



UNIVERSIDADE
CATÓLICA
PORTUGUESA

DEPARTAMENTO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE

O POTENCIAL TRANSLACIONAL DOS BIOMARCADORES NA ABORDAGEM DA LEUCOPLASIA ORAL

Dissertação apresentada à Universidade Católica Portuguesa para obtenção do grau de mestre
em

MEDICINA DENTÁRIA

Por

Francisco de Almeida Rocha

Viseu 2013



UNIVERSIDADE
CATÓLICA
PORTUGUESA

DEPARTAMENTO DE
CIÊNCIAS DA SAÚDE

O POTENCIAL TRANSLACIONAL DOS BIOMARCADORES NA ABORDAGEM DA LEUCOPLASIA ORAL

Dissertação apresentada à Universidade Católica Portuguesa para obtenção do grau de mestre
em

MEDICINA DENTÁRIA

Por

Francisco de Almeida Rocha

Sob a orientação de

Prof. Doutor Rui Amaral Mendes

Viseu 2013

Resumo

O cancro como neoplasia maligna representa a proliferação dismórfica e contínua de células nativas de um determinado órgão, conduzindo à invasão tecidual e metastização à distância. O aparecimento destas desordens patológicas resulta de um processo fisiopatológico associado a anormalidades genéticas e epigenéticas, que originam populações celulares clonais com alterações nos mecanismos de sobrevivência.

Apesar de todos os avanços tecnológicos e dos conhecimentos disponíveis para a abordagem do cancro oral, a sua mortalidade apresenta números bastante elevados, sendo superior à registada em outras patologias malignas, como o cancro do colo do útero, mama ou cólon.

No que à cavidade oral diz respeito, a potencial translação do transcriptoma para a prática clínica, permitirá diminuir a morbidade e mortalidade do cancro oral, através do diagnóstico precoce de desordens orais potencialmente malignas, como a leucoplasia oral.

Atualmente, o diagnóstico diferencial entre lesões orais benignas reativas/inflamatórias e desordens orais potencialmente malignas baseia-se em exames histológicos de espécimes biopsados, por existência de lesões clinicamente suspeitas. Além disso, o diagnóstico histológico de displasia epitelial é subjetivo e sujeito a diferentes interpretações, estando apenas a sua existência presumivelmente relacionada com o risco aumentado de transformação maligna. Os estudos bioquímicos e moleculares, conhecidos e praticados nos dias de hoje, servem como pedestal para uma classificação clínica mais verosímil, que poderá prever com maior exatidão o potencial maligno. São necessários biomarcadores moleculares capazes de identificar a fisiopatologia de cada uma das desordens orais potencialmente malignas, em particular a leucoplasia oral, para eliminar os dilemas do diagnóstico clínico e histológico, corrigir diagnósticos diferenciais, assim como reconhecer fatores de risco que permitam averiguar a suscetibilidade individual à neoplasia maligna oral.

Os médicos dentistas devem integrar nas suas faculdades básicas o diagnóstico tão precoce quanto possível de desordens orais potencialmente malignas, classificando os seus estadiamentos através de evidência científica sensível, específica e universal. O objetivo deste plano de estudos à escala global passa pela personalização e otimização dos cuidados médicos.

Palavras-chave: oncogénese oral, desordens orais potencialmente malignas, leucoplasia oral, displasia epitelial oral, biomarcadores.

Abstract

Cancer such as malignant neoplasm represents a dysmorphic continuous native cells proliferation of a given organ, able of tissue invasion and metastization. The onset of these pathological conditions is a result of a physiopathological process with genetic and epigenetic alterations, which lead to foundation of clonal cell populations with selective growth modifications.

Despite all the technological advances and the background knowledge available to oral cancer management, its mortality shows alarming higher than other malignant pathologies, such as cancer of the cervix, breast or colon.

With respect to the oral cavity, the potential of the transcriptome translation into clinical practice will reduce morbidity and mortality of oral cancer, since objectify the early diagnosis of oral potentially malignant disorders, such as oral leukoplakia.

Currently, differential diagnosis between benign oral reactive/inflammatory lesions and oral potentially malignant disorders has been based on histological examination of biopsied specimens by mere existence of suspected lesions. Moreover, histological diagnosis of dysplasia is subjective and is only related to the increased risk of malignant transformation. Biochemical studies and molecular knowledge practiced today, serve as a pedestal for a clinical classification more likely that may more accurately predict the potential malignant. It takes molecular biomarkers capable of identifying the pathophysiology of each of these oral potentially malignant disorders, particularly leukoplakia, to eliminate these dilemmas in clinical diagnosis, correct differential diagnoses, as well as recognize risk factors in order to verify the individual susceptibility to oral malignancy.

Dentists should integrate in their basic skills the earliest possible diagnosis of oral potentially malignant disorders, classifying their staging through validated scientific evidence. The major objective of this study plan goes through customization and optimization of medical care.

Keywords: oral oncogenesis, oral potentially malignant disorders, oral leukoplakia, oral epithelial dysplasia, biomarkers.

Agradecimentos

Aos meus pais, irmãos e avós,
por todo o amor e valores transmitidos.

À Aura Neiva Rosa,
por revelar sempre o melhor de mim.

Aos meus amigos,
que me guiaram num ciclo de sucessos.

Ao Professor Doutor Rui Amaral Mendes,
por ser a minha referência profissional. O mestre.

À Dr.^a Maria Teresa Carvalho,
pelo contributo na valorização deste trabalho.

Ao Mestre Tiago Marques,
por toda a disponibilidade e conhecimento partilhado.

A todos os docentes,
que me inspiraram e motivaram.

Índice

1. Introdução	1
1.1. Contextualização do tema em estudo.....	1
1.2. A carcinogênese	5
1.3. Modelos de progressão genética.....	9
1.4. Displasia epitelial oral	11
1.5. Desordens orais potencialmente malignas	19
1.6. Leucoplasia oral.....	26
1.7. Tratamento da leucoplasia oral.....	38
2. Objetivos	49
3. Metodologia.....	53
4. Resultados	57
5. Discussão.....	75
5.1. Desequilíbrio alélico.....	76
5.1.1. Amplificação genética.....	77
5.1.2. Perda de heterozigotia.....	77
5.2. Aneuploidia	78
5.3. DNA microssatélite	80
5.4. RNA microssatélite	81
5.4.1. miR-31	82
5.5. Eventos epigenéticos.....	83
5.6. Importância da telomerase	84
5.7. Marcadores de proliferação	86
5.7.1. Ki67	86
5.7.2. PCNA.....	89
5.7.3. AgNOR	90
5.8. Família p53.....	94
5.8.1. p53.....	98
5.8.2. p63.....	110
5.8.3. p21.....	111

5.8.4. p27.....	113
5.9. Família Rb	114
5.9.1. pRb.....	115
5.9.2. p16.....	117
5.10. Recetores tirosino-cinases.....	119
5.10.1. EGFR/TNF- α	119
5.10.2. PI3K/Akt.....	123
5.10.3. ERK/MAPK	125
5.10.4. Ciclina D1.....	125
5.10.5. VEGF	128
5.11. Apoptose.....	129
5.11.1. Bcl-2.....	129
5.11.2. FAS e FASL	131
5.11.3. TC21	132
5.12. Adesão celular	133
5.12.1. CD44.....	133
5.12.2. CD133.....	135
5.13. Marcadores de diferenciação.....	137
5.13.1. Carbohidratos da superfície celular.....	137
5.13.2. Queratina 5	138
5.13.3. Queratina 4 e 13	140
5.13.4. Queratina 8	141
5.14. Ribonucleoproteína heterogénea K.....	142
5.15. Marcadores inflamatórios.....	144
5.15.1. Interleucina-6	144
5.15.2. COX-2.....	146
5.15.3. CXCR7/ligandos	148
5.16. Sets multigénicos.....	149
5.16.1. Análise <i>microarray</i>	149
5.17. HPV.....	153
6. Conclusão	157
7. Referências bibliográficas	161

Lista de siglas

AgNOR – silver-stained Nucleolar Organizer Region

AI – Allelic Imbalance

ALDH – ALdehyde DeHydrogenase

AMIDA – Autoantibody Mediated Identification of Antigens

CAM – Cell Adhesion Molecule

CDH1 – CaDHerin 1, type 1

CDK – Cyclin-Dependent Kinase

cDNA – complementary DNA

CI – Confidence Interval

CIS – Carcinoma *In Situ*

CK – CytoKeratin

COX – CicloOXigenase

DAPK1 – Death-Associated Protein Kinase-1

DEO – Displasia Epitelial Oral

DNA – DeoxyriboNucleic Acid

EBV – Epstein-Barr Virus

EGF – Epidermal Growth Factor

EGFR – EGF Receptor

EIC – intraEpithelial Inflammatory Cells

ELISA – Enzyme-Linked Immunosorbent Assay

ERK – Extracellular signal-Regulated Kinase

FGF – Fibroblast Growth Factor

FIH – Fibrous Inflammatory Hyperplasia

FISH – Fluorescence *In Situ* Hybridization

FNAC – Fine Needle Aspiration Cytology

H-E – Hematoxilina-Eosina

HIV – Human Immunodeficiency Virus

HNOSCC – Head and Neck Oral Squamous Cell Carcinoma

HNSCC – Head and Neck Squamous Cell Carcinoma

HO-1 – Heme Oxygenase-1

HPV – Human PapillomaVirus
hRNP K – heterogeneous RiboNucleoProtein K
hsp – heat-shock protein
IHC – ImunoHistoChemistry
IMP3 – Insulinlike growth factor II mRNA-binding Protein 3
JAK – JAnus Kinase
K – Keratin
LDH – Lactate DeHydrogenase
LI – Labeling Index
LOH – Loss Of Heterozygosity
LOXL – Lysyl OXidase-Like
MAPK – Mitogen Activated Protein Kinase
MDM2 – Murine Double Minute 2
MGMT – MethylGuanine-DNA-Methyl Transferase
MI – Microsatellite Instability
miRNA – microsatellite RNA
MK – MidKine
mRNA – messenger RNA
Nd:YAG – Neodymium-doped Yttrium Aluminum Garnet
NGF – Nerve Growth Factor
NOR – Nucleolus Organizer Region
OPMD – Oral Potentially Malignant Disorder
OSCC – Oral Squamous Cell Carcinoma
PAHs – Polycyclic Aromatic Hydrocarbons
PCNA – Proliferating Cell Nuclear Antigen
PCR – Polymerase Chain Reaction
PD – Países Desenvolvidos
PDGF – Platelet-Derived Growth Factor
PGE2 – ProstaGlandina E2
PI – PhosphatidinilInositol ou Phosphatidyl-1D-myo-Inositol
PI3K – PhosphoInositide 3-Kinase
PVD – Países em Vias de Desenvolvimento
Q-PCR – Quantitative real time-PCR

QRT-PCR – Quantitative Reverse Transcription-PCR
RARβ2 – Retinoic Acid Receptor B2
Rb – Retinoblastoma
RCT – Randomized Controlled Trial
RFLP – Restriction Fragment Length Polymorphism
RNA – RiboNucleic Acid
RT-PCR – Real Time-PCR
SCC – Squamous Cell Carcinoma
SNP – Single Nucleotide Polymorphism
SSCP – Single Strand Conformational Polymorphism
STAT – Signal Transducer and Activator of Transcription
TGF- α – Transforming Growth Factor- α
TNF- α – Tumor Necrosis Factor- α
VEGF – Vascular Endothelial Growth Factor

O POTENCIAL TRANSLACIONAL DOS BIOMARCADORES NA
ABORDAGEM DA LEUCOPLASIA ORAL

INTRODUÇÃO

1. Introdução

1.1. Contextualização do tema em estudo

O cancro oral é um problema de Saúde Pública à escala mundial. A maioria da informação epidemiológica publicada acerca do cancro oral é incorporada numa classificação anatómica vasta do “cancro cabeça e pescoço” ou “cancro da cavidade oral e faringe”, sendo definido como neoplasma maligno do lábio e da boca. O carcinoma de células escamosas da cabeça e pescoço (HNSCC) é o 6º cancro mais comum em todo o mundo, representando cerca de 4% de todos os cancros e 500 000 novos casos por ano,¹⁻⁷ correspondendo ao 4º mais prevalente entre homens.⁸ O carcinoma oral de células escamosas (OSCC) é o mais frequente dos HNSCCs,⁹ contando com aproximadamente 50% dos casos,¹⁰ sendo a língua a sua localização mais comum (20-59%).¹¹ As estimativas apontam para que 8% de todos os cancros em pacientes do sexo masculino se localizem na boca e faringe, com uma estimativa correspondente a 4% para as mulheres.^{12, 13} À semelhança de outras doenças malignas, o cancro oral é multifatorial, verificando-se que 90% dos pacientes são consumidores de tabaco, fumado ou mascado.² Também os antecedentes hereditários de HNSCC aumentam o risco de doença maligna em 3,5 vezes.¹⁴ Ao contrário de outras doenças malignas, a sua incidência tem vindo a aumentar.^{13, 15} Em virtude das diferentes áreas geográficas estudadas, fatores de risco e hábitos de vida característicos de cada população, os dados epidemiológicos nem sempre são semelhantes.⁶

As incidências anuais de cancro oral são maiores nos países desenvolvidos (PD), embora os países em vias de desenvolvimento (PVD) apresentem maiores taxas de mortalidade.^{16-18, 16} A incidência anual de cancro oral é superior ao dobro nos PD face aos PVD (10,37 vs. 4,43 por 100 000 pessoas, respetivamente). Dois terços dos casos de cancro oral afetam os países do Sul e Sudeste Asiático, América Latina e Europa de Leste.^{12, 13} A Índia, Sri Lanka e Paquistão apresentam os valores mais altos,⁶ sendo mesmo o cancro mais comum entre homens, correspondendo a cerca de 30% de todos os novos casos de cancro, comparando com os 3% no Reino Unido e os 6% na França.^{13, 19} No que diz respeito aos países da Europa, a maior incidência na população masculina é encontrada na França e Hungria, enquanto os valores mais baixos se verificam na Grécia e Chipre.¹³ A incidência de cancro oral está intimamente relacionada ao menor estatuto social e económico, com os

valores mais altos a estarem correlacionados com populações mais desfavorecidas.^{13, 20} Estes dados epidemiológicos também podem ser explicados pela ausência de programas de rastreio públicos nos PVD.²¹ No entanto, a incidência continua a aumentar nos países ocidentais,^{12, 13} particularmente na população jovem masculina (≤ 40 anos)^{6, 22} e feminina.^{17, 23} Historicamente, o risco de desenvolvimento de cancro oral aumenta com a idade, no entanto, a faixa com maior incidência (26,8%) nos USA entre 2003-2007 foi a dos 55-64 anos de idade. Pelo contrário, nos países com elevada incidência, muitos pacientes não tinham 40 anos e a incidência de cancro oral em homens com 40-50 anos duplicou no Reino Unido,¹⁹ assim como em muitos países da União Europeia.¹³

Segundos dados de 2012 recolhidos do *European Cancer Observatory*, projeto desenvolvido pela WHO, a incidência anual para o cancro do lábio, cavidade oral e faringe em Portugal foi de 27,5 e 4,7 por 100 000 homens e mulheres, respetivamente. A sua incidência tem vindo a aumentar em ambos os sexos, representando nos homens um aumento de 2,71% em 4 anos (2008:3,2% para 2012:5,91%).^{24, 25}

Com o intuito de diminuir a morbilidade e mortalidade das patologias malignas, foram instaurados programas de rastreio, desenvolvidos através do conhecimento fisiopatológico da carcinogénese. A considerável diminuição da incidência de cancro do cérvix uterino nas últimas 3 a 4 décadas em países desenvolvidos deve-se à introdução de programas de rastreio comunitários.²⁶ Todavia, não se conhece eficácia a nenhum programa de prevenção desenhado para o cancro oral,¹³ em parte pelas imperfeições dos seus métodos e técnicas de diagnóstico precoce.

