancerizáveis”; a mais comum é a leucoplasia.

A leucoplasia oral é definida como sendo uma placa ou mancha que não pode ser caracterizada clinicamente ou patologicamente como qualquer outra doença. Este termo tem conceituação estritamente clínica e não implica numa alteração histopatológica específica, portanto seu padrão de diagnóstico passa a não depender tanto de aparências definidas, mas sim da exclusão de outras lesões, que se apresentam como placas brancas orais. As regiões mais acometidas são: a língua, a mucosa jugal, palato duro, assoalho de boca e a gengiva. Leucoplasias apresentam etiologia variada, sendo relacionada ao tabaco, álcool, irritações locais, deficiências vitamínicas, distúrbios endócrinos, radiação ultravioleta e infecções. Relatos científicos apontam para uma possível associação entre leucoplasia e a infecção oral por fungos do gênero *Candida*.

O promissor desenvolvimento de trabalhos na área de histoquímica e imunoistoquímica assumem um papel fundamental no detalhamento do comportamento biológico dos tecidos, conduzindo diagnósticos histopatológicos a um patamar maior de refinamento, tornando-os obviamente menos subjetivos, além de promover os aspectos preventivos e definir os prognósticos das lesões. Existem leucoplasias que sofrem processos de malignização o que nos estimula a uma pesquisa ainda mais aprofundada destas lesões. Assim, a detecção de anticorpos específicos como PCNA, Ki67

---

---

e p53, conjuntamente com a determinação do número de NORs permitem indicar a atividade proliferativa dos tecidos e seu risco de transformação maligna. Com este método buscamos, no presente trabalho, evidências que poderiam atribuir ou não ao fungo *Candida* um papel na patogênese da leucoplasia oral através do aumento da proliferação celular ou risco de transformação maligna.

---

---

## **2 Revisão de Literatura**

### **2.1 Conceito e Terminologia**

Leucoplasia é um termo que tem sido usado por muitos anos para indicar uma mancha ou placa branca numa superfície de uma mucosa, não só na cavidade oral, como também na vulva, colo uterino, da bexiga urinária, da pelve renal e das vias respiratórias superiores. Desta forma, a literatura científica incluiu uma variada terminologia histológica para designar a leucoplasia clínica (SHAFER et al., 1987).

Schwimmer (1877 apud HOBREK, 1946,1874), foi quem primeiro usou a denominação leucoplasia para descrever lesões esbranquiçadas anteriormente denominadas ictiose, tilose, ou psoríase bucal. Já em 1946/1947, Hobaek 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.

Kollar Júnior et al. (1954) sugeriram descontinuar o uso da palavra leucoplasia como termo histopatológico e adotar a seguinte nomenclatura histológica para as lesões pré-neoplásicas e neoplásicas de aspecto esbranquiçado: 1) hiperplasia; 2) hiperceratose simples; 3) hiperceratose complexa; 4) câncer intraepitelial e 5) carcinoma epidermóide.

Bernier (1955 apud Shira,1957) 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, 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.

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

Em 1968, Lemmer e Shear utilizando o termo leucoplasia com sentido histológico, determinaram que em tais lesões a presença de displasia discreta a severa seria critério essencial para seu diagnóstico. Contrariando esse conceito, Califano e Caputo (1969 apud GRINSPAN,1973) 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.

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 (KRAMER et al.,1978).

Em 1984, Axéll et al., acrescentaram à definição da OMS 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. alteraram sua definição de leucoplasia considerando apenas aquelas lesões predominantemente brancas da mucosa bucal que não pudessem ser caracterizadas como nenhuma outra doença definida. Ao fazer o diagnóstico da leucoplasia procurou-se não depender tanto de aparências definidas, mas sim da exclusão de outras lesões, que se apresentam como placas brancas, como o líquen plano, ceratose friccional, ceratose de tabaco, estomatite nicotínica, leucoedema, e nevos esponjosos brancos (NEVILLE, et al., 2004). Além disso, criaram o diagnóstico provisório, que seria realizado a nível clínico, e o diagnóstico definitivo que requereria a exclusão de fatores etiológicos (AXÉLL et al.,1996). Caso a lesão persistisse, ou descrevesse alterações morfológicas, principalmente aquelas de aspecto verrucóide ou avermelhado, haveria a necessidade de um novo exame histopatológico (NEVILLE et al., 2004; PETTI, 2003 ).

---

---

## 2.2 Etiologia

Não há uma causa única ou definida para a leucoplasia, mas existe na literatura científica, através de número significativo de trabalhos, correlações entre ela e seus prováveis fatores etiológicos.

O tabaco é a principal causa isolada de leucoplasia, apresentando diversas formas de uso em diferentes culturas (PAGET,1900;BUTLIN, 1855; HOBÆK 1946/1947; LEMMER e SHEAR,1968; METHA et al.,1969; PINDBORG,1971, WALDRON e SHAFER 1975; BÀNOCZY 1977; OMS,1978; ÁXELL et al.,1984; GUPTA et al.,1992; VAN DER WALL,1995). Mais de 80% dos pacientes com leucoplasia são fumantes (TAVARES, 2000). Suas alterações clínicas são mais facilmente visíveis em usuários de cachimbo, por causa da elevada temperatura, do íntimo contato com o conduto por onde é aspirado e da fumaça com a mucosa o que parece favorecer ao desenvolvimento da leucoplasia. (ÁXELL et al.,1984; GUPTA et al.,1992; VAN DER WALL,1995). O mesmo efeito é visto entre os fumantes reversos, que posicionam o cigarro com a brasa voltada para o interior da boca, hábito difundido na Índia( TAVARES, 2000; METHA et al. 1969). O hábito de consumir o tabaco em sua forma mascável produz um resultado diferente.Freqüentemente, leva a uma placa oral branca, clinicamente distinta, chamada ceratose da bolsa de contato. A maioria das leucoplasias parecem regredir depois de suspenso o uso do tabaco (NEVILLE et al., 2004; VAN DER WALL et al.,1997).

O álcool parece ter forte efeito sinérgico com o tabaco, em relação à produção do câncer oral, não tem sido associado à leucoplasia( NEVILLE et al., 2004; BANOCZY, 1977;HOBÆK 1946/1947).

---

---

A radiação ultravioleta é aceita como um fator etiológico para a leucoplasia do vermelhão do lábio inferior, o que normalmente é associado com a quelite actínica (SHAFER et al., 1987).

Vários tipos de microorganismos têm sido implicados na etiologia da leucoplasia como ao *Treponema palidum*, menos freqüente nos dias de hoje, e a *Candida albicans* que coloniza células superficiais paraceratinizadas da mucosa oral (STURGIS, e LUND, em 1934; JESPEN e WINTHER,1965; CAWSON, 1966; ROED-PETERESEN et al.,1970; PINDBORG 1971; BANOCZY e SUGAR,1975; BANOCZY, 1977 ).

O papiloma vírus humano (HPV), em subtipos específicos, tem sido freqüentemente associados as leucoplasias orais (GOPALAKRISHAN, et al 1997;GREER JUNIOR et al.,1990; LONING et al.,1984; LIND et al.,1986).

Fatores nutricionais têm sido especulados como é o caso da deficiência vitamínica, anemia ferropríva e o desenvolvimento de da disfagia sideropênica na síndrome de Plummer-Vison ou Paterson-Kelly (REGEZI; SCIUBBA, 2004; NEVILLE et al., 2004).

### **2.3 Características Clínicas**

As leucoplasias variam consideravelmente de tamanho, morfologia e localização (SHAFER et al., 1987; KRAMER et al., 1978). Leucoplasia brandas e iniciais apresentam-se como placas cinzas ou branco-acinzentadas levemente elevadas, que podem parecer um pouco translúcidas ou enrugadas, e são tipicamente moles e chatas, com bordas fortemente demarcadas,mas ocasionalmente misturam-se com a mucosa oral.

---

---

Segundo Neville et al. (2004) aproximadamente 70% das leucoplasias orais são encontradas no vermelhão do lábio, mucosa jugal e gengiva. Em algumas leucoplasias também podem ser vistas zonas avermelhadas, fato que levou ao emprego do termo leucoplasia mosqueada (REGEZI; SCIUBBA, 2004). Entretanto as lesões de língua, vermelhão dos lábios e assoalho oral somam mais de 90 % daquelas que indicam displasia ou carcinoma espinocelular (NEVILLE et al., 2004).

Sugár e Bánóczy (1969 apud BANOCZY, 1977) 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 1971, Pindborg 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 (1976) 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”, que são formas de combinação do tabaco com produtos variados e disponíveis para o uso em forma mascável, e, desta forma, 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. Axéll et al. (1984) classificaram as leucoplasias

---

---

cl 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 incluiriam 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. Para Axéll et al. (1996) 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.

A leucoplasia verrucosa proliferativa tem sido distinta das outras leucoplasias. Este tipo começaria com uma simples ceratose, adquirindo por fim, uma natureza verrucosa e algumas lesões tenderiam a recidivar, tornando-se multifocais ou desviariam sua diferenciação morfológica para a malignidade (REGEZI; SCIUBBA, 2004) Embora a causa da leucoplasia verrucosa seja desconhecida pesquisadores relacionaram sua etiologia com a infecção por

---

---

HPV, em subtipos específicos. (REGEZI; SCIUBBA, 2004; HOBÆEK 1946/1947)

## **2.4 Histopatologia**

Microscopicamente as leucoplasias foram estudadas ao longo da literatura como lesões histomorfologicamente variadas. A evolução do estudo histológico procurou dar subsídios para determinar quais destas variações morfológicas, ou o conjunto delas, poderiam destinar as leucoplasias aos processos de transformação maligna.

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

Para Lemmer e Shear (1968) a presença de displasia 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) 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, Bánóczy 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 ceratinização e os tipos clínicos da leucoplasia. Dos casos avaliados, 67 apresentavam

---

---

histologicamente hiperortoceratose, 56 hiperparaceratose e 27 áreas de para e ortoceratose entremeadas. Hiperplasia epitelial foi observada em 86% dos casos de hiperparaceratose, 60% dos casos de hiperorto e hiperparaceratose associadas e em 42% dos casos de hiperortoceratose, enquanto disceratose foi encontrada em 10% das hiperortoceratoses e em 50% das hiperparaceratoses. Os autores encontraram citologicamente hiperortoceratose em 72% das leucoplasias simples e 58% das verrucosas, e hiperparaceratose citológica em 77% das leucoplasias erosivas. A partir desses dados os autores concluíram que o tipo de ceratinização pode ser definido por métodos citológicos e que as hiperparaceratoses seriam vistas predominantemente em leucoplasias erosivas. Além disso, puderam constatar que carcinomas se desenvolveram preferencialmente a partir de leucoplasias com hiperparaceratose.

Bánóczy e Csiba (1972) 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 ocorreriam nos vários tipos clínicos de leucoplasias (com atenção especial para o padrão de ceratinização) e a tendência de cura das várias alterações histológicas no curso dos subseqüentes controles. Os autores puderam observar que os tipos de ceratinização variaram de acordo com os tipos clínicos, ocorrendo orto e hiperortoceratinização na maioria dos casos de leucoplasia simples e verrucosa, e para e hiperparaceratinização principalmente nos casos de leucoplasia erosiva. Além disso, os autores constataram que enquanto 27% das leucoplasias com hiperortoceratinização não sofreram alterações ou aumentaram de tamanho, isso ocorreu em 52%

---

---

das leucoplasias com para ou hiperparaceratinização. 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 poderiam ter valor diagnóstico e influenciar a terapia a ser aplicada.

Waldron e Shafer (1975) 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 e Csiba (1976) 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 Kramer et al. (1978) 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 puderam ser associados aos achados clínicos.

Bánóczy et al., 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 ceratinização, aumento da quantidade de tonofibrilas, de grânulos de cerato hialina e corpos de Odland, assim como sinais de disqueratose. Em contraste, as lesões erosivas revelaram evidências de displasia como: defeitos na membrana basal, diminuição de hemidesmossomos, 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) 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 suspeitas.

---

---

Pindborg et al. (1985) 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) 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) 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, a fim 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.

De acordo com Lawall (2004) não havia diferença na atividade proliferativa entre grupos distintos de leucoplasias com variável grau e o tipo de ceratinização através de um estudo imunohistoquímica usando p53 e PCNA

---

---

## 2.5 Candidose

A candidose é a mais comum infecção fúngica oportunista da cavidade oral causada pelo crescimento de espécies de *Candida*, sendo a mais comum a *Candida albicans* ( Krogh et al., 1987).

A *Candida* foi isolada pela primeira vez em 1844 num paciente tuberculoso (MANDEL, 1994). Como outros fungos, a *Candida* não é fotossintetizante, eucarionte com parede celular externa e membrana plasmática rica em esteróis e usualmente ergosterol (LEHMANN,1998). Moraes et al. (2000) descreveram que em vida parasitária a *Candida* apresenta formas filamentosas e pseudofilamentosas e gemulantes. Algumas espécies em meios apropriados produzem clamidiosporos. A temperatura influencia o grau de crescimento da *Candida*, sendo considerada a partir de 37<sup>0</sup>C, o que propicia ao crescimento de pseudo-hifas (MORAES et al., 2000). Seus filamentos crescem no sentido apical e descrevendo formações laterais sendo denominadas hifas ou micélios, a divisão celular é associada com as leveduras (LEHMANN, 1998). As colônias podem ser brancas ou cremes, cremosas ou membranosas, de superfície lisa ou rugosa. Os mesmos autores avaliaram que a classificação das espécies do gênero *Candida* ainda não está em definitivo estabelecida, devido à inconstância dos caracteres morfológicos e biológicos das espécies consideradas e das variações que sofrem sob a ação de fatores diversos nem sempre suficientemente conhecidos. Quanto à morfologia, apenas a presença de clamidósporos permite distinguir a *Candida albicans* das demais. Vários pesquisadores propuseram a diferenciação das espécies

---

---

baseada nos caracteres referente às enzimas (zigograma) e na assimilação de determinados glicídios e substâncias nitrogenadas (auxanograma dos glicídios e do nitrogênio). Os auxanogramas são trabalhosos e de resultados pouco compensadores para a identificação específica da *Candida*, razão pela qual não são usados na prática micológica (MORAES et al., 2000). Na realidade, a classificação das espécies é norteadada pela ação fermentativa sobre os glicídios, além de outros caracteres, como o crescimento ou não da amostra em estudo na superfície do meio glicosado líquido. Estes fungos podem usar via anaeróbica e aeróbica. Salivas ácidas e pacientes fumantes tem maior predisposição a formação de nichos para o crescimento da *Candida* (YOUNG et al., 1951). Desvios fenotípicos são descritos em literatura e correspondem a habilidade de certos tipos de *Candida* em mudar sua morfologia fenotípica (SLUTTSKY et al., 1985). Desvios fenotípicos são descritos em literatura e correspondem a habilidade de certos tipos de *Candida* em mudar sua morfologia fenotípica (SLUTTSKY et al., 1985).

As espécies de *Candida* podem ser encontradas de forma comensal na pele, nas das cavidades naturais e no intestino. Clinicamente, as falsas membranas esbranquiçadas por elas formadas possuem células do tegumento mucoso, exudato e pelo cogumelo nelas abundantes, com suas formas filamentosas e gemulantes. A retirada das falsas membranas por meio de pinça ou espátula expõe uma superfície vermelha e por vezes hemorrágica, denotando a intensidade da resposta inflamatória local (MORAES et al., 2000). Willams et al. (1997) estudaram as características do infiltrado inflamatório em tecidos hiperplásicos da mucosa oral contaminados por *Candida*, descrevendo variações em densidade de infiltrados entre os casos, sendo os linfócitos T as

---

---

células predominantes (53.9%), linfócitos B (8.2%) e macrófagos (14,2%), além de predominância de IgG ( 60.8%, SD +/- 9.0) , seguida de IgA (36.7% SD +/- 9.1) e uma menor proporção de IgM ( 2.5%, SD +/- 3.0). Alguns neutrófilos, junto de linfócitos T e macrófagos foram vistos em camadas do epitélio. Tal trabalho sugere a presença de células mediadoras de processos inflamatórios causados pela presença de *Candida* na mucosa oral, tenham relação com a prevalência da IgA.

A presença da candidose nas células epiteliais superficiais e paraceratinizadas da mucosa oral leucoplásica produzem clinicamente uma placa granular e espessa, cuja coloração é uma mistura de branco e vermelho, podendo histologicamente apresentar mudanças de caráter displásico ou hiperplásico (NEVILLE et al., 2004).

A candidose está associada a certos tipos de variáveis patogênicas. A adesão da *Candida* nas paredes de células epiteliais, que é um importante passo para a instalação da infecção, é promovida por componentes tal como a manose, receptores de CD3d, manoproteínas, e sacarinas (KANBE et al. 1991; BRASSAT et al., 1991). Williams et al. (1997) estudaram os mecanismos de aderência da *Candida* em estudo com células da mucosa oral, descrevendo que a *Candida* predispunha sua aderência às células com maior índice de ceratinização. Ellepola et al. (1999) sugeriram num estudo com células do epitélio oral que a *Candida* talvez mantenha uma aderência maior no epitélio de pacientes HIV positivos. Outros fatores associados são a formação tubular do germe, a presença de micélio, a presença de células epiteliais, endotoxinas, indução de fatores de necrose tumoral, e proteinases (SOBEL et al., 1984; KWON-CHUNG et al., 1985).

---

---

A incidência de candidose e sua predisposição obedecem a diversos fatores como: déficit funcional das glândulas salivares, drogas imunossupressoras, prótese totais, dietas ricas em carboidratos, estados de estresse, fumo, diabete melitus, síndrome de Cushing, tratamentos oncológicos e condições de imunossupressão ( RODE et al., 2000). Budtz-Jorgensen (1990) acrescentaram ainda que o período neonatal é predisponente a instalação da Candidose, devido à imaturidade do sistema imunológico.

