

ADRIELE FERREIRA GOUVÊA

**ANÁLISE DA EXPRESSÃO DE Ki-67, P53, MCM 2 e MCM 5 EM LEUCOPLASIA
VERRUCOSA PROLIFERATIVA**

Dissertação apresentada à
Faculdade de Odontologia de
Piracicaba, da Universidade
Estadual de Campinas, para
obtenção do título de mestre em
Estomatopatologia, área de
concentração em Patologia.

Orientador: Prof. Dr. Márcio
Ajudarte Lopes

PIRACICABA

2008

**FICHA CATALOGRÁFICA ELABORADA PELA
BIBLIOTECA DA FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA**

Bibliotecário: Marilene Girello – CRB-8ª. / 6159

G745a Gouvêa, Adriele Ferreira.
Análise da expressão de ki-67, p53, mcm2 e mcm5 em leucoplasia verrucosa proliferativa. / Adriele Ferreira Gouvêa. -- Piracicaba, SP : [s.n.], 2008.

Orientador: Márcio Ajudarte Lopes.
Dissertação (Mestrado) – Universidade Estadual de Campinas, Faculdade de Odontologia de Piracicaba.

1. Imunohistoquímica. 2. Proliferação celular. I. Lopes, Márcio Ajudarte. II. Universidade Estadual de Campinas. Faculdade de Odontologia de Piracicaba. III. Título.

(mg/fop)

Título em Inglês: Analysis of ki-67, p53, mcm2 and mcm5 expression in oral proliferative verrucous leukoplakia

Palavras-chave em Inglês (Keywords): 1. Immunohistochemistry. 2. Cell proliferation

Área de Concentração: Patologia

Título: Mestre em Estomatopatologia

Banca Examinadora: Cléverton Roberto de Andrade, Pablo Augustin Vargas, Márcio Ajudarte Lopes

Data da Defesa: 27-02-2008

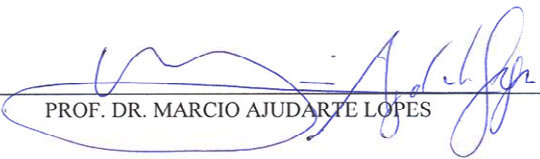
Programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia



UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA



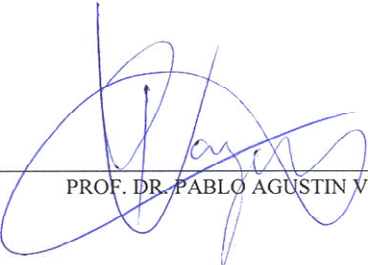
A Comissão Julgadora dos trabalhos de Defesa de Dissertação de MESTRADO, em sessão pública realizada em 27 de Fevereiro de 2008, considerou a candidata ADRIELE FERREIRA GOUVÊA aprovada.



PROF. DR. MARCIO AJUDARTE LOPES



PROF. DR. CLEVERTON ROBERTO DE ANDRADE



PROF. DR. PABLO AGUSTIN VARGAS

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho a meus pais, **Helvécio** e **Sônia Gouvêa**, exemplos de abnegação, dedicação, integridade e, acima de tudo, temor a Deus. A confiança e apoio incondicionais de vocês tornaram tudo isto possível.

AGRADECIMENTOS ESPECIAIS

Agradeço a **Deus**, que sempre me fortaleceu quando já não mais força havia. Sempre me susteve e proveu, milagrosamente, mesmo não sendo eu merecedora.

A **Rúben** pela torcida e carinho, sempre.

A **Jônatas**, pelo amor, pela vibração nas conquistas e, principalmente, pelo amparo nos momentos atribulados.

A minha família: **avós, tios e primos**. Obrigada pelo incentivo.

Ao Prof. Dr. **Márcio Ajudarte Lopes** pelos conselhos, ensinamentos e respeito. Sobretudo pelo exemplo de honestidade e dedicação ao trabalho e à família.

AGRADECIMENTOS

À Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, na pessoa de seu diretor, **Prof. Dr. Francisco Haiter Neto**.

Ao coordenador geral da Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas, **Prof. Dr. Mário Alexandre Coelho Sinhoreti**.

Ao **Prof. Dr. Jacks Jorge Junior**, coordenador do programa de Pós-Graduação em Estomatopatologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas. Muito obrigada pelo modelo de paciência em momentos atribulados. Obrigada, também, pela liberdade de escolhas e pelas várias discussões filosóficas e científicas.

À **CAPES**, Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa de estudos.

Ao **Prof. Dr. Oslei Paes de Almeida** pelo exemplo de total envolvimento na busca do conhecimento.

Ao **Prof. Dr. Edgard Graner**, por me escutar e aconselhar em alguns momentos de indecisão. Sua dedicação, objetividade e humildade são louváveis.

Aos demais professores das áreas de Patologia e Semiologia da Faculdade de Odontologia de Piracicaba da Universidade Estadual de Campinas: **Prof. Dr. Oswaldo Di Hipólito Júnior, Prof. Dr. Pablo Agustín Vargas e Prof. Dr. Ricardo Della Coletta**. Obrigada pelo carinho, conhecimentos e atenção a mim dispensados desde a graduação.

Aos grandes amigos feitos durante toda a vida. Os deixados em Manaus: **Luisa Feijó, Luciana Leite, Marcelo Mota, Shymmene Cardoso**; os espalhados pelo mundo: **Tânia Rocha, Telma Rocha, Noemi Oliveira, Paulo César Ferreira, Raquel Freire, Talita Ishy**; os mineiros: **Juliana Nicoletti, Juliana Pinheiro, Luiz Carlos, Rosana Freitas, Samira Guidi**; os conquistados em Piracicaba: **Cristina Gibilini, Evelyn Fariña, Graziele, Julia Luna, Juliana Whately, Gustavo Vitti, Laura Tomita, Leatrice Palieraqui, Maira Fujita, Paula Palermo**. Todos foram formidáveis em diferentes épocas.

À amiga e companheira **Carolina Bitu**, por compartilhar conhecimentos tão variados com tamanha maestria, pelo apoio, pelas gargalhadas e agonias divididas. Você é um exemplo de dedicação e paciência para mim.

À querida **Rebeca de Sousa Azevedo**, superlativa, intensa em tudo. Sua amizade, incentivo, apoio, dicas e exemplo foram imprescindíveis nesse caminho. Muito obrigada.

À amiga **Lucielma Salmito**, pelos conselhos e pelos momentos compartilhados de maneira tão especial.

Ao **Jorge Esquiche León** pelo carinho, incentivo e exemplo de dedicação e generosidade.

A **Mario José Romañach Gonzalez Sobrinho**. Amigo e companheiro de descobertas.

Aos demais amigos da pós-graduação, pelos conhecimentos e alegrias divididos: **Ademar Takahama Junior, Alan Roger dos Santos Silva, Ana Terezinha Marques Mesquita, Andréia Aparecida da Silva, Débora Campanella Bastos, Erica Furquim Soledade Neves Silva, Fabiana Seguin,**

Fernanda Gonçalves Basso, Fernanda Viviane Mariano, Guillermo Martinez Matta, Laís Sobral, Lília Alves Rocha, Lívia Maris Ribeiro Paranaíba, Luiz Alcino Monteiro Gueiros, Marcelo Rodrigues, Marco Antonio Carvalho, Maria Fernanda de Souza Setúbal Destro, Michelle Agostini, Michele Gasser Kellermann, Patrícia Gemma Strappa Abrahão, Victor Hugo Toral Rizo.

Aos funcionários e companheiros do Laboratório de Patologia e do Orocentro da FOP/UNICAMP, **Adriano, Bete, Cida, Débora, Dinha, Ellen, João, Lúcia, Rogério, Rosa, Valéria, Valéria Totti** pelo auxílio e apoio nestes dois anos, e em especial à **Ana Cristina do Amaral Godoy**, amada, pelo trabalho incessante e pelo apoio.

A todos que, de alguma forma, contribuíram para a realização deste trabalho.

“Somos o que fazemos, mas somos, principalmente, aquilo que fazemos para mudar o que somos.”

Eduardo Galeano

RESUMO

Leucoplasia verrucosa proliferativa é uma forma agressiva de leucoplasia oral, que afeta mais mulheres acima de 60 anos, sem história de etilismo e tabagismo. Tem apresentação clínica multifocal, mostra recorrência e sempre desenvolve displasia epitelial e carcinoma espinocelular (CEC). O objetivo deste trabalho foi avaliar os achados clínico-patológicos e a expressão imunohistoquímica de ki-67, p53, Mcm2 e Mcm5, na tentativa de elucidar o comportamento biológico distinto desta condição. Os dados clínico-patológicos de 12 pacientes foram revisados. Todos eram mulheres, acima de 50 anos (50% acima de 70 anos), 91,7% eram não fumantes e nenhuma etilista habitual. Os casos acompanhados por mais tempo mostraram aspectos clínicos compatíveis com lesões iniciais com presença de hiperqueratose e acantose, desenvolvimento de diferentes graus de displasia e CEC. Os locais mais acometidos foram rebordo alveolar (66,6%), língua (50%) e mucosa jugal (41,6%). Quatro pacientes desenvolveram CEC. Os achados imunohistoquímicos mostraram expressões variáveis em cada marcador. As áreas epiteliais sem displasia mostraram imunopositividade fraca para p53 e ki-67 e moderada para Mcm2 e Mcm5; os casos de displasia leve tiveram expressão fraca de p53, moderada de ki-67 e Mcm5 e forte de Mcm2; displasia moderada exibiu marcação fraca de Mcm5 e de p53 e Mcm2, além de expressão moderada de ki-67; CEC mostrou expressão fraca de Mcm5, moderada de Mcm2 e forte de ki-67 e p53. Não foi observado, na maioria dos casos, um padrão regular de aumento de marcação imunohistoquímica conforme avanço do grau de displasia epitelial. A expressão de ki-67, Mcm2 e Mcm5 mostrou-se variada, com casos de displasias leves apresentando forte imunopositividade.

Palavras-chave: Ki-67; p53; Mcm2; Mcm5; Leucoplasia verrucosa proliferativa.

ABSTRACT

Proliferative verrucous leukoplakia (PVL) is an aggressive form of oral leukoplakia that affects particularly women over 60 years of age, without tobacco and alcohol intake history. Has multifocal presentation, presents recurrences and always develops epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma (SCC). The aim of this study was to evaluate the clinico-pathological findings and the ki-67, p53, Mcm2 and Mcm5 immunohistochemical expression, in order to elucidate the distinct biologic behavior of this condition. The clinico-pathological data of 12 patients were reviewed. All were women, above 50 years (50% above 70 years of age), 91.7% were non smoker and 100% were non-drinker. The cases with longer follow-up showed clinical aspects compatible with initial lesions presenting hyperkeratosis and acantosis, development of different grade of epithelial dysplasia and SCC. Alveolar ridge (66,6%), tongue (50%) and buccal mucosa (41,6%) were the most affected sites. Four patients developed SCC. The immunohistochemical findings showed variable expression for each antibody. Areas without epithelial dysplasia showed weak positivity to p53 and ki-67 and moderate to Mcm2 and Mcm5. Mild dysplasia cases showed weak positivity to p53, moderate to ki-67 and Mcm5 and strong to Mcm2; moderate dysplasia exhibited weak p53, Mcm2 and Mcm5 expression and moderated ki-67 immunopositivity; SCC showed weak Mcm5 positivity, moderate expression of Mcm2 and strong immunopositivity of ki-67 and p53. The majority of the cases did not show a regular pattern of increasing immunohistochemical expression according to higher grades of epithelial dysplasia. Ki-67, Mcm2 and Mcm5 showed variable immunopositivity, with some mild dysplasia cases presenting strong expression.

Key words: Ki-67; p53; Mcm2; Mcm5; Proliferative verrucous leukoplakia.

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DA LITERATURA	3
2.1. EPIDEMIOLOGIA	3
2.1.1. Incidência e prevalência	3
2.1.2. Idade e gênero	4
2.2. ETIOLOGIA	5
2.2.1. Fumo	5
2.2.2. Bebidas alcoólicas	5
2.2.3. Betel	6
2.2.4. <i>Candida albicans</i> e Papilomavirus Humano (HPV)	7
2.2.5. Sanguinarina	9
2.2.6. Nutrição	9
2.3. ASPECTOS CLÍNICOS	10
2.4. ASPECTOS HISTOPATOLÓGICOS	11
2.5. DIAGNÓSTICO DIFERENCIAL	13
2.6. TRANSFORMAÇÃO MALIGNA	15
2.6.1. p53	18
2.6.2. ki-67	20
2.6.3. Mcm2 e Mcm5	22
2.7. TRATAMENTO	24
3. PROPOSIÇÃO	29
4. MATERIAIS E MÉTODOS	31
4.1. FONTES DE OBTENÇÃO DO MATERIAL DA PESQUISA E SELEÇÃO DA AMOSTRA	31
4.2. ANÁLISE HISTOPATOLÓGICA	31
4.3. ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA	33
5. RESULTADOS	39
5.1. CARACTERÍSTICAS SÓCIO-DEMOGRÁFICAS E CLÍNICAS	39
5.2. CARACTERÍSTICAS HISTOPATOLÓGICAS	56
5.3. ANÁLISE IMUNOHISTOQUÍMICA	63
6. DISCUSSÃO	76
7. CONCLUSÕES	86
REFERÊNCIAS	87
ANEXOS	139

1. INTRODUÇÃO

A Organização Mundial de Saúde (OMS), em 1978, definiu leucoplasia oral como “placa ou mancha branca que não pode ser caracterizada clínica ou histologicamente como qualquer outra doença” e a incluiu no grupo de lesões com potencial de malignização. Axéll T *et al.*, em 1996, corroboraram esta definição ao dizer que leucoplasia oral é “lesão predominantemente branca da mucosa oral, que não pode ser caracterizada como nenhuma outra lesão” e que “algumas leucoplasias se transformam em câncer”.

Hansen *et al.*, descreveram, em 1985, LVP como uma forma distinta de leucoplasia, que apresentava aparência verrucosa e exofítica, com altos índices de transformação maligna e achados histopatológicos progressivos em biópsias seqüenciais - de hiperqueratose, diferentes graus de displasia a carcinoma verrucoso e CEC, fatos confirmados por outros autores (Murrah & Batsakis, 1994; Silverman & Gorsky, 1997; Batsakis *et al.*, 1999; Epstein *et al.*, 2007). A OMS, em 2005, caracterizou LVP como um subtipo raro de leucoplasia oral que possui etiologia desconhecida, acomete principalmente mulheres – proporção homens:mulheres igual a 1:4, com idade média de 62 anos, apresenta alto risco de malignização e cujo diagnóstico deve ser feito através de associação das características clínicas e histopatológicas, as quais mostram evidência de displasia progressiva (Barnes *et al.*, 2005). LVP afeta múltiplos locais da mucosa oral, apresenta resistência a qualquer forma de tratamento e altos índices de recorrência (Hansen *et al.*, 1985; Murrah & Batsakis, 1994; Silverman & Gorsky, 1997; Batsakis, 1999; Lopes *et al.*, 2000; Barnes *et al.*, 2005; Epstein *et al.*, 2007).

Vários estudos vêm sendo feitos para se determinar se a expressão alterada de proteínas como Ki-67, PCNA, TGF- α , p21, erB-2, erB-1, p57, hsp 60, ciclina D1, p53, Mcm2 e perda de heterozigotidade poderiam estar envolvidas no processo de alteração epitelial (epitélio normal - displásico – CEC) presente nas leucoplasias orais (Kannan *et al.*, 1996; Chang *et al.*, 2000; Liu & Klein-Szanto,

2000; Jiang *et al.*, 2001; Epstein *et al.*, 2003; Fan *et al.*, 2006; Szelachowska *et al.*, 2006).

A despeito destes achados da literatura, existem poucos estudos relativos a marcadores de proliferação tumoral em LVP e nenhum correlacionando Mcm2, Mcm5, maspin, ki-67 e p53 com os aspectos clínico-patológicos das leucoplasias verrucosas proliferativas. Assim sendo, é reforçada a importância de se realizar outros estudos, na tentativa de elucidar o comportamento biológico distinto desta condição e o possível valor prognóstico destes marcadores.

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1. Epidemiologia

2.1.1. Incidência e prevalência

A incidência e a prevalência de leucoplasia oral variam de acordo com a população estudada e seus hábitos. A maioria dos estudos mostra prevalência que varia entre 1 e 5% (Pindborg *et al.*, 1968; Lay *et al.*, 1982; Bouquot & Gorlin, 1986; Reichart *et al.*, 1987). Entretanto, alguns estudos mostram resultados distintos: em uma população sueca adulta a prevalência foi de 3,6% (Axéll *et al.*, 1976), na Hungria Bánóczy & Sugar (1972) encontraram prevalência variando entre 0,6 e 3,6%. Na Índia, Mehta *et al.*, em 1972, encontraram prevalência que variou entre 0,2% e 4,9% e Silverman *et al.* (1976), também em população indiana, relataram prevalência de 9.6% em grupos mais jovens (entre 35 e 39 anos) e 14,6% em grupos com idades acima de 65 anos. Os relatos de incidência anual de leucoplasia oral na maioria dos estudos em não fumantes foi de 0,6, em fumantes, em usuários de outras formas de tabaco foi igual a 8,9 e em pacientes usuários de betel foi de 1,3 por 100.000 pacientes (Pindborg *et al.*, 1968; Lay *et al.*, 1982; Bouquot & Gorlin, 1986; Reichart *et al.*, 1987). Gupta *et al.* (1980), realizaram estudo prospectivo com 10 anos de acompanhamento, em amostra randomizada, em diferentes locais da Índia e com diferentes formas de consumo de tabaco. Encontraram incidência anual de leucoplasia oral igual a 1.1 - 2.4 por 1.000 homens e 0.2 – 0.03 entre 1.000 mulheres.

Com relação à LVP, sabe-se que acomete mais mulheres, numa proporção homem:mulher igual a 1:4 (Barnes *et al.*, 2005). No entanto, não existem trabalhos com amostra populacional suficientemente grande para que haja um número estabelecido de incidência e de prevalência.

2.1.2. Idade e gênero

Leucoplasia é condição que apresenta ocorrência após os 30 anos de idade (Waldrom *et al.*, 1975), havendo aumento da prevalência com o aumento da idade, especialmente para o gênero masculino (Zakrzewska *et al.*, 1996; Regezi & Sciuba, 1999). A distribuição de lesões entre os gêneros muda entre os estudos de acordo com as diferenças ambientais e, principalmente, de acordo com hábitos orais de cada população, como fumar, mascar tabaco e betel (Jang-Jaer *et al.*, 2006). Se existem esses costumes, todos associados ou em diferentes combinações, a proporção entre homens:mulheres pode chegar a 1:1 (van der Waal *et al.*, 1997). Em outras regiões, onde esses hábitos combinados não existem, a proporção homem:mulher geralmente é igual a 2:1 (Neville *et al.*, 2004).

Quase todos os estudos realizados em pacientes portadores de LVP mostram que essa condição acomete principalmente mulheres, com idades de diagnóstico variando entre 62 e 80 anos, (Hansen *et al.*, 1985; Zakrzewska *et al.*, 1996; Silverman & Gorsky, 1997; Fettig *et al.*, 2000; Bagan *et al.*, 2003). A OMS relata que mulheres são mais acometidas, com proporção homem:mulher igual a 1:4, e 62 anos como idade média de diagnóstico (Barnes *et al.*, 2005).

Tabela 01 - Estudos publicados descrevendo casos de LVP, distribuição entre os gêneros e idades de diagnóstico.

Autores	Ano	Pacientes	Gênero	Idade de diagnóstico	Número de fumantes
				(anos)	
Hansen <i>et al.</i>	1985	30	6 H, 24 M	66	7
Zakrzewska <i>et al.</i>	1996	10	5 H, 5 M	64	3
Silverman & Gorsky	1997	54	11 H, 43 M	62	17
Fettig <i>et al.</i>	2000	10	6 H, 4 M	65	5
Bagan <i>et al.</i>	2003	30	6 H, 24 M	71	18
Morton <i>et al.</i>	2007	3	1 H, 2 M	80	-
Klanrit <i>et al.</i>	2007	6	1H, 5 M	65.8	1

H: homens, M: mulheres.

2.2. Etiologia

2.2.1. Fumo

O uso de tabaco parece ter correlação com o desenvolvimento de leucoplasias. Bánóczy *et al.*, em estudo longitudinal realizado em 2001, mostraram claramente associação do tabaco com o desenvolvimento de lesões leucoplásicas. Hogewind *et al.*, em 1988, relataram que 64% das leucoplasias orais estavam associadas ao hábito tabagista, dado confirmado por Freitas *et al.* e Chen *et al.*, em 2006, que encontraram prevalência ainda maior do uso do tabaco entre pacientes com leucoplasias (84,4%). Já foi demonstrado que há relação entre quantidade de cigarros consumidos por dia e risco de aparecimento de leucoplasias (Røed Petersen, 1982), e existem relatos de remissão das leucoplasias orais após descontinuação do hábito tabagista (Røed Petersen, 1982; Bánóczy *et al.*, 1991; Gupta *et al.*, 1995).

LVP, segundo vários autores, não tem associação com uso de tabaco (Eversole, 1997; Barnes *et al.*, 2005; Cabay *et al.*, 2007). Entretanto, quase todos os estudos encontrados na literatura relatam que uma parte dos pacientes fazia uso de fumo - associado ou não a betel (Hansen *et al.*, 1985; Murrah & Batsakis, 1994; Zakrzewska *et al.*, 1996; Silverman & Gorsky, 1997; Fettig *et al.*, 2000; Bagan *et al.*, 2003; Morton *et al.*, 2007).

2.2.2. Bebidas alcoólicas

Embora o consumo de tabaco em suas variadas formas seja o principal agente etiológico das leucoplasias orais, consumo de bebidas alcoólicas também parece ter um papel importante neste processo. A formação de metabólitos tóxicos do etanol, interferência nos mecanismos de reparo do DNA e aumento da permeabilidade celular, que permite entrada de agentes carcinógenos – como os

existentes no tabaco - sugere que o efeito sinérgico entre consumo de álcool e tabaco seja o pivô do desenvolvimento de leucoplasias orais (Øgden *et al.*, 1998; Øgden, 2005). Hashibe *et al.* (2000) afirmaram, entretanto, que há associação entre consumo de álcool e leucoplasias orais em pacientes não fumantes e não usuários de qualquer forma de tabaco. O desenvolvimento de lesões com potencial de malignização depende da quantidade e da composição da bebida ingerida. Algumas bebidas, como o vinho tinto, contêm polifenóis, que apresentam alto poder antioxidante. No entanto, outros tipos de bebidas alcoólicas, como destilados, possuem, em suas composições componentes carcinogênicos como nitrosaminas, aflatoxinas, arsênico, asbestos, benzopirenos e acetaldeído que podem ter efeito carcinogênico direto sobre as células da mucosa, causando dano ao DNA (IARC, 1999; Hashibe *et al.*, 2000; Petti & Scully 2006). Além disso, Blot (1992) afirmou que o álcool pode contribuir para diminuição da ingestão e absorção de nutrientes presentes nos vegetais e frutas, importantes no controle do desenvolvimento de câncer e no processo de imunossupressão.

Com relação à LVP, é importante ressaltar que esta condição acomete prevalentemente mulheres de meia idade sem história de ingestão de álcool (Eversole, 1997; Barnes *et al.*, 2005).

2.2.3. Betel

Betel, combinação de sementes de areca, folha de betel, hidróxido de cálcio e tabaco, é outro fator etiológico de leucoplasia oral. O hábito de mascar betel é prevalente em populações de Taiwan, Índia, Papua Nova Guiné, África do Sul e países do sudeste asiático. Estima-se que aproximadamente 600 milhões de pessoas mascam betel em todo o mundo (IARC, 1985; Thomas *et al.*, 1992; Ko *et al.*, 1995; Jeng *et al.*, 2000). Chen *et al.* (2006) encontraram incidência de leucoplasia oral em 69,7% das pessoas que mascavam betel. Jacob *et al.* (2004) relataram que o hábito de mascar betel sem tabaco também levou a um aumento

na prevalência de leucoplasia oral, tanto em homens quanto em mulheres. Afirmaram, ainda, que o risco de desenvolvimento de lesões com potencial de malignização era maior em indivíduos que apenas mascavam tabaco, intermediário em sujeitos que mascavam betel associado a tabaco e menor, mas ainda alto, naqueles que mascavam betel sem tabaco.

2.2.4. *Candida albicans*, Papilomavirus Humano (HPV) e Epstein – Barr vírus (EBV)

Se o conceito adotado é o de que leucoplasias orais são lesões que não podem ser caracterizadas como nenhuma outra com causa conhecida, então se pode afirmar que *candida* está associada à lesão, não induzindo seu aparecimento e transformação displásica (Reibel, 2003). Entretanto, estudos em animais mostraram que *C. albicans* tem um efeito no desenvolvimento de carcinomas (O'Grady & Reade, 1992). Isto fortalece a associação entre *Candida* e leucoplasias não homogêneas, lesões mostrando displasia e maiores índices de transformação maligna em leucoplasias infectadas (Røed-Petersen, 1970; Bánóczy & Sugár, 1972). Barrett *et al.* (1998) observaram associação significativa entre infecção fúngica e leucoplasias com displasia moderada e grave. Além disso, notaram que lesões displásicas infectadas apresentavam tendência três vezes maior de desenvolver displasia epitelial mais grave. Entretanto, fica em aberto, ainda, a questão se *Candida* de fato causa displasia epitelial ou se apenas infecta tecido já alterado.

HPV é uma família de mais de 80 tipos de vírus DNA pequenos, (5nm), sem envelope, icosaédricos, epiteliotrópicos que são transmitidos precocemente na vida. Dividem-se em HPV de baixo risco (6,11,1-5, 7-10, 12-15, 17, 19-30, 32, 34, 36-44, 46-51, 53-57 e 59), envolvidos na patogênese de várias lesões epiteliais, a maioria lesões hiperplásicas; e alto risco (16, 18, 31, 33, 35, 39, 45, 52), com potencial carcinogênico. Apesar de HPV ser encontrado em epitélio

normal a probabilidade de se detectar HPV em lesões com potencial de malignização é 2-3 vezes maior e em carcinomas espinocelulares é 4-5 vezes maior (Nielsen *et al.*, 1996; Teraí *et al.*, 1999; Miller & Johnstone, 2001). O papel do vírus no processo de transformação maligna dos queratinócitos se dá através da ação de dois de seus genes: E6 e E7, que são traduzidos em oncoproteínas que se ligam a p53 e Rb, alterando todo o controle do ciclo celular (Park *et al.*, 1991; Scheffner *et al.*, 1992, Scheffner *et al.*, 1993).

HPV 16 e 18 estão fortemente relacionados a carcinomas de cérvix uterino e anogenitais (Schiffman *et al.*, 1993). E, com relação aos CEC orais, alguns estudos afirmam que estes vírus também têm papel etiológico (Miller *et al.*, 1996; Gopalakrishnan *et al.*, 1997; Miller & Johnstone, 2001, Sugiyama *et al.*, 2003).

A presença de HPV em leucoplasias orais foi descrita em vários trabalhos (Miller *et al.*, 1996; Miller & Johnstone, 2001; Campisi *et al.*, 2004; Chen *et al.*, 2006). Embora alguns autores tenham descrito a importância do HPV na etiologia da LVP, particularmente HPV 16 (Gopalakrishnan *et al.*, 1997) e 18 (Palefsky *et al.*, 1995; Silverman & Gorsky, 1997, Femiano *et al.*, 2001), outros autores mostram que a prevalência de HPV em LVP não difere das leucoplasias orais (Fettig *et al.*, 2000; Eversole, 2000; Campisi *et al.*, 2004).

Bagan *et al.* (2008) relataram a presença de EBV em 6 de seus 10 casos de LVP e em 2 dos 5 casos de CEC analisados. Entretanto, ainda não se sabe se EBV realmente tem papel efetivo na etiologia das leucoplasias e dos CEC. Além disso, mesmo com a utilização de PCR – ferramenta sensível – não é possível afirmar se os vírus detectados infectam apenas os queratinócitos ou os linfócitos do infiltrado inflamatório adjacente.

2.2.5. Sanguinarina

Sanguinarina é utilizado em colutórios e cremes dentais por apresentar propriedades de desorganização do biofilme dental e atividade antiinflamatória. Recentemente foi descrita a participação de sanguinarina no desenvolvimento de leucoplasias orais. Estas lesões geralmente localizam-se no vestíbulo anterior ou mucosa alveolar maxilar, locais não muito comuns de incidência de leucoplasia oral. A mistura deste composto com alcalóides presentes na composição de tais produtos mostra interação, *in vitro*, com DNA. Sanguinarina e seus metabólitos aparentemente se ligam a proteínas plasmáticas, alteram o metabolismo hepático, são eliminados lentamente e retidos no trato gastrointestinal, fígado, pulmões, rins e coração. Explica-se, assim, porque as lesões leucoplásicas podem não desaparecer após descontinuação do uso ou apresentar recorrência após excisão. Infelizmente, ainda não há consenso se sanguinarina realmente apresenta poder carcinogênico, visto que apenas pequena porcentagem das biópsias apresentaram displasia moderada (Damm *et al.*, 1999; Allen *et al.*, 2001, Shopper *et al.*, 2004).

2.2.6. Nutrição

Segundo Regezi & Sciuba (1999) fatores nutricionais também podem estar envolvidos na patogenia da leucoplasia oral. Vitaminas A, B12, C, E, β -caroteno e folato são micronutrientes que apresentam forte evidência de envolvimento com prevenção e controle do processo de iniciação e promoção do câncer. Vitamina A (ácido retinóico) apresenta efeito anti-proliferativo e indutor da diferenciação celular, além de capacidade de induzir apoptose (Willis & Wians, 2003). β -caroteno e vitamina E são considerados menos tóxicos que o ácido retinóico e apresentam efeitos celulares semelhantes à vitamina A (Toma *et al.*, 1992; Garewal, 1994; Benner *et al.*, 1993; Garewal, 1994).

Em um estudo feito na Índia, os níveis séricos de vitamina A, B12, C, β -caroteno e folato estavam diminuídos significativamente em pacientes que apresentavam leucoplasia oral, mesmo nos não fumantes (Ramaswamy *et al.*, 1996). Em outro trabalho realizado por Gupta e colaboradores, em 1999, foi demonstrado que a ingestão de β -caroteno estava inversamente relacionada ao aparecimento de lesões orais com potencial de malignização. Deve ser levado em consideração o hábito muito prevalente nesta população de uso do tabaco sob várias formas. Mesmo assim, a ingestão de uma dieta rica em frutas e vegetais frescos pode ter um papel protetor na prevenção de câncer oral (van der Waal *et al.*, 1997). Não existe, ainda, nenhum estudo que mostre se nutrição deficiente tem ou não papel na etiologia de LVP.

