

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS - UFMG

FACULDADE DE MEDICINA

THIAGO FONSECA SILVA

**Estudo da perda de heterozigosidade em regiões de genes supressores
de tumor e sua associação com alterações morfológicas e grau de
displasia epitelial em leucoplasias bucais**

Tese apresentada ao Programa de Pós-graduação em Medicina Molecular da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais – UFMG, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Medicina Molecular.

Orientador: Prof^ª. Dr. Carolina Cavalieri Gomes

Coorientador: Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez

BELO HORIZONTE

2013

*Dedico este trabalho aos meus pais Antônio Lúcio da Silva e Santa Helena
Fonseca Silva e a meus irmãos Ângelo Fonseca Silva e Nayara Fonseca Silva.*

AGRADECIMENTOS

Primeiramente a **Deus**, pela sabedoria e discernimento depositados em mim. Agradeço por ter iluminado meus passos na busca do saber.

A **Professora Carolina Cavalieri Gomes** pela orientação, dedicação e respeito. Agradeço por ter me dado a oportunidade de crescer pessoalmente e profissionalmente.

Ao **Professor Ricardo Santiago Gomez** por ter me dado a oportunidade de avançar nos meus estudos.

A **Carolina Carvalho de Oliveira Santos**, minha namorada, pelo amor, dedicação e paciência dispensados a mim.

A **Rosangela Ramos Veloso Silva**, pelo apoio e incentivo.

Ao **Professor Adriano Mota Loyola**, pelos ensinamentos, companheirismo e incentivo.

A **Cláudia Maria Pereira**, pela amizade e companheirismo.

Ao **Geraldo Resende Vaz**, pela confiança depositada em mim, mesmo sem me conhecer, quando do aluguel da minha moradia durante este período de estudo.

A **Sibele Cristina Portella**, por ter me dado à oportunidade de trabalharmos juntos.

Ao **Danillo Costa Rodrigues**, pelo grande auxílio quando do início do doutorado.

Aos Colegas do laboratório de Patologia Molecular – **Lucyana Conceição Farias, Ana Carolina Mesquita Netto Rosales, Marina Gonçalves Diniz, Vanessa Fátima Bernardes, João Artur Ricieri Brito, Thais Santos, Kelma Campos, Jeane de Fátima Correia, Fabrício Amaral, Fabrício Tinoco de Souza, Geffer Thiago Batista Correa, Sílvia Ferreira de Sousa, Renata Gonçalves Resende, Elizete Maria Rita**

Pereira, Telma Arão, Clarice Galvão, Paula Serelle, Marcela Rodrigues, Natalia Cardoso, Alessandra Duarte, Lissur Azevedo Orsine, Leonardo Nogueira, Elisa Carvalho de Siqueira, Flavia Amaral, Flavia Fonseca e Daniele Ramalho – obrigado pela força e pelos momentos de troca do saber

A **CAPES**, coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior, pela concessão da bolsa de estudos.

A todas as pessoas que contribuíram direta ou indiretamente para a que eu pudesse me fazer melhor, me formar melhor e possibilitar a conclusão de mais um ciclo que chega ao fim.

“...Temos o destino que merecemos. O nosso destino está de acordo com os nossos méritos...”

“...A mente que se abre a uma nova ideia jamais voltará ao seu tamanho original...”

Albert Einstein

RESUMO

A leucoplasia bucal é considerada a principal lesão cancerizável da boca. Instabilidades genéticas em regiões próximas aos genes supressores de tumor é uma fonte potencial de alterações moleculares que podem estar associadas ao comportamento biológico dessas lesões. O objetivo deste estudo foi investigar a perda de heterozigidade em regiões próximas aos genes supressores de tumor em amostras de leucoplasia bucal e sua associação tanto com as alterações citológicas e arquiteturais do epitélio, como com a graduação histopatológica das displasias, transformação maligna e com os dados clínicos dos pacientes. A perda de heterozigidade nas regiões cromossômicas 3p, 9p, 11p, 11q e 17p foi avaliada por meio da análise dos marcadores de microssatélites D3S1234, D3S1300, D3S1029, D3S1293, D9S157, D9S162, D9S171, D11S1369, D11S1883, AFM238WF2 e P53. Foram selecionados 17 pacientes portadores de leucoplasia que apresentavam pelo menos duas biópsias realizadas no mesmo sítio anatômico. As amostras foram graduadas histopatologicamente de acordo com os critérios definidos pela Organização Mundial da Saúde (2005). 20 amostras apresentaram displasia epitelial leve; 10 displasia epitelial moderada; 2 displasia epitelial acentuada e 2 foram diagnosticadas como carcinomas de células escamosas. A perda de heterozigidade foi identificada em 30 amostras, em pelo menos um marcador, com exceção do D3S1029. Os marcadores relacionados às regiões cromossômicas 3p, 9p, 11q e 17p (D3S1293, D9S157, D9S162, D9S171, D11S1369 e P53) apresentaram frequência de perda alélica superiores a 40%. Adicionalmente, a perda de heterozigidade nos marcadores localizados nas regiões cromossômicas 9p e 17p foi associada a alterações citológicas e arquiteturais do epitélio das displasias ($p < 0,05$). Além disso, o aumento da frequência de LOH das amostras foi associada à

displasia epitelial acentuada e aos carcinomas ($p < 0,05$). Interessantemente, os dois casos de carcinoma apresentaram LOH nas regiões cromossômicas 3p (D3S1293), 9p (D9S162 e D9S171), 11q (D11S1369) e 17p (P53) simultaneamente, diferente do perfil encontrado na maioria das leucoplasias. Os resultados deste trabalho suportam que a perda de heterozigidade em regiões de genes supressores de tumor representa um evento observado nas leucoplasias bucais e que tal alteração genética está associada às alterações citológicas e arquiteturais do epitélio das displasias.

Palavras Chaves: perda de heterozigidade; leucoplasias bucais; genes supressores de tumor; displasia epitelial.

ABSTRACT

Oral leukoplakia is the main potentially malignant lesions of the mouth. The genetic instability in tumor suppressor genes may be related to the biological behavior and malignant transformation of oral leukoplakia. The aim of this study was investigate the loss of heterozygosity in regions related to tumor suppressor genes in oral leukoplakia and its association with cytological and architectural abnormalities of epithelium, as well as with histopathological grade of dysplasia and clinical-pathological data. Loss of heterozygosity in 3p, 9p, 11p, 11q and 17p was assessed by analysis of microsatellite markers (D3S1234, D3S1300, D3S1029, D3S1293, D9S157, D9S162, D9S171, D11S1369, D11S1883, AFM238WF2 and P53). From the archives were selected 17 cases of leukoplakia that had at least two biopsies at the same anatomical site. Histopathologically, the samples were graded according to the World Health Organization criteria. 20 samples showed mild epithelial dysplasia; 10 moderate epithelial dysplasia; 2 severe epithelial dysplasia; and 2, oral squamous cell carcinomas. Loss of heterozygosity was observed in 30 samples in at least one marker, except from D3S1029. The markers related to chromosome region 3p, 9p, 11q and 17p (D3S1293, D9S157, D9S162, D9S171, D11S1369 and P53) showed higher frequency of allelic loss exceeding 40%. Additionally, loss of heterozygosity at markers D9S171, D9S162 and P53 was associated with cytological and architectural abnormalities of epithelium ($p < 0.05$). Furthermore, high frequency of allelic loss was associated with severe epithelial dysplasia and carcinomas ($p < 0.05$). The samples of carcinomas showed LOH at regions 3p, 9p, 11q and 17p, simultaneously, unlike the profile found in majority of leukoplakia. The results of this study support that loss of heterozygosity in regions of tumor suppressor genes represent a frequent event in oral leukoplakia and may be

associated with the cytological and architectural abnormalities of epithelial dysplasia. However, LOH of chromosome regions 3p, 9p, 11q, 11p and 17p may be not sufficient to predict the increase of degree of epithelial dysplasia and malignant transformation of oral leukoplakia.

Key Words: loss of heterozygosity; oral leukoplakia; tumor suppressor genes; epithelial dysplasia.

LISTA DE FIGURAS

Figura 1: Aspecto clínico das leucoplasias bucais	22
Figura 2: Fotomicrografia de espécimes de leucoplasias bucais.	25
Figura 3: Representação esquemática das fases do ciclo celular.	32
Figura 4: Representação da atividade do ciclo celular	33
Figura 5: Representação da microdissecção do tecido.....	43
Figura 6: Regiões cromossômicas 3p, 9p, 11p, 11q e 17p com os respectivos marcadores de microssatélites.....	44
Figura 7: Eletroferograma da análise de LOH..	47
Figura 8: Eletroferograma evidenciando a possível homozigose.....	49
Figura 9: Eletroferograma demonstrando o cálculo para a correção de stutter.....	49
Figura 10: Fotomicrografia da detecção das proteínas p53 e ki67.....	51
Figura 11: Representação gráfica da distribuição da porcentagem da FAL em relação com a graduação histopatológica das leucoplasia	61

LISTA DE TABELAS

Tabela 1: Graduação morfológica das displasias epiteliais - OMS (2005).	24
Tabela 2: Marcadores de microssatélite das regiões 3p, 9p, 11p, 11q e 17p.....	44
Tabela 3: Condições térmicas do PCR.	45
Tabela 4: Anticorpos primários utilizados para as reações de imunohistoquímica.....	50
Tabela 5: Dados clínico-patológicas dos casos incluídos no estudo.	55
Tabela 6: Alterações citológicas e arquiteturais observadas nas amostras de leucoplasia bucal.	56
Tabela 7: Dados moleculares dos pacientes do presente analisados	59

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

µg	Micrograma
µl	Microlitro
µM	Micromolar
11p	Braço curto do cromossomo 11
11q	Braço longo do cromossomo 11
17p	Braço curto do cromossomo 17
3p	Braço curto do cromossomo 3
9p	Braço curto do cromossomo 9
AC	Altura do alelo curto
AL	Altura do alelo longo
CA	Citosina e adenina
CCEB	Carcinoma de células escamosas de boca
CDK	<i>Cyclin-dependent kinase</i> (quinase dependente de ciclina)
CDKN2A	<i>Cyclin-dependent kinase inhibitor 2A gene</i>
CHRNBI	<i>Cholinergic receptor nicotinic beta 1</i> (receptor colinérgico nicotínico beta 1)
Di	Dinucleotídeo
DNA	Ácido desoxirribonucleico
DNTPs	Deoxinucleotídeos fosfato
FHIT	<i>Fragile histidine triad</i> (Tríade de histidina frágil)
GATA	Guanina, adenosina, timina, adenosina
G1	Gap 1
G2	Gap 2
HPV	<i>Human papillomavirus</i> (papiloma virus humano)

LB	Leucoplasia bucal
LOH	<i>Loss of heterozygosity</i> (perda de heterozigosidade)
M	Mitose
MDM2	<i>Mouse double minute 2 homolog</i>
Min	Minuto
MLH1	<i>MutL homolog 1</i>
Mm	Milimolar
ng	Nanograma
NUP98	<i>Nucleoporin 98-KD</i>
OMS	Organização Mundial de Saúde
pb	Pares de bases
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
pRb	<i>Protein retinoblastoma</i> (proteína retinoblastoma)
RARβ	<i>β-retinoic acid receptor gene</i> (gene receptor de ácido retinóico- β)
S	Síntese
Seg	Segundos
SH3GL2	<i>SH3-domain GRB2-like 2 gene</i>
SLC24A2	<i>Solute carrier family 24, member 2 gene</i>
Taq DNA	Thermus aquaticus DNA polimerase
Tetra	Tetranucleotídeo
UFMG	Universidade Federal de Minas Gerais
Unid	Unidade
VHL	<i>Von Hippel Lindau gene</i>

SUMÁRIO

<i>INTRODUÇÃO</i>	16
1. INTRODUÇÃO	17
<i>REVISÃO DE LITERATURA</i>	20
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	21
2.1 LEUCOPLASIA BUCAL.....	21
2.1.1 CONCEITO E DIAGNÓSTICO	21
2.1.2 GRADUAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DAS LEUCOPLASIAS BUCAIS	23
2.1.3 TRANSFORMAÇÃO MALIGNA DAS LEUCOPLASIAS BUCAIS.....	27
2.2 GENES SUPRESSORES DE TUMOR.....	30
2.3 PERDA DE HETEROZIGOSIDADE (<i>LOSS OF HETEROZYGOSITY</i> – LOH)	35
<i>OBJETIVOS</i>	38
3. OBJETIVOS	39
3.1 OBJETIVO GERAL	39
3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS	39
<i>MATERIAIS E MÉTODOS</i>	40
4. MATERIAIS E MÉTODOS	41
4.1. ASPECTOS ÉTICOS	41
4.2. PACIENTES E AMOSTRAS.....	41
4.3. MICRODISSECÇÃO DOS TECIDOS	42
4.4. EXTRAÇÃO DO DNA	43
4.5. ANÁLISE DE LOH.....	46
4.6. IMUNOHISTOQUÍMICA.....	50
4.7. ANÁLISE DOS DADOS.....	52
<i>RESULTADOS</i>	53
5. RESULTADOS	54
5.1 PACIENTES E AMOSTRAS.....	54

5.2 DADOS MOLECULARES DE LOH.....	57
5.3 DADOS MOLECULARES, CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS.....	61
5.4 IMUNOHISTOQUÍMICA.....	62
<i>DISCUSSÃO</i>	64
6. <i>DISCUSSÃO</i>	65
<i>CONCLUSÕES</i>	69
7. <i>CONCLUSÕES</i>	70
<i>REFERÊNCIAS</i>	71
8. <i>REFERÊNCIAS</i>	72
<i>ANEXOS</i>	80
9.1 <i>ANEXOS I</i>	81
9.2 <i>ANEXO II</i>	82
9.2 <i>ANEXO III</i>	83

INTRODUÇÃO

1. INTRODUÇÃO

A leucoplasia bucal (LB), segundo a Organização Mundial de Saúde (OMS), é uma lesão que se apresenta clinicamente como uma mancha ou placa branca, hiperkeratizada, não destacável e que não pode ser diagnosticada como nenhuma outra lesão específica, clínica ou histologicamente (Barnes, Eveson et al. 2005).

Ainda segundo a OMS, a LB seria a principal lesão cancerizável da cavidade bucal (Barnes, Eveson et al. 2005). Tal fato foi inicialmente sugerido com base em sua relação direta com o carcinoma de células escamosas de boca, em função de características clínicas comuns (localização e aparência) e a alta frequência de alterações epiteliais que apresentam graus variados de atipia celular (Kollar, Finley et al. 1954; Lind 1987; Silverman, Gorsky et al. 1996; Schepman, van der Meij et al. 1998; Hsue, Wang et al. 2007; Warnakulasuriya, Reibel et al. 2008).

Nesse contexto, um dos questionamentos em relação às LB é a identificação de quais lesões teriam um risco potencial de se transformar em câncer, visto que os achados clínicos e histopatológicos não predizem com absoluta confiabilidade a evolução das lesões.

Estudos genéticos e moleculares têm sido utilizados na tentativa de determinar a evolução das leucoplasias bucais e ainda identificar quais lesões apresentariam uma maior probabilidade de transformação maligna (Rosin, Cheng et al. 2000; Zhang & Rosin 2001; Smith, Rattay et al. 2009). Pesquisas realizadas nessa área refletem a grande importância de se estabelecer de forma precoce o diagnóstico de lesões neoplásicas e, conseqüentemente, promover melhorias para o tratamento e o prognóstico dos pacientes.

Os genes supressores de tumor, juntamente com seu produto protéico, agem na regulação do ciclo celular, especificamente nos pontos de checagem (*check points*),

prevenindo duplicações celulares aberrantes e, conseqüentemente, atuando como fatores anti-câncer (Kumar, Abbas et al. 2007; Lai, Visser-Grieve et al. 2012). Alterações no padrão de expressão desses genes podem acarretar na ineficiência ou ausência da checagem do ciclo celular e, dessa maneira, permitir erros de replicação alélica, determinando ou potencializando os eventos da tumorigenese (Berger, Knudson et al. 2011).

Diversos autores discutem o papel das alterações em genes supressores de tumor nas leucoplasias bucais (Rosin, Cheng et al. 2000; Zhang & Rosin 2001; Rosin, Lam et al. 2002; Reibel 2003; Souza, Fonseca-Silva et al. 2011; Fonseca-Silva, Farias et al. 2012). Nesse sentido, a literatura sugere que a desregulação dos genes supressores de tumor pode estar relacionada com o comportamento biológico dessas lesões e parece exercer um papel importante para a gênese e evolução das mesmas (Tanaka & Ishigamori 2011). Contudo, é importante ressaltar que há uma carência de estudos que tenham tentado associar as alterações em genes supressores de tumor às alterações citológicas e arquiteturais das displasias. Os aspectos morfológicos das leucoplasias podem ser importantes preditores de modificações moleculares relacionados ao comportamento biológico destas lesões e também aos fenômenos de transformação maligna.

Alterações em regiões cromossômicas próximas a genes supressores de tumor, como 3p, 4, 8p, 9p, 11, 13, 17p, já foram descritas em diversos tipos de neoplasias malignas (Mao, Lee et al. 1996; Arai, Shibahara et al. 2002). Nesse contexto, as perdas alélicas nessas regiões são alvos atrativos para o estudo da predição do comportamento biológico das LB, bem como do seu processo de transformação maligna.

Sendo a LOH de regiões relacionadas a genes supressores de tumor eventos relacionados ao câncer, em especial o carcinoma de células escamosas de boca, o estudo

da LOH em leucoplasias bucais se traduz em uma importante ferramenta para investigação dos fenômenos envolvidos no comportamento biológico dessas lesões, bem como nos processos relacionados à transformação maligna. Nesse contexto, uma vasta revisão de literatura foi realizada no intuito de selecionar marcadores de microssatélites em regiões de genes supressores de tumor, já descritos em diferentes tipos de neoplasias malignas, para serem estudados em amostras de leucoplasia bucal. Foram selecionados onze marcadores de microssatélite (D3S1234, D3S1300, D3S1029, D3S1293, D9S157, D9S162, D9S171, D11S1369, D11S1883, AFM238WF2 e P53) localizados nos cromossomos 3p, 9p, 11q, 11p e 17p.