Os fatores de risco *major* no mundo ocidental incluem o consumo crónico de tabaco e álcool,^{6, 7} enquanto na Ásia, os fatores de risco primários são o tabaco mascado e/ou infeções pelo papiloma vírus humano (HPV).⁶ A história familiar de hábitos alcoólicos aumenta o risco em 3,65 vezes.¹⁴ O consumo simultâneo de tabaco e álcool tem ação sinérgica, sendo que os indivíduos com hábitos tabágicos e alcoólicos graves apresentam um risco 38 vezes superior de desenvolver cancro oral, quando comparados com os não consumidores.¹³ O HNSCC é o segundo cancro mais comum relacionado com o tabaco a nível mundial, só depois do cancro do pulmão.¹⁰ Ainda que controverso, alguns autores consideram a infeção por HPV, nomeadamente por estirpes de elevado risco oncogénico - HPV16/18, como um fator etiológico *major*.⁷

O OSCC é universalmente reconhecido como o cancro oral mais frequente (80-90%).^{16, 22, 27} Infelizmente as diferentes modalidades de tratamento – cirurgia, quimioterapia, radioterapia e terapia fotodinâmica – de forma isolada ou em associação, não têm conseguido melhorar as taxas de sobrevivência nas últimas 3 décadas,^{9, 15, 28, 29} pelo que o prognóstico destes pacientes é muito reservado.^{7, 10, 17, 30} A sobrevida geral dos OSCCs diminui drasticamente com o diagnóstico tardio, de aproximadamente 50% e 41% a 5 e 10 anos,^{7, 22, 30} para 20% em lesões mais avançadas (estádios III e IV de acordo com o *American Joint Committee on Cancer*). Mesmo nos países ocidentais, 2/3 ou mais dos pacientes com doença avançada não são facilmente curados por cirurgia ou radioterapia.¹⁷ O atraso no diagnóstico é o fator mais determinante para a elevada taxa de mortalidade, uma vez que mais de 60% dos pacientes apresentam estádios III e IV no momento do diagnóstico,^{13, 22} sendo que a taxa de metastização regional ou à distância ronda os 25-50%,⁶ com um rácio de tumores primários secundários maior do que para qualquer outro tipo de cancro (3-7% por ano), sendo mesmo a sua causa de morte mais frequente. Aproximadamente 15% dos pacientes apresentam outro cancro no trato aerodigestivo: laringe, esófago ou pulmões.³¹ A inacessibilidade do tumor nos casos mais avançados também limita o sucesso terapêutico.¹³ Além da taxa de mortalidade elevada, a cirurgia curativa é altamente desfigurante, exponenciando o seu índice de morbidade.^{13, 30}

Felizmente, um grande número de OSCCs é precedido por alterações visíveis da mucosa oral,^{13, 32-34} sob a forma de desordem oral potencialmente maligna (OPMD), que se apresentam geralmente assintomáticas.⁶ A doença tende a progredir para estádios mais avançados, apesar de geralmente o diagnóstico clínico provisório ser possível através de simples exame físico.¹³

As desordens potencialmente malignas estão presentes nos diferentes sistemas do corpo humano, sendo que a cavidade oral não constitui exceção. Pelas suas particularidades anatómicas, a cavidade oral ao contrário de outros órgãos humanos está acessível à inspeção visual direta. Segundo a classificação mais recente adotada pela WHO em 2007, a distinção entre lesões e condições potencialmente malignas orais deve ser abandonada, pelo que nesta revisão sistemática será utilizado o termo desordens orais potencialmente malignas. Destas constam a leucoplasia, a eritroplasia, a fibrose submucosa, o líquen plano, síndromes de cancro hereditário e algumas imunodeficiências.³² Além da classificação protelada pela WHO, outros autores incluem as lesões no palato em fumadores com cigarro invertido, lúpus eritematoso discóide,³⁴ disqueratose congénita e epidermólise bolhosa.³⁵

O diagnóstico diferencial é histopatológico, sendo a displasia epitelial oral (DEO) a alteração mais importante,^{33, 36, 37} caracterizada por anormalidades na maturação e proliferação celular das camadas suprabasais. A determinação da sua presença, severidade (ligeira, moderada e severa) e significado clínico não é consensual, em parte pela subjetividade inter- e intra-individual do diagnóstico histopatológico. Contudo, os estudos defendem que 6,6-36,4% das displasias epiteliais orais podem transformar-se em OSCCs nas várias populações^{9, 38, 39}, pelo que o conhecimento científico destas anormalidades assume grande importância clínica. Prova disso, é o facto da taxa de malignização entre todas as OPMDs com OED variar entre 1,1% e 17,5%.^{35, 40, 41} Todavia, e apesar do diagnóstico de displasia ser ainda o dado de maior valor na predição de malignização de lesões na cavidade oral, nem todas as OPMDs apresentam displasia e nem todas as neoplasias malignas são precedidas de displasia, havendo mesmo casos de regressão espontânea.^{6, 7, 32, 33} Além disso, têm sido descritas casos de OED associados à deficiência de vitamina B12, que regredem após terapêutica de substituição.⁴² Aproximadamente 30% dos casos de cancro oral não derivam de OPMDs.⁷

O conceito de OED no diagnóstico e determinação do potencial maligno da leucoplasia oral será extensivamente abordado nesta monografia, assim como todas as indefinições conhecidas da sua interpretação. Urge a necessidade de descobrir novos métodos de diagnóstico, para aferição do prognóstico maligno e novas estratégias terapêuticas bem fundamentadas e associadas a menor morbilidade. Nas últimas décadas têm sido propostos vários exames visuais da cavidade oral, de técnica acessível para o médico dentista generalista, baseados na luminescência ou coloração dos tecidos, ainda que estas apresentem várias limitações.⁶

O processo de carcinogénese oral é hoje compreendido como uma sequência de alterações cromossómicas, genéticas e moleculares partilhadas entre OPMDs e o OSCC.^{40, 43} Assim, é de extrema importância o desenvolvimento de biomarcadores moleculares para o diagnóstico precoce de OPMDs, particularmente de lesões sem manifestações clínicas evidentes.^{6, 7}

1.2. A carcinogénese

O ambiente em que vivemos está repleto de carcinogéneos, definidos como substâncias ou agentes que aumentam significativamente a incidência de tumores, independentemente da dose necessária, via de administração ou espécie exposta. Basicamente podem ser divididos em 1) químicos, 2) vírus oncogénicos e 3) radiação de alta frequência/energia.⁴⁴

Os investigadores encaram o processo oncológico como uma sequência de diferentes etapas,^{37, 44, 45} com base nalguns factos que suportam esta teoria:^{37, 44}

- A existência da fase de latência tumoral após exposição a carcinogéneos;
- A sequência aparente de eventos patológicos na evolução de diferentes tipos de tumores;
- A sua distribuição etária característica. Na sua grande maioria são as populações mais velhas as mais afetadas;
- A existência de um padrão familiar;
- A correlação entre lesões moleculares e genéticas e os diferentes eventos patológicos da oncogénese.

Quais os fatores que promovem a transformação maligna, aqueles que transitam e as suas causas, são parâmetros biológicos que estão incessantemente a ser estudados, mas que para os quais não existe resposta definitiva. Ainda estão igualmente por descobrir quais as alterações fenotípicas que transparecem a irreversibilidade de uma lesão maligna, em lesões anteriormente reversíveis, definidas como desordens potencialmente malignas.⁴⁴

Os 4 estadios da carcinogénese: iniciação, latência, promoção e progressão interagem sequencialmente na formação de neoplasmas malignos. Neste processo contínuo, a iniciação ocorre quando um carcinogéneo interage com o DNA, provocando uma quebra da dupla cadeia e mais frequentemente a alteração de um nucleótido. Assim, e se o genoma for replicado antes das enzimas repararem o dano, a DNA polimerase criará um erro permanente e hereditário. No caso de alterações de um só nucleótido, também o seu par será complementariamente substituído na cadeia inicialmente não afetada. A grande maioria destas incorporações é neutra às células afetadas. Contudo, se a alteração ocorre, a título de exemplo, num codão responsável pela transcrição de proteínas reguladoras do crescimento, poderá

desencadear, sob certas circunstâncias, uma vantagem seletiva no tecido em que se encontra. Noutros casos, são os promotores as estruturas genómicas expostas aos carcinogéneos, conduzindo à formação de múltiplos tumores benignos ou lesões hiperplásicas, representando a segunda fase da carcinogénese - latência. O efeito promotor é reversível, e a sua desativação resulta no desaparecimento das células clonais em expansão ou dos nódulos hiperplásicos. Ainda assim, os promotores não são considerados genotóxicos, isto é, não são capazes de induzir alterações ou mutações hereditárias. São também fracos indutores de transformações malignas.⁴⁴

Numa próxima fase, as células com vantagem seletiva intratumoral entram em proliferação. Neste estadio, composto igualmente por diferentes etapas, as células tumorais adquirem uma vantagem permanente face às células saudáveis ou aumentam a probabilidade de se tornarem anaplásicas. A anaplasia é definida como a alteração da forma, constituindo para alguns patologistas como o apanágio das características microscópicas de uma lesão maligna. É neste momento que se cria o ímpeto para que uma lesão benigna sofra malignização, iniciando a invasão dos tecidos adjacentes e por fim a metastização. Estas alterações advêm de:⁴⁴

- Exposições repetidas ao mesmo ou a diferentes carcinogéneos;
- Às mutações espontâneas por erros naturais das enzimas reparadoras do DNA em replicação;
- Instabilidade genómica induzida por mutações adicionais.

Independentemente do(s) mecanismo(s), o resultado passa por uma alteração celular irreversível que permite a expressão do fenótipo neoplásico.⁴⁴

Além disto, pela etiologia molecular existente nas lesões malignas, alguns genes reguladores estão normalmente envolvidos na grande maioria dos cancros:^{14, 44}

- I. Proto-oncogenes; quando mutados denominam-se oncogenes. Estão presentes em todas as células normais e regulam o crescimento. Comportam-se como dominantes, já que a mutação de um único alelo provoca transformações no comportamento celular.
- II. Genes supressores de tumores. Encontram-se presentes em todas as células normais e são responsáveis por impedir o crescimento tecidual. São de carácter recessivo, pelo que é necessária a alteração das duas cópias alélicas.

- III. Genes reguladores do ciclo celular. Estão presentes em todas as células normais e regulam o crescimento.
- IV. Genes envolvidos na apoptose. Quando mutados contribuem para a imortalidade de células alteradas.
- V. Genes envolvidos na reparação do DNA.
- VI. Genes envolvidos na angiogênese. O processo é regulado por fatores estimuladores e inibidores em múltiplas etapas, como a degradação e remodelação da matriz extracelular, proliferação endotelial e migração celular.

O proteoma resultante da danificação destes mesmos genes, assim como de outras alterações genéticas e epigenéticas resultará em:⁴⁵

1. Crescimento autónomo, independente de sinais externos necessários ao crescimento celular normal. Sabe-se no entanto que este crescimento não é efetivamente independente, dependendo em parte do ambiente microtumoral em que se insere.⁴⁴
2. Insensibilidade a sinais inibidores do crescimento.
3. Inoperacionalidade apoptótica.
4. Replicação ilimitada ou senescência replicativa.³⁷
5. Angiogénese sustentada.
6. Invasão e metastização – ainda que nem todos os tumores malignos metastizem, é certo que os tumores benignos não o fazem.