2.3. Aspectos Clínicos

Leucoplasias orais podem ocorrer como alterações isoladas, únicas, ou como lesões difusas, às vezes múltiplas. Os locais de distribuição das lesões mostram variações de acordo com o gênero e, principalmente, com as diferenças nos hábitos de cada população (Bánóczy & Sugár; 1975; Silverman *et al.*, 1976; Gupta *et al.*, 1980; Jang-Jaer *et al.*, 2006).

O aspecto das lesões varia e mudanças podem ocorrer com o tempo. São divididas, basicamente, em homogêneas e não homogêneas, havendo subdivisões (Bánóczy *et al.*, 1975; Sciubba, 1995). As leucoplasias orais homogêneas são definidas como lesões predominantemente brancas, de aparência uniforme, com aspecto fino e translúcido. Caracterizá-las como homogêneas refere-se à consistência e à cor sempre constantes (Axéll *et al.*, 1996; van der Waal *et al.*, 1997).

Leucoplasias não homogêneas são assim denominadas por apresentar variação na cor (podendo apresentar áreas brancas e eritroplásicas, sendo, então, chamadas leucoeritroleucoplasias) ou por mostrar aparência irregular, nodular ou

exofítica, com ou sem fissuras, geralmente apresentando textura firme à palpação (Gupta *et al.*, 1989; Zakrzewska *et al.*, 1996; van der Waal, 1997; Regezi and Sciuba, 1999). As leucoplasias nodulares são caracterizadas por irregularidades superficiais arredondadas (Gupta *et al.*, 1989; van der Waal *et al.*, 1997) e as leucoplasias verrucosas apresentam projeções superficiais exofíticas irregulares achatadas ou finas (Axéll *et al.*, 1996). Portanto, uma lesão leucoplásica não homogênea é assim definida pelo seu aspecto, textura e mistura de cores (branco e vermelho) (van der Waal *et al.*, 1997).

LVP apresenta, como uma das características mais marcantes, apresentação clínica variável e progressiva, além de seu diagnóstico só poder ser realizado retrospectivamente (Hansen *et al.*, 1985; Zakrzewska *et al.*, 1996, Barnes *et al.*, 2005). Esta condição pode acometer qualquer local da cavidade oral e pode ter apresentação inicial como lesão única e, com o tempo, pode haver desenvolvimento de lesões múltiplas e multifocais. Língua e mucosa jugal são os locais mais acometidos e palato, rebordo alveolar, gengiva, assoalho e mucosa labial os menos envolvidos (Hansen *et al.*, 1985; Batsakis *et al.*, 1999).

2.4. Aspectos Histopatológicos

Os aspectos histopatológicos principais da leucoplasia oral são hiperplasia epitelial e acantose, com ou sem hiperqueratose (van der Waal *et al.*, 1997; Neville *et al.*, 2004; Barnes *et al.*, 2005). Displasia epitelial pode estar presente, variando de leve a grave. Em alguns casos, carcinoma *in situ* e até CEC invasivo podem ser encontrados microscopicamente (van der Waal *et al.*, 1997; Regezi e Sciuba, 1999; Barnes *et al.*, 2005).

As displasias epiteliais podem variar de brandas (havendo alterações apenas na porção basal e suprabasal do epitélio) a graves (quando as alterações epiteliais ultrapassam a camada espinhosa do epitélio) (van der Waal *et al.*, 1997; Reibel, 2003; Barnes *et al.*, 2005; Jang-Jaer *et al.*, 2006). O termo carcinoma *in*

situ é utilizado quando o epitélio está alterado em toda sua extensão, mas ainda não houve invasão do tecido conjuntivo subjacente (Reibel, 2003; Barnes *et al.*, 2005). Alguns autores consideram que mudanças na microvascularização e/ou um aumento do número de linfócitos, plasmócitos e células de Langerhans no tecido conjuntivo subjacente também são indicativos de displasia epitelial (van der Waal *et al.*, 1997). Certas leucoplasias displásicas podem apresentar algumas características que se assemelham às do líquen plano, tendo sido chamadas por alguns autores de displasias liquenóides (Krutchkoff & Eisenberg, 1985).

Exocitose no epitélio pode estar presente, mas não é comum. Se há infecção por *C. albicans* pode ser observado formação de microabcessos nas camadas mais superficiais do epitélio (van der Waal *et al.*, 1997).

As alterações epiteliais progressivas associadas às LVP fazem o diagnóstico microscópico inicial impossível. Geralmente um diagnóstico histopatológico de ausência de alterações ou displasia mínima é feito, mas o comportamento clínico agressivo não condiz com estes achados (Cabay *et al.*, 2007). Hansen *et al.* (1985) propuseram gradação microscópica de LVP através de uma escala de 0 a 10, traduzindo uma progressão de alterações que abrangia mucosa oral histopatologicamente normal, leucoplasia clinicamente homogênea, hiperplasia verrucosa, carcinoma verrucoso, CEC papilar, CEC pouco diferenciado, e graus intermediários. Em 1999, Batsakis *et al.* sugeriram nova gradação às LVP que incluía quatro fases principais (leucoplasia sem displasia epitelial e clinicamente achatada, hiperplasia verrucosa, carcinoma verrucoso e CEC) e suas gradações intermediárias. Estes métodos classificatórios diferem em suas interpretações em quais lesões deveriam ser classificadas como CEC papilar: o critério proposto por Batsakis *et al.* (1999) inclui no grupo de carcinoma verrucoso lesões classificadas como CEC papilar por Hansen *et al.* (1985). Outra dificuldade encontra-se em definir hiperplasia verrucosa, diferenciando-a do carcinoma verrucoso (Cabay *et al.*, 2007). Shear & Pindborg (1980) foram os primeiros a descrever esta condição da mucosa oral, eliminando o uso do termo “papilomatose oral florida” para proliferações epiteliais papilomatosas

hiperqueratóticas, proposto por Rock & Fisher, em 1960. Alguns autores a consideram uma variante morfológica do carcinoma verrucoso (Slootweg & Müller, 1983; Murrah & Batsakis, 1994) e outros como uma entidade distinta, mas que pode coexistir com carcinoma verrucoso (Shear & Pindborg, 1980).

Leucoplasia verrucosa proliferativa pode exibir características histopatológicas diferentes em uma mesma biópsia, em biópsias múltiplas realizadas no mesmo tempo cirúrgico, ou em biópsias feitas ao longo do tempo (Cabay *et al.*, 2007). Pode haver infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo, mas com aspecto também muito variável, aparecendo como linha difusa e suave ou até como faixa densa subepitelial semelhante ao líquen plano, mas sem a característica degeneração da camada basal (Silverman *et al.*, 1997; Cabay *et al.*, 2007). Com o tempo, há progressivo aumento da queratinização, da verrucosidade superficial, da acantose, hiperplasia da camada basal, desenvolvimento de displasia epitelial e, não havendo tratamento, progressão para carcinoma verrucoso ou espinocelular (Hansen *et al.*, 1985; Zakrzewska *et al.*, 1996; Silverman & Gorsky, 1997; Fettig *et al.*, 2000; Lopes *et al.*, 2000; Bagan *et al.*, 2003; Vigliante *et al.*, 2003; Cabay *et al.*, 2007).

2.5. Diagnóstico Diferencial

Um diagnóstico preciso de lesão branca oral deve ser feito através da análise de fatores etiológicos, exame clínico e exame histopatológico, se necessário, visto que existem diversas lesões orais que podem ser definidas como brancas. Deve-se avaliar a história do paciente e os possíveis fatores etiológicos, como microorganismos (caso da candidose pseudomembranosa e hiperplásica, leucoplasia pilosa oral, lesões da sífilis secundária), trauma (morsicatio bucarum, linha alba, hiperqueratose reacional por defeitos em restaurações bucais), doenças auto-imunes (como líquen plano reticular ou em placa), entre outros (Røed Petersen, 1982; Axéll *et al.*, 1984; Gupta, 1984; Axéll *et al.*, 1996; van der

Waal *et al.*, 1997). Também se deve atentar para as características clínicas, como bilateralidade, simetria da lesão e aspecto superficial (Tabela 02).

Se após exame cuidadoso de todos os fatores ainda não houver diagnóstico conclusivo, biópsia é mandatória (van der Waal *et al.*, 1997; Pentenero *et al.*, 2003).

Tabela 02 - Lesões orais brancas ou predominantemente brancas mais comuns e seus principais critérios diagnósticos.

Lesão	Critérios diagnósticos principais
Candídose pseudomembranosa	Aspecto clínico (pseudomembranas raspáveis, geralmente padrão simétrico)
Candídose hiperplásica	Aspecto clínico, histopatologia
Lesão friccional	Presença de irritação mecânica (ex: presença de cúspide dental pontiaguda)
Leucoplasia pilosa	Aspecto clínico (localização: bilateral lingual), presença do EBV
Lesão associada a restaurações dentárias	Aspecto clínico (relação com restauração dental)
Leucoedema	Aspecto clínico (padrão simétrico, desaparece quando mucosa é distendida)
Líquen plano, tipos reticular ou em placa	Aspecto clínico (padrão simétrico), histopatologia
Linha alba	Aspecto clínico (localização: mucosa jugal, linha de oclusão dos dentes)
Morsicatio	História de hábito de mordiscar, mastigar; aspecto clínico
Sífilis secundária	Aspecto clínico, presença do <i>T. pallidum</i> , sorologia
Lesões induzidas por tabaco	
Estomatite nicotínica	Aspecto clínico, história de fumo
Queratose por uso de tabaco	Aspecto clínico, local onde tabaco é colocado
Nevo branco esponjoso	História familiar, aspecto clínico (geralmente simétrico)
Papiloma e lesões similares	Aspecto clínico, histopatologia

Baseado em van der Waal et al, 1997.

Como algumas lesões são muito extensas e/ou múltiplas, podendo apresentar diferentes aspectos ao longo de sua superfície, torna-se necessário realização de múltiplas biópsias, dando prioridade às áreas não-homogêneas. Também se deve atentar para a profundidade da biópsia, objetivando incluir na amostra tecido conjuntivo suficiente, possibilitando avaliação da completa da lesão (Vedtofte *et al.*, 1987; Silverman, 1988; van der Waal *et al.*, 1997, Regezi e Sciuba, 1999).

Leucoplasias verrucosas proliferativas são diagnosticadas pelos aspectos clínicos (lesões múltiplas, podendo apresentar variadas características morfológicas, como hiperqueratose, superfície nodular, verrucosa e até áreas eritroplásicas e ulceradas), histopatológicos (progressão para displasia e

carcinoma em biópsias seqüenciais) e história clínica pregressa (maioria dos pacientes mulheres, sem história de consumo de álcool e fumo, lesões apresentando recorrência e resistência a qualquer tratamento instituído) (Hansen *et al.*, 1985; Murrah & Batsakis, 1994; Silverman & Gorsky, 1997; Batsakis, 1999; Lopes *et al.*, 2000; Barnes *et al.*, 2005; Cabay *et al.*, 2007; Epstein *et al.*, 2007; Morton *et al.*, 2007).

2.6. Transformação Maligna

A maioria dos estudos descreve que as porcentagens de transformação maligna das leucoplasias orais geralmente estão abaixo de 10% (Pindborg *et al.*, 1977; Silverman *et al.*, 1984; Batsakis *et al.*, 1997; van der Waal *et al.*, 1997) e outros mostram porcentagens realmente baixas: 0.3% (Gupta *et al.*, 1980) e 0.06% (Silverman *et al.*, 1976).

Algumas características têm sido descritas na literatura como associadas a maior risco de transformação maligna das leucoplasias orais: gênero (mulheres parecem apresentar maior risco), tempo longo de duração da lesão, leucoplasia em não fumantes (leucoplasia idiopática), localização em assoalho bucal e/ou língua, morfologia não homogênea, presença de displasia epitelial e, fato mais recentemente estudado, expressão alterada de certas proteínas pelas células epiteliais (van der Waal, *et al.*, 1997; Reibel, 2003; Jang-Jaer *et al.*, 2006). De todas as características listadas, a mais importante é presença de displasia epitelial e é de consenso comum que lesões displásicas apresentam risco cinco vezes mais aumentado de desenvolver carcinoma que lesões não displásicas (van der Waal, *et al.*, 1997; Reibel, 2003; Jang-Jaer *et al.*, 2006). Silverman *et al.* (1976), em estudo realizado em 57.518 trabalhadores indianos relataram que menos de 1% das leucoplasias orais apresentavam algum grau de displasia. Entretanto, segundo Bánóczy & Sugar (1972), Waldrom & Shaffer (1975), Pindborg *et al.* (1977) e Chiesa *et al.* (1990), displasia pode estar presente em

mais de 16% das lesões, e mais de 10% delas podem apresentar malignidade ao exame inicial. Outros estudos mostram porcentagens ainda maiores: Bánóczy & Csiba (1976) encontraram 28.7% e Pentenero *et al.* (2003) relataram porcentagem igual a 39.1%.

Em leucoplasias displásicas o risco de transformação maligna descrito tem sido, aproximadamente, igual a 43% (Silverman *et al.*, 1984). Em contrapartida, Gupta *et al.* (1980) demonstraram, em estudo com seguimento de sete anos, que 60% das lesões displásicas permaneceram imutáveis ou sofreram regressão, e apenas 7% progrediram para carcinoma. Outros pesquisadores relataram achados similares (Pindborg *et al.*, 1977).

van der Waal *et al.* (1997) afirmaram que transformação carcinomatosa pode ocorrer também em lesões não displásicas, afirmação apoiada por outros autores (Waldrom & Shaffer, 1975; Silverman *et al.*, 1984; Hansen *et al.*, 1985; Crissman & Zarbo, 1989; Schepman *et al.*, 1998). A dúvida que persiste é se realmente não há displasia epitelial ou se esta não foi detectada no tecido biopsiado.

LVP apresenta altas taxas de transformação maligna, como mostram os trabalhos encontrados na literatura. Fettig *et al.* (2000) relataram 60% de desenvolvimento de carcinoma, Bagan *et al.* (2003) relataram transformação carcinomatosa em 63% de seus pacientes, Silverman & Gorsky (1997) relataram 70%, Hansen *et al.* (1985) descreveram 87%, Zakrzewska *et al.* (1996) e Morton *et al.* (2007) relataram 100% de malignização em sua amostra.

Vários estudos vêm sendo realizados na tentativa de se descobrir por que as leucoplasias orais e, em particular as LVP, apresentam potencial de transformação maligna. Uma grande quantidade de proteínas está envolvida no processo de proliferação e diferenciação celular. Qualquer alteração em uma delas, e conseqüentemente no ciclo celular, pode levar ao processo de carcinogênese.

O ciclo celular eucariótico é dividido em quatro fases – G1, S, G2, e mitose. As fases mais críticas são a de síntese de DNA (fase S), em que há

replicação, e mitose (M), em que o genoma replicado é dividido igualmente entre as duas novas células-filhas. Em G1 (Gap 1) há preparação para a fase de replicação do material genético (S) e em G2 a célula se organiza para a mitose (Tye, 1999, Tachibana *et al.*, 2005). Todas estas fases podem variar significativamente, dependendo do estágio de desenvolvimento do organismo (Tye, 1999).

O genoma eucariótico é dividido em múltiplos cromossomos por causa de seu tamanho e complexidade (Tye, 1999) e sua replicação deve ser perfeitamente coordenada a fim de haver precisa duplicação e posteriormente divisão em duas células-filhas (Lei & Tye, 2001; Blow & Hogson, 2002; Blow & Dutta, 2005; Gonzalez *et al.*, 2005).

A maioria das células humanas se encontra fora do ciclo celular, em estado de quiescência (fase G0). Estas células degradam várias proteínas necessárias à proliferação, mas fatores de crescimento podem incitá-las a entrar em G1, e, em alguns casos, a tornarem-se comprometidas com o processo mitótico (Gonzalez *et al.*, 2005; Tachibana *et al.*, 2005).

Durante cada ciclo celular, eventos de iniciação são rigorosamente coordenados por regulação positiva e negativa. Regulação positiva é necessária para início da síntese de DNA e regulação negativa impede ou previne re-replicação do DNA, mantendo sempre uma replicação por ciclo celular (Tye, 1999). A passagem para uma nova fase do ciclo celular é orquestrada de acordo com as concentrações de ciclinas, ciclinas dependentes de quinases e inibidores das ciclinas dependentes de quinases, as quais estacionam o ciclo celular se algum erro é detectado em um determinado *check point* (Gonzalez *et al.*, 2005; Tachibana *et al.*, 2005).

Uma vez que o genoma humano não é uma fita contínua, mas é dividido em 46 cromossomos por célula diplóide, existe um grande número de origens de replicação garantindo que o material genômico completo seja replicado (Blow & Dutta, 2005; Tachibana *et al.*, 2005). O mecanismo de replicação

cromossômica é um processo complexo bem conservado com várias etapas, que requer a participação de numerosas proteínas reguladoras (Tye BK, 1999).

2.6.1. p53

TP53 é o nome de um gene supressor de tumor localizado no braço curto (p) do cromossomo 17, assim como da proteína por ele codificada. Gene *TP53* é formado por 11 éxons e quatro regiões com funções diferentes.

Ativação da proteína p53 ocorre quando há estresse ou estímulo carcinogênico. São formados tetrâmeros que induzem a ativação de uma série de genes cujos produtos facilitam as atividades adaptativas e protetoras, incluindo apoptose e interrupção do ciclo celular na fase G1. Dessa maneira, p53 age como fator de ativação transcricional (Prives & Hall, 1999; Chang *et al.*, 2000; Nylander *et al.*, 2000).

Alterações do gene p53 estão entre as mais prevalentes anormalidades moleculares em cânceres humanos, em que mutações em ponto e perda do *locus* alelo no cromossomo 17 são as mais freqüentes. Além disso, p53 é alvo de inativação por proteínas virais, como o antígeno T SV40, proteína E6 do HPV e adenovirus E1B, entre outros (Prives & Hall, 1999; Nylander *et al.*, 2000).

P53 tem uma meia-vida curta de aproximadamente 20 minutos, sendo assim, dificilmente detectadas em tecidos normais. Entretanto, a proteína pode permanecer por mais tempo nos tecidos através de mutações, defeitos na via de degradação ou ligação a outras proteínas. Em CEC de cabeça e pescoço, sugere-se que após mutação de um dos alelos do *TP53* há deleção do remanescente e expressão do alelo mutado (Yin *et al.*, 1993). A maioria das mutações afeta áreas da proteína p53 não envolvidas na formação de tetrâmeros, desta forma, a maioria dos p53 mutantes continua capaz de formar tetrâmeros (Chène, 1998). Assim, nem todas as mutações causam perda de função da proteína, mas estas

provavelmente têm propriedades alteradas (Prives & Hall, 1999). Proteínas mutadas apresentam meia-vida prolongada, facilitando sua visualização através de imunohistoquímica (Nylander *et al.*, 2000).

Mutações no gene TP53 são encontradas em 40-50% dos CEC de cabeça e pescoço (Greenblatt *et al.*, 1994), mas a maioria dos estudos não mostra correlação entre expressão de p53 e prognóstico quando o tumor inteiro ou apenas o front de invasão é avaliado (Gapany *et al.*, 1993; Raybaud-Diogène *et al.*, 1996, Nylander *et al.*, 1997; Piffkó *et al.*, 1998). Sauter *et al.* (1995) mostraram que houve correlação entre a marcação de p53 e diminuição da taxa de sobrevida. Entretanto, frente ao grande número de trabalhos que apresentam resultados contrários, não há significância nestes achados.

Vários estudos imunohistoquímicos têm demonstrado expressão do gene TP53 em lesões orais com potencial de malignização e relata-se que pacientes com expressão positiva de proteína p53 apresentam um pior prognóstico (Fan *et al.*, 2006). O padrão de marcação imunohistoquímica difere do encontrado em tecidos normais, que mostram expressão apenas na camada basal: há positividade em células basais e parabasais em tecidos com displasia leve e marcação em toda a extensão do epitélio com displasia grave (Kerdpon *et al.*, 1997, Cruz *et al.*, 1998).

Piatelli *et al.* (2002) encontraram que p53 estava expressa nas camadas suprabasais em leucoplasias orais, displasia e CEC *in situ*. Cruz *et al.* (1998) demonstraram que a imunopositividade suprabasal de p53 está associada com desenvolvimento de CEC. Foi demonstrado que 86% dos tecidos que expressaram marcação suprabasal se transformaram em CEC e que 72% dos tecidos com positividade apenas na camada basal ou com ausência de marcação permaneceram estáveis.

Em relação à LVP, Gopalakrishnan *et al.* (1997) encontraram marcação de p53 em oito de dez casos de LVP, expressão mínima em mucosa oral normal, e imunopositividade em sete de dez casos de CEC orais. Neste mesmo trabalho, nenhuma mutação no gene p53 foi encontrada em LVP e metade das amostras de

CEC que apresentaram o gene *TP53* mutado não apresentavam expressão de p53. Fetting *et al.* (2000) encontraram expressão de p53 em quatro dos dez casos analisados de LVP em gengiva, entretanto não foi relatado tempo de acompanhamento e porcentagens de transformação maligna.

No estudo realizado por Gopalakrishnan *et al.* (1997), também foi analisada a presença de HPV e expressão de p53 em LVP e CEC. HPV-16 e 18 foram encontrados em duas das oito LVP p53 positivas e HPV-16 foi identificado em dois dos sete CEC p53 positivos. Fetting *et al.* (2000), ao examinar 10 casos de LVP gengival, não detectaram HPV em nenhum dos tecidos. Deste modo, HPV pode ter papel na mutação da proteína p53 em algumas, mas não em todas as lesões de LVP (Cabay *et al.*, 2007):

2.6.2. ki-67

A proteína ki-67 foi descoberta em 1983 em frações nucleares de células da linhagem L428, de linfoma de Hodgkin. A proteína foi assim nomeada porque foi produzida em Kiel, Alemanha, e porque o clone celular em que foi detectada era cultivado na 67ª placa de cultura (Gerdes *et al.*, 1983). Ki-67 é uma proteína grande, de aproximadamente 395 kDa, codificada por gene composto por quase 30.000 pares de bases, localizado no braço longo do cromossomo 10 (10q25). Ki67 apresenta localização complexa e específica no núcleo, que muda durante o ciclo celular. Durante a mitose ela se desloca do nucléolo, onde se associa ao componente fibrilar denso – um dos três componentes necessários para produção ribossomal, para regiões pericromossômicas (Verheijen *et al.*, 1989; Scholzen & Gerdes, 2000; Brown & Gatter, 2002).

Estima-se que apresenta meia-vida de 60-90 minutos e que sua quantidade durante todo o ciclo celular é altamente regulada pelo sistema proteossomal (Wu *et al.*, 2000). Sabe-se que ki-67 é essencial para proliferação celular - Gerdes *et al.* (1984), descreveram que a proteína estava presente no

núcleo de células em G1, S, G2 e mitose e que células quiescentes ou em G0 não expressavam este antígeno.

No entanto, suas funções ainda não são conhecidas completamente. Macallum & Hall (2000) sugeriram uma função estrutural dentro do nucléolo (pois ki67 é capaz de interagir com outras proteínas e de ligar-se a RNA e DNA, além de ser, talvez, essencial para síntese de ribossomos durante divisão celular). Esta afirmação é apoiada por Plaat *et al.* (1999), os quais observaram que a expressão de ki-67 está correlacionada à síntese de proteínas, função dos ribossomos (Bridger *et al.*, 1998; Plaat *et al.*, 1999; Macallum & Hall, 2000).

A expressão de Ki-67 é correlacionada, em vários estudos, a comportamento clínico de neoplasias, e utilizada como marcador prognóstico. Utilização de ki-67 em câncer de próstata tem valor preditivo e o tratamento é realizado de acordo com a marcação imunohistoquímica (Khoo *et al.*, 1999; Ahlgren *et al.*, 1999). Estudos feitos em câncer de mama mostram correlação estatística significativa entre imunopositividade e comportamento clínico da neoplasia (Bouzubar *et al.*, 1989; Gottardi *et al.*, 1992; Locker *et al.*, 1992; Beck *et al.*, 1995; Jacquemier *et al.*, 1998; Chang *et al.*, 1999; Midulla *et al.*, 1999; Paradiso *et al.*, 1999; Cecarelli *et al.*, 2000). Outras neoplasias mostram padrão não muito claro e até contraditório de imunopositividade e comportamento clínico, como carcinomas de cérvix uterino, linfomas não-Hodgkins (Brown & Gatter, 2002) e câncer de intestino grosso (Palmqvist *et al.*, 1999; Kimura *et al.*, 2000).

Positividade de ki-67 tem sido utilizada como ferramenta para estimar o potencial de proliferação em cânceres de cabeça e pescoço (Wozniak *et al.*, 2002; Liu *et al.*, 2003), além da sobrevida dos pacientes (Silva *et al.*, 2003). Piatelli *et al.* (2003) relataram imunopositividade de ki-67 semelhante à encontrada em p53 (expressão na camada basal em epitélios normais e marcação das camadas basal e parabasal em leucoplasias displásicas e carcinoma *in situ*). Há relatos na literatura de aumento de expressão de ki-67 conforme o aumento dos graus de displasia epitelial (Girod *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2000; Oliver *et al.*, 2000; Kövesi & Szende; 2003; Kurogawa *et al.*, 2003).

Fettig *et al.* (2000) em seu estudo de 10 LVP em gengiva descreveram expressão moderadamente elevada de ki-67. A positividade encontrada nas LVP foi observada nas camadas basal e suprabasal, semelhantemente às amostras de mucosa oral normal utilizadas como controle. Como existe escassez de estudos relatados na literatura, há necessidade de se pesquisar melhor o comportamento de ki-67 e seu possível papel prognóstico em LVP.

2.6.3. Mcm2 e Mcm5

Para que a replicação de todo o material genético seja feita de maneira adequada, existem múltiplas origens de replicação. Uma vez que o genoma humano não é uma fita contínua, mas é dividido em 46 cromossomos por célula diplóide, existe um grande número de origens de replicação garantindo que o material genômico completo seja replicado (Lei & Tye, 2001; Blow & Dutta, 2005; Tachibana *et al.*, 2005). O mecanismo de replicação cromossômica é um processo complexo bem conservado com várias etapas, que requer a participação de numerosas proteínas reguladoras (Tye BK, 1999) e que necessita da presença de um complexo hetero-hexamérico de proteínas mantenedoras de minicromossomos (Mcm – assim chamadas porque leveduras mutantes que não possuem essas proteínas não são capazes de manter elementos extracromossômicos - minicromossomos - ligados à cromatina) para seu perfeito desenrolar (Bell & Dutta, 2002). Mcm2-7 se ligam à cromatina no fim da mitose e início de G1 e são removidas em S e G2. Mcm1 e Mcm10 não fazem parte desta família de proteínas, mas também são muito conservadas em eucariotos. Mcm1 é um fator transcricional que pode ter um papel na síntese de DNA, enquanto Mcm10 parece ser requerido na iniciação da síntese do DNA (Maiorano *et al.*, 2006). Recentemente, mais dois membros da família Mcm2-7 foram identificados: Mcm8 e 9. Mcm9 existe apenas em vertebrados e parece estar relacionada de modo mais próximo a Mcm8 que às outras proteínas Mcm (Lutzman *et al.*, 2005).

Mcms estão presentes no núcleo eucariótico durante todo o ciclo celular e sua atividade cíclica é regulada por fatores de recrutamento e pela atividade de ciclinas dependentes de quinases (CDK). Mcm2-7 têm papel fundamental na regulação da replicação do DNA a partir das origens de replicação (Bell & Dutta, 2002). Sua presença na cromatina durante a fase S age como uma “licença” (Laskey *et al.*, 1981; Blow *et al.*, 1987). No início de G1 os fatores de ativação Cdc6 e Cdt1 recrutam o complexo Mcm à cromatina, próximo das origens de replicação, que são ocupados por complexos protéicos de reconhecimento de origem (ORC). O agrupamento completo dessas proteínas na cromatina resulta na formação de complexos de pré-replicação (pre-RC), que se mantêm unidas à cromatina até o fim da fase G1. A fase S é desencadeada por aumento dos níveis de proteínas ciclina A/CDK2 e Dbf4/Cdc7, que ativam os pre-RC. Subunidades do complexo Mcm são fosforilados e deslocados durante o processo de replicação do DNA. Uma vez replicado todo o DNA e liberadas todas as proteínas Mcm da cromatina, estas ficam livres no núcleo durante G2 e início da mitose. Cdc6 e Cdt1, após início da fase S, são fosforiladas e deslocadas da cromatina - Cdc6 é exportada para o citoplasma e Cdt1 é fosforilada e degradada (Tachibana *et al.*, 2005; Maiorano *et al.*, 2006). Qualquer Cdt1 que escape deste controle é capturada por geminina, que é expressa nas fases S, G2 e início de mitose, prevenindo formação de novas origens, re-replicação cromossômica e instabilidade genômica (Wohlschlegel *et al.*, 2000; Tada *et al.*, 2001; Gonzalez *et al.*, 2004).

A expressão desregulada de Mcm é um marcador de proliferação tumoral. Sua detecção permite, com grande precisão, diagnóstico de cânceres de origem epitelial. Como elas estão ausentes nas células em fase quiescente, sua presença é considerada como um marcador prognóstico, sendo assim, consideradas uma nova classe de marcadores de proliferação celular (Stoeber *et al.*, 2001; Alison *et al.*, 2002).

A expressão de Mcm está desregulada em um grande número de lesões neoplásicas e pré-neoplásicas em vários órgãos como cérvix uterino,

esôfago, bexiga, próstata e cérebro (Freeman *et al.*, 1999; Meng *et al.*, 2001; Going *et al.*, 2002). Altos índices de Mcm2 têm sido considerados marcadores de prognóstico de carcinomas renais, além de ser método de mapeamento de carcinomas coloretais (Kodani *et al.*, 2003). Além disso, níveis elevados de Mcm5 em sedimentos de urina são altamente preditivos de câncer do trato genito-urinário (Meng *et al.*, 2001; Stoeber *et al.*, 2001).

Poucos estudos existem relatados na literatura que tenham sido feitos em tecidos displásicos ou em CEC orais. Kodani *et al.*, em 2001, demonstraram que maior imunopositividade de Mcm2 pode predizer transformação maligna em displasias orais. Em 2003, Kodani *et al.* realizaram trabalho que mostraram marcação maior e mais difusa de Mcm2 nos CEC pouco diferenciados. Szelachowska *et al.*, em 2006, afirmaram que Mcm2 pode ser usado como marcador prognóstico em pacientes com CEC orais, visto que foi encontrada correlação entre índice de sobrevida e imunopositividade.

A regulação da replicação do DNA, e especialmente o papel das proteínas da família Mcm em lesões com potencial de malignização, entre as quais LVP, e câncer de cabeça e pescoço precisam ser mais bem investigados.