REVISÃO DE LITERATURA

2. REVISÃO DA LITERATURA

2.1 LEUCOPLASIA BUCAL

2.1.1 CONCEITO E DIAGNÓSTICO

As primeiras descrições para o termo LB revelaram uma lesão cuja definição clínica seria de uma área esbranquiçada sobre as mucosas da cavidade bucal e que não poderia ser removida por raspagem (Kollar, Finley et al. 1954; Rentstrup 1954). Atualmente, o termo LB se remete a uma lesão que se apresenta clinicamente como uma placa ou mancha esbranquiçada, não destacável à raspagem, e que não pode ser diagnosticada clínica e histopatologicamente como nenhuma outra lesão específica, além de apresentar risco aumentado para a transformação em câncer (Axell, Pindborg et al. 1996; Silverman, Gorsky et al. 1996; Pindborg, Reichart et al. 1997; Warnakulasuriya, Johnson et al. 2007).

A LB podem ser classificada clinicamente em dois tipos: homogêneas ou heterogêneas (van der Waal, Schepman et al. 2000). As leucoplasias homogêneas apresentam-se como placas finas esbranquiçadas ou branco acinzentadas, algumas vezes translúcidas, fissuradas ou rugosas, de limites precisos e superfície regular (Figura 1A). Essas lesões podem tornar-se duras e as fissuras podem aprofundar-se. No entanto, elas não possuem elevações localizadas no plano da superfície (Bouquot & Whitaker 1994; van der Waal, Schepman et al. 2000). Alguns autores associam essa apresentação clínica a alterações displásicas discretas do epitélio da lesão, sugerindo uma menor possibilidade de transformação maligna.

Por sua vez, as leucoplasias heterogêneas apresentam aspectos nodulares localizados ou projeções verrucosas de crescimento exofítico, revelando múltiplas placas/manchas com componentes avermelhados e ulcerados, constituindo a lesão

(Figura 1B). Tais áreas avermelhadas seriam representativas de regiões onde as células epiteliais seriam imaturas, incapazes de produzir ceratina (Bouquot 1994; Reichart & Philipsen 2005). Vários estudos apontam que a apresentação clínica heterogênea pode estar associada ao comportamento biológico mais agressivo da lesão, possuindo atipias acentuadas e, conseqüentemente, elevadas taxas de malignização, principalmente na apresentação verrucosa (Bouquot 1994; Reichart & Philipsen 2005; Speight 2007).

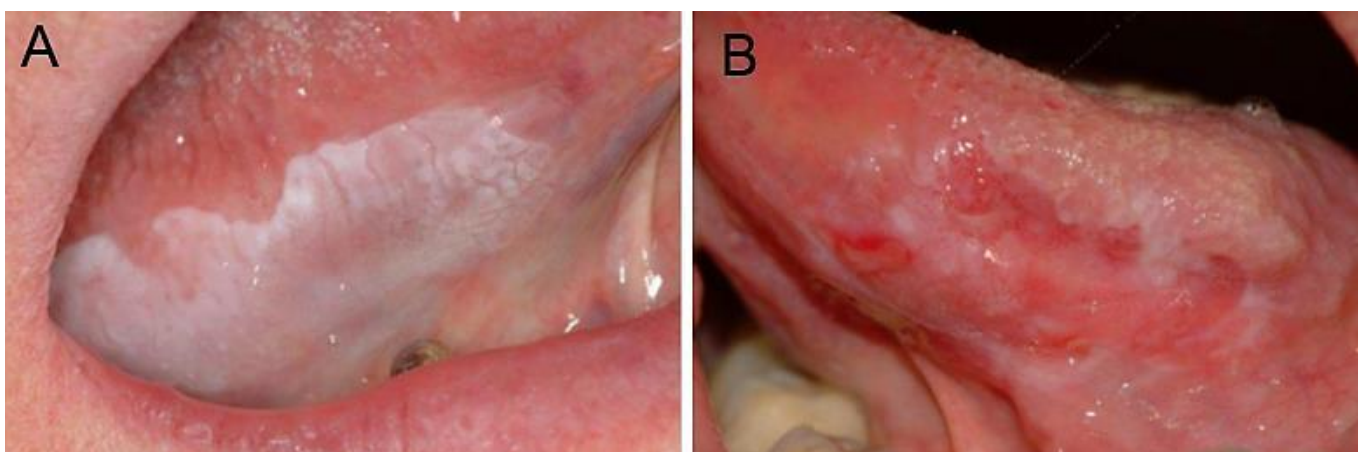


Figura 1: Aspecto clínico das leucoplasias bucais; **A)** Leucoplasia bucal homogênea em borda lateral de língua; **B)** Leucoplasia bucal heterogênea em borda lateral de língua.

Fonte: (Lodi, Sardella et al. 2006)

Acredita-se que a LB origina-se a partir de reações inespecíficas do epitélio em resposta aos vários estímulos endógenos e exógenos, podendo estar associada a uma ampla gama de agentes físicos, químicos e biológicos, tais como: consumo de álcool e tabaco (em suas mais diversas formas), infecções viróticas (como o HPV - papilomavírus humano), deficiências nutricionais (vitaminas A, C e complexo B, ácido fólico e β -caroteno, licopeno), quadros de imunossupressão, além de fatores genéticos individuais (King, Healy et al. 1994; Kaugars, Silverman et al. 1996; Sankaranarayanan,

Mathew et al. 1997; Lee, Hung et al. 2006; Martorell-Calatayud, Botella-Estrada et al. 2009; Lu, Dan et al. 2011; Fonseca-Silva, Farias et al. 2012).

Apesar de haver um consenso na literatura de que o tabaco seria o principal fator associado ao desenvolvimento destas lesões (Axell, Pindborg et al. 1996; Silverman, Gorsky et al. 1996; Rhodus 2005; Speight 2007), o mecanismo exato pelo qual os fatores etiológicos atuam na gênese das leucoplasias ainda não foi bem estabelecido (Napier & Speight 2008; van der Waal 2009; van der Waal & Scully 2011).

2.1.2 GRADUAÇÃO HISTOPATOLÓGICA DAS LEUCOPLASIAS BUCAIS

Os achados histopatológicos das LB podem consistir-se de diferentes tipos de hiperkeratoses. Quadros de atipias epiteliais podem ou não ser encontrados e, caso presentes, a gravidade das alterações pode se apresentar de formas variadas (Pindborg 1971; Tilakaratne, Sherriff et al. 2011).

Vários autores propuseram um sistema de classificação histológica das leucoplasias baseado na presença de alterações citológicas e arquiteturais do epitélio, tais como: estratificações epiteliais irregulares, hiperplasia da camada basal, proliferação epitelial em gotas, disqueratose, perda da aderência celular, aumento do índice e alterações morfológicas das mitoses, aumento da razão núcleo-citoplasma, perda ou inversão da polaridade da camada basal, pleomorfismo celular e nuclear, além de nucléolos grandes e proeminentes. A partir desses achados, as lesões poderiam ser classificadas como hiperkeratoses sem atipias ou hiperkeratoses com atipias celulares podendo ser classificadas em displasias leves, moderadas ou acentuadas, além da classificação em carcinoma in situ. A displasia leve refere-se às alterações celulares limitadas às camadas basais e parabasais do epitélio; displasia moderada, às alterações que envolvem as camadas basal e porção média da camada espinhosa, a displasia

acentuada representa os casos onde as alterações estendem-se além da porção mediana do epitélio, e o carcinoma in situ configura casos em que há presença de atipias celulares em toda a extensão do epitélio (Banoczy & Sugar 1972; Banoczy & Sugar 1975; Waldron & Shafer 1975; Lumerman, Freedman et al. 1995).

Em 2005, a OMS propôs modificações no modelo de graduação das displasias (Tabela 1). Essa proposta também leva em consideração as alterações citológicas e arquiteturais do epitélio da lesão e estabelece critérios para classificação das displasias baseados na divisão em terços da camada epitelial. Esse modelo é utilizado até os dias atuais e visa graduar histologicamente as leucoplasias em atipia epitelial leve, moderada, acentuada e carcinoma in situ (Figura 2) (Barnes, Eveson et al. 2005).

Tabela 1: Graduação morfológica das displasias epiteliais - OMS (2005).

Critérios Morfológicos	
Parâmetros Arquiteturais	Parâmetros Citológicos
Estratificação epitelial irregular	Varição anormal do tamanho nuclear
Perda da polaridade das células basais	Varição anormal da forma nuclear
Processos reticulares em forma de gota	Varição anormal do tamanho das células
Aumento do número de figuras mitóticas	Varição anormal da forma das células
Mitoses anormalmente superficiais	Aumento da proporção núcleo-citoplasma
Ceratinização prematura de células simples	Aumento do tamanho nuclear
Pérolas de ceratina	Figuras mitóticas atípicas
	Aumento do número e tamanho dos nucléolos
Classificação Morfológica	
Graduação Histológica	Critérios
Ausência de atipia	Ausência de alterações estruturais e atipia citológica
Displasia epitelial leve	Presença de alterações estruturais e atipia citológica confinada ao terço inferior do epitélio.
Displasia epitelial moderada	Presença de alterações estruturais e atipia citológica estendendo até o terço médio do epitélio
Displasia epitelial Acentuada	Presença de alterações estruturais e atipia citológica estendendo além do terço médio do epitélio.
Carcinoma in situ	Presença de alterações estruturais e atipia citológica em todo o epitélio.

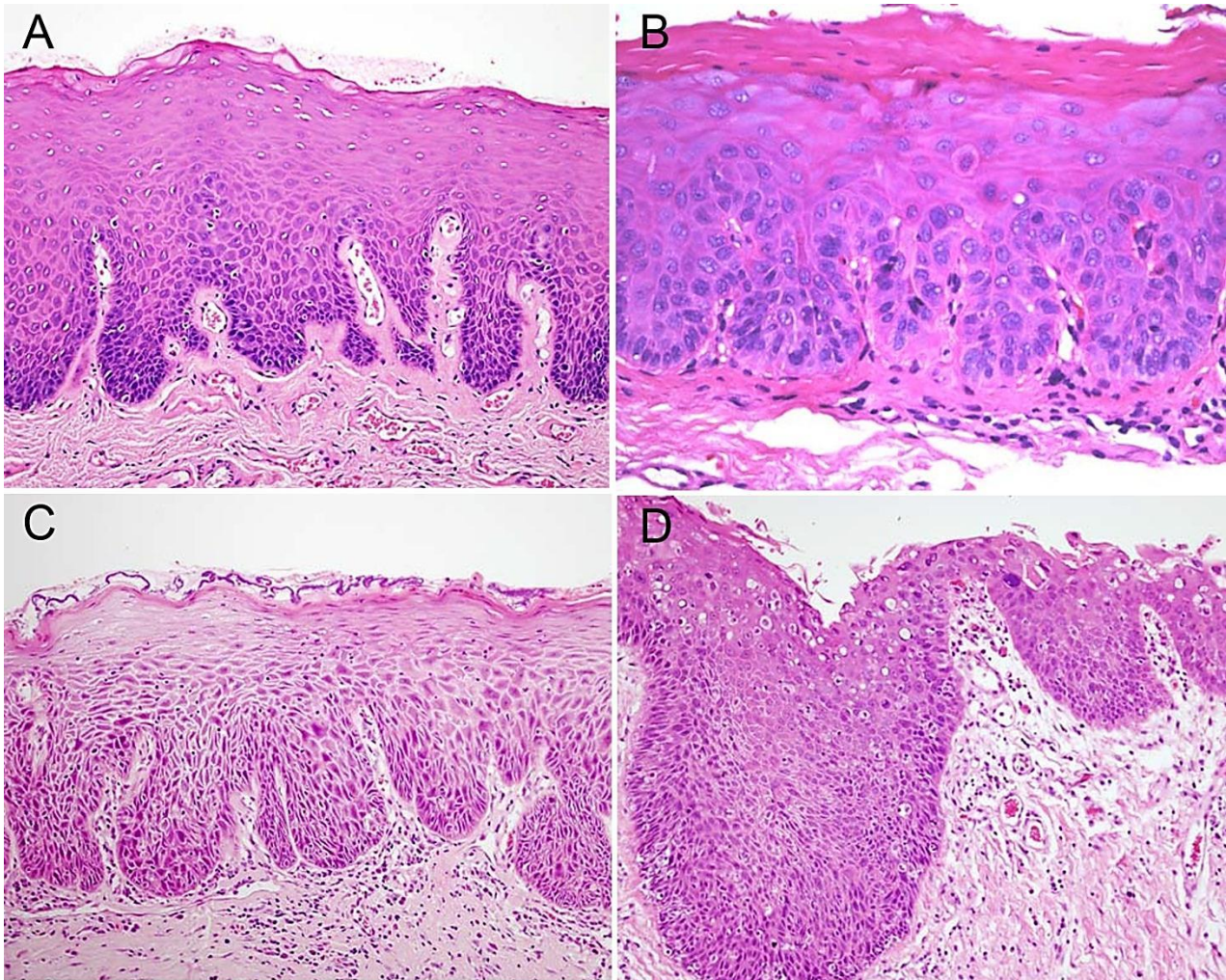


Figura 2: Fotomicrografia de espécimes de LB; **A)** Displasia epitelial leve. As células da camada basal apresentam atipia citológica incluindo pleomorfismo e hiperchromatismo confinadas à camada basal e para-basal. **B)** Displasia epitelial moderada. As células apresentam considerável atipia citológica com alterações que se estendem até ao terço médio do epitélio; **C)** Displasia epitelial acentuada. Atipias citológicas são observadas em todo o epitélio bem como alterações arquiteturais como perda da estratificação epitelial; **D)** Carcinoma *in situ*. A arquitetura do epitélio é quase totalmente alterada, as células atípicas e hipercomáticas são observadas entre as células superficiais e não há presença de invasão do tecido epitelial no tecido conjuntivo.

Fonte: (Speight 2007)

Há um consenso na literatura de que é grande a discordância intra e inter-examinador na graduação displásica das LB. Trabalhos mostraram que a classificação das atipias epiteliais em leve, moderada e acentuada pode ser bastante difícil de ser conseguida, resultando, invariavelmente, em dificuldades na avaliação do prognóstico do paciente. Isso pode, além de dificultar conclusões precisas sobre os eventos progressivos e regressivos das LB, também dificultar o valor preditivo das alterações celulares para os eventos de malignização (Abbey, Kaugars et al. 1995; Karabulut, Reibel et al. 1995). Adicionalmente a este fato, muitos patologistas podem ser influenciados pelos dados clínicos do paciente (sexo, idade, localização e tamanho da lesão) ou pelas descrições fornecidas pelos cirurgiões-dentistas sobre hipóteses diagnósticas. Tais influências podem levar a uma diminuição da acurácia entre as observações realizadas por examinadores distintos, muito embora sendo os profissionais de mesma formação acadêmica (Abbey, Kaugars et al. 1998; Kujan, Khattab et al. 2007).

Independente dessa discussão, outro consenso presente na literatura revela a importância da graduação das atipias celulares nas LB. Apesar de suas limitações relativas à sensibilidade, especificidade e a subjetividade do examinador, o exame histopatológico ainda é a melhor ferramenta diagnóstica para a análise e graduação das alterações epiteliais presentes nas leucoplasias (Silverman, Gorsky et al. 1996; van der Waal, Schepman et al. 2000; Speight 2007; Warnakulasuriya, Reibel et al. 2008; Martorell-Calatayud, Botella-Estrada et al. 2009).

Nesse contexto, vários pesquisadores trabalham no intuito de aprimorar o modelo de graduação destas lesões, relacionando eventos citológicos a um possível valor preditivo para o risco de transformação maligna (Pindborg 1971; Kujan, Oliver et al. 2006; Speight 2007; Napier & Speight 2008; Tilakaratne, Sherriff et al. 2011).

O grau de displasia epitelial da LB parece ser o principal indicador do potencial de transformação maligna da lesão (van der Waal, Schepman et al. 2000; Warnakulasuriya, Reibel et al. 2008; Smith, Rattay et al. 2009). As alterações citológicas e arquiteturais do epitélio, juntamente com as características clínicas (fatores etiológicos, sítios de acometimento, formas clínicas), foram importantes para indicar a natureza cancerizável das leucoplasias (Lind 1987; Lee, Hung et al. 2006; Brennan, Migliorati et al. 2007). Entretanto, ainda não foram estabelecidos os fatores determinantes para a identificação das possíveis lesões que teriam um risco de se transformarem em câncer, visto que os parâmetros citológicos e histológicos ainda não são suficientes para prever com confiabilidade a evolução das lesões.

A dificuldade em se alcançar reprodutibilidade de concordância para os achados histopatológicos das LB tem estimulado inúmeros pesquisadores a buscarem alterações antigênicas, imunológicas e genéticas com o objetivo de prever, com alta taxa de sensibilidade e especificidade, quais lesões iriam, com o tempo, progredir para o carcinoma de células escamosas de boca (Mao, Lee et al. 1996; Zhang & Rosin 2001; Rosin, Lam et al. 2002; Martorell-Calatayud, Botella-Estrada et al. 2009; Smith, Rattay et al. 2009). Como consequência, o desenvolvimento de biomarcadores resultaria num relevante aprimoramento dos procedimentos de prognóstico e confecção de protocolos de tratamento para as leucoplasias bucais, além de promover um combate preventivo ao câncer bucal e às suas lesões ou estágios precursores (Axell, Pindborg et al. 1996).

2.1.3 TRANSFORMAÇÃO MALIGNA DAS LEUCOPLASIAS BUCAIS

As taxas de transformação maligna das leucoplasias variam de 2,4 a 36%, sendo que fatores como presença e grau de displasia, gênero feminino, ausência de fatores etiológicos explícitos, localização da lesão (língua e soalho bucal), tamanho da lesão

(>200mm²) e apresentação clínica heterogênea parecem estar associados com maior probabilidade de malignização (Silverman, Gorsky et al. 1996; Hsue, Wang et al. 2007; Bagan, Jimenez-Soriano et al. 2011). Entretanto, os estudos relacionados às taxas de transformação maligna das leucoplasias são bastante divergentes na literatura.