As leucoplasias podem estar infectadas por microorganismos tais como a *Candida*, eventualmente estas lesões podem apresentar concomitantemente alterações. Franklin e Martin (1986) num estudo experimental em ratos através da indução de lesões hiperplásicas pelo uso da turpentina e infectadas por *Candida albicans*, demonstraram que após um período de oito semanas havia uma mudança de caráter displásico de modo semelhante as leucoplasias infectadas por *Candida* em humanos.

Interessante também é a correlação entre *Candida* e aminas carcinogênicas. Nas áreas onde nitritos e nitratos estão presentes em altas concentrações na água potável ou produtos alimentícios de primeira necessidade, especialmente em variedades de vegetais, atingindo valores de 16ppm, há a possibilidade de formação de nitrosaminas endógenas (NEURATH et al., 1977). Dentro deste perfil, locais na China onde haviam alta incidência de carcinoma de esôfago, os níveis salivares de nitritos dos pacientes portadores de displasia ou carcinoma do esôfago eram altos quando comparados aos pacientes normais. Reações típicas de nitrosação fazem com que BMA (N-metil-benzil-amina) e  $\text{NaNO}_2$  sejam transformadas em NBMA (N-nitroso-N-metil-benzil-amina), ocorrendo melhor sobre condições ácidas, mas

---

---

também sendo possível sobre condições próximas à neutralidade do pH. As aminas carcinogênicas tal como a NBMA são geradas no esôfago pela ação da *Candida*, entre outras espécies de fungos, e podem estabelecer participação na formação das neoplasias gastrointestinais. A Candidose poderia então aumentar reações de nitrosação (HSIA et al., 1983). Krogh et al. (1987) investigaram epitélio normal e alterado por leucoplasias, epitélio normal e eritoleucoplasias em 12 casos onde pacientes apresentavam candidose oral concomitante, relacionando 15 biótipos de *Candida* e a produção de nitrosaminas como possíveis agentes carcinogênicos. Krogh (1987) sugere a possível relação entre as leveduras de do gênero *Candida* e o câncer oral através dos processos de catalases formadores de NBMA (N-nitroso-N-metil-benzil-amina).

Lipperheide et al. (1996) identificaram 60 fenótipos de *Candida albicans* envolvendo 35 leucoplasias e 34 líquens planos, mostrando, em alguns biótipos, um alto potencial de adaptação nas mudanças associadas ao com o desenvolvimento das leucoplasias e líquen plano orais. Rindum et al. (1994) identificaram 147 fenótipos diferentes de *Candida* em 53 pacientes portadores de leucoplasias infectadas, distribuídas entre fumantes e não fumantes. A presença de terapia antifúngica tornou-se eficiente nos pacientes não fumantes, geralmente havendo reversibilidade das lesões leucoplásicas, contudo tal comportamento não foi visto no grupo associado ao tabaco, desta forma, supõem-se que estas lesões poderiam ainda seguir um curso pré-maligno.

---

---

## **2.6 Tratamento**

O tratamento da Candidose é inclinado a relacionar-se às manifestações clínicas variáveis e ao estado imunológico do paciente (EPSTEIN; POLSKY, 1998; BLATCHFORD, 1990; SCHUMAN et al., 1997). Diversos tipos de drogas fizeram parte do arsenal de tratamento que no começo do século XX até recentemente combatiam às candidoses. como a nistatina, anfotericina B, cetoconazol, imidazol, clorexidine e itraconazol (FERRETI et al., 1987; SANGUINETI et al., 1993).

## **2.7 Marcações histoquímicas e imunohistoquímicas no estudo da pré-malignidade e transformação maligna das leucoplasias**

### **2.7.1 p 53**

O gene p53 foi descoberto em 1979 por Lane e Crawford. O p53 codifica uma proteína, P53, contendo 11 éxons que decodificam uma fosforoproteína nuclear de 53 kD que se associa com a regulação do ciclo celular ,diferenciação celular,supressão de anormalidades de proliferação e desenvolvimento tumoral e fatores de ativação transcricional (CHANG et al., 1993; LEVINE et al., 1991; IGGO et al., 1990). Este gene localiza-se no cromossomo 17. O p53 foi originalmente descrito como um oncogene, mas posteriormente definido como um gene supressor. Quando o gene p53 torna-se não-funcional, este fato direciona a célula a caminhos de transformação celular.

---

---

O p53 controla eventuais danos no DNA celular durante as fases G1 e S da interfase(EL-DEIRY et al., 1994; MOLL; SCHARMM, 1998; CHANG et al., 1993; FRITSCHÉ et al., 1993). Dependendo do dano a célula, através da ação do p 53, sofre a reapração do DNA ou segue um curso de apoptose, relacionando-se com outros genes como é o caso do *Bcl-2* (PIATTELLI et al., 2002)

Como o p53 interage com um número grande de proteínas celulares ele sinaliza ciclos de vida e apoptose. A mutação do p53 também esta presente nos diferentes tipos de neoplasias como: cólon, mama, colo de útero, pulmão, esôfago, fígado e próstata. O gene p53 mutado passou a ser o mais freqüente gene supressor detectado nas neoplasias humanas (BARTEK et al., 1992; HOLLSTEIN et al., 1991).

Estudos seguirem avaliando as células da camada basais em epitélios orais portadores de displasias severas que a expressão imunohistoquímica do p53 era aumentada quando comparada aos grupos controle (CRUZ et al., 1998; GIROD et al., 1998; RALHAN et al., 1998; OGDEN et al., 1997). A expressão aumentada de p53 acompanhava lesões orais displásicas associadas às práticas tabagistas que tiveram curso clínico para a malignidade (SULKOWSKA et al., 2001; SARANATH et al.,1999).

Leucoplasias verrucosas recidivantes, ou aquelas que tiveram curso neoplásico também apresentaram alta expressão p53 quando comparadas aos grupos contoles (CHIANG et al., 2000). A presença de HPV também estabeleceu alta expressão de p53 nas lesões verrucosas orais quando comparadas a áreas livres de contaminação (GOPALAKRISHNAN et al., 1997). A detecção do p53 encaminhou estudos das anormalidades em áreas

---

---

adjacentes aos carcinomas espinocelulares e sítios displásicos do epitélio oral, os quais constituíam eventos iniciais na história evolutiva das lesões neoplásicas (RALHAN et al., 1998; MURTI et al., 1998; SLOOTWEG et al., 1994). Desta forma, o p53 passou a representar uma valorosa ferramenta na avaliação de prognóstico de lesões orais consideradas pré-malignas e malignas (BOYLE et al., 1993; NISHIOKA et al., 1993; WARNAKULASURIYA; JONHSON, 1993; LANGDON; PARTRIDGE, 1992).

Outras tentativas conciliaram a relação do p53 com outros marcadores imunohistoquímica (Bcl-2, Ki-67, mdm2, ciclina D1, p21<sup>WAF1</sup>). Tais padrões foram estabelecidos apenas no sentido de orientar, com refinamento, o estudo de alterações progressivas de epitélios inicialmente normais que evoluíssem para lesões malignas (PIATTELLI et al., 2002; CHANG et al., 2000; AGARWAL et al., 1999; CALTLE et al., 1999; TETE et al., 1999; KANNAN et al., 1996).

### **2.7.2 PCNA**

O antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) é uma proteína não-histônica, descoberta originalmente por Miyachi et al. (1978) durante experimentos como o soro de pacientes portadores de lupus eritematoso, presente nos núcleos em processos de proliferação, porém ausente nas células normais do tecido humano. O PCNA contém 261 aminoácidos, pesando 36kD, que auxilia a delta-DNA-polimerase nos processos necessários a replicação. A expressão celular do PCNA atinge seu pico máximo durante a fase S da interfase (SCULLY; BURKHARD, 1993; BRAVO et al., 1987; BRAVO; MACDONALD-BRAVO, 1987; MATHEWS et al., 1984; MORRIS; MATHEWS, 1991, TAN et al., 1987).

---

---

O PCNA foi usado inicialmente como um marcador de proliferação tecidual, porém mais recentemente acrescentaram-se observações com respeito à sua relação na indução por fatores de crescimento e nos processos reparo tecidual ( MCORMICK ; HALL, 1992)

As evidências da marcação do PCNA em lesões neoplásicas foram vistas em diversas neoplasias como linfomas não-Hodgkin, tumores gástricos, mamários e do pâncreas ( HALL et al., 1990)

O PCNA foi utilizado como marcador de proliferação em leucoplasias orais, expressando nas camadas basais determinadas variáveis estatísticas que mantiveram relação de expressão com os diferentes graus de displasia e carcinomas espinocelulares (LIU; KLEIN-SZANTO, 2000; TSUJI et al., 1995).

O PCNA e o AgNOR apresentaram, quando em estudos combinados, variáveis estatísticas que direcionaram a avaliação do comportamento biológico de diferentes graus de displasia do epitélio oral e lesões malignas (KOBAYASHI et al., 1995). Donofrio et al. (1995) avaliaram o prognóstico de diferentes graus de leucoplasias infectadas e livres do HPV e carcinoma microinvasivos na cavidade oral, através de experimento combinado de PCNA e AgNOR, e concluíram que, embora poucos casos de pacientes infectados por HPV mostrassem altos valores de PCNA, o destaque maior estava nas marcações associadas a displasias severas e moderadas representando um sinal de “alarme” na hiperatividade de proliferação tecidual destas lesões.

Alguns trabalhos associaram o PCNA a outros marcadores imunohistoquímicos como o bcl-2 e o p53 tendo como finalidade expor valores de marcação que indicassem nas leucoplasias orais manifestações

---

---

histológicas de malignidade e apoptose (BIRCHAL et al., 1997; NISHIOKA et al., 1993).

### **2.7.3 Ki 67**

O Ki-67 é uma proteína não histônica, com peso molecular aparente de 345 a 349 Kd, descoberta por Brown e Gatter (1990), presente em todas as fases do ciclo de divisão celular (exceto G<sub>0</sub>), sendo sua denominação decorrente de sua identificação em Kiel (Alemanha) na 67<sup>a</sup> placa de cultura tecidual, tratando-se de uma IgG<sub>1</sub> de camundongo produzida contra uma fração nuclear da linhagem celular L428 da doença de Hodgkin, alcançando sua maior expressão nas fases G<sub>2</sub> e M (SASAKI et al., 1987). Sendo um antígeno monoclonal, de vida média de uma hora, o cromossomo 10 parece ser aquele envolvido na síntese protéica determinante deste antígeno no ciclo celular (GARRIDO et al., 1992; KEY et al., 1992). Assim, vários trabalhos referenciam o Ki-67 como protetor clínico do comportamento biológico das neoplasias malignas, pois diagnostica a síntese do DNA da neoplasia com o aumento da marcação de células malignas com este antígeno (SASAKI et al., 1987). Outro aspecto que merece ser ressaltado é a definição das margens cirúrgicas pelo Ki-67, pois demonstram a invasão tumoral por vezes não detectadas à microscopia óptica, sendo o aumento de sua positividade determinante de índices de mau prognóstico. O ki67 mostrou-se como importante fator de prognóstico em várias neoplasias, como o câncer de próstata, tumores do estroma gastrointestinal, tumores de mama (SZEND et al., 2003; PANIZO-SANTOS et al., 2000, KROGERUS et al., 2000).

---

---

Vale ressaltar que nos tumores glandulares a positividade do Ki-67 não é exclusiva das neoplasias malignas, mas sim predominante em relação às benignas, sendo o melhor marcador de transformação maligna, como, por exemplo, do carcinoma ex-adenoma pleomórfico. Desta forma, o carcinoma indiferenciado das glândulas salivares maiores obtivera o estabelecimento de uma correlação estatística de variáveis histopatológicas e imunohistoquímicas, através da utilização do Ki-67 clone, denominado MIB-1, como um marcador prognóstico da evolução da lesão ( MURAKAMI et al., 1992; COOPER et al.,1993).

Pelo fato das leucoplasias serem freqüentes na cavidade oral e apresentarem diferentes graus de displasia, o antígeno Ki67 foi estudado nestas lesões, de modo a determinar o grau de proliferação tecidual, possibilidades de malignidade e parâmetros de apoptose, através da combinação com outros marcadores imunoistoquímicos como o p53,Bcl-2 e PCNA ( KOVESI; SZENDE, 2003; PIATTELLI et al., 2002; TETE et al., 1999, KANNAN et al., 1996, SLOOTWEG et al., 1994). É possível acrescentar também que Cruchley et al. (1998) estudaram a expressão de Ki67 em leucoplasias pilosas, demonstrando não haver uma relação entre a proliferação das camadas basais e o agravamento da infecção pelo vírus Epstein-Barr (EBV).

#### **2.7.4 Pré-malignidade e transformação maligna das leucoplasias**

Na cavidade oral, as doenças mais freqüentemente associadas ao câncer são as leucoplasias, as eritroplasias e o liquens planos. Nos lábios, a

---

---

queilite actínica pode ser considerada pré-cancerosa. Para definir lesão pré-cancerosa, o termo leucoplasia deve ser restrito a lesões não caracterizadas clinicamente como outra doença, não associada a fatores externos que não o uso do tabaco e principalmente associadas ao cigarro, charuto, cachimbo e gomas de mascar. Podem ter aparência homogênea e não homogênea, com variantes nodular e exofítica (TAVARES, 2000).

Cerca de 30% das leucoplasias podem desenvolver um carcinoma, tendo sido descrita uma taxa de malignização de 2,9% ao ano, segundo Tavares (2000). Segundo Araújo (2000) com o desenvolvimento da histoquímica e imunohistoquímica, a avaliação de processos proliferativos e carcinogênicos associados às lesões leucoplásicas tornaram-se detalhados e menos subjetivos.

Langdon e Partridge (1992) estudaram a expressão de p53 no câncer oral e leucoplasias através de amostras de 15 casos de carcinoma espinocelular sendo 12 marcados positivamente, e de 15 leucoplasias com apenas 2 marcadas positivamente, indicando que as alterações oncogênicas são previstas em lesões leucoplásicas. Girod et al. (1998) relataram em estudo imunohistoquímico utilizando p53, MDM2, Ki67 e RB envolvendo líquens planos, leucoplasias e carcinomas epidermóides, numa análise estatística de 216 pacientes que não foi significativamente estatístico as diferenças do p53, MDM2, ou RB para estágio da doença, transformação maligna, envolvimento de nódulo metastático, recorrência ou sobrevida do doente. Entretanto a expressão de p53 tinha forte relação com a progressão da doença, confirmando a atuação do p53 na alteração de lesões malignas da cavidade oral.

---

---

Utilizando técnicas de imunohistoquímica, Girod et al. (1994) avaliaram os níveis de expressão do p53 e PCNA em 265 cortes de mucosa oral normal, lesões pré-malignas, malignas e metastáticas. Concluíram que houve um aumento da expressão do PCNA nos cortes de mucosa normal em relação aos observados em lesões malignas. Além disso, verificaram que os níveis detectáveis de p53 foram encontrados nas lesões pré-malignas como a leucoplasia, os quais estavam relacionados com o aumento da displasia, perda de diferenciação e a proliferação celular.

Para Liu e Klein-Szanto (2000), o aumento da capacidade proliferativa das leucoplasias pode ser identificado, usando biomarcadores como PCNA. Saranath et al. (1999) estudaram a mutação do p53 em carcinomas epidermóides e leucoplasias orais induzidas pelo hábito de mascar fumo, e constataram que 27% das leucoplasias mostravam aumento de expressão de p53, o que caracteriza essa proteína como um valioso biomarcador na identificação do potencial de malignização dessas lesões.

Chang et al. (2000) estudaram a expressão de p53 e de p21<sup>WAF1</sup> em 53 leucoplasias orais verrucosas, na maior parte lesões não-displásicas. A análise de imunohistoquímica revelou a reatividade do p53 e p21<sup>WAF1</sup> em 51% (27 casos) e em 75% (40 casos), respectivamente. Após um período médio de controle pós-operatório de três anos e meio, o exame histopatológico revelou que 22 casos (42%) tinham desenvolvido o carcinoma espinocelular, 14 (26%) tiveram recorrência da leucoplasia verrucosa, e 17 casos (32%) estavam livres da doença. Uma diferença significativa foi notada nas lesões que tiveram evolução para o carcinoma espinocelular, ou mesmo recorrência, tanto para o p53 (93% contra 42%; P=0.00008) quanto p21<sup>WAF1</sup> (80% contra 32%; P=0.002)

---

---

em comparação com lesões sem imunoreatividade. Este estudo sugeriu que a imunoreatividade aberrante do p53 e do p21<sup>WAF1</sup> poderia atuar como um fator prognóstico a ser observado nas leucoplasias verrucosas.

Sulkowska et al. (2001) observaram 55 casos de mudanças na proliferação epitelial em leucoplasias. A alta expressão de proteína p53 (54%) foi encontrada em leucoplasias alteradas (displásicas) coexistindo em áreas próximas aos carcinomas espinocelulares, comparada com áreas não-acometidas (p53-45%). Os resultados indicaram que há uma correlação entre os graus de displasia epitelial e a expressão de p53 e Bcl-2; em displasias severas ocorreram aumento da expressão de ambas proteínas. Leucoplasias adjacentes aos carcinomas espinocelulares mostraram-se altamente expressivas para p53 e Bcl-2, comparados com o grupo não-alterado.