2.7. Tratamento

O manejo de lesões leucoplásicas orais deve primeiramente ser direcionado à eliminação de possíveis fatores causais, como trauma, fumo, *candida*, etc, eliminando assim a possibilidade de existência de outras lesões que não leucoplasia. Havendo persistência de alteração na ausência de possíveis fatores causais, biópsia deve ser realizada para exclusão histopatológica de outras lesões e para avaliação de presença de displasia epitelial, carcinoma *in situ* ou carcinoma (van der Waal *et al.*, 1997; Epstein *et al.*, 1998).

A excisão cirúrgica é sempre recomendada, embora alguns autores a indiquem somente quando displasia estiver presente (Vedtofte *et al.*, 1987; van

der Waal *et al.*, 1997, Epstein *et al.*, 1998). A reavaliação periódica deve ser feita e, havendo suspeita de desenvolvimento de alterações epiteliais, recomenda-se realização de novas biópsias para confirmação do diagnóstico e decisão de possível tratamento.

A remoção de lesões leucoplásicas pode ser feita através de métodos variados. É muito importante ponderar, entretanto, se o método escolhido possibilita avaliação histopatológica do tecido removido. A excisão cirúrgica é o método mais tradicional utilizado, apresentando índices de recorrência que variam de 20% a 35%, podendo chegar a 83% nas leucoplasias verrucosas ou exofíticas, sendo então necessária nova remoção (Neville *et al.*, 2004). Estas taxas dependem do tipo morfológico da leucoplasia removida, da presença ou não de alteração do epitélio adjacente ou até da continuação de hábito deletério, como consumo de tabaco e álcool (Vedtofte *et al.*, 1987). As LVP apresentam altas taxas de recorrência e resistência a qualquer tratamento escolhido (Hansen *et al.*, 1985; Murrah & Batsakis, 1994; Silverman & Gorsky, 1997; Batsakis, 1999; Lopes *et al.*, 2000; Cabay *et al.*, 2007).

Criocirurgia é método estudado desde os anos 60 e os resultados desta técnica variam. Além da dificuldade de obtenção de espécime viável para análise histopatológica, há a complexidade de controle visual da profundidade durante cirurgia e período pós-operatório com maior resposta inflamatória e aumento do tempo de cicatrização (van der Waal *et al.*, 1997). A cirurgia a laser de CO₂ empregada para tratamento de leucoplasias orais pode ser usada tanto através da excisão da lesão e parte do tecido subjacente ou pela evaporação completa da superfície epitelial, sendo necessária biópsia prévia (Silverman *et al.* 1984; van der Waal *et al.*, 1997; Schoelch *et al.*, 1999). Apesar de haver um período pós-operatório com menos complicações, formação de menos tecido cicatricial e melhor manutenção da função os índices de recorrência variam de 9% a 22% (Chiesa, 1990; van der Waal *et al.*, 1997; Epstein *et al.*, 1998), o que traduz talvez a dificuldade de avaliação histopatológica do tecido removido.

Algumas lesões leucoplásicas localizam-se em locais de difícil acesso, acometem grande parte da mucosa oral, envolvem sítios anatômicos sensíveis – como ductos salivares, ou, ainda, recorrem depois de repetidas excisões cirúrgicas. Para estas lesões estuda-se a utilização de tratamentos alternativos, como vitaminas A e E, retinóides, bleomicina e alfa-tocoferol (Epstein *et al.*, 1994 ; Epstein *et al.*, 1998 Gorsky & Epstein, 2002).

O uso de vitamina A no tratamento de leucoplasias orais está sendo estudada e alguns trabalhos têm demonstrado eficiência da ação desta substância no processo de regressão das lesões leucoplásicas (Gorsky & Epstein, 2002). É considerada agente antiproliferativo e indutores da diferenciação celular, capazes de agir como reguladores transcricionais (por inibição da ação da DNA polimerase, na fase G1 do ciclo celular) e induzir apoptose celular (Willis & Wians, 2003). A desvantagem é que a vitamina A e seus derivados possuem toxicidade, apresentando efeito cumulativo no organismo, necessitando redução da dose ou abstinência temporária (Girod & Pfhal, 1999; Gorsky & Epstein, 2002).

Beta-caroteno e vitamina E são considerados menos tóxicos que o ácido retinóico (Toma *et al.*, 1992; Garewal, 1994), também apresentando altas taxas de remissão da lesão durante o tratamento (40-60% dos casos) (Benner *et al.*, 1993; Garewal, 1994).

A aplicação tópica de bleomicina mostrou resultados encorajadores em alguns estudos realizados. Parte das leucoplasias apresentou diminuição de tamanho, do grau de displasia e até remissão completa, além de menores taxas de recorrência, quando comparadas a tratamentos cirúrgicos (Hammersley *et al.*, 1985; Malmstrom *et al.*, 1988; Wong *et al.*, 1989; Epstein *et al.*, 1994). Em estudo realizado por Epstein e colaboradores, em 1998, foram realizadas aplicações tópicas de Bleomicina nas lesões leucoplásicas e mais de 94,7% destas apresentaram diminuição de displasia epitelial.

Infelizmente, a maioria das lesões tratadas através de meios alternativos apresenta recorrência quando o tratamento é descontinuado e não há plena certeza de que o risco de malignização é completamente eliminado com

nenhum dos tratamentos acima citados (Scully & Boyle, 1992; Scully, 1995; Gorsky & Epstein, 2002). Dessa maneira, o acompanhamento dos pacientes que apresentam lesão tem que ser continuado por longo prazo, imprescindivelmente.

O tratamento utilizado em LVP usualmente é a cirurgia, mas freqüentemente há recorrência da lesão no mesmo local, logo após remoção (Hansen *et al.*, 1985; Zakrzewska JM, 1996; Schoelch *et al.*, 1999; Lopes *et al.*, 2000; Vigliante *et al.*, 2003; Morton *et al.*, 2007). Femiano *et al.*, em 2001, propuseram a utilização de metisoprinol em LVP que têm HPV detectados, visto que esta droga tem atividade antiviral e imunomoduladora. Em seu estudo, após 18 meses de acompanhamento, o grupo tratado apenas com cirurgia apresentou 18 recorrências e o tratado com metisoprinol apenas 4.

Assim, terapias não cirúrgicas têm sido propostas, como radioterapia, crioterapia e terapia tópica com vitaminas, mas nenhuma mostrou ser suficientemente proveitosa (Silverman *et al.*, 1997; Batsakis *et al.*, 1999). Cirurgia tradicional seguida por criocirurgia (Yeh, 2003) e terapia fotodinâmica (Dilkes *et al.*, 2003; Sieron *et al.*, 2003) também já foram indicadas. Desta maneira, tratamento agressivo precoce é recomendado enquanto outras terapias mais efetivas não são propostas (Cabay *et al.*, 2003).

3. PROPOSIÇÃO

O objetivo deste trabalho foi avaliar os achados clínico-patológicos e a expressão imunohistoquímica de ki-67, p53, Mcm2 e Mcm5, na tentativa de se esclarecer o comportamento clínico agressivo de LVP e verificar a importância destas proteínas como possíveis marcadores prognósticos.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Fontes de obtenção do material da pesquisa e seleção da amostra

Os dados de pacientes que apresentavam lesões leucoplásicas foram avaliados e selecionados os indivíduos que apresentaram características de LVP. Os critérios de inclusão estabelecidos foram: presença de lesões hiperqueratóticas múltiplas, progressão das alterações clínicas e histopatológicas e recorrência após tratamento.

Foram avaliados dados de 12 indivíduos que apresentaram LVP, selecionados do arquivo de pacientes atendidos no Centro de Diagnóstico Oral – Orocentro – das Áreas de Semiologia e Patologia, do Departamento de Diagnóstico Oral da Faculdade de Odontologia de Piracicaba. As informações sócio-demográficas e clínicas foram obtidas a partir dos prontuários clínicos.

Esta pesquisa foi aprovada pelo Comitê de Ética em Pesquisa – CEP, da Faculdade de Odontologia de Piracicaba - UNICAMP sob o número de protocolo 081/2006, conforme anexo na página 107.

4.2. Análise Histopatológica

Foram realizados cortes de 5 µm de espessura dos tecidos emblocados em parafina para a confecção das lâminas, que foram coradas com Hematoxilina & Eosina. Estas lâminas foram revisadas para a confirmação do diagnóstico e classificação dos graus de displasia epitelial, presença de CEC ou carcinoma verrucoso, de acordo com o sistema-padrão proposto pela Organização Mundial da Saúde, em 2005. Os critérios utilizados para diagnóstico e gradação histológica encontram-se resumidos nas tabelas 03, 04 e 05. Tal avaliação foi realizada por

duas pessoas separadamente, e, nos casos em que não houve concordância, foi feita re-análise até haver consenso.

Tabela 03 - Descrição das alterações estruturais e citológicas presentes nos diferentes graus de displasia epitelial.

Estruturais
Estratificação irregular do epitélio
Perda de polaridade das células basais
Projeções epiteliais acentuadas
Mitoses superficiais anormais
Queratinização precoce em células isoladas (disqueratose)
Pérolas de queratina nas projeções epiteliais
Citológicas
Variação anormal do tamanho nuclear (anisonucleose)
Variação anormal da forma nuclear (pleomorfismo nuclear)
Variação anormal do tamanho celular (anisocitose)
Variação anormal da forma celular (pleomorfismo celular)
Aumento do tamanho nuclear
Figuras de mitose atípicas
Hipercromatismo

Baseado em Kramer *et al.*, 1978; Barnes *et al.*, 2005

Tabela 04 - Descrição dos diferentes graus de displasia epitelial.

Displasia leve	Alterações estruturais e citológicas restritas ao terço basal do epitélio
Displasia moderada	Alterações estruturais e citológica se estendem ao terço médio epitelial
Displasia grave	Alterações estruturais e citológicas acima dos dois terços inferiores
Carcinoma <i>in situ</i>	Alterações estruturais e citológicas em toda a extensão do epitélio
Carcinoma invasivo	Rompimento da membrana basal e invasão do conjuntivo subjacente

Baseado em Barnes *et al.*, 2005.

Tabela 05 - Descrição clínica e histopatológica de carcinoma verrucoso.

Carcinoma Verrucoso	
Variante de CEC	
Distribuição	75% acometem cavidade oral
Comportamento	Crescimento lento, não metastatizante ou metástases tardias
Aparência clínica	Inicia-se como placa queratótica, progride com espessamento e desenvolvimento de superfície papilar e/ou verrucosa
Histopatológico	Invaginações rombas de epitélio escamoso bem diferenciado hiperqueratinizado Epitélio não mostra características de malignidade Mitoses na camada basal Comprime, e não invade, o conjuntivo subjacente

Baseado em Barnes *et al.*, 2005.

4.3. Análise imunohistoquímica

Para as reações imunohistoquímicas foram realizados cortes de 3 µm de espessura dos tecidos incluídos em parafina e montados em lâminas de vidro silanizadas. Os cortes foram desparafinados em duas trocas de xilol: 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram hidratados em soluções decrescentes de álcool (100%, 90%, 70% e 50%) por 1 minuto em cada solução e, posteriormente, lavados em água corrente por 30 segundos.

A atividade da peroxidase endógena foi bloqueada com peróxido de hidrogênio a 3% (20 volumes) em 5 trocas de 5 minutos cada. Os cortes foram lavados em água corrente por 30 segundos.

O procedimento para recuperação antigênica foi realizado de maneira semelhante para todos os anticorpos analisados. Os cortes foram colocados em um recipiente com solução de ácido cítrico (pH 6,0) que foram levados ao forno de microondas (Panasonic – Modelo NN7809BH) em potência alta (consumo de

energia – 1380 W) por 24 minutos. Após 20 minutos em temperatura ambiente, tempo necessário para que ocorresse o resfriamento do líquido, os cortes foram lavados em solução fosfatada tamponada (PBS: phosphate-buffered saline, pH 7,4) e incubados por, no mínimo, 12 horas com os anticorpos primários monoclonais de cada anticorpo a ser estudado (Tabela 06).

O processo de incubação com o anticorpo secundário foi diferente entre os Mcm 2 e 5, p53 e ki-67.

Mcm2 e Mcm5: Após a incubação os cortes foram lavados em PBS e incubados com o anticorpo secundário (StreptABComplex/HRP – Dako, diluição 1:20) por 30 minutos a 37°C. Posteriormente os cortes foram incubados com o complexo Streptoavidina – Biotina (StreptABComplex/HRP – Dako, diluição 1:300) por mais 30 minutos. A reação foi evidenciada com diaminobenzidina (DAB) por 5 minutos e os cortes foram contracolorados com Hematoxilina de Carazzi por 5 minutos.

P53 e ki-67: Após o tempo de incubação os cortes foram lavados em PBS e incubados com o anticorpo secundário LSAB (Labelled Streptavidin Biotin – Dako, diluição 1:100) por 30 minutos a 37°C. A reação foi evidenciada com diaminobenzidina (DAB) por 5 minutos e os cortes foram contracolorados com Hematoxilina de Carazzi por 5 minutos.

Todas as reações e metodologias foram realizadas conforme instruções dos fabricantes.

Tabela 06 - Anticorpos primários, secundários, clones, fabricantes e diluições empregadas na análise imunohistoquímica das biópsias selecionadas.

Anticorpos primários	Clones	Fabricante	Diluição
p53	DO-7	DAKO	1/100
ki-67	MIB-1	DAKO	1/100
Mcm2	CRCT2.1	Novocastra	1/20
Mcm5	CRCT5.1	Novocastra	1/15
Anticorpos secundários			
Mcm2	CRCT2.1	Novocastra	1/300
Mcm5	CRCT5.1	Novocastra	1/300

A classificação quanto à positividade da reação foi realizada conforme a porcentagem de núcleos tumorais marcados, não levando em consideração a intensidade. Foram considerados: negativo: positividade entre 0 e 5% das células tumorais (-); positivo fraco: entre 5 e 25% das células tumorais (+); positivo moderado: entre 25 e 50% das células tumorais (++); positivo forte: mais que 50% das células tumorais (+++). As expressões de ki-67, Mcm2 e Mcm5 também foram classificadas de acordo com a média de células coradas em 10 campos de grande aumento (400x) de cada espécime sob microscópio óptico, não levando em consideração a intensidade. Foram contadas 500 células com o auxílio de um programa para análise de imagens (KS-400 software; KOMTROL KE 2.00, Zeiss, Germany) e encontrado um LI (labelling index) a partir da proporção entre as células positivas e totais. Além disso, também foi avaliada a extensão da imunopositividade dos quatro marcadores nas diferentes camadas epiteliais.

Dos doze casos de LVP, dezoito biópsias foram selecionadas para análise imunohistoquímica. Como todos os pacientes apresentavam mais de uma biópsia realizada, foram escolhidas áreas representativas de alterações epiteliais progressivas: hiperqueratose e acantose, displasia leve, moderada, grave e CEC – se presentes. Destas biópsias, 1 caso era de hiperqueratose e acantose – áreas sem displasia epitelial, 10 eram de displasia leve, 3 eram displasias moderadas e quatro eram CEC. Os locais de biópsia de cada paciente e cada tecido selecionado para análise imunohistoquímica estão organizados na Tabela 07.

Tabela 07 – Locais de incidência e aspectos histopatológicos encontrados nos tecidos biopsiados (continua).

Pacientes	Número de Biópsias	Data	Local de biópsia	Histopatológico
1	5	2002	1. Mucosa jugal direita	1. Acantose, hiperqueratose
		2002	2. Mucosa jugal direita	2. Acantose, hiperqueratose
		2003	3. Mucosa jugal direita	3. Displasia leve
		2003	4. Mucosa jugal direita	4. Displasia leve
		2003	5. Fórnice vestibular, gengiva vestibular, rebordo alveolar esquerdos	5. Acantose, hiperortoqueratose, displasia leve
2	4	2000	1. Rebordo alveolar superior, mucosa jugal direitos	1. Displasia leve, áreas de atrofia
		2000	2. Mucosa jugal esquerda	2. Acantose, hiperqueratose, áreas de atrofia, displasia leve
		2004	3. Mucosa jugal esquerda	3. Displasia moderada
		2005	4. Mucosa jugal esquerda	4. Acantose, hiperqueratose
3	6	2003	1. Língua (ápice)	1. Epitélio atrófico, displasia grave
		2003	2. Língua (borda lateral direita anterior, ápice)	2. Carcinoma espinocelular
		2004	3. Rebordo alveolar (região anterior) e assoalho bucal	3. Acantose, hiperqueratose, displasia moderada
		2004	4. Assoalho bucal	4. Acantose, hiperqueratose, displasia leve
		2005	5. Assoalho bucal	5. Carcinoma espinocelular
		2005	6. Língua (borda lateral esquerda)	6. Carcinoma espinocelular
4	4	2003	1. Trigonoretromolar esquerda	1. Carcinoma espinocelular
		2004	2. Área retromolar direita	2. Carcinoma espinocelular
		2004	3. Área retromolar esquerda	3. Displasia moderada
		2004	4. Rebordo alveolar inferior esquerdo	4. Carcinoma espinocelular
5	2	2003	1. Língua (borda lateral esquerda)	1. Acantose, hiperqueratose, displasia leve
		2007	2. Assoalho bucal	2. Acantose, hiperqueratose, displasia leve

Tabela 07 (conclusão) – locais de incidência e aspectos histopatológicos.

6	2	2005	1. Mucosa jugal direita	1. Acantose, hiperqueratose, displasia leve
		2005	2. Língua (borda lateral esquerda)	2. Acantose, hiperqueratose, displasia leve
7	1	2005	Mucosa labial inferior	Acantose, displasia leve
8	1	2006	Língua (borda lateral direita)	Carcinoma espinocelular
9	6	2006	1. Rebordo alveolar superior esquerdo	1. Acantose, hiperqueratose
		2006	2. Gengiva vestibular inferior direita	2- Acantose, hiperqueratose
		2006	3. Rebordo alveolar superior esquerdo	3. Acantose, hiperqueratose, displasia leve
		2006	4. Rebordo alveolar superior esquerdo	4. Displasia leve, apitélío atrófico
		2006	5. Rebordo alveolar superior direito	5. Displasia leve
		2006	6. Rebordo alveolar superior direito	6. Hiperqueratose, displasia leve
10	1	2006	Mucosa jugal esquerda	Displasia leve
11	3	2006	1. Gengiva inserida	1. Acantose, hiperqueratose, displasia leve
		2006	2. Gengiva inserida	2. Displasia leve
		2006	3. Gengiva inserida	3. Displasia leve
12	13	1991	1. Mucosa jugal	1. Displasia leve
		1991	2. Língua (borda lateral esquerda)	2. Displasia leve
		1994	3. Língua (borda lateral esquerda)	3. Acantose, hiperqueratose, displasia leve
		1996	4. Língua (borda lateral) e assoalho bucal	4. Acantose, hiperqueratose, displasia leve
		1996	5. Língua (borda lateral direita)	5. Acantose, hiperqueratose, displasia leve
		1998	6. Língua (borda lateral direita)	6. Acantose, hiperqueratose, displasia leve
		2000	7. Língua (ventre) e assoalho esquerdos	7. Displasia leve
		2002	8. Língua (borda lateral esquerda)	8. Carcinoma espinocelular
		2004	9. Assoalho bucal	9. Acantose, hiperqueratose, displasia grave
		2004	10. Assoalho bucal	10. Acantose, hiperqueratose, displasia leve
		2007	11. Rebordo alveolar inferior anterior	11. Acantose, hiperqueratose, displasia moderada
		2007	12. Assoalho bucal inferior anterior	12. Acantose, hiperqueratose
		2007	13. Fórnice inferior anterior	13. Acantose, hiperqueratose

5. RESULTADOS

5.1. Características sócio-demográficas e clínicas

Os 12 pacientes selecionados eram do gênero feminino, com idades acima de 50 anos (50% com idades acima de 70 anos, média de 69,75 anos) e 66,6% tinham cor de pele branca. A maioria dos pacientes apresentava como queixa principal alteração da cor da mucosa bucal (33%), ferida (33%) e dor (25%). O tempo de queixa das pacientes que sabiam o tempo de evolução das lesões (cinco não sabiam) variou entre 1 e 48 meses (média de 14,29 meses). Estes dados estão resumidos nas tabelas 07 e 08.

Tabela 08 - Distribuição dos pacientes de acordo com idade, gênero e cor de pele.

Pacientes	Idade (anos) na primeira consulta	Gênero	Cor de pele
1	62	Feminino	Branca
2	77	Feminino	Branca
3	64	Feminino	Parda
4	80	Feminino	Branca
5	51	Feminino	Branca
6	85	Feminino	Branca
7	84	Feminino	Branca
8	68	Feminino	Branca
9	63	Feminino	Parda
10	79	Feminino	Branca
11	70	Feminino	Branca
12	54	Feminino	Branca

Tabela 09 - Distribuição dos pacientes de acordo com queixa principal e tempo de queixa.

Pacientes	Queixa principal	Tempo de queixa (meses)
1	Dor	1
2	Alteração de cor, textura irregular	3
3	Ferida	48
4	Dor	3
5	Nódulo	36
6	Ferida, xerostomia	Desconhecido
7	Lesões em boca	Desconhecido
8	Ferida	Desconhecido
9	Dor, ferida	4
10	Alteração de cor	Desconhecido
11	Alteração de cor	Desconhecido
12	Alteração de cor	5

Com relação aos hábitos nocivos, nove pacientes eram não fumantes, sete nunca haviam fumado e sete eram não etilistas. Um paciente era fumante ($\frac{1}{2}$ maço/dia) e dois eram ex-fumantes (paciente 1 fumava 3 cigarros/dia e paciente 8 fumava $\frac{1}{2}$ maço/dia). Três eram etilistas ocasionais, com tempo de hábito não informado (Tabela 09).

Tabela 10 - Distribuição de pacientes de acordo com hábitos (fumo e ingestão de bebidas alcoólicas), tempo de utilização, tipo e quantidade.

Pacientes	Fumo	Bebidas alcoólicas
1	Ex-fumante (5 anos de hábito, tempo de interrupção do hábito não informado)	Cerveja (ocasionalmente)
2	Não	Não
3	Não	Não
4	Não	Não
5	Não	Não
6	Não	Não
7	Não	Não
8	Ex-fumante (30 anos de hábito, cessou uso há 20 anos)	Não
9	Não	Não
10	Fumante (20 anos de hábito)	Não
11	Não	Vinho (ocasionalmente)
12	Não	Cerveja (ocasionalmente)

Todos os pacientes apresentavam múltiplas lesões brancas hiperqueratóticas, recorrentes após excisão cirúrgica. As lesões com maior tempo de acompanhamento mostraram as mudanças clínicas progressivas características de LVP - aspecto inicial homogêneo, aumento do número de lesões, aumento da rugosidade superficial e/ou alteração de cor, desenvolvimento de áreas mais granulares ou verrucosas e, por fim, carcinoma verrucoso e CEC (Figuras 1 a 12).

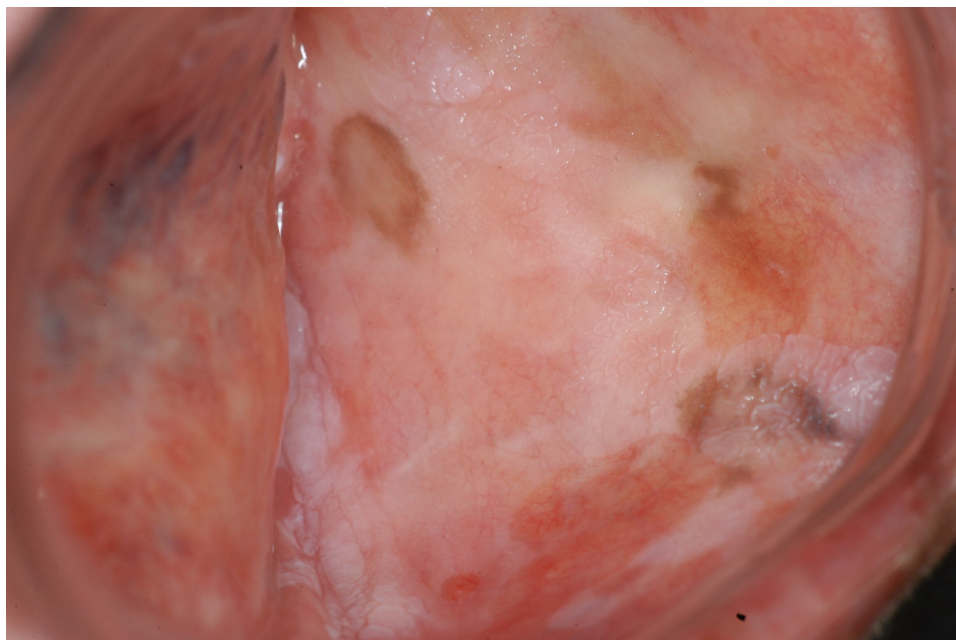


Figura 1 - Lesões leucoplásicas em mucosa jugal, estendendo-se até rebordo alveolar inferior no paciente nº. 2.



Figura 2 - Lesões leucoplásicas em rebordo alveolar superior, no paciente nº. 10.

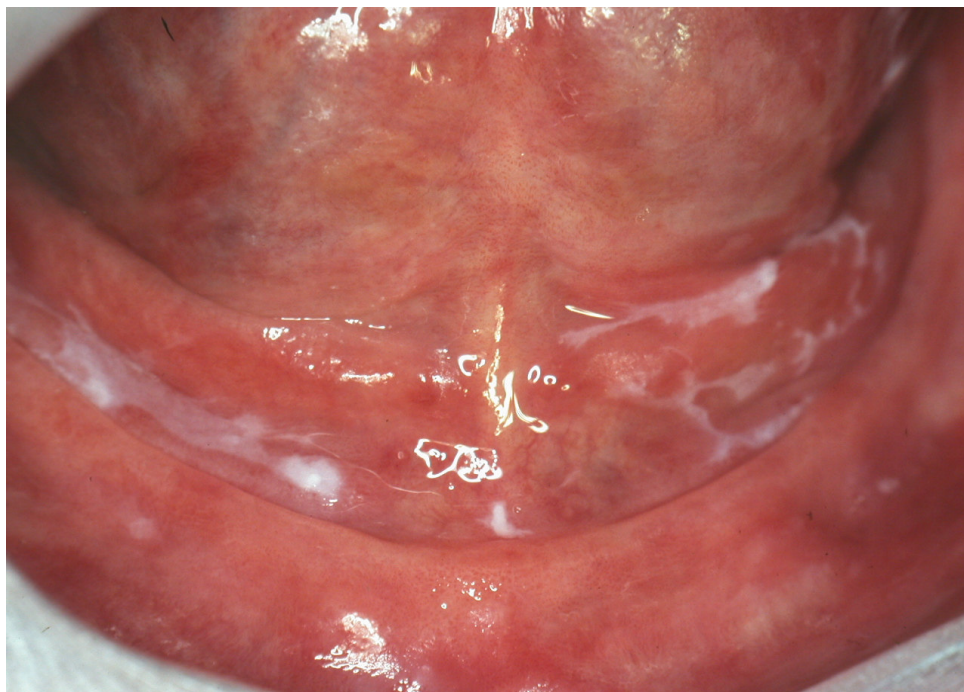


Figura 3 - Lesões leucoplásicas em assoalho bucal inferior anterior, no paciente nº. 12.



Figura 4 - Áreas leucoplásicas em rebordo alveolar inferior e gengiva inserida, no paciente nº. 9.



Figura 5 - Lesão leucoplásica em assoalho bucal com superfície mais queratótica, não homogênea, no paciente nº. 12.



Figura 6 - Leucoplasia não-homogênea com superfície hiperqueratinizada, em rebordo alveolar inferior, no paciente nº. 4.



Figura 7 - Lesão eritroleucoplásica em mucosa jugal, no paciente nº. 12.



Figura 8 - Área eritroleucoplásica envolvendo rebordo alveolar inferior e fórnice inferior anterior, no paciente nº. 2.



Figura 9 – Leucoplasia extensa, mostrando diferentes padrões: áreas regulares, hiperqueratóticas e granulares, no paciente nº. 9.

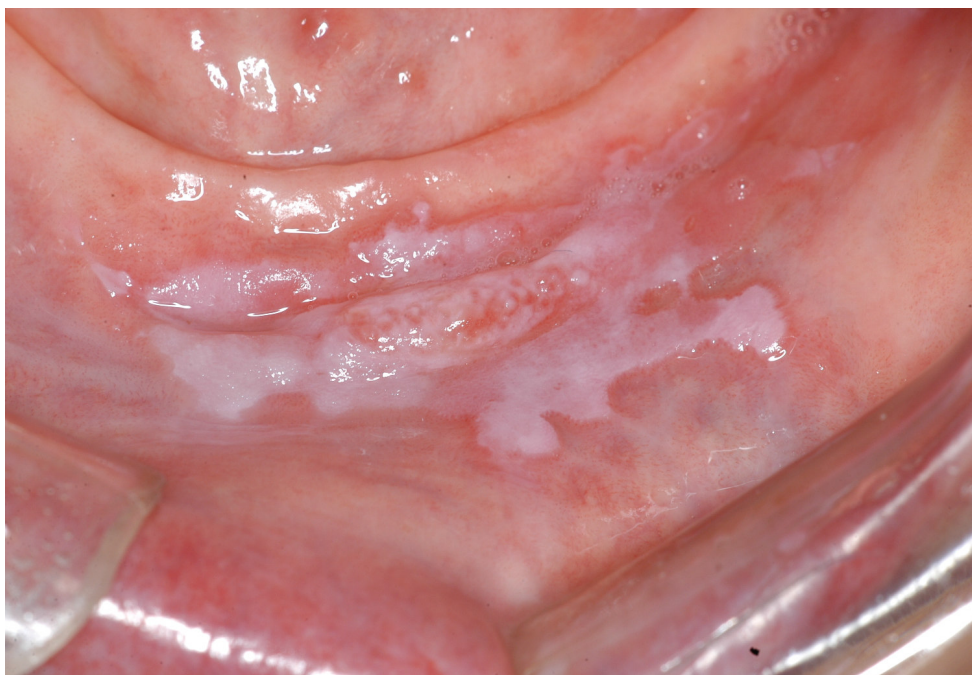


Figura 10 – Lesão leucoplásica com área central granular, no paciente nº. 12.



Figura 11 – Área leucoplásica granular que se desenvolveu a partir da lesão mostrada na figura 10.



Figura 12 – Lesão com áreas granulares e eritroleucoplásicas, infiltrativa, clinicamente sugestiva de CEC.

Os locais mais acometidos por LVP foram rebordos alveolares (24,24%), língua (18,18%) e mucosa jugal (15,15%), seguidos por gengiva (12,12%), assoalho bucal (9,09%), fórnice (9,09%), mucosa labial (6,06%), palato duro (3,03%) e palato mole (3,03%) (Tabela 10).

Tabela 11 - Distribuição dos locais das lesões leucoplásicas.