A instabilidade genética, característica de lesões malignas, permite a diversidade celular que facilita a aquisição de um fenótipo agressivo, ao mesmo tempo que os processos inflamatórios alimentam as suas diferentes capacidades patológicas.⁴⁵

Além das habilidades já mencionadas, as células malignas são capazes de reprogramarem o seu metabolismo energético e de se evadirem ao sistema imune. A potencialidade destas lesões é exponencialmente aumentada sob ambientes propícios que podem ser sustentados por células do próprio tumor.⁴⁵

Tendo em consideração a teoria aqui apresentada, um carcinogéneo “capaz” é um agente que através de exposições singulares ou múltiplas, provoca um insulto inicial, promove o crescimento seletivo das células alteradas, e dá origem a lesões que na fase proliferativa resultam em patologias malignas.⁴⁵

Daqui podemos concluir que nem todos os carcinogêneos são necessariamente mutagênicos, podendo interferir em qualquer uma das fases de carcinogênese de uma desordem com potencial maligno. Podem assim, além de mutações pontuais, provocar alterações cromossômicas ou interagir com determinadas enzimas sob ativação metabólica. Não obstante, todos têm afinidade pelo DNA.⁴⁴

Para que se manifeste um determinado fenótipo é necessária a presença de um determinado número de células dominantes. Ainda que dificilmente seja quantificável, a identificação da célula dominante responsável consistirá noutra ferramenta de diagnóstico. No caso de se identificar um biomarcador molecular específico de uma determinada célula tumoral, mais fácil será o seu diagnóstico, assim como a presunção do seu prognóstico. Contudo, não se conhecem as bases moleculares pelas quais determinadas células dominantes, sob um determinado número, manifestam o fenótipo da doença.⁴⁴

A malignização das desordens potencialmente malignas consiste num processo translacional complexo, marcado pela presença de determinados fatores ambientais, que conduzirão à dominância de determinadas linhagens celulares. Assim mesmo, a seleção celular intratumoral tem um papel importante na progressão destas lesões. Será importante ter em conta, que o processo de carcinogênese é o resultado cumulativo da exposição a diferentes carcinogêneos, que resultam em múltiplas alterações genómicas e do comportamento celular. Na realidade, a acumulação de diferentes erros assume maior importância do que determinada sequência de alterações singulares. Além disso, não existe um padrão de evolução único, mas uma maior preponderância de determinados eventos genéticos e epigenéticos.⁴⁴

O comportamento evolutivo das lesões tumorais está por isso em constante mudança, pelo que o diagnóstico histopatológico pontual nem sempre é fidedigno da gravidade da lesão.⁴⁴

Os conceitos modernos da oncogênese oral, que evoluíram do trabalho de Slaughter, Southwick e Smejkal⁴⁶ acerca da origem do OSCC, reforçam a existência de campos potencialmente neoplásicos molecularmente alterados (*oral field cancerization*), a partir dos quais se desenvolvem lesões múltiplas. A partir de uma ou mais células estaminais que adquirem alterações genéticas, forma-se um grupo de células filhas geneticamente alteradas. Como resultado da acumulação de anormalidades, as células estaminais negam o controlo do crescimento tumoral, adquirem vantagens de crescimento e desenvolvem clones que darão lugar a um ou mais campos por fim deslocados do epitélio normal.⁴⁷

Em suma, o cancro resulta de aberrações no crescimento, diferenciação ou organização celular. As células malignas ao contrário das células estaminais indiferenciadas que de alguma forma lhe dão origem, não conservam a capacidade embrionária de renovação tecidual, conduzindo à falência orgânica e morte do paciente. A diferenciação celular nas lesões malignas não representa a progressão da lesão para estados indiferenciados, mas a diferenciação de células com comportamentos progressivamente malignos.⁴⁴

1.3. Modelos de progressão genética

O modelo de iniciação e progressão tumoral proposto para o carcinoma coloretal é uma referência para os tumores sólidos humanos, nos quais se incluem os da cabeça e pescoço. De igual forma se pensa, que o HNSCC progride através de estádios clínicos e histopatológicos bem definidos.³⁷

Ainda não se conhece a fisiopatologia das alterações genéticas de cada etapa da oncogénese oral, mas Califano *et al.*¹⁴ descreveram um modelo de progressão genética para o HNSCC, desde estádios benignos a invasivos, com análise microssatélite da perda alélica em 10 *loci* cromossómicos *major* de genes supressores de tumores:³⁷

- 9p21: contém o gene p16;
- 11q13: inclui o *locus* bcl-2/int-2, incluindo o proto-oncogene ciclina D1;
- 17p13: *locus* do gene p53;
- O cromossoma 3p, que contém os 3 *loci* supracitados. A perda alélica do 9p21 ou 3p foi considerada entre os eventos mais precoces.
- Os cromossomas 4q26-28 e 14q31-32.1 contêm *loci* com elevada taxa de alterações no HNSCC;
- Os cromossomas 8 e 6p, que contêm *loci* de genes supressores tumorais frequentemente alterados, entre os quais o gene p21.

Os resultados de Califano *et al.*⁴⁸ justificam o modelo de progressão genética que se representa na figura seguinte.^{37, 48}

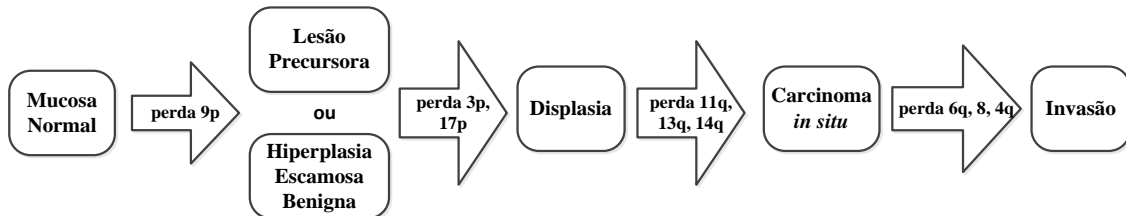


Figura 1. Progressão genética do HNSCC.

Fonte: Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res.* 1996;56(11):2488-92.⁴⁸

Um modelo de progressão genética para a patologia maligna da cabeça e pescoço tem muitas implicações importantes.³⁷

- Do ponto de vista científico, a identificação de genes supressores de tumores e oncogenes, em determinados *loci* cromossômicos, pode ser crítica para compreender a iniciação biológica, o comportamento e a progressão do cancro da cabeça e pescoço;
- Por outro lado, o perfil genético terá valor no prognóstico de malignização de lesões benignas, tumores primários ou tecido circundante a carcinoma invasivo, em relação à sua recidiva ou à progressão de uma população epitelial clonal remanescente, que resulte em tumores secundários;
- Da mesma forma, a identificação de eventos genéticos poderá proporcionar uma nova ferramenta de diagnóstico precoce das transformações celulares, através da análise de fluidos corporais (e.g. saliva, soro);
- O conhecimento de eventos precoces poderá igualmente ser utilizado para identificação de populações clonais residuais através da análise molecular das margens de ressecção;
- As ciências farmacêuticas poderão desenvolver agentes terapêuticos mais eficazes, específicos para cada etapa da carcinogénese e individualizados para cada paciente.

1.4. Displasia epitelial oral

A presença de displasia epitelial oral, isto é, de um conjunto de alterações da maturação epitelial sugestivas de malignização, é hoje considerada o parâmetro mais fiável para o diagnóstico de desordem oral potencialmente maligna.⁹

Apesar da sua utilidade diária como *gold standard* de alterações potencialmente malignas, a evidência científica não permite definir a displasia epitelial como marcador preditivo de malignização. Atualmente, deverá a sua presença ser considerada apenas como indicadora de risco.⁴⁹

Embora os patologistas reconheçam e aceitem as características que definem a displasia, existe desacordo quando determinam a sua presença, severidade e significado clínico.³³ O diagnóstico de OED é feito por quantificação das anormalidades citológicas e da arquitetura celular, que são identificadas acima da camada basal epitelial, através da coloração com hematoxilina-eosina (H-E).⁹

Quadro 1. Características arquiteturais e citológicas específicas utilizadas no sistema de estadiamento da WHO para a displasia epitelial oral

Arquiteturais	Citológicas
Estratificação epitelial irregular	Varição anormal do tamanho do núcleo (anisonucleose)
Perda de polaridade das células basais	Varição anormal da forma do núcleo (pleomorfismo nuclear)
Projeções epiteliais em forma de gota	Varição anormal do tamanho celular (anisocitose)
Aumento de figuras mitóticas	Varição anormal da forma celular (pleomorfismo celular)
Mitoses superficiais anormais	Rácio núcleo:citoplasma aumentado
Queratinização prematura de células isoladas (disqueratose)	Aumento do tamanho do núcleo
Pérolas de queratina nas projeções epiteliais	Figuras mitóticas atípicas
	Nucléolos em tamanho e número aumentado
	Hipercromatismo

Fontes: van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncology*. 2009;45(4-5):317-23.³²; Nankivell P, Williams H, Matthews P, Suortamo S, Snead D, McConkey C, et al. The binary oral dysplasia grading system: validity testing and suggested improvement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2013;115(1):87-94.⁵⁰

Normalmente quanto mais proeminentes e numerosas são estas alterações, maior a severidade displásica. No entanto, a displasia epitelial deve ser encarada como um conceito que engloba um espectro de alterações e não apenas estádios isolados e discretos. A ausência de *guidelines* na interpretação destes padrões, ou seja, da reunião ímpar de determinadas características alteradas, pode ter conduzido a avaliações inconsistentes e resultados não comparáveis entre diferentes estudos.^{32, 40} Alguns autores defendem que determinados parâmetros citológicos devem ter maior valor preditivo na malignização das OPMDs. Através de análise discriminativa, foram estudados diferentes critérios, sendo que a presença de figuras mitóticas anormais na camada basal e espinhosa, mitoses presentes nas camadas suprabasais superiores e a polaridade alterada das células epiteliais poderão estar associadas com maior certeza a alterações potencialmente malignas. A presença de corpos de Russell na lâmina própria destes espécimes também assumiu grande valor preditivo. No entanto, o real valor de prognóstico destas manifestações não foi testado em estudos com maior relevo científico.^{33, 40}

Existem inúmeros sistemas de estadiamento histológico para alterações da maturação epitelial:⁵⁰

- a) A classificação de Ljubljana foi adaptada com sucesso a problemas histológicos e clínicos específicos de anormalidades laríngeas. Todavia, a sua utilização satisfatória para a cavidade oral e orofaringe carece de confirmação. Neste sistema, os termos hiperplasia atípica/epitélio de risco são utilizados em detrimento de displasia.
- b) A utilização do termo neoplasia intraepitelial escamosa também não foi aceite pela WHO, porque não existe confirmação da progressão maligna de todas as OPMDs.
- c) A classificação histopatológica das OPMDs pela WHO é a mais utilizada, dividindo as lesões precursoras epiteliais em 5 categorias (quadro 2).³²

Quadro 2. Classificação histopatológica das OPMDs epiteliais

<u>Hiperplasia escamosa</u>	Camada basal (hiperplasia celular basal) ou espinhosa (acantose); estratificação regular sem atipia celular
<u>Displasia ligeira</u>	Alterações da arquitetura tecidual limitadas ao terço inferior do epitélio acompanhadas de atipia citológica
<u>Displasia moderada</u>	Distorção da arquitetura até ao terço médio do epitélio; atipia celular mais marcada
<u>Displasia severa</u>	Distorção da arquitetura envolve mais de 2/3 do epitélio; distorções da arquitetura no terço médio com atipia citológica suficiente são sobrevalorizadas de displasia moderada para severa
<u>Carcinoma <i>in situ</i></u>	Distorção da arquitetura em toda a espessura do epitélio com atipia celular pronunciada

Fonte: van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncology*. 2009;45(4-5):317-23.³²

A incorporação dos casos nas respetivas categorias deste sistema requer em primeiro lugar, a consideração das características da arquitetura epitelial e só depois as citológicas. Na presença de alterações da arquitetura no terço médio epitelial (displasia moderada), a presença de atipia celular marcada poderá categorizar a lesão como displasia severa. Também a displasia com atipia ligeira, que se estenda ao terço médio epitelial, mantém a designação de displasia ligeira. O epitélio das desordens potencialmente malignas pode ser espesso, ainda que na cavidade oral seja na maioria das vezes atrófico. Por definição, não existe evidência de invasão. A magnitude da queratinização superficial (queratose ou hiperqueratose) não tem importância na avaliação de displasia.⁴⁰

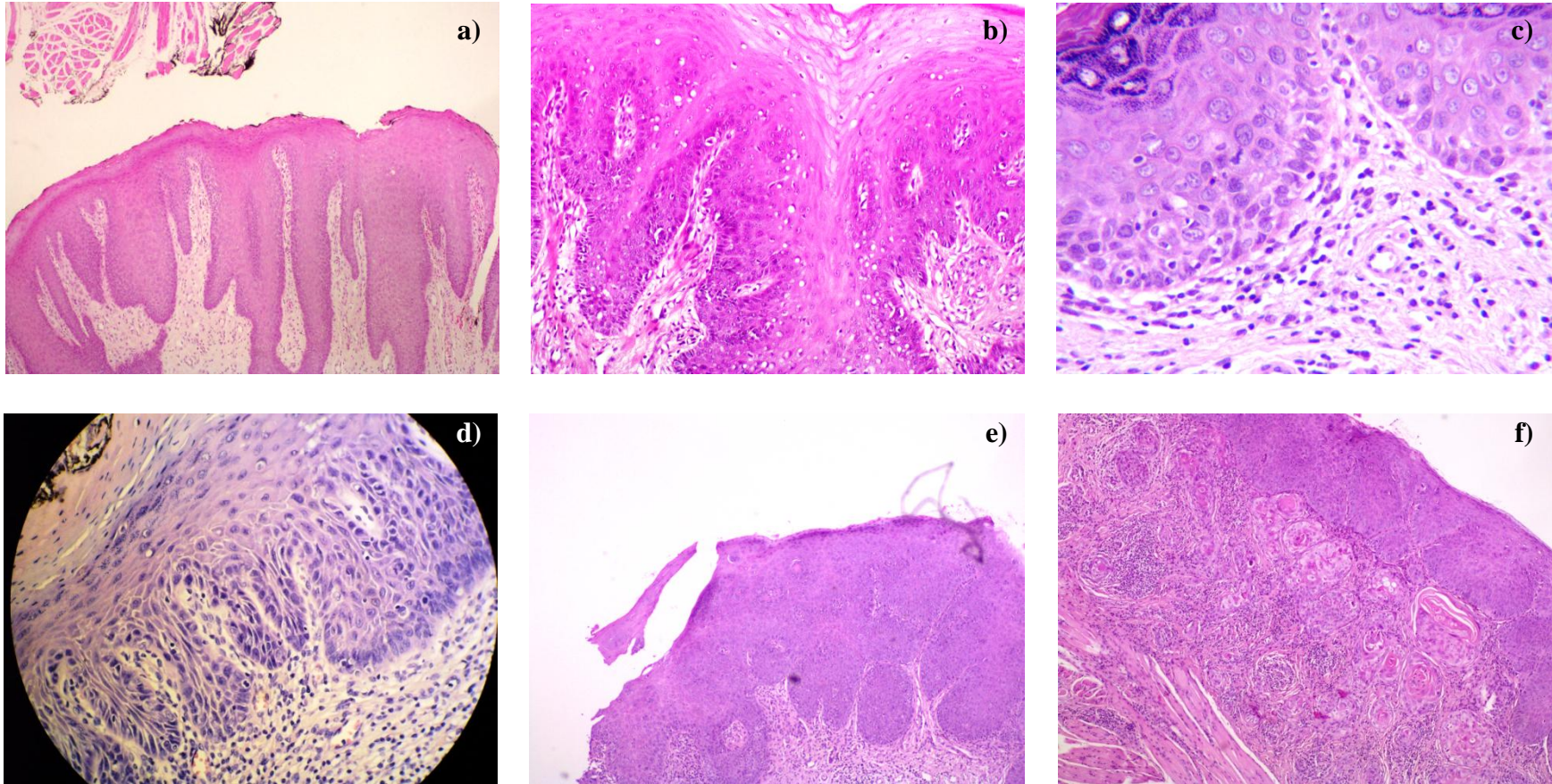


Figura 2. Fotografias histológicas. Coloração H-E. **a)** hiperplasia escamosa com acantose (40x) **b)** displasia ligeira (100x) **c)** displasia moderada (200x) **d)** displasia severa (100x) **e)** carcinoma *in situ* (40x) e **f)** carcinoma invasivo baixo grau (40x)

