

ETHMILA CARVALHO BUENO

**ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA DA EXPRESSÃO DOS
IMUNOMARCADORES KI-67 E P53 EM LEUCOPLASIAS ORAIS.**

CAMPO GRANDE
2011

ETHMILA CARVALHO BUENO

**ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA DA EXPRESSÃO DOS
IMUNOMARCADORES KI-67 E P53 EM LEUCOPLASIAS ORAIS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Dutra Aydos

CAMPO GRANDE
2011

Catálogo-na-Publicação

Universidade Federal de Mato Grosso do Sul

Bueno, Ethmila Carvalho

Análise espectrofotométrica da expressão dos imunomarcadores ki-67 e p53 em leucoplasias orais. Ethmila Carvalho Bueno; Orientador Ricardo Dutra Aydos – Campo Grande, 2011.

50p.: il.; tab.; fig.

Dissertação de Mestrado [Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região do Centro-Oeste]. Universidade Federal de Mato Grosso do Sul.

FOLHA DE APROVAÇÃO

ETHMILA CARVALHO BUENO

**ANÁLISE ESPECTROFOTOMÉTRICA DA EXPRESSÃO DOS
IMUNOMARCADORES KI-67 E P53 EM LEUCOPLASIAS ORAIS.**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região Centro-oeste da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, para obtenção do título de Mestre.

Resultado _____

Campo Grande (MS), _____ de _____ de _____.

BANCA EXAMINADORA

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____

Prof. Dr. _____

Instituição _____

DEDICATÓRIA

Dedico este trabalho aos amores da minha vida: minha mãe Gisele, meu pai Gilberto, a minha irmã Carol que me apoiaram nos momentos mais difíceis me dando coragem e força para continuar.

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a Deus pela saúde e pela oportunidade.

Ao Prof. Dr. Ricardo Dutra Aydos pela orientação e dedicação durante estes anos de estudo.

A Profa. Dra. Rosana Mara Giordano de Barros, a minha primeira orientadora, que muito gentilmente me ofereceu os espécimes para este estudo.

À Profa. Dra. Inês Aparecida Tozetti pela colaboração efetiva na metodologia deste estudo, sempre alegre, prestativa e muito eficiente.

Ao Prof. Daniel Martins Pereira pelo auxílio na estatística deste trabalho.

A todos aqueles que não estão descritos aqui que colaboram direta ou indiretamente para a realização deste trabalho.

"Tudo tem seu tempo determinado e há tempo
para todo o propósito debaixo do céu"

(Eclesiastes 3 vs 1)

RESUMO

Bueno EC. **Análise espectrofotométrica da expressão dos imunomarcadores Ki-67 e p53 em Leucoplasias Orais.** Campo Grande, 2011. [Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região do Centro-Oeste].

Este trabalho se propôs a analisar espectrofotometricamente o comportamento imunoistoquímico das leucoplasias perante aos anticorpos Ki-67 e p53. Foram analisadas 11 espécimes de leucoplasia, 11 leucoplasias sem displasia e os resultados obtidos foram comparados aos do grupo controle, composto por 11 hiperplasias fibrosas inflamatórias. Os espécimes foram cortados com a espessura de 3 μ m, depositados em laminas previamente silanizadas e submetidos a processamento imunoistoquímico. As laminas foram analisadas em microscópio óptico por dois examinadores e sem seguidas selecionados três campos em cada lamina, excluindo a camada basal, para a análise espectrofotométrica. Quando comparado o grupo das leucoplasias com o das hiperplasias fibrosas inflamatórias, observou-se diferença estatisticamente significativa tanto na marcação de Ki-67 quanto p53. Houve significância estatística na comparação das leucoplasias com displasias e hiperplasias marcadas com p53 e Ki-67. Na comparação das leucoplasias sem displasia com as leucoplasias com displasia houve significância estatística para os dois marcadores. Conclui-se que as leucoplasias com displasia apresentam maior densidade espectrofotométrica, o p53 mostrou-se mais sensível nas lesões estudadas e diante dos marcadores estudados as leucoplasias sem displasia não apresentaram densidade espectrofotométrica relevante.

Palavras-chaves: fatores de prognóstico, imunoistoquímica, leucoplasia

ABSTRACT

Bueno CE. **Spectrophotometric analysis of the immunomarkers expression of Ki-67 and p53 in oral leukoplakia.** Campo Grande, 2011 [Dissertation – Postgraduate Program in Health and Development in Midwest Region].

This study proposes to analyze the behaviour spectrophotometrically leukoplakia of immunohistochemical antibodies against Ki-67 and p53. We analyzed 11 specimens of leukoplakia, 11 leukoplakias without dysplasia and the results were compared to the control group, composed of 11 inflammatory fibrous hyperplasia. The specimens were cut with a thickness of 3 μ m, previously deposited on silanized slides and to immunohistochemical processing. The slides were analyzed under a light microscope by two observers and then three samples were selected, excluding the basal layer, for the spectrophotometric analysis. When compared with the group of leukoplakia of the inflammatory fibrous hyperplasia, there was a statistically significant difference in the marking of both Ki-67 and p53. There was statistical significance in comparison of leukoplakia with dysplasia and marked hyperplasia with p53 and Ki-67. In the comparison of leukoplakia without dysplasia with leukoplakia with dysplasia was statistically significant for both markers. It is concluded that the leukoplakia with dysplasia has a higher density spectrophotometric, p53 was more sensitive for wounds on the markers studied whereas the markers studied the leukoplakias without dysplasia showed no significant density spectrophotometrically.

Keywords: prognostic factors, immunohistochemistry, leukoplakia

LISTA DE TABELAS

Tabela I – Expressão dos marcadores Ki-67 e p53 nas Hiperplasias Fibrosas Inflamatórias.....	30
Tabela II – Expressão dos marcadores Ki-67 e p53 nas Leucoplasias com displasias.....	30
Tabela III – Expressão dos marcadores Ki-67 e p53 nas Leucoplasias sem displasia.....	30
Tabela IV – Comparação da espectrofotometria das Hiperplasias Fibrosas Inflamatórias e Leucoplasias com displasia marcadas com p53.....	31
Tabela V – Comparação da espectrofotometria das Leucoplasias com displasia e sem displasia marcadas com p53.....	31
Tabela VI – Comparação da espectrofotometria das Hiperplasias Fibrosas Inflamatórias e Leucoplasias com displasia marcadas com ki-67.....	31
Tabela VII – Comparação da espectrofotometria das Leucoplasias com e sem displasia marcadas com Ki-67.....	32

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Calibragem do programa (seleção de cor).....	27
Figura 2 - Seleção do espectro de marrom.....	28
Figura 3 - Espectrofotometria no Programa Image Pro Plus 5.0.....	28
Figura 4 - Hiperplasia (1), Leucoplasia com displasia (2) e Leucoplasia sem displasia (3) para as análises em p53 e Ki-67. Valores expressos em média e desvio padrão.....	32
Figura 5 - Diferença entre as médias para a análise em p53: Hiperplasia (1), Leucoplasia com displasia (2) e Leucoplasia sem displasia (3). ANOVA com pós-teste de Tukey. Observada diferença estatisticamente significativa entre o grupo Hiperplasia e Leucoplasia com displasia ($p < 0,01$) e entre o grupo Leucoplasia com displasia e Leucoplasia sem displasia ($p < 0,05$).....	33
Figura 6 - Diferença entre as médias para a análise em Ki-67: Hiperplasia (1), Leucoplasia com displasia (2) e Leucoplasia sem displasia (3). ANOVA com pós-teste de Tukey. Observada diferença estatisticamente significativa entre o grupo Hiperplasia e Leucoplasia com displasia ($p < 0,01$) e entre o grupo Leucoplasia com displasia e Leucoplasia sem displasia ($p < 0,05$).....	34
Figura 7 - Leucoplasia marcada com p53 observada em microscópio de luz com aumento de 400X.....	35
Figura 8 - Leucoplasia marcada com Ki-67 observada em microscópio de luz com aumento de 400X.....	35

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

p53	Proteína ou gene de 53 quilodaltons –supressor de tumor
Bcl2	" <i>B cell lymphoma/leukemia</i> /" refere-se à proteína Bcl-2
UFRN	Universidade Federal do Rio Grande do Norte
AIDS	Síndrome da imunodeficiência adquirida
C-erbB-2	Protooncogene de 185 quilodaltons
MGMT	metilguanina-DNA-metiltransferase
EGFR	"epidermal growth factor receptor"
EGF	Fator de crescimento epidérmico
PCNA	Antígeno de proliferação nuclear
LSAB	" <i>Link streptavidin biotin complex</i> "
Ki-67	Refere-se ao antígeno kiel-67
EUA	Estados Unidos da América
INCA	Instituto Nacional do Câncer
DNA	Ácido desoxorribonucléico
ph	Potencial hidrogeniônico
HPV	" <i>Human papilomavirus</i> "
CEC	Carcinoma espinocelular
H.E.	Hematoxilina e eosina
Rb	Gene Retinoblastoma
kDa	QuiloDalton
ml	Mililitros

LISTA DE SÍMBOLOS

μm	Unidade de medida referente a micrômetro
X	Sinal matemático indicativo de multiplicação
+	Sinal matemático indicativo de positividade
<	Sinal matemático indicativo de inferioridade
=	Sinal matemático que indica igualdade
%	Símbolo de porcentagem
β	Beta

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO	1
2. REVISÃO DE LITERATURA	3
2.1. Leucoplasia	3
2.1.1. Considerações Gerais.....	3
2.2. Fatores etiológicos	5
2.3. Características clínicas e histológicas	9
2.4. Panorama do câncer no Brasil	12
2.5. Fatores de prognóstico.....	12
2.5.1. Ki-67- Antígeno de proliferação celular	13
2.5.2. Proteína p53.....	15
2.6. Métodos Diagnósticos	18
2.7. Hiperplasia (considerações gerais)	20
3. OBJETIVOS GERAIS	23
3.1. Objetivos Específicos	23
4. MATERIAL E MÉTODO	24
4.1. Seleção da amostra.....	24
4.2. Preparo da Amostra	24
4.3. Metodologia.....	25
4.3.1. Técnica da imunohistoquímica.....	25
4.4. Análise descritiva da imunohistoquímica	26
4.5. Leitura das lâminas e obtenção de imagens	26
4.6. Análise das imagens	27
4.7. Análise estatística.....	29
5. RESULTADOS	30
6. DISCUSSÃO	33
7. CONCLUSÕES	36
REFERÊNCIAS	37
ANEXOS	48

1. INTRODUÇÃO

As leucoplasias são as lesões cancerizáveis mais comuns da cavidade oral. Tem esta definição devido a sua capacidade de sofrer alterações celulares malignas e desenvolver câncer bucal, pois podem apresentar tecido morfológicamente alterado. O seu diagnóstico é estritamente clínico e não depende de aparências definidas, mas sim da exclusão de outras lesões que se apresentam como placas brancas na boca (Waldron e Shafer, 1975; INCA, 2005; Parise Jr, 2000).

Os fatores predisponentes responsabilizados com mais frequência são: o álcool e o tabaco. Há predominância em homens, acima de 40 anos, podendo desenvolver-se em qualquer região da mucosa bucal. Entretanto as lesões presentes na língua, vermelhão dos lábios e assoalho da boca somam mais de 90% daquelas que indicam displasia ou carcinoma *in situ* (Neville *et al.*, 2004; Ide *et al.*, 2008).

Histologicamente as leucoplasias podem apresentar epitélios displásicos ou não-displásicos. Alguns pesquisadores enfatizam que a presença de displasia aumentam as chances de transformações malignas, não excluindo as lesões não-displásicas dessa possibilidade (Pindborg, 1980; Holmstrup *et al.*, 2007).

No método convencional de avaliação histopatológica com coloração hematoxilina e eosina (H.E) a separação entre a displasia discreta, moderada, displasia acentuada e carcinoma *in situ* é difícil o que reforça a necessidade de métodos mais precisos para essas avaliações. A progressão para carcinoma invasivo está diretamente relacionada com a severidade das alterações

displásicas, mas a avaliação é altamente subjetiva (Waldron *et al.*, 1975; Macluskey *et al.*, 1999).

O estudo imunoistoquímico e molecular de lesões cancerizáveis é um meio rotineiro que permite conhecer a expressão protéica das alterações genéticas, que pode ajudar no diagnóstico precoce e tratamento de patologias (Lumerman *et al.*, 1995; Alves *et al.*, 1999; Gomes *et al.*, 2000 ; Cruz *et al.*, 1998 Moles *et al.*, 2002; Steinbeck *et al.*, 2002; Reis-Costa *et al.*, 2004; Garcia *et al.*, 2005).

Embora as marcações imunoistoquímicas sejam bastante específicas e evidenciem o comportamento biológico das células, sua quantificação nem sempre é precisa, para tanto foram desenvolvidos métodos quantificadores por imagem a fim de aperfeiçoar a avaliação celular proliferativa, além de outras vantagens como velocidade na análise, consistência nos resultados e automação (Teresa *et al.*, 2007).

Avaliar o comportamento biológico das leucoplasias a fim de evitar a transformação maligna é um grande desafio para os profissionais da odontologia. Diversos estudos foram desenvolvidos para avaliar os padrões celulares das lesões cancerizáveis como por exemplo a imunoistoquímica. Entretanto, bem como na histopatologia, os espécimes submetidos a avaliação visual podem apresentar padrões divergentes devido a avaliação distinta entre os examinadores. Portanto o objetivo deste estudo foi observar a atividade espectrofotométrica das leucoplasias e hiperplasias fibrosas inflamatórias imunomarcados com Ki-67 e p53.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Leucoplasia

2.1.1. Considerações Gerais

Leucoplasia é o termo clínico utilizado para denominar uma placa predominantemente branca da mucosa oral, não removível a raspagem, que não pode ser classificada clinicamente como qualquer outra doença. Sua superfície pode apresentar-se lisa, rugosa ou verrucosa, sendo a lesão cancerizável mais freqüente da boca (Gabriel *et al.*, 2004). Acomete principalmente a mucosa jugal e as comissuras labiais, seguidas por mucosa alveolar, língua, lábio, palato duro, palato mole, assoalho de boca e gengiva (Neville *et al.*, 2004).

Silveira *et al.*, 2009, analisaram clínica e morfologicamente 205 casos de lesões orais com potencial de malignização e observaram que a lesão mais prevalente foi a leucoplasia (70,7%), com aparecimento predominante no rebordo alveolar (21%) sendo mais freqüente na quinta, sexta e sétima décadas de vida. Além disso observaram que as leucoplasias sofreram transformação maligna em 2,1% dos casos estudados.

O protocolo ideal indica a realização de biópsia incisional ou excisional seguida de exame histopatológico do espécime. O resultado histológico compatível com a hipótese clínica pode variar de hiperkeratose, acantose até graus variados de displasia epitelial – discreta, moderada ou acentuada. Perante a variedade microscópica das leucoplasias, a biópsia é obrigatória para estabelecer o diagnóstico definitivo (Almeida *et al.*, 2000; Bressiani *et al.*, 2004; Robbins *et al.*, 2005).