Pacientes	Localização								
	Rebordo alveolar	Gengiva	Mucosa jugal	Língua	Mucosa labial	Palato duro	Palato mole	Fórnice	Assoalho bucal
1	+	+	+					+	
2	+		+						
3	+			+					+
4	+		+		+		+		
5	+			+					+
6			+	+					
7				+	+			+	
8	+	+		+					
9		+							
10	+		+			+			
11		+							
12	+			+				+	+

Pacientes 9 e 11 apresentavam múltiplas áreas leucoplásicas em gengiva

Quatro pacientes desenvolveram CEC (pacientes 3, 4, 8 e 12) a partir de lesões leucoplásicas verrucosas pré-existentes. Paciente 3 desenvolveu cinco carcinomas espinocelulares (três biopsiados em nosso serviço de Diagnóstico Oral - Orocentro) e metástase axilar. O paciente 4 apresentou desenvolvimento de um carcinoma verrucoso e três CEC (estes diagnosticados em nosso serviço de Diagnóstico Oral - Orocentro). Todos os quatro pacientes foram submetidos à intervenção cirúrgica e os pacientes 3 e 4 à radioterapia pós-operatória (Tabela 11).

Tabela 12 – Tratamento dos pacientes que apresentaram carcinoma verrucoso e espinocelular.

Pacientes	Diagnóstico	Tratamento		
		Cirurgia	Data	RXT
3	CEC	Glossectomia parcial e esvaziamento cervical parcial esquerdos	20/12/2002	32 sessões (6400 cGy)
	CEC	Glossectomia parcial direita	31/10/2003	-
	CEC	Glossopelvectomia direita	04/03/2005	-
	CEC	Glossoplevemandibulectomia direita	17/10/2006	-
	CEC	Glossectomia parcial esquerda	17/10/2006	-
	CEC - Metástase axilar	Linfadenectomia axilar radical direita	17/10/2006	-
4	Carcinoma verrucoso	Mandibulectomia marginal, glossopelvectomia e esvaziamento cervical supraomóideo esquerdos	06/05/2003	34 sessões (6800cGy)
	CEC	Remoção de tumor em área trigonoretromolar esquerda	18/11/2003	-
	CEC	Remoção de tumor em área retromolar direita	03/2004	-
	CEC	Hemimandibulectomia esquerda	28/12/2004	-
8	CEC	Informação indisponível	Informação indisponível	Informação indisponível
12	CEC	Glossopelvectomia esquerda parcial	06/12/2002	-

5.2. Características Histopatológicas

Todas as pacientes apresentaram lesões múltiplas, com aspecto histopatológico de hiperqueratose e acantose e desenvolvimento de diferentes graus de displasia epitelial, em algum momento clínico. Os casos acompanhados por mais tempo apresentaram as mudanças características da LVP: lesões iniciais com presença de hiperqueratose e acantose variáveis, aumento da queratinização e da verrucosidade da superfície do epitélio, variados graus de acantose e hiperplasia da camada basal, desenvolvimento de diferentes graus de displasias com ocasional atrofia epitelial, e, finalmente, carcinoma espinocelular (Figuras 13 a 19).

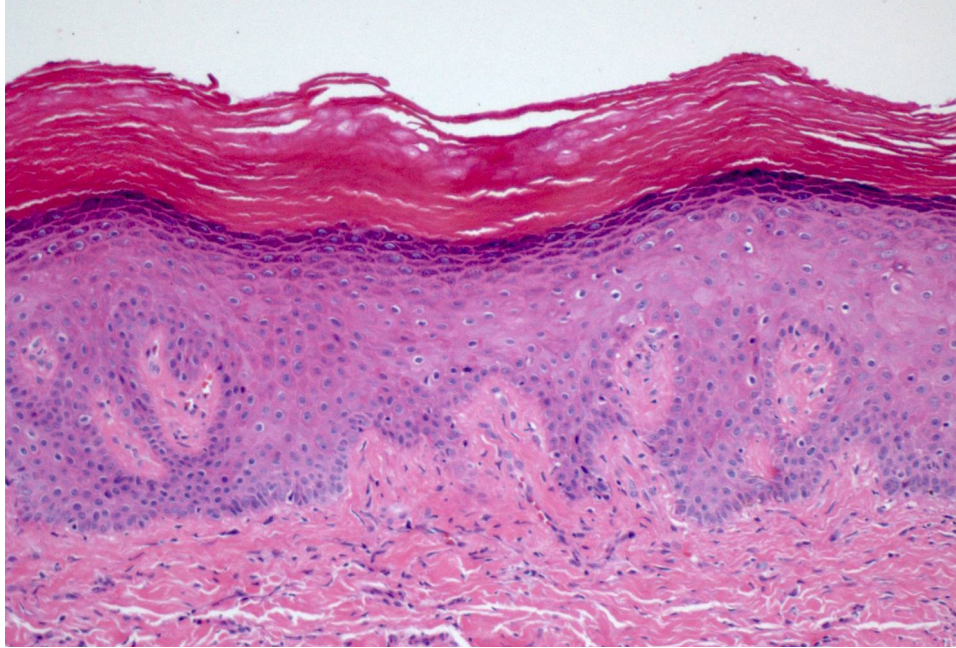


Figura 13 - Epitélio pavimentoso estratificado hiperqueratinizado, mostrando áreas de acantose (HE, aumento original de 100X).

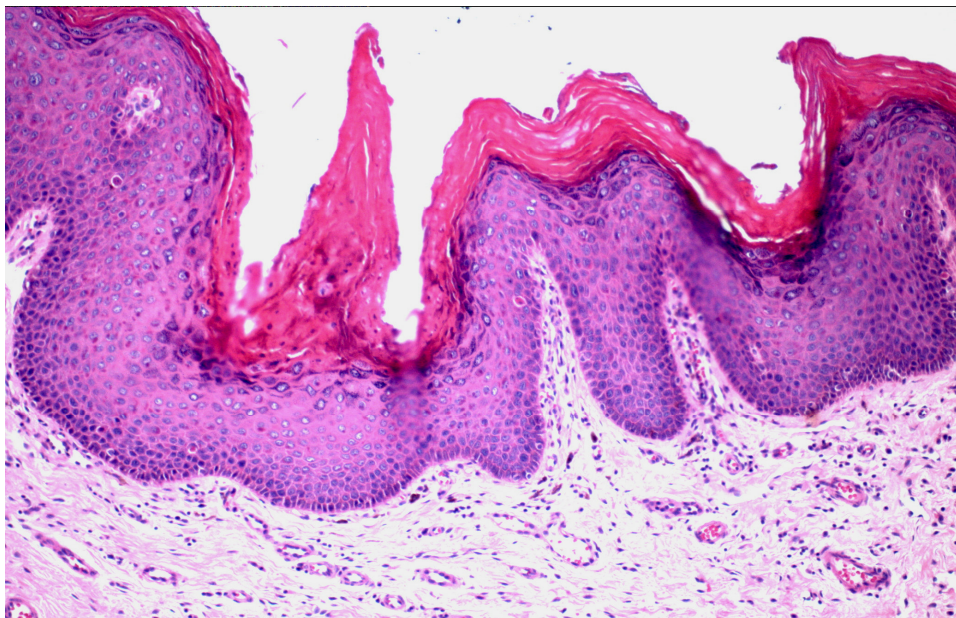


Figura 14 - Epitélio pavimentoso estratificado hiperqueratinizado, com superfície verrucosa (HE, aumento original de 100X).

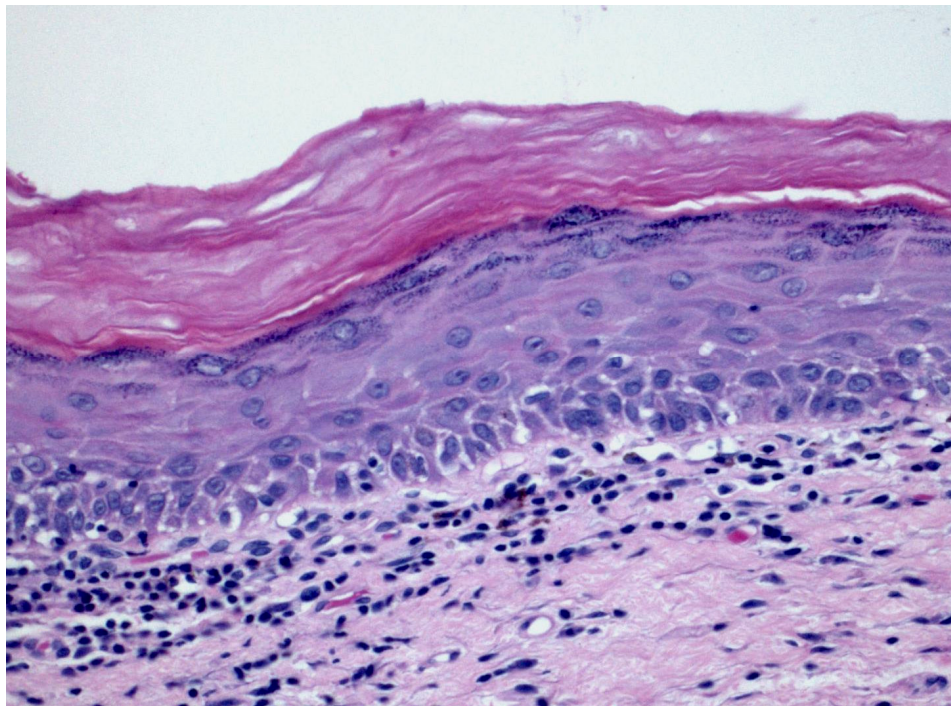


Figura 15 - Epitélio pavimentoso estratificado hiperqueratinizado, com displasia epitelial leve (HE, aumento original de 200X).

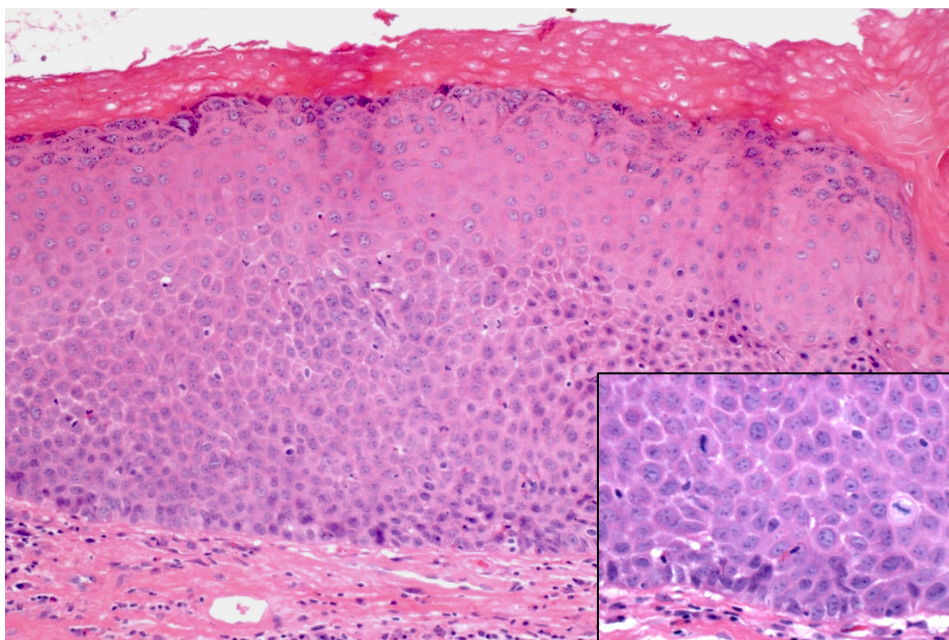


Figura 16 - Epitélio pavimentoso estratificado hiperqueratinizado, com displasia moderada. Notar mitoses suprabasais (HE, aumento original de 100X).

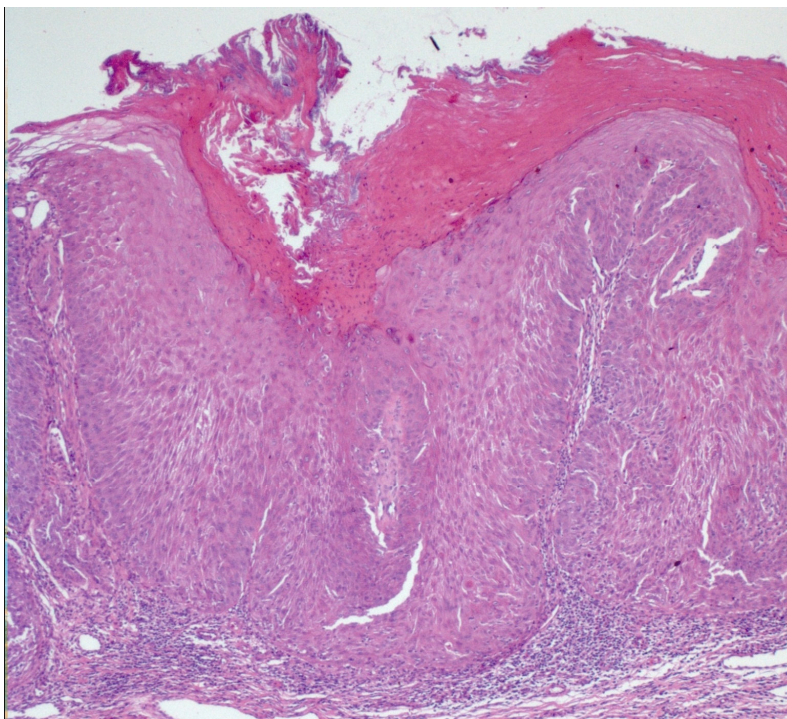


Figura 17 - Epitélio pavimentoso estratificado, com displasia grave e infiltrado inflamatório no tecido conjuntivo subjacente (HE, aumento original de 50X).

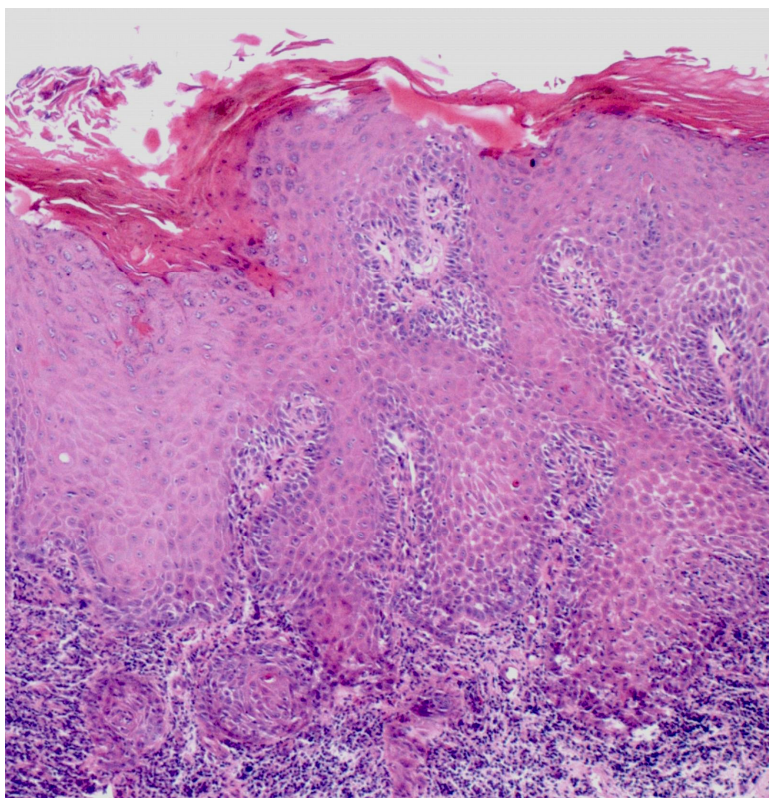


Figura 19 – Carcinoma espinocelular, com áreas de invasão tumoral (HE, aumento original de 50X).

Os 12 pacientes tiveram, ao todo, 48 biópsias realizadas, com quantidades variando entre 1 e 13 (média de 8 biópsias por paciente). Vinte e seis biópsias realizadas mostraram displasia leve (54,16%), sete apresentaram hiperqueratose e acantose (14,58%), quatro mostraram displasia moderada (8,33%), três displasia grave (6,25%) e oito eram CEC (16,66%). Em sua maioria, os pacientes acompanhados há mais tempo tiveram maior número de biópsias realizadas e mostraram alterações histopatológicas progressivas (notar paciente nº. 12, na tabela 07 - páginas 34 e 35).

5.3. Análise imunohistoquímica

Como a maioria dos pacientes possuía múltiplas biópsias e muitas destas com o mesmo aspecto microscópico, foi decidido escolher de cada paciente lâminas com aspectos histopatológicos de interesse (biópsias de hiperqueratose e acantose, diferentes graus de displasia epitelial e CEC, se existente). De modo geral, todos os casos apresentaram algum grau de positividade para todos os marcadores de proliferação celular e p53.

O caso de hiperqueratose e acantose apresentou positividade para todos os marcadores, mostrando expressão fraca para p53 e ki-67 e moderada para Mcm2 e Mcm5.

Os casos de displasia leve mostraram marcação fraca para p53 em 70% dos casos, os outros 30% foram negativos. Ki-67 apresentou imunopositividade em 100% dos casos, havendo expressão fraca em 50% dos casos e marcação moderada nos outros 50%. Mcm5 teve expressão positiva em todos os casos, apresentando marcação variada com positividade moderada (50%), fraca (40%) e forte (10%). Mcm2 apresentou positividade moderada na maioria dos casos (60%) e forte em 4 casos de displasia leve (40%).

Displasia moderada mostrou distribuição imunohistoquímica praticamente homogênea, com p53 e Mcm2 mostrando expressão moderada em 1 caso cada e ki-67 em 2 casos.

Todos os CEC apresentaram algum grau de positividade para todos os marcadores, exceto um caso que foi negativo para p53. Os marcadores de proliferação celular mostraram expressão semelhante, que variou de fraco a forte. Expressão fraca foi encontrada em Mcm5 (75% dos casos) e em ki-67 (50%), moderada em Mcm2 (75%) e forte em ki-67 (25%) e Mcm2 (25%). P53, em contrapartida, apresentou positividade forte em três dos casos estudados.

P53 mostrou expressão forte em apenas três casos, todos CEC. Somente um caso, de displasia moderada, apresentou imunopositividade moderada. Ki-67 teve expressão forte em só um caso – um CEC, e expressão moderada foi observada em cinco casos de displasia leve (50% dos casos de displasia leve) em dois casos de displasia moderada e em um CEC. Mcm2 mostrou expressão forte em três casos, todos displasias leves; um CEC e duas displasias moderadas apresentaram imunopositividade fraca e todos os outros casos tiveram marcação moderada. Mcm5 teve imunopositividade forte em apenas um caso de displasia leve; o caso de hiperqueratose e acantose, cinco displasias leves e um CEC mostraram expressão moderada. Os outros casos apresentaram marcação fraca.

A marcação de Mcm2 e Mcm5 foi igual em 44,4% dos casos e Mcm2 apresentou maior expressão que Mcm5 em dez casos (55,5%). Mcm2 apresentou maior expressão em quatro casos (22,2%), quando comparado a p53, ki-67 e Mcm5 (os quatro casos eram displasias leves).

Não foi observado, na maioria dos casos, um padrão regular de aumento de marcação conforme avanço do grau de displasia epitelial (Tabela 13).

Tabela 13 – Características histopatológicas e expressão de p53, Ki-67, Mcm2 e Mcm5, nas biópsias selecionadas.

Pacientes	Histopatológico	p53	Ki-67	Mcm2	Mcm5
9	Hiperqueratose/acantose	+	+	++	++
1	Displasia leve	+	++	+++	++
5	Displasia leve	+	++	+++	++
6	Displasia leve	+	+	++	+
7	Displasia leve	-	+	+++	+++
12	Displasia leve	+	++	++	+
10	Displasia leve	+	+	++	++
11	Hiperqueratose/acantose/displasia leve	+	++	++	++
9	Hiperqueratose/displasia leve	-	+	++	+
3	Hiperqueratose/acantose/displasia leve	-	++	++	+
2	Hiperqueratose/acantose/áreas de atrofia/displasia leve	+	+	+++	++
2	Displasia Moderada	+	++	+	+
4	Displasia moderada	++	++	++	+
12	Hiperqueratose/acantose/displasia moderada	+	+	+	+
3	CEC bem diferenciado	-	+	+	+
	CEC	+++	+	++	+
8	CEC	+++	+++	++	+
12	CEC	+++	++	++	++

O LI (Labelling Index) foi obtido através da proporção entre células positivas e o número total de células contadas por caso (500 células).

Maior LI no caso de hiperqueratose e acantose foi encontrado em Mcm2 (30%). Mcm5 apresentou LI quase três vezes maior (17,87%) que ki-67 (6,1%). Nos casos de displasia leve, os maiores LI encontrados foram em Mcm2 (em 60% dos casos, com LI variando entre 28,5% e 64,9%) e Mcm5 (40% dos casos, com variação de LI entre 29,6% e 88%) que em ki-67, cujos LI variaram de 7,6% a 39,5%. Todos os três casos de displasia moderada mostraram LI maiores em Mcm5 (86%, 87,5% e 65,8%) que Mcm2 (57,7%, 69,5% e 57,2%) e ki-67 (15,4%, 13,2%, 10,4%). Dois casos de CEC tiveram LI maiores em Mcm2 (74,8% e 78,3%) e dois casos em Mcm5 (77,1% e 49,14%)

Ki-67 apresentou LI maiores em dois casos de displasia leve (39,5% e 23,8%) e em um caso de CEC (30,10%).

Mcm2 apresentou os maiores LI em casos marcados três casos de CEC (74,79%, 78,32% e 76,84%). Os LI encontrados em três casos de displasia leve (54,39%, 57,40% e 64,97%) foram quase semelhantes aos de displasia moderada (57,24%, 57,70% e 69,52%).

Mcm5 mostrou LI maiores em dois casos de displasia moderada (86,06% e 87,52%). Depois destes, o maior LI encontrado foi o de um caso de displasia leve (86,05%). Um CEC apresentou LI igual a 77,11%, mas os outros três tiveram LI menores que alguns casos de displasia leve (Tabela 14).

Os três marcadores (Ki-67, Mcm2 e Mcm5) apresentaram um LI alto coincidente em um caso de CEC (30,10%, 76,84% e 77,11%, respectivamente) e em um caso de displasia leve (23,80%, 64,97% e 62,30%).

Tabela 14 – Características histopatológicas e LI dos marcadores (Ki-67, Mcm2 e Mcm5) em cada biópsia.

Pacientes	Histopatológico	Ki-67	Mcm2	Mcm5
9	Hiperqueratose/acantose	6,14%	30,01%	17,87%
1	Displasia leve	10,20%	32,51%	20,29%
5	Displasia leve	16,66%	35,40%	20,74%
6	Displasia leve	8,80%	46,46%	32,18%
7	Displasia leve	14,83%	54,39%	86,05%
12	Displasia leve	23,80%	64,97%	62,30%
10	Displasia leve	15,32%	37,60%	43,43%
11	Hiperqueratose/acantose/displasia leve	39,50%	28,34%	29,64%
9	Hiperqueratose/displasia leve	7,60%	28,53%	6,78%
3	Hiperqueratose/acantose/displasia leve	12,34%	57,40%	46,61%
2	Hiperqueratose/acantose/áreas de atrofia/displasia leve	10,30%	29,08%	44,14%
2	Displasia Moderada	10,43%	57,24%	65,80%
4	Displasia moderada	15,34%	78,32%	50,66%
12	Hiperqueratose/acantose/displasia moderada	15,43%	57,70%	86,06%
3	CEC bem diferenciado	19,39%	74,79%	55,31%
4	CEC	15,34%	78,32%	50,66%
8	CEC	30,10%	76,84%	77,11%
12	CEC	20,54%	31,04%	49,14%

P53 apresentou marcação da camada basal no caso de hiperqueratose e acantose, em 5 casos de displasia leve (50%) e em dois casos de displasia moderada (66,6%). Imunopositividade na camada suprabasal foi observada em um caso de displasia leve e em um de displasia moderada; expressão de p53 na

camada basal e suprabasal (marcação de um terço do epitélio) foi notada em um caso de displasia leve.

Ki-67 apresentou expressão na camada basal em apenas um caso de displasia leve; imunopositividade na camada suprabasal foi observada no caso de hiperqueratose e acantose e em quatro casos de displasia leve (40%); imunopositividade nas camadas basal e suprabasal (marcação de um terço da extensão epitelial) foi observada em cinco dos dez casos de displasia leve (50%), em todas as displasias moderadas e na maioria dos casos de CEC (três dos quatro casos)

Mcm2 e Mcm5 mostraram expressão em um terço do epitélio (camadas basal e suprabasal) no caso de hiperqueratose e acantose. Cinco dos dez casos de displasia leve (50%) e dois dos três casos de displasia moderada apresentaram extensão entre um terço e dois terços do epitélio (Mcm2 apresentou maior quantidade de casos com maior extensão de marcação epitelial que Mcm5). Dois dos quatro casos de CEC apresentaram extensa marcação do epitélio (um caso mostrou expressão de Mcm2 e 5 em dois terços do epitélio e o outro caso mostrou imunopositividade na extensão completa do epitélio). Estes resultados estão resumidos na tabela 15 e imagens das marcações imunohistoquímicas podem ser vistas nas figuras 20 a 40.

Tabela 15 – Características histopatológicas e extensão da marcação nas diferentes camadas epiteliais.

Pacientes	Histopatológico	p53	Ki-67	Mcm2	Mcm5
9	Hiperqueratose/acantose	Basal	Suprabasal	1/3	1/3
1	Displasia leve	1/3	1/3	1/3	1/3
5	Displasia leve	Basal	1/3	1/3	1/3
6	Displasia leve	Basal	1/3	Basal	1/3
7	Displasia leve	-	Suprabasal	2/3	2/3
12	Displasia leve	Suprabasal	Basal	1/3	1/3
10	Displasia leve	Basal	1/3	2/3	1/3
11	Hiperqueratose/acantose/displasia leve	Basal	Suprabasal	1/3	Suprabasal
9	Hiperqueratose/displasia leve	-	Suprabasal	Suprabasal	Suprabasal
3	Hiperqueratose/acantose/displasia leve	-	1/3	1/3	Basal
2	Hiperqueratose/acantose/áreas de atrofia/displasia leve	Basal	Suprabasal	Suprabasal	1/3
2	Displasia Moderada	Basal	1/3	2/3	1/2
4	Displasia moderada	Suprabasal	1/3	2/3	1/2
12	Hiperqueratose/acantose/displasia moderada	Basal	1/3	1/3	1/3
3	CEC bem diferenciado	-	1/3	Epitélio: - ; ilhas tumorais: periferia	Epitélio: 1/3; ilhas tumorais: periferia
4	CEC	3/3	Suprabasal	3/3	2/3
8	CEC	Epitélio: - ; ilhas tumorais: 3/3	1/3	2/3	2/3
12	CEC	Epitélio: - ; ilhas tumorais: 3/3	1/3	1/3	1/3

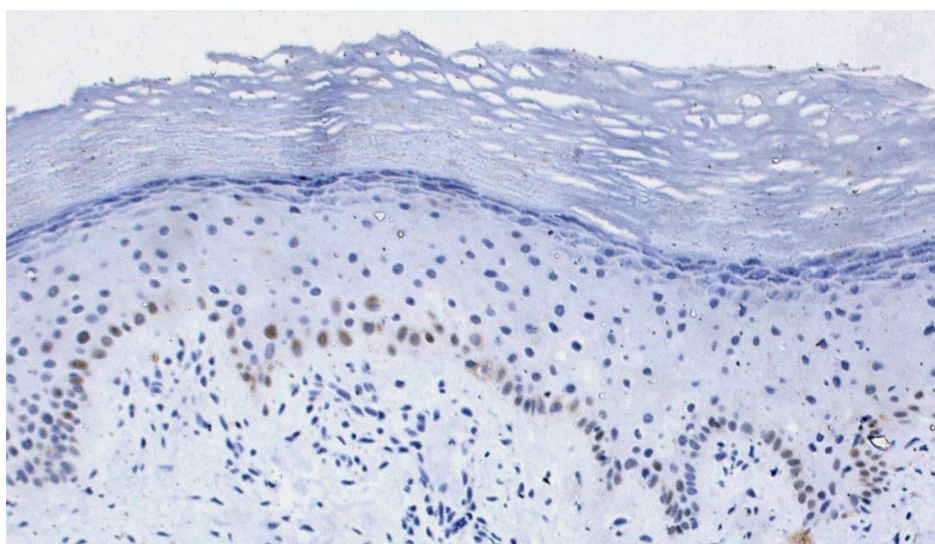


Figura 20 – Imunopositividade para p53 em algumas células da camada basal em epitélio mostrando hiperqueratose e acantose (Aumento original de 100x).

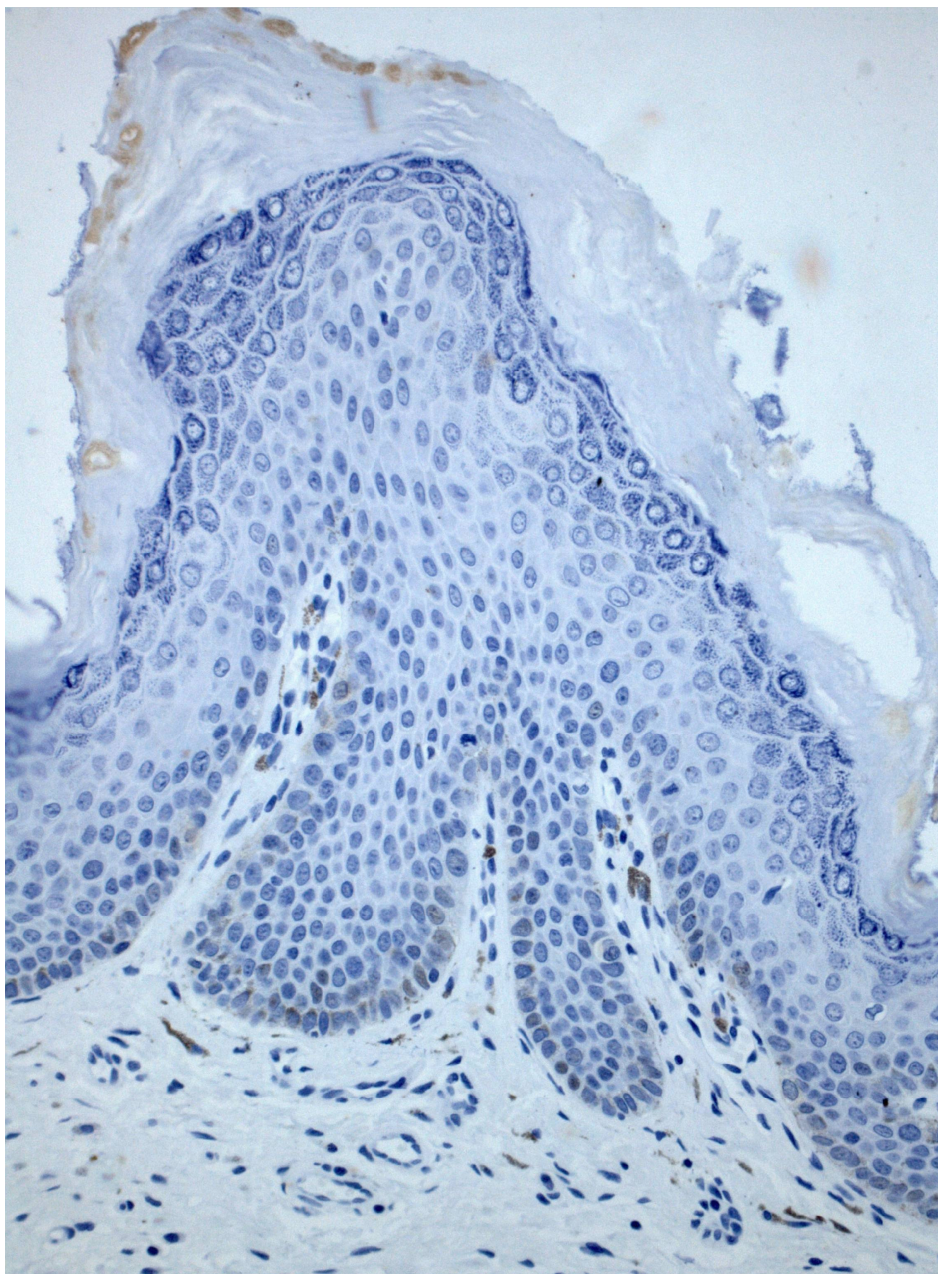


Figura 21 – Imunopositividade esparsa para p53 em poucas células das camadas basal e suprabasal em epitélio verrucoso com displasia leve (Aumento original de 200x).