A perda do padrão normal do p53 está correlacionada com a progressão de alguns tipos lesões pré-neoplásicas para lesões neoplásicas, e a expressão de Bcl-2 determina alterações na morte programada das células. Existe hoje um alerta para estudos que refletem a importância do apoptose na carcinogênese, e uma forte correlação do Ki-67 com as diversas classes de tumores relatados em literatura científica. Piattelli et al. (2002) investigaram imunohistoquimicamente a expressão e relacionamento do p53, bcl-2, MIB-1, e índice de apoptose (AI) em epitélio oral normal leucoplasia, displasia, e carcinoma espinocelular oral. Os pesquisadores obtiveram como resultado neste trabalho uma forte correlação entre a expressão do p53 e a proliferação celular (MIB-1) e o índice de apoptose (AI). Um relacionamento inverso foi encontrado entre a expressão de Bcl-2, a expressão de MB-1 e o índice de apoptose (AI). Um relacionamento inverso significativo foi encontrado entre o

---

---

p53 e a Bcl-2. Uma boa correlação estava presente entre o índice de apoptose e a expressão de MIB-1. Com este estudo puderam concluir que a apoptose marca uma importante etapa na compreensão dos processos de carcinogênese oral.

## **2.8 AgNOR**

O ciclo celular corresponde aos processos que ocorrem na célula, desde sua formação até a divisão binária formando células filhas. A célula em um organismo pode também proliferar, estar viva porém sem divisão ou destinar-se à apoptose. As fases G1,S,G2 e M correspondem às fases consecutivas do ciclo celular. As fases G1, S e G2 correspondem à interfase, que é um período de intensas atividades relacionadas com a proliferação celular, caracterizando-se por mudanças no conteúdo do DNA e por alterações bioquímicas e fisiológicas. Um conjunto de mecanismos bioquímicos regulam o ciclo celular e muitas dessas reações envolvem proteínas reguladoras, atuando na síntese de DNA na fase S e no processo de mitose (RABENHORST et al., 1993; LEVINE et al., 1991).

A descoberta de proteínas que atuam na replicação de material genético permitiu que se investigassem vários métodos de avaliação da proliferação celular em material histológico. Inúmeras proteínas estariam localizadas adjacentes ao núcleo, desempenhando um papel na descondensação e/ou na transcrição do DNA e na maturação do RNA.

Em 1986, Ploton et al., descreveram uma técnica modificada para visualização de proteínas ácidas, argirofílicas, não histônicas. Estes autores

---

---

observaram que as proteínas poderiam ser observadas com um simples método de coloração de prata. A prata ficou impregnada onde se revelaria posição ativa de transcrição das regiões organizadoras nucleolares, que formariam, portanto, a sigla de referência: NOR. Estas proteínas das NOR estão presentes na interfase dentro dos nucléolos, e nos seres humanos estão localizados nos braços curtos dos cromossomos acrócentricos números 13-14-15-21 (BABU; VERMA, 1985; DERENZINI et al., 1988; VAN DIEST et al., 1998; DERENZINI, 2000). Junera et al. (1995) identificaram as proteínas das NORs em fases específicas do ciclo celular. Durante a interfase as maiores proteínas das NORs em humanos e linhagem celulares de hamster são a C23 e B23 (nucleolinas); a maior proteína de NOR associada com genes ribossômicos era a RNA polimerase I.

Esta técnica histoquímica ficaria conhecida como AgNOR, onde era possível visualizar, através da microscopia de luz, pontos negros intracelulares correspondentes as regiões organizadora nucleolares (KAMEL et al., 1990).

As NORs foram utilizadas para obtenção de informações sobre a estrutura dos nucléolos e atividade nucleolar em condições hiperplásicas, displásicas e neoplásicas (WALKER, 1988; MATOLCSY et al., 1992).

Crocker et al. (1989) discutiram os aspectos técnicos da coloração AgNOR, como fixação e processamento, pois alguns estudos mostraram que alguns fixadores são contra-indicados para a reação contida na AgNOR, sendo o formol a 10% um fixador indicado. Zaczek et al. (1994), avaliaram a relação entre a espessura do tecido e a fixação apropriada das proteínas nucleolares associadas as NORs e concluíram que em cortes mais espessos a penetração do fixador é dificultada, portanto a fixação das proteínas associadas as NORs

---

---

não ocorreria devidamente, provocando assim, uma interpretação questionável dos resultados. Costa et al. (1997) descreveram que a técnica de AgNOR é também sensível à presença de luz, temperatura e a preparação das soluções empregadas.

Segundo Crocker et al. (1989), existem três tipos de configurações para os NORs em células normais e neoplásicas: o primeiro é comum em linfócitos e em células que não estão proliferando, cujas NORs são totalmente agregadas de forma arredondada correspondente ao nucléolo; o segundo é muito freqüente em células que estão proliferando, cujas NORs são vistas no interior do núcleo. O terceiro tipo é muito freqüente em células malignas, onde observam-se pequenas e numerosas NORs dispersas por todo o núcleo.

A cinética celular tem sido avaliada pelo número das NORs. Em qualquer estágio do ciclo de divisão celular parece ser inversamente proporcional ao tempo deste ciclo, ou seja, quanto maior a quantidade de AgNOR, mais curto será o ciclo celular. Em 1990, Derenzini et al. encontraram correlação positiva entre a atividade de duplicação do DNA e a quantidade de NORs das células. Quanto mais rápido o crescimento celular, maior a quantidade de NORs. O significado das NORs dentro de uma célula ainda não foi completamente determinado, mas tem sido sugerido que seja um reflexo da proliferação celular, da ploidia celular ou de um aumento na transcrição gênica (XIE et al., 1997; WOLANSKI et al., 1998).

Trabalhos iniciais propuseram então relacionar a morfologia, área e o número de NORs com as atividades nucleares e celulares ambos na presença de malignidade e transformações maligna (PLOTON et al., 1986; CROCKER; NAR, 1987; OFNER et al., 1990). Em 1992, Cabrini et al. realizaram um estudo

---

---

morfométrico das NORs que analisaria a distribuição, volume e a forma em diferentes camadas do epitélio oral normal, papiloma e carcinoma espinocelular. Os achados demonstraram que os parâmetros das NORs foram diferentes entre as lesões. E, ainda, NORs irregulares, aumentadas em número e diminuídas em tamanho, representaram uma expressão da alteração do mecanismo de proliferação e diferenciação celular, juntamente com a síntese protéica oncogênica presentes nos carcinomas espinocelulares.

Sano et al. (1991) verificaram número elevado de NORs na contagem oriunda de amostras de carcinomas espinocelulares quando comparadas à mucosa normal. Egan et al. (1988) usaram a técnica AgNOR para analisar e comparar neoplasias benignas e malignas do tecido epitelial e concluíram que os números de NORs dos carcinomas foram maiores que nas demais neoplasias indicando assim que a técnica poderia ser formalmente destinada às neoplasias malignas epiteliais. Cabrini et al. (1992) constatou que os dados referentes aos números absolutos das NORs poderiam distinguir lesões com grau leve e severo de displasia, a irregularidade e a diminuição do tamanho dos NORs são uma expressão de mecanismos de proliferação e de diferenciação celular, em conjunto com a síntese de novas proteínas oncogênicas presentes no carcinoma. Entretanto, outros autores têm demonstrado que o diagnóstico diferencial entre lesões com base no valor numérico das NORs é impossível, considerando essencial e indispensável a avaliação morfológica das amostras. Warnakulasuriya e Johnson (1993) compararam a contagem média de NORs em três grupos de lesões : carcinomas espinocelulares (8.37 +/- 6.11), displasias epiteliais (5.61 +/- 4.63) e ceratoses benignas (4.51 +/- 2.57). Estes pesquisadores ressaltaram que

---

---

embora as diferenças entre os valores médios das NORs fossem significativas tais valores não podem ser utilizados para o diagnóstico individual de lesões . A interpretação dos números das NORs, em população de células altamente estruturada, com um rápido remodelamento, tal como o epitélio oral, pode indicar um processo mais complexo comparado a tecidos com população celular estável. Números elevados das NORs estão relacionados com o aumento na ploidia celular, com um aumento na atividade transcricional e em estados de proliferação celular ativa. Neste mesmo trabalho concluiu-se que as NORs são avaliadas como possíveis marcadores de prognóstico de condições malignas de hiperqueratose, displasia e carcinoma espinocelulares. Schwint et al. (1994) descreveram diferenças estatísticas entre o número de NOR do epitélio normal e epitélio adjacente ao carcinoma espinocelular verificando que a técnica auxilia no conhecimento do crescimento tumoral. Mourad et al. (1992) afirmaram que a célula com cinco ou mais NORs relacionava-se com a fração da fase S, medidas por meio de citometria de fluxo de DNA. Segundo Cabrini et al. (1992) e Lo Muzio et al. (1997), o número das NORs na interfase é um reflexo mais da proliferação do que do grau de malignidade. Uma população celular anaplásica, dividindo-se rapidamente, provavelmente tem maior proporção de células nos estágios iniciais G1 e , deste modo, como números elevados de NORs contrariamente, neoplasias com baixo nível de proliferação celular tendem a apresentar uma única NOR.

Nunes et al. (1991) estudaram leucoplasias orais pela técnica AgNOR e apontaram para diferentes graus de atipia celular acompanhando as variáveis na contagem das NORs e sugeriram, portanto, um provável potencial desta técnica na observação do comportamento biológico da lesão. Chattopadhyay,

---

---

et al. (1994) estudaram as NORs em leucoplasias da mucosa oral. Tal estudo sugeriu uma distribuição diferente na contagem das NORs entre leucoplasias não-displásicas e displásicas, sendo significativamente maior em áreas displásicas. Xie et al. (1997) relataram que uma lesão displásica que evolui para carcinomas apresentam um número aumentado das NORs. Isto indica que a contagem das NORs podem auxiliar na detecção do prognóstico de uma lesão displásica.

O custo da reação de AgNOR é mais baixo quando comparado a maioria das reações imunohistoquímicas utilizadas no prognóstico de neoplasias (PIFFKO et al. ,1997). Nestas circunstâncias pesquisadores teriam a possibilidade do uso combinado da técnica AgNOR e marcadores imunoistoquímicos, propondo um refinamento na formação do marcadores de prognósticos das leucoplasias orais. Zoeller et al. (1994) avaliaram epitélio oral em grupos de displasias e carcinomas espinocelulares através da combinação entre a contagem das NORs e o uso do antígeno Ki 67, concluindo serem valiosas ferramentas para descrição da cinética das células e como auxílio no prognóstico dos carcinomas orais. Donofrio et al. (1995) investigaram através da detecção do antígeno PCNA e AgNOR diferentes graus de displasia em leucoplasias associadas ao HPV. Tal estudo sugeriu que os valores altos das NORs e a marcação positiva para o PCNA, em leucoplasias com moderado e alto grau de displasia poderiam representar um sinal de alarme, indicando um prognóstico desfavorável. Kobayashi et al. (1995) avaliaram a atividade proliferativa das leucoplasias com e sem alterações displásicas e carcinomas na mucosa oral, examinando a reatividade para o antígeno PCNA e a

---

---

contagem do número das NORs, sugerindo seu papel adjuvante na avaliação da displasia epitelial.

Trabalhos recentes continuam reafirmando que a avaliação de leucoplasias com e sem displasia resulta em diferenças nas contagens do números das NORs , refletindo uma graduação que pode dar informações valiosas para o prognóstico e prevenção das lesões consideradas pré-malignas na mucosa oral (PANDIT; AITHAL,2002; RAY et al., 2003).

---

### **3- Proposição**

A literatura científica de qualidade procurou evidenciar que as leucoplasias possuem risco de transformação maligna e atividade proliferativa, conforme apresente 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. Este trabalho propõe avaliar nas leucoplasias da mucosa jugal, sem evidência de displasias, a influência da *Candida sp* na atividade proliferativa ou risco de alteração maligna dos queratinócitos pelas técnicas de imunohistoquímica com os anticorpos p53, PCNA, ki67 e histoquímica AgNOR.

---

---

## **4 Material e Métodos**

### **4.1 Seleção dos Casos**

Os casos estudados foram coletados dos arquivos do Serviço de Histopatologia, do Departamento de Patologia e Propedêutica Clínica da Faculdade de Odontologia “Campus” de Araçatuba – UNESP, liberados a partir de documentação enviada e aprovada pelo comitê de ética e pesquisa da instituição. Foram utilizados vinte casos de leucoplasia de mucosa jugal sem displasia epitelial, sendo dez contendo o fungo *Candida sp* e dez sem o fungo, além de cinco biópsias contendo epitélio normal de mucosa jugal.

As lâminas foram coradas pela hematoxilina e eosina para a descrição à microscopia de luz. As lâminas que continham *Candida sp* também foram coradas pelo método metanamina-prata.

### **4.2 Imunohistoquímica**

Na imunohistoquímica foi utilizado o método streptavidina-biotina amplificado (B-SA) na coloração dos complexos antígeno / anticorpo por imunoperoxidase. Os materiais foram submetidos aos anticorpos primários PCNA, p53 e Ki67, todos da Dako Corporation. Cortes de 3µm foram desparafinados em dois banhos de xilol: um a 60°C por trinta minutos e outro à temperatura ambiente por vinte minutos. A seguir foram reidratados em série descendente de etanóis, e imersos em solução de hidróxido de amônio a 10% durante dez minutos para retirada do pigmento formólico.

---

---

Após a lavagem em água corrente e água destilada procedeu-se o tratamento do material com ácido cítrico monoidratado 10mM-pH 6.0, deixando-se no forno de microondas por quinze minutos, com o cuidado de verificar o nível da solução a cada cinco minutos, que deve estar sempre banhando o material. Este recurso permitiu recuperar sítios antigênicos dos filamentos intermediários devido a uma ordenação molecular de suas proteínas, melhorando assim a reação com o anticorpo primário.

Após uma nova lavagem, o material foi incubado em solução de água oxigenada a 6% / metanol (1:1), em duas trocas de 5 minutos cada, com o objetivo de bloquear a peroxidase endógena tecidual. Repetida a lavagem com água corrente e destilada, os cortes foram incubados duas vezes em solução de TRIS-pH 7.4, por cinco minutos cada. Em seguida foram incubados com o soro primário diluído, conforme mostra a Tabela 1, preparados junto com soro de albumina bovino (B.S.A.) a 1%.

**Tabela 1- Anticorpos monoclonais a serem utilizados**

<b>Anticorpos</b>	<b>Fração de diluição</b>	<b>tempo de incubação</b>	<b>Temperatura</b>
PCNA*	1:100	Over Night(15hs)	5°C
P53*	1:100	Over Night(15hs)	5°C
Ki67*	1:250	Over Night(15hs)	5°C

\*Dako Corporation, Carpinteria, CA 93013

Os procedimentos posteriores foram sempre precedidos de duas lavagens em TRIS pH 7.4, durante 5 minutos cada.

O passo seguinte foi a incubação com o anticorpo de ligação diluído em 1:100 (coelho anti-camundongo e cabra), durante trinta minutos à temperatura ambiente. Foi aplicado o complexo streptavidina por vinte minutos

---

---

à temperatura ambiente, em diluição 1:150, e para a reação de revelação se utilizará o cromógeno diaminobenzidina-D.A.B. (30 mg) por três minutos, diluído em TRIS pH7.4 (100ml) e ativado pela água oxigenada (1.2ml).

Os cortes foram então lavados em água corrente e água destilada e contracorados com hematoxilina de Mayer por dez minutos. Posteriormente os cortes foram desidratados em cadeia ascendente de etanóis, diafanizados em três banhos de xilol, e montados em resina Permount\* para exame microscópico óptico.

Todas as reações tiveram como controle positivo fragmento de tecido epitelial estratificado pavimentoso da mucosa jugal normal. Especificamente para o Ki67, uma lâmina de carcinoma espinocelular foi disposta para controle positivo da marcação. Para o controle negativo das reações foi substituído o anticorpo primário por solução BSA a 1%, diluída em tampão TRIS pH7.4.

### **4.3 AgNOR**

O conjunto de lâminas deste trabalho, descritas anteriormente, foram também submetidas à coloração histoquímica AgNOR, a técnica utilizada foi descrita por Ploton et al. (1986) e otimizada por Nunes (1991). Além disso, introduzimos modificações para adaptar a técnica as nossas condições laboratoriais, a fim de permitir a visualização das NOR. A técnica realizada consistiu em :

1. Cortes de 6  $\mu\text{m}$  desparafinizados em dois banhos de xilol, o primeiro trinta minutos em estufa a 57° C, em seguida por 20 minutos a temperatura ambiente;
-

- 
2. Hidratação em etanol absoluto;
  3. Imersão em ácido acético/etanol (30ml de ácido acético/ 70 ml de etanol), durante cinco minutos;
  4. Imersão em Celoidina a 1% em éter/ etanol (1:1) durante 1 minuto. Essa solução foi preparada misturando-se 50ml de éter + 50 ml de etanol, a seguir desprezando-se 12,5 ml e completando-se com Celoidina (Colódio elástico da Polyfarma);
  5. Imersão em etanol a 70% por cinco minutos seguida da lavagem com água destilada;
  6. Preparo das soluções de prata para AgNOR, constituídas de:
    7. **Solução A**: 50 ml de água destilada, 0,5 ml de ácido fórmico e 1g de gelatina. Essa solução foi mantida em estufa a 45° C uma hora antes da incubação;
    8. **Solução B**: 10 ml de água destilada e 5 g de nitrato de prata.
  9. As soluções A e B foram misturadas e pingadas sobre os cortes, que permaneceram durante trinta minutos em estufa a 45° C;

Os cortes, por fim, foram desidratados com álcool em concentrações crescentes (95 e 100%), clareados em três banhos de xilol e por fim as lâminas montadas em Permout\*, que não interfere no processo de coloração.

\*Permout – meio de adesão de lamínula com índice de refração de 1,53, transparente, neutro e seco rapidamente.

---

---

#### **4.4 Análise Qualitativa e Morfométrica**

Após a obtenção das lâminas submetidas aos marcadores de imunohistoquímica (p53,PCNA,Ki67) as mesmas foram submetidas à microscopia de luz (400x) para a verificação da qualidade da coloração e subsequente captura de imagens, em áreas leucoplásicas selecionadas, considerando no grupo III, a presença de *Candida sp* na superfície da lesão.