Os estadios mais avançados de displasia parecem associados a maiores rácios de malignização. A importância da subdivisão da OED ainda não foi estabelecida. Embora alguns estudos correlacionem valores de transformação maligna para displasias ligeiras (3-5%), moderadas (4%) e severas (43%), nem sempre estadios de maior severidade estão associados a maior probabilidade de desenvolvimento de lesões malignas.^{33, 51, 52} Os estadios mais precoces podem transformar-se em patologias malignas, enquanto estadios avançados se mantêm latentes. Uma grande desvantagem no diagnóstico correto da displasia passa pela variabilidade inter-individual e intra-observador, conferindo subjetividade a uma classificação que se defende como quantitativa.^{26, 30, 32, 40, 52-54} Esta variabilidade no diagnóstico de displasia epitelial não se limita à cavidade oral, estando também presente nas lesões do cérvix uterino.³⁰

Os *kappa values* (de 0- pior concordância a 1 – concordância total) de estudos com diferentes metodologias, normalmente refletem pouca a moderada concordância entre os patologistas intervenientes.⁴⁰ Estes valores são semelhantes para pacientes consumidores ou não de álcool, mas superiores entre não fumadores quando comparados com fumadores passados ou correntes, talvez pelo menor trauma tecidual.³⁰ O conhecimento de aspetos clínicos nem sempre tem aumentado o consenso. No entanto, quanto à localização existe maior acordo para lesões da mucosa jugal e língua do que para lesões dos lábios, talvez pela maior e menor frequência destas lesões, respetivamente.³⁰

Fischer *et al.*³⁰ após revisão da evidência identificou com um CI de 95%, que a presença de inflamação,⁴⁰ tamanho da lesão e técnica de biópsia alteram a segurança do diagnóstico de lesões orais. A inflamação pode induzir atipia celular reativa e/ou reduzir a habilidade do patologista para observar as alterações displásicas. A sua severidade pode ser por consequente subestimada. Nos fumadores, a presença e extensão da inflamação é menor, talvez por alterações crónicas que resultam do tabagismo. Quanto à técnica de biópsia, as *punch biopsies* (3-4cm) apresentaram maior concordância entre observadores do que biópsias em cunha, aparentemente por recolha de menos material para análise, diminuindo a possibilidade de maior heterogeneidade que dificulte o diagnóstico. A técnica de *punch biopsy* também permite a recolha e posicionamento mais fácil do espécimen, o que facilitará o seccionamento do tecido para análise histopatológica. Ainda assim, tem a desvantagem de possíveis falsos negativos ou diagnóstico errado da presença, severidade e significância de displasia.³⁰

Além da dificuldade na identificação e interpretação dos dados histopatológicos, a biópsia, atualmente considerada como *gold standard* no diagnóstico de cancro oral, relaciona-se com a falta de precisão na seleção do local apropriado para obtenção de espécimen conclusivo. A introdução do conceito de cancerização de campo tem acrescentado problemas a esta falta de fiabilidade, questionando os resultados positivos e negativos da avaliação histopatológica do tecido biopsado.⁵⁵

Abbey *et al.*⁵⁶ testaram seis patologistas experientes quanto à sua consistência no diagnóstico histológico de 120 biópsias orais que variavam desde simples hiperqueratoses até displasia severa. A concordância no diagnóstico de displasia ligeira ou moderada atingiu apenas 50,5% e os observadores concordaram numa segunda tentativa em apenas 50,8% dos casos relativamente aos diagnósticos iniciais. Estiveram de acordo quanto ao diagnóstico original de presença/ausência de OED em 81,5% dos casos, e a coerência dos diferentes patologistas quanto aos próprios diagnósticos ocorreu em 80,3% dos casos. Assim em aproximadamente 20% dos casos, os patologistas não repetiram as próprias avaliações quanto à presença ou ausência de displasia.⁵⁶

Vários estudos de análise da variabilidade intra- e inter-individual no diagnóstico de OED, têm calibrado previamente os grupos de patologistas intervenientes. Esta situação, apesar de apresentar valores de concordância superiores deve ser interpretada com cautela, já que não representa a prática diária.⁴² Além disso, esta subjetividade é fator de confundimento mesmo na presença de patologistas orais experientes.^{30, 33, 49}

Estão por determinar em consenso quais as particularidades histológicas que provocam erros no diagnóstico destas lesões,³⁰ sabendo-se no entanto que são as características citológicas as mais sensíveis, resultando normalmente em variações de um grau no estadiamento das peças operatórias.⁵⁰

Face aos problemas em estabelecer o valor preditivo da OED nas OPMDs, torna-se claro a necessidade de soluções:³³

1. Melhorar a classificação de displasia epitelial oral;
2. Descobrir, validar e aplicar outros métodos com maior valor preditivo para a transformação maligna das OPMDs.

Em 2006, foi apresentado por Kujan *et al.*⁵³ um sistema binário – lesões de baixo (displasia ausente/questionável/ligeira) e elevado risco (displasia moderada a severa) - que aspirava diminuir a variabilidade entre observadores e aumentar a certeza do prognóstico, face à classificação de displasia atualmente defendida pela WHO. Pretendia-se também outro aspeto clinicamente importante, que passaria pela diferenciação mais correta entre lesões displásicas ligeiras, moderadas e severas. Nem todos os pressupostos foram atingidos, escasseando estudos devidamente fundamentados. Ainda assim, é consensual que este sistema binário resulta em menor variabilidade entre observadores, ainda que a definição do prognóstico e a diferenciação entre diferentes gravidades displásicas não melhore face à classificação da WHO.^{32, 53}

Warnakulasuriya *et al.*⁴¹ investigaram a variabilidade inter- e intra-individual na interpretação da presença, severidade e significado clínico de cada característica histopatológica de displasia. Os resultados sugeriram igualmente que a utilização do sistema binário – displasias de baixo e elevado risco – por redução de possíveis escolhas de 3 para 2, poderia aumentar a concordância entre patologistas, i.e., aumentar os *kappa values*.^{33, 40} No entanto, reafirmam que a utilidade deste sistema, na determinação do significado biológico das lesões de baixo e elevado risco, deve ser testada em estudos longitudinais. Os mesmos autores reiteram que todo o sistema de classificação deve ter valor preditivo, já que a sua função primária é guiar o clínico a selecionar o tratamento que oferece o melhor prognóstico.⁴⁰

Segundo alguns autores, poderá haver maior previsibilidade do prognóstico se forem consideradas 4 características citológicas e 4 arquiteturais, ao invés do rácio 5:4 atualmente mais utilizado. Além disso, a suposição do risco de malignização poderá ser melhorada se a dados histológicos forem conjugados dados clínicos, como sendo os hábitos alcoólicos ou tabágicos, idade, sexo, local e morfologia da lesão.⁵⁰

Além dos dados clínicos poderão ser conjugados resultados moleculares. Habitualmente o diagnóstico de displasia epitelial é feito a partir de uma imagem estática, sendo que o processo malignização é dinâmico, pelo que a avaliação da patologia deve ser feita em diferentes etapas. Aplicar o conhecimento biomolecular do processo de transformação maligna poderá ser a única alternativa para melhorar a determinação do potencial maligno das OPMDs, já que é possível acompanhar de forma repetida o comportamento de cada marcador. Ainda que não existam certezas quanto à fiabilidade destes

biomarcadores, a sua integração providencia informação a ser interpretada e possivelmente correlacionada, em modelos que integrem diferentes ferramentas de diagnóstico precoce de OSCC.¹³

A frequência e severidade de OED não são iguais entre as OPMDs. A leucoplasia oral está frequentemente associada a alterações displásicas e em casos muito raros a carcinoma *in situ* (CIS).^{6, 17, 57} Por sua vez, a eritroplasia, OPMD com maior taxa de malignização (90% ou mais), está sobretudo associada a alterações carcinomatosas,^{6, 17, 57} sendo que aproximadamente 40% são CIS e 50% apresentam OSCC invasivo.³¹ Virtualmente todos os casos de eritroplasia apresentam áreas de displasia, CIS ou carcinoma invasivo. Os carcinomas são 17 vezes mais frequentes nas eritroplasias do que nas leucoplasias orais.⁴² Felizmente, para a eritroplasia, apesar de apresentar o maior risco de malignização, estima-se uma incidência mínima de 0,02-0,80%.³¹ Ainda que uma minoria das OPMDs evoluam para OSCC, a incidência geral de cancro oral varia entre 4,4-31,4%, atingindo um máximo de 36% na presença de displasia moderada ou severa.⁴² Num rastreio indiano casa-a-casa (*house-to-house survey*) demonstraram que aproximadamente 80% dos cancros orais eram precedidos de OPMDs.³³

Vários estudos debruçaram-se sobre o potencial maligno de lesões displásicas. Arduino *et al.*³⁹ conduziram um estudo retrospectivo numa população hospitalar de 207 pacientes com displasia, verificando que após um ano de *follow-up*, 39% das lesões regrediram, 20% estabilizaram, 33% desenvolveram novas lesões orais displásicas e 7% evoluíram para OSCC. Numa meta-análise de 14 estudos conduzida por Mehanna *et al.*⁵⁸, foi reportada uma taxa de malignização de 12% em 992 pacientes, após 4,3 anos do diagnóstico. Neste mesmo estudo os autores não observaram diferenças no tempo necessário à malignização entre diferentes severidades displásicas e modalidades de tratamento. Do mesmo modo, Holmstrup *et al.*⁵¹ observaram que a presença de qualquer grau de displasia não tinha qualquer influência no risco de desenvolvimento de OSCC.

Face às limitações do diagnóstico clínico e histológico, é urgente o aproveitamento da evidência oferecida por estudos bioquímicos e moleculares.

1.5. Desordens orais potencialmente malignas

A progressão maligna corresponde à transformação de uma população policlonal diferenciada numa população monoclonal indiferenciada e parcialmente autónoma. A instabilidade genética característica de lesões tumorais potencia a constante variabilidade comportamental. Existem igualmente células tumorais malignas que se apresentam latentes ou inativas, fase na qual o diagnóstico precoce permite um tratamento mais eficaz.⁴⁴

Os neoplasmas malignos são distinguidos de modulações celulares reversíveis por persistirem mesmo quando o estímulo é removido, o que dificulta a identificação da causa e efeitos relacionados com a carcinogénese. Isto também significa que ao contrário de doenças infecciosas ou inflamatórias não existe um agente etiológico identificável ou passível de tratamento, uma vez que nas neoplasias, o agente causador é duradouro, normalmente múltiplo, e por isso a massa resultante é o alvo do tratamento. Este é um conceito importante, porque limita a intervenção terapêutica na grande maioria dos casos, não sendo possível a cura da patologia identificada, mas apenas a sua manutenção e abrandamento com cuidados paliativos. O diagnóstico precoce tem por isso grande valor, na abordagem de lesões malignas e desordens orais potencialmente malignas, como é o caso da leucoplasia oral.⁴⁴

O conceito atual de desordens potencialmente malignas da mucosa oral surge baseado na seguinte evidência:³⁴

- a) Em estudos longitudinais, tecidos com determinadas alterações clínicas, identificadas inicialmente como sendo potencialmente malignas, evoluíram para lesões malignas durante o *follow-up*;
- b) Algumas destas alterações, particularmente placas vermelhas e brancas, podem coexistir com margens de carcinomas de células escamosas;
- c) Algumas destas lesões partilham alterações morfológicas e citológicas concordantes com neoplasias malignas epiteliais, mas sem invasão tecidual;
- d) Algumas das alterações cromossomais, genómicas e moleculares identificadas em cancros orais são detetadas em fases com provável potencial maligno.

Em 1978, uma revisão publicada pela WHO estabeleceu a seguinte distinção no que concerne às alterações pré-cancerosas:³³

A. Lesões pré-cancerosas, que se definem como tecidos morfológicamente alterados em que o processo de malignização é mais provável do que num tecido equivalente de aparência normal.