Rodrigues *et al.*, em 2000, analisaram a relação entre o aspecto clínico e histopatológico das leucoplasias em 28 pacientes adultos, com mais de 35 anos, de ambos os sexos. As lesões foram clinicamente divididas em homogêneas e não-homogêneas, quanto ao aspecto histopatológico foram divididas em seis grupos (hiperceratose com ausência de displasia epitelial, displasia epitelial leve, displasia epitelial moderada, displasia epitelial severa, carcinoma *in situ* e carcinoma invasivo). Quanto ao aspecto clínico, houve predomínio de lesões homogêneas (78,6%) frente as não-homogêneas (21,4%). Considerando o aspecto histopatológico, os resultados mostraram que 32,2% dos casos apresentaram hiperkeratose com ausência de displasia epitelial. Em 53,5% das lesões pesquisadas foi detectado sinais de displasia epitelial (39,3% - displasia leve, 7,1% - displasia moderada e 7,1% - displasia severa). O restante, ou seja, 14,3% foram classificados como carcinoma invasivo.

Em geral em 5 a 30% das leucoplasias é encontrada alguma evidência de displasia epitelial. Quando presentes, as alterações começam na região basal e parabasal do epitélio. Alguns pesquisadores enfatizam que a presença de displasia e o uso contínuo de derivadas do tabaco aumentam as chances de transformações malignas, não excluindo as lesões não-displásicas desta possibilidade (Bánóczy e Csiba, 1976; Hogewind *et al.*, 1989; Jaber *et al.*, 1999; Neville *et al.*, 2004; Holmstrup *et al.*, 2007).

Lawall *et al.*, em 2006, evidenciaram em seu estudo que leucoplasias com epitélios não-displásicos possuem sinais sub-microscópicos de alterações direcionadas à transformação maligna e que os graus de queratinização não se correlacionam com o maior risco desse acontecimento.

Segundo Lodi *et al.*, 2008, a remoção cirúrgica têm efeitos benéficos, mas não reduz os riscos de recorrência e transformação maligna. Os riscos podem ser diminuídos com a redução do consumo de tabaco e álcool.

Hsue *et al.*, 2007, estudaram o tempo estimado para uma lesão sofrer transformação maligna. O tempo foi definido entre o diagnóstico inicial da lesão até a confirmação do câncer de boca. Um total de 1.458 pacientes com diagnóstico histológico de várias lesões orais cancerizáveis foram acompanhados entre 1991 e 2001. A média de idade do diagnóstico inicial era de 47,5 anos. O diagnóstico histológico foi dividido em seis categorias: displasia epitelial com hiperqueratose/hiperplasia epitelial (8,85%); displasia epitelial com fibrose submucosa (2,54%); fibrose submucosa (27,57%); hiperqueratose/hiperplasia epitelial (29,1%); líquen plano (9,80%) e leucoplasia verrucosa (22,22%). Dentre os pacientes estudados, 44 progrediram para câncer de boca no mesmo local da lesão inicial, aproximadamente 3,02% da amostra sofreram transformação maligna em 42,64 meses. Oito dos 166 pacientes com lesões displásicas e 15 de 423 pacientes com hiperqueratose/hiperplasia epitelial progrediram para a malignidade.

2.2. Fatores etiológicos

A leucoplasia normalmente afeta adultos com mais de 40 anos, tem predileção pelo sexo masculino, podendo acometer qualquer região da mucosa bucal. Aproximadamente 3% dos adultos brancos possuem lesão branca. Os fatores responsabilizados com mais freqüência são: o álcool, tabaco, o qual

apresenta potencial carcinogênico em qualquer forma que é utilizado, falta de higiene bucal, sífilis, AIDS, no caso de leucoplasia dos lábios, a radiação solar e predisposição genética (Waldron e Shafer, 1975; Kaur *et al.*, 1996; Damante *et al.*, 1997; Neville *et al.*, 2004).

Almeida *et al.*, em 2000, avaliaram 42 casos de leucoplasia oral diagnosticados no Serviço de Anatomia Patológica da Disciplina de Patologia Oral do Departamento de Odontologia da UFRN, no período de janeiro 1970 a junho de 2000 e observaram que em 19 casos (45,2%) havia referência ao uso do tabaco e, em 17 casos (40,5%), a lesão estava associada a um agente etiológico definido. Outros tipos de agentes etiológicos foram mencionados em 6 casos (14,3%), como prótese mal adaptada, sucção de lábio, exposição solar.

Pentenero *et al.*, 2008, avaliaram a associação do álcool, de próteses removíveis com o aparecimento de lesões orais em pacientes de Turin, Itália. Foi realizado um estudo retrospectivo, que contou com a participação de 4098 voluntários, 2040 homens e 2058 mulheres com idade média de 50.5 anos. Foi feito um exame clínico e biópsia quando necessário. O histórico dos pacientes também foi pesquisado (idade, sexo, uso de prótese total removível e hábitos de risco). Os homens observados tiveram mais lesões da mucosa oral que as mulheres 27.3% contra 22.89% das mulheres. A presença de lesões esteve relacionada a fatores de risco e a idade, sendo o tabaco responsável pelo aparecimento da leucoplasia. A associação do álcool e do tabaco também se relacionou com as leucoplasias. O uso da prótese total removível aumentou a prevalência em particular de candidíase e lesões traumáticas.

Ide *et al.*, 2008, analisaram uma amostra 34.136 homens e 43.711 mulheres com idades variando entre 40 e 79 anos. Os seguintes critérios foram estudados: hábito de fumar, consumo de bebida alcoólica, sexo, idade, consumo de chá verde, preferência por comidas salgadas, e consumo de vegetais verde e amarelo. Fumantes ativos tiveram um maior risco de morte causado por câncer oral e de faringe comparados com os não-fumantes de ambos os sexos: o risco relativo foi de 2.6 e 8.2 maior em homens e mulheres respectivamente. Os homens que beberam mais de 46g de etanol/dia tiveram o risco aproximadamente triplicado para o desenvolvimento do câncer. A exposição simultânea aos dois fatores teve uma associação significativa, tendo os pacientes 3.3 mais riscos. O álcool e o tabaco, associados ou não, aumentam o risco do desenvolvimento de lesões bucais.

Yen *et al.*, 2008, avaliaram um grupo de homens fumantes e/ou consumidores de fumo mastigável. Modelaram os efeitos da duração do hábito, da quantidade de fumo mascado e consumo de cigarros comparando-os com as taxas de incidência de desenvolvimento das leucoplasias e o seu tempo médio de instalação. Observaram que a incidência anual de leucoplasias foi estimada em 0.35%. A média de anos de consumo para o aparecimento das leucoplasias foi de 24 anos, sendo mais prevalente em pacientes que consumiam cigarro e mascavam fumo com frequência. Os riscos de desenvolvimento de câncer após 20 anos giraram em torno de 42.2% para as leucoplasias. Os resultados encontrados por este estudo mostram que os riscos de transformação maligna variam de acordo com a quantidade e o tempo de consumo do tabaco.

Freitas *et al.*, 2006, avaliaram as diferenças clínico-patológicas existentes entre pacientes fumantes e os que nunca fumaram. Foi feito um estudo retrospectivo de 52 pacientes com leucoplasia oral. As amostras foram coletadas seguindo os seguintes critérios: idade, sexo, tamanho da lesão, localização da lesão e presença ou ausência de displasia. A idade média para o aparecimento de lesões em fumantes era de 49 anos, bem abaixo dos não-fumantes que foi de 59 anos em média. A proporção das mulheres no grupo dos não-fumantes foi marcante e expressiva estatisticamente maior no grupo dos pacientes que nunca fumaram diante do grupo dos fumantes (82% vs 22%). Lesões displásicas foram observadas com mais frequência em pacientes que nunca fumaram, e esta diferença obteve resultados estatisticamente significativos ($P=0.026$). Os autores concluíram que as leucoplasias presentes nos não-fumantes acometem mais mulheres, localizam-se preferencialmente na língua, e apresentam mais casos de displasia epitelial.

Liu *et al.*, 2010, estudaram 218 casos de leucoplasia com diagnósticos clínicos e histopatológicos e os acompanharam durante 5 anos e três meses. Dos 218 casos, 39 (17,9%) desenvolveram câncer em 5 anos e dois meses. O estudo também revelou que o fator relevante para a malignização das lesões foi a presença de displasias severas. O álcool, a idade, o gênero, o local da lesão, o hábito alimentar e o consumo de tabaco não foram considerados pelos pesquisadores como fator de risco. A presença de displasia severa aumentou significativamente a transformação maligna das lesões ($P < 0,001$) quando comparados com as displasias leves ou de baixo grau. Os autores concluíram que as leucoplasias com displasias mais severas

apresentaram risco maior de transformação maligna principalmente durante o segundo e o terceiro ano de acompanhamento.

Jaber *et al.*, 1999, selecionaram 630 pacientes com displasia epitelial oral e 643 pacientes controles. A combinação do álcool com o tabaco aumentou os riscos do aparecimento de displasia epitelial oral e fumar cigarro sem filtro foi um significativo fator predisponente. A análise mais detalhada do hábito de fumar revelou que os riscos estão mais atribuídos a pacientes que fumam quantidade superior a 20 cigarros/dia, os quais tem aproximadamente 5 vezes mais chances de desenvolver lesões orais que os não fumantes. Os fumantes têm maiores riscos que os consumidores de álcool. Parar de fumar foi associado ao declínio do risco do aparecimento de displasias epiteliais orais, bem como a redução do consumo diário de cigarro. O consumo sinérgico do álcool e do tabaco aumento o risco de desenvolvimento de displasias epiteliais orais. Os riscos diminuem quando do uso moderado e/ou parar de consumir álcool e tabaco.

Para que o aparecimento de novas lesões e de recidivas seja controlado, há necessidade de mudança radical de hábitos, ou seja, eliminar o consumo de álcool e tabaco (Boffetta *et al.*,2001; Thongsukai e Boonyaphiphat, 2001).

2.3. Características clínicas e histológicas

Aproximadamente 70% das leucoplasias bucais são encontradas no vermelhão dos lábios, na mucosa jugal e na gengiva. Entretanto, as lesões na

língua, vermelhão dos lábios e assoalho da boca somam mais de 90% daquelas que indicam displasia ou carcinoma (Neville *et al.*, 2004).

Clinicamente aparecem como placas ou manchas esbranquiçadas, irremovíveis perante raspagem, decorrentes de causas indeterminadas, geralmente indolores, podendo ter aparência homogênea ou heterogênea (Waldron e Shafer, 1975; INCA, 2005; Parise Jr, 2000; Regezi, 1995).

Rodrigues *et al.*, em 2000, concluíram após o seu estudo que as leucoplasias homogêneas apresentaram alterações celulares mais discretas, enquanto as não-homogêneas evidenciaram displasia severa e/ou carcinoma invasivo. (Rodrigues *et al.*, 2000).

Outra forma clínica distinta é a leucoplasia verrucosa proliferativa que é definida pela sua evolução progressiva, com alterações clínico-patológicas marcantes e alto potencial para desenvolvimento do câncer. O comportamento desta lesão é mais agressivo que as outras modalidades de leucoplasia, sendo mais comum entre mulheres, com mais de 60 anos e o consumo de tabaco não está diretamente relacionado com o seu aparecimento. A maioria dos pacientes com leucoplasia verrucosa proliferativa (74%) evoluem para carcinoma (Caly *et al.*, 2007).

Ramalho *et al.*, em 2007, relataram caso clínico de paciente do sexo feminino, 67 anos, que relatou apresentar lesão branca há 40 anos, com o passar do tempo outros sítios anatômicos foram comprometidos e após 2 anos do diagnóstico inicial foi observada a malignização da lesão, isto é, transformação da leucoplasia verrucosa proliferativa em carcinoma espinocelular.

Histologicamente as leucoplasias dividem-se em dois grupos: com displasias e sem displasias. A displasia epitelial é observada nas leucoplasias em suas diferentes formas: simples, verrucosas e erosivas, podendo também estar associadas à mucosa adjacente a tumores em pacientes portadores de carcinoma de células invasivas (Bánóczy e Csiba, 1976). Segundo Partridge *et al.*, 2001, as lesões displásicas tendem a progredir para a malignidade devido as instabilidades genômicas que levam ao acúmulo de desequilíbrios alelogênicos em diversos locos.

Quanto mais o epitélio se torna displásico, mais as mudanças epiteliais atípicas se estendem para envolver toda a espessura do epitélio. As alterações histopatológicas das células epiteliais displásicas são semelhantes às daquelas do carcinoma epidermóide e incluem: núcleos e células aumentados, núcleos grandes e proeminentes, aumento da razão núcleo/citoplasma, núcleos hipercromáticos (excessivamente escuros), núcleos e células pleomórficos (de forma anormal), disceratose (ceratinização prematura das células), aumento da atividade mitótica (número excessivo de mitoses), figuras mitóticas anormais (mitoses tripolares ou em forma de estrela ou figuras mitóticas acima da camada basal). Além disso, as alterações histomorfológicas do epitélio displásico são evidentes no maior aumento, incluindo: cristas epiteliais em forma de gota ou bulbosas, perda de polaridade (perda de maturação progressiva em direção à superfície), pérola de ceratina ou epiteliais (coleções redondas e focais de células ceratinizadas em camadas concêntricas), perda de coesão celular típica (Neville *et al.*, 2004).

2.4. Panorama do câncer no Brasil

O Ministério da Saúde, por meio do Instituto Nacional de Câncer (INCA), estima que no biênio 2010/2011 ocorram 489.270 novos casos de câncer no Brasil. No panorama nacional, essa doença se apresenta como um grave desafio para a saúde pública, em virtude da sua elevada incidência, que se contrapõe as possibilidades de prevenção (INCA, 2010).

Dentre todos os cânceres que incidem na região de cabeça e pescoço, 40% ocorrem na cavidade oral. Dados do INCA demonstraram que o câncer bucal ocupa o quinto lugar de incidência entre todos os tipos de câncer nos homens e o sétimo entre as mulheres, no Brasil, num total de 14.120 novos casos. Essa relação de incidência foi mantida, apesar das discretas reduções, ao se comparar com as estimativas do INCA de 2008 e 2010, revelando uma diminuição da taxa bruta de 11,00 para 10,64 entre os homens e de 3,88 para 3,76 entre as mulheres (INCA, 2008).

O câncer e as lesões pré-cancerizáveis são um desafio para a Saúde Pública Brasileira devido a tendência crescente do número de casos. Pinheiro *et al.*, 2010, avaliaram os conhecimentos e diagnóstico em câncer bucal entre os profissionais de odontologia de Jequié, Bahia, e concluíram que os profissionais de odontologia tem um conhecimento inconsistente com relação ao reconhecimento de alguns fatores de risco e procedimentos diagnósticos.

2.5. Fatores de prognóstico

Waldron e Shafer, 1975, estudaram 3.256 casos de leucoplasia bucal, usando o método convencional de avaliação histopatológica com

coloração hematoxilina e eosina (H.E), mostrando, através de suas experiências, que a separação entre a displasia discreta, moderada, displasia acentuada e carcinoma *in situ* é difícil; reforçando a necessidade de métodos mais precisos para essas avaliações. A progressão para carcinoma invasivo está diretamente relacionada com a severidade das alterações displásicas, mas a avaliação é altamente subjetiva (Macluskey *et al.*, 1999).

Segundo Tumuluri *et al.*, 2002, os marcadores de proliferação celular têm sido um assunto comum na evolução da imunohistoquímica. Esse método tem se tornado a nova perspectiva para a compreensão do crescimento tumoral, com repercussão no prognóstico e na terapêutica dessas lesões.