Para a análise quantitativa dos NOR, três campos com área fixa foram selecionados em cada lâmina, mantendo um limite mínimo de 100 núcleos, divididos em 50 basais e 50 para-basais. As imagens em microscopia de luz em imersão (1.000x) com foco definido e adequação da luminosidade, permitindo clareza nas imagens, foram obtidas em áreas leucoplásicas selecionadas contendo a evidência da *Candida sp* e padrões de queratinização sem displasia (grupos II e III), além daquelas que continham epitélio normal (grupo I).

A qualidade das lâminas destinadas ao AgNOR e a avaliação descritiva das colorações de imunohistoquímica foram avaliadas através do sistema de integração entre o microcomputador, microscópio de luz acoplado à câmara de vídeo e o programa Leica QWin (Image Processing and Analysis System). Participaram neste processo de avaliação três observadores distintos.

Tal sistema também permitiu estabelecer um padrão de contagem confiável dos NOR e área em  $\mu\text{m}^2$ . Os resultados obtidos pelo programa foram

---

---

calculados automaticamente e apresentados no formato de planilha, que mais tarde foi salva em arquivo próprio com a finalidade de amostragem para o tratamento estatístico através da análise de variância (ANOVA), aplicando-se o teste F com nível de significância de 0.05.

---

---

## 5 RESULTADO

### 5.1 Morfologia

A avaliação histopatológica através da microscopia de luz estabeleceu no segundo grupo (GII) deste trabalho dez amostras de leucoplasias, representadas por hiperkeratose e hiperparakeratose e infiltrado inflamatório crônico subepitelial (Figura...). O terceiro grupo (GIII) também com dez amostras exibiu hiperkeratose, acantose, e hifas de *Candida sp* abundantes na superfície junto a ceratose ( Figura...) além do infiltrado inflamatório crônico subjacente, e frequentemente exocitose neutrofílica.

### 5.2 AgNOR

Nas lâminas estudadas, as regiões organizadoras de nucléolos coradas pela prata (AgNORs), foram visualizadas como pontos enegrecidos ou acastanhados, localizados no interior dos núcleos (Figuras... ) Os núcleos eram verificados como estruturas maiores de coloração amarelada, redondas ou ovóides (Figura ...). O número médio de NORs para o grupo I foi de 3.8, já o grupo II 2.6 e grupo III 3.1 (Figura...)

### 5.3 p53

A marcação da proteína p53 foi semelhante nos grupos II e III. Ambas apresentaram uma marcação positiva em 30 % dos casos. Os núcleos

---

---

celulares apresentavam-se corados em castanho quando marcados, com dispersão variável nas camadas inferiores do epitélio. No grupo I a marcação foi positiva em 80% da amostra e poucas células da camada basal e para basal.

### **5.3 PCNA**

A proteína PCNA foi expressa tanto nas leucoplasias do grupo III como naquelas do grupo I e II, sendo sua marcação nítida nas camadas basal e parabasal nos vinte espécimes avaliados (Figuras...). Os núcleos das camadas basais e para basais apresentaram-se positivamente marcados com dispersão regular ao longo das camadas inferiores do epitélio, não raro se estendendo para a camada espinhosa (Figuras ...).

### **5.5 Ki67**

A marcação do Ki67 foi expressa positiva em 70% do total de leucoplasias, distribuída em 90% da amostra de leucoplasias sem *Candida* e 50% do grupo com o fungo. A coloração acastanhada dos núcleos entre células mantinha uma dispersão variável nas camadas inferiores do epitélio em padrão semelhante ao p53 (Figuras...). No epitélio normal (GI) a expressão foi de 40 % em poucas células da camada basal e parabasal(Figura ...).

---

---

## 5.6 Análise estatística do AgNOR

Os dados obtidos relativos as mensurações de área e número de NORs tanto no epitélio normal quanto nas de leucoplasias apresentavam normalidade, variância semelhante, considerando que cada grupo era independente.

Uma vez apresentadas estas exigências, os três grupos foram então submetidos ao tratamento estatístico, através da análise de variância (ANOVA), sendo submetida ao teste F, com nível de significância de 0.05.

Como resultado, os grupos não apresentavam diferenças estatisticamente significativas tanto na área média, como no número médio de NORs.

---

## 5.7 Tabelas

Tabela 2 – Grupos para o estudo de área média das NORs

GA1	GA2	GA3
212721,2548	461722,1319	690047,4773
252955,3723	2698674,024	358727,0727
152258,1331	540599,8411	471599,0862
383797,8377	277737,7719	651914,5457
253571,0773	133058,6364	366461,3026
	511838,3343	336325,3173
	385781,8444	842701,4218
	360535,7412	357019,5976
	515990,3442	780911,7183
	504038,4822	515990,3442

Tabela 3- Análise de valores em área média das NORs.

RESUMO				
Grupo	Contagem	Soma	Média	Variância
A1	5	1255303,68	251060,74	7215224948
A2	10	6389977,15	638997,72	5,4011E+11
A3	10	5371697,88	537169,79	3,6425E+10

Tabela 4- Análise de variância (ANOVA) pelo teste F, referente à NORs

ANOVA						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	5,062E+11	2	2,531E+11	1,06713574	0,361138	3,443361
Dentro dos grupos	5,218E+12	22	2,372E+11			
Total	5,724E+12	24				

Tabela 5- Grupos para o estudo numérico das NORs.

GN1	GN2	GN3
5,10	2,68	2,50
4,02	3,07	5,11
3,74	2,13	5,97
3,92	2,46	2,60
2,50	2,33	2,80
	2,08	3,35
	3,46	1,94
	3,55	3,20
	2,26	2,13
	2,32	2,26

Tabela 6 - Análise de valores dos números médios das NORs

RESUMO				
Grupo	Contagem	Soma	Média	Variância
N1	5	19,28	3,856	0,85768
N2	10	26,34	2,634	0,2928489
N3	10	31,86	3,186	1,7741822

Tabela 7.- Análise de variância (ANOVA) pelo teste F, referente às  
NORS

ANOVA						
Fonte da variação	SQ	gl	MQ	F	valor-P	F crítico
Entre grupos	5,103184	2	2,551592	2,5476547	0,101115	3,443361
Dentro dos grupos	22,034	22	1,001545455			
Total	27,13718	24				

## 5.8 Figuras

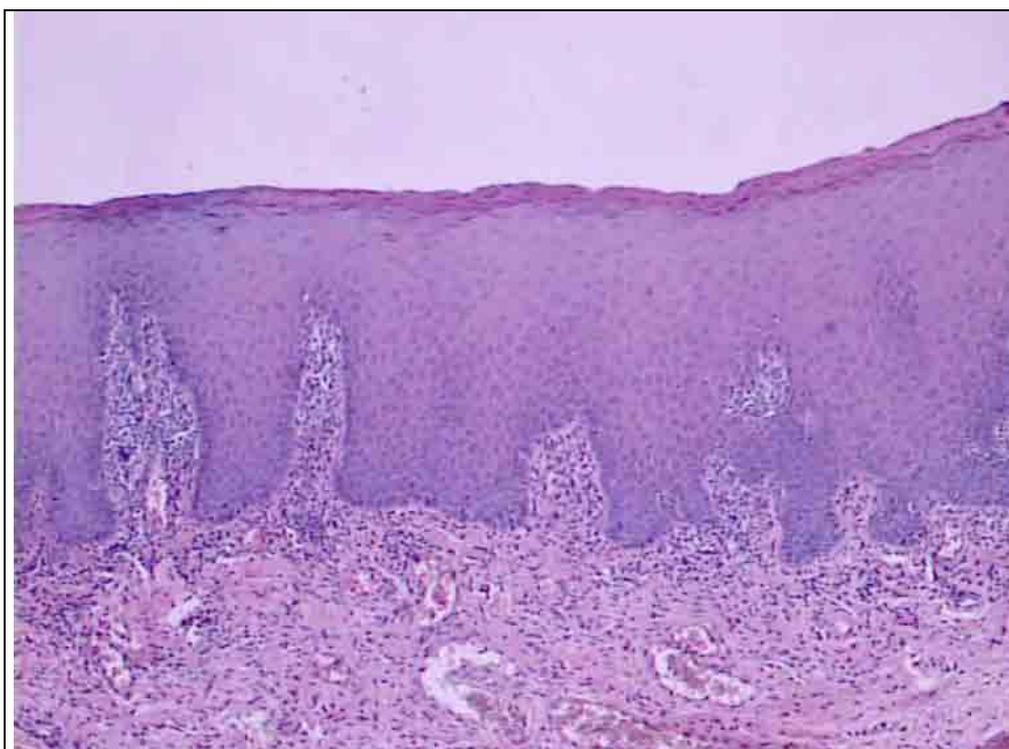


FIGURA 1 – Aspecto histológico da leucoplasia oral sem *Candida*.  
***Hematoxilina-eosina (100x).***

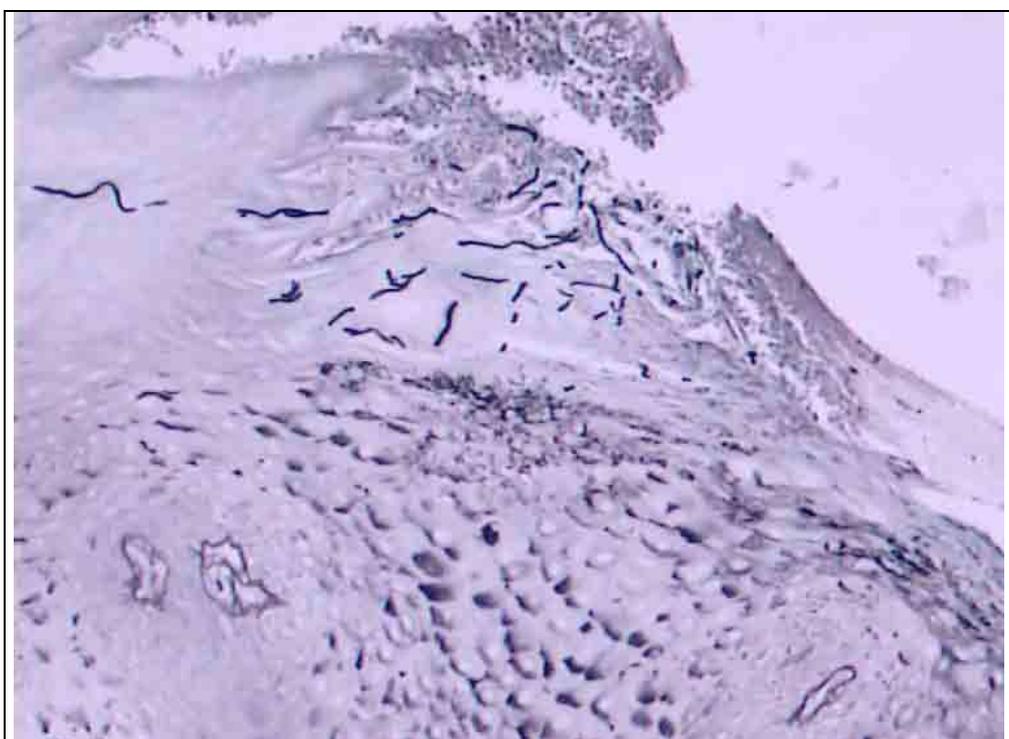


FIGURA 2 – Aspecto histológico da leucoplasia oral com  
*Candida* – ***Metanamina-prata. (100x).***

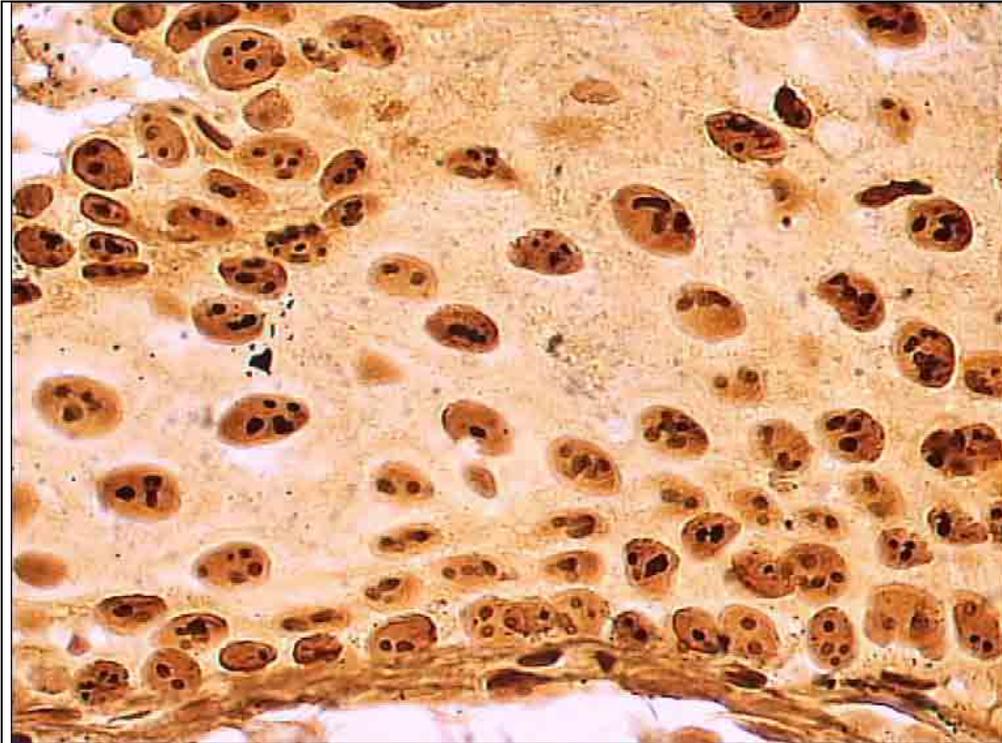


FIGURA 3 – NORs na camada basal e parabasal de epitélio normal – **AgNOR (1000x)**.

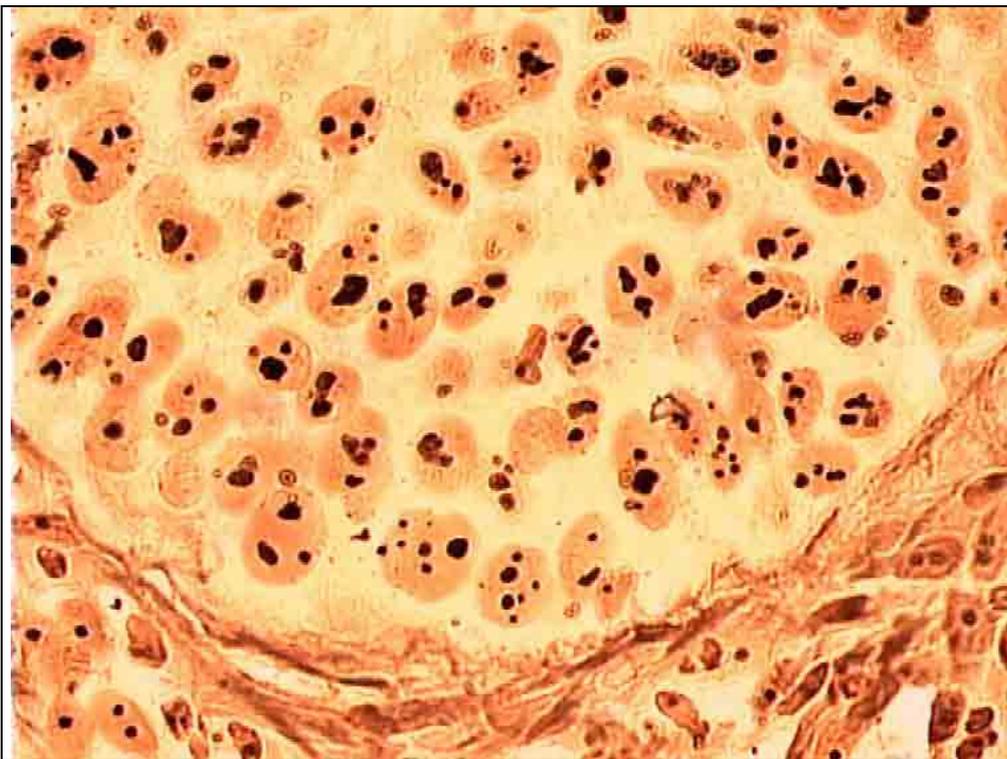


FIGURA 4 – NORs na camada basal e para basal da leucoplasia com *Candida* - **AgNOR (1000x)**.

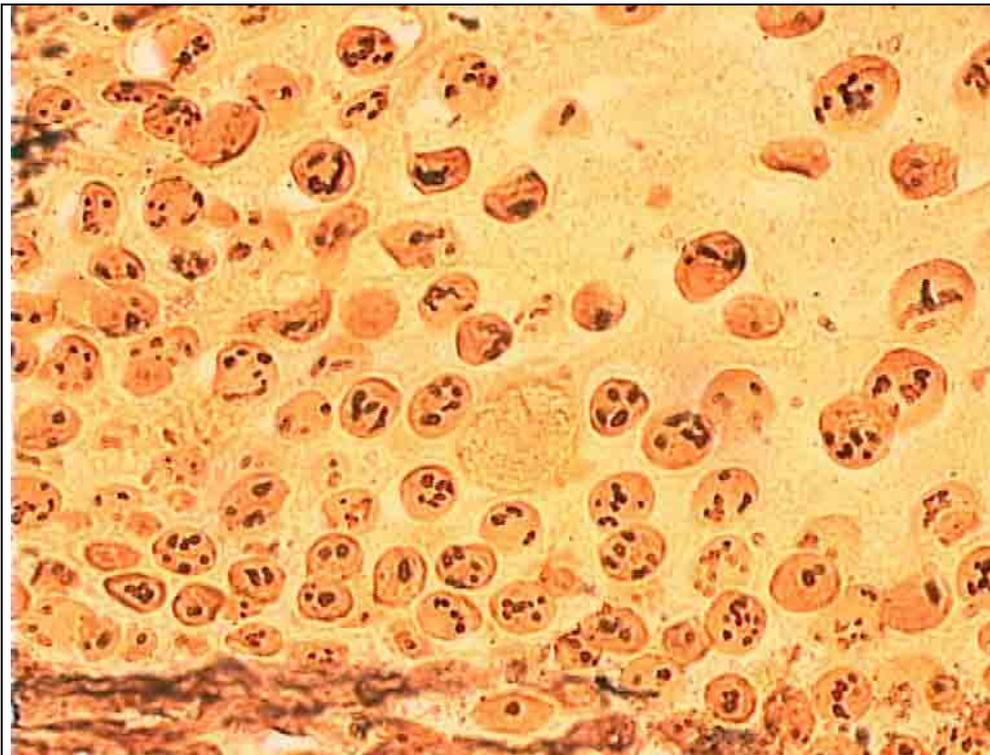


FIGURA 5 – NORs na camada basal e para basal da leucoplasia sem *Candida* - **AgNOR (1000x)**.