Existe uma grande diversidade de trabalhos que relataram taxas variáveis de transformação maligna das LB em diferentes regiões do mundo: Einhorn & Wersall (1967) relataram que a taxa de transformação maligna das leucoplasias varia 2,4% a 4%; Pindborg et al (1968) descreveram que os índices da transformação são de 3,5%; para Banoczy & Sugar (1975) e Banoczy & Csiba (1976) as taxas seriam de 5,9 a 13,2%; Silverman et al (1984) descreveram índices de malignização de 36%; Lumerman et al (1995) observaram taxas de 16% e Schepman et al (1998) relataram índices de transformação de 2,9%.

Dessa forma, baseado nos estudos relacionados com a transformação maligna das LB, o percentual exato das lesões que vão evoluir para a cancerização ainda é desconhecido (Einhorn & Wersall 1967; Pindborg, Jolst et al. 1968; Banoczy & Sugar 1972; Banoczy & Sugar 1975; Silverman, Gorsky et al. 1984; Lumerman, Freedman et al. 1995; Schepman, van der Meij et al. 1998).

Outra questão importante é o tempo que se leva para que a LB transforme-se em carcinoma. Alguns trabalhos relataram que esse tempo pode variar de 6,3 a 16 anos; Banoczy & Csiba (1975) verificaram que o tempo necessário é de 6,3 anos em média. O trabalho de Pindborg et al (1975) mostrou um período de transformação maior que 7 anos. Silverman et al (1984) observaram uma taxa média de 8,1 anos. Lumerman et al (1995) mostraram período médio de transformação acima de 6,5 anos. Já Schepman et al (1998), num estudo retrospectivo, relataram que o tempo estimado para que esse evento ocorresse seria de 16,7 anos (Banoczy & Sugar 1975; Pindborg, Mehta et al.

1975; Silverman, Gorsky et al. 1984; Lumerman, Freedman et al. 1995; Schepman, van der Meij et al. 1998). Baseado na literatura, o tempo estimado para que ocorra transformação maligna seria superior a 6 anos. Entretanto, há uma carência de estudos longitudinais (coortes) que elucide melhor esta questão.

Em relação ao manejo das LB, a literatura descreve que a execução de biópsias incisionais ou excisionais são de grande importância para o estabelecimento do correto diagnóstico das leucoplasias, visto que estas lesões não poderiam ser avaliadas somente pela aparência clínica (Brennan, Migliorati et al. 2007; Holmstrup, Vedtofte et al. 2007; Speight 2007). O fato que norteia a obrigatoriedade da biópsia está ligado diretamente ao conceito da lesão, ao qual se faz necessário descartar qualquer outra manifestação patológica (Warnakulasuriya, Johnson et al. 2007). Além disso, os trabalhos de Renstrup (1957) e Bouquot (1991), mostraram que as apresentações clínicas das lesões nem sempre coincidem com o grau de atipia celular encontrado nos achados histopatológicos das mesmas (Rentstrup 1954; Bouquot 1991; van der Waal, Schepman et al. 1997; Schepman, van der Meij et al. 1998).

Estudos genéticos e moleculares têm sido relevantes na busca de ferramentas capazes de determinar quais LB apresentariam maior probabilidade de transformação maligna. Atualmente, são estudadas várias alterações genéticas associadas aos fenômenos de carcinogênese, como perda de heterozigosidade (LOH - *loss of heterozygosity*), modificações epigenéticas e identificação de polimorfismos gênicos. Tais alterações podem estar associadas à redução ou ausência de expressão de genes supressores de tumor e, conseqüentemente, à potencialização dos fenômenos de transformação maligna (Smith, Rattay et al. 2009). Até o presente momento, a grande questão que permanece é: por que algumas leucoplasias sofrem transformação maligna e outras não? E, além disso, quais irão sofrer a malignização e quais não?

Considerando que o diagnóstico e a avaliação dos tecidos biopsiados é feito por meio de microscopia de luz sob a observação humana, a classificação da displasia epitelial pode se tornar subjetiva, conferindo um valor preditivo de transformação maligna muito aquém do ideal (Silverman, Gorsky et al. 1996; van der Waal, Schepman et al. 2000; van, Schepman et al. 2000; Warnakulasuriya, Reibel et al. 2008). O ideal, portanto, seria que cada centro de diagnóstico avaliasse o valor preditivo positivo e negativo de sua gradação histopatológica das leucoplasias, realizando um acompanhamento periódico dos pacientes diagnosticados ao longo dos anos. No entanto, a maioria dos centros de diagnóstico não conhecem os valores preditivos de seus diagnósticos histológicos, por dificuldades variadas.

2.2 GENES SUPRESSORES DE TUMOR

A transformação de um tecido normal em neoplasia maligna é um processo multifatorial caracterizado por alterações genéticas e moleculares que culminam na imortalização celular e no potencial de infiltrar e disseminar para os tecidos. Este fenômeno é denominado tumorigênese (Kademani 2007; Chen, Chang et al. 2008).

Didaticamente, os eventos relacionados à gênese do câncer podem ser divididos em iniciação, promoção, progressão. A iniciação é caracterizada por lesões irreversíveis no DNA (mutação) induzidas pela exposição a agentes químicos, físicos ou biológicos; a promoção pode ser entendida por um processo lento, reversível e associada à proliferação focal de células iniciadas (Pitot 1993; Choi & Myers 2008). Os agentes promotores são aqueles capazes de alterar os sinais moleculares envolvidos no controle da proliferação celular (Pitot 1991; Pitot & Dragan 1991; Pitot 1993); a progressão é caracterizada, morfológica e biologicamente, por crescimento autônomo e caracterização fenotípica do câncer (Pitot & Dragan 1991).

A literatura aponta que mutações em regiões relacionadas a genes supressores de tumor podem promover o aumento da susceptibilidade ao desenvolvimento do câncer (Knudson 1971; Knudson, Meadows et al. 1976; Berger, Knudson et al. 2011). Esses genes codificam proteínas com funções específicas que atuam impedindo o acúmulo de mutações no genoma da célula durante a divisão celular, garantindo a integridade genética (Kumar, Abbas et al. 2007; Romana 2010). Os genes supressores de tumor atuam como guardiões do ciclo celular e desempenham o importante papel de checagem da duplicação da célula e de modulação da continuidade (ou não) dos processos relativos à mitose (Schafer 1998; Kumar, Abbas et al. 2007). Contudo, é importante salientar que outros grupos de genes também participam dos eventos relacionados à divisão celular. Genes de reparo de DNA e os reguladores de apoptose são exemplos de grupos gênicos relacionados à supressão tumoral. O envolvimento destes genes nos processos controladores de mitose faz desses importantes alvos para o estudo de proto-oncogenes (Kumar, Abbas et al. 2007).

O ciclo celular é um processo altamente ordenado, que resulta na duplicação e transmissão de informação genética de uma geração celular para outra. Durante esse processo, o DNA se replica e ocorre a distribuição das cópias idênticas de cromossomos para as duas células filhas resultantes da divisão celular (Schafer 1998; Vermeulen, Van Bockstaele et al. 2003; Malumbres & Barbacid 2009).

O ciclo celular pode ser dividido nas seguintes fases: G1 (Gap 1), S (síntese), G2 (Gap 2) e M (mitose). G1 e G2 são consideradas as fases intermediárias do ciclo, relacionadas aos processos de duplicação da massa de proteínas e organelas; S se caracteriza pela fase em que ocorre a duplicação do DNA e M é a etapa na qual ocorre a segregação cromossômica e a divisão celular propriamente dita (Schafer 1998;

Vermeulen, Van Bockstaele et al. 2003; Kumar, Abbas et al. 2007; Malumbres & Barbacid 2009).

A regulação do ciclo celular precisa assegurar que os eventos em cada fase estejam completos e adequados, antes de passar para a próxima etapa. Portanto, os pontos de checagem para monitoramento da integridade do DNA estão estrategicamente localizados entre as etapas G1 para S, em S e na G2 para M (Figura 3). Os genes supressores de tumor atuam nestes pontos de checagem no intuito de regular o ciclo celular, a fim de evitar duplicações celulares aberrantes (Kumar, Abbas et al. 2007; NatureEducation 2010).

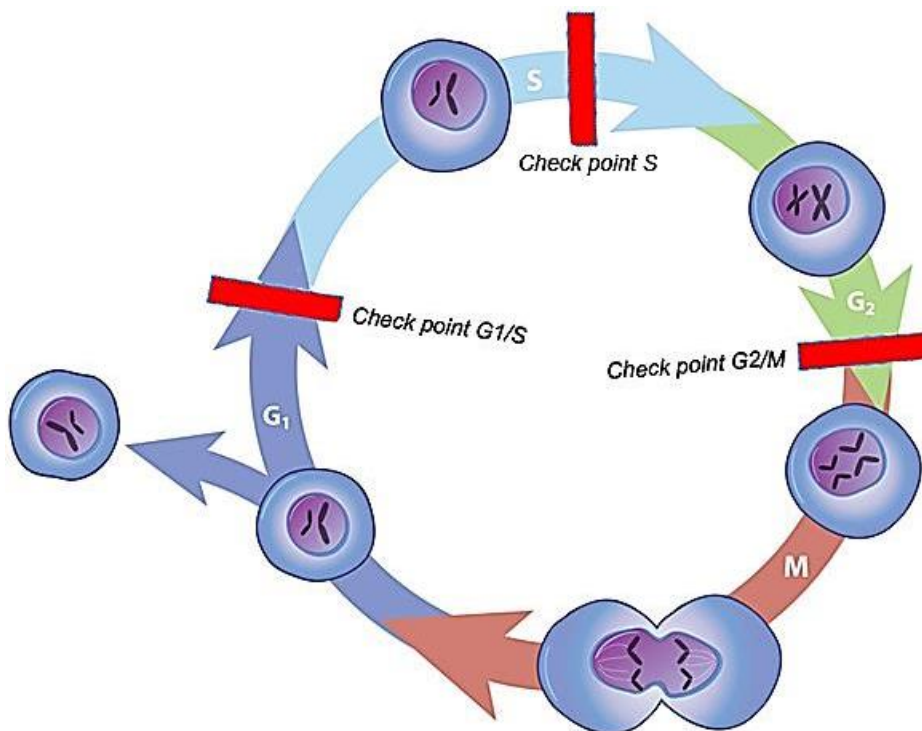


Figura 3: Representação esquemática das fases do ciclo celular.

Fonte: (NatureEducation 2010)

No ciclo celular normal, as ciclinas (proteínas reguladoras do ciclo celular) ligam-se às quinases dependentes de ciclinas (CDKs - *Cyclin-Dependent Kinases*) e formam complexos capazes de fosforilar a proteína do retinoblastoma (Rb). A

fosforilação da Rb libera fatores de transcrição conhecidos como E2F, os quais ativam as vias de leitura e síntese do DNA (Kumar, Abbas et al. 2007) (Figura 4).

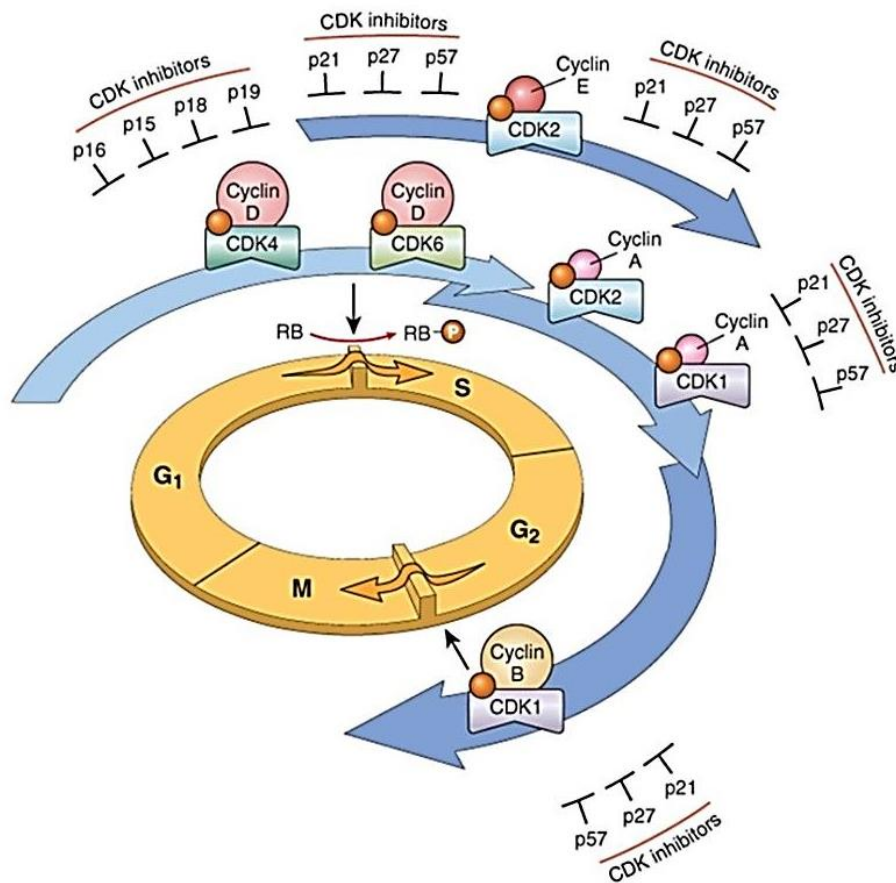


Figura 4: Representação da atividade do ciclo celular. Interação entre ciclinas, CDKs e genes supressores de tumor na regulação mitótica.

Fonte: (Kumar, Abbas et al. 2007)

Na presença de erros durante a divisão celular, os produtos protéicos dos genes supressores de tumor, também conhecidos como inibidores de CDKs, possuem habilidades bioquímicas de se ligarem aos complexos de ciclina-CDK, inibir a

fosforilação da proteína Rb e, conseqüentemente, interromper o ciclo celular (Malumbres & Barbacid 2009). Dessa forma, estando em parada, o ciclo celular pode ser corrigido pelo sistema de reparo. Caso o reparo não seja possível, os genes supressores de tumor, em especial o *P53*, possui a habilidade de induzir a célula a apoptose ou de mantê-la quiescente (Li, Kon et al. 2012). A perda funcional desses genes poderá predispor ao aparecimento de fenótipos celulares mais susceptíveis a proliferação e, conseqüentemente, pode determinar a susceptibilidade à tumorigênese (Berger, Knudson et al. 2011; Li, Kon et al. 2012).

Vários trabalhos na literatura descreveram alterações relacionadas aos genes supressores de tumor em diversos tipos de neoplasias malignas (Boyle, Hakim et al. 1993; Boland, Thibodeau et al. 1998; Ashazila, Kannan et al. 2011; Berger, Knudson et al. 2011; Cavenee 2012). Além disso, em modelos experimentais de indução de câncer, foram observadas alterações em nível genético e protéico de genes como *P53*, *P21* e *P16* (Gonzales-Moles, Rodriguez-Archilla et al. 2002; Berger, Knudson et al. 2011). Em LB, diversos trabalhos apontam que perdas alélicas em regiões relacionadas a genes supressores de tumor, bem como modificações no padrão de expressão gênica dos mesmos, podem estar associados aos eventos displásicos e ao processo de transformação maligna da lesão (Wistuba & Meyerson 2008; Pitiyage, Tilakaratne et al. 2009; Giaretti, Maffei et al. 2012).

Atualmente, estudos moleculares para rastreamento de possíveis genes envolvidos no processo de carcinogênese bucal vêm sendo alvo de várias investigações (Choi & Myers 2008; Pitiyage, Tilakaratne et al. 2009; Smith, Rattay et al. 2009; Romana 2010). Nesse contexto, a perda de heterozigosidade parece estar associada aos processos de gênese do câncer por meio de alterações do padrão de expressão gênica ou mesmo da inativação de genes supressores de tumor (Zhang & Rosin 2001; Rosin, Lam

et al. 2002; Pitiyage, Tilakaratne et al. 2009; Berger, Knudson et al. 2011). Recentemente, foi sugerido que a LOH poderia estar associada à progressão das LB e, conseqüentemente, aos processos de transformação maligna (Mao, Lee et al. 1996; Rosin, Cheng et al. 2000; Jiang, Fujii et al. 2001; Zhang & Rosin 2001; Rosin, Lam et al. 2002).

2.3 PERDA DE HETEROZIGOSIDADE (*LOSS OF HETEROZYGOSITY* – LOH)

A LOH é entendida como a perda alélica em um locus heterozigoto para um dado marcador (Thiagalingam, Laken et al. 2001; Li, Korol et al. 2004). A análise desse evento permite identificar, através da comparação entre o DNA oriundo de tecido normal e o DNA de uma determinada patologia, as alterações no balanço alélico presentes no tecido alterado, seja um tumor ou outra doença (van Houten, Tabor et al. 2000).

A LOH pode ocorrer por meio de deleções de regiões gênicas, conversão gênica, recombinação, duplicação e até de perda cromossômica, resultando em modificações na função normal da célula (Boland, Thibodeau et al. 1998; van Houten, Tabor et al. 2000).

Diversos estudos mostraram que perdas somáticas em locus de genes supressores de tumor são capazes de gerar instabilidades genéticas com conseqüente alteração da expressão e função desses genes. O resultado disso é uma maior susceptibilidade ao desenvolvimento do câncer (Boland, Thibodeau et al. 1998; Zhang & Rosin 2001; Ashazila, Kannan et al. 2011; Berger, Knudson et al. 2011).

A LOH pode ser detectada por diferentes métodos, incluindo: análise de marcadores de microssatélites, análise de cariótipo, hibridação in situ, análise de polimorfismos (SNP - *single-nucleotide polymorphism*) e hibridação comparativa do genoma (Velasco, Pallares et al. 2008).