Steinbeck, em 2002, afirmou que a pesquisa do marcador do potencial de malignidade busca identificar no âmbito da lesão precursora, aquelas que verdadeiramente progredirão para a malignidade, já nas lesões neoplásicas analisa-se o potencial de malignidade, chances de recorrência e metastatização.

2.5.1. Ki-67- Antígeno de proliferação celular

A proliferação celular anormal aparece como fator precursor e pode ser um preditor na origem de tumores malignos. Dentre os marcadores de proliferação celular o Ki-67 é tido como dos mais promissores (Tumuluri *et al.*, 2002).

Teresa *et al.*, 2007, sugeriram a imunohistoquímica combinada com os parâmetros morfométricos na análise do marcador Ki-67, apresentam-se como um diferencial para determinar o comportamento proliferativo das células,

tornando-o um bom marcador para velocidade de crescimento dos tumores orais.

Macluskey *et al*, em 1999, examinaram 47 espécimes, sendo 12 tecidos normais (controle), 17 displasias e 18 carcinomas de células escamosas. A classificação foi feita através da análise dos espécimes em coloração H.E. Os espécimes foram cortados com a espessura de 5µm e processados para a marcação com Ki-67. Para quantificar o padrão de proliferação foi calculada a porcentagem de células positivas para Ki-67 em dez seções distintas. A comparação dos três grupos de tecidos feita por uma análise de variância única mostrou um aumento significativo no índice de proliferação em lesões mais severas ($p < 0.001$). O índice de proliferação tanto do carcinoma como das displasias foram significativamente maiores que os índices dos tecidos normais ($p < 0.001$). Entretanto entre os grupos das displasias e carcinomas não houve diferenças estatisticamente significativas. O índice de proliferação, neste trabalho, não está associado com o consumo de tabaco e álcool. A expressão do Ki-67 facilita a detecção precoce das alterações da mucosa oral, mas, não é um bom indicador para transformações malignas.

Teresa *et al*, 2007, avaliaram a efetividade das medidas do AgNOR e do Ki-67 para determinar as taxas de crescimento das lesões orais. Foram estudadas 83 biópsias, sendo 20 hiperplasias fibrosas inflamatórias, 40 leucoplasias e 23 carcinomas de células escamosas. Dentro do grupo das leucoplasias 22 biópsias foram diagnosticadas como não-displásicas e 18 leucoplasias displásicas, apresentavam displasias discretas, moderadas ou acentuadas. As imunomarcações do Ki-67 foram classificadas de forma

crescente na seguinte ordem: hiperplasia fibrosa inflamatória, leucoplasia com displasia, leucoplasia sem displasia e carcinoma de células escamosas. Isto indicando que o Ki-67 é um bom marcador para determinar a proliferação celular. O Ki-67 e o AgNOR podem ser usados para determinar os níveis de proliferação celular no câncer de boca.

Kovesi *et al.*, 2002, observaram que a expressão do Ki-67 está diretamente ligada a severidade das displasias nas leucoplasias.

2.5.2. Proteína p53

Trata-se de uma proteína codificada por um gene situado no cromossomo 17, o qual leva o mesmo nome (gene p53), em consequência do seu peso molecular de 53 kDa (quilo/Dalton). Sua principal função está relacionada à preservação da integridade do código genético em cada célula. Durante o ciclo de divisão celular, a proteína p53 faz uma verificação quanto à ocorrência de mutação na seqüência do código genético em consequência de um a duplicação defeituosa do DNA (Pinho *et al.*, 2000).

A inativação funcional do gene p53 por mutação ou deleção representa anormalidades genéticas bastante frequentes encontradas em displasias e neoplasias humanas. Essa inativação deixa tais células mais susceptíveis a estímulos oncogênicos e a agressões do meio ambiente. As células geneticamente modificadas levarão, com o tempo, à seleção de clones malignos (Weinberg, 2000).

As mutações levam à produção de proteínas de conformação alterada, o que permite que ela seja detectada mais facilmente pela técnica da imunistoquímica. O efeito regulador negativo da p53 sobre a proliferação

celular parece ser inativado pelas mutações, o que confere vantagem proliferativa às células neoplásicas. Existe uma forte correlação entre a expressão do p53 e proliferação celular (Cruz *et al.*, 2000; Piattelli *et al.*, 2002; Tanaka *et al.*, 2002). A marcação positiva de p53 nas leucoplasias está diretamente ligada a severidade das displasias e associada com a redução do índice de sobrevida dos pacientes (Kovesi *et al.*, 2002; Ogmundsdóttir *et al.*, 2009).

Objetivando estudar os eventos precoces no processo de transformação maligna, Regezi *et al.*, 1995, pesquisaram a expressão da p53 em 19 lesões de pacientes que tiveram como diagnóstico diferencial displasia epitelial ou carcinoma *in situ* que, durante sua história natural, persistiram, recidivaram ou progrediram. Cerca da metade das atipias foram positivas, independentemente da severidade das alterações histopatológicas. Destas, três (p53 positivas) evoluíram para o carcinoma invasivo e dos seis carcinomas *in situ* quatro foram positivos. Assim os autores concluíram que as atipias são sinalizadoras precoces das transformações malignas.

Reis-Costa *et al.*, 2004, analisaram a expressão da proteína p53 em epitélio oral normal, displásico e hiperplásico. Foram analisados cinco espécimes de epitélio normal, sete de epitélio hiperplásico e vinte de epitélio displásico, os quais foram classificados em leves (sete casos), moderados (oito casos), e acentuados (cinco casos). Dentre os resultados obtidos verificou-se que em nenhum espécime normal ou hiperplásico houve imunorreatividade p53. No entanto, cinco dos sete casos de displasias leves (72%), quatro das oito displasias moderadas (50%) e todas as displasias graves (100%) apresentaram positividade à p53. Estes resultados sugerem que a expressão

da proteína p53 é um fenômeno indicativo de alterações displásicas do epitélio oral.

García *et al.*, 2005, avaliaram a expressão da p53 nas alterações genéticas presentes nas etapas precoces do câncer de boca. Foram selecionados 53 pacientes portadores de leucoplasia oral, atendidos no Hospital Universitário de Salamanca, de 1990 até 2000. Após exame anatomopatológico das biópsias, observou-se a presença de 11 amostras de epitélio normal, 15 displasias leves e moderadas, 15 carcinomas *in situ* e 12 carcinomas microinvasivos. Os espécimes foram submetidos à técnica da imunistoquímica Biotina/estreptovidina amplificada (BSA). Após análise em microscópio óptico a proliferação celular e expressão de p53 ficaram mais marcantes conforme avançava a severidade histopatológica das lesões. As alterações precoces apresentaram aumento significativo da proliferação celular, principalmente no grupo das displasias leves e moderadas e conseqüentemente aumento da expressão da p53. O estudo imunistoquímico e molecular das lesões é um meio rotineiro que permite conhecer a expressão protéica das alterações genéticas sendo a p53 um marcador indicado para lesões mais avançadas.

Lawall *et al.*, 2006, selecionaram 24 espécimes de leucoplasias que foram divididos em três grupos: 8 leucoplasias grau I (leucoplasias pequenas com discreta hiperkeratose), 8 leucoplasias grau II (placas brancas apresentando hiperkeratose), 8 leucoplasias grau III (placas brancas e verrucosas, com hiperkeratoses e papilomatosis). Os tecidos foram submetidos a testes imunistoquímicos. Para observar a expressão do p53 e PCNA, os cortes foram analisados pelo método de quantificação digital Qwin Image

System associados a um microscópio. A avaliação envolveu a quantificação visual dos núcleos marcados e seleção de área aleatoriamente com tamanho aproximado de 19,5µm. As leucoplasias apresentaram diferentes resultados na expressão do p53 e do PCNA. A marcação do p53 restringiu-se às camadas basal e parabasal, enquanto o PCNA marcou praticamente todas as camadas epiteliais. O padrão de expressão desses marcadores foi histologicamente e estatisticamente semelhante entre as lesões.

Caly *et al.*, 2007, realizaram um estudo a fim de verificar o valor da expressão do p53 no carcinoma epidermóide de lábio. O estudo imunohistoquímico foi realizado segundo a técnica de Streptavidina-Biotina-Peroxidase. A expressão da p53 foi positiva em 87,5% dos carcinomas epidermóide de lábio bem diferenciados, 60% nos carcinomas moderadamente diferenciados e 91,67% nos pouco diferenciados. Nas margens da ressecção cirúrgica a marcação para p53 foi negativa em 94,23% e positiva em 5,77% dos casos estudados; o que determina a associação entre o grau de diferenciação e a expressão do p53 ($p=0,05$). Os autores concluíram que a expressão da p53 foi positiva na lesão primária e negativa na margem de ressecção cirúrgica.

2.6. Métodos Diagnósticos

Os exames histopatológicos de rotina são altamente subjetivos, o que dificulta a classificação das leucoplasias quanto aos seus graus de displasia - discreta, moderada, acentuada. Abbey *et al.*, 1995, pesquisaram as divergências na diferenciação dos epitélios displásicos e não-displásicos. Observaram que 80.3% dos resultados assinalados pelos patologistas não foram semelhantes quando comparados.

A pesquisa do marcador de malignidade busca identificar no âmbito da lesão precursora, aquelas que verdadeiramente progredirão para a malignidade. Desta forma, os resultados podem ser às vezes controversos, o que motiva os estudos que buscam correlacionar as gradações convencionais com os métodos mais sensíveis, como por exemplo, a técnica das imunohistoquímicas. O ponto importante desta técnica é a extrema especificidade de determinado anticorpo para um antígeno em particular (Lumerman *et al.*, 1995; Alves *et al.*, 1999; Moles *et al.*, 2002; Steinbeck *et al.*, 2002; Reis-Costa *et al.*, 2004). Segundo Mithani *et al.*, 2007, os estudos moleculares servem como base para prever possíveis transformações malignas.

Embora as marcações imunohistoquímicas sejam bastante específicas e evidenciem o comportamento biológico das células, sua quantificação visual nem sempre é precisa, para tanto foram desenvolvidos métodos análises quantitativas e espectrofotométricas por imagem. Segundo Teresa *et al.*, 2007, a fim de aperfeiçoar a avaliação celular proliferativa, além de outras vantagens como velocidade na análise, consistência nos resultados e automação (Moles *et al.*, 2002; Teresa *et al.*, 2007).

Francisco *et al.*, 2004, avaliaram o programa Image-Pro Plus 4.5 (Media Cybernetics, Silver Spring, EUA) para a contagem automática dos núcleos imunopositivos para PCNA. Foram utilizadas 154 imagens microscópicas digitalizadas coloridas e obtidas de onze cortes histológicos de líquen plano oral reticular, processados por imunohistoquímica para PCNA. Os parâmetros de densidade média (nível de cinza), densidade de vermelho, de verde e de azul, área, eixo menor, taxa de perímetro e redondeza foram

usados para a discriminação dos núcleos positivos, que no final do processo, apresentavam estes núcleos delineados e contados. A definição dos limites de corte para a densidade média e área foi realizada automaticamente em função, respectivamente, da média de densidade e da média da área dos núcleos imunopositivos presentes em cada imagem. Para controle foi realizado um delineamento manual dos núcleos imunopositivos sobre as imagens digitalizadas e sua contagem visual. A comparação entre o método computadorizado e a contagem visual mostrou uma correlação estatisticamente significativa ($p < 0.001$) e uma alta proporção 89,8% de núcleos imunopositivos contados coerentemente pelo programa de computador. Os principais parâmetros associados com a alta correlação entre os resultados obtidos pela análise computadorizada e do controle foram os limites de cortes para a densidade média (nível cinza) e área baseados no padrão da imagem. Além disso, a análise de imagem usando o Image-Pro Plus 4.5 com definição automática de limites de corte para a densidade média e área pode ser considerada uma alternativa válida para o método visual de núcleos imunopositivos para PCNA.

2.7. Hiperplasia (considerações gerais)

Outro tipo de proliferação celular importante, com ocorrência frequente na boca é a hiperplasia. Esta é definida por Robbins *et al.*, em 2005, como sendo um aumento no número de células de um órgão ou tecido, geralmente resultando em aumento de volume. A hiperplasia é causada pela produção de fatores locais de crescimento, aumento dos receptores dos fatores de crescimento nas células envolvidas ou na ativação de determinadas vias de

sinalização intermolecular. Todas essas alterações levam à produção de fatores de transcrição que ativam muitos genes celulares, inclusive os genes que codificam o crescimento, receptores para os fatores de crescimento e reguladores do ciclo celular, resultando em proliferação celular.

A capacidade de proliferação hiperplásica tem limites e as células apresentam estratificação epitelial regular e não tem sinais de atipias. As células hiperplásicas não se multiplicam indefinidamente e, embora formem uma população nova crescendo no local estimulado, conservam os mecanismos de controle da divisão celular e diferenciação. Além disso, a hiperplasia é um processo reversível, no sentido de que, se a causa é eliminada, a população celular volta ao nível normal. Essas propriedades são fundamentais para diferenciar a hiperplasia de uma neoplasia (Brasileiro Filho, 2004; Warnakulasuriya *et al.*, 2008) As hiperplasias fibrosas inflamatórias não apresentaram neste estudo espectrofotometria expressiva, indicando a ausência de malignidade da lesão.

A hiperplasia pode ser dividida em fisiológica ou patológica. Os principais tipos da primeira são as hiperplasias compensadoras e as secundárias a estimulação hormonal, como a que ocorre no útero durante a gravidez ou a da mama na puberdade ou durante a lactação. Exemplo clássico da hiperplasia compensadora é a que acontece no rim após a nefrectomia ou lesões graves do outro rim. Os exemplos mais conhecidos de hiperplasia patológica são as secundárias a hiperestimulação hormonal. Quando existe

hiperfunção da hipófise, por exemplo, todas as glândulas-alvo dos hormônios produzidos em excesso entram em hiperplasia (Brasileiro Filho, 2004).

3. OBJETIVOS GERAIS

Observar a expressão dos imunomarcadores Ki-67 e p53 em leucoplasias orais.

3.1. Objetivos Específicos

1. Correlacionar a expressão espectrofotométrica das leucoplasias orais com a expressão dos imunomarcadores Ki-67 e p53.

4. MATERIAL E MÉTODO

4.1. Seleção da amostra

As amostras foram obtidas do arquivo do serviço de Patologia da Disciplina de Patologia Bucal do curso de Odontologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Faculdade de Odontologia Professor Albino Coimbra, sendo 11 amostras de cada grupo estudado (11 hiperplasia fibrosas inflamatórias, 11 leucoplasias com displasia e 11 leucoplasias sem displasia).

Foi realizado o levantamento de dados referentes ao número de exames histopatológicos efetuados entre 2005 e 2010 e posteriormente, selecionados os casos diagnosticados como leucoplasia com displasia, sem displasia e hiperplasia fibrosa inflamatória.

Todas as amostras de biópsia eram do tipo incisionais, fixadas em formol e incluídas em parafina. Os critérios avaliados para a inclusão dos blocos neste estudo foram: inclusão adequada do material, qualidade e quantidade do espécime no bloco de parafina, histopatologia específica e preservação do material.

4.2. Preparo da Amostra

As amostras foram novamente revisadas na coloração H.E. Os critérios avaliados para o grupo das leucoplasias foram: presença ou ausência de displasia epitelial, obedecendo aos critérios da Organização Mundial de Saúde (Pindborg, 1985). O grupo da hiperplasia fibrosa inflamatória foi selecionado aleatoriamente.