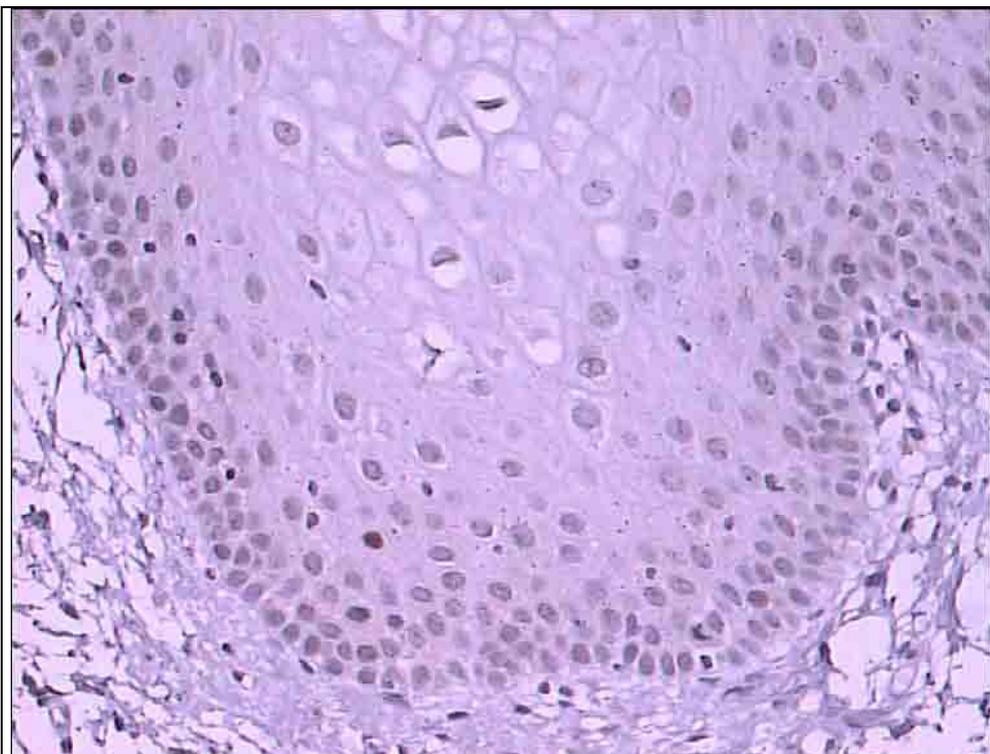


FIGURA 6 – Expressão do p53 na camada basal e parabasal de epitélio normal - **Streptavidina-biotina (400x)**.

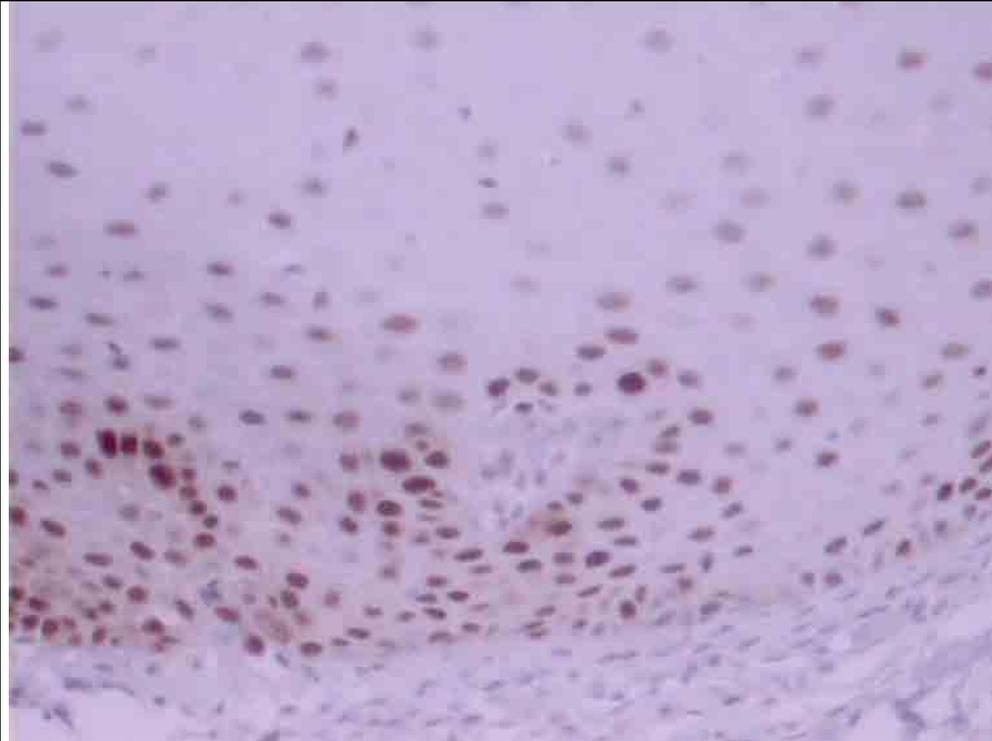


FIGURA 7 - Expressão do p53 na camada basal e parabasal da leucoplasia com *Candida* - **Streptavidina-biotina (400x)**.

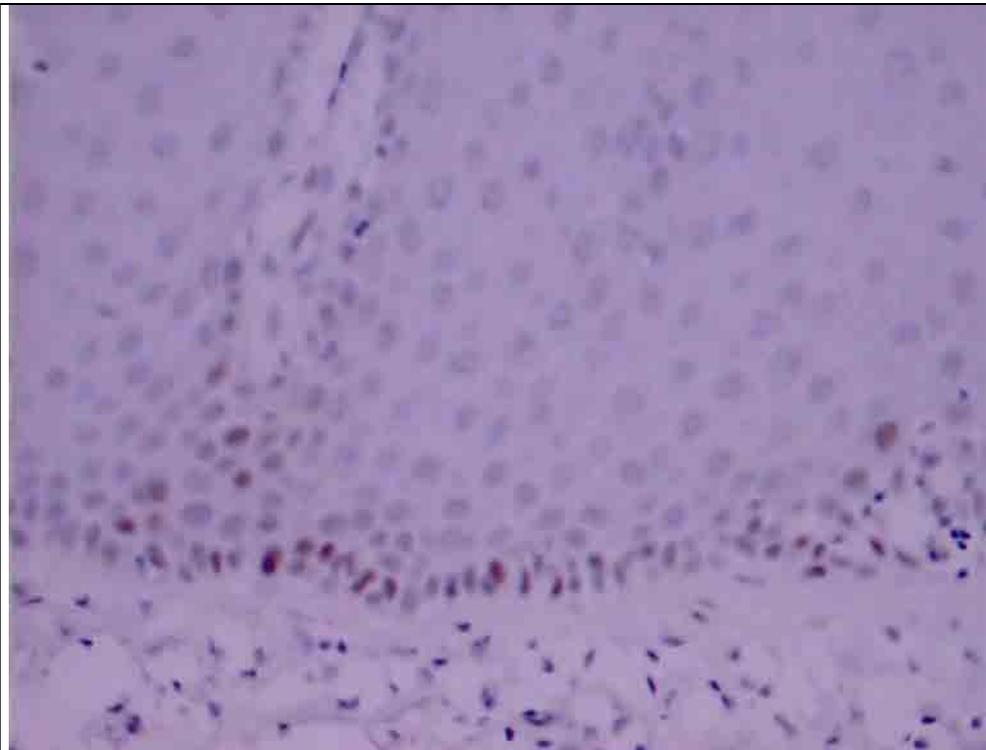


FIGURA 8 - Expressão do p53 na camada basal e parabasal da leucoplasia sem *Candida* - **Streptavidina-biotina (400x)**.

---

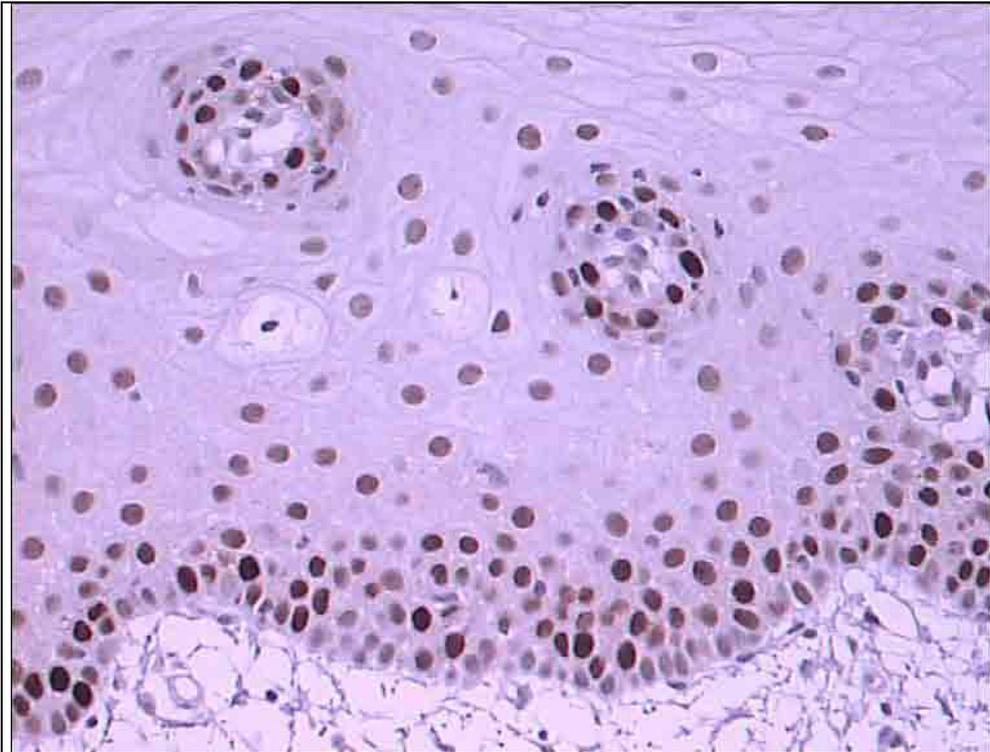


FIGURA 9 – Expressão do PCNA na camada basal e parabasal de epitélio normal - ***Streptavidina-biotina (400x)***.

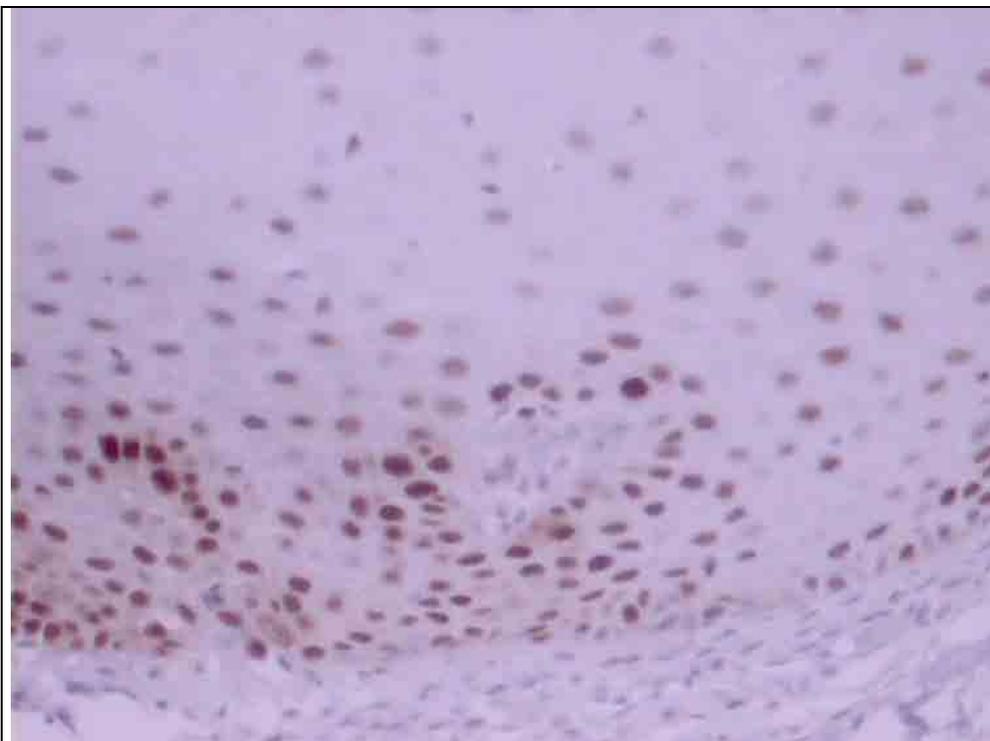


FIGURA 10 – Expressão do PCNA na camada basal e parabasal da leucoplasia com *Candida* e fraca marcação na camada espinhosa - ***Streptavidina-biotina (400x)***.

---

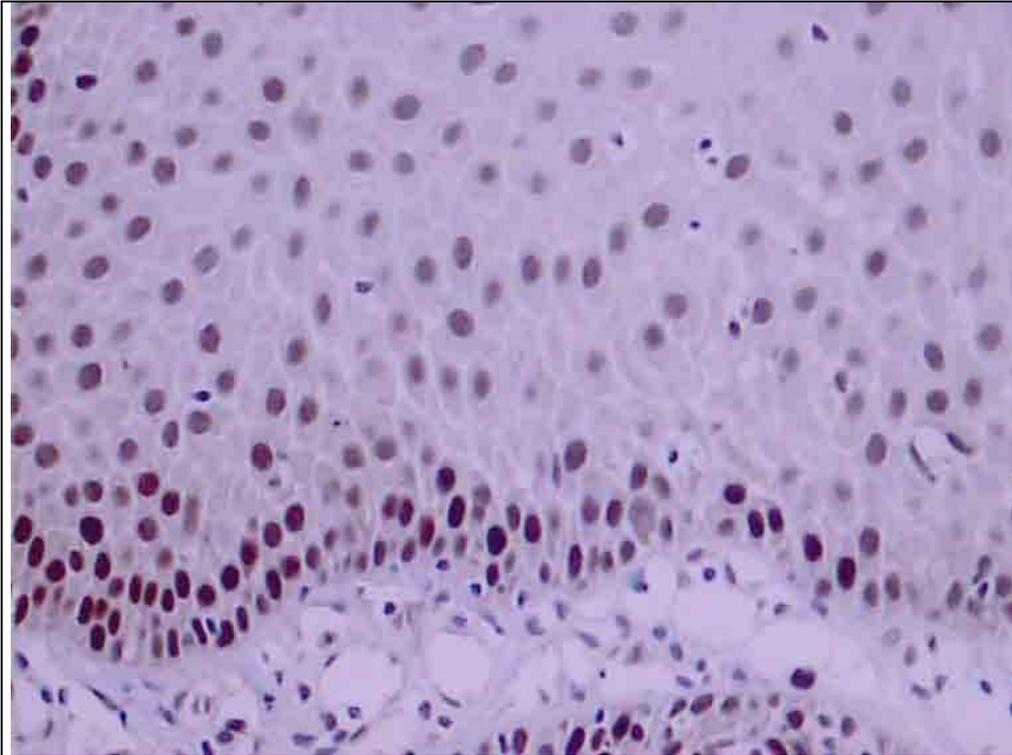


FIGURA 11 - Expressão do PCNA na camada basal e parabasal da leucoplasia sem *Candida* e fraca marcação na camada espinhosa - ***Streptavidina-biotina (400x)***.



FIGURA 12 - Expressão do ki67 em algumas células da camada basal e parabasal de epitélio normal - ***Streptavidina-biotina(400x)***.