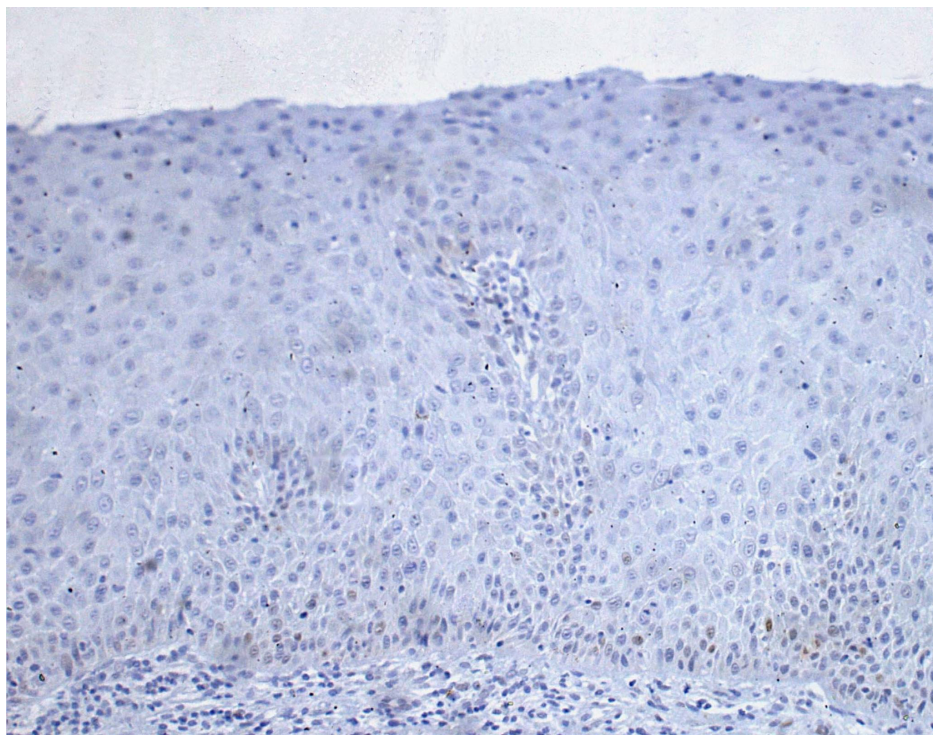


Figura 22 – Imunopositividade para p53 em algumas células da camada basal e suprabasal em epitélio com displasia moderada (Aumento original de 100x).

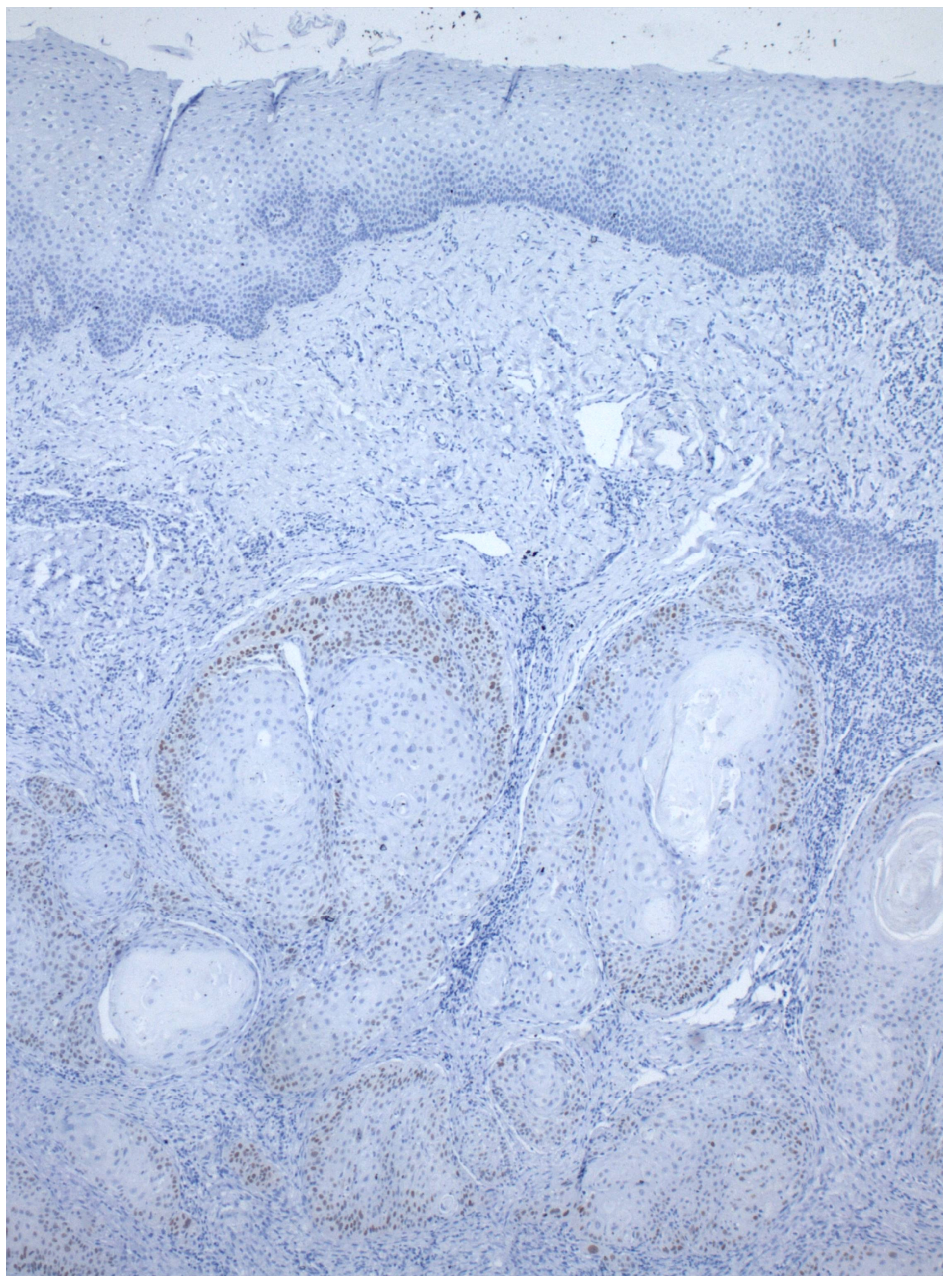


Figura 23 – Imunopositividade para p53 na periferia das ilhas tumorais em CEC bem diferenciado. Notar expressão negativa do epitélio (Aumento original de 50x).

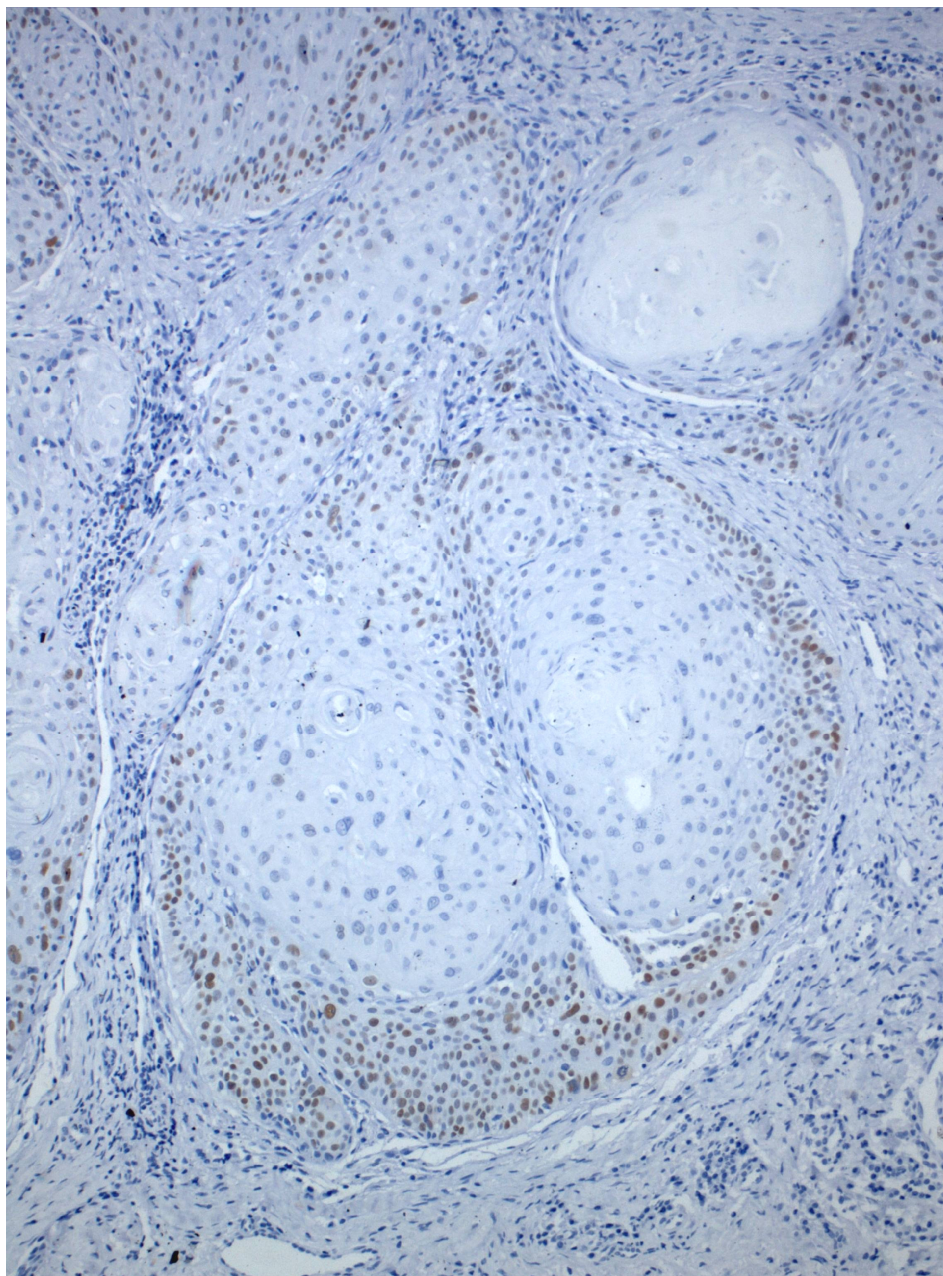


Figura 24 – Imunopositividade para p53 na periferia de ilhas tumorais em CEC bem diferenciado (Aumento original de 100x).

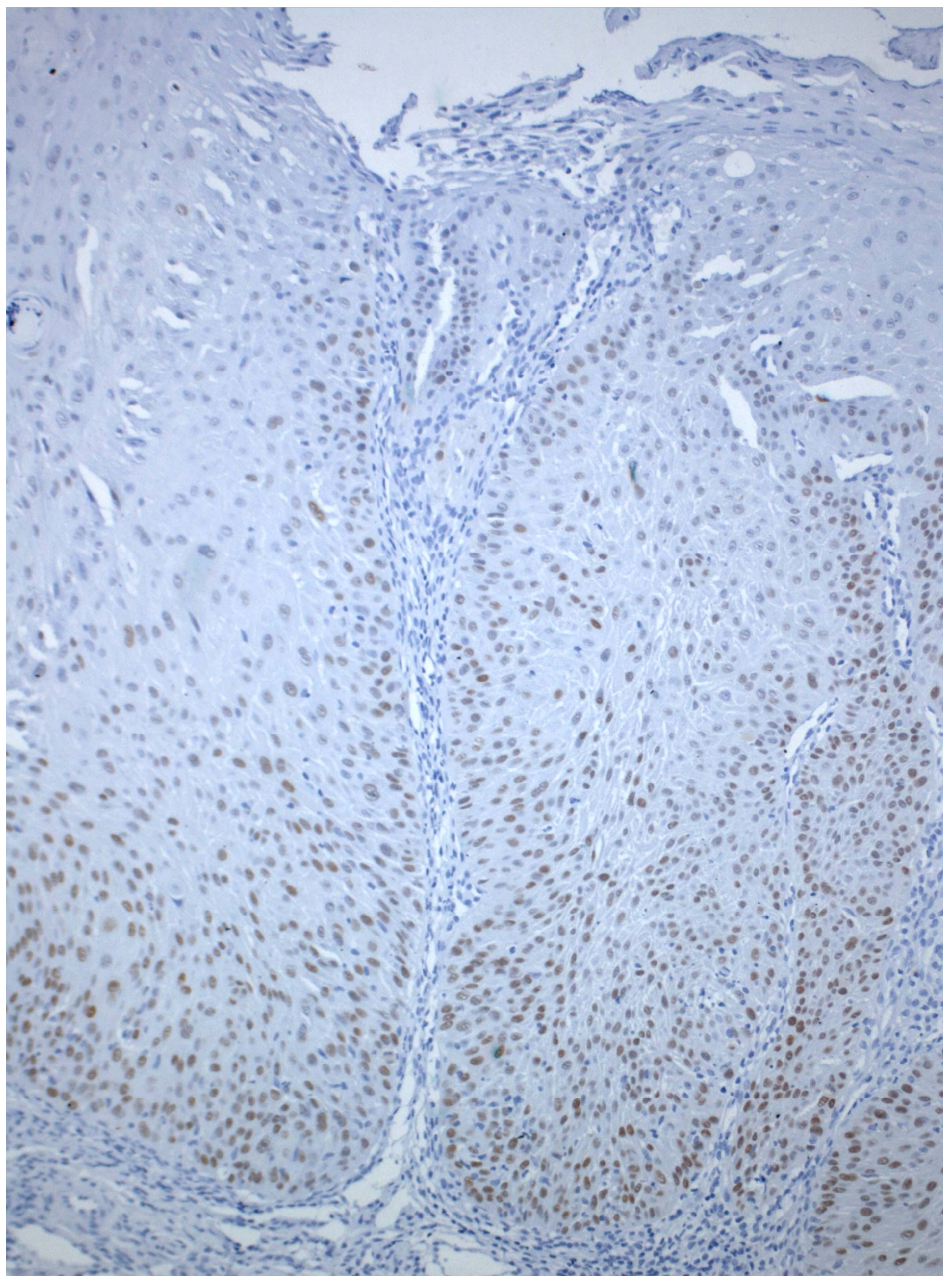


Figura 25 – Imunopositividade difusa para p53 em CEC moderadamente diferenciado (Aumento original de 100x).

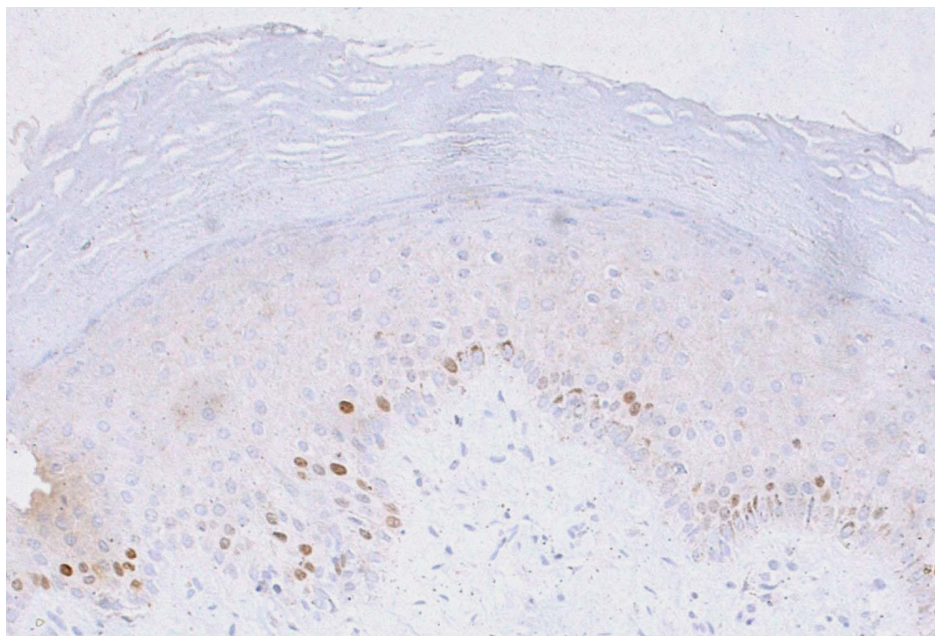


Figura 26 – Imunopositividade para ki-67 em células da camada suprabasal em epitélio mostrando hiperqueratose e acantose (Aumento original de 100x).

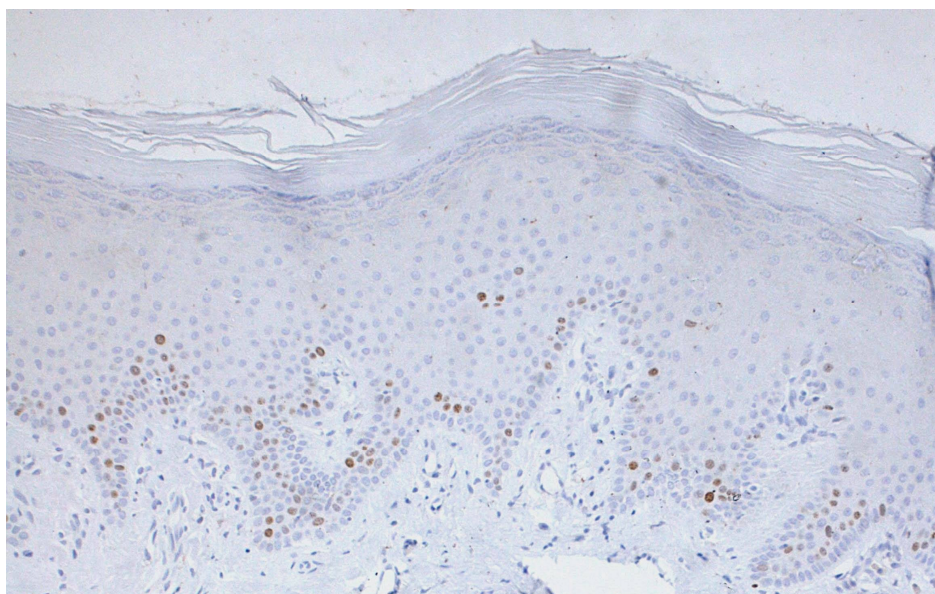


Figura 27 – Imunopositividade para ki-67 em células da camada suprabasal e em esparsas células da camada espinhosa em epitélio mostrando displasia leve (Aumento original de 100x).

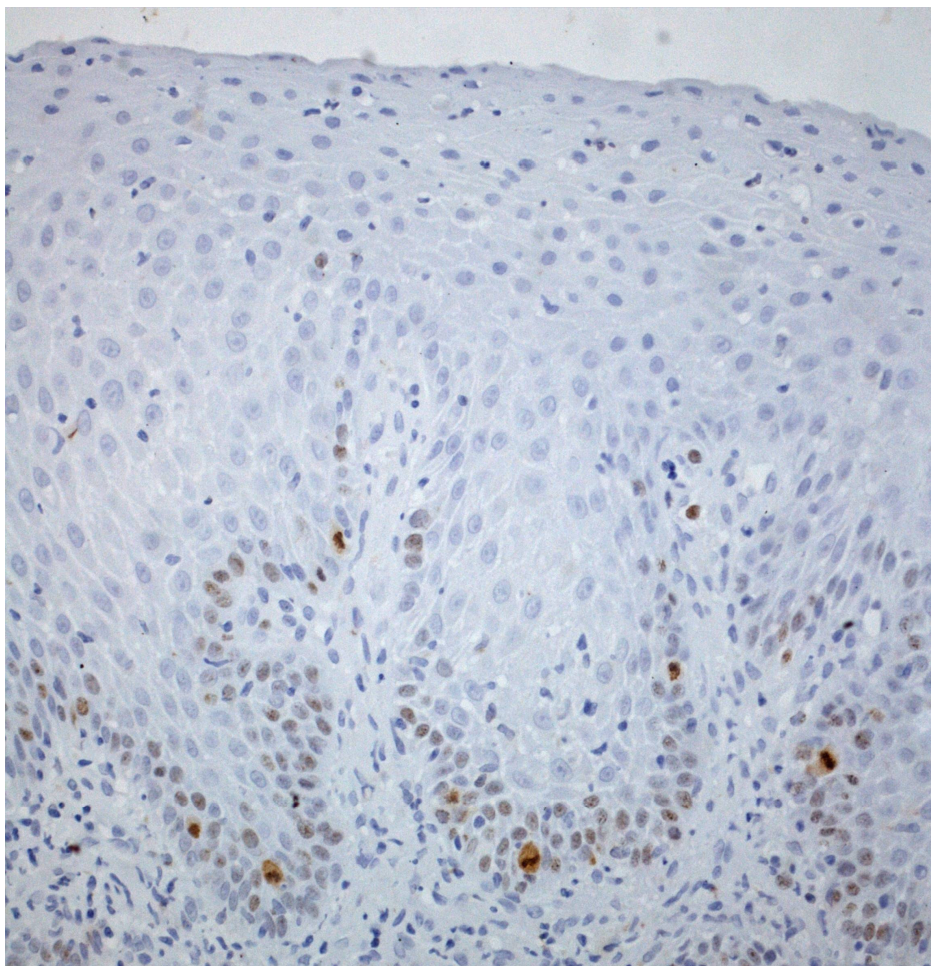


Figura 28 – Imunopositividade para ki-67 em células da camada basal e suprabasal em epitélio com displasia moderada. Notar imunopositividade das células em mitose (Aumento original de 200x).

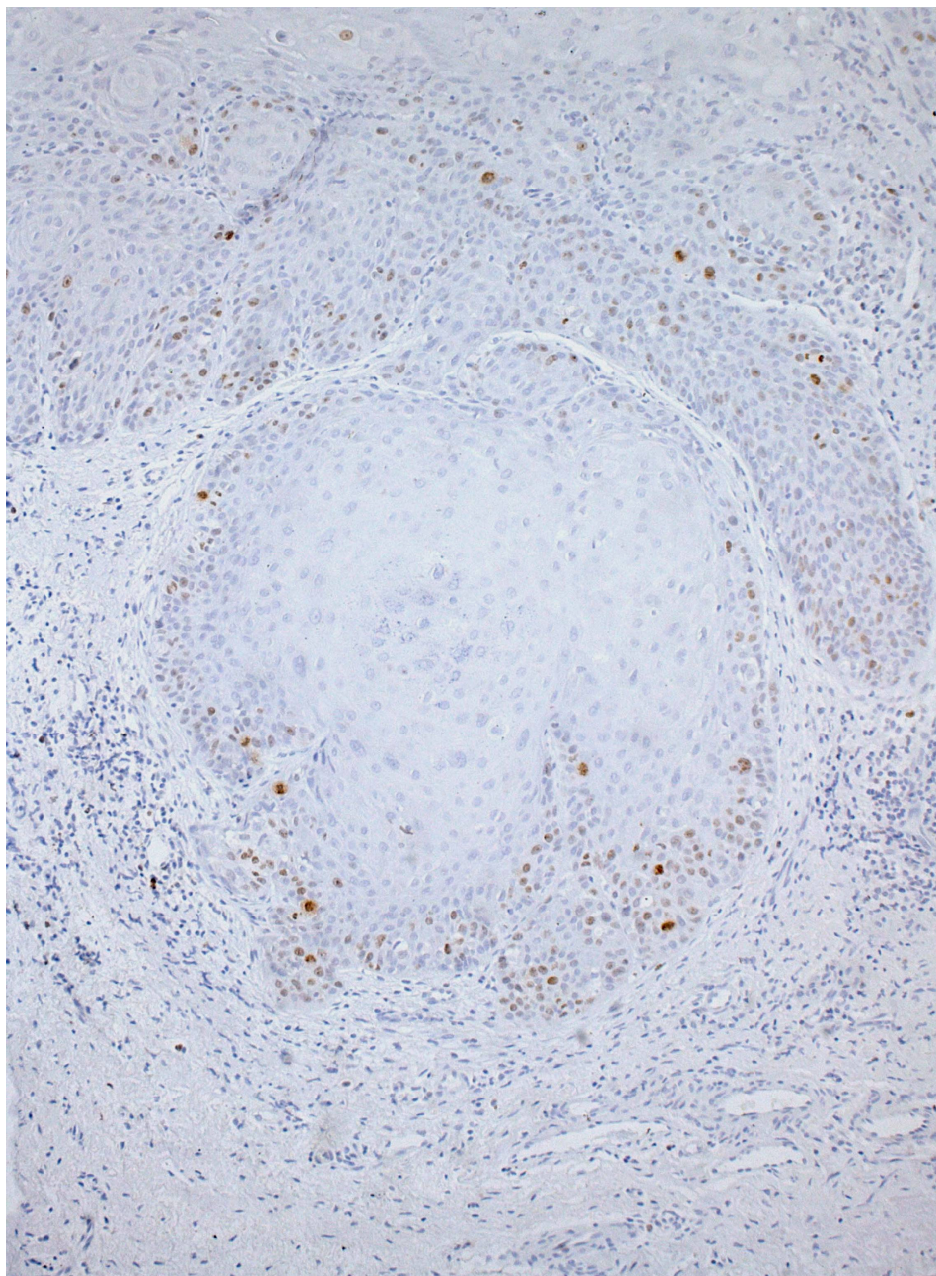


Figura 29 – Imunopositividade para ki-67 na periferia de ilha tumoral em CEC bem diferenciado (Aumento original de 100x).

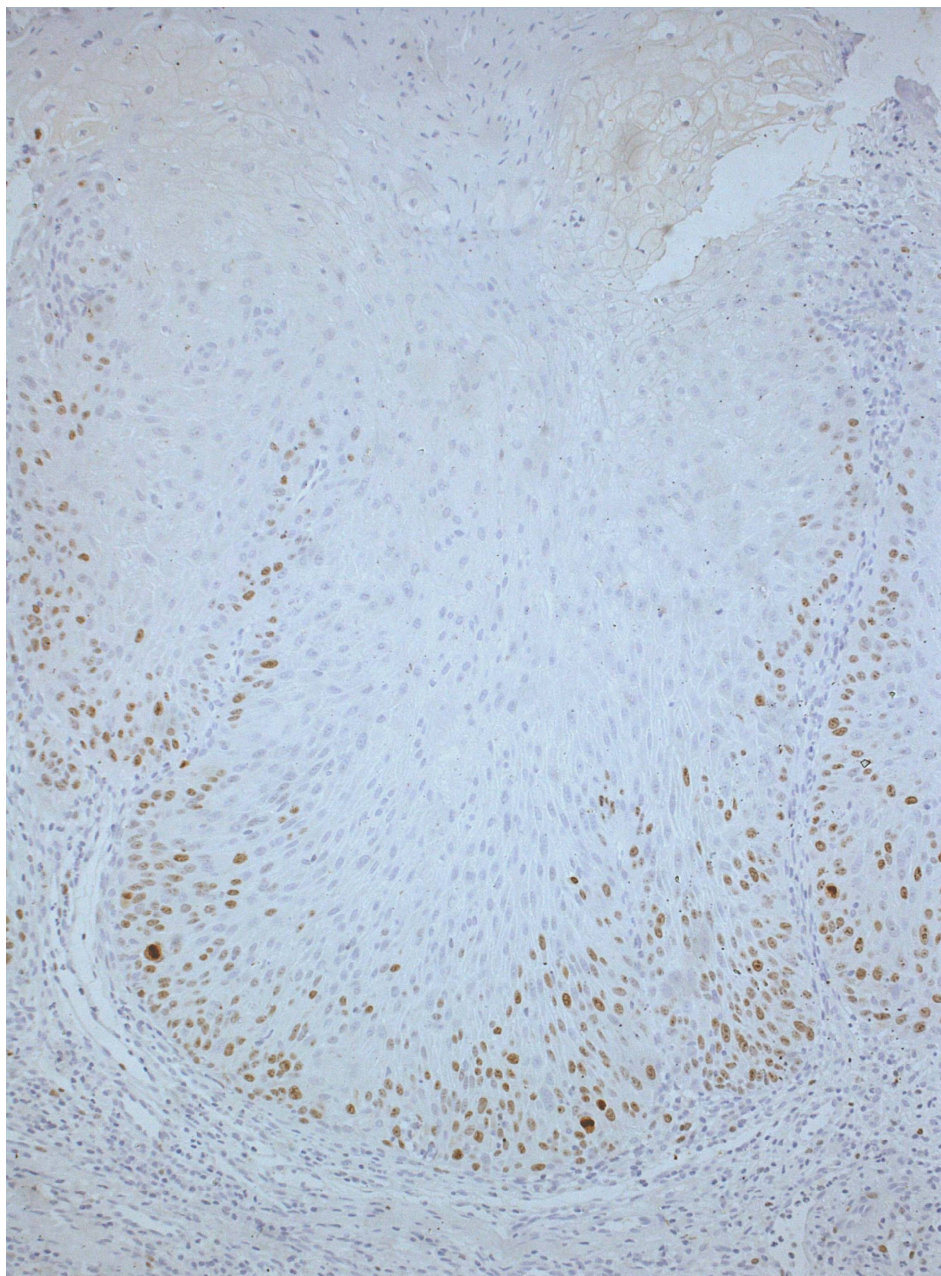


Figura 30 – Imunopositividade para ki-67 em CEC moderadamente diferenciado. Notar marcação nas camadas basal e suprabasal (Aumento original de 100x).