4.3. Metodologia

4.3.1. Técnica da imunistoquímica

A confecção das lâminas se deu no Laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). As amostras selecionadas foram submetidas à técnica imunistoquímica para avaliar a reação dos anticorpos Ki-67 e p53, utilizando o protocolo da *Streptavidina Biotina Peroxidase*.

Os materiais processados e emblocados em parafina foram cortados com 3µm de espessura e depositados sobre lâminas silanizadas. A reação de imunistoquímica foi realizada segundo Santos *et al.*, 1999, utilizando a recuperação antigênica por calor úmido em tampão citrato 10mM pH 6,0. Como anticorpos primários foram utilizados os monoclonais anti-p53 (Clone BP53.12 - Invitrogen) e anti-Ki67 (Clone 7B11 – Invitrogen).

A revelação das lâminas foi realizada com o substrato cromógeno diaminobenzidina (Líquido DAB + substrate, Chromogen System, DAKOCytomation-USA) preparado conforme as instruções do fabricante.

Após a lavagem em água corrente para a retirada do excesso de cromógeno, as secções foram contra coradas com hematoxilina de Harris por 20 segundos e lavadas, em seguida, com água amoniacal e, a seguir com água corrente.

Finalmente, seguiu-se a desidratação das secções, em três banhos de álcool a 99%, e montagem das lamínulas com Entellan (Merck).

4.4. Análise descritiva da imunoistoquímica

Após as imunomarcações, estas amostras foram avaliadas por três examinadores calibrados, que usaram microscopia de luz com aumentos de 400 vezes.

As marcações imunoistoquímicas foram caracterizadas como positivas ou negativas, sendo que a positividade dos anticorpos foi determinada pela forte coloração acastanhada dos núcleos que neste trabalho foi avaliada somente nas células epiteliais das lesões.

Quando a imunomarcação encontrava-se positiva, analisou-se também a localização, se apenas na camada basal, nas camadas basal e parabasal ou na região suprabasal (esta correspondendo à positividade acima da quarta camada epitelial) (Cruz *et al.*, 1998). A análise da localização foi realizada desta forma nas hiperplasias fibrosas inflamatórias e leucoplasias.

4.5. Leitura das lâminas e obtenção de imagens

A leitura das lâminas foi realizada por dois examinadores sendo observado apenas a conformação epitelial do espécime. Em cada corte selecionou-se três regiões distintas acima da camada basal.

As imagens foram capturadas em fotomicroscópio Carl Zeiss adaptado a microcâmera Samsung conectada a um computador com placa de captura de imagens e Software Image Lab versão 2000.

4.6. Análise das imagens

A espectrofotometria foi realizada com o auxílio do programa Image Pro-Plus 5.0, previamente calibrado para o tom de marrom específico, característico das marcações estudadas (Fig.1). Observou-se, somente no epitélio das lesões, a quantidade de núcleos compatíveis com o espectro por pixel (Fig. 2) selecionado nas amostras (Fig. 3).

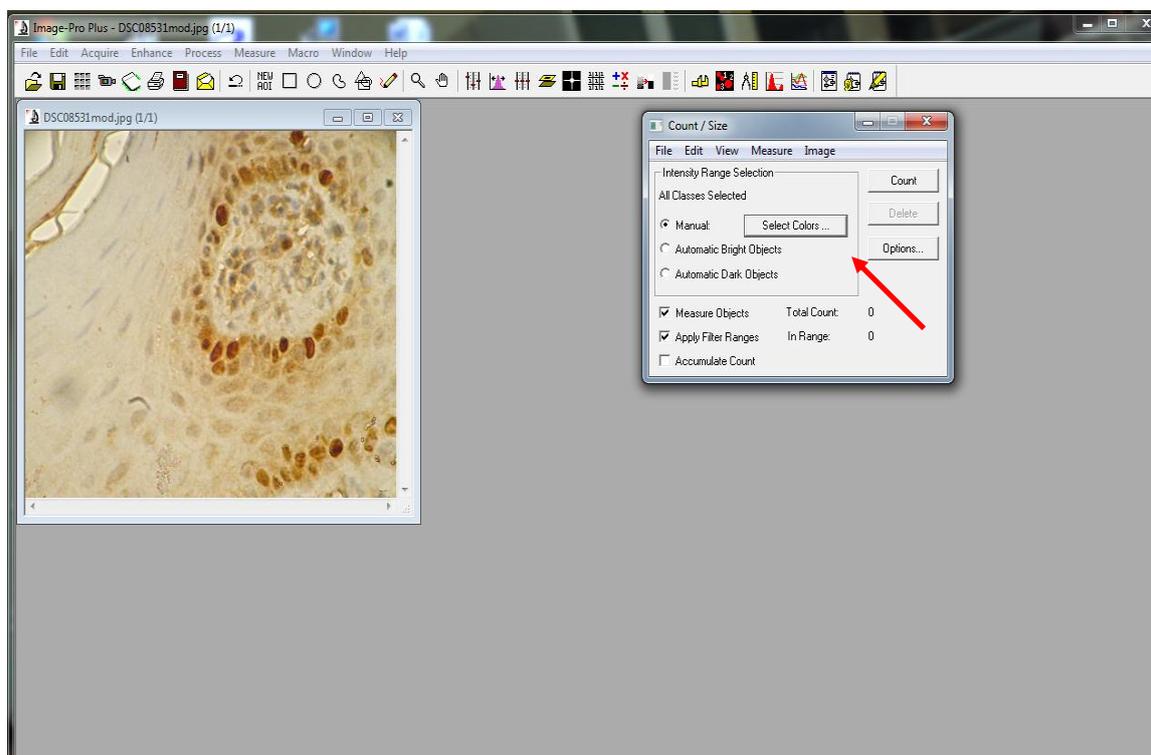


Figura 1. Calibragem do programa (seleção de cor).

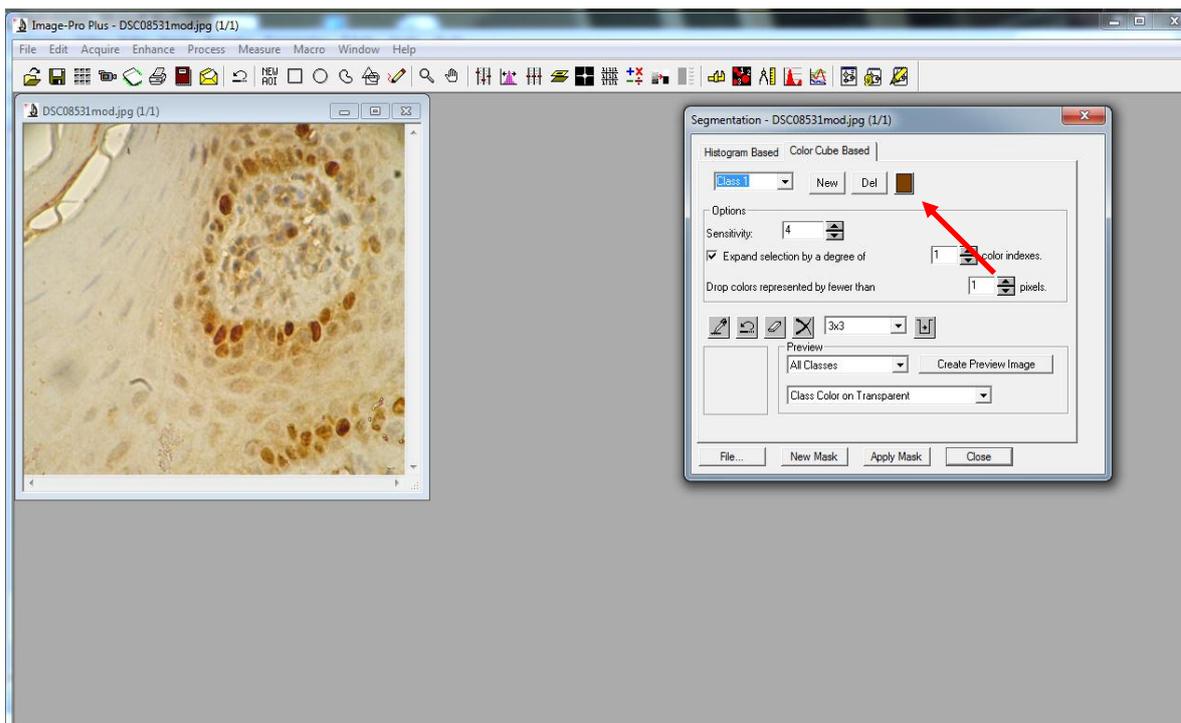


Figura 2. Seleção do espectro de marrom.

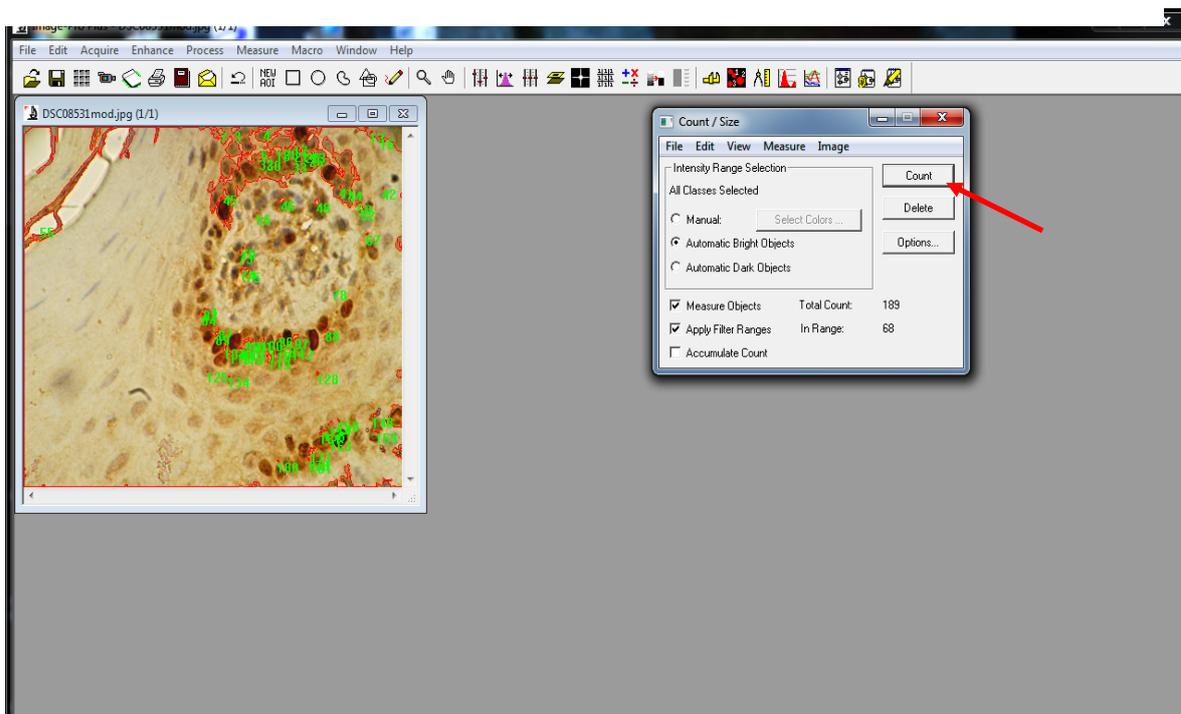


Figura 3. Espectrofotometria no Programa Image Pro Plus 5.0.

4.7. Análise estatística

Os dados foram tabulados e analisados com obtenção das medidas de tendência central (média) e de dispersão (desvio padrão). Foi aplicado o teste estatístico two-way ANOVA e teste complementar de Bonferroni para apontar a origem das diferenças. O nível de decisão estabelecido foi de $p \leq 0,05$. Em relação às variáveis estudadas se aceita a hipótese de nulidade com distribuição normal dos valores ($p > 0,05$).

5. RESULTADOS

Os resultados encontrados para a expressão dos marcadores ki-67 e p53 nas hiperplasias fibrosas inflamatórias e leucoplasias encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Valores de expressão dos marcadores ki-67 e p53.

Grupos	ki-67	p53
Hiperplasia Fibrosa Inflamatória	65,08 ± 23,94	55,19 ± 33,93
Leucoplasia sem Displasia	112,9 ± 59,82	173,27 ± 52,96
Leucoplasia com Displasia	239,25 ± 160,91	533,93 ± 422,95

Estes resultados são apresentados sob forma gráfica na Figura 1.

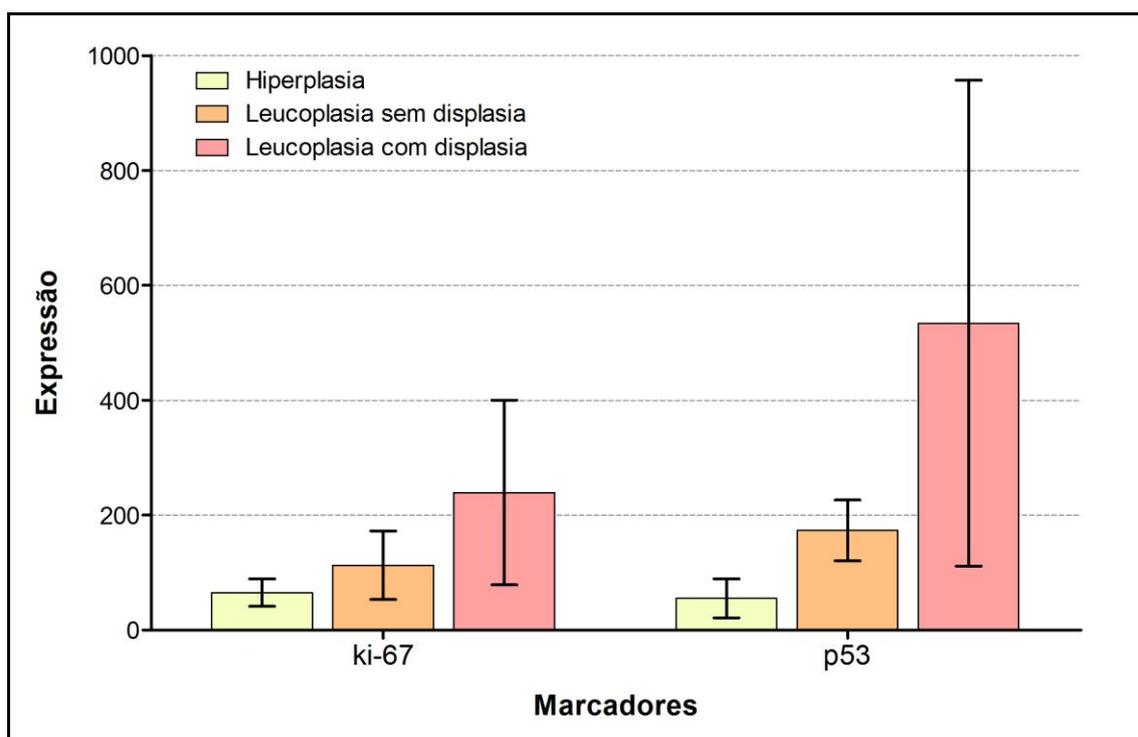


Figura 1 - Gráfico ilustrando a expressão do marcador ki-67 nas patologias estudadas.