B. Condições pré-cancerosas, que se definem como estados generalizados de maior risco de desenvolvimento de cancro.^{34, 37}

Quadro 3. Classificação das lesões e condições pré-cancerosas	
Lesões pré-cancerosas	Condições pré-cancerosas
Leucoplasia Eritroplasia Lesões no palato em fumadores com cigarro invertido	Fibrose submucosa oral Queratose actínica Líquen plano Lúpus eritematoso discóide

Fonte: Kramer I, Lucas R, Pindborg J, Sobin L. Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1978;46(4):518-39.⁵⁹

A distinção entre lesões e condições pré-cancerosas não é meramente académica. Quando está identificada uma lesão pré-cancerosa no historial de um paciente, o aparecimento da patologia maligna faz-se aproximadamente na mesma localização. Por outro lado, no que diz respeito às condições pré-cancerosas, o cancro pode aparecer em qualquer localização anatómica da boca e faringe.³⁴

Embora esta divisão ainda seja praticada por alguns investigadores com trabalhos recentes, o conceito de *field cancerization* limita esta classificação, uma vez que o processo de transformação maligna não está circunscrito ao local onde clinicamente são visíveis estas patologias.³³ Atualmente tem-se conhecimento de que mesmo mucosas aparentemente normais em pacientes onde foram diagnosticadas OPMDs, podem ter alterações displásicas na mucosa contralateral ou aberrações moleculares noutros locais da orofaringe, sugestivas de processos de carcinogénese multifocal.³⁴

O termo potencialmente maligno foi pela primeira vez sugerido em 1993 por Johnson *et al.*³³ Tal como proposto por van der Waal *et al.*³², o termo pré-maligno/canceroso deve cair em desuso, uma vez que não foi estabelecido em nenhum caso uma relação direta entre lesões/condições pré-cancerosas e o aparecimento de cancro. Tal como referido anteriormente, a WHO sugere em 2007 a utilização de desordens orais potencialmente

malignas,^{34, 60} como um grupo de lesões e condições que não sofrem necessariamente transformação maligna, representado assim um conjunto de alterações morfológicas, que sugerem um potencial aumentado de malignização. As desordens potencialmente malignas da mucosa oral são também indicadores de risco do desenvolvimento de malignidade futura em qualquer localização anatômica, sem limitação à localização da lesão suspeita inicialmente diagnosticada.^{32, 34} Esta nomenclatura tem por objetivo uniformizar a utilização correta destas classificações, facilitando assim o estudo e a divulgação consensual desta temática.

Apesar da sua grande aceitação, os adjetivos pré-canceroso, pré-maligno e potencialmente maligno têm sido utilizados como sinónimos. De igual forma, a quantificação do mais provável ou do significativamente não é possível, uma vez que não representam em nenhum momento, um aumento cientificamente validado de qualquer taxa concreta de malignização.³⁷

Face à imutabilidade das taxas de sobrevivência no cancro oral, não obstante o desenvolvimento de técnicas terapêuticas mais avançadas e eficazes, é imperativo recorrer à prevenção primária e secundária por forma a melhorar o *outcome* final.^{7, 10}

O diagnóstico precoce das OPMDs diminui a morbilidade e mortalidade da doença oncológica oral, pelo que a prevenção primária e secundária foram definidos pela WHO como os principais objetivos para a monitorização do cancro oral. Apesar da maioria destas desordens ser provisoriamente diagnosticada por simples exame físico, a sua diferenciação com lesões inflamatórias é desafiante. A apresentação clínica destas alterações com potencial maligno é notavelmente heterogénea e pode facilmente mimetizar outras alterações reativas/inflamatórias mais comuns da mucosa oral. Esta abordagem tem limitações na definição das severidades e apenas é útil após o aparecimento de alterações visualmente distinguíveis da mucosa oral normal. Existe a necessidade vinculativa de realizar biópsia e subsequente análise diferencial, para confirmação de diagnóstico de qualquer uma destas patologias orais.⁷ Além disso, o cancro oral é dos poucos tipos de doença maligna que permite a realização de biópsias em todos os estadios da doença e o consequente estudo da progressão genética de fases precoces à metastização.¹⁴

O diagnóstico destas desordens potencialmente malignas requer monitorização clínica regular, através de consultas de rastreio semestrais, normalmente proteladas pela comunidade médico-dentária. Sem exceção, todos os indivíduos saudáveis com mais de 35

anos devem fazer exames orais ocasionais. A detecção visual de placas brancas/vermelhas e de zonas inflamadas é facilmente realizada, somente com a ajuda de luz incandescente.¹⁴

Além do exame físico por rotina, existem outros métodos e técnicas coadjuvantes que têm sido desenvolvidas para detetar eficazmente lesões e determinar as suas severidades. A quimioluminescência consiste no diagnóstico de lesões da mucosa oral através de luz azul/branca quimioluminescente difusa (λ 490-510nm) após bochecho oral com uma solução de ácido acético a 1%. À mucosa oral normal corresponde a apresentação de coloração azul, enquanto a coloração mais brilhante com margem bem definida indica possível transformação da mucosa (diferente reflexão da luz por maior rácio núcleo:citoplasma). Ainda que eficaz³² este método nem sempre deteta lesões precoces.⁶

Por seu turno, a fluorescência tecidual também é frequentemente aproveitada para detecção de OPMDs. Durante a transformação celular e tecidual que desencadeia o aparecimento destas patologias, ocorre a hiperqueratinização dos tecidos, a acumulação de cromatina e metabolitos, e alterações na matriz de colagénio e elastina. Estas alterações podem ser detetadas por diferenças no λ (autofluorescência tecidual) da luz que é emitida pelos tecidos. A mucosa oral normal emite autofluorescência verde pálida, enquanto lesões anormais exibem autofluorescência diminuída, de cor preta, em relação aos tecidos saudáveis circundantes. Este método pode não ser eficaz em lesões de pequenas dimensões,⁶ pelo que também não está recomendada a sua utilização por rotina para diagnóstico das OPMDs.²⁶

A espectroscopia fluorescente tecidual é outra técnica através da qual se utiliza fibra ótica, para produzir luz com vários comprimentos de onda por excitação tecidual. O espectro fluorescente produzido é detetado por espectrógrafo e analisado por *software* próprio que indicará a suscetibilidade maligna da lesão observada.^{6,32}

Todavia, os métodos citológicos continuam a ser considerados como *standards* na avaliação de lesões orais. O diagnóstico definitivo, na ausência de sinais patognomónicos, é, para a maioria da patologia oral, confirmado pela interpretação médica do relatório histopatológico. A mais comum coloração por H-E e visualização microscópica oferecem pistas de acordo com a atipia celular e estado de maturação epitelial (displasia epitelial oral) para identificação do potencial maligno. A citologia por aspiração com agulha fina (FNAC) é um excelente método para identificação de lesões orais, ainda que apresente limitações no diagnóstico precoce. O *OralCDx brush test*, conhecido também por biópsia aspirativa, caracteriza-se por raspar e coleccionar células epiteliais de diferentes camadas histológicas. As

amostras são recolhidas e sujeitas a fixação em lâmina de vidro. Segue-se a análise de várias características citológicas, imunohistoquímicas e moleculares que determinam a severidade da lesão.⁶ Este método deteta facilmente alterações displásicas de lesões com elevado risco, mas tem utilização limitada nas lesões de menor risco. Apresenta pouca sensibilidade e especificidade no diagnóstico das OPMDs.²⁶ Tem a vantagem de não se circunscrever a lesões clinicamente visíveis, ao contrário da biópsia incisional que limita o estudo da cancerização de campo.¹⁷ No entanto, na raspagem não se respeita a integridade do tecido sujeito a diagnóstico, não sendo possível observar a organização da arquitetura tecidual, e as amostras são contaminadas por algumas células tipo-selvagem, por não se circunscrever a um determinado local.^{6,32}

Para além destas técnicas o azul de toluidina é um corante que cora ácidos nucleicos e pode detetar diferenças na ploidia de DNA das células presentes em tecido potencialmente maligno.⁶ Esta técnica de coloração poderá ser útil na identificação das OPMDs,³² embora atualmente não exista evidência que suporte a sua utilização com valor de diagnóstico.²⁶

Em suma, escasseiam os estudos que avaliem a eficácia dos diferentes métodos de diagnósticos mais comuns: inspeção visual, imagiologia por fluorescência, azul de toluidina e citologia exfoliativa (*brush biopsy*). O desenvolvimento de métodos bioquímicos (e.g. amostras salivares e serológicas) e moleculares pretende ultrapassar as limitações no diagnóstico histológico desta patologia, pressupondo a otimização do valor preditivo no momento do diagnóstico.^{6,26,40} Estes biomarcadores podem representar alterações sistémicas momentâneas, enquanto determinadas alterações celulares ou tecidulares ainda não evidenciam clinicamente potencialidade maligna.⁵⁵

A saliva é uma secreção aquosa da cavidade oral que pode conter células vivas ou mortas, DNA, RNA e metabolitos ou *footprints* de OPMDs existentes na cavidade oral.^{6,61} O seu estudo não é mais exigente do que a análise imunohistoquímica (IHC) de biomarcadores através de espécimes biopsados, sendo a recolha mais fácil e confortável para o paciente.⁶¹

Estão disponíveis vários estudos que sugerem alterações dos padrões bioquímicos salivares como indicadores da presença e capacidade de malignização das OPMDs. A *truncated cystatin SA-1* presente na saliva tem sido proposta como marcador para tumores orais. A expressão salivar da IL-8 e IL-1 β encontra-se significativamente aumentada em pacientes com cancro oral face a indivíduos saudáveis. Encontram-se metilados vários genes expressos em amostras salivares em pacientes com lesões orais, pelo que podem constituir

marcadores precoces significativos para cancro oral. Da mesma forma, os níveis da *Cyfra 21-1* (fragmento solúvel da K19 presente na saliva) correlacionam-se com a presença de cancro oral.⁶

Além destes, outros biomarcadores salivares proteicos e específicos para o OSCC têm sido propostos. Assim, os autores sugerem que será útil desenhar uma ferramenta de diagnóstico por biomarcadores salivares, que detete mais facilmente OPMDs em estadios precoces.⁶ Ainda que a saliva seja boa fonte de marcadores para deteção do cancro oral, não constitui por si só diagnóstico definitivo.²²

A utilização de fluidos corporais como substrato de diagnóstico estende-se à análise serológica. A deteção de antigénios circulantes pode providenciar grande quantidade de informação em várias doenças, incluindo o OSCC.⁶

Esta hipótese é suportada por vários estudos, incluindo os que envolvem o transcriptoma sérico do cancro oral. O aumento do microRNA plasmático miR-31 e as alterações dos níveis séricos do fator de crescimento vascular endotelial (VEGF) têm sido propostos como marcadores do cancro oral. Outras proteínas como o EGFR, queratinas, recetor 87 acoplado a proteína G, GTPase Rab11, proteínas com domínio PDZ e proteínas nucleares contendo PEST, têm sido identificadas como sobreexpressas no soro de pacientes diagnosticados com cancro oral. O autoanticorpo p53 foi detetado no soro de 25% dos pacientes com HNSCC. Da mesma forma outros estudos reportaram a sua presença no soro e correlação com metástases das cadeias linfáticas.⁶

A PGE₂, produto da COX, desempenha um papel na oncogénese do OSCC induzida pelo tabaco. Além disso os níveis da C16, C24 e C24:1-*ceramide* aumentam e os da C18-*ceramide* diminuem no OSCC, indicando um possível valor preditivo destes marcadores.⁶ É necessária mais investigação no que diz respeito aos níveis hormonais e de metabolitos no soro destes pacientes. Atribui-se vulgarmente aos homens maior suscetibilidade a OSCC. Ainda que seja difícil averiguar o papel do tabaco e álcool, estão em jogo diferentes hormonas e respetivos recetores com diferentes repercussões no desenvolvimento de OSCC. Em modelos animais já foi estabelecida associação entre hormonas sexuais e a iniciação de carcinomas na língua. Além disso, as mulheres com história médica precedente de toma de estrogénios parecem estar menos suscetíveis ao desenvolvimento de leucoplasia oral, enquanto a diminuição de estrogénio que acompanha a menopausa torna as mulheres mais

suscetíveis à leucoplasia. É necessária mais pesquisa para validar estes parâmetros de diagnóstico e previsão da malignização.⁶

Ainda que possamos assistir à franca evolução destes métodos, todas as técnicas de diagnóstico, à exceção da vulgar biópsia incisional, devem ainda ser interpretados como acessórios ao exame clínico de lesões com elevado risco. Nos casos mais dúbios, a análise bioquímica e molecular poderá no futuro oferecer informação útil.⁶ São necessários estudos que integrem a histopatologia, biomarcadores e *profiling* molecular, com parâmetros clínicos bem estabelecidos, incluindo populações homogêneas e *follow-ups* a longo prazo,⁷ para que seja possível desenhar diferentes *kits*, *chips* e mapas genéticos baseados na evidência disponível para a oncogênese oral.^{6,33}

Estas ferramentas devem ser otimizadas para aplicação clínica diária. A utilização eficaz destas técnicas com elevados níveis de sensibilidade deverá permitir a detecção precoce, fiável e alargada de cancro oral em populações de risco e por fim analisar lesões de maior suscetibilidade à malignização.⁶

O quadro que se segue resume os diferentes métodos de diagnóstico para as OPMDs.

Quadro 4. Análise abrangente das desordens orais potencialmente malignas		
Exame oral	Material	Análise
<u>Exame oral primário</u> <u>Quimioluminescência</u> <u>Espectroscopia</u>	Exame visual da mucosa oral	Placas brancas com margens distintas. Natureza da autofluorescência; aparência (luz emissora escura – lesão potencial, verde pálido – normal). Utilização de fibra ótica com luzes de vários λs. Fluorescência recebida por espectroscópio e análise computadorizada.
<u>Exame oral secundário</u> <u>Testes citológicos</u> <u>Testes histológicos</u> <u>(H-E, azul de toluidina)</u>	Células (CDx <i>Brush</i> /FNAC) Espécimen do órgão afetado	Aparência, rácio núcleo:citoplasma, extensão da marcação nuclear, presença de células anormais, células atípicas. Arquitetura tecidual alterada.
<u>Exame oral terciário</u> <u>Testes bioquímicos (MS; ELISA)</u> <u>Testes moleculares</u> <u>(micro, -nanarray)</u>	Análise bioquímica da saliva e soro DNA, RNA e proteínas do órgão afetado	Metabólitos ou <i>footprints</i> da lesão. DNA – genes analisados quanto à possível amplificação, LOH, mutação, SNP, metilação, etc. RNA: mRNA, miRNA e o padrão de expressão. Proteína: expressão e nível de ativação proteica (oncogenes e supressoras tumorais), estado pós-transcricional.