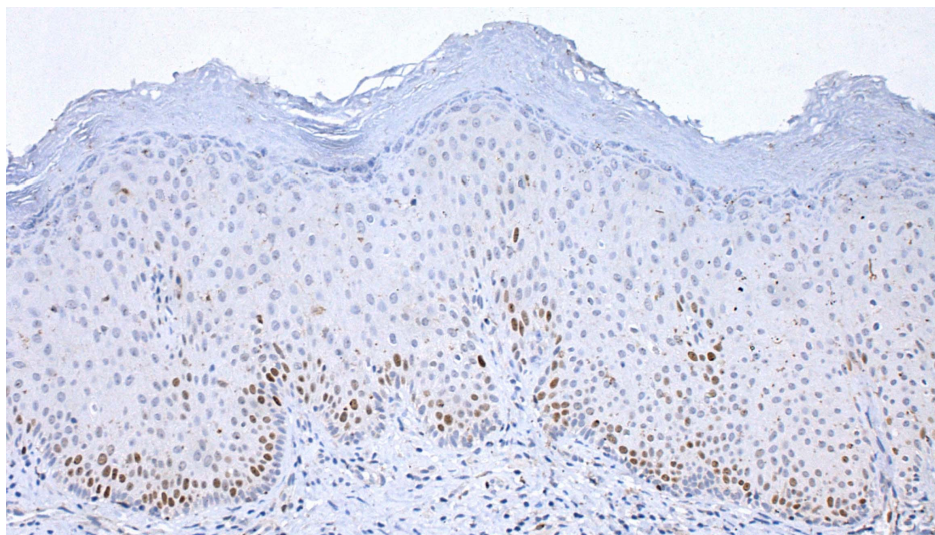


Figura 31 – Imunopositividade para Mcm2 em células da camada suprabasal em epitélio mostrando hiperqueratose e acantose (Aumento original de 100x).

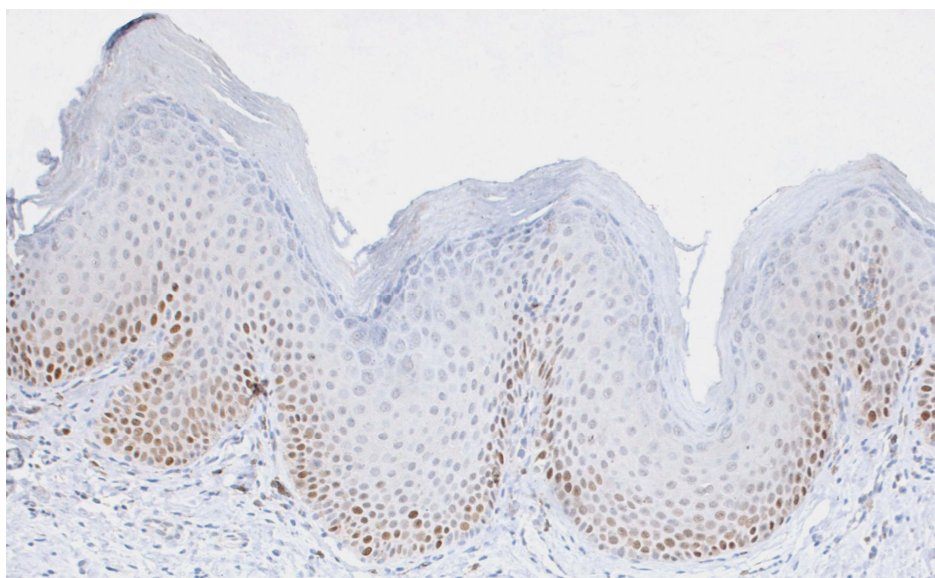


Figura 32 – Imunopositividade para Mcm2 em células da camada suprabasal e basal em epitélio com displasia leve. Notar verrucosidade do epitélio (Aumento original de 100x).

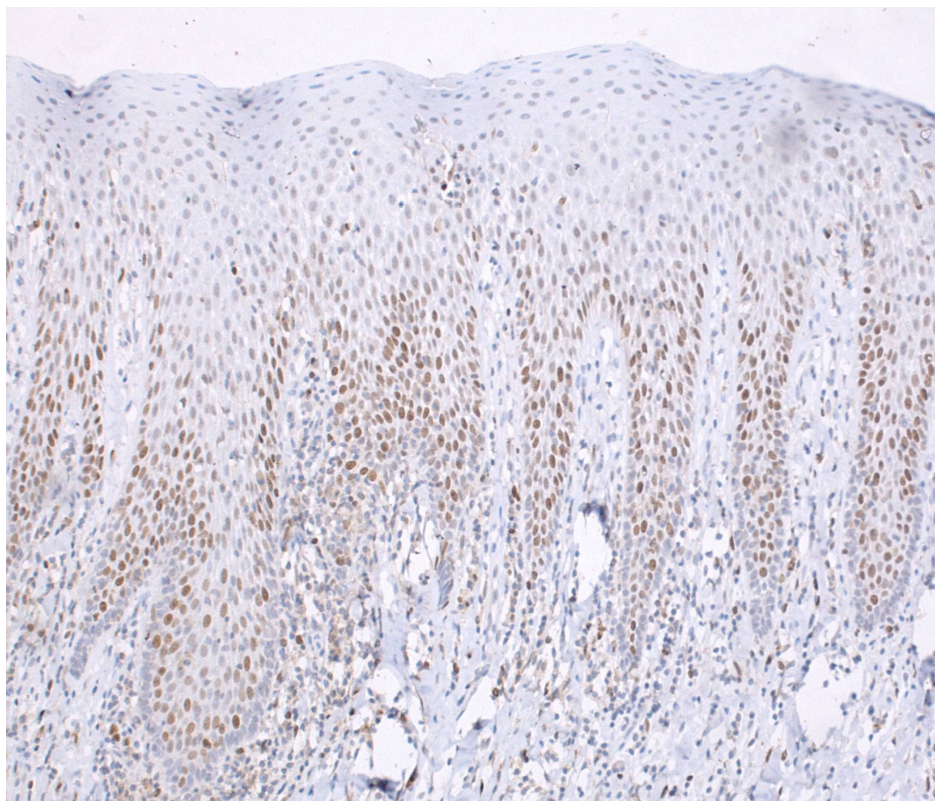


Figura 33 – Imunopositividade para Mcm2 em dois terços de epitélio com displasia moderada (Aumento original de 200x).

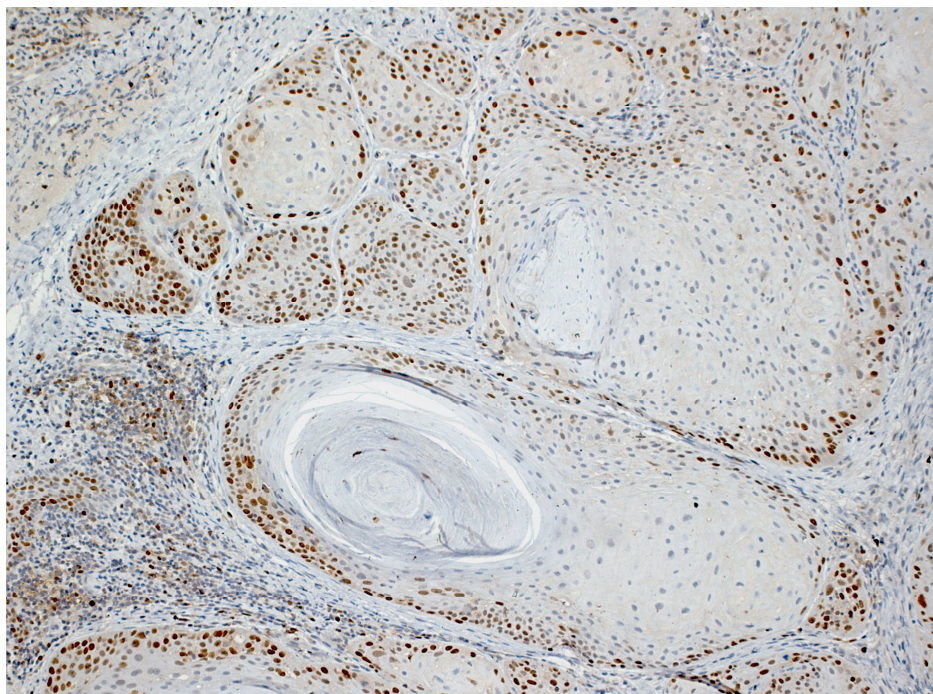


Figura 34 – Imunopositividade para Mcm2 na periferia de ilhas tumorais de CEC bem diferenciado (Aumento original de 100x).

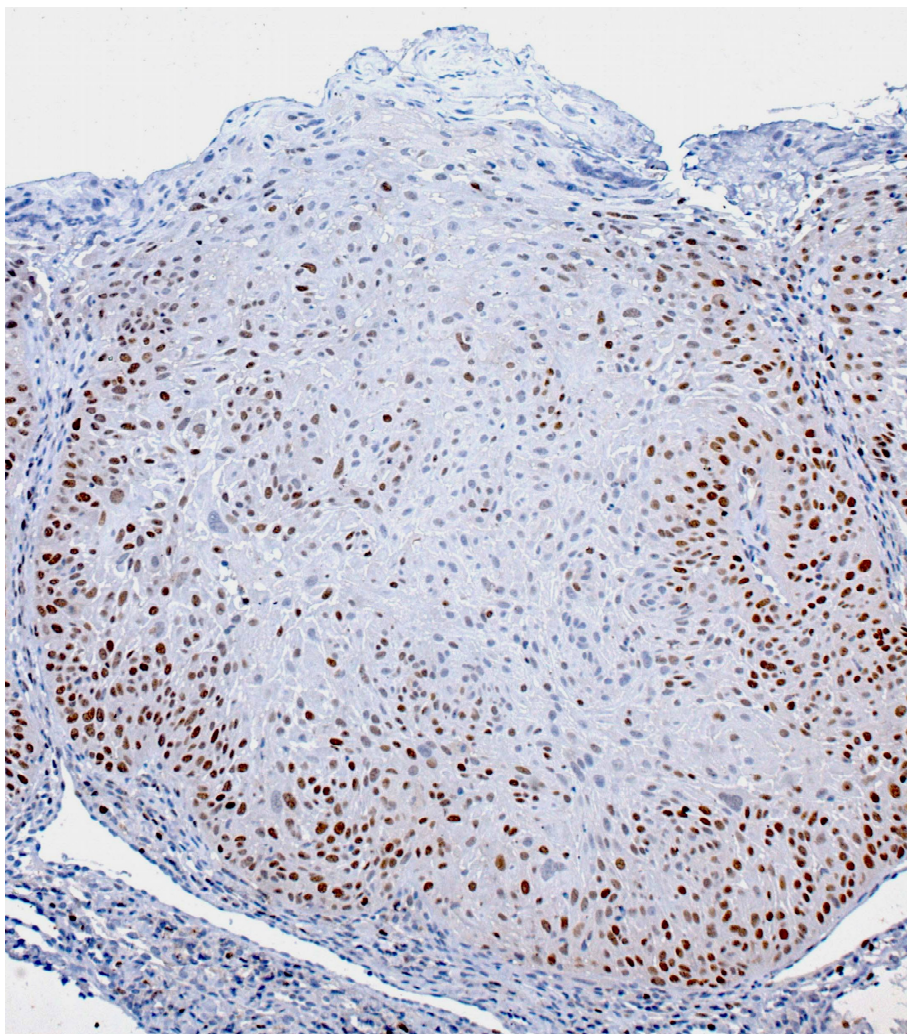


Figura 35 – Imunopositividade difusa para Mcm2 em CEC moderadamente diferenciado (Aumento original de 100x).

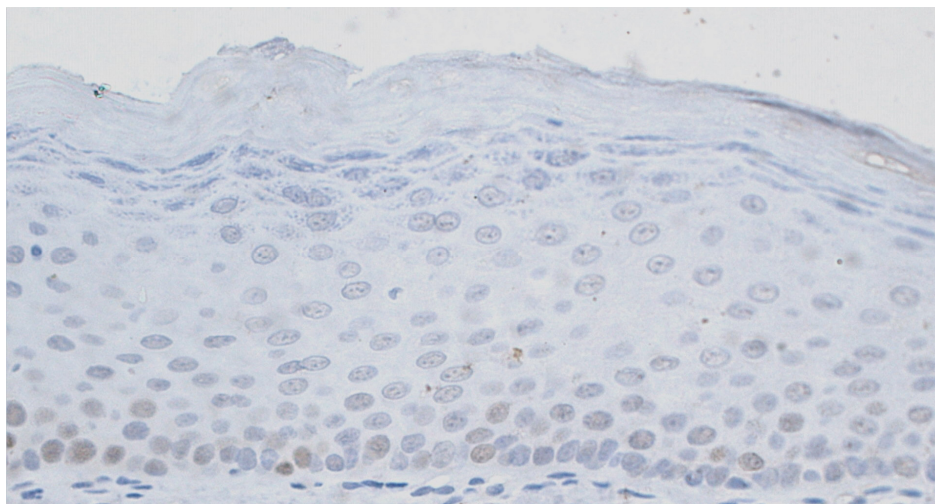


Figura 36 – Imunopositividade para Mcm5 de células da camada basal e suprabasal de epitélio mostrando hiperqueratose e acantose (Aumento original de 200x).

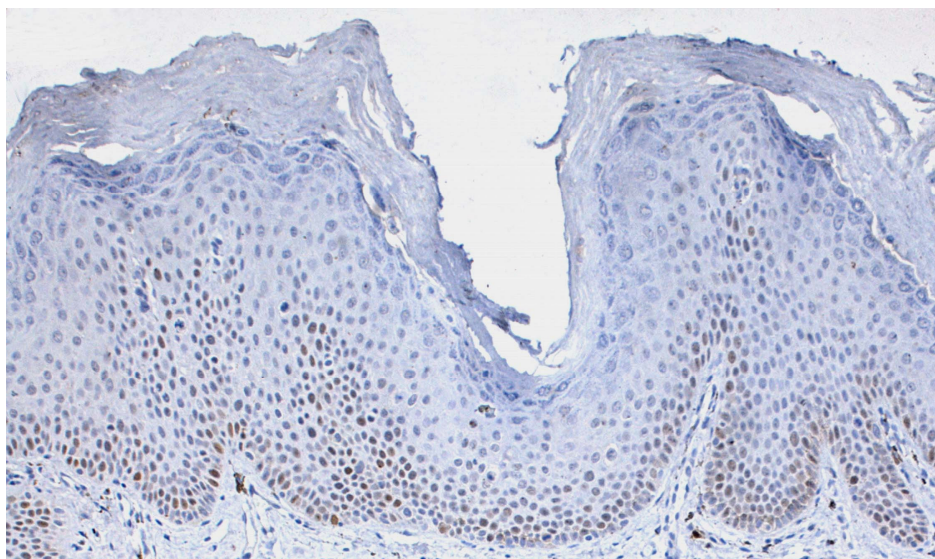


Figura 36 – Imunopositividade para Mcm5 de células da camada basal e suprabasal em epitélio verrucoso com displasia leve (Aumento original de 100x).

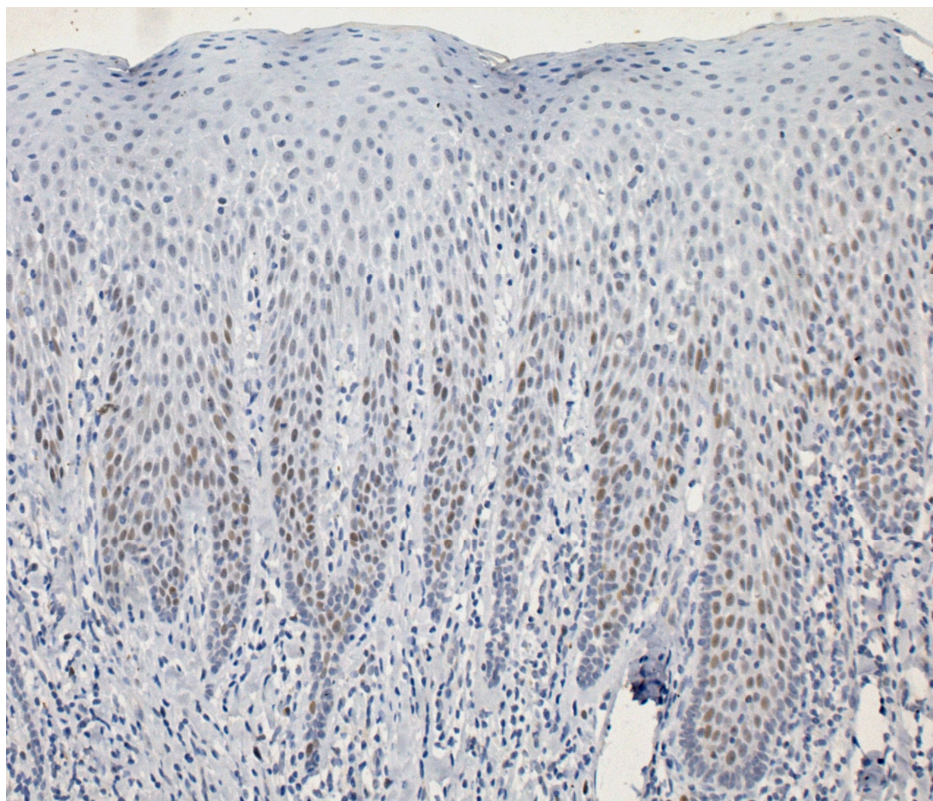


Figura 37 – Imunopositividade para Mcm5 em dois terços do epitélio com displasia moderada (Aumento original de 100x).

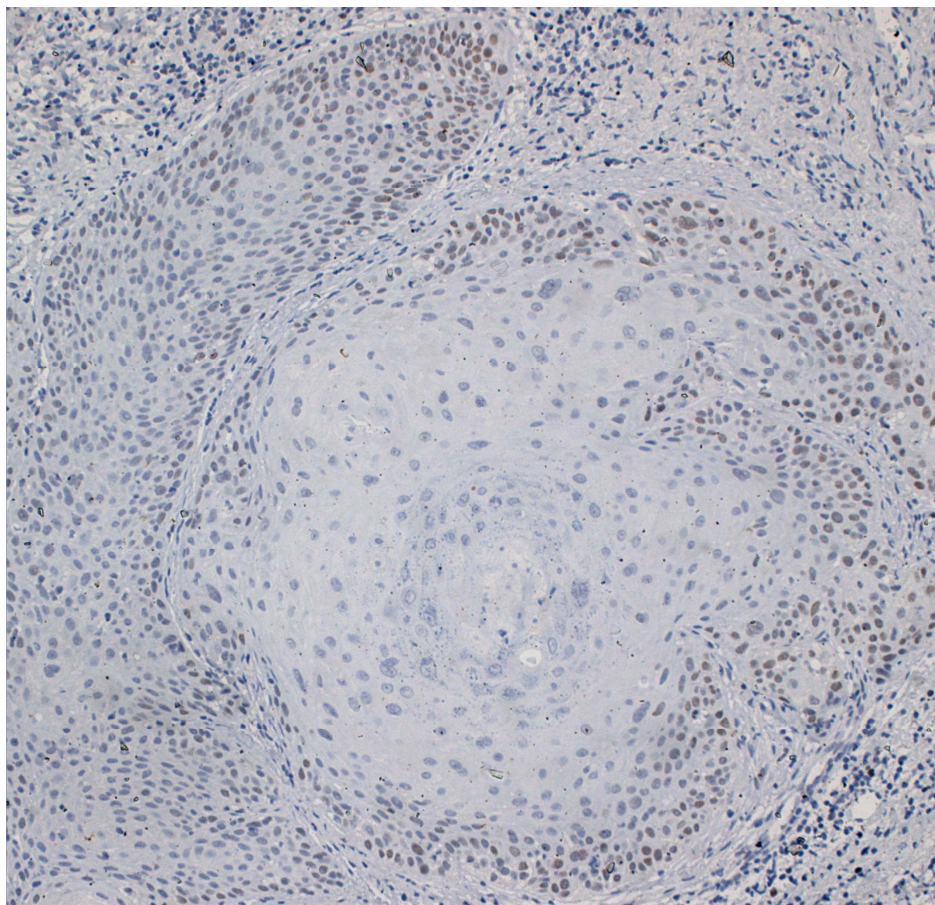


Figura 38 – Imunopositividade para Mcm5 em células da periferia de ilhas tumorais de CEC bem diferenciado (Aumento original de 100x).

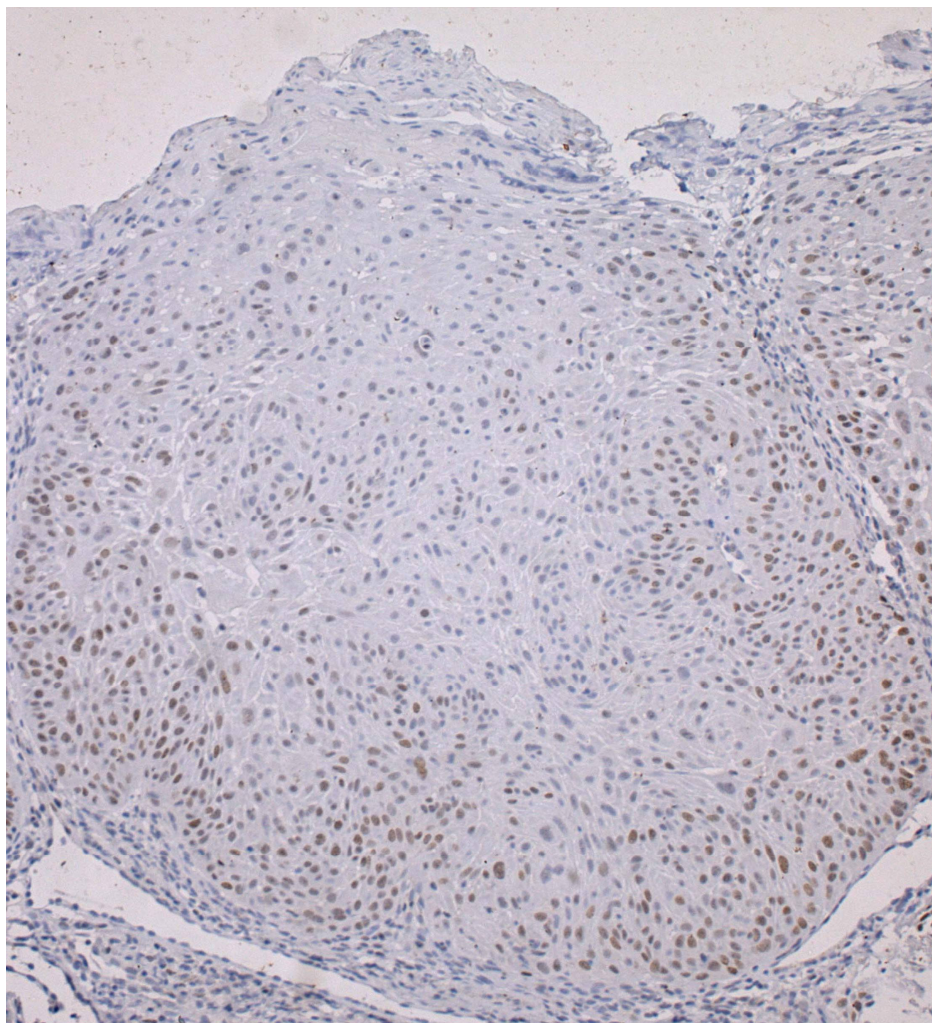


Figura 39 – Imunopositividade difusa para Mcm5 em CEC moderadamente diferenciado (Aumento original de 100x).

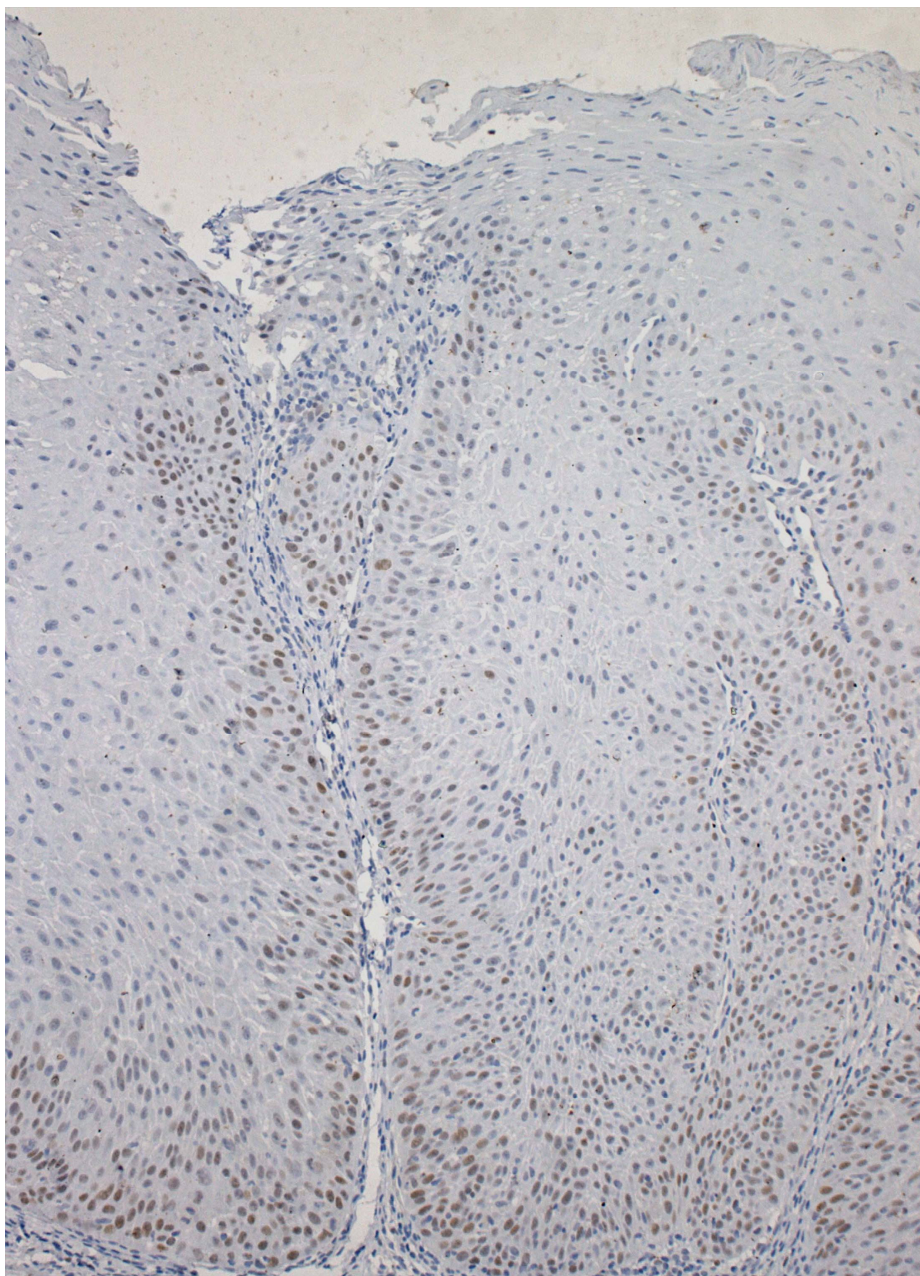


Figura 40 – Imunopositividade para Mcm5 em CEC moderadamente diferenciado. Neste corte, há maior marcação nas camadas basal e suprabasal (Aumento original de 100x).

6. DISCUSSÃO

A OMS descreve LVP como condição que afeta principalmente mulheres (prevalência homem:mulher igual a 1:4), com idade média de acometimento igual a 62 anos (Barnes *et al.*, 2005). Todos os estudos realizados em pacientes portadores de LVP confirmam o fato de que essa condição acomete principalmente mulheres, com idades no momento de diagnóstico variando entre 62 e 80 anos, (Hansen *et al.*, 1985; Murrah & Batsakis, 1994; Zakrzewska *et al.*, 1996; Silverman & Gorsky, 1997; Fetting *et al.*, 2000; Bagan *et al.*, 2003, Bagan *et al.*, 2004; Morton *et al.*, 2007). Em nosso estudo, todos os 12 pacientes eram do gênero feminino, com idades variando entre 51 e 85 anos e idade média de 69,7 anos. Cinquenta por cento destes pacientes apresentavam idades acima de 70 anos, concordando com os dados da literatura.

A maioria dos pacientes apresentava queixa principal de alteração da cor da mucosa bucal (33%), ferida (33%) e dor (25%). O tempo de queixa de sete pacientes variou entre 1 e 48 meses (média de 14,29 meses), cinco não sabiam o tempo de evolução das lesões. Os trabalhos encontrados na literatura não relatam as principais queixas e o tempo de queixa de seus pacientes.

O uso de tabaco e de álcool não tem sido diretamente associado à LVP (Eversole, 1997; Barnes *et al.*, 2005; Cabay *et al.*, 2007). Entretanto, quase todos os estudos relatados na literatura mostram que pelo menos 30% dos pacientes relatam uso de fumo (prevalência média de uso de fumo - associado ou não a betel - igual a 37%) (Hansen *et al.*, 1985; Murrah & Batsakis, 1994; Zakrzewska *et al.*, 1996; Silverman & Gorsky, 1997; Fetting *et al.*, 2000; Bagan *et al.*, 2003; Morton *et al.*, 2007). Vigliante *et al.* (2003) e Shopper *et al.* (2004) relataram que seus pacientes não utilizavam qualquer forma de fumo e não apresentavam hábito etilista. Em nosso estudo, nove pacientes eram não fumantes, sete nunca haviam fumado. Um paciente era fumante (½ maço/dia) e dois eram ex-fumantes (um paciente fumava 3 cigarros/dia, com tempo de interrupção de hábito não informado, e o outro paciente fumava ½ maço/dia, tendo interrompido o hábito há

20 anos). Assim, 91,7% de nossos pacientes eram não fumantes. Nove de nossos pacientes não eram etilistas e apenas três deles eram etilistas ocasionais, com tempo de hábito não informado

LVP pode se desenvolver em qualquer local da cavidade oral e pode aparecer inicialmente como lesão única que progride para alterações múltiplas e multifocais (Cabay *et al.*, 2007). LVP apresenta, interessante, apresentação clínica variável e progressiva (Hansen *et al.*, 1985; Zakrzewska *et al.*, 1996). Os locais de maior acometimento relatados na literatura foram rebordo alveolar, mucosa jugal e língua, e os menos envolvidos foram mucosa labial e palato (mole e duro) (Hansen *et al.*, 1985; Zakrzewska *et al.*, 1996; Batsakis *et al.*, 1999; Bagan *et al.*, 2004). Em nosso estudo, os locais mais acometidos por LVP foram rebordos alveolares (66,6%), língua (50%) e mucosa jugal (41,6%), seguidos por gengiva (33,3%), assoalho bucal (25%), fórnice (25%), mucosa labial (16,6%), palato duro (8,3%) e palato mole (8,3%) – incidências semelhantes às já relatadas.