A análise estatística (two-way ANOVA) aplicada aos resultados encontrados revelou diferenças significantes entre as patologias estudadas ($p < 0,001$), bem como entre os marcadores utilizados ($p = 0,0049$). O teste complementar de Bonferroni apontou a origem destas diferenças, não sendo detectadas entre as hiperplasias e as leucoplasias sem displasia ($p > 0,05$). Entretanto, enquanto o marcador ki-67 indicava diferenças nos níveis de expressão apenas entre hiperplasia e leucoplasia com displasia ($p < 0,05$), o marcador p53 era capaz de diferenciar os dois tipos de leucoplasia de forma distinta ($p < 0,001$), sendo mais sensível.

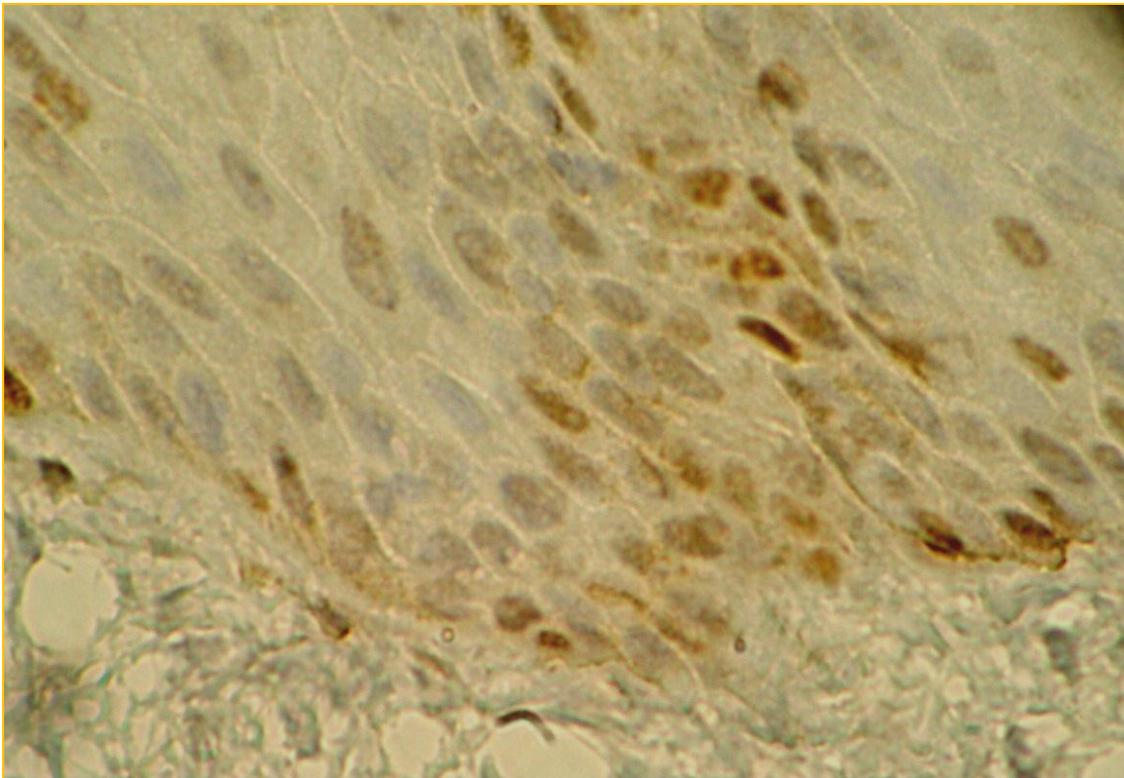


Figura 7. Leucoplasia marcada com p53 observada em microscópio de luz com aumento de 400X.

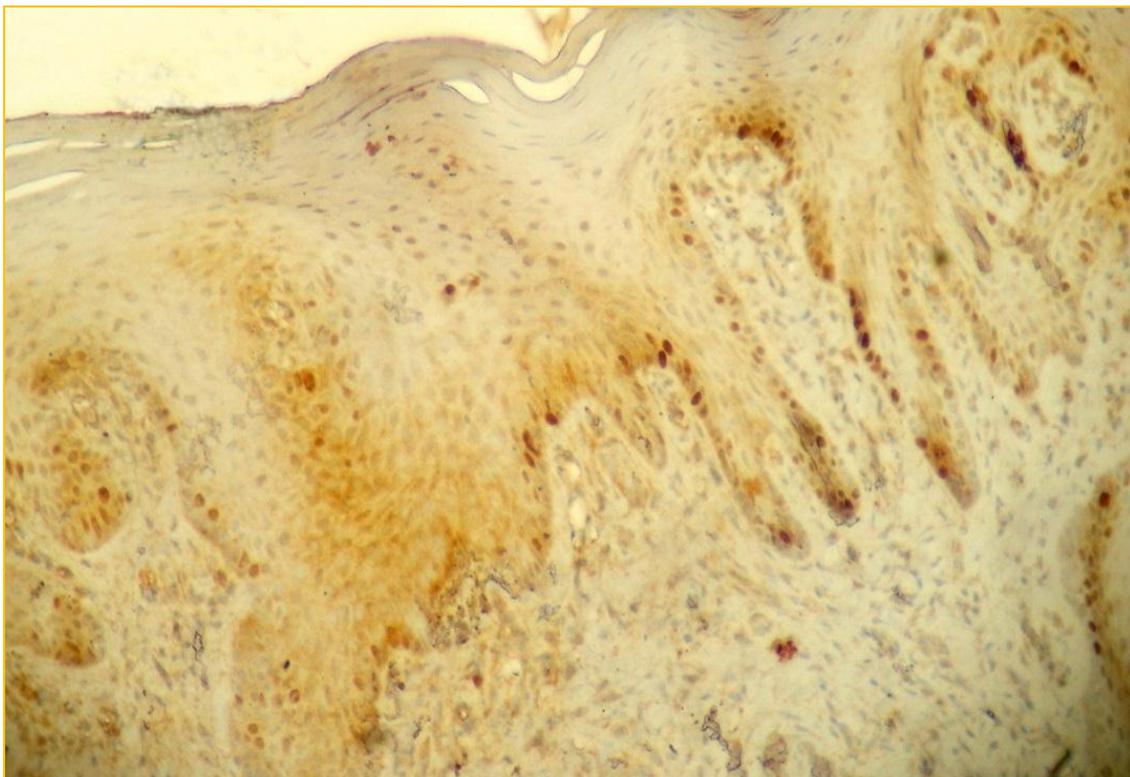


Figura 8. Leucoplasia marcada com Ki-67 observada em microscópio de luz com aumento de 400X.

6. DISCUSSÃO

Segundo Bánóczy e Csiba, 1976; Hogewind *et al.*,1989; Jaber *et al.*,1999; Neville *et al.*, 2004; Partridge *et al.*, 2001,Holmstrup *et al.*, 2007 a presença de displasia epitelial aumentam as chances de transformação maligna das leucoplasias, não excluindo as lesões sem displasia desta possibilidade. No presente estudo as leucoplasias (com displasia e sem displasia) apresentaram diferenças bastante significativas quando comparadas espectrofotometricamente com as hiperplasias fibrosas inflamatórias. Entretanto houve também diferença estatística na análise entre as leucoplasias com e sem displasias, embora menos significativas, concordando com os autores acima descritos os quais não excluem as leucoplasias sem displasia da possibilidade de malignização, contudo as leucoplasias com displasia tiveram mais destaque, apresentando maior saturação imunoistoquímica.

As marcações localizadas na região suprabasal foram destacadas devido à importância da identificação de positividade nesta área. A marcação nesta área não é esperada normalmente e quando localizada, cogita-se a idéia da presença de alterações genéticas nas células (Cruz *et al.*, 1998; Moles *et al.*, 2002). Outro ponto relevante da análise imunoistoquímica é a capacidade de evidenciar o comportamento biológico das células. Quando as atípias celulares atingem a camada basal, parabasal e células da camada espinhosa, provavelmente estariam sinalizando proliferações celulares descontroladas. Acreditam que as marcações localizadas na região suprabasal, não são esperadas normalmente e quando localizadas, cogita-se a idéia da presença de alterações genéticas nas células (Gomes *et al.*, 2000 ; Cruz *et al.*, 1998; Moles *et al.*, 2002).

Embora a literatura seja extremamente vasta neste assunto, inúmeros autores mostram a necessidade de fatores de prognóstico para doenças potencialmente malignas. A progressão patológica detalhada da lesão cancerizável e a relação desta com os oncogenes e genes supressores de tumor ainda precisam ser mais definidas (Bánkfalvi e Piffkó, 2000; Loro *et al.*, 2003).

Waldron e Shafer, 1975; Macluskey *et al.*, 1999, a progressão para carcinoma invasivo está diretamente relacionada com a severidade das alterações displásicas, mas a avaliação é altamente subjetiva. Corroborando com esta idéia Abbey *et al.*, 1995, pesquisaram as divergências na diferenciação dos epitélios displásicos e não-displásicos. Observaram que 80.3% dos resultados assinalados pelos patologistas não foram semelhantes quando comparados.

Buscando maior especificidade Lumerman *et al.*, 1995; Alves *et al.*, 1999; Moles *et al.*, 2002; Steinbeck *et al.*, 2002; Reis-Costa *et al.*, 2004. Segundo Mithani *et al.*, 2007, mostraram que os estudos moleculares servem como base para prever possíveis transformações malignas, afim de identificar no âmbito da lesão precursora, aquelas que verdadeiramente progredirão para a malignidade. Entretanto, apesar das marcações imunohistoquímicas serem bastante específicas e evidenciem o comportamento biológico das células, sua quantificação visual nem sempre é precisa. No presente estudo observou-se extrema agilidade na análise dos espécimes e especificidade. Não foi encontrado na literatura trabalhos comparando a atividade do Ki-67 e p53 em leucoplasias, contudo este trabalho observou maior reatividade de p53,

mostrando-se mais sensibilidade quando analisada visual e espectrofotometricamente.

De acordo Francisco *et al.*; Moles *et al.*, 2002; Teresa *et al.*, 2007 a avaliação proliferativa celular realizada pelo programa Image-Pro Plus, além de outras vantagens como velocidade, consistência nos resultados e automação da análise de imagem. Pode ser usado para definição automática de limites de cortes, para a densidade média e área pode ser considerada uma alternativa válida para o método visual de núcleos imunopositivos. Evidenciando ainda mais as vantagens da automação visual da avaliação das imagens, no presente estudo observou-se grande facilidade na leitura das lâminas e imparcialidade nos resultados visto que o programa estava previamente calibrado para determinada função.

7. CONCLUSÕES

Com base na metodologia empregada e nos resultados obtidos, conclui-se que:

- As leucoplasias com displasia apresentam maior densidade espectrofotométrica nos dois marcadores estudados (p53 e Ki-67).
- As leucoplasias sem displasia e hiperplasia fibrosa inflamatórias não apresentam diferença expressiva quanto a densidade espectrofotométrica em nenhum dos marcadores estudados (p53 e Ki-67).
- O p53 mostrou-se mais sensível diante das lesões estudadas.

8. REFERÊNCIAS

Abbey LM, Kaugars GE, Gunsoley JC, Burns JC, Page DG, Svirsky JA, *et al.*. Interexaminer and interexaminer reliability in the diagnosis of oral epithelial dysplasia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1995; 80:188-191.

Alberts SB, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molecular biology of the cell*. 3ª ed. New York: Garland; 1994. p. 823-910.

Almeida ALF, Nobre MDP, Galvão HC, Freitas RA. Leucoplasia oral: estudo clínico patológico de 42 casos. *Rev Saúde Natal* 2000; 14(1): 17-22.

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. *Manual de imuno-histoquímica*. Sociedade Brasileira de Patologia 1999; p.259.

Bánóczy J, Csiba Á. Occurrence of epithelial dysplasia in oral leucoplakia. *Oral surg* 1976; 42: 766-774.

Bánkafalvi A, Piffko J. Prognostic and predictive factors in oral cancer: the role of the invasive tumour front. *J Oral Pathol Med* 2000; 29:291-298.

Boffeta PP, Ye W, Adame HO, Miucci LA, Nyren O. Risk of cancers of the lung, head and neck in patients hospitalized for alcohol in Sweden. *Br J Cancers* 2001; 85(5):678-82.

Brasileiro FG. *Boglilo patologia geral*. 3º ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koonegan; 2004. Cap.8, p.173-274.

Bressiani M, Martins MAT, Martins MD. Leucoplasia bucal: revisão de literatura e relato de casos clínicos. *Rev Odontol Univ Santo Amaro* 2004; 9 (1 e 2): 8-12.

Cabay RJ, Morton TH, Epstein JB. Proliferative verrucous leucoplakia and its progression to oral carcinoma: a review of the literature. *J Oral Pathol Med*. 2007; 36: 255-261.

Caly DN, Cherter EZ, Torloni H, Nonogaki S. Expressão do p53 no carcinoma epidermóide de lábio. *Rev. Col. Bras. Cir.* 2007; 34(2): 92-97.

Cruz IB, Snijders PJF, Meijer CJ, Boudewin JB, Gordon BS, Walboomers JM *etal*. P53 expression above the basal cell layer in oral mucosa is an early event of malignant transformation and has predictive value for developing oral squamous cell carcinoma. *J Pathol* 1998; 184:360-368.

Cruz IB, Chris JL, Meijer CJ, Snijders PJF, Gordon BS. p53 imunoexpression in non-malignant oral adjacent to oral squamous cell carcinoma: potential consequences for clinical management. *J Pathol* 2000; 191:132-137

Damante JH, Fleury RN, Silva MAGS, Rubira IRF, Antunes CEA. Leucoplasia bucal. *Realidades da teoria e da prática*. *Gaúcha Odontol* 1997; 45:79-84.

Francisco JS, Moraes HP, Dias EP. Evaluation of the Image-Pro Plus 4.5 software for automatic counting of labeled nuclei by PCNA immunohistochemistry. *Rev Oral Res* 2004; 18 (2): 100-104.

Freitas MD, Carrión AB, Vila PG, López JÁ, Garcia AB, Rey JMG. Clinicopathologic aspects of oral leukoplakia in smokers and nonsmokers. *OOOE* 2006; 102 (2): 199-203.

Gabriel JG *et al.* Considerações gerais e abordagem clínica da leucoplasia oral. *Ver Brás Pathol Oral* 2004; 102 (7): 187-194.

García AS, Hernández MMA, Sánchez EF, Hernández JJ, Sopelana. E.Expresión protéica de p53 y proliferación celular em leucoplasias orales. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2005; 10:1-8.

Gomes APN, Araújo VC, Pintor Junior DS. Avaliação imuno-histoquímica de p53 e PCNA como marcadores de risco para lesões bucais potencialmente malignas. *RPG* 2000; 7: 349-355.

Hartwell LH, Kastan MB. Cell cycle control and cancer. *Sci* 1994; 266:1821-1827.

Hogewind WFC, Kwast WAMVD, Waal IVD. Oral leukoplakia, with emphasis on Malignant Transformation. *J Cranio Max Fac Surg* 1989; 17: 128-133.

Holmstrup P, Vedtofte P, Reibel J, Stoltze K. Oral premalignant lesions: is a biopsy reliable? J Oral Pathol Med. 2007; 36: 262-266.

Hsue SS, Wang WC, Chen CH, Lin CC, Chen YK, Lin LM. Malignant transformation in 1458 patients with potentially malignant oral mucosal disorders: a follow-up study based in a Taiwanese hospital. J Oral Pathol Med 2007; 36: 25-29.