Fonte: Mishra R. Biomarkers of oral premalignant epithelial lesions for clinical application. *Oral Oncology*. 2012;48(7):578-84. Epub 2012 Feb 18.⁶

1.6. Leucoplasia oral

O aparecimento de cancro oral não respeita uma progressão clínica linear. Não está determinada qual a percentagem de carcinomas orais que derivam de OPMDs e de mucosa aparentemente normal.³³ Alguns autores reportam um risco de desenvolvimento de cancro oral 8-10 vezes superior em pacientes com leucoplasia,⁶² enquanto outros investigadores defendem que a maioria deriva de mucosa oral aparentemente normal.⁴²

A leucoplasia oral é considerada a OPMD mais comum, representando cerca de 80% de todas as OPMDs, afetando aproximadamente 1-5% da população.³¹ Após revisão sistemática, Petti²¹ publicou uma prevalência global realística de 2,60% (95% CI: 1,72%-2,74%) para a leucoplasia oral. A estimativa de prevalência global de leucoplasia neste estudo foi bem inferior ao intervalo apresentado por estudos de menor impacto (11-27%). Normalmente estes valores tão díspares estão associados a áreas geográficas com estilos de vida específicos, ou outros fatores de risco que não representam a população em geral. A heterogeneidade dos resultados deve-se igualmente à falta de representatividade das amostras incluídas e à inexistência de critérios de diagnóstico universalmente utilizados para a leucoplasia. No mesmo estudo também se demonstrou que a leucoplasia é significativamente mais prevalente entre homens (rácio de 3,22), mas sem diferenças entre áreas geográficas e entre jovens e adultos com <50 anos.²¹

De acordo com os estudos mais recentes, a frequência anual de transformação maligna para todas as formas de leucoplasia é alta, variando entre 0,7%-2,9%. Petti²¹ definiu uma taxa de malignização anual para a leucoplasia oral de 1,36% (95% CI: 0,69%-2,03%), sendo que aproximadamente 17-25% dos casos de cancro oral foram atribuídos à leucoplasia oral,²¹ embora figurem estudos com associações superiores a carcinoma oral de 16-62%.³³ Todavia, os dados da incidência de leucoplasia oral são raros. Um estudo japonês recente reportou um rácio de incidência ajustado à idade de 409 homens e 70 mulheres para 100 000 pessoas. Um estudo indiano, conduzido numa população com diferentes fatores de risco, reportou valores mais baixos: 240 homens e 3 mulheres para 100 000 pessoas.⁶³ Segundo a revisão sistemática por Petti²¹, a incidência anual de cancro oral atribuída à leucoplasia deveria variar entre 6,2-29,1 por 100 000 casos. O limite inferior deste intervalo é maior do que a habitual incidência anual de cancro oral (5,56 por 100 000), pelo que o número de casos de cancro oral deve estar subestimado,²¹ principalmente nos PVD, onde os programas de rastreio de Saúde Pública escasseiam.³⁵

Por sua vez, Scully e Bagan²⁰ apresentaram um rácio de transformação maligna superior a 5% para a leucoplasia oral. Alguns autores apontam para um rácio de malignização entre 0-34% para períodos de *follow-up* de até 30 anos.^{10, 63} De acordo com os dados epidemiológicos europeus, o limite superior para o rácio anual de transformação maligna situa-se abaixo de 1%. Menos de metade (33-42%) das leucoplasias sofre malignização nos primeiros 2 anos após o diagnóstico, aumentando a incidência de malignização com a duração do *follow-up*, pelo que a avaliação apropriada dos rácios de malignização da leucoplasia necessita de estudos com grandes amostras e períodos de monitorização alargados, em ensaios randomizados e controlados (RCTs) multicêntricos. A maioria dos estudos prospetivos não cumpre estas premissas.⁶³

Em 2007, a WHO publicou, após *meeting* internacional de *experts* na área, uma avaliação crítica das definições propostas até ao momento para leucoplasia oral. Definiram-na como: “A *white plaque of questionable risk having excluded (other) known diseases or disorders that carry no increased risk for cancer.*”^{16, 32, 34} A terminologia apresentada adequa-se ao conhecimento atual da oncogénese, como uma sequência de processos.^{33, 34}

Quadro 5. Definições de leucoplasia oral propostas nas últimas décadas	
Grupo de trabalho	Definição
<u>WHO 1978</u>	Placa/ <i>patch</i> branca que não pode ser caracterizada clinicamente ou histologicamente como outra doença
<u><i>First International Conference on oral leukoplakia. Malmo, Sweden</i></u> <u>(Axéll et al. 1984)</u>	Placa ou <i>patch</i> branca que não pode ser caracterizada clinicamente ou histologicamente como outra doença e não está associada a agentes físicos ou químicos exceto o uso de tabaco
<u><i>International Symposium. Uppsala, Sweden</i></u> <u>(Axéll et al. 1994)</u>	Lesão predominantemente branca da mucosa oral que não pode ser caracterizada como outra doença; algumas leucoplasias transformam-se em cancro
<u>Pindborg et al. 1997 (WHO)</u>	Lesão predominantemente branca da mucosa oral que não pode ser caracterizada como outra doença
<u>WHO 2005</u>	Sem definição ou sem distinção com outras placas brancas
<u>Warnakulasuriya, Johnson e van der Waal 2007 (WHO)</u> ³⁴	Placas brancas de risco questionável após exclusão de outras doenças ou desordens que não tenham risco aumentado de malignização

Fonte: Warnakulasuriya S, Johnson N, van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med.* 2007;36:575-80.³⁴

O termo leucoplasia oral é clínico e o diagnóstico feito por exclusão, tendo em conta as semelhanças clínicas com várias patologias orais e por não partilhar alterações histológicas específicas.³⁶ À semelhança de outras OPMDs, a leucoplasia caracteriza-se pela presença de alterações celulares (atrofia, hiperplasia, acantose ou displasia epitelial) e subcelulares (citogenéticas, mutações, mitocondriais, epigenéticas).⁴³

Apresenta um padrão comportamental muito variável mas com tendência para malignização. Deve ser lembrado que a displasia epitelial oral não tem aparência clínica específica, e o termo não deve ser usado para descrever clinicamente uma lesão branca.³⁴

Fundamentalmente, a leucoplasia oral é classificada em dois tipos clínicos: homogénea (lesão plana, pouco espessa, branca e uniforme) e não-homogénea/heterogénea.^{16, 32, 34} A distinção entre elas é simplesmente clínica, baseada na cor da superfície e nas suas características morfológicas (espessura), tendo influência sobre o respetivo prognóstico.³⁴

As lesões homogéneas são uniformemente planas, finas e exibem fissuras pouco profundas na superfície queratinizada.^{16, 34} Podem apresentar-se corrugadas, enrugadas, de aspeto espumoso, sendo o aspeto corrugado mais frequente no pavimento da boca definido como “*ebbing-tide*” type of leukoplakia. A localização anatómica da lesão pode influenciar a sua morfologia.¹⁶

A aparência enrugada (*wrinkled*) da mucosa é característica dos fumadores de rapé (*snuff*). Este aspeto tem sido usado para estadiar a severidade das lesões em estudos na Suécia e USA. As aberturas dos ductos das glândulas salivares *minor* podem apresentar-se caracteristicamente como um ponteadado vermelho, havendo a necessidade de diagnóstico diferencial com leucoplasia não homogénea ponteadada. A aparência enrugada raramente ocorre com displasia.¹⁶

A apresentação clínica “espumosa” é caracterizada por estrias brancas delicadas e parece ser uma reação específica da mucosa oral causada pelo tabaco ou consumo de rapé.¹⁶

Pode ser observado um misto destas diferentes apresentações clínicas numa só lesão leucoplásica homogénea. O risco de malignização das leucoplasias homogéneas é relativamente baixo,¹⁶ sendo que apenas 5% das leucoplasias homogéneas desenvolvem carcinoma.³⁵

As lesões não homogêneas representam apenas 10% de todas as lesões leucoplásicas.¹⁶ No entanto consentem um risco de malignização 4-5 vezes superior³³ e incluem diferentes apresentações:^{16, 32, 34}

- Ponteadas: coloração branca (*speckled*/leucoeritroplasia) ou vermelha (eritroleucoplasia) predominante;
- Nodular: pequenos crescimentos exofíticos polipóides, com excrescências brancas ou vermelhas arredondadas;
- Verrucosa: superfície de aparência enrugada ou ondulada. Por norma é difícil a sua distinção do papiloma escamoso ou do carcinoma verrucoso. Apesar de normalmente apresentar cor branca uniforme, a sua textura verrucosa distingue-a da leucoplasia homogênea.

Segundo os *experts*, a classificação de leucoplasia quanto à sua aparência mais ou menos homogênea é imprecisa e de valor limitado. Contudo, aquelas que se apresentem eritroleucoplásicas devem ser reconhecidas como de maior risco.^{16, 34}

Correspondendo ao conceito de cancerização de campo, existe um subtipo raro de leucoplasia não homogênea, a leucoplasia verrucosa proliferativa. Esta exhibe placas brancas múltiplas e simultâneas, de crescimento lento, abrangendo frequentemente áreas extensas.⁶⁴ Os estudos têm notado a apresentação multifocal em 3-24% dos pacientes com OPMDs, sendo a leucoplasia a forma mais comum de doença com apresentação difusa.⁶⁵ Pode ou não existir associação etiológica com o consumo de tabaco e parece ser mais frequente em mulheres com mais de 60 anos. Normalmente recidiva após excisão.^{16, 32, 34, 64} A leucoplasia verrucosa proliferativa apresenta resistência ao tratamento e elevado rácio de malignização (60-100%), podendo fazê-lo num período alargado de 10-15 anos. A malignização coincidente de diferentes locais da cavidade oral faz-se de acordo com a sua aparência multifocal.^{16, 32, 34, 64} O frequente desenvolvimento sincrónico ou metacrónico de nova doença em local distinto, reflete igualmente o conceito de *oral field cancerization* e constitui um grave problema na monitorização destas lesões múltiplas.²³

Além da variedade de tipos e subtipos clínicos das lesões leucoplásicas, outras descrições clínicas são consideradas na caracterização das leucoplasias orais:^{34, 35}

- Etiologia: manifestamente associadas a hábitos tabágicos e consumo de *areca nut*, ou idiopáticas;
- Localização anatômica, definindo sítios específicos da boca ou orofaringe;
- Tamanho/extensão das lesões.

O tabaco e o álcool constituem os dois fatores de risco mais importantes, sendo que o consumo de tabaco nas suas mais diferentes formas, apresenta-se como o fator de risco *major* para a leucoplasia oral.^{21, 35} A leucoplasia oral é até 6 vezes mais frequente em fumadores.³² Através de estudos transversais tem sido apresentada uma incidência anual de leucoplasia oral em 5,2-30,2/1000 indivíduos fumadores, dependendo das características dos hábitos. Os não consumidores de tabaco desenvolvem menos lesões, aproximadamente 0,6-5,8/1000 pessoas. A cessação deste hábito está relacionada com o desaparecimento substancial destas lesões e com menor incidência de leucoplasia.³⁵

Existem vários tipos de consumo de tabaco para além do fumado normalmente nos países europeus. O tabaco de mascar predomina em determinadas áreas geográficas, destacando-se o Sudeste Asiático. O consumo de rapé predomina na Escandinávia e parece ser de baixo risco. Por outro lado, o consumo de *areca nut* e de outros *quids* com componentes de tabaco, predominantes na Ásia, África e América do Norte, está associado a maior risco de desenvolvimento de cancro oral. Os distintos hábitos de consumo refletem-se na heterogeneidade clínica das lesões leucoplásicas entre pacientes fumadores ou mascadores de tabaco.³³ Assim, os diferentes hábitos associam-se a variações no risco de malignização.³³ O índice de transformação maligna nos PD tende a ser superior, também porque os estudos são feitos em amostras hospitalares de risco ou em pacientes acompanhados por especialistas, após contacto com cuidados primários de saúde. A seleção da amostra nos estudos em PVD é na sua maioria aleatória e por isso mais heterogénea.³⁵

Apesar do tabaco ser um dos fatores de risco mais importantes associados à leucoplasia, as lesões em pacientes consumidores de tabaco aparentemente representam menor risco de desenvolverem OSCC. Num estudo sueco, uma frequência cumulativa de cancro foi superior no grupo não consumidor de tabaco (1,1% em 2 anos, 3,1% em 5 anos) em comparação com fumadores (0,4% em 2 anos, 0,4% em 5 anos). Uma tendência similar foi observada na Dinamarca; onde 5/45 leucoplasias (11,1%) em não consumidores de tabaco

sofreu malignização, em comparação com 6/283 lesões (2,1%) em consumidores de tabaco. Na Hungria, a proporção de fumadores no grupo das leucoplasias que desenvolveram tumor (78%) foi menor do que o grupo que não evoluiu para OSCC (87%). A diferença foi atribuída à maior predisposição para a transformação maligna em leucoplasias não associadas ao tabaco. Dos 74 não fumadores de um grupo de 257 pacientes californianos com leucoplasia, 18 pacientes desenvolveram OSCC (24%). Pelo contrário, surgiram 21 carcinomas em 133 indivíduos que continuaram a fumar após o diagnóstico (16%) e apenas 6 OSCC surgiram em 50 indivíduos que pararam de fumar após diagnóstico de leucoplasia (12%). Numa série de 46 leucoplasias com *follow-up* na Holanda, os únicos 3 pacientes que desenvolveram OSCC eram não fumadores. Num estudo alargado, pacientes mulheres não fumadoras com leucoplasia apresentaram risco aumentado estatisticamente significativo de transformação maligna, comparando com mulheres que fumaram, sem que fosse possível estabelecer relação para os homens. Schepman *et al.* sugeriram uma relação entre o consumo de tabaco e o desenvolvimento de leucoplasias no pavimento da boca, sendo mais frequente nos bordos da língua entre não fumadores. Sendo estas duas localizações intraorais consideradas como áreas de risco aumentado, a relação entre tabaco e o risco de transformação maligna não parece depender do local preferencial de leucoplasias em fumadores e não fumadores. Por outro lado, as leucoplasias sem fator etiológico óbvio, ditas idiopáticas, demonstraram um risco significativamente maior de transformação maligna, em comparação com leucoplasias onde foram identificados os agentes associados.^{35, 33}

Assim, os dados disponíveis não confirmam o consumo de tabaco como fator de risco para a malignização de lesões leucoplásicas.³⁵

O clínico deve também ter em conta, que se o consumo de tabaco for identificado como fator causal direto para uma determinada lesão branca, i.e., se a lesão desaparecer quando o paciente deixa de fumar, a sua apresentação inicial não pode ser definida como leucoplasia. Existe um sinal clínico que indica a indução por tabaco: finas estrias brancas, que, em conjunto, imitam uma impressão digital na mucosa. Estas lesões são definidas como “*fingerprint lesions*” ou “*pumice stone*”. Histologicamente demonstram um padrão de queratinização *chevron-like* (também referido como “*church-spire*” ou “*Christmas tree-like*”). A evidência defende que estas lesões desaparecem com a cessação do tabagismo, sendo normalmente consideradas lesões inocentes sem potencial maligno. Não está no entanto confirmado, se estas lesões “*fingerprint*” desenvolvem leucoplasia, isto é, se o padrão característico é perdido e as mesmas adquirem potencial de transformação maligna.