A análise a partir da amplificação de microssatélites por meio da técnica da PCR é uma das mais utilizadas atualmente. Os microssatélites são definidos como segmentos de DNA que apresentam sequências de nucleotídeos constituídos por diferentes bases, as quais se repetem em tipo, ordem e número variado (Li, Korol et al. 2002; Li, Korol et al. 2004). As repetições podem ser caracterizadas pela presença de 1 a 6 bases organizadas em repetições tipo “tandem” (sequenciais), com unidades adjacentes umas às outras (Boland & Goel 2010). Os microssatélites configuram sequências nucleotídicas altamente polimórficas na população e suscetíveis a erros durante a replicação do DNA (Li, Korol et al. 2004; Migaldi, Sartori et al. 2008).

Essas sequências estão dispersas pelo genoma e estão localizados principalmente em regiões não codificadoras. O mecanismo de distribuição dessas sequências pelo DNA ainda não foi esclarecido (Li, Korol et al. 2002; Boland & Goel 2010). Contudo, uma característica marcante na distribuição desses elementos estruturais do DNA é a apresentação de comprimento fixo para cada indivíduo, sugerindo uma variação individual característica, o que tem favorecido a sua utilização como confiável marcador de DNA (Li, Korol et al. 2002; Li, Korol et al. 2004; Boland & Goel 2010).

Até pouco tempo, esses DNAs repetitivos eram considerados elementos “neutros”, sem função aparente, representando estruturas vestigiais ou subprodutos da evolução e da maquinaria de replicação do DNA. Entretanto, atualmente, essas sequências têm sido reconhecidas como elementos importantes para várias funções celulares como a transcrição gênica (Li, Korol et al. 2002; Li, Korol et al. 2004).

A LOH em regiões de microssatélites próximos a genes supressores de tumor parece ser um importante evento relacionado à alteração da expressão gênica, o que pode predispor a célula ao crescimento neoplásico (van Houten, Tabor et al. 2000; Berger, Knudson et al. 2011).

Anormalidades em sequências de microssatélites, em especial a LOH, têm sido associadas a várias condições patológicas, incluindo diversos tipos de neoplasias malignas e benignas, como: ameloblastomas, tumor de células granulares de boca, lesões fibro-ósseas de boca, carcinoma colo-retal, carcinoma de mama e carcinoma de cabeça e pescoço (Jiang, Fujii et al. 2001; Zhang & Rosin 2001; Smith, Rattay et al. 2009; Galvao, Gomes et al. 2012; Gomes, Fonseca-Silva et al. 2013). Os estudos de LOH em regiões de microssatélites vêm sendo realizados no intuito melhorar a compreensão acerca dos processos relacionados à carcinogênese (Guillaud, Zhang et al. 2008).

LOH em regiões do braço curto dos cromossomos 3, 9, 11 e 17 foram descritas em diversos tumores como o carcinoma de mama, pulmão, melanoma, carcinoma de células escamosas de boca e carcinoma de cabeça e pescoço (Field, Kiaris et al. 1995; Rowley, Jones et al. 1996; Migaldi, Sartori et al. 2008). Alguns desses estudos têm correlacionado a LOH nesses loci a um pior prognóstico do paciente (Field, Kiaris et al. 1995; Bremmer, Braakhuis et al. 2008). Adicionalmente a tais evidências, outros autores sugeriram que a LOH nas regiões 3p e 9p estariam associadas ao aumento do risco de transformação maligna das leucoplasias (Mao, Lee et al. 1996; Jiang, Fujii et al. 2001; Zhang & Rosin 2001; Rosin, Lam et al. 2002; Tabor, Brakenhoff et al. 2002).

OBJETIVOS

3. OBJETIVOS

3.1 OBJETIVO GERAL

Estudar a perda de heterozigosidade em regiões cromossômicas próximas aos genes supressores de tumor em amostras de leucoplasia bucal.

3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS

1. Avaliar a LOH em regiões cromossômicas 3p, 9p, 11p, 11q e 17p em amostras de leucoplasias bucais em dois tempos distintos da evolução da lesão;
2. Descrever e analisar o perfil de LOH nas leucoplasias considerando as gradações histopatológicas encontradas nas lesões estudadas;
3. Testar a associação entre o perfil de LOH das leucoplasias e a gradação histológica, alterações citológicas e arquiteturais do epitélio das lesões;
4. Testar a associação dos dados de LOH com os dados clínicos dos casos (tipo de lesão, localização, tamanho da lesão, presença do hábito tabagista);
5. Analisar a expressão de p53 e ki67 em função das LOH, gradação histopatológica e alterações citológicas e arquiteturais do epitélio das leucoplasias.

MATERIAIS E MÉTODOS

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. ASPECTOS ÉTICOS

O presente trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG), sob o parecer CAAE-0499.0.203.000-11 (Anexo I).

4.2. PACIENTES E AMOSTRAS

A partir da análise dos arquivos do Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, entre os anos 2003 e 2010, foi realizada uma busca para selecionar pacientes portadores de leucoplasia bucal.

Como critério de elegibilidade foi determinado que os pacientes apresentassem duas biópsias realizadas em intervalos de tempo distintos. Além disso, todos os pacientes deveriam apresentar, na primeira biópsia, diagnóstico histopatológico de displasia epitelial leve ou moderada ou acentuada sem história prévia de câncer de boca.

Todos os 17 pacientes selecionados para este estudo foram aconselhados, e convocados por telefone, a comparecer a consultas periódicas para acompanhamento. Desses, 13 compareceram às consultas clínicas de acompanhamento até outubro de 2012. Os outros 3 pacientes restantes não se apresentaram às consultas de reavaliação e o seguimento dos casos foi perdido. O tempo médio de seguimento dos casos foi de 53 meses.

As informações clínicas, etiológicas e epidemiológicas (sexo, idade, tabagismo, tipo de biópsia e características clínicas) foram obtidas a partir dos prontuários odontológicos ou diretamente no exame clínico dos pacientes.

O hábito tabagista e o consumo diário de cigarros foram investigados. Apenas os pacientes que nunca fumaram foram considerados não fumantes. Pacientes fumantes e ex-fumantes foram agrupados.

Sítio de acometimento da lesão foi categorizado em alto e baixo risco de transformação maligna. O ventre e borda de língua, assoalho bucal e palato mole foram considerados sítios de alto risco, enquanto os demais sítios foram considerados de baixo risco (Zhang, Cheung et al. 2001; van der Waal 2009).

Os espécimes biopsiados foram fixados em solução de formol a 10%, desidratados, incluídos em parafina e cortados em uma espessura de 5 μ m. Posteriormente, os cortes foram corados com Hematoxilina e Eosina (H&E), com a finalidade de analisar morfológicamente os espécimes, segundo os critérios adotados pela OMS para graduação das displasias (Barnes, Eveson et al. 2005).

Para a inclusão dos casos na pesquisa, todas as amostras foram analisadas por dois patologistas bucais (RSG e CCG), de forma independente, cega e em dois momentos distintos. A análise de concordância intra e inter-examinador foi de mais de 85% (Kappa > 0,85), refletindo uma boa concordância.

4.3. MICRODISSECÇÃO DOS TECIDOS

A partir das lâminas em H&E, o epitélio e o tecido conjuntivo dos espécimes foram identificados por microscopia ótica (100X) e marcadas com pincel e tinta. A lâmina com o corte histológico demarcado (epitélio-lesão Vs conjuntivo-normal) foi sobreposta ao bloco de parafina. Com auxílio de uma lâmina de bisturi número 15 e de uma lupa foi realizada a separação dos componentes do bloco (Figura 5). Posteriormente, os espécimes foram microdissecados com dez cortes de 10 μ m de espessura e foram realizadas as coletas dos tecidos epitelial e conjuntivo separadamente,

em dois tubos distintos, sendo um para cada tipo de tecido. Todos os materiais utilizados nos passos da microdissecção dos tecidos foram previamente esterilizados e os procedimentos conduzidos com o uso de luvas.

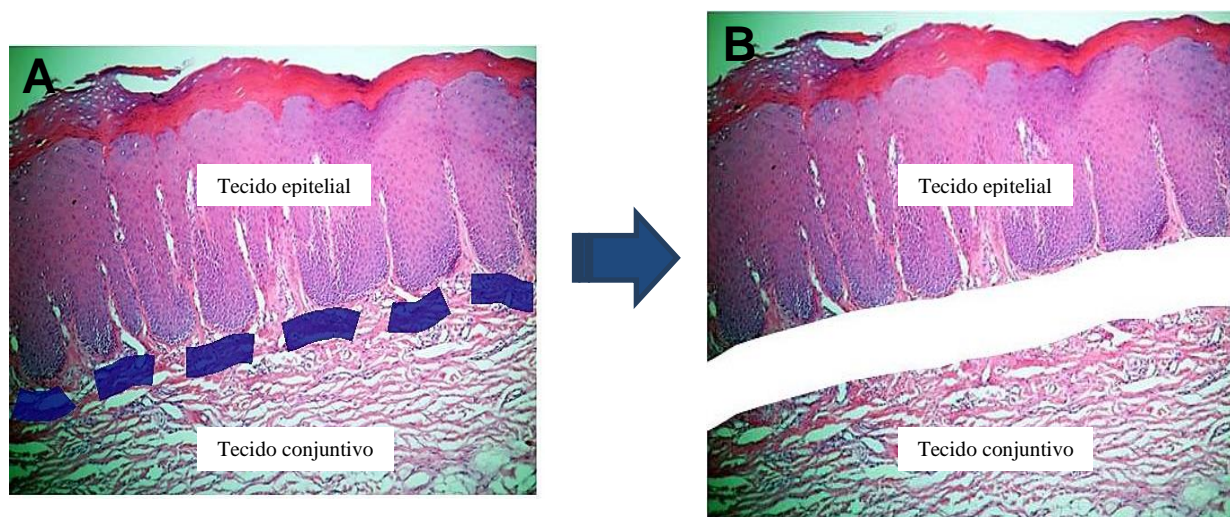


Figura 5: Representação da microdissecção do tecido. **A)** Separação do epitélio e do tecido conjuntivo com caneta permanente; **B)** Separação dos fragmentos após secção do tecido.

4.4. EXTRAÇÃO DO DNA

As amostras foram desparafinadas a partir de banhos de xilol aquecido a 65°C. Posteriormente, os tecidos foram reidratados em banhos decrescentes de etanol (100%, 95% e 70%) e digeridos com proteinase K (Finnzymes, Espoo, Finland). O DNA foi extraído com o kit *DNeasy Blood and Tissue Kit*, de acordo com as recomendações do fabricante (Qiagen, Hilden, NRW, Alemanha).

Após a quantificação do DNA em espectrofotômetro BioSpec-mini (Shimadzu, Columbia, EUA), foi realizado o teste de viabilidade do DNA a partir da amplificação da região do gene constitutivo β -globina, por meio da reação de PCR. Posteriormente,

os marcadores de microssatélites selecionados para as regiões 3p, 9p, 11p, 11q e 17p (Figura 6) foram submetidos a reação de PCR (Tabela 2).

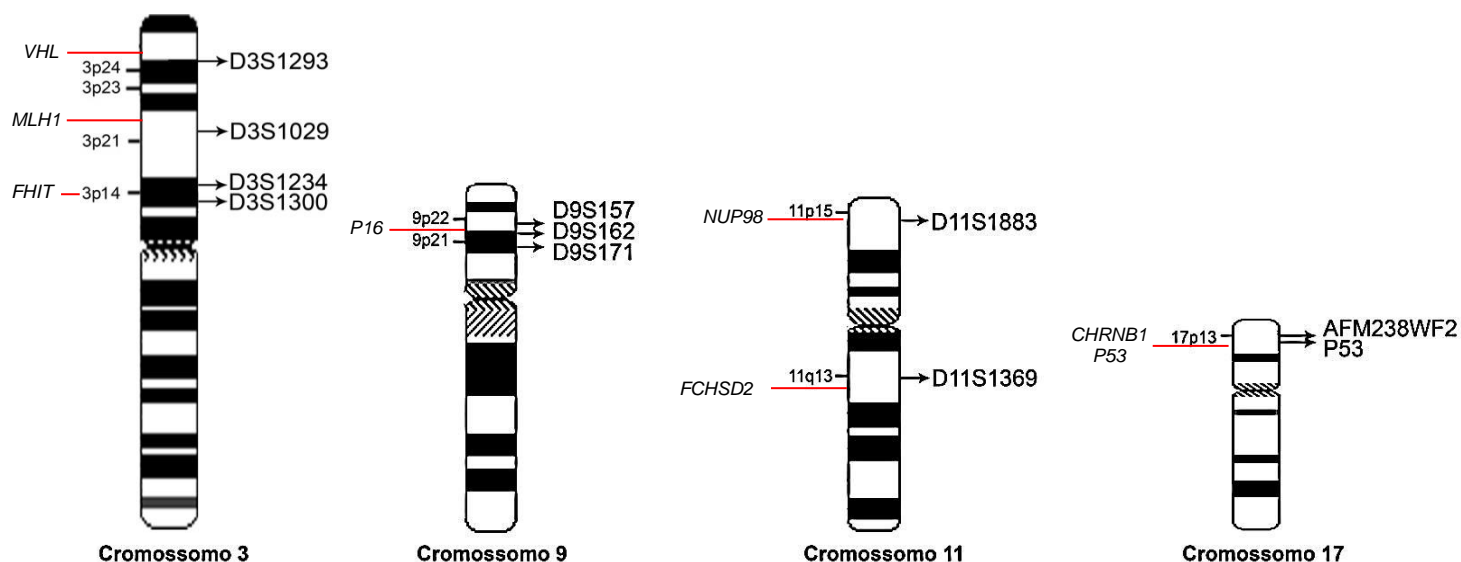


Figura 6: Regiões cromossômicas 3p, 9p, 11p, 11q e 17p com os respectivos microssatélites selecionados e os genes supressores de tumor.

Tabela 2: Marcadores de microssatélite utilizados para as regiões 3p, 9p, 11p, 11q e 17p.

Marcadores	Lócus	Sequência de primers	Tipo de repetição	Amplicon
D3S1234	3p14.2	<i>F: CCTGTGAGACAAAGCAAGAC</i> <i>R: GACATTAGGCACAGGGCTAA</i>	Di (CA)	99-125 pb
D3S1300	3p14.2	<i>F: AGCTCACATTCTAGTCAGCCT</i> <i>R: GCCAATCCCCAGATG</i>	Di (CA)	217-241 pb
D3S1029	3p21.2	<i>F: ATACTCTGGACCCAGATTGATTAC</i> <i>R: TAATCCCAAATGGTTTAGGGGAG</i>	Di (CA)	168 pb
D3S1293	3p24.3	<i>F: ACTCACAGAGCCTTCACA</i> <i>R: CATGGAAATAGAACAGGGT</i>	Di (CA)	116-144 pb
D9S157	9p22	<i>F: AGCAAGGCAAGCCACATTTTC</i> <i>R: TGGGGATGCCAGATAACTATATC</i>	Di (CA)	133-149 pb
D9S162	9p22-p13	<i>F: GCAATGACCAGTTAAGGTTC</i> <i>R: AATCCCACAACAAATCTCC</i>	Di (CA)	172-196 pb

D9S171	9p22-p21	<i>F:AGCTAAGTGAACCTCATCTCTGTCT</i> <i>R: ACCCTAGCACTGATGGTATAGTCT</i>	Di (CA)	158-177 pb
D11S1369	11q13.4	<i>F: CCACAGCACTGATACATGGA</i> <i>R:TCAGTCTCAAGTCAAAAAGTAATCG</i>	Tetra (GATA)	180 pb
D11S1883	11p15.5	<i>F: AACACGAGGTTAAGCAGAG</i> <i>R: GAATGAAGAATTTTCCAAACTAC</i>	Di (CA)	195-211 pb
AFM238WF2	17p13.1	<i>F: AACAGCCTGTGCAACATAGT</i> <i>R: AGCTCGAAGCAACAACACTT</i>	Di (CA)	160 pb
P53	17p13.1	<i>F:TACAGGGATAGGTAGCCCGAG</i> <i>R: GGATTTGGGCTCTTTTGTA</i>	Di (CA)	149 pb

Para a reação de PCR dos microssatélites, foi utilizado mix contendo 0,7µM de cada primer, 500ng de DNA, 0,25mM de desoxirribonucleotídeo trifosfato (dNTP), 2,5mM de cloreto de magnésio, 1,5µl (1X) de tampão de PCR comercial e 0,6U de enzima polimerase (AmpliTaq Platiniun polymerase, Invitrogen, Carlsbad, CA, USA), totalizando um volume final de 15µl. A amplificação do DNA do tecido epitelial e do conjuntivo foi realizada sob as mesmas condições térmicas (Tabela 3) e os produtos foram identificados por meio da eletroforese em gel de poliacrilamida 6,5% corados pela prata.

Tabela 3: Condições térmicas do PCR.

Marcadores	Desnaturação inicial	Desnaturação	Anelamento	Extensão	Ciclos	Extensão Final
P53	10min 95°	10 seg 96°	30 seg 58°	1 min 70°	45	30 min 70°
D9S162						
D3S1234						
D3S1300						
D3S1293	10min 95°	10 seg 96°	30 seg 57°	2 min 70°	45	30 min 70°
D9S171						
D11S1883						
D9S157	10min 95°	10 seg 96°	30 seg 60°	1 min 70°	45	30 min 72°
D3S1029						
D11S1369						
AFM238WF2						

4.5. ANÁLISE DE LOH

A análise da LOH foi realizada com a utilização da eletroforese capilar em sequenciador ABI-PRISM 310 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Os produtos de PCR foram diluídos em água milliQ (ultra pura), numa proporção que variou de 1:0 a 1:80 (produto de PCR: água milliQ), a partir da análise da intensidade da banda no gel. Dessa diluição, 1µl foi adicionado a 12µl de formamida e 0,5µl de padrão GeneScan™ 500 LIZ® (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA). Após homogeneização vigorosa, as amostras foram desnaturadas por 10 minutos a 95° e a seguir foram colocadas no gelo. Em seguida, as amostras foram submetidas a eletroforese capilar.