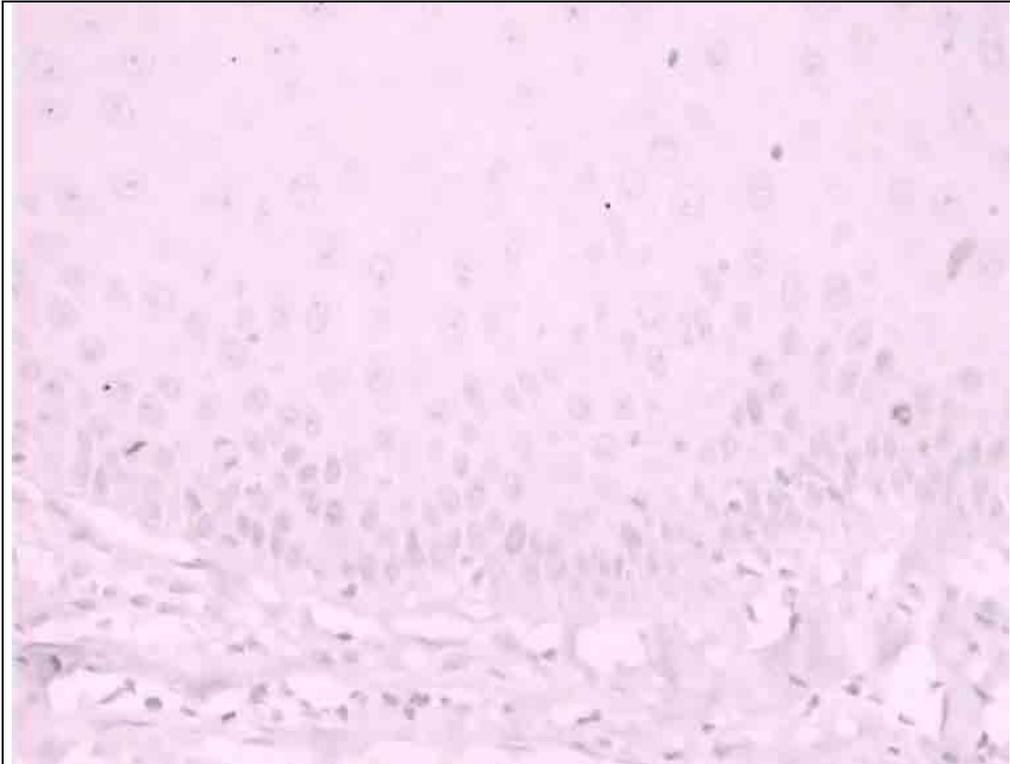


FIGURA 13 - Expressão do ki67 em algumas células basal e parabasal da leucoplasia com *Candida* - **Streptavidina- biotina (400x).**

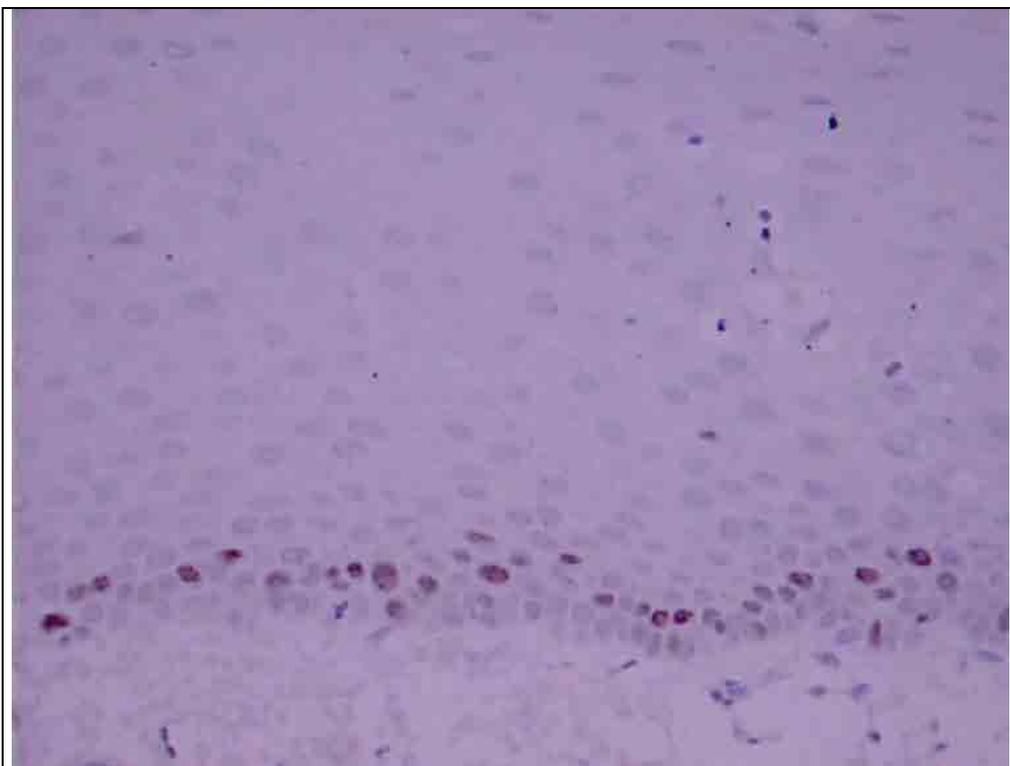
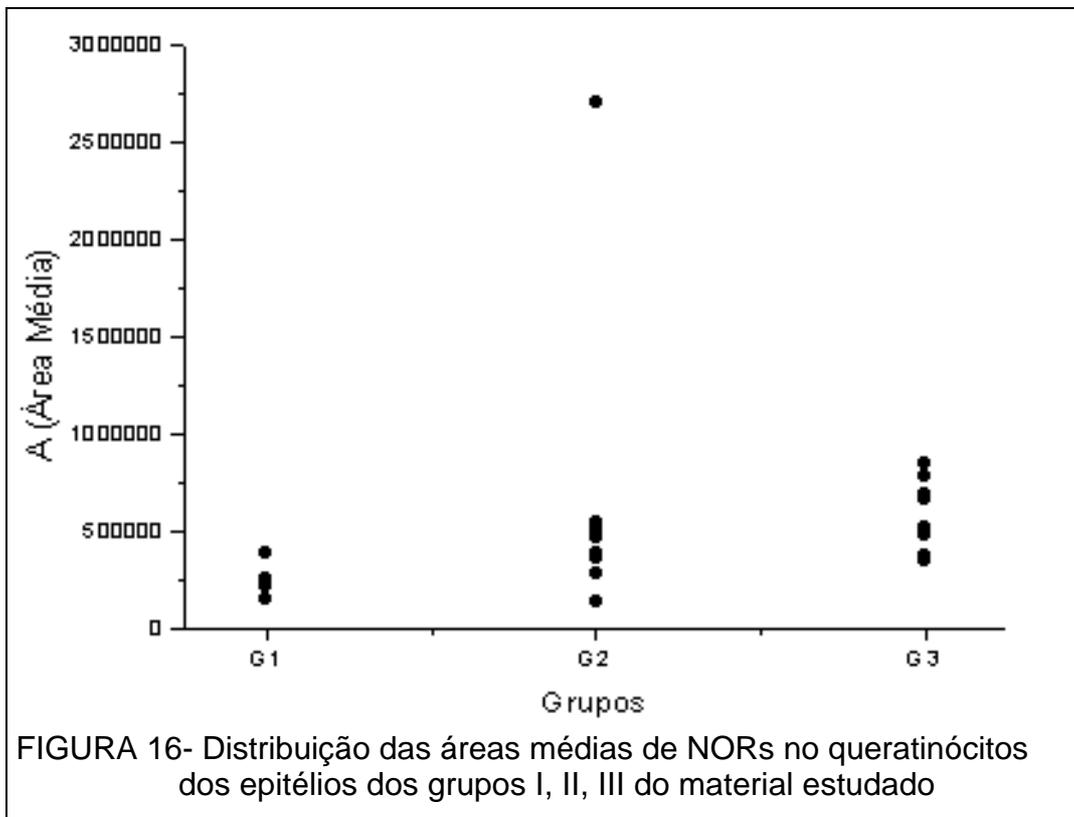
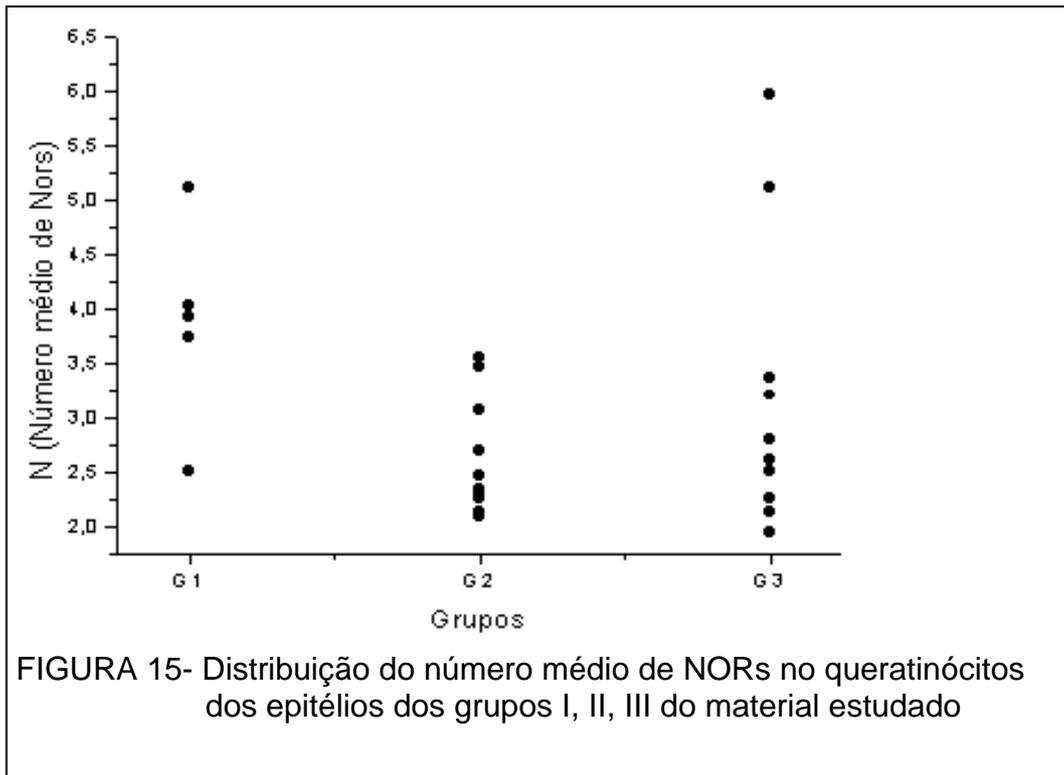


Figura 14- Expressão do ki67 em algumas células na camada basal e parabasal da leucoplasia sem *Candida* – **Streptavidina -biotina (400x).**

---



---

## 6 Discussão

A Organização Mundial de Saúde define o termo leucoplasia como sendo uma lesão de coloração branca, plana ou elevada, lisa ou rugosa, que não se destaca após a raspagem, que não regride após a eliminação de possíveis fatores causais e que histologicamente não pode ser classificada como nenhuma outra doença (SCHWIMMER, 1877 apud HOLBEK, 1946/1947; PINDBORG et al.,1963; SILVERMAN JUNIOR,1968; LEMMER; SHEAR, 1968; CALIFANO; CAPUTO,1969 apud GRINSEPAN, 1973; AXELL et al., 1984,1996; SHAFER et al., 1987; NEVILLE et al., 2004).

O termo leucoplasia é uma expressão consagrada pelo uso clínico. O compromisso de defini-la não é, porém, exclusivo de sua manifestação clínica. Portanto coube aos pesquisadores ressaltar ainda suas características histológicas variáveis no intuito de defini-la melhor e assim poder partir para a avaliação de sua possível malignidade (HOBBAEK, 1946/1947; KOLLAR JUNIOR et al., 1954; BERNIER, 1955 apud SHIRA,1957; LEMMER; SHEAR ,1968; SUGAR; BANOCZY,1969 apud BANOCZY,1977; METHA et al.,1969; BANOCZY,1971; BANOCZY; CSIBA, 1976; WALDRON; SHAFER, 1975; Kramer et al., 1978; BANOCZY et al.,1980; FISCHMAN et al., 1982; PINDBORG et al.,1985; AXELL et al.;1996; VAN DER WALL et al., 2000; LAWALL, 2004; REGEZI; SCIUBBA, 2004). A etiologia da leucoplasia ainda é pouco definida. No momento, os fatores etiológicos oscilam entre o uso do álcool, do fumo, exposição solar, fatores irritativos mecânicos como próteses sem adaptação adequada e uma série associações com possíveis falhas nas condições sistêmicas, como a diabetes e avitaminoses, que parecem ser

---

---

questionáveis. Embora não tenham sido eleitas causas únicas para a leucoplasia, este fato não permite que o clínico não as busque. Negar este preceito condenaria a prática diagnóstica, evolução da lesão e qualidade de vida do paciente (BUTLIN, 1855 apud MCCARTHY; SHKKLAR, 1964; PAGET, 1900 apud HOBAEK, 1946/1947; LEMMER; SHEAR, 1968; METHA et al., 1969; PINDBORG, 1971; WALDRON; SHAFER, 1975; SILVERMAN et al., 1976; BANOCZY, 1977; KRAMER et al., 1978; ÁXELL et al., 1984; GUPTA et al., 1992; VAN DER WALL, 1995; VAN DER WALL et al., 1997; TAVARES, 2000; NEVILLE et al., 2004).

Clinicamente, observou-se que as leucoplasias apresentavam aspectos variáveis na superfície, na homogeneidade de sua coloração, no número de lesões e em sua localização e tamanho (LANGDON; PARTRIGDE, 1992; GIROD et al. 1993, 1994, 1998; LIU; KLEIN-SZANTO, 2000; SARANATH et al., 1999; IWASA et al., 2001; SULKWASKA et al., 2001). Impõe observação clínica cuidadosa seu aspecto verrucoso, áreas avermelhadas não homogêneas e localização como a borda de língua e assoalho da boca, pois representam áreas de maior incidência de carcinoma espinocelular (LONING et al., 1984; LIND et al., 1986; GREER JUNIOR et al., 1990; GOPALAKRISHNAM et al., 1997).

Os aspectos histopatológicos das leucoplasias também variam de acordo com as hiperkeratoses, acantoses, papilomatoses, displasias e até mesmo carcinoma "in situ" (HOBAEK, 1946/1947; LEMMER; SHEAR, 1968; MEHTA et al., 1969; BANOCZY; CSIBA, 1976; WALDRON; SHAFER, 1975; BANOCZY et al., 1980; FISCHMAN et al., 1982; AXELL et al., 1996; VAN DER WALL et al., 2000; LAWALL, 1998).

---

---

A candidose, por ser uma infecção oportunista comum, estabelece uma relação de concomitância com as leucoplasias. Observa-se a colonização natural por *Candida* da mucosa oral onde encontramos células superficiais paraceratinizadas, por meio de mecanismos bioquímicos bem definidos; portanto as leucoplasias, que são lesões hiperkeratinizadas, tendem ser susceptíveis a esta contaminação (YOUNG et al., 1951; DOUGLAS, 1985; SOBEL et al., 1984; KWON-CHUNG et al., 1985; SLUTTSKY et al., 1985; CHANNOUM et al., 1986; BUDTZ-JORGENSEN, 1990; KLOTZ et al., 1991; KROGH et al., 1987; KANBE et al., 1991; HAZEN et al., 1991; BRASSAT et al., 1991; MANDEL, 1994; WILLAMS et al., 1997; LEHMANN, 1998; MORAES et al., 2000; NEVILLE, et al. 2004).

A resposta inflamatória da mucosa oral frente à candidíase é uma característica evidente. Os grupos de leucoplasias com *Candida*, descrito em nossos resultados, apresentavam infiltrado inflamatório crônico, semelhante ao descrito em literatura (Willams et al., 1997). O tratamento da candidose nas leucoplasias pode contribuir na diminuição da resposta inflamatória das lesões, bem como remissão das leucoplasias o que nos obriga a pensar em uma conduta, a princípio, conservadora, postergando temporariamente uma biópsia (EPSTEIN; POLSKY, 1998; BLATCHFORD, 1990; SCHUMAN et al., 1997; FERRETI et al., 1987; GUPTA et al., 1994; SANGUINETI et al., 1993).

A presença de nitritos e nitratos no ambiente e em certos tipos de alimentos, gera dentro de valores específicos, a possibilidade de formação de nitrosaminas endógenas, que por sua vez pode oscilar com mudanças fisiológicas como o pH da mucosa (NEUARTH et al., 1977). Reações típicas de nitrosação fazem com que BMA (N-metil-benzil-amina) e  $\text{NaNO}_2$  sejam

---

---

transformadas em NBMA (N-nitroso-N-metil-benzil-amina), que sendo carcinogênicas, podem estabelecer participação na formação das neoplasias gastrointestinais (HSIA et al., 1983; KROGH et al., 1987; LIPPERHEIDE et al., 1996).

Na síntese de nitrosaminas, a candidíase é descrita como um agente coadjuvante, já que o fornecimento de nitritos e nitratos é intrinsecamente ligado ao meio externo. Deduz-se, portanto, que a candidíase poderia colaborar secundariamente na malignização das células. A região noroeste do estado de São Paulo a qual, por conseqüência, provem as biópsias de nosso trabalho, não pode ser caracterizada como área geograficamente controlada no sentido de avaliar uma possível contaminação por nitritos ou nitratos. Porém, aparentemente, por nossos resultados a presença da *Candida* nas leucoplasias não aumentou este risco de malignização (STURGIS; LUND, 1934; JEPSEN; WINTHER, 1965; CAWSON, 1966; ROED-PETERSEN et al., 1970; PINDBORG, 1971; BANOCZY; SUGAR, 1975; BANOCZY, 1977).

Informações epidemiológicas recentes relacionadas às leucoplasias apontam para índices de transformação maligna na população mundial, variando sua incidência entre 6.2 à 29.1 para cada 100.000 habitantes (LIU; KLEIN-SZANTO, 2000; LANGDON; PARTRIGDE, 1992; GIROD et al., 1994; CHANG et al., 2000; ARAUJO; ARAUJO, 2000; TAVARES, 2000; IWASA et al., 2001; SULKOWSKA et al., 2001; PIATTELLI et al., 2002; PETTI, 2003). Questionar esta variabilidade estatística seria uma tarefa inevitável. Portanto os pesquisadores foram guiados, ao longo das três últimas décadas, no sentido de desvendar os mecanismos biológicos, aos quais permitiriam as leucoplasias atingir estes valores estimados de transformação maligna. Muitos fatores foram

---

---

relacionados como idade, sexo, etnias e relações genéticas. Mas paralelamente, surgiram indícios do comportamento celular das leucoplasias através do avanço gradativo das técnicas de imunohistoquímica e histoquímica. A parceria entre desenvolvimento tecnológico e as observações na rotina dos trabalhos clínicos, obteve, como conseqüência, a descoberta de alguns fatores de prognóstico e, obviamente, justificou as condutas terapêuticas e o controle do pacientes.