Desconhecem-se quais as leucoplasias sem padrão “*fingerprint*” que desaparecem após eliminação dos hábitos tabágicos. Contudo, algumas lesões associadas ao consumo de tabaco, mas sem padrão “*fingerprint*”, são possivelmente tão alarmantes como lesões não relacionadas com tabaco. Provavelmente existe uma continuidade de alterações, que se tornam irreversíveis após a acumulação de danos genéticos nas células estaminais do epitélio oral. Assim, a distinção entre leucoplasias associadas ao tabaco e leucoplasias idiopáticas na determinação do prognóstico pode ser questionada.³³

O álcool parece ser um fator de risco independente, sem discriminação do tipo de bebida ou padrão de consumo.³² Todavia, em 15 811 participantes do *National Health Nutrition Examination Survey* nos USA (1988-1994), não foi considerado como fator de risco independente para a leucoplasia.³⁵ O consumo médio de álcool é muito alto na Europa e América. No entanto, nos PVD, a produção e ingestão de álcool informal é extremamente importante, atingindo 80% do álcool disponível para consumo, pelo que os dados reais destes países estão subestimados. O consumo de álcool entre faixas etárias varia consoante os países, sendo marcadamente mais alto nos homens na maioria dos estudos de todo o mundo. Pelas inconsistências na caracterização deste hábito a sua importância como fator de risco para a leucoplasia oral não deve ser descartada, sendo necessários estudos que avaliem a sua dependência de outros parâmetros possivelmente etiológicos.²¹

A associação entre a candidíase e o risco de desenvolvimento maligno surge da aparente relação da *C. albicans* com leucoplasias homogêneas. A aparência clínica inicial pode ser alterada, tornando-se ulcerada ou com um componente eritematoso mais marcado em pacientes não imunodeprimidos. Esta lesão pode também evoluir para uma leucoplasia nodular.¹⁶

Apesar do maior rácio de transformação maligna associado às leucoplasias infetadas por *Candida*, a candidíase normalmente afeta as comissuras labiais e dorso da língua, locais com pouca tendência ao desenvolvimento de cancro oral.³² No entanto esta questão não está esclarecida. A discussão neste momento prende-se em distinguir a infeção por *Candida* como fator etiológico ou como infeção oportunista de uma lesão leucoplásica pré-existente. Tem sido demonstrado em ensaios terapêuticos com antifúngicos locais, que as leucoplasias não homogêneas infetadas por *Candida* se convertem em lesões homogêneas ou acabam por regredir, o que suporta cada uma das hipóteses em discussão.³³

Se aceitarmos a definição da WHO (Pindborg *et al.*, 1977) ou Axéll *et al.* (1996) para a leucoplasia oral, a discussão quanto à sua etiologia deixa de ser racional. A definição é dada pela aparência clínica sem conhecimento da etiologia. Ainda assim, os pacientes devem ser incentivados a cessar hábitos tabágicos e na presença de infecções por *Candida*, à administração dos antifúngicos recomendados. A lesão remanescente, após cumprimento das recomendações médicas, deve ser então reavaliada para a possibilidade de existir leucoplasia.³³

O papel do HPV na etiologia e potencial de transformação maligna das OPMDs tem sido amplamente estudado, embora os resultados sejam inconsistentes.^{32, 35} Uma meta-análise reportou uma frequência aumentada do HPV em OPMDs e OSCC em 2-3 e 4-5 vezes, quando comparados com epitélio oral normal. O estudo também confirmou que o HPV16/18 estava mais frequentemente associado a OSCCs. No entanto, pela incongruência das metodologias e qualidade dos estudos, estes dados devem ser cautelosamente interpretados. Assim, não é atribuído um papel etiológico ao HPV, havendo no entanto preocupação quanto à sua influência no comportamento maligno das OPMDs.³³ Ocasionalmente, podem ser observadas alterações coilocíticas em lesões displásicas – displasia coilocítica – aparentemente relacionadas com a presença das estirpes oncogénicas do HPV. Da mesma forma, a importância clínica e o potencial de transformação maligna estão por determinar.³²

Os estudos têm atribuído risco elevado a algumas localizações intraorais como o pavimento da boca e a face ventral e lateral da língua, apesar da maioria das leucoplasias se encontrar na mucosa jugal.³⁵ Num dos estudos, 24% dos 29 pacientes com queratose sublingual no pavimento da boca e/ou face ventral da língua desenvolveram carcinoma, num período de *follow-up* de 1 a 19 anos. Num *follow-up* de 166 leucoplasias estes dados foram contrapostos, não sendo possível atribuir maior rácio de malignização a leucoplasias do pavimento da boca.³³

Possivelmente este conceito de locais de risco aumentado pode confirmar-se com estudos genéticos. As displasias epiteliais em localizações de maior risco demonstraram maior frequência de perda de heterozigotia (LOH) e risco aumentado de progressão para carcinoma. Foram analisadas 71 displasias epiteliais do pavimento da boca, superfície ventrolateral da língua e palato mole, áreas consideradas de risco elevado, e 56 displasias epiteliais de outras localizações de menor risco. Os resultados não foram influenciados por fatores clinicopatológicos como o género ou hábitos tabágicos.³³

Assim, o conceito de localizações de maior risco como o pavimento da boca, superfície ventrolateral da língua e possivelmente palato mole não está ainda confirmado. Defende-se que o pavimento da boca e face ventrolateral da língua estejam mais expostos a carcinogêneos concentrados na saliva do que outras mucosas da cavidade oral, além de que por estudos experimentais se valorize a maior permeabilidade do epitélio.³³

Em suma, o diagnóstico provisório de leucoplasia deve ser feito quando uma lesão predominantemente branca ao exame clínico não pode ser claramente diagnosticada como sendo outra doença ou desordem da mucosa oral.³⁴

O diagnóstico diferencial é imprescindível, sendo a biópsia obrigatória. A biópsia incisional pode não ser representativa para as leucoplasias não homogêneas. Por outro lado, as lesões mais pequenas, e.g. <2-3cm, devem ser excisionadas. Nos casos em que existem lesões distribuídas ao longo da mucosa oral devem ser consideradas múltiplas biópsias – *field mapping* – eventualmente com anestesia geral.³² O diagnóstico definitivo é feito quando qualquer causa relativa é excluída à exceção dos hábitos tabágicos e do consumo de *areca nut* e a histopatologia não confirma outra desordem específica.^{16, 34} Na tabela que se segue figuram algumas destas patologias:^{32, 34}

Quadro 6. Patologias orais para diagnóstico diferencial de leucoplasia		
Patologia	Apresentação	Biópsia
<u>Nevo branco esponjoso</u>	Primeiras décadas de vida, historial familiar, áreas extensas, mucosa genital pode estar afetada	Biópsia não está indicada
<u>Queratose friccional</u>	História de trauma, maioria ao longo do plano oclusal, causa aparente, maioria reversível por remoção da causa	Biópsia se persistir após remoção da causa, particularmente em fumadores
<u>Morsicatio buccarum</u>	Paciente tem consciência que morde a bochecha e/ou lábio, flocos brancos com margens irregulares	Biópsia não indicada
<u>Lesão química</u>	Historial conhecido, localização corresponde ao local da agressão química (ácido acetilsalicílico), dolorosa, resolve rapidamente	Não indicada
<u>Candidíase pseudomembranosa aguda</u>	Membrana removida deixando superfície eritematosa	Esfregaço para cultura
<u>Leucoedema</u>	Bilateral na mucosa vestibular, sinal de Godet positivo, racial	Não indicada
<u>Líquen plano em placas</u>	Outras formas de líquen plano (reticular) também presentes	Consistente com líquen plano; pode apresentar displasia liquenóide

<u>Reação liquenóide</u>	Historial de consumo de fármacos, e.g. proximidade com restauração a amálgama	Consistente com líquen plano ou reação liquenóide
<u>Lúpus eritematoso discóide</u>	Lesão circunscrita com centro eritematoso, linhas brancas radiais	Biópsia consistente com lúpus apoiada por imunofluorescência e outros exames
<u>Enxerto</u>	Historial conhecido	Não indicada
<u>Leucoplasia pilosa</u>	Queratose lingual bilateral	Histopatologia específica com coilocitose; vírus Epstein-Barr presente
<u>Leucoqueratose nicotínica palatina/estomatite nicotínica</u>	Hábito tabágico, palato branco acinzentado	Não indicada
<u>Papiloma e lesões relacionadas</u>	Apresentação clínica; historial	Histopatologia
<u>Sífilis secundária</u>	Aspeto clínico	Identificação da <i>Treponema pallidum</i> ; serologia

Fontes: van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncology*. 2009;45(4-5):317-23.³²; Warnakulasuriya S, Johnson N, van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med*. 2007;36:575-80.³⁴

O termo leucoplasia pilosa foi introduzido para descrever uma lesão branca característica, que quase exclusivamente ocorre nos bordos linguais de alguns indivíduos infetados por HIV. Esta terminologia pode ser enganosa já que não coincide com a definição anteriormente defendida para leucoplasia. A leucoplasia pilosa não apresenta risco de malignização.¹⁶

A infeção pelo vírus Epstein-Barr (EBV) é por vezes referida como fator de risco. O EBV é um vírus de DNA da família *herpesviridae*. É conhecido como fator causal da mononucleose infecciosa e aparentemente está associado a uma variedade de cancros humanos, incluindo linfoma de células B e T, doença de Hodgkin, carcinoma nasofaríngeo, gástrico e leiomiomas. Os recetores deste vírus expressam-se no epitélio oral normal e maligno, sugerindo por isso que o EBV pode infetar as células epiteliais orais. Muitos investigadores têm estudado o seu papel na oncogénese oral, obtendo resultados variáveis e contraditórios na sua associação com o OSCC, por técnicas de deteção e amostras de diferentes áreas geográficas, com elevadas prevalências em populações imunocomprometidas. Existem inclusivamente estudos que associam a presença do vírus a melhor prognóstico deste carcinoma oral. Apesar da evidência limitada e pouco esclarecedora do seu papel causal, a comunidade científica encara a sua presença como resultado de infeção oportunista, não sendo um fator etiológico *major* para o OSCC.⁶⁶

O diagnóstico de leucoplasia pode assim ser feito com diferentes níveis de certeza (*C-factor*), sendo unicamente clínico (C1 ou C2) ou também histopatológico (C3 ou C4):³²

- C1 – numa só consulta, evidência por inspeção e palpação – diagnóstico clínico provisório;
- C2 – após resultado negativo da eliminação de fatores etiológicos prováveis, e.g. trauma, durante um período de *follow-up* de 2-4 semanas ou na ausência de qualquer fator etiológico suspeito – diagnóstico clínico definitivo;
- C3 – tal como C2, mas complementado por biópsia incisional (diagnóstico histopatológico provisório);
- C4 – excisão e exame patológico do espécimen - diagnóstico histopatológico definitivo.

Foi divulgado por Warnakulasuriya *et al.*³⁴ um esquema que representa as diferentes etapas do diagnóstico da leucoplasia oral.

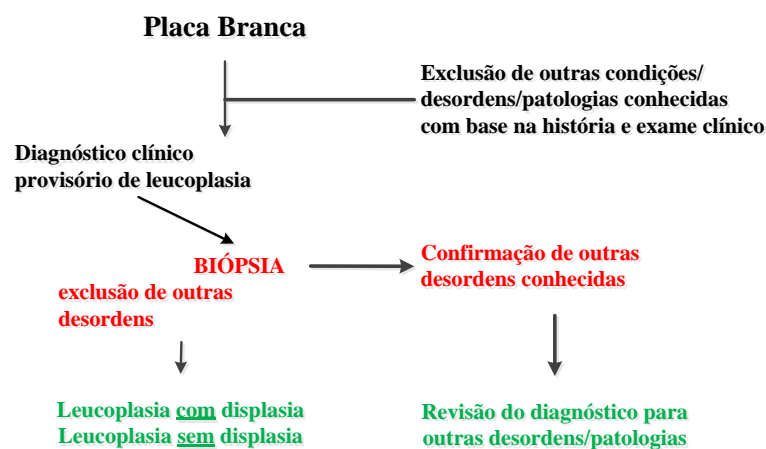


Figura 3. Representação por etapas do diagnóstico de leucoplasia oral.

Fonte: Warnakulasuriya S, Johnson N, van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med.* 2007;36:575-80.³⁴

Têm sido sugeridos sistemas de estadiamento para a leucoplasia oral que combinam aspetos clínicos e histopatológicos. No entanto nem sempre os estudos são reprodutíveis ou os resultados comparáveis, pelo que a associação de características clínicas e histopatológicas de maior potencial de malignização nem sempre é consistente.³⁴

Com o objetivo de estabelecer coerência entre os dados publicados, van der Waal³² sugere a utilização de uma classificação que inclua o tamanho (L) e as características histológicas (P) da lesão.