Os resultados foram analisados através do software Genescan, versão 3.0 (Applied Biosystem, Foster City, CA, USA) e a LOH foi calculada a partir da proporção entre o valor da altura do alelo curto dividido pelo alelo longo do tecido conjuntivo. O valor da altura do alelo curto dividido pelo alelo longo do tecido epitelial (van Houten, Tabor et al. 2000), de acordo com a seguinte fórmula:

$$\text{LOH} = \frac{\frac{\text{Altura do alelo curto}}{\text{Altura do alelo longo}}}{\frac{\text{Altura do alelo curto}}{\text{Altura do alelo longo}}}$$

} Tecido conjuntivo (Normal)
} Tecido epitelial (Lesão)

Foi considerada LOH quando um dos alelos da amostra do epitélio se apresentasse ausente ou reduzido de mais de 50%, quando comparado com os alelos da amostra do conjuntivo (score <0,5 ou > 2) (Figura 7). As amostras em que a razão entre os valores dos alelos do tecido conjuntivo (normal) e epitelial (lesão) foram menores ou igual a 0,5, ou maiores ou igual a 2, foram denominadas LOH. Os valores encontrados

entre 0,5 e 2,0 foram considerados como casos de retenção dos alelos. Os casos em que as amostras de tecido conjuntivo (normal) apresentaram apenas um pico foram considerados não informativos, pois possivelmente eram homocigotos. Os casos que, porventura, exibiram interpretação duvidosa também foram considerados não informativos.

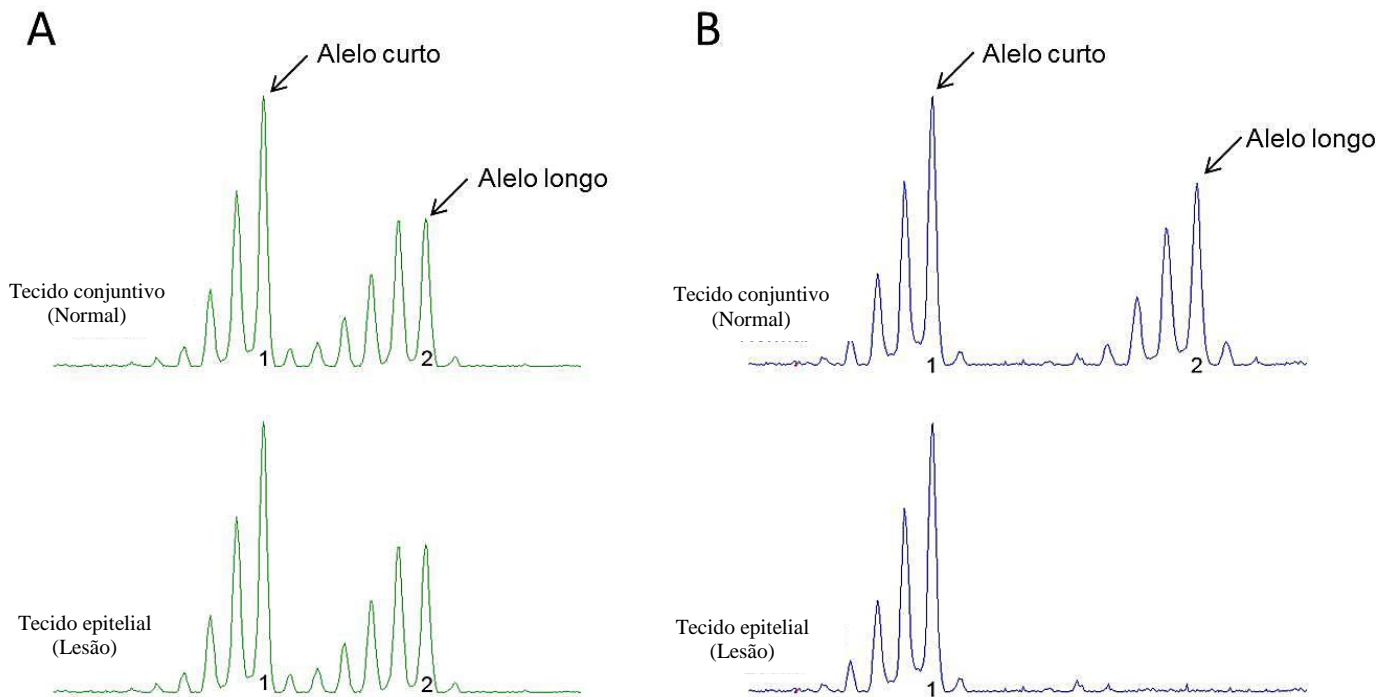


Figura 7: Eletroferograma da análise de LOH. A) Análise da amostra da primeira biópsia do paciente #9 para o marcador D9S157. Observa-se a retenção de ambos os alelos na amostra de tecido epitelial. B) Análise da amostra da primeira biópsia do paciente #4 para o marcador AFM238WF2 que apresentou perda do alelo longo na amostra do tecido epitelial, identificando a LOH.

Os *stutters* são fragmentos de produtos de PCR incompletos, que durante a análise de LOH podem ser interpretados como picos menores, antecessores ao pico principal (alelo). Este fenômeno se dá por dois fatores principais: 1) *Slippage* ou

deslizamento da enzima polimerase, que é um erro no processo de extensão na fita de DNA durante a PCR, o que resulta na confecção de produtos incompletos, principalmente quando se trata de mono-di ou trinucleotídeos; 2) Falhas durante a adição do nucleotídeo adenina (A) na extensão final da PCR (van Houten, Tabor et al. 2000).

Os *stutters* podem gerar dificuldade para a análise da LOH. Quando dois alelos, representados por picos, estão muito próximos um do outro, o valor do *stutter* do alelo longo pode estar somado ao alelo curto, gerando um resultado falso para o valor da altura do alelo curto (os valores relativos à altura dos picos, alelos e *stutters* são fornecidos pelo software Genescan, version 3.0 - Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). Nesses casos, o valor do alelo curto foi corrigido antes do cálculo de LOH. Para isso, foram utilizadas amostras homozigotas (não informativas), para obter um valor numérico médio da altura do *stutter* em relação ao alelo. Esse valor foi chamado de *Fator de Correção* (FC) e foi determinado dividindo a altura do *stutter* pela altura do alelo. Posteriormente, para obter a altura real do alelo curto, o valor do *stutter* do alelo longo foi subtraído do alelo curto através da fórmula:

$$\text{Alelo curto (real)} = \text{Alelo curto} - (\text{FC} \times \text{Alelo longo})$$

Após essa correção, finalmente foi possível calcular o verdadeiro valor de LOH, utilizando o alelo curto corrigido (Figura 8 e 9).

A frequência de perda alélica foi calculada para cada amostra e para cada marcador, considerando-se a proporção de loci com LOH para o total de loci informativo (Fowler, Fowler et al. 2006).

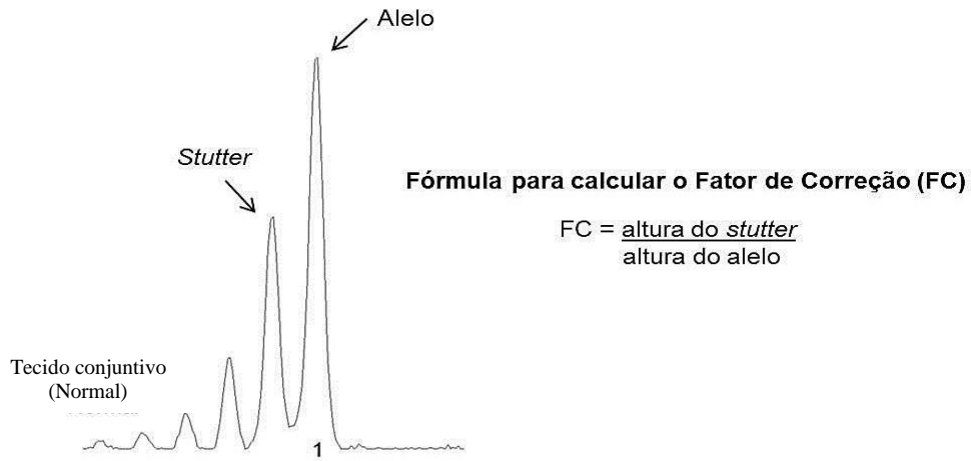


Figura 8: Eletroferograma da primeira biópsia do paciente #12 evidenciando a possível homozigose da amostra normal para o marcador D11S1883. Ao lado, é demonstrada a fórmula de identificação do fator de correção de *stutter*.

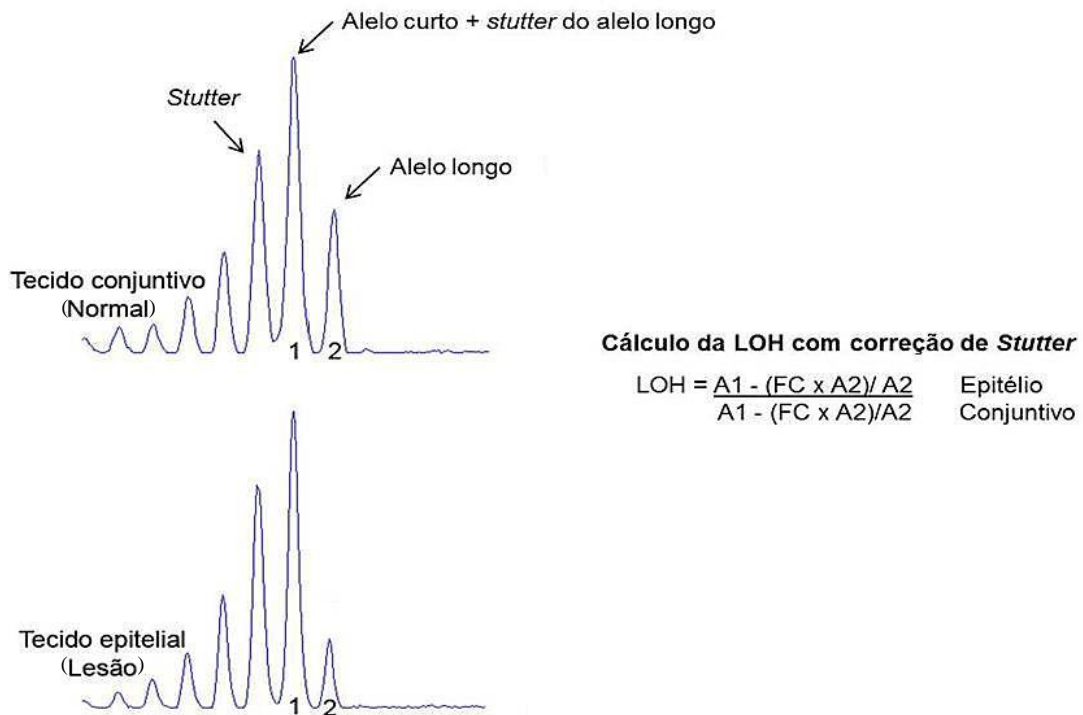


Figura 9: Eletroferograma da primeira biópsia do paciente #17 demonstrando a LOH marcador P53 após o cálculo de correção de *stutter*. Ao lado, é demonstrada a fórmula para o cálculo da LOH com a correção de *stutter*.

4.6. IMUNOHISTOQUÍMICA

Para a realização da técnica da imunohistoquímica, para a detecção das proteínas p53 e ki67 (Tabela 4), foram confeccionados cortes histológicos de 3µm de espessura, montados em lâminas de vidro.

Para a identificação da proteína p53, inicialmente os tecidos foram desparafinizados em xilol e hidratados em cadeia descendente de etanol (100%, 95% e 70%). Já para a detecção da ki67, as lâminas foram acondicionadas em solução Trilogy® (Cell Marque Corporation, Rocklin, CA).

Tabela 4: Anticorpos primários utilizados para as reações de imunohistoquímica.

Anticorpo monoclonal	Clone	Fabricante	Recuperação antigênica	Diluição	Sistema de detecção
P53	DO7	Dako Cytomation, Glostrup, Denmark	Ácido cítrico, pH 6.0	1:50	EnVision, Dako Corporation, Carpinteria, CA, EUA
Ki67	MIB-1	Dako Cytomation, Glostrup, Denmark	Trilogy® (Cell Marque Corporation, Rocklin, CA)	1:50	EnVision, Dako Corporation, Carpinteria, CA, EUA

A recuperação antigênica foi realizada em panela a vapor (Cuisinart Convection Steamer, New Jersey, EUA), por 30 minutos. Após recuperação antigênica, realizou-se bloqueio da peroxidase endógena com solução de metanol e H₂O₂ 3%.

As lâminas foram incubadas com os anticorpos primários por um período de 30 minutos, sob agitação. Posteriormente, o mesmo procedimento foi repetido, com o sistema de detecção por tempo e condição iguais. A reação foi revelada com solução cromógena de 3,3' diaminobenzidina (DAB) (Sigma, St Louis, MO, EUA) e a contra coloração foi feita com hematoxilina de Mayer.

Fragmentos de espécimes de carcinoma de células escamosas de boca sabidamente positivas para cada anticorpo foram incluídos como controle positivo.

Como controle negativo, foi realizada a omissão dos anticorpos primários em lâminas com amostras de carcinoma, sabidamente reativas para os anticorpos. O controle positivo e o negativo foram incluídos em todas as reações realizadas.

Todas as lâminas foram analisadas com microscópio de luz (Figura 10). As células com núcleo acastanhado foram consideradas positivas, independentemente da intensidade da coloração. A contagem das células foi realizada de forma semi-quantitativa por um observador (TFS) em microscópio óptico Zeiss® (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Alemanha), com retículo acoplado. Esse possui 100 pontos compostos por 10 linhas horizontais e 10 linhas verticais.

Foram avaliados 8 campos em aumento de 400x em cada lâmina restritos à camada epitelial. Nos casos em que toda a extensão do corte não perfazia os oito campos, o tecido foi contado em sua totalidade. Os resultados foram calculados como porcentagem de células positivas em relação ao número total de células contadas.

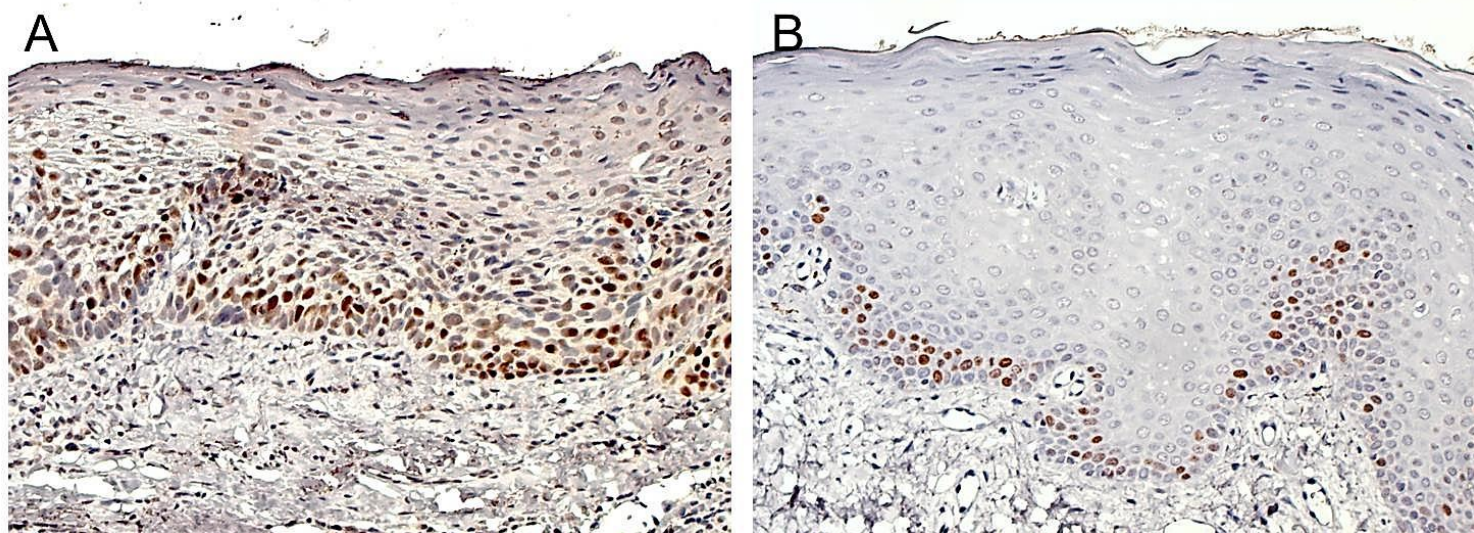


Figura 10: Fotomicrografia da detecção das proteínas p53 e ki67 (200X). A) Amostra positiva para a p53 em displasia epitelial moderada (amostra #14 primeira biópsia); B) Amostra apresentando positividade celular para a proteína ki67 em displasia epitelial leve (amostra #1 segunda bópsia).

Para o anticorpo p53, as amostras foram categorizadas em positivo e negativo, baseadas na porcentagem da positividade. Amostras que apresentaram marcação superior a 10%, foram considerados positivas. Aquelas que apresentaram marcação igual ou inferior a 10%, foram consideradas negativas (Gomes, Diniz et al. 2012). Além disso, em ambos os anticorpos (p53 e ki67) a marcação foi avaliada como restrita à camada basal, e parabasal ou extensiva às camadas suprabasais.

4.7. ANÁLISE DOS DADOS

Os dados obtidos nesse estudo foram planejados e analisados com auxílio do programa SPSS (*Statistical Package for the Social Sciences*; Chicago; EUA) (versão 17.0). Os dados clínicos e histopatológicos dos pacientes (idade, gênero, hábito tabagista, apresentação clínica da lesão, localização da lesão, tamanho da lesão, graduação da displasia) foram descritos a partir de estatística descritiva (percentuais, medias, medianas).

As frequências de perda de heterozigosidade foram obtidas por contagem direta e foram expressas em percentuais. A avaliação da positividade da expressão da proteína p53 foi realizada de forma categorizada em marcação negativo ($\leq 10\%$) e positivo ($>10\%$); a proteína ki67 foi analisada pelo percentual de células marcadas do tecido.