Quase todos os pacientes incluídos em nosso estudo apresentavam múltiplas lesões brancas que se mostraram recorrentes após excisão cirúrgica. As lesões com maior tempo de acompanhamento apresentaram as mudanças clínicas progressivas características de LVP – aspecto homogêneo inicial, aumento do número de lesões, aumento da rugosidade superficial, presença ou não de alteração de cor, desenvolvimento de áreas mais granulares ou verrucosas e carcinoma verrucoso e CEC. À biópsia, a maioria dos casos mostrou aspecto microscópico de hiperqueratose e acantose e desenvolvimento de diferentes graus de displasia epitelial, em algum momento clínico. Os casos que apresentaram maior tempo de acompanhamento mostraram as mudanças típicas da LVP: lesões iniciais com hiperqueratose e acantose variáveis, aumento da queratinização e da verrucosidade da superfície do epitélio, aumento variável de acantose, desenvolvimento de hiperplasia da camada basal e de diferentes graus de displasias – com ocasional atrofia epitelial, e, por fim, carcinoma verrucoso e espinocelular. Estes achados estão em concordância com os relatos anteriores (Hansen *et al.*, 1985; Zakrzewska *et al.*, 1996; Silverman & Gorsky, 1997; Fettig *et*

al., 2000; Lopes *et al.*, 2000; Bagan *et al.*, 2003; Vigliante *et al.*, 2003; Cabay *et al.*, 2007).

Hansen *et al.* (1985); Zakrzewska *et al.* (1996); Silverman & Gorsky (1997); Fetting *et al.* (2000); Bagan *et al.* (2003), Morton *et al.* (2007) relataram tempos de acompanhamento dos pacientes variando entre 3,7 e 11,6 anos, com média de 7,8 anos. O tempo de acompanhamento de nossos pacientes variou de 1 a 16 anos com média de 4,8 anos. Durante este período, 48 biópsias foram realizadas, com quantidades variando entre 1 e 13 (média de 8 biópsias por paciente). Em alguns pacientes, várias biópsias foram realizadas na mesma lesão, por esta ter apresentado alterações das características clínicas. Zakrzewska *et al.*, em 1996, relataram média de biópsias realizadas por paciente igual a 7,7 (variação entre 4 e 13 biópsias) e Bagan *et al.*, em 2004, descreveram média de biópsias igual a 5,9 (biópsias variando entre 4 e 7). Em sua maioria, os pacientes acompanhados há mais tempo tiveram maior número de biópsias realizadas e mostraram alterações histopatológicas progressivas. Quatro pacientes tiveram pequeno número de biópsias realizado (pacientes 5, 6, 7, 8, e 10). A confirmação de que estes casos eram realmente LVP baseou-se na história clínica e na multiplicidade das lesões.

A maioria dos trabalhos encontrados na literatura descreveu 6,68 anos como tempo médio de progressão de LVP para CEC (Hansen *et al.*, 1985; Zakrzewska *et al.*, 1996; Silverman & Gorsky, 1997; Fetting *et al.*, 2000; Bagan *et al.*, 2003). O tempo médio de progressão de LVP para CEC, em nossos 4 pacientes, foi de 2,75 anos. Média de tempo curta, visto que três destes pacientes já apresentavam carcinoma na primeira consulta.

Taxas de transformação maligna relatadas em trabalhos anteriores são bem altas. Fetting *et al.* (2000) relataram 60% de desenvolvimento de carcinoma, Bagan *et al.* (2003) relataram transformação maligna em 63% de seus pacientes, Silverman & Gorsky (1997) encontraram 70%, Hansen *et al.* (1985) descreveram 87%, Zakrzewska *et al.* (1996) e Morton *et al.* (2007) relataram transformação carcinomatosa em 100% de seus pacientes. Foi encontrado, em nosso trabalho,

taxa de transformação carcinomatosa igual a 33,3%. Esta porcentagem, baixa quando comparada aos outros estudos, deve-se provavelmente ao curto tempo de acompanhamento de nossos pacientes. Dois de nossos pacientes desenvolveram mais de dois CEC. Um deles teve cinco carcinomas espinocelulares e metástase axilar e o outro paciente apresentou desenvolvimento de um carcinoma verrucoso e três CEC. Bagan *et al.*, em 2004, também relataram ocorrência de grande número de CEC em seus pacientes (todos eles tiveram, no mínimo, dois carcinomas). Os locais mais freqüentes de desenvolvimento de CEC descritos por Bagan *et al.* (2004) foram rebordos alveolares e palato (80%), mucosa jugal (30%), mucosa labial (20%) e língua (10%). Em nosso estudo encontramos maior incidência de CEC em língua (50%), seguido por rebordo alveolar (37,5%) e assoalho bucal (12,5%).

Os altos índices de transformação maligna apresentados por LVP fogem do comportamento típico das leucoplasias orais, que apresentam taxas de transformação carcinomatosa abaixo dos 10% (Silverman *et al.*, 1976; Pindborg *et al.*, 1977; Gupta *et al.*, 1980; Silverman *et al.*, 1984; Batsakis *et al.*, 1997; van der Waal *et al.*, 1997), podem permanecer estáveis ou até regredir em alguns casos (Pindborg *et al.*, 1977; Gupta *et al.*, 1980). Dessa forma, alguns estudos vêm sendo feitos na tentativa de se elucidar o comportamento tão agressivo de LVP.

Tecidos normais apresentam expressão negativa de p53 ou marcação apenas da camada basal e lesões com potencial de malignização mostram imunopositividade de acordo com o aumento do grau de displasia presente. Há positividade em células basais e parabasais em tecidos com displasia leve e marcação em toda a extensão do epitélio em displasia grave e carcinoma *in situ* (Girod *et al.*, 1993; Kerdpon *et al.*, 1997, Cruz *et al.*, 1998; Nylander *et al.*, 2000; Piatelli *et al.*, 2002). Entretanto, estes dados não foram confirmados por Cruz *et al.* (1998) e Regezi *et al.* (1995), que não encontraram associação significativa entre o padrão de expressão de p53 e os diferentes graus de displasia em suas amostras de lesões com potencial de malignização. A expressão de p53 em

carcinomas invasivos mostra-se em regiões centrais e também na periferia das ilhas tumorais, de acordo com seu grau de diferenciação (Piatelli *et al.*, 2002).

As discrepâncias entre os padrões de imunomarcacão nos distintos graus de displasia descritas em diferentes estudos podem talvez ser explicadas pelas diferenas entre as populaes estudadas, por diferenas na quantidade de cortes realizados para análise histopatológica em um mesmo tecido biopsiado e também pela variabilidade intra e inter-observadores existente na gradacão dos diferentes graus de displasia epitelial e carcinomas (Pindborg *et al.*, 1985; Abbey *et al.*, 1995; Cruz *et al.*, 1998; Pentenero *et al.*, 2003).

Gopalakrishnan *et al.* (1997) encontraram marcação mínima de p53 em mucosa oral normal, em oito de dez casos de LVP e em sete de dez casos de CEC orais. Fettig *et al.* (2000) encontraram expressão de p53 em quatro dos dez casos analisados de LVP em gengiva. Em nosso estudo, das 18 biópsias selecionadas, 14 foram positivas para p53.

Dos tecidos que mostraram expressão negativa de p53, 3 casos eram de displasia leve e um era CEC. Há a possibilidade de este caso de CEC possuir mutação no gene *TP53*, fato observado por Gopalakrishnan *et al.* (1997) em metade de suas amostras de CEC. Não há relatos na literatura que descrevam a expressão de p53 nos diferentes graus de displasia epitelial em LVP. No entanto, em displasia oral convencional, Cruz *et al.* (1998) encontraram maior quantidade de expressão negativa de p53 em lesões com displasia moderada e grave, achado distinto do observado em nossos casos, que mostraram maior negatividade em casos de displasia leve.

Leucoplasias orais convencionais mostram um padrão de expressão de p53 que aumenta conforme há aumento do grau de displasia (Girod *et al.*, 1993; Kerdpon *et al.*, 1997). Em nosso estudo, o caso de hiperqueratose e acantose, displasia leve e dois dos três casos de displasia moderada mostraram padrão de expressão de p53 muito semelhante (expressão fraca). Um caso de displasia moderada apresentou expressão moderada e três dos quatro casos de CEC apresentaram imunopositividade forte.

Piatelli *et al.* (2002) encontraram expressão de p53 nas camadas suprabasais em leucoplasias orais, displasias e CEC *in situ*. Kerdpon *et al.* (1997) relataram imunopositividade nas camadas basal e parabasal em displasias leves e moderadas e expressão de p53 também em camadas epiteliais mais superficiais em displasias grave. Cruz *et al.* (1998) relataram que 53% das lesões com expressão de p53 na camada basal não apresentavam displasia ou mostravam displasia leve, e que 57% das lesões que expressaram p53 acima da camada basal apresentavam alteração epitelial mais grave. Nossos achados não mostraram padrão de aumento de marcação epitelial conforme aumento do grau de displasia. O caso de hiperqueratose e acantose, 5 casos de displasia leve (50%) e dois casos de displasia moderada (66,6%) mostraram marcação apenas da camada basal. Um caso de displasia leve (10%) e um de moderada (33,3%) tiveram expressão de p53 apenas na camada suprabasal e um caso de displasia leve (10%) mostrou imunopositividade para p53 na camada basal e suprabasal (marcação de um terço de todo o epitélio). Se estes casos apresentarem transformação maligna durante o acompanhamento clínico, pode-se supor que o padrão de expressão de p53 seja de valor prognóstico.

Cruz *et al.* (1998) afirmaram, em seu estudo, que a imunopositividade suprabasal de p53 está associada a desenvolvimento de CEC. Eles demonstraram que 86% dos tecidos que expressaram marcação suprabasal se transformaram em CEC e que 72% dos tecidos com positividade apenas na camada basal ou com ausência de marcação permaneceram estáveis. Nos nossos casos de LVP o tempo de acompanhamento da maioria dos pacientes não é longo e 8 pacientes (66,6%) não apresentaram desenvolvimento de carcinoma. Em um dos pacientes (paciente nº. 12) pôde ser observada aumento de alteração epitelial (displasia leve, moderada e CEC), mas não o aumento esperado da expressão de p53 nas camadas do epitélio de acordo com esta progressão.

A expressão de ki-67 em leucoplasias orais é, segundo Piatelli *et al.* (2003), semelhante à encontrada em p53. Assim como em estudos com p53, existem relatos na literatura afirmando que há aumento da expressão de ki-67

conforme o avanço do grau de displasia epitelial (Girod *et al.*, 1993; Liu *et al.*, 1998; Liu *et al.*, 2000; Oliver *et al.*, 2000; Kodani *et al.*, 2001; Kövesi & Szende; 2003; Kurogawa *et al.*, 2003). Este achado, entretanto, não foi observado em nosso trabalho. O caso de hiperqueratose e acantose, cinco casos de displasia leve, um caso de displasia moderada e dois casos de CEC mostraram fraca imunopositividade, os outros cinco casos de displasia leve, dois casos de displasia moderada e um caso CEC tiveram expressão moderada de ki-67. Apenas um caso de CEC mostrou imunomarcação forte.

Cruz *et al.* (1998) afirmaram que expressão de ki-67 acima da camada suprabasal foi observada em casos com presença de displasia epitelial. Slootweg *et al.* (1994) detectaram marcação de ki-67 em toda a extensão epitelial em grande quantidade de lesões orais displásicas e imunopositividade apenas da camada basal em epitélios orais normais. Girod *et al.* (1993) descreveram expressão de ki-67 acima da camada basal em epitélios orais com diferentes graus de displasia epitelial, mas não descreveram nenhuma correlação entre aumento do padrão de marcação e progressão das alterações epiteliais. Liu *et al.* (1998) descreveram que displasias leves e moderadas mostraram imunopositividade nas camadas basais e suprabasais, enquanto que em displasias graves e carcinoma *in situ* expressão foi encontrada em camadas mais superficiais. Observamos, em nossos casos, que o caso de hiperqueratose e acantose apresentou expressão de ki-67 apenas na camada suprabasal; quatro casos de displasia leve mostraram imunomarcação da camada suprabasal e um caso mostrou positividade apenas na camada basal; cinco dos dez casos de displasia leve, todas as displasias moderadas e a maioria dos casos de CEC (três dos quatro casos) mostraram imunopositividade nas camadas basal e suprabasal (marcação de um terço da extensão epitelial). Dessa maneira, nossos achados fogem do padrão de expressão de ki-67 descrito por outros autores em leucoplasias orais.

Fettig *et al.* (2000) descreveram 10 casos de LVP encontradas em gengiva. Encontraram expressão de ki-67 nas camadas basal e suprabasal

variando entre 5% e 10%. Os autores não descreveram, entretanto, os diferentes graus de displasia epitelial e os diferentes padrões de imunomarcacão, se existiram. Liu *et al.* (1998) relataram que LI encontrados em todos os graus de displasia epitelial foram maiores que os de tecido oral normal (aumento de, aproximadamente, 8 vezes). Descreveram, ainda, que os LI obtidos nas contagens das células positivas da camada suprabasal foram semelhantes nos casos de displasia leve e moderada, enquanto que os LI encontrados nas camadas suprabasal e mais superficiais dos casos de displasia grave e carcinoma *in situ* foram maiores que os de displasias leve e moderada (aumento de 4,5 vezes nas camadas mais superficiais). Encontramos menor LI no caso de hiperqueratose e acantose e maiores LI em alguns casos de displasia leve. O número de células positivas encontradas nestes casos foi maior até que os achados nas displasias moderadas e nos CEC, padrão que foge completamente de descrito em leucoplasias orais. Pode ser que estas lesões apresentem comportamento agressivo, com rápido desenvolvimento de CEC.

Segundo Freeman *et al.* (1999) e Scott *et al.* (2006), Mcm são proteínas que regulam os complexos de pr -replicac o, logo, são marcadores sensíveis e específicos de células dentro do ciclo celular (células de ep lio displásico e neoplásicas).

Estudos de neoplasias em outros locais anatômicos, que não a cavidade oral, mostraram maior marca o de Mcm que outros marcadores de prolifera o, como Ki-67 (Freeman *et al.*, 1999; Gonzalez *et al.*, 2005; Liu *et al.*, 2007). Nossos casos de LVP também mostraram, de maneira geral, maior expressão de Mcm2 e 5 que Ki-67. Mas observamos interessantes variações de imunopositividade em cada um dos estágios de altera o epitelial. O caso de hiperqueratose e acantose mostrou marca o moderada para Mcm2 e 5 e fraca para ki-67; sete casos de displasia leve mostraram maior expressão de Mcm2 ou Mcm5 que ki-67; os casos de displasia moderada, entretanto, mostraram imunopositividade moderada em maior número de casos para ki-67 que para Mcm2 e 5. Os casos de CEC mostraram positividade semelhante para estes três

marcadores, exceto um caso que mostrou expressão forte para ki-67, moderada para Mcm2 e fraca para Mcm5.

Scott *et al.* (2006) descreveram que a expressão de Mcm2 e ki-67 restringiu-se à camada proliferativa em hiperqueratoses orais. Achados semelhantes aos de Freeman *et al.* (1999) em outros locais anatômicos. Em epitélios orais displásicos Mcm2 e ki-67 mostraram maior expressão em todas as camadas epiteliais. Na progressão hiperqueratose - displasia leve - displasia moderada – displasia grave Mcm2 mostrou aumento do número de células positivas em todas as camadas epiteliais. (Kodani *et al.*, 2001; Scott *et al.*, 2006). Em nosso estudo também foi observado, de modo geral, aumento da extensão da marcação epitelial conforme avanço das alterações epiteliais. O caso de hiperqueratose e acantose mostrou expressão de Mcm2 e 5 em um terço do epitélio, imunopositividade para ki-67 foi encontrada apenas na camada suprabasal. Cinco dos casos de displasia leve apresentaram maior extensão de positividade para Mcm2 ou Mcm5 que ki-67; dois dos três casos de displasia moderada mostraram maior extensão de expressão para Mcm2 e Mcm5 que ki-67 (Mcm2 apresentou maior número de positivities que Mcm5). Dois dos quatro casos de CEC também mostram maior extensão de imunopositividade para Mcm2 e 5 que para ki-67.

CEC bem diferenciados mostraram expressão de Mcm2 na periferia das ilhas tumorais e os menos diferenciados apresentaram padrão difuso de imunopositividade, achados que corroboram os trabalhos de Kodani *et al.* (2001), Kodani *et al.* (2003) e Scott *et al.* (2006). Nossos resultados mostraram que Mcm2 e ki-67 mostraram variação de LI semelhantes e que Mcm2 e 5 apresentaram LI bem maiores que ki-67. Estes achados entram em concordância com o relatado por Scott *et al.* (2006). Estes autores relataram valor médio de LI para Mcm2 nas hiperqueratoses orais igual a 9,2% e 21,6% para as displasias leves. Displasias moderadas apresentaram LI médio igual a 58,8% e displasias graves apresentaram valor médio igual a 77,7%. Todos os nossos casos mostraram maiores LI que os relatados por Scott *et al.* (2006). O caso de hiperqueratose e

acantose mostrou valores iguais a 30% para Mcm2 e 17,87% para Mcm5. Os casos de displasia leve apresentaram LI igual 41,47% para Mcm2 e 39,22% para Mcm5; displasias moderadas tiveram LI de 61,48% para Mcm2 e 79,8% para Mcm5. Scott *et al.* (2006) observaram, ainda, que os seus casos de CEC mostraram LI médio igual a 92%. O LI médio encontrado em nossos casos foi igual a 65,22% para Mcm2 e 58,05% para Mcm5, menores, portanto, que os relatados.

De forma resumida, verificamos em nosso trabalho que os casos analisados mostraram comportamento clínico e histopatológico semelhante ao relatado na literatura. Observamos, também, que o padrão de marcação imunohistoquímica dos quatro marcadores foi diferente do esperado em alguns casos e que a expressão de Mcm2 e Mcm5 mostrou-se maior que a de ki-67.

7. CONCLUSÕES

- 1.** Nossos achados clínicos e histopatológicos foram semelhantes aos relatados na literatura;
- 2.** Os resultados imunohistoquímicos observados foram diferentes do padrão encontrado nos casos de leucoplasias orais relatados na literatura;
- 3.** Avaliação clínica cuidadosa e acompanhamento freqüente dos pacientes é imprescindível.

REFERÊNCIAS*

Abbey LM, Kaugars GE, Gunsolley JC, Burns JC, Page DG, Svirsky JA *et al.* Intraexaminer and interexaminer reliability in the diagnosis of oral epithelial dysplasia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1995 Aug; 80(2):188-91.

Ahlgren G, Pedersen K, Lundberg S, Aus G, Hugosson J, Abrahamsson PA. Tumor cell proliferation in prostate cancer after 3 months of neoadjuvant LHRH analogue treatment is a prognostic marker of recurrence after radical prostatectomy. *Urology.* 1999 Aug; 54(2): 329-34 .

Alani RM, Münger K. Human papillomaviruses and associated malignancies. *J Clin Oncol.* 1998 Jan; 16(1): 330-7.

Alison MR, Hunt T, Forbes SJ. Minichromosome maintenance (MCM) proteins may be pre-cancer markers. *Gut.* 2002 Mar; 50(3): 290-1.

Allen CL, Loudon J, Mascarenhas AK. Sanguinaria-related leukoplakia: epidemiologic and clinicopathologic features of a recently described entity. *Gen Dent.* 2001 Nov-Dec; 49(6):608-14.

Axéll T. A prevalence study of oral mucosal lesions in an adult Swedish population. *Odontologist Revy.* 1976; 27(36):1-103.

Axéll T, Holmstrup P, Kramer IRH, Pindborg JJ, Shear M. International seminar on oral leukoplakia and associated lesions related to tobacco habits. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1984 Jun; 12(3): 145-54.

Axéll T, Pindborg JJ, Smith CJ, van der Waal I. 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. International Collaborative Group on Oral White Lesions. *J Oral Pathol Med.* 1996 Feb; 25(2):49-54.

*De acordo com a norma da UNICAMP/FOP, baseadas na norma do International Committee of Medical Journal Editors – Grupo de Vancouver. Abreviatura dos periódicos de acordo com o Medline.

Bagán JV, Jimenez Y, Sanchis JM, Poveda R, Milian MA, Murillo J *et al.* Proliferative verrucous leukoplakia: high incidence of gingival squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2003 Aug; 32(7): 379-82.

Bagán JV, Jiménez Y, Murillo J, Poveda R, Diaz J, Gavaldá C *et al.* Epstein-Barr virus in oral proliferative verrucous leukoplakia and squamous cell carcinoma: A preliminary study. *Med Oral Patol Cir Bucal.* 2008 Feb; 13(2): 110-3.

Bagán JV, Murillo J, Poveda R, Gavaldá C, Jiménez Y, Scully C. Proliferative verrucous leukoplakia: unusual locations of oral squamous cell carcinomas, and field cancerization as shown by the appearance of multiple OSCCs. *Oral Oncol.* 2004 Apr; 40(4): 440-3

Bagan JV, Jimenez Y, Sanchis JM, Poveda R, Milian MA, Murillo J *et al.* Proliferative verrucous leukoplakia: high incidence of gingival squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2003 Aug; 32(7):379-82.

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.* 1976 Dec; 42(6):766-74.

Bánóczy J, Sugár L. Longitudinal studies in oral leukoplakias. *J Oral Pathol.* 1972; 1(6): 265-72.

Bánóczy J, Sugár L. Progressive and regressive changes in Hungarian oral leukoplakias in the course of longitudinal studies. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1975 Aug; 3(4): 194-7.

Bánóczy J, Ginter Z, Dombi C. Tobacco use and oral leukoplakia. *J Dent Educ.* 2001 Apr; 65(4): 322-7.

Bánóczy J, Rigó O. Prevalence study of oral precancerous lesions within a complex screening system in Hungary. *Community Dent Oral Epidemiol.* 1991 Oct; 19(5): 265-7.

Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology & Genetics – Head and Neck Tumors. Lyon: IARC Press; 2005.

Barrett AW, Kingsmill VJ, Speight PM. The frequency of fungal infection in biopsies of oral mucosal lesions. *Oral Dis.* 1998 Mar; 4(1): 26-31.

Batsakis JG, Suarez P, el-Naggar AK. Proliferative verrucous leukoplakias and its related lesions. *Oral Oncol.* 1999 Jul; 35(4): 354-9.

Beck T, Weller EE, Weikel W, Brumm C, Wilkens C, Knapstein PG. Usefulness of immunohistochemical staining for p53 in the prognosis of breast carcinomas: correlations with established prognosis parameters and with the proliferation marker, MIB-1. *Gynecol Oncol.* 1995 Apr; 57(1): 96-104.

Bell SP, Dutta A. DNA replication in eukaryotic cells. *Annu Rev Biochem.* 2002; 71: 333-74.

Blow JJ, Dilworth SM, Dingwall C, Mills AD, Laskey RA. Chromosome replication in cell-free systems from *Xenopus* eggs. *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 1987 Dec 15; 317(1187): 483-94.

Benner SE, Winn RJ, Lippman SM, Poland J, Hansen KS, Luna MA, Hong WK. Regression of oral leukoplakia with alpha-tocopherol: a community clinical oncology program chemoprevention study. *J Natl Cancer Inst.* 1993 Jan 6; 85(1): 44-7.

Blot WJ. Alcohol and cancer. *Cancer Res.* 1992 Apr; 52(7): 2119-23.

Blow JJ, Dutta A. Preventing re-replication of chromosomal DNA. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2005 Jun; 6(6): 476-86.

Blow JJ, Hodgson B. Replication licensing — defining the proliferative state? *Trends Cell Biol.* 2002 Feb; 12(2): 72-8.

Bouquot JE, Gorlin RJ. Leukoplakia, lichen planus, and other oral keratoses in 23,616 white Americans over the age of 35 years. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1986 Apr; 61(4): 373-81.

Bouzubar N, Walker KJ, Griffiths K, Ellis IO, Elston CW, Robertson JF *et al.* Ki67 immunostaining in primary breast cancer: pathological and clinical associations. *Br J Cancer.* 1989 Jun; 59(6): 943-7.

Bridger JM, Kill IR, Lichter P. Association of pKi-67 with satellite DNA human genome in early G1 cells. *Chromosome Res.* 1998 Jan; 6(1): 13-24.

Brown DC, Gatter KC. Monoclonal antibody Ki-67: its use in histopathology. *Histopathology*. 1990 Dec; 17(6): 489-503.

Brown DC, Gatter KC. Ki67 protein: the immaculate deception? *Histopathology*. 2002 Jan; 40(1): 2-11.

Cabay JR, Morton TH, Epstein JB. Proliferative verrucous leukoplakia and its progression to oral carcinoma: a review of the literature. *J Oral Pathol Med*. 2007 May; 36(5): 255-61.

Campisi G, Giovanelli L, Ammatuna P, Capra G, Colella G, Di Liberto C *et al*. Proliferative verrucous leukoplakia vs conventional leukoplakia: no significant increased risk of HPV infection. *Oral Oncol*. 2004 Sep; 40(8): 835-40.

Campisi G, Giovanelli L, Arico P, Lama A, Di Liberto C, Ammatuna P, D'angelo M. HPV DNA in clinically different variants of oral leukoplakia and lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004 Dec; 98(6): 705-11.

Cecarelli C, Trerè D, Santini D, Taffurelli M, Chieco P, Derenzini M. AgNORs in breast tumours. *Micron*. 2000 Apr; 31(2): 143-9.

Chang J, Powles TJ, Ashley SE, Clark GM, Makris A, Assersohn L *et al*. Biologic markers as predictors of clinical outcome from systemic therapy for primary operable breast cancer. *J Clin Oncol*. 1999 Oct; 10: 3058-63.

Chang KW, Lin SC, Kwan PC, Wong YK. Association of aberrant p53 and p21 (WAF1) immunoreactivity with the outcome of oral verrucous leukoplakia in Taiwan. *J Oral Pathol Med*. 2000 Feb; 29(2): 56-62.

Chen PCH, Pan CC, Kuo C, Lin CP. Risk of oral nonmalignant lesions associated with human papillomavirus infection, betel quid chewing, and cigarette smoking in Taiwan. An integrated molecular and epidemiologic study. *Arch Pathol Lab Med*. 2006 Jan; 130(1): 57-61.

Chène P. In vitro analysis of the dominant negative effect of p53 mutants. *J Mol Biol*. 1998 Aug; 281(2):205-9.

Chiesa F, Tradati N, Sala L, Costa L, Podrecca S, Boracchi P *et al.* Follow-up of oral leukoplakia after carbon dioxide laser surgery. Arch Otolaryngol Head Neck Surg. 1990 Feb; 116(2): 177-80.

Crissman JD, Zarbo RJ. Dysplasia, in situ carcinoma, and progression to invasive squamous cell carcinoma of the upper aerodigestive tract. Am J Surg Pathol. 1989; 13: 5-16.

Cruz IB, Snijders PJ, Meijer CJ, Braakhuis BJ, Snow GB, Walboomers JM, *et al.* p53 expression above the basal cell layer in oral mucosa is an early event of malignant transformation and has predictive value for developing oral squamous cell carcinoma. J Pathol. 1998 Apr; 184(4): 360-8.

Damm DD; Curran A; White DK; Drummond JF. .Leukoplakia of the maxillary vestibule - an association with Viadent? Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 1999 Jan; 87(1): 61-6.

Dilkes MG, Benjamin E, Ovaisi S, Banerjee AS. Treatment of primary mucosal head and neck squamous cell carcinoma using photodynamic therapy: results after 25 treated cases. J Laryngol Otol. 2003 Sep; 117(9): 713-7.

Epstein JB, Gorsky M, Wong FL, Millner A. Topical bleomycin for the treatment of dysplastic oral leukoplakia. Cancer. 1998 Aug 15; 83(4):629-34.

Epstein JB, Wong FL, Millner A, Le ND. Topical bleomycin treatment of oral leukoplakia: a randomized double-blind clinical trial. Head and Neck. 1994 Nov-Dec; 16(6): 539-44.

Epstein JB, Zhang L, Poh C, Nakamura H, Berean K, Rosin M. Increased allelic loss in toluidine blue-positive oral premalignant lesions. Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod. 2003 Jan; 95(1): 45-50.

Eversole LR. Case 6: proliferative verrucous leukoplakia. J Calif Dent Assoc. 1997 Aug; 25(8): 569-78.

Eversole LR. Papillary lesions of the oral cavity: relationship to human papillomaviruses. J Calif Dent Assoc. 2000 Dec; 28(1): 922-7.

Fan GK, Ping J, Geng Y. Immunohistochemical analysis of p57 (kip2), p53 and hsp60 expression in premalignant and malignant oral tissues. *Oral Oncol.* 2006 Feb; 42(2): 147-53.

Femiano F, Gombos F, Scully C. Oral proliferative verrucous leukoplakia (PVL): open trial of surgery compared with combined therapy using surgery and methisoprinol in papillomavirus-related PVL. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2001 Aug; 30(4): 318-22.

Fettig A, Pogrel MA, Silverman SJr, Bramanti TE, Costa M, Regezi JA. Proliferative leukoplakia of the gingiva. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2000 Dec; 90(6): 723-30.

Freeman A, Morris LS, Mills AD, Stoeber K; Williams GH, Coleman N. Minichromosome maintenance proteins as biological markers of dysplasia and malignancy. *Clin Cancer Res.* 1999 Aug; 5(8): 2121-32.

Freitas MD, Blanco-Carrión A, Gándara-Vila P, Antúnez-López J, García-García A, Gándara Rey JM. Clinicopathologic aspects of oral leukoplakia in smokers and nonsmokers. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2006 Aug;102(2): 199-203.

Gapany SR, Pavelic L, Li YG, Craven JM, Jones H, Biddinger P *et al.* Relationship between immunohistochemically detectable p53 protein and prognostic factors in head and neck tumors. *Cancer Detect Prev.* 1993; 17(3): 379-86.

Garewal H. Chemoprevention of oral cancer: beta-carotene and vitamin E in leukoplakia. *Eur J Cancer Prev.* 1994 Mar; 3(2): 101-7.

Garewal HS. Beta-carotene and vitamin E in oral cancer prevention. *J Cell Biochem.* 1993; 17: 262-9.

Gerdes J, Schwab U, Lemke H, Stein H. Production of a mouse monoclonal antibody reactive with a human nuclear antigen associated with cell proliferation. *Int J Cancer.* 1983 Jan; 31(1): 13-20.