Ide R, Mizoue T, Fujino Y, Hoshiyama Y, Sakata K, Tamakoshi A, *et al.* Cigarette smoking, alcohol drinking, and oral and pharyngeal cancer mortality in Japan. Oral Diseases 2008; 14: 314-319.

INCA – Instituto Nacional do Câncer. Estatística inicial e mortalidade por câncer no Brasil. Disponível em URL: <http://www.inca.gov.br/estimativas/2005/midex>

INCA – Instituto Nacional do Câncer. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer. Disponível em URL: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2010/>

INCA – Instituto Nacional do Câncer. Estimativas da incidência e mortalidade por câncer. Disponível em URL: <http://www.inca.gov.br/estimativa/2008/>

Jaber MA. Risk factors for oral epithelial dysplasia: the role of smoking and alcohol. Oral Oncol, Oxford, 1999; 35(2): 151-156.

Kamio N. Coexpression of p53 and c-erbB-2 proteins is associated with histological type, tumour stage, and cell proliferation in malignant salivary gland. *Virchows Archiv B* 1996; 428: 75-83.

Kaur J, Srivastava A, Ralhan R. P53-HSP70. Complexes in oral dysplasia and cancer: Potential prognostic implications. *Oral Oncol* 1998; 34: 373-377.

Kovesi G, Szende B. Progression of leucoplakia is associated with changes in apoptotic and mitotic index as well as in p53 and Ki-67 expression. *Magy Oncol* 2002; 46 (4): 333-338.

Lawall MA, Crivelini MM. PCNA and p53 expression in oral leucoplakia with different degrees of keratinization. *J Appl Oral Sci.* 2006; 14(4): 276-280.

Levine AJ, Perry ME, Mchang P, Silver A, Dittmer P. The role of the p53 tumor suppressor genetic tumorigenesis. *Br J Cancer* 1994; 20(3):409-416.

Liu W, Wang YF, Zhou HW, Shi P, Zhou ZT, Tang GY. Malignant transformation of oral leukoplakia: a retrospective cohort study of 218 Chinese patients.

Lodi G, Porter S. Management of potentially malignant disorders: evidence and critique. *J Oral Pathol Med.* 2008; 37: 63-69.

Loro LL, Vintermyr OK, Johannsen AC. Cell death regulation in oral squamous cell carcinoma: methodological considerations and significance. *J Oral Pathol Med* 2003; 32: 125-138.

Lumerman H, Freedman P, Kerpel S. Oral and maxillofacial pathology, oral epithelial dysplasia and the development of invasive squamous cell carcinoma. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathol* 1995; 79: 321-329.

Macklueskey M, Ogden GR, Green M, Chisholm DM, Schor SL, Schor AM The association between epithelial proliferation and disease progression in the oral mucosa. *Oral Oncol.* 1999; 35: 409-414.

Mithani SK, Mydlarz WK, Grumbine FL, Smith IM, Califano JA. Molecular genetics of premalignant oral lesions. *Oral diseases* 2007; 13:126-133.

Moles GMA, Avila IR, Archilla AR, Lara IM. Suprabasal expression of Ki-67 antigen as a marker for presence and severity of oral epithelial dysplasia. *Head & Neck* 2002; 22: 658-661.

Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. *Patologia oral e maxilofacial*. 2ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan; 2004. Cap10; p.252-304.

Novellino ATN, Amorin RFB, Queiroz LMG, Freitas RA. Análise da Imunoexpressão do PCNA e p53 em carcinoma de células escamosas oral.

Correlação com a graduação histológica de malignidade e características clínicas. *Acta Cirúrg Bras* 2003; 18 (5): 458-464.

Ogmundsdottir HM, Bjornsson J, Holbrook WP. Role of TP53 in the progression of premalignant and malignant oral mucosal lesions. A follow-up study of 144 patients. *J Oral Pathol Med* 2009; 38: 565-571.

Parise Júnior O. Câncer de boca: aspectos básicos e terapêuticos. Editora Sarvier. 2ª ed. São Paulo 2000. p.200- 205.

Partridge M, Pateromichelakis S, Phillips E, *et al.* Profiling clonality and progression in multiple premalignant and malignant lesions identifies a subgroup of cases with a distinct presentation of squamous cell carcinoma. *Clin Cancer res* 2001; 7: 1860-6.

Pentenero M, Brocoletti R, Carbone M, Conrotto D, Gandolfo S. The prevalence of oral mucosal lesions in adults from the Turin área. *Oral diseases* 2008; 14: 356-366.

Piatelli A, Rubini C, Fioroni M, Lezzi G, Santinelli A. Prevalence of p53, bcl-2 and Ki-67 immunoreactivity and Apoptosis in normal epithelium and in premalignant and malignant lesions of the oral cavity. *J Maxillofac Surg* 2002; 60: 532-540.

Pindborg JJ, Reibel J, Holmstrup P. Câncer e pré-câncer bucal. São Paulo: Panamericana; 1980. Cap.20; p.146-147.

Pinheiro SMS, Jefferson PC, Prado FO. Conhecimentos e diagnóstico em câncer bucal entre os profissionais de odontologia de Jequié, Bahia. Rev Bras de Câncer 2010; 56(2): 195-205.

Pinho MSL. Proteína p53: algum valor clínico ou apenas pesquisa? Uma revisão de literatura. Revista Bras Coloproct 2000; 20(4): 258-260.

Ramalho LMP, Reis SRA, Aquino FC, Góes C, Damis LFT. Carcinoma espinocelular em leucoplasia verrucosa proliferativa: relato de caso e revisão de literatura. Ver Odon Cien 2007; 22(55): 88-91.

Reis-Costa A, Freitas RA. Expressão da proteína p53 em epitélio oral normal, hiperplásico e displásico. Rev ABO Nac 2004; 12(3): 183-186.

Regezi JA, Zarbo RJ, Regev E, Sliverman S. P53 protein expression in sequential biopsies of oral dysplasias and in situ carcinomas. J Oral Pathol Med 1995; 24(1): 18-22.

Robbins SL, Contran RS, Kumar V, Abbas AB, Fausto N. Patologia- Bases Patológicas das doenças. 7ª ed. São Paulo: Elsevier, 2005. Cap.1; p. 6-7.

Rodrigues TLC, Costa LJ, Sampaio MCC, Rodrigues FG, Costa ALL,
Leucoplasias bucais: relação clínico-histopatológico. *Pesq Odontol Bras* 2000;
14(4): 357-361.

Silveira EJD, Lopes MFF, Silva LMM, Ribeiro BF, Lima KC, Queiroz LMG.
Lsões orais com potencial de malignização: análise clínica e morfológica de
205 casos. *J Bras Patol Med Lab* 2009; 45 (3): 233-238.

Schimitt FC, Soares R, Cirnes L, Seruca R. P53 in breast carcinomas:
Association between presence of mutation and immunohistochemical
expression using a semiquantitative approach. *Pathol Res Prac* 1998; 194: 815-
819.

Sherr CJ. Cancer cell cycles. *Sci* 1996; 274 (5293):1672-1671.

Steinbeck RG. Atypical mitoses in lesions of the oral mucosas a new
interpretation of their impact upon tumorigenesis. *Bristh J Cancer* 2002; 86 (11):
1745-1750.

Tanaka N, Sugihara K, Odajima T, Mimura M, Klmijima Y, Ichinose S. Oral
squamous cell carcinoma: electron microscopic and imunohistochemical
characteristics. *Med Electr Microsc* 2002; 35: 127-138.

Teresa DB, Neves KA, Neto CB, Fregonezi PAG, Oliveira RB, Zuanon JAS, *et al.*
Computer assisted analysis of cell proliferation markers in oral lesions. *Acta
Histochemica* 2007; 109: 377-387.

Thongsksai P, Boonyaphiphat P. Lack of association between p53 expression and betel nut chewing in oral cancers from Thailand. *Oral Oncol* 2001; 37:276-281.

Tumuluri V, Thomas GA, Fraser IS. Analysis of the ki-67 antigen at the invasive tumor front of human oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2002; 31: 598-604.

Ulanovski D, Stern Y, Roizman P, Shpintzer T, Popvster A, Feinmesser R. Expression of EGFR and C-erbB-2 as prognostic factors in cancer of the tongue. *Oral Oncol* 2004; 40: 532-537.

Waldron C, Shafer WG. Leukoplakia revisited. A clinicopathologic study 3256 oral leukoplakias. *Cancer*, 1975; 36(4): 165-169.

Weinberg R. Uma célula regenerada. *Ciência atual*. Editora Rocco 5ªed. Rio de Janeiro 2000. 155p.

Warnakulasuriya S, Reibel J, Bouquot J, Dabelsteen E. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weakness and scope for improvement. *J Oral Pathol Med*. 2008; 37: 127-133.

Yen AMF, Chen SC, Chen THH. Dose-response relationships of oral habits associated with the risco of oral pre-malignant lesions among men who chew betel quid. *Oral Oncol*. 2007; 43: 634-638.

Yen AMF, Chen SC, Chang SH, Chen THH. The effect of betel quid and cigarette on multistate progression of oral pre-malignancy. *J Oral Pathol Med.* 2008; 37: 417-422.

9. ANEXOS

ANEXO A - Quantidade de núcleos marcados pela proteína Ki-67 nas Leucoplasias com Displasia por pixel (Média)

Leucoplasia com Displasia Ki-67	
1	156
2	175
3	240
4	162
5	177
6	719
7	438
8	259
9	160
10	381
11	251

ANEXO B - Quantidade de núcleos marcados pela proteína Ki-67 nas Leucoplasias sem Displasia por pixel (Média)

Leucoplasia sem Displasia Ki-67	
1	81
2	80
3	176
4	86
5	85
6	63
7	51
8	118
9	75
10	63
11	60

ANEXO C - Quantidade de núcleos marcados pela proteína Ki-67 Hiperplasias Fibrosas Inflamatórias por pixel (Média)

Hiperplasia Fibrosas Inflamatórias Ki-67	
1	110
2	95
3	53
4	16
5	82
6	75
7	74
8	60
9	61
10	73
11	54

ANEXO D - Quantidade de núcleos marcados pela proteína p53 Leucoplasias com Displasia por pixel (Média)

Leucoplasia com Displasia p53	
1	650
2	565
3	761
4	176
5	316
6	251
7	548
8	205
9	293
10	181
11	518

ANEXO E - Quantidade de núcleos marcados pela proteína p53 Leucoplasias sem Displasia por pixel (Média)

Leucoplasia sem Displasia p53	
1	181
2	156
3	167
4	139
5	198
6	148
7	289
8	86
9	162
10	148
11	232

ANEXO F - Quantidade de núcleos marcados pela proteína p53 nas Hiperplasias Fibrosas Inflamatórias por pixel (Média)

Hipesplasia Fibrosa Inflamatória p53	
1	44
2	61
3	53
4	56
5	90
6	67
7	44
8	130
9	84
10	40
11	16

Análise espectrofotométrica da expressão dos imunomarcadores Ki-67 e p53 em Leucoplasias Orais.

RESUMO

Bueno EC. **Análise espectrofotométrica da expressão dos imunomarcadores Ki-67 e p53 em Leucoplasias Orais.** Campo Grande, 2011. [Dissertação – Programa de Pós-Graduação em Saúde e Desenvolvimento na Região do Centro-Oeste].

Este trabalho se propôs a analisar espectrofotometricamente o comportamento imunoistoquímico das leucoplasias perante aos anticorpos Ki-67 e p53. Foram analisadas 11 espécimes de leucoplasia, 11 leucoplasias sem displasia e os resultados obtidos foram comparados aos do grupo controle, composto por 11 hiperplasias fibrosas inflamatórias. Os espécimes foram cortados com a espessura de 3 μ m, depositados em laminas previamente silanizadas e submetidos a processamento imunoistoquímico. As laminas foram analisadas em microscópio óptico por dois examinadores e sem seguidas selecionados três campos em cada lamina, excluindo a camada basal, para a análise espectrofotométrica. Quando comparado o grupo das leucoplasias com o das hiperplasias fibrosas inflamatórias, observou-se diferença estatisticamente significativa tanto na marcação de Ki-67 quanto p53. Houve significância estatística na comparação das leucoplasias com displasias e hiperplasias marcadas com p53 e Ki-67. Na comparação das leucoplasias sem displasia com as leucoplasias com displasia houve significância estatística para os dois marcadores. Conclui-se que as leucoplasias com displasia apresentam maior densidade espectrofotométrica, o p53 mostrou-se mais sensível nas lesões estudadas e diante dos marcadores estudados as leucoplasias sem displasia não apresentaram densidade espectrofotométrica relevante.

Palavras-chaves: fatores de prognóstico, imunoistoquímica, leucoplasia

1. INTRODUÇÃO

As leucoplasias são as lesões cancerizáveis mais comuns da cavidade oral. Tem esta definição devido a sua capacidade de sofrer alterações celulares malignas e desenvolver câncer bucal, pois podem apresentar tecido morfológicamente alterado. O seu diagnóstico é estritamente clínico e não depende de aparências definidas, mas

sim da exclusão de outras lesões que se apresentam como placas brancas na boca (Waldron e Shafer, 1975; INCA, 2005; Parise Jr, 2000).

Os fatores predisponentes responsabilizados com mais frequência são: o álcool e o tabaco. Há predominância em homens, acima de 40 anos, podendo desenvolver-se em qualquer região da mucosa bucal. Entretanto as lesões presentes na língua, vermelhão dos lábios e assoalho da boca somam mais de 90% daquelas que indicam displasia ou carcinoma *in situ* (Neville *et al.*, 2004; Ide *et al.*, 2008).

Histologicamente as leucoplasias podem apresentar epitélios displásicos ou não-displásicos. Alguns pesquisadores enfatizam que a presença de displasia aumentam as chances de transformações malignas, não excluindo as lesões não-displásicas dessa possibilidade (Pindborg, 1980; Holmstrup *et al.*, 2007).

No método convencional de avaliação histopatológica com coloração hematoxilina e eosina (H.E) a separação entre a displasia discreta, moderada, displasia acentuada e carcinoma *in situ* é difícil o que reforça a necessidade de métodos mais precisos para essas avaliações. A progressão para carcinoma invasivo está diretamente relacionada com a severidade das alterações displásicas, mas a avaliação é altamente subjetiva (Waldron *et al.*, 1975; Macluskey *et al.*, 1999).

O estudo imunoistoquímico e molecular de lesões cancerizáveis é um meio rotineiro que permite conhecer a expressão protéica das alterações genéticas, que pode ajudar no diagnóstico precoce e tratamento de patologias (Lumerman *et al.*, 1995; Alves *et al.*, 1999; Gomes *et al.*, 2000 ; Cruz *et al.*, 1998; Moles *et al.*, 2002; Steinbeck *et al.*, 2002; Reis-Costa *et al.*, 2004; Garcia *et al.*, 2005).

Embora as marcações imunoistoquímicas sejam bastante específicas e evidenciem o comportamento biológico das células, sua quantificação nem sempre é precisa, para tanto foram desenvolvidos métodos quantificadores por imagem a fim de aperfeiçoar a avaliação celular proliferativa, além de outras vantagens como velocidade na análise, consistência nos resultados e automação (Teresa *et al.*, 2007).