Quanto ao estudo imunoistoquímico, a variabilidade de anticorpos disponíveis no mercado e sua especificidade exige um cuidado rigoroso na seleção dos marcadores de transformação maligna. A interpretação da sensibilidade ou especificidade do marcador depende da situação na qual ele é aplicado, bem como da questão clínica a qual ele deseja responder. Atualmente recomenda-se a aplicação conjunta de anticorpos para avaliar a proliferação celular ou malignização de um tecido. Utilizamos os mais aplicados: p53, PCNA, e ki67, além da histoquímica do AgNOR.

Presenciamos ainda o contínuo e sistemático esforço coletivo dos pesquisadores em decifrar caminhos para a compreensão da dinâmica bioquímica que determina, através da especificidade imunoistoquímica, os prováveis sítios de malignidade das leucoplasias. Sem isto, as atividades preventivas não se sustentariam. Contudo, notamos que a microscopia de luz formal não é mais satisfatória, em regime de exclusividade, para determinar fatores de prognóstico associados às mudanças celulares específicas, como no caso das leucoplasias de mucosa oral (PIATTELLI et al., 2002; CHANG et al., 2000; AGARWAL et al., 1999; CASTLE et al., 1999; TETE et al., 1999;

---

---

KANNAN et al., 1996; LIU; KLEIN-SZANTO, 2000; TSUJI et al., 1995; KOVESI; SZENDE, 2003; TETE et al., 1999; SLOOTWEG et al., 1994).

O p53 expresso em nossos resultados mostrou dois caminhos na avaliação do comportamento celular: um de apoptose e o outro referente à transformação maligna nos diferentes tipos de neoplasias (CHANG et al., 1993,2000; LEVINE et al., 1991; IGOO et al., 1990; EL-DEIRY et al., 1994; MOLL; SCHARMMAN, 1998; FRITSCHE et al., 1993; BARTEK et al., 1992; HOLLSTEIN et al., 1991; CRUZ et al., 1998; GIROD et al., 1998; RALHAN et al., 1998; OGDEN et al., 1997; WOOD et al., 1994; SULKOWSKA et al., 2001; SARANATH et al.,1999; GOPALAKRISHNAM et al., 1997).

A marcação positiva do p53 não diz implicitamente que estamos diante de uma neoplasia. Ao avaliar leucoplasias observando camadas basais de epitélios displásicos , tendo como único marcador o p53, não teremos em mãos um fator prognóstico de malignidade totalmente confiável. Isto justifica o fato da literatura ter, mais recentemente, abordado as lesões leucoplásicas combinando outros marcadores como o Bcl-2, PCNA e ki67 (PIASTTELLI et al., 2002; CHANG et al., 2000; AGARWAL et al., 1999; CASTLE et al., 1999; TETE et al., 1999; KANNAN et al., 1996). Em cada um dos grupos de leucoplasias, com e sem *Candida* apenas 30% foram marcadas positivamente para o p53. Porém consideramos esta marcação alta em relação ao epitélio normal, o que pode estar referindo alterações bioquímicas incipientes intracelulares no sentido da transformação maligna ou apoptose.

O PCNA apresenta nas camadas basais e para basais de epitécio de leucoplasias uma marcação bastante evidente, representando bons alertas de malignidade e apoptose; também quando combinados a outras técnicas de

---

---

histoquímica (AgNOR) e imunoistoquímica (LIU; KLEIN-SZANTO, 2000; TSUJI et al., 1995; KOBAYASHI et al., 1995; DONOFRIO et al., 1995) leucoplasias orais manifestações histológicas de malignidade e apoptose (BIRCHALI et al., 1997; NISHIOKA et al., 1993). O grupos de leucoplasias com e sem *Candida sp* em nosso trabalho foram marcados positivamente em padrões semelhantes para o PCNA.

O Ki 67 pode ser visto como um indicador de área ativa de proliferação celular em leucoplasias da mucosa oral e quando comparado a grupos também marcados positivamente pelo PCNA, parece obedecer algum tipo de uniformidade.( KOVESI; SZENDE, 2003; PIATTELLI et al., 2002; TETE et al., 1999, KANNAN et al., 1996, SLOOTWEG et al., 1994). A marcação do Ki67 foi expressa positiva em 70% do total de leucoplasias, distribuída em 90% da amostra de leucoplasias sem *Candida* e 50% do grupo com o fungo, num padrão semelhante ao p53, porém com maior frequência. A presença de *Candida* não se associou a maior expressão do ki67.

Em particular, nossa escolha por marcadores p53, PCNA e Ki67 foi adequada e embasada numa revisão de literatura, a qual se aproximou pertinentemente de nossos objetivos (RALHAN et al., 1998; OGDEN et al., 1997; WOOD et al., 1994; SULKOWSKA et al., 2001; SARANATH et al., 1999; LAWALL et al., 2003).

A técnica AgNOR possui benefícios por já ser padronizada, ter suporte na literatura científica em diversas patologias orais e oferecer baixo custo operacional (PIFFKO et al.,1997).

Alguns cuidados referentes à manipulação das peças durante a rotina da AgNOR são importantes. Destacam-se trabalhos que avaliavam alterações

---

---

técnicas que geram complicações desnecessárias, como é o caso da escolha do agente fixador da reação química, a espessura do material, as soluções empregadas e a sensibilidade do material à exposição luminosa (CROCKER et al., 1989; ZACZEK et al.,1994; COSTA et al.,1997).

A progressão dos queratinócitos da mucosa oral para metaplasia, displasia, e eventualmente neoplasias é o resultado de múltiplos passos envolvendo fatores complexos adicionando aumento na proliferação celular e aneuploidias, sendo a coloração AgNOR um dos possíveis agentes marcadores, porém não de forma isolada( Warnakulasuriya ; Jonson, 1993). Sabemos que o aumento na proliferação celular, detectado por aumento da atividade mitótica ou síntese de DNA, nos mostra que existe uma associação, com mudanças na diferenciação do queratinócito alterada em situação de displasia presentes em leucoplasia (PLOTON et al., 1986; CROCKER; NAR, 1887; OFNER et al., 1990; CABRINI et al., 1992; SANO et al., 1991; WARNAKULASURIVA; JOHNSON, 1993; SCHWINT et al.,1994; LO MUZIO et al.,1997).

Entretanto, como fator prognóstico, a AgNOR é incompleta. Muitos autores têm demonstrado que o diagnóstico diferencial entre lesões com base no valor numérico das NORs, é amplamente questionável, considerando essencial e indispensável a avaliação morfologia das amostras e ou combinação com outras técnicas imunohistoquímicas (LEVINE et al., 1994; PLOTON et al., 1986, BABU; VERMA, 1985; DERENZINI et al., 1988; VAN DIEST et al.,1998; DERENZINI et al.,1999; DERENZINI, 2000; HERNANDEZ-VERDUN; ROUSSEL,1995; HORZAK et al., 1986; KAMEL et al., 1990;

---

---

HERNANDEZ-VERDUN; FAKAN, 1986; WALKER, 1988; MATOLCSY et al., 1992).

Ressaltamos que, embora as diferenças entre os valores médios das NORs possam eventualmente ser significativas, tais valores não podem ser utilizados para o diagnóstico individual de lesões (SANO et al., 1991; ERGAN; CROCKER, 1988; CABRINI et al., 1992; WARNAKULASURIYA; JOHNSON, 1993).

A presença ou ausência de candidose nas leucoplasias parece não afetar a contagem do número médio de NORs, como observado por Warnakulasuriya ; Johnson em 1993. Nosso trabalho não apresentou resultados estatisticamente significativos quanto ao número médio de NORs ou a sua área média de NORs e a morfologia dos grupos não apresentou discrepâncias que sugeririam mudanças importantes entre os grupos de leucoplasias com e sem *Candida*.

O desenvolvimento de novos programas gráficos estão tentando reduzir possíveis discrepâncias na avaliação dos NORs, gerando análises automatizadas cada vez mais confiáveis.

O propósito pelo qual alguns trabalhos combinam a AgNOR à imunohistoquímica, principalmente os marcadores de proliferação tecidual como o Ki67 e o PCNA, reside na melhoria da interpretação dos possíveis mecanismos de comportamento biológico e fatores prognósticos ligados as leucoplasias. Esta conduta é relevante no sentido de reduzir falhas presentes em cada uma das técnicas potencializando-as (NUNES et al., 1991; CHATTOPADHYAY et al., 1994; ZOELLER et al., 1994; DONOFRIO et al.,

---

---

1995; KOBAYASHI et al., 1995; PIFFKO et al., 1997; PANDIT; AITHAL, 2002; RAY et al., 2003).

A disposição desta combinação contribuiu no direcionamento adequado e na observação histológica refinada de nosso trabalho. A marcação dos antígenos p53, PCNA e Ki67 nas leucoplasias sem displasia contaminadas ou não com *Candida* foi discreta, e quando comparadas entre si, não descreviam qualitativamente indícios de proliferação tecidual anormal.

---

## **7. Conclusão**

- Todas as leucoplasias de mucosa jugal, com e sem *Candida* apresentaram expressão positiva para o PCNA, abrangendo camada basal, parabasal e espinhosa..
  - O ki67 e p53 exibiram padrão de marcação semelhante tanto nas leucoplasias contaminadas por *Candida sp* quanto nas livres do fungo, sendo o p53 menos freqüente na positividade desta marcação.
  - A histoquímica do AgNOR não apresentou diferenças estatisticamente significantes na área ou número de NORs dos queratinócitos.
  - De acordo com os marcadores PCNA, p53, ki67 e AgNOr a *Candida sp* não interferiu na atividade proliferativa celular ou risco de malignização dos queratinócitos das leucoplasias estudadas.
-

---

## Referências

AGARWAL, S. et al. MDM2/p53 co-expression in oral premalignant and malignant lesions: potential prognostic implications. *Oral Oncol*, v. 35, n. 2, p.209-16, 1999.

ARAÚJO, N. S.; ARAÚJO, V. C. Anatomia patológica nas lesões pré-neoplásicas. In : PARISE JUNIOR, O. Câncer de boca: aspectos básicos e terapêuticos. São Paulo: Sarvier, 2000, Cap. 9, p.63-70.

AXÉLL, T. et al. International seminar on oral leukoplakia and associated lesions related to tobacco habits: *Community Dent. Oral Epidemiol.*, v.12, n.3, p.145-54, 1984.

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.

BABU, K. A.; VERMA, R. S. Structural and functional aspects of nucleolar organizer regions (NORs) of human chromosomes. *Int Rev Cytol*, v.94, p. 151-76, 1985.

BLATCHFORD, N. R. Treatment of oral candidosis with itraconazole: a review. *J Am Acad Dermatol.*, v. 23, n. 3, p. 565-7, 1990.

BÁNÓCZY, J. Cytological study of the keratinization pattern in oral leukoplakia. *J. Dent. Res.*, v.50, n.6, p.1562-6, 1971.

---

---

BÁNÓCZY, J. Follow-up studies in oral leukoplakia. *J. Maxillofac. Surg.*, v.5, n.1, p.69-75, 1977.

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.

BÁNÓCZY, J.; CSIBA, A. Occurrence of epithelial dysplasia in oral leukoplakia: Analysis and follow-up study of 12 cases. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, v.42, n.6, p.766-74, 1971.

BÁNÓCZY, J.; SUGÁR, L. Longitudinal studies in oral leukoplakias. *J. Oral Pathol.*, v.1, n.6, p.265-72, 1972.

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.

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.

BARONCELLI, G.; QUESTA, L. Il problema terapeutico delle leucoplasie del cavo orale. *Rev. Ital. Stomat.*, v.20, n.10, p.1290-1306, 1965.

BARTEK J.; VOJTESEK B.; LANE D. P. Diversity of human p53 mutants revealed by complex formation to SV40 T antigen. *Eur J Cancer.*, v. 29A, n. 1, p. 101-7, 1992.

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.

---

---

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.

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.

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.

BRASSAT, D. et al. In vitro inhibition of adhesion of *Candida albicans* clinical isolates to human buccal epithelial cells by Fuc alpha 1-2Gal beta-bearing complex carbohydrates. *Infect Immun.*, v. 59, n. 5, p. 1605-13, 1991

BRAVO, R. et al. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase – delta. *Nature*, v.326, n.6112, p.515-7, 1987.

BRAVO, R.; MACDONALD-BRAVO H. Existence of two populations of cyclin/proliferating cell nuclear antigen during the cell cycle: association with DNA replication sites. *J Cell Biol.*, v. 105, n. 4, p. 1549-54, 1987.

BROWN D. C.; GATTER K. C. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology.*, v. 17, n. 6 p. 489-503, 1990.

BUDTZ-JORGENSEN, E. Histopathology, immunology, and serology of oral yeast infections. Diagnosis of oral candidosis. *Acta Odontol Scand.*, v. 48, n. 1, p 37-43, 1990.

---

---

CABRINI R. L. et al. Morphometric study of nucleolar organizer regions in human oral normal mucosa, papilloma and squamous cell carcinoma.

*J Oral Pathol Med.*, v. 6, n. 21, p. 275-9, 1992.

CASTLE, J. T. et al. P53 and cyclin D1 staining patterns of malignant and premalignant oral lesions in age-dependent populations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*, v. 88, n. 3, p. 326-32, 1999.

CAWSON, R. A. Chronic oral candidiasis and leukoplakia. *Oral Surg. Oral Med. Oral Pathol.*, v.22, n.5, p.582-91, 1966.

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.

CHANG, F. et al. Tumourigenesis associated with the p53 tumour suppressor gene. *Br J Cancer*, v. 68, n. 4, p.653-61, 1993.

CHANG, K. W. et al. Association of aberrant p53 and p21(WAF1) immunoreactivity with the outcome of oral verrucous leukoplakia in Taiwan. *J Oral Pathol Med.*, v. 29, n. 2, p. 56-62, 2000.

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.

COOPER, M. P. et al. A panel of biomarkers of carcinomarkers of carcinogenesis of the upper aerodigestive tract as

---

---

potential intermediate endpoints in chemoprevention trials. *Cancer*, n. 71, p. 825-30, 1993.

CROCKER, J.; SKILBEC N. Nucleolar organiser region associated proteins in cutaneous melanotic lesions: a quantitative study. *J Clin Pathol.*, v. 40, n. 8, p. 885-9, 1987.

CRUCHLEY A.T. et al. Bromodeoxyuridine incorporation and Ki 67 expression in oral hairy leukoplakia. *Oral Dis.*, v. 4, n 1, p. 9-15, 1998.

CRUZ, I. B. et al. p53 expression above the basal cell layer in oral mucosa is an early event of malignant transformation and has predictive value for developing oral squamous cell carcinoma. *J. Pathol.*, v.184, n.4, p.360-8, 1998.

DERENZINI, M. et al. Nucleolar function and size in cancer cells. *Am J Pathol.*, v. 152, n. 5, p. 1291-7, 1998.

DERENZINI, M. The AgNORs. *Micron.*, v. 31, n. 2, p. 117-20, 2000.

DONOFRIO V, et al. Prognostic evaluation of HPV-associated precancerous and microinvasive carcinoma of the oral cavity: combined use of nucleolar organiser regions (AgNOR) and proliferating cell nuclear antigen (PCNA). *Eur J Cancer B Oral Oncol.*, v. 31B, n. 3, p. 174-80, 1995.

DOUGLAS L.J. Surface composition and adhesion of *Candida albicans*. *Biochem Soc Trans.*, v. 13, n. 6, p. 982-4, 1985.

EGAN, M.; RAMSDEN, K.; CROCKER, J. Diagnostic significance of mean numbers of nucleolar organizer regions in benign

---

---

and malignant transitional tumors of nose. *Histopathology.*, v. 13, n. 5, p. 579-81, 1988.

EL-DEIRY, W. S. et al. WAF1/CIP1 is induced in p53-mediated G1 arrest and apoptosis. *Cancer Res.*, v. 54, n.5, p. 1169-74, 1994.

ELLEPOLA, A. N.; PANAGODA, G. J.; SAMARANAYAKE, L. P. Adhesión of oral *candida* species to human buccal epithelial cells following brief exposure to nystatin. *Oral Microbiol Immunol.*, v. 14, n. 6, p. 358-63, 1999.

EPSTEIN J.B.; POLSKY, B. Oropharyngeal candidiasis: a review of its clinical spectrum and current therapies. *Clin Ther.*, v. 20, n. 1; p. 40-57, 1998.

FERRETTI, G. A. et al. Chlorhexidine for prophylaxis against oral infections and associated complications in patients receiving bone marrow transplants. *J Am Dent Assoc.*, v. 114, n. 4, p. 461-7, 1987.

FISCHMAN, S. T. et al. Correlative clinico-pathological evaluation of oral premalignancy. *J. Oral Pathol.*, v.11, n.4, p.283-9, 1982.

FRANKLIN, C.D.; MARTIN M.V. The effects of *Candida albicans* on turpentine-induced hyperplasia of hamster cheek pouch epithelium. *J Med Vet Mycol.*, v.24, n. 4, p.281-7, 1986.

FRITSCHKE, M.; HAESSLER, C.; BRANDNER, G. Induction of nuclear accumulation of the tumor-suppressor protein p53 by DNA-damaging agents. *Oncogene.*, v. 2, n. 28, p. 307-18.,1993.

GARRIDO M. C. et al. Monoclonal antibody: new reagent for studying cell proliferation. *J Clin Pathol.*, v. 45, n. 10, p 860-5, 1992.

---

---

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.

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.

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.

GOPALAKRISHNAN, R. et al. Mutated and wild-type p53 expression and HPV integration in proliferative verrucous leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.*, v. 83, n. 4, p. 471-7, 1997.