O teste Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para analisar o padrão de distribuição das variáveis (normal ou não normal). A comparação entre os dados foi realizada por meio dos testes de Qui-Quadrado, Mann-Whitney e Kruskal-Wallis. O nível de significância adotado no presente estudo foi de 5% (intervalo de confiança de 95%).

RESULTADOS

5. RESULTADOS

5.1 PACIENTES E AMOSTRAS

Dos 17 pacientes selecionados para o estudo, sete eram do gênero masculino e 10 do gênero feminino, com idade média de 57,4 anos (mediana de 61 anos), variando de 32 a 82 anos de idade. Os dados detalhados dos pacientes estão apresentados na tabela 5. A maioria dos pacientes era fumante (70,6%). O tempo médio de tabagismo foi de 25 anos (variando de 15 a 60 anos), com consumo médio de 13,5 cigarros industrializados por dia (variando 05 a 25 cigarros).

Os sítios de acometimento das leucoplasias foram: mucosa gengival, mucosa jugal, palato duro, palato mole, mucosa retromolar e ventre de língua; sendo 9 casos em locais considerados de baixo risco (52,9%) e 8 de alto risco (47,1%). Em relação à aparência clínica das lesões, 26 casos foram caracterizados como homogêneas (76,5%) e 8 como heterogêneas (23,5%). O tamanho médio das lesões (medido em maior dimensão) foi de 20 milímetros, variando de 4 a 100mm.

O exame histopatológico das 34 amostras, provenientes dos 17 pacientes, revelaram que 20 espécimes apresentaram displasia epitelial leve, 10 moderada, 2 acentuada e 2 apresentaram diagnóstico de carcinoma de células escamosas de boca na segunda biópsia. Os 2 casos de carcinoma foram identificados como transformação maligna de lesões de leucoplasia. Os dados relativos à caracterização das alterações citológicas e arquiteturais das displasias estão dispostos na tabela 6.

Tabela 5: Dados clínico-patológicos dos casos incluídos no estudo.

Caso	Gênero	Idade	Hábito tabagista	Biópsia	Intervalo entre biópsias	Localização da lesão	Tipo de biópsia	Aparência clínica	Tamanho da lesão	Gradação histopatológica
#1	Masculino	63	Tabagista	Primeira	15 meses	Trigono retromolar (D)	Incisional	Homogênea	30mm	Leve
				Segunda		Trigono retromolar (D)	Excisional	Homogênea	10mm	Leve
#2	Feminino	32	Não tabagista	Primeira	2,5 meses	Palato mole	Excisional	Homogênea	15mm	Leve
				Segunda		Palato mole	Excisional	Homogênea	10mm	Leve
#3	Masculino	77	Tabagista	Primeira	47 meses	Rebordo gengival (E)	Incisional	Homogênea	70mm	Leve
				Segunda		Rebordo gengival (E)	Incisional	Homogênea	20mm	Leve
#4	Masculino	51	Tabagista	Primeira	46 meses	Mucosa labial	Excisional	Homogênea	8mm	Leve
				Segunda		Palato duro	Incisional	Heterogênea	4mm	Leve
#5	Masculino	37	Tabagista	Primeira	2,5 meses	Mucosa jugal (E)	Excisional	Homogênea	35mm	Leve
				Segunda		Mucosa jugal (E)	Excisional	Homogênea	20mm	Leve
#6	Feminino	34	Tabagista	Primeira	71 meses	Mucosa jugal (D)	Incisional	Heterogênea	20mm	Leve
				Segunda		Mucosa jugal (E)	Excisional	Homogênea	8mm	Moderada
#7	Feminino	81	Tabagista	Primeira	15 dias	Palato duro	Incisional	Homogênea	50mm	Leve
				Segunda		Palato duro	Incisional	Homogênea	60mm	Moderada
#8	Feminino	63	Não tabagista	Primeira	21 dias	Ventre de língua	Excisional	Homogênea	30mm	Leve
				Segunda		Ventre de língua	Incisional	Heterogênea	8mm	Moderada
#9	Feminino	79	Tabagista	Primeira	20 dias	Ventre de língua	Incisional	Heterogênea	30mm	Leve
				Segunda		Ventre de língua	Excisional	Homogênea	20mm	Moderada
#10	Feminino	56	Tabagista	Primeira	20 dias	Mucosa jugal (D)	Excisional	Homogênea	20mm	Leve
				Segunda		Mucosa jugal (E)	Excisional	Homogênea	20mm	Moderada
#11	Feminino	48	Não tabagista	Primeira	34 meses	Mucosa jugal (D)	Incisional	Heterogênea	15mm	Moderada
				Segunda		Mucosa jugal (D)	Excisional	Heterogênea	10mm	Leve
#12	Masculino	63	Tabagista	Primeira	15 dias	Trigono retromolar (E)	Excisional	Homogênea	20mm	Moderada
				Segunda		Trigono retromolar (E)	Excisional	Homogênea	15mm	Leve
#13	Feminino	61	Não tabagista	Primeira	47 meses	Mucosa gengival	Excisional	Homogênea	15mm	Moderada
				Segunda		Mucosa gengival	Excisional	Homogênea	30mm	Leve
#14	Masculino	53	Tabagista	Primeira	29 meses	Mucosa labial	Excisional	Homogênea	25mm	Moderada
				Segunda		Mucosa labial	Excisional	Homogênea	10mm	Moderada
#15	Feminino	67	Tabagista	Primeira	24 meses	Mucosa gengival	Excisional	Homogênea	50mm	Leve
				Segunda		Mucosa gengival	Incisional	Homogênea	35mm	Acentuada
#16	Masculino	61	Tabagista	Primeira	4 meses	Mucosa jugal (D)	Incisional	Homogênea	30mm	Leve
				Segunda		Mucosa jugal (E)	Excisional	Homogênea	20mm	CCEB
#17	Feminino	43	Não tabagista	Primeira	36 meses	Palato mole	Incisional	Heterogênea	60mm	Acentuada
				Segunda		Palato mole	Incisional*	Heterogênea	100mm	CCEB

* As biópsias foram realizadas com fins de diagnóstico e sempre que possível foram do tipo excisional. Casos que revelaram diagnóstico histopatológico de CCEB foram referenciados para o serviço de cirurgia de cabeça e pescoço. (D) Lado direito; (E) Lado esquerdo.

Tabela 6: Alterações citológicas e arquiteturas observadas nas amostras de leucoplasia bucal.

Caso	Biópsias	Estratificação epitelial irregular	Perda da polaridade das células basais	Projeções epiteliais em forma de gota	Aumento do número de figuras mitóticas	Mitoses superficiais anormais	Ceratinização celular prematura	Presença de pérolas de ceratina	Alteração do tamanho nuclear e celular	Pleomorfismo nuclear e celular	Aumento da proporção núcleo / citoplasma	Núcleos aumentados de tamanho	Figuras de mitose atípicas	Núcleos numerosos e aumentados	Hiperplasia nuclear
#1	Primeira	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	Segunda	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
#2	Primeira	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
	Segunda	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
#3	Primeira	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
	Segunda	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
#4	Primeira	-	+	-	+	-	-	-	+	+	-	-	+	+	+
	Segunda	-	+	-	-	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
#5	Primeira	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
	Segunda	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	-	+
#6	Primeira	-	+	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
	Segunda	-	+	+	-	+	-	-	-	+	-	-	-	+	+
#7	Primeira	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	Segunda	-	+	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-	+	+
#8	Primeira	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	Segunda	+	-	+	+	-	-	-	+	+	+	+	+	+	+
#9	Primeira	-	+	-	+	-	-	-	+	+	+	+	-	+	+
	Segunda	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	+	-	+	+
#10	Primeira	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	+	-	+	+
	Segunda	-	+	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	+	+
#11	Primeira	-	+	-	+	-	-	-	-	+	+	+	-	+	+
	Segunda	-	+	-	-	-	-	-	-	-	+	-	-	-	-
#12	Primeira	-	+	-	+	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+
	Segunda	-	+	+	-	-	-	-	-	+	-	+	-	+	+
#13	Primeira	+	+	-	+	-	+	-	+	+	+	+	-	+	+
	Segunda	-	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+
#14	Primeira	-	+	+	-	-	-	-	+	-	-	+	-	+	+
	Segunda	-	+	+	+	-	-	-	+	+	-	-	-	-	+
#15	Primeira	+	+	-	-	-	+	-	-	+	+	+	-	+	+
	Segunda	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
#16	Primeira	-	+	+	-	-	-	-	-	-	-	-	-	+	+
	Segunda	CCEB	CCEB	CCEB	CCEB	CCEB	CCEB	CCEB	CCEB	CCEB	CCEB	CCEB	CCEB	CCEB	CCEB
#17	Primeira	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
	Segunda	CCEB	CCEB	CCEB	CCEB	CCEB	CCEB	CCEB	CCEB	CCEB	CCEB	CCEB	CCEB	CCEB	CCEB

(-) Ausente;(+) Presente; CCEB (carcinoma de células escamosas de boca)

5.2 DADOS MOLECULARES DE LOH

A LOH foi observada em 30 amostras em pelo menos um dos marcadores de microssatélites (os dados moleculares de LOH estão detalhados na tabela 7). A média de frequência de perda alélica (*FAL - frequency of allelic loss*) nas amostras foi de 38,6%, variando de 0,0% (#9) a 100,0% (#15). A distribuição dos eventos de LOH foi observada tanto nas displasias epiteliais leves, quanto nas moderadas e acentuadas, além de também ter sido identificada nas lesões de CCEB.

A FAL foi analisada nas duas biópsias de cada paciente separadamente. Foi observado que nos casos #1, #3, #5, #6, #12, #14, #15, #16 e #17 houve um aumento da FAL da primeira biópsia para a segunda. Nos casos #2, #7 e #13 houve a manutenção da FAL entre ambas as biópsias. Já os casos #4, #8, #10 e #11 apresentaram redução da FAL da primeira biópsia para a segunda. O caso #9 não apresentou LOH.

Interessantemente, os casos #6, #11, #12, #15, #16 e #17 apresentaram maior frequência de LOH nas amostras em que foi observado o aumento do grau de displasia epitelial, sendo que nos casos #16 e #17 as amostras de CCEB demonstraram maior FAL quando comparadas com a primeira biópsia diagnosticada como LB.

A análise revelou a presença de LOH em todos os marcadores microssatélites estudados, com exceção do marcador D3S1029. Os valores da FAL variaram de 0% a 59%, sendo que a frequência de perda alélica para cada marcador foi 31,2% (D3S1234), 35,7% (D3S1300), 0% (D3S1029), 50% (D3S1293), 54,1% (D9S171), 59% (D9S162), 52,9% (D9S157), 21,4% (D11S1883), 45% (D11S1369), 30,7% (AFM238WF2) e 38,4% (P53). Os marcadores que apresentaram maior porcentagem de FAL foram os D9S171, D9S162 e D9S157, localizados no braço curto do cromossomo 9.

Os marcadores D3S1293, D9S171, D9S162, D11S1369 e P53 apresentaram, simultaneamente, LOH em todos os casos de CCEB (segunda biópsia dos casos #16,

#17). Entretanto, a LOH desses marcadores também foi observada de forma isolada em outras amostras com displasias leves e moderadas, mas não simultânea. Curiosamente, na segunda biópsia do caso #3, que apresentou displasia epitelial leve, também foi observada a LOH nos marcadores D3S1293, D9S171, D9S162, D11S1369 e P53 com o mesmo perfil dos espécimes de carcinomas.

Tabela 7: Dados moleculares dos pacientes do presente estudo.

Casos	Biópsia	IHQ ki67 (%)	IHQ p53	Marcadores de microssatélites											FAL (%)
				D3S1234	D3S1300	D3S1029	D3S1293	D9S171	D9S162	D9S157	D11S1883	D11S1369	AFM238WF2	P53	
#1	Primeira	9.4	+	●	●	□	○	●	●	●	○	●	●	●	80,0
	Segunda	24.4	+	○	○	□	○	●	●	●	●	●	●	●	70,0
#2	Primeira	28.4	+	□	○	○	●	□	□	●	□	□	○	□	40,0
	Segunda	5.3	+	□	○	○	●	□	□	○	□	□	●	□	40,0
#3	Primeira	7.5	+	□	□	○	●	●	●	●	○	●	○	○	55,5
	Segunda	11.6	+	□	□	○	●	●	●	●	○	●	○	●	66,6
#4	Primeira	7.5	+	□	○	○	●	○	○	●	○	□	○	●	33,3
	Segunda	33.6	-	□	○	○	○	●	○	●	○	□	○	○	22,2
#5	Primeira	21.8	+	○	○	○	●	○	○	●	□	□	○	○	22,2
	Segunda	12.3	-	○	●	○	●	●	○	●	□	□	○	○	44,4
#6	Primeira	2.4	+	○	○	□	○	□	○	○	○	○	○	○	0,0
	Segunda	8.6	+	○	○	□	○	□	●	●	●	●	○	○	44,4
#7	Primeira	3.2	+	●	●	○	●	□	□	○	□	□	○	□	50,0
	Segunda	41.7	+	○	●	○	○	□	□	○	□	□	●	□	33,3
#8	Primeira	2.7	+	○	○	□	○	□	□	●	●	●	○	○	37,5
	Segunda	17.2	+	□	○	□	○	□	□	●	○	□	●	○	33,3
#9	Primeira	4.9	+	□	○	○	○	○	□	○	□	○	□	○	0,0
	Segunda	6.7	-	□	○	○	○	○	□	○	□	○	□	○	0,0
#10	Primeira	4.6	+	○	○	□	●	○	●	○	○	○	□	□	25,0
	Segunda	10.2	+	○	○	□	○	●	○	○	○	○	□	□	12,5
#11	Primeira	4.3	+	□	□	○	□	○	○	●	□	○	○	○	14,2
	Segunda	31.2	+	□	□	○	□	○	○	○	□	○	○	○	0,0
#12	Primeira	5.1	+	○	●	□	○	○	○	○	□	○	○	●	22,0
	Segunda	18.9	+	○	●	□	●	○	●	○	□	○	●	○	44,4
#13	Primeira	7.6	+	□	□	○	○	□	□	●	□	□	○	○	20,0
	Segunda	6.7	-	□	□	○	○	□	□	○	□	□	●	○	20,0

#14	Primeira	1.3	-	□	○	□	○	○	□	●	○	□	□	□	20,0
	Segunda	8.7	+	□	○	□	●	●	□	○	○	□	□	□	40,0
#15	Primeira	12.5	+	●	○	□	●	●	●	○	□	□	○	●	62,5
	Segunda	18.5	-	●	●	□	●	●	●	●	□	□	●	●	100,0
#16	Primeira	21.4	+	□	○	○	○	●	●	●	□	○	□	○	37,5
	Segunda	9.7	-	□	○	○	●	●	●	○	□	●	□	●	62,5
#17	Primeira	13.5	+	○	○	□	●	○	●	●	□	●	○	●	66,6
	Segunda	23.4	+	●	○	□	●	●	●	○	□	●	○	●	66,6
FAL (%)				31,2	35,7	0,0	50,0	54,1	59	52,9	21,4	45	30,7	38,4	

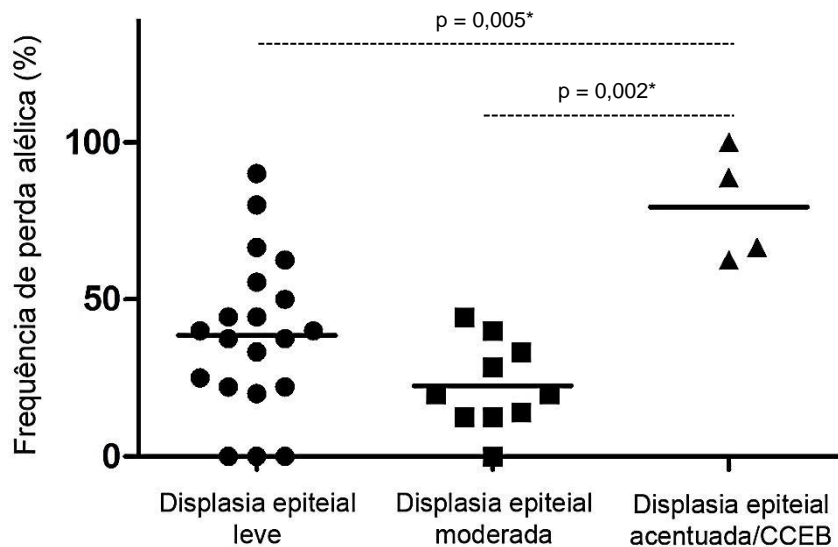
(○) Retenção dos alelos; (□) Não informativo; (●) LOH ; FAL (frequência de perda alélica); CCEB (carcinoma de células escamosas de boca)

5.3 DADOS MOLECULARES, CLÍNICOS E HISTOPATOLÓGICOS

Foi analisada a associação entre a LOH de cada um dos marcadores estudados e as alterações citológicas e arquiteturais do epitélio, apresentação clínica das lesões (homogênea/heterogênea), sítio de acometimento das lesões (alto/baixo risco), tamanho da lesão, hábito tabagista e imuno positividade para as proteínas p53 e ki67. Adicionalmente, foi testada a associação entre a FAL e as alterações citológicas e arquiteturais do epitélio, apresentação clínica das lesões (homogênea/heterogênea), sítio de acometimento das lesões (alto/baixo risco), tamanho da lesão, hábito tabagista e imuno positividade para as proteínas p53 e ki67.

A partir dessas análises, foi possível observar a associação entre a graduação histopatológica dos espécimes e a FAL ($p < 0,05$), na qual o aumento da frequência de perda alélica foi associado à displasia acentuada e CCEB (Figura 11).

Figura 11: Representação gráfica da distribuição da porcentagem da frequência de perda alélica em relação com a graduação histopatológica das amostras de leucoplasia (n=34).



* teste Mann-Whitney

Nas amostras de leucoplasia (n=32) foi testada a associação entre a LOH dos diferentes marcadores e as alterações citológicas e arquiteturais das displasias. Observou-se que a presença de projeções em forma de gota foi associada à LOH no marcador D9S162 (p=0,012). A presença de ceratinização celular prematura foi associada à LOH no marcador P53 (p=0,028). A presença de núcleos aumentados de tamanho foi associada à LOH no marcador D9S171 (p=0,043). A presença de nucléolos numerosos e aumentados foi associada à LOH no marcador D9S162 (p=0,026). Adicionalmente a esses resultados, o aumento da porcentagem da frequência de perda alélica foi associado à presença de mitoses superficiais anormais (p=0,028).