Avaliar o comportamento biológico das leucoplasias a fim de evitar a transformação maligna é um grande desafio para os profissionais da odontologia. Diversos estudos foram desenvolvidos para avaliar os padrões celulares das lesões cancerizáveis como por exemplo a imunoistoquímica. Entretanto, bem como na histopatologia, os espécimes submetidos a avaliação visual podem apresentar padrões divergentes devido a avaliação distinta entre os examinadores. Portanto o objetivo deste estudo foi observar a atividade espectrofotométrica das leucoplasias e hiperplasias fibrosas inflamatórias imunomarcadas com Ki-67 e p53.

2. MATERIAL E MÉTODO

As amostras foram obtidas do arquivo do serviço de Patologia da Disciplina de Patologia Bucal do curso de Odontologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul, Faculdade de Odontologia Professor Albino Coimbra, sendo 11 amostras de cada grupo estudado (11 hiperplasia fibrosas inflamatórias, 11 leucoplasias com displasia e 11 leucoplasias sem displasia). Foi realizado o levantamento de dados referentes ao número de exames histopatológicos efetuados entre 2005 e 2010 e posteriormente, selecionados os casos diagnosticados como leucoplasia com displasia, sem displasia e hiperplasia fibrosa inflamatória.

A confecção das lâminas se deu Laboratório de Imunologia da Universidade Federal de Mato Grosso do Sul (UFMS). As amostras selecionadas foram submetidas à técnica imunoistoquímica para avaliar a reação dos anticorpos Ki-67 e p53, utilizando o protocolo da *Streptavidina Biotina Peroxidase*.

A leitura das laminas foi realizada por dois examinadores sendo a observado apenas a conformação epitelial do espécime. Em cada corte selecionou-se três regiões distintas acima da camada basal.

As imagens foram capturadas em fotomicroscópio Carl Zeiss adaptado a microcâmera Samsung conectada a um computador com placa de captura de imagens e Software Image Lab versão 2000.

A espectrofotometria foi realizada com o auxílio do programa Image Pro-Plus 5.0, previamente calibrado para o tom de marrom específico, característico das marcações estudadas (Fig.1). Observou-se, somente no epitélio das lesões, a quantidade de núcleos compatíveis com o espectro por pixel (Fig. 2) selecionado nas amostras (Fig. 3).

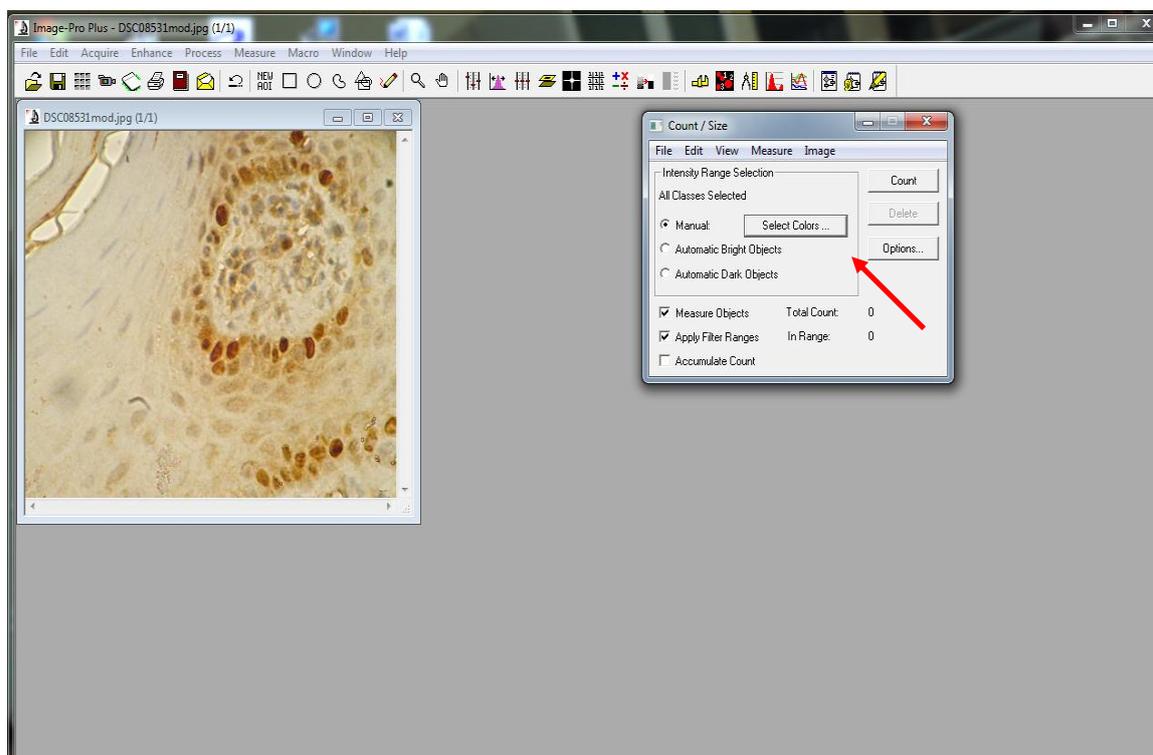


Figura 1. Calibragem do programa (seleção de cor).

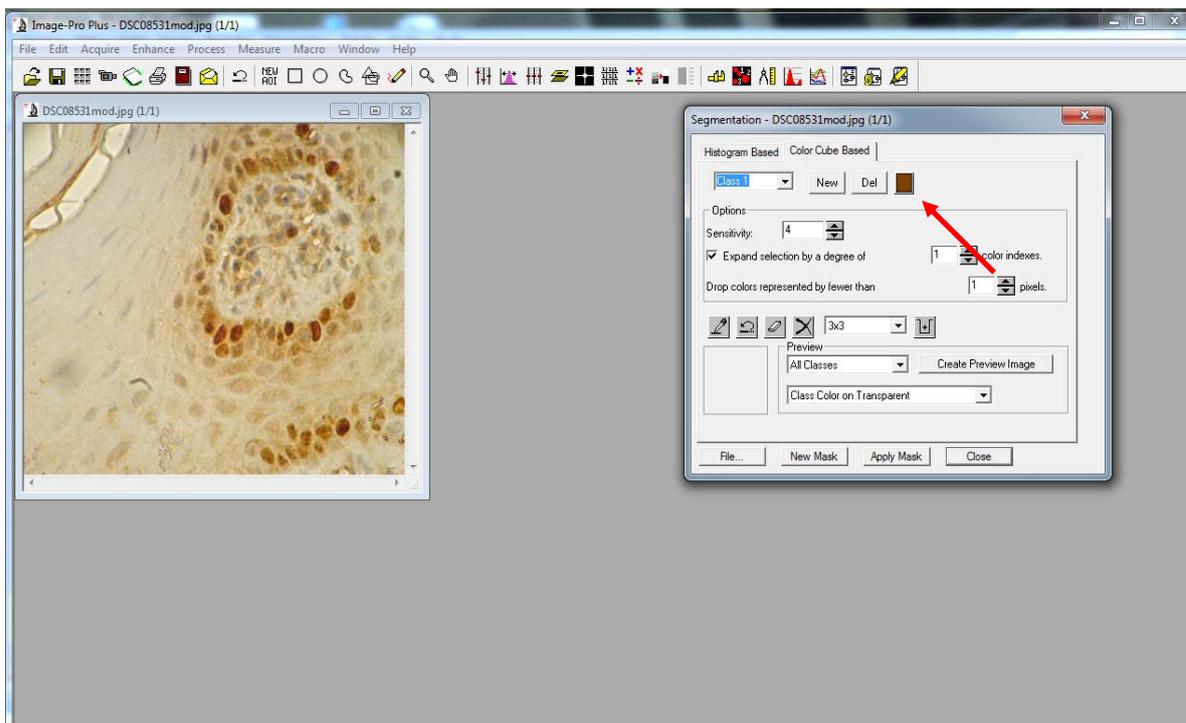


Figura 2. Seleção do espectro de marrom.

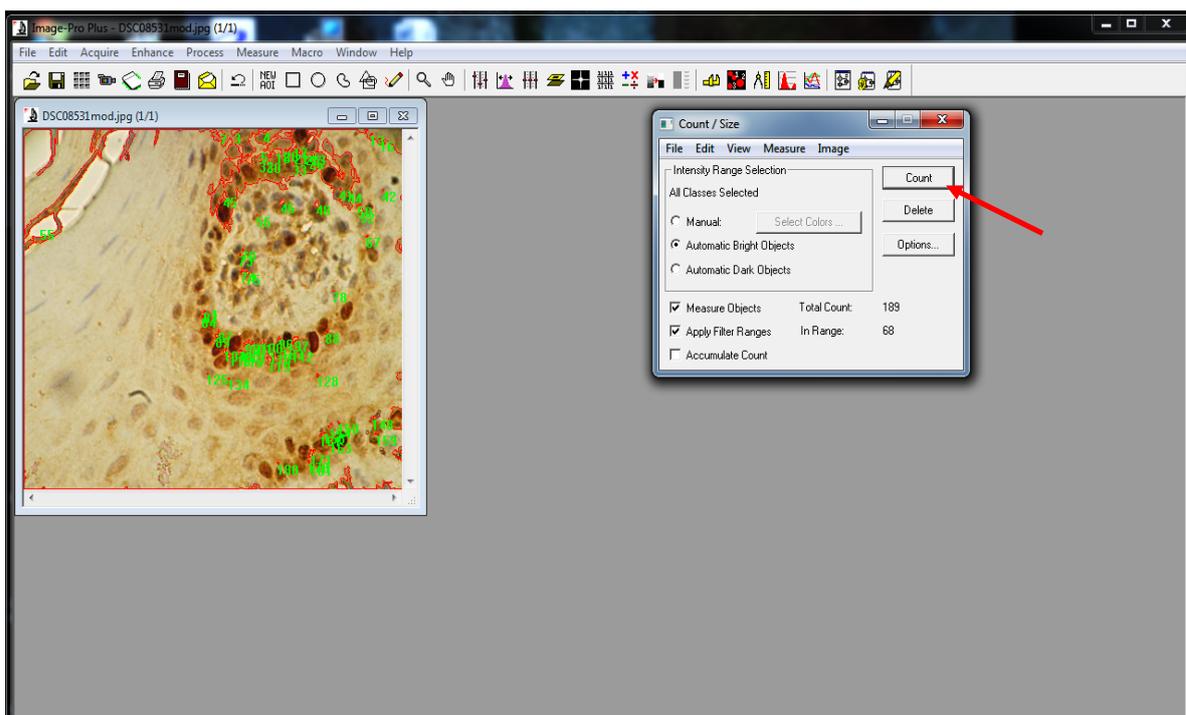


Figura 3. Espectrofotometria no Programa Image Pro Plus 5.0.

estatística

Os dados foram tabulados e analisados com obtenção das medidas de tendência central (média) e de dispersão (desvio padrão). Para a observação quanto à distribuição dos valores foi utilizado o teste de Shapiro-Wilk. Foi testada a hipótese de nulidade, com distribuição normal dos valores e a hipótese alternativa com distribuição não normal. O nível de decisão estabelecido foi de $p \leq 0,05$. Em relação às variáveis estudadas se aceita a hipótese de nulidade com distribuição normal dos valores ($p > 0,05$)

Foi utilizada a análise de variância ANOVA com pós-teste de Tukey para a comparação intragrupo das variáveis: Hiperplasia (1), Leucoplasia com displasia (2) e Leucoplasia sem displasia (3).

Para a comparação entre os grupos p53 e Ki-67 foi utilizado o teste t de Student para amostras não pareadas.

3. RESULTADOS

Os resultados encontrados para a expressão dos marcadores ki-67 e p53 nas hiperplasias fibrosas inflamatórias e leucoplasias encontram-se na Tabela 1.

Tabela 1 - Valores de expressão dos marcadores ki-67 e p53.

Grupos	ki-67	p53
hiperplasia	65,08 ± 23,94	55,19 ± 33,93
leucoplasia sem displasia	112,9 ± 59,82	173,27 ± 52,96
leucoplasia com displasia	239,25 ± 160,91	533,93 ± 422,95

Estes resultados são apresentados sob forma gráfica na Figura 1.

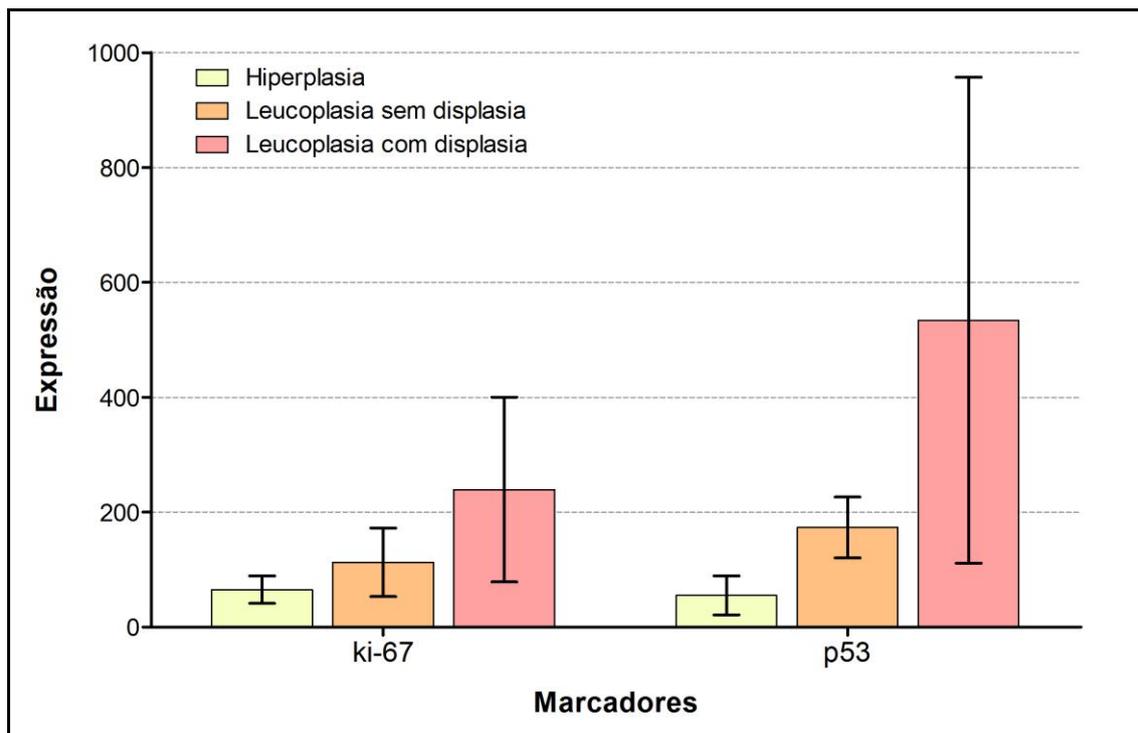


Figura 1 - Gráfico ilustrando a expressão do marcador ki-67 nas patologias estudadas.

A análise estatística (two-way ANOVA) aplicada aos resultados encontrados revelou diferenças significantes entre as patologias estudadas ($p < 0,001$), bem como entre os marcadores utilizados ($p = 0,0049$). O teste complementar de Bonferroni apontou a origem destas diferenças, não sendo detectadas entre as hiperplasias e as leucoplasias sem displasia ($p > 0,05$). Entretanto, enquanto o marcador ki-67 indicava diferenças nos níveis de expressão apenas entre hiperplasia e leucoplasia com displasia ($p < 0,05$), o marcador p53 era capaz de diferenciar os dois tipos de leucoplasia de forma distinta ($p < 0,001$), sendo mais sensível.