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.

GRINSPAN, D. Enfermedades propias de las mucosas  
In:\_\_\_\_\_ *Enfermedades de la boca: semiología, patología, clínica y terapéutica de la mucosa bucal*. Buenos Aires: Mundi,1973. p.1465-517.

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.

---

---

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.

HAZEN, K. C. et al. Differential adherence of hydrophobic and hydrophilic *Candida albicans* yeast cells to mouse tissues. *Infect Immun.*, v. 59, n. 3, p. 907-12, 1991.

HOBBAEK, A. Leukoplakia oris. *Acta. Odontol. Scand.*, v.7, p.61-91, 1946/1947.

HOLLSTEIN, M. C. et al. Genetic analysis of human esophageal tumors from two high incidence geographic areas: frequent p53 base substitutions and absence of ras mutations. *Cancer Res.*, v. 51, n. 15, p. 4102-6, 1991.

HSIA, M. T.; KREAMER, B. L.; DOLARA, P. Rapid and simple method to quantitate chemically induced unscheduled DNA synthesis in freshly isolated rat hepatocytes facilitated by DNA retention of membrane filters. *Mutat Res.*, v. 122, n. 2, p. 177-85, 1983.

IGGO, R et al. Increased expression of mutant forms of p53 oncogene in primary lung cancer. *Lancet*, v. 335, n. 8691; p. 675-9, 1990.

IWASSA, M.; et al. Immunohistochemical detection of early-state carcinogenesis of oral leukoplakia by increased DNA-instability and various malignancy markers. *Eur J Histochem*, v.45, n. 4, p. 333-46, 2001.

---

---

JEPSEN, A.; WINTHER, J. E. Mycotic infection in oral leukoplakia. *Acta. Odontol. Scand.*, v.23, p.239-56, 1965.

KAMEL, H. M. H.; KIRK, J. TONER, P. G. Ultrastructural pathology of the nucleus. *Curr.Top. Pathol.*,v.82,p.17-89, 1990.

KANBE, T. et al. Evidence for expression of the C3d receptor of *Candida albicans* in vitro and in vivo obtained by immunofluorescence and immunoelectron microscopy. *Infect Immun.*, v. 59, n. 5, p. 1832-8, 1991.

KANNAN, S. et al. Expression of p53 in leukoplakia and squamous cell carcinoma of the oral mucosa: correlation with expression of Ki67. *J. Clin. Mol. Pathol.*, v.49, n.3, p.170-5, 1996.

KEY, G. et al. Immunobiochemical characterization of the antigen detected by monoclonal antibody IND.64. Evidence that IND.64 reacts with the cell proliferation associated nuclear antigen previously defined by Ki-67. *Virchows Arch B Cell Pathol Incl Mol Pathol.*, v. 4, n. 62, p. 259-62, 1992.

KLOTZ, S. A., SMITH R. L. A fibronectin receptor on *Candida albicans* mediates adherence of the fungus to extracellular matrix. *J Infect Dis.*, v. 3, n. 163, p. 604-10, 1991.

KOBAYASHI, I. et al. The proliferative 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.

---

---

KRAMER I. R. et al. 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.

KROGERUS, L. A.; LEIVONEN, M.; HAASTO A. L Expression patterns of biologic markers in small breast cancers and preneoplastic breast lesions. *Breast*, v. 9, n. 5, p. 281-5, 2000.

KROGH, P.; HALD, B.; HOLMSTRUP, P. Possible mycological etiology of orla mucosal cancer: catalytic potencial of infecting *Candida albicans* and other yeasts in production of N – nitosobenylmethylamine. *Carcinnogenesis*, v. 8, n. 10, p.1543-8,1987.

KOLLAR JUNIOR. H. A. et al. Leukoplakia. *J. Am. Dent. Assoc.*, v.49, n.5, p.538-48, 1954.

KOVESI, G.; SZENDE, B.; Changes in apoptosis and mitotic index, p53 and Ki67 expression in various types of oral leukoplakia. *Oncology*, v. 65, n. 4, p. 331-6, 2003.

KWON-CHUNG, K. J. et al. Genetic evidence for role of extracellular proteinase in virulence of *Candida albicans*. *Infect Immun.*, v. 49, n. 3, p. 571-5, 1985.

LAWALL, M. A. **Expressão do PCNA e p53 em leucoplasias de mucosa jugal com diferentes graus de queratinização ( graus I, II, III de Grinspan)**. 1998.117f. Dissertação (Mestrado)– Faculdade de Odontologia, Universidade Estadual Paulista, Araçatuba,1998.

LANGDON, J.D.; PARTRIDGE M. Expression of the tumor suppressor gene p53 in oral cancer. *Br J Oral Maxillofac Surg.*, v. 30, n.4, p. 214-20, 1992.

---

---

LEHMANN, R. Which form of therapy (insulin therapy or oral antidiabetics) is best for a patient with newly diagnosed type 2 diabetes mellitus? *Schweiz. Rundsch. Med. Prax.*, v. 87, n. 41, p. 1368-9, 1998.

LEMMER, J.; SHEAR, M. Precancerous and cancerous lesions of the mouth. *J. Dent. Assoc. Afr.*, v.23, n.9, p.274-85, 1968.

LEVINE, A.J.; MOMAND, J.; FINLAY, C.A. The p53 tumour suppressor gene. *Nature.*, v. 351, n. 6326, p.453-6.,1991.

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.

LIPPERHEIDE, V. et al. *Candida* biotypes in patients with oral leukoplakia and lichen planus. *Mycopathologia.*, v. 134, n. 2, p. 75-82, 1996.

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.

LO MUZIO, L. et al. Morphometric study of nucleolar organiser regions (AgNOR) in HPV-associated precancerous lesions and microinvasive carcinoma of the oral cavity. *Oral Oncol.*, v.33, n. 4, p. 247-59,1997.

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.

MANDEL, I. D. Antimicrobial mouthrinses: overview and update. *J Am Dent Assoc.*, v. 125 suppl 2, p. 2S-10S, 1994.

---

---

MATHEWS, M. B. et al. Identity of the proliferating cell nuclear antigen and cyclin. *Nature*, v.309, n.5966, p.374-6, 1984.

MATOLCSY, A. et al. Nucleolar organizer regions of megakaryocytes in chronic myeloproliferative disorders *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol.*, v. 420, n. 5, p. 441-5, 1992.

MCCARTHY, P. L., SHKLAR, G. *Diseases of the oral mucosa: diagnosis, management, therapy.* New York: McGraw-Hill, 1964. p.98-113.

MCCORMICK, D.; HALL, P. A. The complexities of proliferating cell nuclear antigen. *Histopathology*, v.21, n.6, p.591-4, 1992.

MCMILLAN M.D.; COWELL, V.M. Effects of chronic *Candida albicans* in the hamster cheek pouch. *Oral Surg Oral Med Oral Patol*, v 74, n. 4, p. 492-8, 1992.

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.

MIYACHI, K.; FRITZLER, M.J.; TAN, E.M. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol.*, v.121, n. 6, p. 2228-34, 1978

MOLL, U. M.; SCHRAMM, L. M. p53: an acrobat in tumorigenesis. *Crit. Rev. Oral Biol. Med.*, v.9, n.1, p.23-37, 1998.

MORAES, R. G. Candidoses superficiais e profundas. In: MORAES R.G., GOULART, E. G. LEITE C. I. *Parasitologia e microbiologia humana*. 4 ed. Rio de Janeiro: Cultura Médica, 2000. p 623-630

---

---

MORRIS, G. F.; MATHEWS, M. B. The adenovirus E1A transforming protein activates the proliferating cell nuclear antigen promoter via an activating transcription factor site. *J Virol.*, v. 65, n. 12, p. 6397-406, 1991.

MOURAD, W.A. et al. Argyrophilic nucleolar organizer regions in breast carcinoma. Correlation with DNA flow cytometry, histopathology, and lymph node status. *Cancer.*, v. 69, n.7, p. 1739-44, 1992

MURAKAMI, M. et al. Immunohistochemical evaluation with Ki-67: an application to salivary gland tumours. *J Laryngol Otol.*, v. 106, n. 1, p. 35-8, 1992.

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.

NEURATH, G.B. et al. Primary and secondary amines in the human environment. *Food Cosmet Toxicol.*, v. 4, n. ;15, p. 275-82, 1977.

NEVILLE, B.W. et al. *Patologia oral & maxilofacial*. 2 ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan S.A., 2004. 715p.

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.

NUNES, F. D. *Leucoplasia bucal: aspectos morfológicos, imunohistoquímicos e histoquímicos*. 83f. Tese (Doutorado em Patologia

---

---

Bucal) – Faculdade de Odontologia, Universidade de São Paulo, São Paulo, 1991

NUNES, F. D. et al. Estudo morfológico de otimização da técnica AgNOR. In: REUNIÃO DA SOCIEDADE BRASILEIRA DE PESQUISAS ODONTOLÓGICAS. 7.1990. São Paulo. Anais. São Paulo SBPQO 1990 p. 31.

OFNER, D. et al. Silver stained nucleolar organizer region proteins (Ag-NORs) as a predictor of prognosis in colonic cancer. *J Pathol.*, v. 192, n. 1, p. 43-9, 1990.

OGDEN, G.R. et al. Overexpression of p53 in normal oral mucosa of oral cancer patients does not necessarily predict further malignant disease. *J Pathol*, v. 182, n. 2, p. 180-4, 1997.

PANDIT, S,; AITHAL, D. A qualitative and quantitative estimation of AgNORS in dysplastic and non-dysplastic leukoplakias. *Indian J Dent Res.*, v 13, n.1, p.27-30, 2002.

PANIZO-SANTOS, A. et al. Predicting metastatic risk of gastrointestinal stromal tumors: role of cell proliferation and cell cycle regulatory proteins. *Int J Surg Pathol.*, v. 8, n. 2, p. 133-44, 2000.

PETTI, S Pooled estimate of world leukoplakia prevalence: a systematic review. *Oral Oncol.* v. 39, n. 8, p. 770-80, 2003.

PIATELLI, A. et. al. Prevalence of p53, bcl-2, and Ki-67 immunoreactivity and apoptosis in normal oral epithelium and premalignant and malignant lesions of the oral cavity. *J Oral Maxillofac Surg*, v. 60, n.5, p.532-40, 2002.

---

---

PIFFKO, J. et al. Standardized AgNOR analysis of the invasive tumour front in oral squamous cell carcinomas. *J Pathol.*, v. 4, n. 182, p. 450-6, 1997.

PINDBORG, J. J. Oral leukoplakia. *Aust. Dent. J.*, v.16, n.2, p.83-93, 1971.

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.

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. Am.. Dent. Assoc.*, v.76, n.4, p.767-71, 1968.

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.

RAY, J. G.; CHATTOPADHYAY, A.; CAPLAN D. J. Usefulness of AgNOR counts in diagnosing epithelial dysplasia *J Oral Pathol Med.* v. 32, n. 2, p. 71-6, 2003.

RALHAN, R. et al. Circulating p53 antibodies as early markers of oral cancer: correlation with p53 alterations. *Clin Cancer Res.*, v. 9, n. 4, p. 2147-52, 1998.

REGEZI, J. A.; SCIUBBA, J. J. *Oral patohology clinical pathology correlations*. 4. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 2004. 475p.

---

---

RINDUM, J. L.; STENDERUP, A.; HOLMSTRUP, P.  
Identification of *Candida* types related to healthy and pathological oral mucosa. *J Oral Pathol Med*, v. 23, n.9, p.406-12, Oct 1994.

RODE, M. E. et al. .Candida chorioamnionitis after serial therapeutic amniocenteses: a possible association. *J Perinatol.*, v. 5, n. 20, p. 335-7, 2000.

SANGUINETI, A.; CARMICHAEL, J.K.; CAMPBELL, K.  
Fluconazole-resistant *Candida albicans* after long-term suppressive therapy. *Arch Intern Med.*, v. 153, n.9, p. 1122-4. 1993.

SANO K. et al. Prognostic implication of silver-binding nucleolar organizer regions (AgNORs) in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.*, v. 20, n. 2, p. 53-6, 1991.

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.

SASAKI, K. et al. The cell cycle associated change of the Ki-67 reactive nuclear antigen expression. *J Cell Physiol.*, v. 133, n. 3, p. 579-84, 1987.

SCHWINT, A. E. et al. Nucleolar organizer regions in lining epithelium adjacent to squamous cell carcinoma of human oral mucosa. *Cancer*, v. 73, n. 1, p. 2674-9,1994.

SCHUMAN, P. et al. Weekly fluconazole for the prevention of mucosal candidiasis in women with HIV infection. A randomized, double-blind, placebo-controlled trial. Terry Bein Community Programs

---

---

for Clinical Research on AIDS. *Ann Intern Med.*, v. 126, n. 9, p. 689-96, 1997.

SCULLY, C.; BURKHARDT, A. Tissue markers of potentially malignant human oral epithelial lesions. *J Oral Pathol Med.*, v. 22, n. 6, p. 246-56, 1993.

SHAFER, W. G.; HINE, M.; LEVY, B. *Tratado de patologia bucal*. 2.ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan, 1985. p.80-212.

SHIRA, R, B. Diagnosis of common lesions of the oral cavity. *Anesth Hosp. Dent. Serv.*, v.15, n.2, p.95-119, 1957.

SILVERMAN JUNIOR., S. Observations on the clinical characteristics and natural history of oral leukoplakia. *J. Am. Dent. Assoc.*, v.76, n.4, p.772-7, 1968.

SILVERMAN, 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.

SLOOTWEG, P.J. et al. Lymphocytes at tumor margins in patients with head and neck cancer. Relationship with tumor size, human lymphocyte antigen molecules, and metastasis. *Int J Oral Maxillofac Surg.*, v. 23, n. 5, p. 286-9,1994.

SLUTSKY, B.; BUFFO, J.; SOLL, D.R. High-frequency switching of colony morphology in *Candida albicans*. *Science.*,v. 230, n. 4726, p. 666-9. 1985.

SOBEL J.D.; MULLER, G.; BUCKLEY, H.R. Critical role of germ tube formation in the pathogenesis of candidal vaginitis. *Infect Immun.*, v. 44, n.3, p. 576-80, 1984.

---

---

STURGIS, S. H., LUND, C. C. Leukoplakia buccalis and keratosis labialis. *N. Engl. J. Med.*, v. 210, p.996-1006, 1934.

SULKOWSKA, M. et al. Evaluation of p 53 and bcl-2 oncoprotein expression in precancerous lesions of the oral cavity. *Neoplasma*, v. 48, n. 2, p. 94-8, 2001.

SZENDE, B. et al. Romics I. Apoptosis in prostate carcinomas after short-term treatment with decapeptyl. *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, v. 1010, p. 784-8, 2003.

TAN, C.K. et al. Autoantibody to the proliferating cell nuclear antigen neutralizes the activity of the auxiliary protein for DNA polymerase delta. *Nucleic Acids Res.*, v. 15, n. 22, p. 9299-308, 1987.

TAVARES, M.R. Lesões pré-neoplásicas ou cancerizáveis. In : PARISE JUNIOR, O. Câncer de boca: aspectos básicos e terapêuticos. São Paulo: Sarvier, 2000, Cap. 8, p.57-62.

TETE, S. et al. [Bcl-2, p53, Ki-67 and apoptotic index in cancerous and precancerous lesions of the oral mucosa. *Minerva Stomatol.*, v. 9, n. 48, p. 419-25, 1999.

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.

TUCCI, R; CRIVELINI, M.M. AgNOR em leucoplasias de mucosa jugal I,II,III de Grispan. *Revista Brasileira de Ciências Odontológicas*. No Prelo.

VAN DER WALL, I. The diagnosis and treatment of precancerous lesions. *FDI World*, v. 4, n. 2, p.6-9, 1995.

---

---

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.

VAN DER WALL, I. et al. Oral leukoplakia: a clinicopathological review. *Oral Oncol.*, v.33, n.5, p.291-301, 1997.

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.

XIE, X. et al. Prognostic significance of nucleolar organizer regions in adenoid cystic carcinomas of the head and neck. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*, v. 123, n. 6, p. 615-20, 1997.

YOUNG, W. et al. Trials of oral streptomycin for infants with nonspecific gastroenteritis. II. Trials at the Queen Elizabeth Hospital, Hackney. *Br. Med. J.*, v. 4734, n.29, p. 770-4, 1951.

WALDRON, C. A., SHAFER, W. G. Leukoplakia revisited: a clinicopathologic study 3256 oral leukoplakias. *Cancer*, v.36, n.4, p.1386-92, 1975.

WALKER, R.A. The histopathological evaluation of nucleolar organizer region proteins. *Histopathology.*, v. 12, n. 2, p. 221-3, 1988.

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.

---

---

WILLIAMS, D. W. et al. Characterisation of the inflammatory cell infiltrate in chronic hyperplastic candidosis of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med*, v. 26, n.2, p.83-9, 1997.

WOLANSKI, K. D. et al. The use of epithelial membrane antigen and silver-stained nucleolar organizer regions testing in the differential diagnosis of mesothelioma from benign reactive mesothelioses. *Cancer.*, v. 3, n. 82,p. 583-90, 1998.

WRIGHT, B. J. M. A review and update of oral precancerous lesions. *Tex. Dent. J.*, v.115, n. 6 ,p.15-9, 1998.

ZACZEK, M. et al. Identification and assessment of nucleolar organizer regions (NORs)-technical problems. *Pol. J. Pathol.*, v. 45, n. 1, p. 35-8, 1994.

ZOELLER, J. et al., Evaluation of AgNOR and Ki-67 antigen as cell kinetic parameters in oral dysplasias and carcinomas. *Anal. Cell. Pathol.*, v. 7, n. 1, p. 77-88. 1994.

---