5.4 IMUNOHISTOQUÍMICA

Os resultados da imunohistoquímica estão apresentados na tabela 7. A expressão de p53 e ki67 foi detectada na maioria dos casos nas camadas basal/parabasal e suprabasal. Apenas uma amostra para p53 (primeira biópsia do caso #9) e duas amostras para ki67 (segunda biópsia do caso #2 e primeira biópsia do caso #8) apresentaram expressão das proteínas restrita nas camadas basal e parabasal. Esses casos exibiram displasia epitelial leve. Vinte e sete amostras (79,4%) foram positivas para p53, independentemente do grau de displasia. A positividade para p53 não foi associada a LOH em nenhum dos marcadores. Contudo, a imuno positividade de p53 foi associada à presença de alterações do tamanho nuclear (p=0,043).

A porcentagem de núcleos positivos ki67 variou de 1,3% a 41,7%. O aumento de ki67 foi associado às lesões heterogêneas nas amostras da segunda biópsia dos pacientes (ver item 5.4). Em adição, não houve diferença estatística entre o percentual de positividade ki67 e os diferentes graus de displasia. Todavia, foi possível observar o

aumento gradativo do número de células positivas, na medida em que o grau de displasia aumentava.

DISCUSSÃO

6. DISCUSSÃO

A leucoplasia bucal é a principal lesão cancerizável da boca e representa cerca de 80% de todas as lesões com potencial de malignização da cavidade bucal (Bouquot 1991; Bouquot 1994; Barnes, Eveson et al. 2005). As taxas de transformação maligna das leucoplasias variam de 2,4% a 36%. Contudo, os fenômenos que propiciam a malignização ainda não são conhecidos.

Atualmente, os aspectos clínicos das lesões associados aos achados histopatológicos são os principais parâmetros utilizados para a indicação de possibilidade de transformação maligna da leucoplasia bucal (Jiang, Fujii et al. 2001; Reibel 2003; Tilakaratne, Sherriff et al. 2011). Todavia, nem todas as leucoplasias que apresentam displasias epiteliais irão sofrer transformação maligna. A literatura descreve que cerca de 15% das lesões leucoplásicas que sofrem a transformação maligna não possuem atipias celulares (Silverman, Gorsky et al. 1984; Silverman, Gorsky et al. 1996). Assim, é importante ressaltar que a graduação histopatológica não é capaz de prever quais lesões vão sofrer ou não transformação maligna.

Nesse contexto, fica claro que o atual modelo de predição do comportamento biológico destas lesões é frágil e não traduz com eficiência e objetividade a evolução das LB. A caracterização dos eventos genéticos na leucoplasia pode permitir a definição das lesões que demonstram comportamento clínico mais agressivo, o que pode impactar em estratégias de prognóstico e tratamento das lesões. Além disso, estudos gênicos e moleculares podem fornecer informações adicionais ao modelo de graduação das displasias quando combinados às características clínicas e histopatológicas (Califano, Westra et al. 2000; Bloching, Barnes et al. 2007).

Diversos estudos têm demonstrado que alterações genéticas como a LOH em regiões próximas a genes supressores de tumor estão presentes nas leucoplasias e

poderiam ser capazes de prever o comportamento biológico dessas lesões (Mao, Lee et al. 1996; Califano, Westra et al. 2000; Rosin, Cheng et al. 2000; Zhang & Rosin 2001; Zhang, Cao et al. 2010; Cavenee 2012). Nesse sentido, o presente estudo investigou a LOH em marcadores de microssatélites localizados nas regiões cromossômicas 3p, 9p, 11p, 11q e 17p em amostras de LB, com foco nas alterações citológicas e arquiteturais do epitélio das lesões, bem como com os dados clínicos dos pacientes.

Ha e colaboradores (2002) relataram que as alterações genéticas em microssatélites aumentam na medida em que as displasias celulares do epitélio se tornam mais graves, além de potencializar os eventos de transformação maligna (Ha, Pilkington et al. 2002). Esse achado pode ser identificado no presente estudo tendo em vista que o aumento da FAL foi observado nas amostras que apresentaram displasias celulares acentuadas e nos carcinomas. Esse achado sugere que o aumento da LOH pode estar relacionado com a transformação maligna da leucoplasia. No entanto, apesar das alterações gênicas estarem associadas às displasias epiteliais mais exuberantes, ainda não foi possível identificar se estes fenômenos ocorrem como causa ou consequência do comportamento biológico das lesões.

O aumento da frequência de perdas alélicas nas displasias acentuadas pode sugerir o comportamento genético instável dessas lesões, o que, conseqüentemente, poderia ser refletido no padrão histopatológico desorganizado do tecido. Contudo, é importante salientar que em algumas lesões com displasia epitelial leve foram percebidas perdas alélicas superiores a 70%, semelhantes aos casos de displasias acentuadas e de carcinomas. Nesses casos, a literatura suporta que o aumento de LOH pode estar relacionado com o aumento do risco de transformação maligna, independentemente da graduação histopatológica das displasias (Califano, van der Riet

et al. 1996; Califano, Westra et al. 2000; Rosin, Cheng et al. 2000; Zhang & Rosin 2001; Rosin, Lam et al. 2002; Zhang, Cao et al. 2010).

Nas amostras de CCEB foi observado LOH nas regiões cromossômicas 3p, 9p, 11q e 17p, diferentemente da maioria das amostras de LB, com exceção de um espécime. Esse achado pode sugerir um padrão diferencial de LOH entre a leucoplasia e o carcinoma. Entretanto, não foi encontrado nenhum perfil de LOH que pudesse prever a transformação maligna das lesões.

A displasia epitelial da LB é classificada com base nas alterações citológicas e arquiteturais do epitélio. No entanto, não se sabe quais alterações moleculares estão associados a cada um dos parâmetros utilizados para graduar a displasia. No presente trabalho observou-se que a LOH nos marcadores de microssatélites D9S162, D9S171 e P53 localizados nas regiões 9p e 17p foi associada a alterações citológicas e arquiteturais do epitélio. Estes resultados indicam que pode haver um perfil molecular para cada anormalidade citológica e arranjo arquitetural da displasia.

O presente estudo é o primeiro trabalho da literatura que descreve a associação de LOH a alterações citológicas e arquiteturais do epitélio em leucoplasias. Esses achados sugerem que a LOH dos marcadores D9S162, D9S171 e P53 parecem ser importantes na determinação das alterações histopatológicas das displasias. As associações encontradas configuram partes de um padrão molecular característico das alterações citológicas e arquiteturais que precisa ser mais estudado.

A imuno detecção da proteína p53 foi observada em mais de 75% das amostras analisadas. Além disso, a positividade da p53 foi associada com a presença de alterações do tamanho nuclear. Tais achados sugerem uma possível acumulação da p53 pelas células epiteliais que compõem o quadro de displasia. A proteína p53 detectada nas camadas suprabasais reflete um processo de instabilidade celular funcional que pode

ser interpretado como uma resposta celular frente ao dano genético irreversível. Além disso, o acúmulo da p53 pode indicar a presença de proliferação de células com danos no DNA (Cruz, 1998). Alternativamente, a acumulação da p53 também pode ocorrer em resposta ao stress celular resultando na estabilização da proteína no núcleo da célula (Cox 2012; Gomes, Diniz et al. 2012; Gomes, Fonseca-Silva et al. 2013).

Outra proteína avaliada neste estudo foi a ki67, que é uma molécula relacionada com a proliferação celular. A literatura relata que a detecção e quantificação das células em proliferação, através da avaliação da ki67, constituem parâmetros importantes na caracterização de diversas neoplasias, como carcinoma de pulmão, mama, cabeça e pescoço. Recentemente, inclusive, os índices proliferativos vêm sendo estudado em lesões cancerizáveis (Liu, Lawson et al. 2003; Angiero, Berenzi et al. 2008; Colozza, Sidoni et al. 2010; Ciancio, Galasso et al. 2012).

Adicionalmente, a literatura sugere que o aumento da ki67 está associado à LOH nas regiões 3p, 9p e 17p (Tabor, Braakhuis et al. 2003; Dwivedi, Chandra et al. 2013). Contudo, a imuno positividade da ki67 não foi associada à LOH em nenhum dos marcadores estudados no presente trabalho. Essa contra posição de resultados pode refletir diferenças importantes nos desenhos dos estudos bem como as limitações amostrais. Todavia, o estudo de proliferação associado com as alterações genéticas, como a LOH, constituem importantes passos na elucidação do comportamento biológico das leucoplasias.

CONCLUSÕES

7. CONCLUSÕES

A partir da análise dos dados, pôde-se concluir que:

1. A LOH dos marcadores de microssatélites das regiões cromossômicas 3p, 9p, 11p, 11q e 17p foi um evento identificado nas amostras de LB;
2. Os marcadores localizados no braço curto do cromossomo 9 (D9S157, D9S162, D9S171) apresentaram maior frequência de perda alélica nas amostras estudadas;
3. O aumento da porcentagem da FAL foi identificado nas amostras que apresentaram displasia epitelial acentuada e nos carcinomas;
4. A LOH dos marcadores D9S162, D9S171 e P53 apresentou associação com alterações citológicas e arquiteturais do epitélio das LB.
5. Os dados moleculares de LOH não foram associados aos dados clínicos dos pacientes;
6. A imunopositividade da proteína p53 apresentou associação com a presença de alterações do tamanho nuclear do epitélio das displasias.

Tendo em vista a complexidade dos processos relacionados com o comportamento biológico das leucoplasias bucais, assim como a dos fenômenos que norteiam a gênese do câncer de boca, mais estudos são necessários para melhor compreensão da etiopatogênese dessas lesões.

REFERÊNCIAS

8. REFERÊNCIAS

- Abbey, L. M., G. E. Kaugars, et al. (1998). "The effect of clinical information on the histopathologic diagnosis of oral epithelial dysplasia." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **85**(1): 74-77.
- Abbey, L. M., G. E. Kaugars, et al. (1995). "Intraexaminer and interexaminer reliability in the diagnosis of oral epithelial dysplasia." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **80**(2): 188-191.
- Angiero, F., A. Berenzi, et al. (2008). "Expression of p16, p53 and Ki-67 proteins in the progression of epithelial dysplasia of the oral cavity." Anticancer Res **28**(5A): 2535-2539.
- Arai, K., T. Shibahara, et al. (2002). "The presence of candidate tumor suppressor gene loci at chromosome 3p for oral squamous cell carcinomas." Oral Oncol. **38**(8): 763-771.
- Ashazila, M. J., T. P. Kannan, et al. (2011). "Microsatellite instability and loss of heterozygosity in oral squamous cell carcinoma in Malaysian population." Oral Oncol **47**(5): 358-364.
- Axell, T., J. J. Pindborg, et al. (1996). "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 **25**(2): 49-54.
- Bagan, J. V., Y. Jimenez-Soriano, et al. (2011). "Malignant transformation of proliferative verrucous leukoplakia to oral squamous cell carcinoma: a series of 55 cases." Oral Oncol **47**(8): 732-735.
- Banoczy, J. and L. Sugar (1972). "Longitudinal studies in oral leukoplakias." J Oral Pathol **1**(6): 265-272.
- Banoczy, J. and L. Sugar (1975). "Progressive and regressive changes in Hungarian oral leukoplakias in the course of longitudinal studies." Community Dent Oral Epidemiol **3**(4): 194-197.
- Barnes, L., J. W. Eveson, et al. (2005). World Health Organizations Classification of Tumour. Pathology & Genetics of Head and Neck Tumours. Lyon, IARC Press.
- Berger, A. H., A. G. Knudson, et al. (2011). "A continuum model for tumour suppression." Nature **476**(7359): 163-169.
- Bloching, M. B., J. Barnes, et al. (2007). "Saliva as a biomarker for head and neck squamous cell carcinoma: in vitro detection of cytotoxic effects by using the plating efficiency index." Oncol Rep **18**(6): 1551-1556.
- Boland, C. R. and A. Goel (2010). "Microsatellite instability in colorectal cancer." Gastroenterology **138**(6): 2073-2087 e2073.

- Boland, C. R., S. N. Thibodeau, et al. (1998). "A National Cancer Institute Workshop on Microsatellite Instability for cancer detection and familial predisposition: development of international criteria for the determination of microsatellite instability in colorectal cancer." Cancer Res **58**(22): 5248-5257.
- Bouquot, J. E. (1991). "Reviewing oral leukoplakia: clinical concepts for the 1990s." J Am Dent Assoc **122**(6): 80-82.
- Bouquot, J. E. (1994). "Oral leukoplakia and erythroplakia: a review and update." Pract Periodontics Aesthet Dent **6**(6): 9-17; quiz 19.
- Bouquot, J. E. and S. B. Whitaker (1994). "Oral leukoplakia--rationale for diagnosis and prognosis of its clinical subtypes or "phases"." Quintessence Int **25**(2): 133-140.
- Boyle, J. O., J. Hakim, et al. (1993). "The incidence of p53 mutations increases with progression of head and neck cancer." Cancer Res **53**(19): 4477-4480.
- Bremmer, J. F., B. J. Braakhuis, et al. (2008). "Comparative evaluation of genetic assays to identify oral pre-cancerous fields." J Oral Pathol Med **37**(10): 599-606.
- Brennan, M., C. A. Migliorati, et al. (2007). "Management of oral epithelial dysplasia: a review." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **103** **Suppl**: S19 e11-12.
- Califano, J., P. van der Riet, et al. (1996). "Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization." Cancer Res **56**(11): 2488-2492.
- Califano, J., W. H. Westra, et al. (2000). "Genetic progression and clonal relationship of recurrent premalignant head and neck lesions." Clin Cancer Res **6**(2): 347-352.
- Cavenee, W. K. (2012). "Genetic driver events in premalignancy: LOH validated for marking the risk of oral cancer." Cancer Prev Res (Phila) **5**(9): 1073-1074.
- Chen, Y. J., J. T. Chang, et al. (2008). "Head and neck cancer in the betel quid chewing area: recent advances in molecular carcinogenesis." Cancer Sci **99**(8): 1507-1514.
- Choi, S. and J. N. Myers (2008). "Molecular pathogenesis of oral squamous cell carcinoma: implications for therapy." J Dent Res **87**(1): 14-32.
- Ciancio, N., M. G. Galasso, et al. (2012). "Prognostic value of p53 and Ki67 expression in fiberoptic bronchial biopsies of patients with non small cell lung cancer." Multidiscip Respir Med **7**(1): 29.
- Colozza, M., A. Sidoni, et al. (2010). "Value of Ki67 in breast cancer: the debate is still open." Lancet Oncol **11**(5): 414-415.
- Cox, D. P. (2012). "p53 expression and mutation analysis of odontogenic cysts with and without dysplasia." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol **113**(1): 90-98.

- Dwivedi, N., S. Chandra, et al. (2013). "Suprabasal expression of Ki-67 as a marker for the severity of oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma." Contemp Clin Den **4**(1): 7-12.
- Einhorn, J. and J. Wersall (1967). "Incidence of oral carcinoma in patients with leukoplakia of the oral mucosa." Cancer **20**(12): 2189-2193.
- Field, J. K., H. Kiaris, et al. (1995). "Allelotype of squamous cell carcinoma of the head and neck: fractional allele loss correlates with survival." Br J Cancer **72**(5): 1180-1188.
- Fonseca-Silva, T., L. C. Farias, et al. (2012). "Analysis of p16(CDKN2A) methylation and HPV-16 infection in oral mucosal dysplasia." Pathobiology **79**(2): 94-100.
- Fowler, M. H., J. Fowler, et al. (2006). "Malignant mixed tumors of the salivary gland: a study of loss of heterozygosity in tumor suppressor genes." Mod Pathol **19**(3): 350-355.
- Galvao, C. F., C. C. Gomes, et al. (2012). "Loss of heterozygosity (LOH) in tumour suppressor genes in benign and malignant mixed odontogenic tumours." J Oral Pathol Med **41**(5): 389-393.
- Giaretti, W., M. Maffei, et al. (2012). "Genomic aberrations in normal appearing mucosa fields distal from oral potentially malignant lesions." Cell Oncol (Dordr) **35**(1): 43-52.
- Gomes, C. C., M. G. Diniz, et al. (2012). "Assessment of TP53 mutations in benign and malignant salivary gland neoplasms." PLoS One **7**(7): e41261.
- Gomes, C. C., T. Fonseca-Silva, et al. (2013). "Evidence for loss of heterozygosity (LOH) at chromosomes 9p and 17p in oral granular cell tumors: a pilot study " Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology **115**(2): 249-253.
- Gomes, C. C., T. Fonseca-Silva, et al. (2013). "Predicting progression of oral dysplasia-letter." Cancer Prev Res (Phila) **6**(6): 614-615.
- Gonzales-Moles, M. A., A. Rodriguez-Archilla, et al. (2002). "p16 Expression in squamous carcinomas of the tongue." Onkologie **25**(5): 433-436.
- Guillaud, M., L. Zhang, et al. (2008). "Potential use of quantitative tissue phenotype to predict malignant risk for oral premalignant lesions." Cancer Res. **68**(9): 3099-3107.
- Ha, P. K., T. A. Pilkington, et al. (2002). "Progression of microsatellite instability from premalignant lesions to tumors of the head and neck." Int J Cancer **102**(6): 615-617.
- Holmstrup, P., P. Vedtofte, et al. (2007). "Oral premalignant lesions: is a biopsy reliable?" J Oral Pathol Med **36**(5): 262-266.