Gerdes J, Lemke H, Baisch H, Wacker HH, Schwab U, Stein H. Cell cycle analysis of a cell proliferation-associated human nuclear antigen defined by the monoclonal antibody Ki-67. *J Immunol.* 1984 Oct; 133(4): 1710-5.

Girod SC, Pfahl M. Retinoid actions and implications for prevention and therapy of oral cancer. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1996 Feb; 25(1): 69-73.

Girod SC, Krueger G, Pape HD. P53 and ki67 expression in preneoplastic and neoplastic lesions of the oral mucosa. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1993 Oct; 22(5): 285-8.

Going JJ, Keith WN, Neilson L, Stoeber K, Stuart RC *et al.* Aberrant expression of minichromosome maintenance proteins 2 and 5, and Ki-67 in dysplastic squamous oesophageal epithelium and Barrett's mucosa. *Gut* 2002 Mar; 50(3): 373-7.

Gonzalez MA; Tachibana KE; Laskey RA; Coleman N. Control of DNA replication and its potential clinical exploitation. *Nat Rev Cancer.* 2005 Feb; 5(2): 135-41.

Gonzalez MA; Tachibana KE; Chin SF, Callagy G, Madine MA, Vowler SI *et al.* Geminin predicts adverse clinical outcome in breast cancer by reflecting cell-cycle progression. *J Pathol.* 2004 Oct; 204(2):121-30.

Gopalakrishnan R, Weghorst CM, Lehman TA, Calvert RJ, Bijur G, Sabourin CL *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.* 1997 Apr; 83(4): 471-477.

Gorsky M, Epstein JB. The effect of retinoids on premalignant oral lesions: focus on topical therapy. *Cancer.* 2002 Sep; 95 (6): 1258-64.

Gottardi O, Tabiaddon D, Scanzi F, Bono A, Maino M, Ferrari M *et al.* Clinical and prognostic usefulness of Ki67 determination in breast carcinoma. *Pathologica.* 1992 Nov-Dec; 84(1094): 15-22.

Greenblatt MS, Bennett WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res.* 1994 Sep 15; 54(18): 4855-78.

Gupta PC. A study of dose-response relationship between tobacco habits and oral leukoplakia. *Br J Cancer*. 1984 Oct; 50(4): 527-31.

Gupta PC, Bhonsle RB, Murti PR, Daftary DL, Mehta FS, Pindborg JJ. An epidemiologic assessment of cancer risk in oral precancerous lesions in India with special reference to nodular leukoplakia. *Cancer*. 1989 Jun; 63(11): 2247-52.

Gupta PC, Hebert JR, Bhonsle RB, Murti PR, Mehta H, Mehta FS. Influence of dietary factors on oral precancerous lesions in a population-based case-control study in Kerala, India. *Cancer*. 1999 May; 85(9): 1885-93.

Gupta PC, Mehta FS, Daftary DK, Pindborg JJ, Bhonsle RB, Jainawalla PN *et al*. Incidence rates of oral cancer and natural history of oral precancerous lesions in a 10-year follow-up study of Indian villagers. *Community Dental and Oral Epidemiology*. 1980 Aug; 8(6): 287-333.

Gupta PC, Murti PR, Bhonsle RB, Mehta FS, Pindborg JJ. Effect of cessation of tobacco use on the incidence of oral mucosal lesions in a 10-yr follow-up study of 12,212 users. *Oral Dis*. 1995 Mar; 1(1): 54-8.

Hammersley N, Ferguson MM; Rennie JS. Topical bleomycin in the treatment of oral leukoplakia: a pilot study. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 1985 Aug; 23(4): 251-8.

Hansen LS, Olson JA, Silverman S Jr. Proliferative verrucous leukoplakia. A long-term study of thirty patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 1985 Sep; 60(3): 285-98.

Hashibe M, Sankaranarayanan R, Thomas G, Kuruvilla B, Mathew B, Somanathan T *et al*. Alcohol drinking body mass index and the risk of oral leukoplakia in an Indian population. *Int J Cancer*. 2000 Oct; 88 (1): 129-34.

Hogewind WF, van der Waal I. Prevalence study of oral leukoplakia in a selected population of 1,000 patients from Netherlands. *Community Dent Oral Epidemiol*. 1988 Oct; 16(5): 302-5.

International Agency for Research on Cancer. Acetaldehyde. IARC monographs on the evaluation of carcinogenic risk to humans. Re-evaluation of

some organic chemicals, hydrazine and hydrogen peroxide (part two). . IARC Pres, Vol 71. Lyon: 1999: 319-35.

International Agency for Research on Cancer. IARC Monographs on the evaluation of carcinogenic risk of chemicals to humans. IARC Press, Vol. 37, Lyon, 1985.

Jaber MA, Porter SR, Gilthorpe MS, Bedi R, Scully C. Risk factors for oral epithelial dysplasia – the role of smoking and alcohol. *Oral Oncol.* 1999 Mar; 35(2): 151-6.

Jacob BJ, Straif K, Thomas G, Ramadas K, Mathew B, Zhang ZF *et al.* Betel quid without tobacco as a risk factor for oral precancers. *Oral Oncol.* 2004 Aug; 40(7): 697-704.

Jacquemier JD, Penault-Llorca FM, Bertucci F, Sun ZZ, Houvenaeghel GF, Geneix JA *et al.* Angiogenesis as a prognostic marker in breast carcinoma with conventional adjuvant chemotherapy: a multiparametric and immunohistochemical analysis. *J Pathol.* 1998 Feb; 184(2): 130-5.

Jeng JH, Chang MC, Hahn LJ. Role of areca nut in betel quid-associated chemical carcinogenesis: current awareness and future perspectives. *Oral Oncol.* 2001 Sep; 37(6): 477-92.

Jiang WW, Fujii H, Shirai T, Mega H, Takagi M. Accumulative increase of loss of heterozygosity from leukoplakia to foci of early cancerization in leukoplakia of the oral cavity. *Cancer* 2001 Nov; 92(9): 2349–56.

Kannan R, Bijur GN, Mallery SR, Beck FM, Sabourin CL, Jewell SD, *et al.* Transforming growth factor-alpha overexpression in proliferative verrucous leukoplakia and oral squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1996 Jul; 82 (1): 69-74.

Kerdpon D, Rich AM, Reade PC. Expression of p53 in oral mucosal hyperplasia, dysplasia and squamous cell carcinoma. *Oral Dis.* 1997 Jun; 3(2): 86-92.

Khoo VS; Pollack A, Cowen D, Joon DL, Patel N, Terry NH *et al.* Relationship of Ki-67 labeling index to DNA-ploidy, S-phase fraction, and outcome in prostate cancer treated with radiotherapy. *Prostate*. 1999 Nov; 41(3): 166-72.

Kimura T, Tanaka S, Haruma K, Sumii K, Kajiyama G, Shimamoto F *et al.* Clinical significance of MUC1 and E-cadherin expression, cellular proliferation, and angiogenesis at the deepest invasive portion of colorectal cancer. *Int J Oncol*. 2000 Jan; 16(1): 55-64.

Klanrit P, Sperandio M, Brown AL, Shirlaw PJ, Challacombe SJ, Morgan PR, *et al.* DNA ploidy in proliferative verrucous leukoplakia. *Oral Oncol* 2007 Aug; 43: 310– 316.

Ko YC, Huang YL, Lee CH, Chen MJ, Lin LM, Tsai CC. Betel quid chewing, cigarette smoking and alcohol consumption related to oral cancer in Taiwan. *J Oral Pathol Med*. 1995 Nov; 24(10): 450-3

Kodani I, Osaki M, Shomori K, Araki K, Goto E, Ryoke K *et al.* Minichromosome maintenance 2 expression is correlated with mode of invasion and prognosis in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2003 Sep; 32(8): 468-74.

Kodani I, Shomori K, Osaki M, Kuratate I, Ryoke K, Ito H. Expression of minichromosome maintenance 2 (MCM2), Ki-67, and cell-cycle-related molecules, and apoptosis in the normal-dysplasia-carcinoma sequence of the oral mucosa. *Pathobiology*. 2001; 69 (3): 150-8.

Kövesi G, Szende B. Changes in apoptosis and mitotic index, p53 and Ki67 expression in various types of oral leukoplakia. *Oncology*. 2003; 65(4): 331-6.

Kramer IRH, Lucas RB, Pindborg JJ, Sobin LH, Bánóczy J, Hahn W *et al.* WHO Collaborating Centre for Oral Precancerous Lesions. Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. *Oral Surg*. 1978 Oct; 46(4): 518-39.

Krogh P, Hald B, Holmstrup P. Possible mycological etiology of oral mucosal cancer: catalytic potential of infecting *Candida albicans* and other yeasts

in production of N-nitrosobenzylmethylamine. *Carcinogenesis*. 1987 Oct; 8(10): 1543-8.

Krutchkoff DJ, Eisenberg E. Lichenoid dysplasia: a distinct histopathologic entity. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol*. 1985 Sep; 60(93): 308-15.

Laskey RA. Molecular mechanisms of chromatin assembly. *Biochem Soc Trans*. 1981 Aug; 9(4): 263-70.

Laskey RA, Madine MA. A rotary pumping model for helicase function of MCM proteins at a distance from replication forks. *EMBO Rep*. 2003 Jan; 4(1): 26-30.

Lee JJ, Hung HC, Cheng SJ, Chen YJ, Chiang CP, Liu BY *et al*. Carcinoma and dysplasia in oral leukoplakias in Taiwan: prevalence and risk factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2006 Apr; 101(4): 472-80.

Lei M, Tye BK. Initiating DNA synthesis: from recruiting to activating the MCM complex. *J Cell Sci* 2001 Apr; 114: 1447-54.

Liu SC, Klein-Szanto AJ. Markers of proliferation in normal and leukoplakic oral epithelia. *Oral Oncol*. 2000 Mar; 36(2): 145-51.

Liu M, Lawson G, Delos M, Jamart J, Ide C, Coche E *et al*. Predictive value of the fraction of cancer cells immunolabeled for proliferating cell nuclear antigen or Ki67 in biopsies of head and neck carcinomas to identify lymph node metastasis: comparison with clinical and radiologic examinations. *Head Neck*. 2003 Apr; 25(4): 280-8.

Liu SC, Sauter ER, Clapper ML, Feldman RS, Levin L, Chen SY *et al*. Markers of cell proliferation in normal epithelia and dysplastic leukoplakias of the oral cavity. *Cancer Epidemiol Biomarkers Prev*. 1998 Jul; 7(7): 597-603.

Locker AP, Birrell K, Bell JA, Nicholson RI, Elston CW, Blamey RW *et al*. Ki67 immunoreactivity in breast carcinoma: relationships to prognostic variables and short term survival. *Eur J Surg Oncol*. 1992 Jun; 18(3): 224-9.

Lopes MA, Pazoki AE, Ord RA. Proliferative verrucous leukoplakia: a case report. *Gen Dent*. 2000 Nov-Dec; 48 (6): 708-10.

Lutzmann M, Maiorano D, Méchali M. Identification of full genes and proteins of MCM9, a novel, vertebrate-specific member of the MCM2-8 protein family. *Gene*. 2005 Dec; 362: 51-6.

MacCallum DE; Hall PA. The location of pKi67 in the outer dense fibrillary compartment of the nucleolus points to a role in ribosome biogenesis during the cell division cycle. *J Pathol*. 2000 Apr; 190(5): 537-44.

Maiorano D; Lutzmann M; Mechali M. MCM proteins and DNA replication. *Curr Opin Cell Biol*. 2006 Apr; 18(2): 130-6.

Malmström M, Hietanen J, Sane J, Sysmäläinen M. Topical treatment of oral leukoplakia with bleomycin. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 1988 Dec; 26 (6): 491-8.

Mehta FS, Gupta PC, Daftary DK, Pindborg JJ, Choksi SK. An epidemiologic study of oral cancer and precancerous conditions among 101,761 villagers in Maharashtra, India. *Int J Cancer*. 1972 Jul 15; 10(1): 134-41.

Meng MV, Grossfeld GD, Williams GH, Dilworth S, Stoeber K, Mulley TW *et al*. Minichromosome maintenance protein 2 expression in prostate: characterization and association with outcome after therapy for cancer. *Clin Cancer Res*. 2001 Sep; 7(9): 2712-18.

Midulla C, De Iorio P, Nagar C, Pisani T, Cenci M, Valli C *et al*. Immunohistochemical expression of p53, nm23-H1, Ki67 and DNA ploidy: correlation with lymph node status and other clinical pathologic parameters in breast cancer. *Anticancer Res*. 1999 Sep-Oct; 19(5): 4033-7.

Miller CS, Johnstone BM. Human papillomavirus as a risk factor for oral squamous cell carcinoma: a meta-analysis, 1982-1997. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2001 Jun; 91(6): 622-35.

Miller CS, White DK. Human papillomavirus expression in oral mucosa, premalignant conditions, and squamous cell carcinoma: a retrospective review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1996 Jul; 82(1):57-68.

Morton TH, Cabay RJ, Epstein JB. Proliferative verrucous leukoplakia and its progression to oral carcinoma: report of three cases. *J Oral Pathol Med*. 2007 May; 36(5): 315-8.

Murrah VA, Batsakis JG. Proliferative verrucous leukoplakia and verrucous hyperplasia. *Ann Otol Rhinol Laryngol*. 1994 Aug; 103(8): 660-3.

Navarro CM, Sposto MR, Sgavioli-Massucato EM, Onofre MA. Transformation of proliferative verrucous leukoplakia to oral carcinoma: a ten years follow-up. *Med Oral*. 2004 May-Jul; 9(3): 229-33.

Neville BW, Damm DD, Allen C.M., Bouquot JE. *Patologia Oral e Maxilofacial*, 2^a ed. Guanabara Koogan, 2004.

Nielsen H, Norrild B, Vedforte P, Praetorius F, Reibel J, Holmstrup P. Human papillomavirus in oral premalignant lesions. *Eur J Cancer B Oral Oncol*. 1996 Jul; 32 (4): 264-70.

Nylander K, Schildt EB, Eriksson M, Roos G. PCNA, Ki-67, p53, bcl-2 and prognosis in intraoral squamous cell carcinoma of the head and neck. *Anal Cell Pathol*. 1997; 14(2): 101-10.

Nylander K, Dabelsteen E, Hall PA. The p53 molecule and its prognostic role in squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Oral Pathol Med*. 2000 Oct; 29(9): 413-25.

Ogden GR. Alcohol and oral cancer. *Alcohol*. 2005 Apr; 35(3): 169-73.

Ogden GR, Wight AJ. Aetiology of oral cancer: alcohol. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 1998 Aug; 36(4): 247-51.

O'Grady Jf, Reade PC. *Candida albicans* as a promoter of oral mucosal neoplasia. *Carcinogenesis*. 1992 May; 13(5): 783-6.

Oliver RJ, MacDonald DG, Felix DH. Aspects of cell proliferation in oral epithelial dysplastic lesions. *J Oral Pathol Med*. 2000 Feb; 29(2): 49-55.

Palefsky JM, Silverman SJr, Abdel-Salaam M, Daniels TE, Greenspan JS. Association between proliferative verrucous leukoplakia and infection with human papillomavirus type 16. *J Oral Pathol Med*. 1995 May; 24(5): 193-7.

Palmqvist R, Sellberg P, Oberg A, Tavelin B, Rutergard JN, Stenling R. Low tumour cell proliferation at the invasive margin is associated with a poor prognosis in Dukes' stage B colorectal cancers. *Br J Cancer*. 1999 Feb; 79(3-4): 577-81.

Paradiso A, Tommasi S, Barletta A, Leone B, Lacava J, Vallejo C *et al*. Metastatic site and p53 primary tumor expression in previously untreated stage IV breast cancer patients. *Anticancer Res*. 1999 Sep-Oct; 19(5): 4523-8.

Park NH, Min BM, Li SL, Huang MZ, Cherick HM, Doniger J. Immortalization of normal human oral keratinocytes with type 16 human papillomavirus. *Carcinogenesis*. 1991 Sep ;12(9): 1627-31.

Pentenero M, Carrozzo M, Pagano M, Galliano D, Broccoletti R, Scully C, Gandolfo S. Oral mucosal dysplastic lesions and early squamous cell carcinomas: underdiagnosis from incisional biopsy. *Oral Dis*. 2003 Mar; 9(2): 68-72.

Petti S, Scully C. Association between different alcoholic beverages and leukoplakia among non- to moderate-drinking adults: a matched case-control study. *Eur J Cancer*. 2006 Mar; 42(4): 521-27.

Piatelli A, Rubini C, Fiorini M, Iezzi G, Santinelli A. Prevalence of p53, bcl-2, and Ki-67 immunoreactivity and of apoptosis in normal oral epithelium and in premalignant and malignant lesions of the oral cavity. *J Oral Maxillofac Surg*. 2002 May; 60(5): 532-40.

Piffkò J, Bãnkfalyi A, Tory K, Fűzesi L, Bryne M, Ofner D *et al*. Molecular assessment of p53 abnormalities at the invasive front of oral squamous cell carcinomas. *Head Neck*. 1998 Jan; 20(1): 8-15.

Pindborg JJ, Daftary DK, Mehta FS. A follow-up study of sixty-one oral dysplastic precancerous lesions in Indian villagers. *Oral Surg, Oral Med, Oral Pathol*. 1977 Mar; 43(3): 383-90.

Pindborg JJ, Barnes D, Roed-Petersen B. Epidemiology and histology of oral leukoplakia and leukoedema among Papuans and New Guineans. *Cancer*. 1968 Aug; 22(2): 379-84.

Pindborg JJ, reibel J, Homstrup P. Subjectivity in evaluating oral epithelial dysplasia, carcinoma in situ and initial carcinoma. J Oral Pathol. 1985 Oct; 14(9): 698-708.

Plaat B, Kole A, Mastik M, Hoekstra H, Molenaar W, Vaalburg W. Protein synthesis rate measured with L-[1-11C]tyrosine positron emission tomography correlates with mitotic activity and MIB-1 antibody-detected proliferation in human soft tissue sarcomas. Eur J Nucl Med. 1999 Apr; 26(4): 328-32.

Prives C, Hall PA. The p53 pathway. J Pathol. 1999 Jan; 187(1): 112-26.

Raybaud-Diogène H, Tétu B, Morency R, Fortin A, Monteil RA. p53 overexpression in head and neck squamous cell carcinoma: review of the literature. Eur J Cancer B Oral Oncol. 1996 May; 32(3): 143-9.

Ramaswamy G, Rao VR, Kumaraswamy SV, Anantha N. Serum vitamins' status in oral leucoplakias - a preliminary study. Eur J Cancer B Oral Oncol. 1996 Mar; 32(2): 120-2.

Reibel J. Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. Crit Rev Oral Biol Med. 2003; 14(1): 47-62.

Reichart PA, Mohr U, Srisuwan S, Geerlings H, Theetranont C, Kangwanpong T. Precancerous and other oral mucosal lesions related to chewing, smoking and drinking habits in Thailand. Community Dent Oral Epidemiol. 1987 Jun; 15(3): 152-60.

Regezi JA, Sciuba JJ. Oral Pathology – Clinical Pathologic Correlations. 3rd ed. W. B. Saunders Company, 1999.

Regezi JA, Zarbo RJ, Regev E, Pisanty S, Silverman S, Gazit D. p53 protein expression in sequential biopsies of oral dysplasias and *in situ* carcinomas. J Oral Pathol Med. 1995 Jan; 24(1): 18-22.

Rock JA, Fisher ER. Florid oral papillomatosis of the oral cavity and larynx. Arch Otolaryngol. 1960 Nov; 72: 593-8.

Røed Petersen B. Effect on oral leukoplakia of reducing or ceasing tobacco smoking. *Acta Derm Venereol.* 1982; 62(2): 164-7.

Roed Petersen B, Renstrup G, Pindborg JJ. Candida in oral leukoplakias. A histologic and exfoliative cytologic study. *Scand J Dent Res.* 1970; 78(4): 323-8.

Rose SL, Fitzgerald MP, White NO, Hitcheler MJ, Futscher BW, De Geest K *et al.* Epigenetic regulation of maspin expression in human ovarian carcinoma cells. *Gynecol Oncol.* 2006 Aug; 102(2): 319-24.

Sauter ER, Ridge JA, Litwin S, Langer CJ. Pretreatment p53 protein expression correlates with decreased survival in patients with end-stage head and neck cancer. *Clin Cancer Res.* 1995 Nov; 1(11): 1407-12.

Shear M, Pindborg JJ. Verrucous Hyperplasia of the oral mucosa. *Cancer.* 1980 Oct; 46(8): 1855-62.

Scheffner M, Huibregtse JM, Vierstra RD, Howley PM. The role of HPV-16 E6 and E6-AP complex functions as an ubiquitin-protein ligase in the ubiquitination of p53. *Cell.* 1993 Nov; 75(3): 495-505.

Scheffner M, Münger K, Huibregtse JM, Howley PM. Target degradation of the retinoblastoma protein by human papillomavirus E7-E6 fusion proteins. *EMBO J.* 1992 Jul; 11(7): 2425-31.

Schepman KP, Bezemer PD, van der Meiji EH, Smeeler LE, van der Waal I. Tobacco usage in relation to the anatomical site of oral leukoplakia. *Oral Dis.* 2001 Jan; 7(1): 25–7.

Schepman KP, van der Meiji EH, Smeele LE, van der Waal I. Malignant transformation of oral leukoplakia: a follow-up study of a hospital-based population of 166 patients with oral leukoplakia from The Netherlands. *Oral Oncol.* 1998 Jul; 34(4): 270-5.

Schiffman MH, Bauer HM, Hoover RN, Glass AG, Cadell DM, Rush BB *et al.* Epidemiologic evidence showing that human papillomavirus infection causes most cervical intraepithelial neoplasia. *J Natl Cancer Inst.* 1993 Jun; 85(12): 958-64.

Schoelch ML, Sekandari N, Regezi JA, Silverman SJr. Laser management of oral leukoplakias: a follow-up study of 70 patients. *Laryngoscope*. 1999 Jun; 109(6): 949-53.

Scholzen T, Gerdes J. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *J Cell Physiol*. 2000 Mar; 182(3): 311-22.

Scott IS, Odell E, Chatrath P, Morris LS, Davies RJ, Vowler SL *et al*. A minimally invasive immunocytochemical approach to early detection of oral squamous cell carcinoma and dysplasia. *Br J Cancer*. 2006 Apr 24; 94(8): 1170-5.

Scully C, Boyle P. Vitamin A related compounds in the chemoprevention of potentially malignant oral lesions and carcinoma. *Eur J Cancer B Oral Oncol*. 1992 Oct; 28(2): 87-9.

Scully C. Oral precancer: preventive and medical approaches to management. *Eur J Cancer B Oral Oncol*. 1995 Jan; 31(1): 16-26.

Shopper TP, Brannon RB, Stalker WH. Proliferative verrucous leukoplakia: an aggressive form of oral leukoplakia. *J Dent Hyg*. 2004 Summer; 78(3): 7.

Sierón A, Adamek M, Kawczyk-Krupka A, Mazur S, Ilewicz L. Photodynamic therapy (PDT) using topically applied delta-aminolevulinic acid (ALA) for the treatment of oral leukoplakia. *J Oral Pathol Med*. 2003 Jul; 32(6): 330-6.

Silva SD, Agostini M, Nishimoto IN, Colleta RD, Alves FA, Lopes MA, Kowalski LP, Graner E. Expression of fatty acid synthase, ErbB 2 and Ki-67 in head and neck squamous cell carcinoma. A clinicopathological study. *Oral Oncol*. 2004 Aug; 40(7): 688-96.

Sciuba JJ. Oral leukoplakia. *Crit Rev of Oral Biol and Med*. 1995; 6(2): 147-60.

Silverman SJr. Early diagnosis of oral cancer. *Cancer*. 1988 Oct; 62(8): 1796-9.

Silverman S, Bhargava K, Smith LW, Malaowalla AM. Malignant transformation and natural history of oral leukoplakia in 57,518 industrial workers of Gujarat, India. *Cancer*. 1976 Oct; 38(4): 1790-5.

Silverman SJr, Gorsky M. Proliferative verrucous leukoplakia: a follow-up study of 54 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1997 Aug; 84(2): 154-7.

Silverman SJr, Gorsky M, Lozada F. Oral leukoplakia and malignant transformation. A follow-up study of 257 patients. *Cancer*. 1984 Feb; 53(3): 563-8.

Slootweg PJ, Müller H. Verrucous hyperplasia or verrucous carcinoma. An analysis of 27 patients. *J Maxillofac Surg*. 1983 Feb; 11(1): 13-9.

Slootweg PJ, Koole R, Hordijk GJ. The presence of p53 protein in relation to Ki-67 as cellular proliferation marker in head and neck squamous cell carcinoma and adjacent dysplastic mucosa. *Eur J Cancer B Oral Oncol*. 1994; 30(2): 138-41.

Stoeber K, Tlsty TD, Happerfield L, Thomas GA, Romanov S, Bobrow L *et al*. DNA replication licensing and human cell proliferation. *J Cell Sci*. 2001 Jun; 114(11): 2927-41.

Sugiyama M, Bhawal UK, Dohmen T, Ono S, Miyauchi M, Ishikawa T. Detection of human papillomavirus–16 and HPV–18 DNA in normal, dysplastic, and malignant oral epithelium. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003 May; 95(5): 594-600.

Szelachowska J, Dziegiel P, Jelen-Krzeszewska J, Jelen M, Matkowski R, Pomiecko A *et al*. Mcm-2 protein expression predicts prognosis better than Ki-67 antigen in oral cavity squamocellular carcinoma. *Anticancer Res*. 2006 May-Jun; 26(3): 2473-8.

Tachibana KE, Gonzalez MA, Coleman N. Cell-cycle-dependent regulation of DNA replication and its relevance to cancer pathology. *J Pathol*. 2005 Jan; 205(2): 123-9.

Tada S, Li A, Maiorano D, Méchali M, Blow JJ. Repression of origin assembly in metaphase depends on inhibition of RLF-B/Cdt1 by geminin. *Nat Cell Biol.* 2001 Feb; 3(2): 107-13.

Terai M, Hashimoto K, Yoda K, Sata H. High prevalence of human papillomavirus in the normal oral cavity of adults. *Oral Microbiol Immunol.* 1999 Aug; 14(4): 201-5.

Thomas SJ, MacLennan R. Slaked lime and betel nut cancer in Papua New Guinea. *Lancet.* 1992 Sep; 340(8819): 577-8.

Toma S, Mangiante PE, Margarino G, Nicolo G, Palumbo R. Progressive 13-cis-retinoid acid dosage in the treatment of oral leukoplakia. *Eur J Oral Oncol.* 1992 Oct; 28(2): 121-3.

Tye BK. MCM proteins in DNA replication. *Annu Rev Biochem.* 1999; 68: 649-86.

van der Waal I, Schepman KP, van der Meiji EH, Smeele LE. Oral leukoplakia: a clinicopathological review. *Oral Oncol.* 1997 Sep; 33(5): 291-301.

Vedtofte P, Holmstrup P, Hjørting-Hansen E, Pindborg JJ. Surgical treatment of premalignant lesions of the oral mucosa. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 1987 Dec; 16(6): 656-64.

Verheijen R, Kuijpers HJ, Schlingermann RO, Boehmer AL, van Driel R, Brakenhoff GJ *et al.* Ki-67 detects a nuclear matrix-associated proliferation-related antigen. I. Intracellular localization during interphase. *J Cell Sci.* 1989 Jan; 92 (1): 123-30.

Vigliante CE, Quinn PD, Alawi F. Proliferative verrucous leukoplakia: report of a case with characteristic long-term progression. *J Oral Maxillofac Surg.* 2003 May; 61(5): 626-31.

Waldron CA, Shafer WG. Leukoplakia revisited. A clinicopathologic study of 3256 oral leukoplakias. *Cancer.* 1975 Oct; 36(4): 1386-92.

Willis MS, Wians FH. The role of nutrition in preventing prostate cancer: a review of the proposed mechanism of action of various dietary substances. *Clin Chim Acta.* 2003 Apr; 330(1-2): 57-83.

Wohlschlegel JA, Dwyer BT, Dhar SK, Cvetic C, Walter JC, Dutta A. Inhibition of eukaryotic DNA replication by geminin binding to Cdt1. *Science*. 2000 Dec; 290(5500): 2309-12.

Wong F, Epstein J, Millner A. Treatment of oral leukoplakia with topical bleomycin. A pilot study. *Cancer*. 1989 Jul; 64(2): 361-5.

Wozniak A, Golusiński W, Kaczmarek E, Kaczmarek J. Prognostic significance of ki67 and PCNA expression in laryngeal squamous cell carcinoma (morphometric evaluation of labeling index-L1]. *Otolaryngol Pol*. 2002; 56(4): 437-43.

Wu Y, Luo H, Kanaan N, Wu J. The proteasome controls the expression of a proliferation-associated nuclear antigen Ki-67. *J Cell Biochem*. 2000 Jan; 76(4): 596-604.

Yeh CJ. Treatment of verrucous hyperplasia and verrucous carcinoma by shave excision and simple cryosurgery. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2003 Jun; 32(3): 280-3.

Yin XY, Smith ML, Whiteside TL, Johnson JT, Herberman RB, Locker J. Abnormalities in the p53 gene in tumors and cell lines of human squamous-cell carcinomas of the head and neck. *Int J Cancer*. 1993 May 8; 54(2): 322-7.

Zakrzewska JM, Lopes V, Speight P, Hopper C. Proliferative verrucous leukoplakia: a report of ten cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1996 Oct; 82 (4): 396-401.



COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE PIRACICABA
UNIVERSIDADE ESTADUAL DE CAMPINAS



CERTIFICADO

O Comitê de Ética em Pesquisa da FOP-UNICAMP certifica que o projeto de pesquisa "**Análise da ploidia e da expressão de maspin, KI-67 e P53 em leucoplasia oral**", protocolo nº **081/2006**, dos pesquisadores **ADRIELE FERREIRA GOUVÊA** e **MARCIO AJUDARTE LOPES**, satisfaz as exigências do Conselho Nacional de Saúde – Ministério da Saúde para as pesquisas em seres humanos e foi aprovado por este comitê em 15/08/2006.

The Research Ethics Committee of the School of Dentistry of Piracicaba - State University of Campinas, certify that project "**Analyzys of ploidy state and expression of maspin, Ki-67 and p-53 in oral leukoplakia**", register number **081/2006**, of **ADRIELE FERREIRA GOUVÊA** and **MARCIO AJUDARTE LOPES**, comply with the recommendations of the National Health Council – Ministry of Health of Brazil for researching in human subjects and was approved by this committee at 15/08/2006.


Profa. Cecília Gatti Guirado
 Secretária
 CEP/FOP/UNICAMP


Prof. Jaeks Jorge Júnior
 Coordenador
 CEP/FOP/UNICAMP

Nota: O título do protocolo aparece como fornecido pelos pesquisadores, sem qualquer edição.
 Notice: The title of the project appears as provided by the authors, without editing.