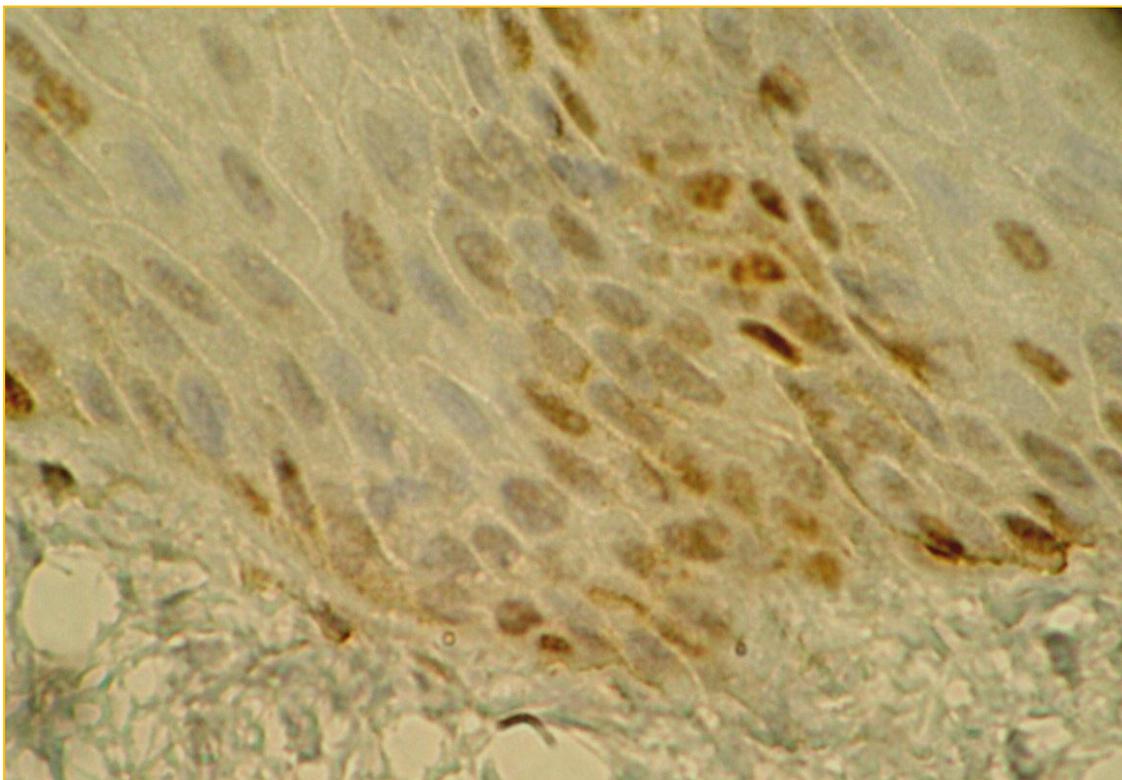


Figura 7. Leucoplasia marcada com p53 observada em microscópio de luz com aumento de 400X.

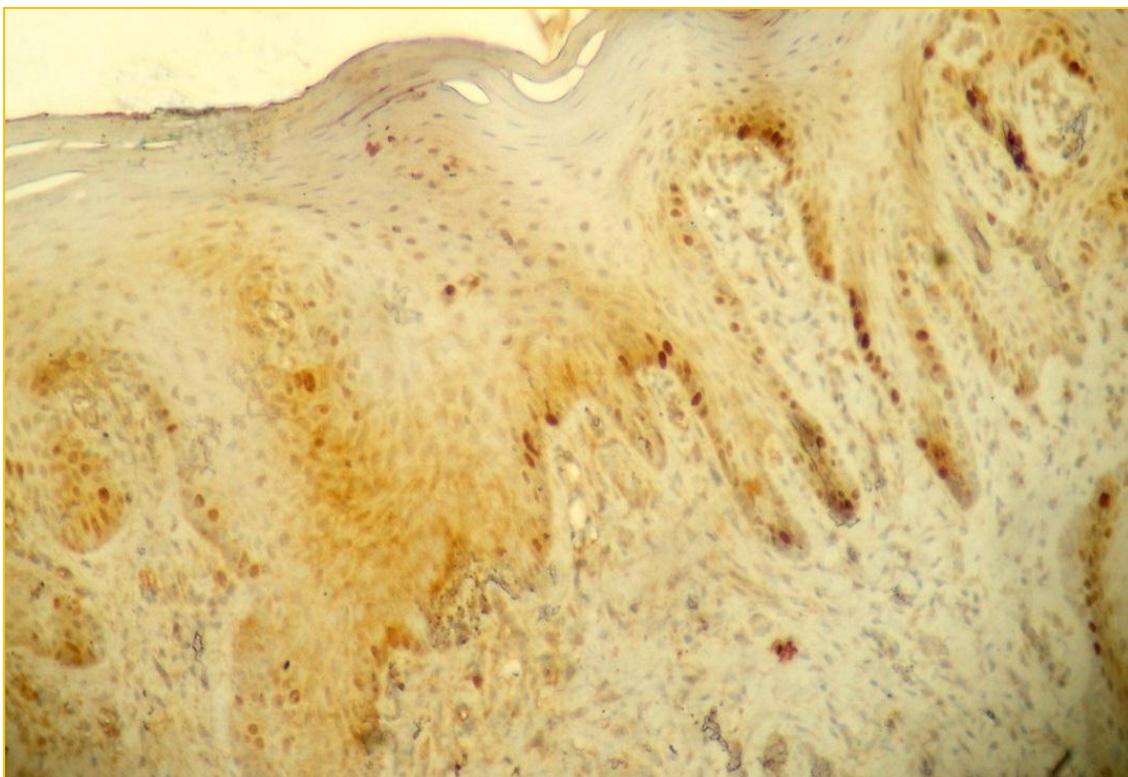


Figura 8. Leucoplasia marcada com Ki-67 observada em microscópio de luz com aumento de 400X.

4. DISCUSSÃO

Segundo Bánóczy e Csiba, 1976; Hogewind *et al.*, 1989; Jaber *et al.*, 1999; Neville *et al.*, 2004; Partridge *et al.*, 2001; Holmstrup *et al.*, 2007 a presença de displasia epitelial aumentam as chances de transformação maligna das leucoplasias, não excluindo as lesões sem displasia desta possibilidade. No presente estudo as leucoplasias (com displasia e sem displasia) apresentaram diferenças bastante significativas quando comparadas espectrofotometricamente com as hiperplasias fibrosas inflamatórias. Entretanto houve também diferença estatística na análise entre as leucoplasias com e sem displasias, embora menos significativas, concordando com os autores acima descritos os quais não excluem as leucoplasias sem displasia da possibilidade de malignização, contudo as leucoplasias com displasia tiveram mais destaque, apresentando maior saturação imunoistoquímica.

As marcações localizadas na região suprabasal foram destacadas devido à importância da identificação de positividade nesta área. A marcação nesta área não é esperada normalmente e quando localizada, cogita-se a idéia da presença de alterações genéticas nas células (Cruz *et al.*, 1998; Moles *et al.*, 2002). Outro ponto relevante da análise imunoistoquímica é a capacidade de evidenciar o comportamento biológico das células. Quando as atipias celulares atingem a camada basal, parabasal e células da camada espinhosa, provavelmente estariam sinalizando proliferações celulares descontroladas. Acreditam que as marcações localizadas na região suprabasal, não são esperadas normalmente e quando localizadas, cogita-se a idéia da presença de alterações genéticas nas células (Gomes *et al.*, 2000 ; Cruz *et al.*, 1998; Moles *et al.*, 2002).

Embora a literatura seja extremamente vasta neste assunto, inúmeros autores mostram a necessidade de fatores de prognóstico para doenças potencialmente malignas. A progressão patológica detalhada da lesão cancerizável e a relação desta com os oncogenes e genes supressores de tumor ainda precisam ser mais definidas (Bánkfalvi e Piffkó, 2000; Loro *et al.*, 2003).

Waldron e Shafer, 1975; Macluskey *et al.*, 1999, a progressão para carcinoma invasivo está diretamente relacionada com a severidade das alterações displásicas, mas a avaliação é altamente subjetiva. Corroborando com esta idéia Abbey *et al.*, 1995, pesquisaram as divergências na diferenciação dos epitélios displásicos e não-displásicos. Observaram que 80.3% dos resultados assinalados pelos patologistas não foram semelhantes quando comparados.

Buscando maior especificidade Lumerman *et al.*, 1995; Alves *et al.*, 1999; Moles *et al.*, 2002; Steinbeck *et al.*, 2002; Reis-Costa *et al.*, 2004. Segundo Mithani *et al.*, 2007, mostraram que os estudos moleculares servem como base para prever possíveis transformações malignas, afim de identificar no âmbito da lesão precursora, aquelas que verdadeiramente progredirão para a malignidade. Entretanto, apesar das marcações imunoistoquímicas serem bastante específicas e evidenciem o comportamento biológico das células, sua quantificação visual nem sempre é precisa. No presente estudo observou-se extrema agilidade na análise dos espécimes e especificidade. Não foi encontrado na literatura trabalhos comparando a atividade do Ki-67 e p53 em leucoplasias, contudo este trabalho observou maior reatividade de p53, mostrando-se mais densa quando analisada visual e espectrofotométricamente.

De acordo Francisco *et al.*; Moles *et al.*, 2002; Teresa *et al.*, 2007 a avaliação proliferativa celular realizada pelo programa Image-Pro Plus, além de outras vantagens como velocidade, consistência nos resultados e automação da análise de imagem. Pode ser usado para definição automática de limites de cortes, para a

densidade média e área pode ser considerada uma alternativa válida para o método visual de núcleos imunopositivos. Evidenciando ainda mais as vantagens da automação visual da avaliação das imagens, no presente estudo observou-se grande facilidade na leitura das laminas e imparcialidade nos resultados visto que o programa estava previamente calibrado para determinada função.

7. CONCLUSÕES

Com base na metodologia empregada e nos resultados obtidos, conclui-se que:

- As leucoplasias com displasia apresentam maior densidade espectrofotométrica nos dois marcadores estudados (p53 e Ki-67).
- As leucoplasias sem displasia e hiperplasia fibrosa inflamatórias não apresentam diferença expressiva quanto a densidade espectrofotométrica em nenhum dos marcadores estudados (p53 e Ki-67).
- O p53 mostrou-se mais sensível diante das lesões estudadas.

REFERÊNCIAS

Abbey LM, Kaugars GE, Gunsoley JC, Burns JC, Page DG, Svirsky JA, *et al.*.

Interexaminer and interexaminer reliability in the diagnosis of oral epithelial

Alves VAF, Bacchi CE, Vassallo J. Manual de imuno-histoquímica. Sociedade Brasileira de Patologia 1999; p.259.

Bánóczy J, Csiba Á. Occurrence of epithelial dysplasia in oral leucoplakia. *Oral surg* 1976; 42: 766-774.

Cruz IB, Snijders PJF, Meijer CJ, Boudewinj JB, Gordon BS, Walboomers JM *etal*. P53 expression above the basal cell layer in oral mucosa is an early event of malignant transformation and has predictive value for developing oral squamous cell carcinoma. *J Pathol* 1998; 184:360-368.

Francisco JS, Moraes HP, Dias EP. Evaluation of the Image-Pro Plus 4.5 software for automatic counting of labeled nuclei by PCNA immunohistochemistry. *Rev Oral Res* 2004; 18 (2): 100-104.

García AS, Hernández MMA, Sánchez EF, Hernández JJ, Sopelana. E. Expresión protéica de p53 y proliferación celular em leucoplasias orales. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2005; 10:1-8.

Gomes APN, Araújo VC, Pintor Junior DS. Avaliação imuno-histoquímica de p53 e PCNA como marcadores de risco para lesões bucais potencialmente malignas. *RPG* 2000; 7: 349-355.

Hogewind WFC, Kwast WAMVD, Waal IVD. Oral leucoplakia, with emphasis on Malignant Transformation. *J Cranio Max Fac Surg* 1989; 17: 128-133.

Holmstrup P, Vedtofte P, Reibel J, Stoltze K. Oral premalignant lesions: is a biopsy reliable? *J Oral Pathol Med*. 2007; 36: 262-266.

Ide R, Mizoue T, Fujino Y, Hoshiyama Y, Sakata K, Tamakoshi A, *et al.*
Cigarette smoking, alcohol drinking, and oral and pharyngeal cancer mortality in
Japan. *Oral Diseases* 2008; 14: 314-319.

INCA – Instituto Nacional do Câncer. Estatística inicial e mortalidade por câncer
no Brasil. Disponível em URL: <http://www.inca.gov.br/estimativas/2005/midex>

Jaber MA. Risk factors for oral epithelial dysplasia: the role of smoking and
alcohol. *Oral Oncol*, Oxford, 1999; 35(2): 151-156.

Loro LL, Vintermyr OK, Johannsen AC. Cell death regulation in oral squamous
cell carcinoma: methodological considerations and significance. *J Oral Pathol
Med* 2003; 32: 125-138.

Lumerman H, Freedman P, Kerpel S. Oral and maxillofacial pathology, oral
epithelial dysplasia and the development of invasive squamous cell carcinoma.
Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology 1995; 79: 321-329.

Macklueskey M, Ogden GR, Green M, Chisholm DM, Schor SL, Schor AM The
association between epithelial proliferation and disease progression in the oral
mucosa. *Oral Oncol*. 1999; 35: 409-414.

Mithani SK, Mydlarz WK, Grumbine FL, Smith IM, Califano JA. Molecular
genetics of premalignant oral lesions. *Oral diseases* 2007; 13:126-133.

Moles GMA, Avila IR, Archilla AR, Lara IM. Suprabasal expression of Ki-67 antigen as a marker for presence and severity of oral epithelial dysplasia. *Head & Neck* 2002; 22: 658-661.

Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. *Patologia oral e maxilofacial*. 2ª Ed. Rio de Janeiro: Guanabara koogan; 2004. Cap10; p.252-304.

Parise Júnior O. *Câncer de boca: aspectos básicos e terapêuticos*. Editora Sarvier. 2ª ed. São Paulo 2000. p.200- 205.

Partridge M, Pateromichelakis S, Phillips E, *et al*. Profiling clonality and progression in multiple premalignant and malignant lesions identifies a subgroup of cases with a distinct presentation of squamous cell carcinoma. *Clin Cancer res* 2001; 7: 1860-6.

Reis-Costa A, Freitas RA. Expressão da proteína p53 em epitélio oral normal, hiperplásico e displásico. *Rev ABO Nac* 2004; 12(3): 183-186.

Steinbeck RG. Atypical mitoses in lesions of the oral mucosas a new interpretation of their impact upon tumorigenesis. *Bristh J Cancer* 2002; 86 (11): 1745-1750.

Teresa DB, Neves KA, Neto CB, Fregonezi PAG, Oliveira RB, Zuanon JAS, *et al*. Computer assisted analysis of cell proliferation markers in oral lesions. *Acta Histochemica* 2007; 109: 377-387.

Waldron C, Shafer WG. Leukoplakia revisited. A clinicopathologic study 3256 oral leukoplakias. *Cancer*, 1975; 36(4): 165-169.