- Hsue, S. S., W. C. Wang, et al. (2007). "Malignant transformation in 1458 patients with potentially malignant oral mucosal disorders: a follow-up study based in a Taiwanese hospital." J.Oral Pathol.Med. **36**(1): 25-29.
- Hsue, S. S., W. C. Wang, et al. (2007). "Malignant transformation in 1458 patients with potentially malignant oral mucosal disorders: a follow-up study based in a Taiwanese hospital." J Oral Pathol Med **36**(1): 25-29.
- Jiang, W. W., H. Fujii, et al. (2001). "Accumulative increase of loss of heterozygosity from leukoplakia to foci of early cancerization in leukoplakia of the oral cavity." Cancer **92**(9): 2349-2356.
- Kademani, D. (2007). "Oral cancer." Mayo Clin Proc **82**(7): 878-887.
- Karabulut, A., J. Reibel, et al. (1995). "Observer variability in the histologic assessment of oral premalignant lesions." J Oral Pathol Med **24**(5): 198-200.
- Kaugars, G. E., S. Silverman, Jr., et al. (1996). "Use of antioxidant supplements in the treatment of human oral leukoplakia." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **81**(1): 5-14.
- King, G. N., C. M. Healy, et al. (1994). "Prevalence and risk factors associated with leukoplakia, hairy leukoplakia, erythematous candidiasis, and gingival hyperplasia in renal transplant recipients." Oral Surg Oral Med Oral Pathol **78**(6): 718-726.
- Knudson, A. G., Jr. (1971). "Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma." Proc Natl Acad Sci U S A **68**(4): 820-823.
- Knudson, A. G., Jr., A. T. Meadows, et al. (1976). "Chromosomal deletion and retinoblastoma." N Engl J Med **295**(20): 1120-1123.
- Kollar, H. A., Jr., C. W. Finley, et al. (1954). "Leukoplakia." J Am Dent Assoc **49**(5): 538-548.
- Kollar, J. A., Jr., C. W. Finley, et al. (1954). "Leukoplakia." J.Am.Dent.Assoc **49**: 538-548.
- Kujan, O., A. Khattab, et al. (2007). "Why oral histopathology suffers inter-observer variability on grading oral epithelial dysplasia: an attempt to understand the sources of variation." Oral Oncol **43**(3): 224-231.
- Kujan, O., R. J. Oliver, et al. (2006). "Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation." Oral Oncol **42**(10): 987-993.
- Kumar, V., A. K. Abbas, et al. (2007). Robbins Basic Pathology, Elsevier Health Sciences.
- Lai, D., S. Visser-Grieve, et al. (2012). "Tumour suppressor genes in chemotherapeutic drug response." Biosci Rep **32**(4): 361-374.

- Lee, J. J., H. C. Hung, et al. (2006). "Carcinoma and dysplasia in oral leukoplakias in Taiwan: prevalence and risk factors." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **101**(4): 472-480.
- Li, T., N. Kon, et al. (2012). "Tumor suppression in the absence of p53-mediated cell-cycle arrest, apoptosis, and senescence." Cell **149**(6): 1269-1283.
- Li, Y. C., A. B. Korol, et al. (2002). "Microsatellites: genomic distribution, putative functions and mutational mechanisms: a review." Mol Ecol **11**(12): 2453-2465.
- Li, Y. C., A. B. Korol, et al. (2004). "Microsatellites within genes: structure, function, and evolution." Mol Biol Evol **21**(6): 991-1007.
- Lind, P. O. (1987). "Malignant transformation in oral leukoplakia." Scand J Dent Res **95**(6): 449-455.
- Liu, M., G. Lawson, et al. (2003). "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 **25**(4): 280-288.
- Lodi, G., A. Sardella, et al. (2006). "Interventions for treating oral leukoplakia." Cochrane Database Syst Rev(4): CD001829.
- Lu, R., H. Dan, et al. (2011). "Lycopene: features and potential significance in the oral cancer and precancerous lesions." J Oral Pathol Med **40**(5): 361-368.
- Lumerman, H., P. Freedman, et al. (1995). "Oral epithelial dysplasia and the development of invasive squamous cell carcinoma." Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod **79**(3): 321-329.
- Malumbres, M. and M. Barbacid (2009). "Cell cycle, CDKs and cancer: a changing paradigm." Nat Rev Cancer **9**(3): 153-166.
- Mao, L., J. S. Lee, et al. (1996). "Frequent microsatellite alterations at chromosomes 9p21 and 3p14 in oral premalignant lesions and their value in cancer risk assessment." Nat. Med **2**(6): 682-685.
- Martorell-Calatayud, A., R. Botella-Estrada, et al. (2009). "[Oral leukoplakia: clinical, histopathologic, and molecular features and therapeutic approach]." Actas Dermosifiliogr **100**(8): 669-684.
- Migaldi, M., G. Sartori, et al. (2008). "Tumor cell proliferation and microsatellite alterations in human ameloblastoma." Oral Oncol **44**(1): 50-60.
- Napier, S. S. and P. M. Speight (2008). "Natural history of potentially malignant oral lesions and conditions: an overview of the literature." J Oral Pathol Med **37**(1): 1-10.
- NatureEducation. (2010). "The eukaryotic cell cycle (<http://www.nature.com/scitable/topicpage/eukaryotes-and-cell-cycle-14046014>)."

- Pindborg, J. J. (1971). "Oral leukoplakia." Aust Dent J **16**(2): 83-93.
- Pindborg, J. J., O. Jolst, et al. (1968). "Studies in oral leukoplakia: a preliminary report on the period prevalence of malignant transformation in leukoplakia based on a follow-up study of 248 patients." J Am Dent Assoc **76**(4): 767-771.
- Pindborg, J. J., F. S. Mehta, et al. (1975). "Incidence of oral cancer among 30,000 villagers in india in a 7-year follow-up study of oral precancerous lesions." Community Dent Oral Epidemiol **3**(2): 86-88.
- Pindborg, J. J., P. A. Reichart, et al. (1997). "World Health Organization International Histological Classification of Tumours. Histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa." Berlin: Springer.
- Pitiyage, G., W. M. Tilakaratne, et al. (2009). "Molecular markers in oral epithelial dysplasia: review." J Oral Pathol Med **38**(10): 737-752.
- Pitot, H. C. (1991). "Endogenous carcinogenesis: the role of tumor promotion." Proc Soc Exp Biol Med **198**(2): 661-666.
- Pitot, H. C. (1993). "Multistage carcinogenesis--genetic and epigenetic mechanisms in relation to cancer prevention." Cancer Detect Prev **17**(6): 567-573.
- Pitot, H. C. and Y. P. Dragan (1991). "Facts and theories concerning the mechanisms of carcinogenesis." FASEB J **5**(9): 2280-2286.
- Reibel, J. (2003). "Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics." Crit Rev Oral Biol Med **14**(1): 47-62.
- Reichart, P. A. and H. P. Philipsen (2005). "Oral erythroplakia--a review." Oral Oncol **41**(6): 551-561.
- Rentstrup, G. (1954). "Leukoplakia of the oral cavity. A clinical and histopathologic study." Acta Odontol.Scand **16**: 99-111.
- Rhodus, N. L. (2005). "Oral cancer: leukoplakia and squamous cell carcinoma." Dent Clin North Am **49**(1): 143-165, ix.
- Romana, P. G. (2010). "WITHDRAWN: Cell alterations and molecular mechanisms in oral carcinogenesis." Int J Oral Maxillofac Surg.
- Rosin, M. P., X. Cheng, et al. (2000). "Use of allelic loss to predict malignant risk for low-grade oral epithelial dysplasia." Clin Cancer Res. **6**(2): 357-362.
- Rosin, M. P., W. L. Lam, et al. (2002). "3p14 and 9p21 loss is a simple tool for predicting second oral malignancy at previously treated oral cancer sites." Cancer Res **62**(22): 6447-6450.
- Rowley, H., A. Jones, et al. (1996). "Definition of a tumor suppressor gene locus on the short arm of chromosome 3 in squamous cell carcinoma of the head and neck by

- means of microsatellite markers." Arch Otolaryngol Head Neck Surg **122**(5): 497-501.
- Sankaranarayanan, R., B. Mathew, et al. (1997). "Chemoprevention of oral leukoplakia with vitamin A and beta carotene: an assessment." Oral Oncol **33**(4): 231-236.
- Schafer, K. A. (1998). "The cell cycle: a review." Vet Pathol **35**(6): 461-478.
- Schepman, K. P., E. H. van der Meij, et al. (1998). "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 **34**(4): 270-275.
- Silverman, S., Jr., M. Gorsky, et al. (1996). "Leukoplakia, dysplasia, and malignant transformation." Oral Surg.Oral Med.Oral Pathol.Oral Radiol.Endod. **82**(2): 117.
- Silverman, S., Jr., M. Gorsky, et al. (1984). "Oral leukoplakia and malignant transformation. A follow-up study of 257 patients." Cancer **53**(3): 563-568.
- Smith, J., T. Rattay, et al. (2009). "Biomarkers in dysplasia of the oral cavity: a systematic review." Oral Oncol. **45**(8): 647-653.
- Souza, L. R., T. Fonseca-Silva, et al. (2011). "Immunohistochemical analysis of p53, APE1, hMSH2 and ERCC1 proteins in actinic cheilitis and lip squamous cell carcinoma." Histopathology **58**(3): 352-360.
- Speight, P. M. (2007). "Update on oral epithelial dysplasia and progression to cancer." Head Neck Pathol **1**(1): 61-66.
- Tabor, M. P., B. J. Braakhuis, et al. (2003). "Comparative molecular and histological grading of epithelial dysplasia of the oral cavity and the oropharynx." J Pathol **199**(3): 354-360.
- Tabor, M. P., R. H. Brakenhoff, et al. (2002). "Multiple head and neck tumors frequently originate from a single preneoplastic lesion." Am J Pathol **161**(3): 1051-1060.
- Tanaka, T. and R. Ishigamori (2011). "Understanding carcinogenesis for fighting oral cancer." J Oncol **2011**: 603740.
- Thiagalingam, S., S. Laken, et al. (2001). "Mechanisms underlying losses of heterozygosity in human colorectal cancers." Proc Natl Acad Sci U S A **98**(5): 2698-2702.
- Tilakaratne, W. M., M. Sherriff, et al. (2011). "Grading oral epithelial dysplasia: analysis of individual features." J Oral Pathol Med **40**(7): 533-540.
- van der Waal, I. (2009). "Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management." Oral Oncol **45**(4-5): 317-323.
- van der Waal, I., K. P. Schepman, et al. (2000). "A modified classification and staging system for oral leukoplakia." Oral Oncol **36**(3): 264-266.

- van der Waal, I., K. P. Schepman, et al. (1997). "Oral leukoplakia: a clinicopathological review." Oral Oncol **33**(5): 291-301.
- van der Waal, I. and C. Scully (2011). "Oral cancer: comprehending the condition, causes, controversies, control and consequences. 4. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa." Dent Update **38**(2): 138-140.
- van, d. W. I., K. P. Schepman, et al. (2000). "A modified classification and staging system for oral leukoplakia." Oral Oncol. **36**(3): 264-266.
- van Houten, V. M., M. P. Tabor, et al. (2000). "Molecular assays for the diagnosis of minimal residual head-and-neck cancer: methods, reliability, pitfalls, and solutions." Clin Cancer Res **6**(10): 3803-3816.
- Velasco, A., J. Pallares, et al. (2008). "Loss of heterozygosity in endometrial carcinoma." Int J Gynecol Pathol **27**(3): 305-317.
- Vermeulen, K., D. R. Van Bockstaele, et al. (2003). "The cell cycle: a review of regulation, deregulation and therapeutic targets in cancer." Cell Prolif **36**(3): 131-149.
- Waldron, C. A. and W. G. Shafer (1975). "Leukoplakia revisited. A clinicopathologic study 3256 oral leukoplakias." Cancer **36**(4): 1386-1392.
- Warnakulasuriya, S., N. W. Johnson, et al. (2007). "Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa." J Oral Pathol Med **36**(10): 575-580.
- Warnakulasuriya, S., J. Reibel, et al. (2008). "Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement." J.Oral Pathol.Med. **37**(3): 127-133.
- Wistuba, II and M. Meyerson (2008). "Chromosomal deletions and progression of premalignant lesions: less is more." Cancer Prev Res (Phila) **1**(6): 404-408.
- Zhang, L., K. J. Cheung, Jr., et al. (2001). "Increased genetic damage in oral leukoplakia from high risk sites: potential impact on staging and clinical management." Cancer **91**(11): 2148-2155.
- Zhang, L., C. F. Poh, et al. (2012). "Loss of heterozygosity (LOH) profiles--validated risk predictors for progression to oral cancer." Cancer Prev Res (Phila) **5**(9): 1081-1089.
- Zhang, L. and M. P. Rosin (2001). "Loss of heterozygosity: a potential tool in management of oral premalignant lesions?" J.Oral Pathol.Med **30**(9): 513-520.
- Zhang, Y., H. Cao, et al. (2010). "Loss of chromosome 9p21 and decreased p16 expression correlate with malignant gastrointestinal stromal tumor." World J Gastroenterol **16**(37): 4716-4724.

ANEXOS

9.1 ANEXOS I



**UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP**

Projeto: CAAE – 0499.0.203.000-11

**Interessado(a): Prof. Ricardo Santiago Gomez
Depto. de Clínica, Patologia e Cirurgia Odontológicas
Faculdade de Odontologia - UFMG**

DECISÃO

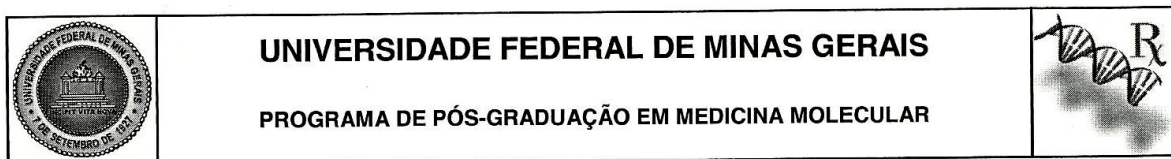
O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 26 de outubro de 2011, o projeto de pesquisa intitulado "**Estudo da perda de heterozigosidade em regiões associadas a genes supressores de tumor e o grau de displasia e de transformação maligna das leucoplasias bucais**" bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.

A handwritten signature in black ink, appearing to read "Maria Teresa Marques Amaral", is written over a horizontal line.

**Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG**

9.2 ANEXO II



ATA DA DEFESA DE TESE DO ALUNO **THIAGO FONSECA SILVA**

Realizou-se, no dia 16 de agosto de 2013, às 14:00 horas, Faculdade de Odontologia UFMG; Sala de Defesa de Tese (3402), da Universidade Federal de Minas Gerais, a defesa de tese, intitulada **Estudo da perda de heterozigosidade em regiões de genes supressores de tumor e sua associação com alterações morfológicas e grau de displasia epitelial em leucoplasias bucais**, apresentada por **THIAGO FONSECA SILVA**, número de registro 2010727430, graduado no curso de ODONTOLOGIA, como requisito parcial para a obtenção do grau de Doutor em MEDICINA MOLECULAR, à seguinte Comissão Examinadora: Prof(a). Carolina Cavalieri Gomes - Orientador (Universidade Federal de Minas Gerais), Prof(a). Ricardo Santiago Gomez (Universidade Federal de Minas Gerais), Prof(a). Ricardo Alves Mesquita (Universidade Federal de Minas Gerais), Prof(a). Alfredo Maurício Batista de Paula (UNIMONTES), Prof(a). Andre Luiz Sena Guimaraes (Unimontes), Prof(a). Marina Gonçalves Diniz (UFMG).

A Comissão considerou a tese:

- Aprovada
 Aprovada condicionalmente, sujeita a alterações, conforme folha de modificações, anexa
 Reprovada

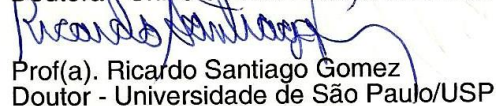
Finalizados os trabalhos, lavrei a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos membros da Comissão.

Belo Horizonte, 16 de agosto de 2013.



Prof(a). Carolina Cavalieri Gomes

Doutora - Universidade Federal de Minas Gerais



Prof(a). Ricardo Santiago Gomez

Doutor - Universidade de São Paulo/USP



Prof(a). Ricardo Alves Mesquita

Doutor - Universidade de São Paulo



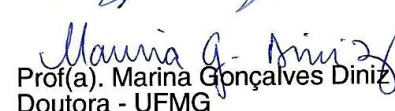
Prof(a). Alfredo Mauricio Batista de Paula

Doutor - Universidade Federal de Minas Gerais-UFMG



Prof(a). Andre Luiz Sena Guimaraes

Doutor - UFMG



Prof(a). Marina Gonçalves Diniz

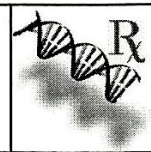
Doutora - UFMG

9.2 ANEXO III



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM MEDICINA MOLECULAR



FOLHA DE APROVAÇÃO

Estudo da perda de heterozigossidade em regiões de genes supressores de tumor e sua associação com alterações morfológicas e grau de displasia epitelial em leucoplasias bucais

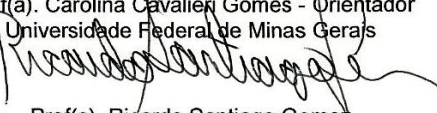
THIAGO FONSECA SILVA

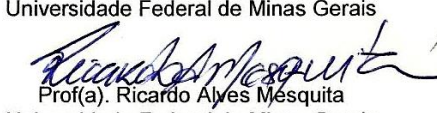
Tese submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em MEDICINA MOLECULAR, como requisito para obtenção do grau de Doutor em MEDICINA MOLECULAR, área de concentração MEDICINA MOLECULAR.

Aprovada em 16 de agosto de 2013, pela banca constituída pelos membros:



Prof(a). Carolina Cavalieri Gomes - Orientador
Universidade Federal de Minas Gerais


Prof(a). Ricardo Santiago Gomez
Universidade Federal de Minas Gerais


Prof(a). Ricardo Alves Mesquita
Universidade Federal de Minas Gerais


Prof(a). Alfredo Mauricio Batista de Paula
UNIMONTES


Prof(a). Andre Luiz Sena Guimarães
Unimontes


Prof(a). Marina Gonçalves Diniz
UFMG

Belo Horizonte, 16 de agosto de 2013.