Quadro 7. Classificação e sistema de estadiamento para as leucoplasias orais (<i>Oral Leukoplakia-system</i>)	
L (tamanho da leucoplasia)	
<u>L1</u>	Leucoplasia única ou múltiplas em conjunto <2cm
<u>L2</u>	Leucoplasia única ou múltiplas em conjunto 2-4cm
<u>L3</u>	Leucoplasia única ou múltiplas em conjunto >4cm
<u>Lx</u>	Tamanho não indicado
P (patologia ou características histopatológicas)	
<u>P0</u>	Sem displasia epitelial (inclui também displasia ligeira aparente)
<u>P1</u>	Displasia epitelial ligeira a moderada
<u>P2</u>	Displasia epitelial severa
<u>PX</u>	Presença/ausência de displasia não indicada

Fonte: van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncology*. 2009;45(4-5):317-23.³²

Deste sistema resultam 4 estadios: estadio I (L_1P_0), II (L_2P_0), III (L_3P_0 ou $L_1L_2P_1$) e IV (L_3P_1 e qualquer LP_2), de acordo com as seguintes regras:³²

1. Se persistirem dúvidas quanto à categoria L a ser atribuída, dever-se-á respeitar a categoria mais baixa, i.e., menos avançada. O mesmo acontece para a definição dos estadios.
2. No caso de biópsias múltiplas de lesão isolada ou de leucoplasia multifocal deverá ser utilizado a categoria de maior severidade entre todos os resultados histopatológicos.
3. Deve ser reportada a localização oral de acordo com a ICD-DA (WHO, *International Classification of Diseases. Tenth Revision. Application to Dentistry and Stomatology*, ICD-DA, Geneva, 1992).

O autor recomenda a indicação do sexo e idade do paciente no momento do diagnóstico e possíveis fatores etiológicos. Este sistema carece de validação.³²

Tal como apresentado anteriormente, o potencial maligno de todas as formas de leucoplasia oral não é igual, já que certas características, como a presença de displasia epitelial, o tipo clínico (não homogêneo), extensão ($> 200\text{mm}^2$) e localização da lesão (pavimento da boca e face ventral da língua), parecem realmente associar-se a um risco aumentado de malignização.^{21, 32, 35} Estes potenciais fatores de risco, inerentes às

particularidades individuais de cada lesão, dificultam a comparação entre estudos, nomeadamente quando não respeitam a mesma metodologia.

van der Waal³² definiu alguns fatores de risco com significado estatístico para o desenvolvimento maligno de lesões leucoplásicas, ainda que estes não devam ser aplicados a casos individuais:³²

- Sexo feminino;
- Leucoplasia não homogénea;
- Leucoplasia de longa duração;
- Leucoplasia em não fumadores (idiopática);
- Localizada na língua e/ou pavimento da boca;
- Tamanho >200mm²;
- Presença de *C. albicans*;
- Presença de displasia epitelial (indicador mais importante).

Alguns autores enumeram também o historial de tumores prévios, nomeadamente OSCC, como fator de risco para o desenvolvimento de leucoplasia.⁶⁷

Apesar dos múltiplos fatores de risco estudados na patologia oral de rotina, prevalecem o tipo clínico (homogénea/não homogénea) e as características histopatológicas (presença/ausência de displasia) como os parâmetros mais importantes para avaliar o potencial maligno da leucoplasia oral.^{32, 33}

1.7. Tratamento da leucoplasia oral

As leucoplasias normalmente não estão associadas a morbilidade ou casos fatais por si mesmas. Sendo a maioria assintomáticas, o principal objetivo do tratamento será sempre prevenir a transformação maligna. Como consequência da incerteza na previsão de malignização, muitos indivíduos recebem tratamentos sobre lesões que nunca progrediriam para cancro. Por esta razão devem ser propostos tratamentos com mínima incidência e morbilidade. Este não é o caso de algumas intervenções correntes e frequentes, como o caso da administração de retinóides com elevado índice de toxicidade, apesar das taxas de *compliance* serem semelhantes a grupos placebo.⁶³

Existem no entanto vários tipos de intervenções:⁶³

1. Ativas:
 - Remoção cirúrgica da lesão, incluindo excisão cirúrgica, cirurgia a laser e crioterapia;
 - Tratamento médico tópico, incluindo agentes anti-inflamatórios, antifúngicos, carotenóides e retinóides, agentes citotóxicos, etc.;
 - Tratamento médico sistémico.
2. Fim de hábitos predisponentes (e.g. tabaco, álcool, etc.)
3. Tratamentos alternativos, e.g. terapêutica fotodinâmica
4. Tratamento combinado
5. Controlo
6. Placebo
7. Sem tratamento

Na maioria dos centros médicos faz-se a exérese de lesões com displasia moderada a severa, na tentativa de diminuir o risco de malignização. O mesmo se aplica a lesões localizadas em locais de maior predisposição ou em pacientes com risco aumentado de malignização. Os estudos de *follow-up* pós-excisão das OPMDs referem no entanto que o risco de malignização não se altera significativamente. As recidivas acontecem em 10-20% e o desenvolvimento de cancro em 3-9% das áreas sujeitas a excisão.³³ Considera-se aqui recidiva, quando independentemente do intervalo de tempo, a lesão reaparece no local da leucoplasia primária. Define-se como nova lesão leucoplásica quando esta ocorre em local distinto.³²

A seleção da terapêutica na leucoplasia oral não é consensual. O julgamento clínico deve ter em conta a sintomatologia, fatores individuais (e.g. higiene oral) e risco de malignização, pela extensão da lesão e severidade displásica.³² Estudos anteriores sugerem que o desenvolvimento de cancro em lesões leucoplásicas está relacionado com o tamanho/extensão da lesão e a falta de tratamento. Apesar das diferentes terapias influenciarem a interpretação dos fatores de risco e expressão de possíveis biomarcadores, a sua recusa não é ética.³³ Ainda que não exista evidência científica de que qualquer tratamento previna a possibilidade de malignização, todos são seguros, independentemente da presença/ausência de OED.³²

Por outro lado, alguns autores defendem o simples controlo de populações de risco por exame físico, apesar da escassez de RCTs.⁶⁸ A revisão sistemática da utilidade da

inspeção visual no diagnóstico de cancro oral demonstrou uma sensibilidade de 0,85 e uma especificidade de 0,97, pelo que os autores concluíram que pode ser comparado ao rastreio cervical e mamografia, que possuem sensibilidade e especificidade na ordem dos 0,80 e 0,90, respetivamente. Este exame é indolor e facilmente aceite por ser pouco invasivo. A real desvantagem de qualquer um destes rastreios é a possibilidade de aumentar falsos positivos e negativos.¹³ Numa revisão sistemática da literatura, Kujan *et al.*⁶⁹ concluíram que não existe evidência suficiente que suporte ou refute a utilização de rastreios para cancro oral na população mundial.

Bremmer *et al.*²⁶ tentaram desenvolver e avaliar um teste genético de rastreio não invasivo para as OPMDs, através da deteção de alterações genéticas. Foram recolhidas células através de citologia exfoliativa, de mucosa normal, displásica e com OSCC, identificadas previamente por análise microssatélite, com a intenção de selecionar um *set* de alterações que identificasse OPMDs. Aplicou-se uma nova ferramenta genética – MPLA (*MultiPlex Ligation-dependent probe Amplification*) – para quantificar a instabilidade cromossómica, i.e. o ganho e perda de alelos, através de PCR. Após análise de 120 amostras foi possível detetar grandes diferenças no número de alterações entre o tecido normal vs. displásico e displásico vs. tumoral ($p < 0,001$). Houve correlação significativa entre o número de alterações detetadas pela MPLA e a análise prévia de perda alélica. A informação disponível permitiu a seleção de 42 sondas MPLA, com poder para otimizar a distinção entre tecido normal, displásico e maligno. Segundo os autores a técnica experimentada é sensível, eficaz, de alta performance e fácil de aplicar, permitindo a deteção de alterações genéticas em pequenas amostras de DNA (20-60ng) de lesões não invasivas. O MPLA parece ser promissor para rastreios populacionais.²⁶

Num estudo levado a cabo na Índia (Bombaim), 42,5% das leucoplasias não tratadas desapareceram em 5 anos e 45,3% em 10 anos, particularmente nos pacientes que mascavam tabaco, enquanto 41,5% das lesões permaneceram inalteradas em 5 anos e 31,6% em 10 anos, na população fumadora. Em Gujarat, província indiana, 11% das leucoplasias, reexaminadas após 2 anos, aumentaram de tamanho, 31,6% diminuíram ou desapareceram e 57,3% permaneceram inalteradas. A redução de tamanho ou desaparecimento foi notada para 42% das leucoplasias em Kerala, 40% em Gujarat e 37% em leucoplasias não localizadas no palato em Andhra Pradesh. A regressão foi mais frequente em mascadores de tabaco e fumadores de cachimbo do que aqueles que fumavam cigarros. A duração média das leucoplasias em cada

região foi calculada dividindo a prevalência pelo rácio de incidência. Persistiram em média por 9 anos em Kerala e por 13 anos em Gujarat.³⁵

Em 520 pacientes húngaros seguidos entre 1-25 anos, a tentativa de eliminação dos fatores etiológicos resultou em desaparecimento total das lesões em 176 pacientes (33,8%), melhoria em 131 pacientes (23,5%), sem alterações em 135 pacientes (26%) e aumento do tamanho em 47 pacientes (9%). Estas leucoplasias também alteraram o seu padrão clínico durante o *follow-up*: 19 leucoplasias (3,7%) progrediram e 47 leucoplasias (9%) regrediram para subtipos mais e menos agressivos, respetivamente. Lesões com áreas vermelhas aumentaram mais frequentemente em extensão, apesar de cada tipo clínico de leucoplasia apresentar a mesma tendência para reduzir em extensão. As lesões na língua e pavimento da boca parecem estar mais sujeitas a progressão (4 das 41 lesões progrediram e nenhuma regrediu), ao contrário das lesões na mucosa jugal ou comissuras (12 das 253 progrediram e 40 das 253 regrediram).³⁵

Na realidade dos países desenvolvidos, em 214 dinamarqueses com leucoplasia seguidos por 1-10 anos, verificou-se a remissão total das lesões em 43 (20,1%) dos casos, diminuição do tamanho em 38 (17,8%) e apenas aumento do tamanho em 7 pacientes (3,3%). Em 257 pacientes californianos com leucoplasia seguidos por um *follow-up* médio de 7,2 anos, as lesões tornaram-se mais pequenas ou desapareceram em 49 pacientes (37%) dos 133 fumadores ainda ativos, em 22 pacientes (44%) dos 50 fumadores que cessaram o hábito após diagnóstico e em apenas 2 pacientes (3%) dos 74 não fumadores. Em 138 dinamarqueses com leucoplasia, todos diminuíram ou cessaram por completo o hábito tabágico após o diagnóstico, com uma redução do consumo de 50% ou abstinência por 3 meses, a que foi associada uma redução do tamanho ou desaparecimento de mais de metade das lesões (56%). Após um ano da eliminação do hábito tabágico, aproximadamente 80% das lesões reduziram em tamanho ou desapareceram.³⁵

Numa análise retrospectiva de 175 OPMDs em 147 pacientes da Holanda monitorizados de forma passiva, 81% das 149 lesões homogéneas permaneceram inalteradas, 1% tornaram-se homogéneas, mas 15% das lesões desapareceram. Por outro lado, 10% das 21 lesões não homogéneas tratadas por cirurgia permaneceram inalteradas, 1% tornaram-se homogéneas e 20% desapareceram. Não foram observadas diferenças estatisticamente significativas entre uma abordagem conservadora, apenas de controlo e a abordagem cirúrgica.³⁵

A excisão cirúrgica tradicional por bisturi pode ser em alguns casos a melhor opção. No entanto, em pacientes com lesões extensas a cirurgia pode ser difícil, dolorosa, provocar danos estéticos e funcionais graves, requerer anestesia geral e incluir complicações, como a formação de cicatrizes⁷⁰ e a metastização.²² Estão disponíveis diferentes modalidades de tratamento como a criocirurgia, cirurgia a laser (e.g. evaporação), administração de retinoides tópicos ou sistêmicos, bochechos com adenovírus atenuados e terapia fotodinâmica.³²

A excisão a laser oferece algumas vantagens sobre a cirurgia tradicional, incluindo a boa visualização, controlo da hemostase, rapidez, baixa morbidade, possibilidade de não coadaptar margens cirúrgicas e excelente cicatrização, com contração limitada da mucosa oral adjacente. Todavia, o *follow-up* a longo prazo não demonstra vantagens no que diz respeito à recidiva e transformação maligna. Os rácios de recidiva e transformação maligna para esta opção terapêutica variam entre 7-38% e 1-9%, respetivamente. A recidiva pode ser consequência da exérese incompleta ou da recolonização por células do epitélio adjacente aparentemente normal, de acordo com a cancerização de campo. A presença de células geneticamente alteradas nas margens cirúrgicas e no tecido normal adjacente a tumores, tem sido confirmada por análise molecular, que inclui técnicas de amplificação de DNA e hibridização *in situ*. Tem sido igualmente demonstrado que a mucosa clínica e histologicamente normal, apresenta *turnover* celular alterado após exames mais detalhados, aumentando a possibilidade de recidiva ou transformação maligna.⁷⁰

As margens cirúrgicas de segurança não estão definidas, pelo que a maioria dos clínicos cumpre margens de poucos milímetros, o que poderá contribuir para a elevada recidiva 1,58-27%²² (até 30%) e desenvolvimento de novas lesões leucoplásicas. Não existe evidência que confirme o valor do *follow-up* alargado e os intervalos ótimos entre consultas após tratamento da leucoplasia, embora van der Waal³² recomende intervalos de 3 e 6 meses para leucoplasias displásicas e não displásicas, respetivamente.³²

Através de uma revisão da *Cochrane* para as possíveis intervenções na abordagem da leucoplasia oral, Lodi *et al.*⁶³ identificaram algumas limitações:

- a) Nenhum dos RCTs compara os efeitos da excisão cirúrgica vs. placebo ou ausência de tratamento;
- b) A comparação entre rácios de malignização resulta do *follow-up* de pacientes sujeitos ou não a tratamento cirúrgico;

- c) Ainda que seja difícil confrontar resultados, pelas diferenças no diagnóstico e critérios de inclusão, intervalos de monitorização, características dos pacientes e técnicas cirúrgicas adotadas (bisturi, laser, crioterapia), estes demonstram dados muito variáveis e por vezes conflituosos nas suas conclusões;
- d) Faltam estudos que avaliem intervenções direcionadas aos fatores de risco conhecidos (e.g. tabaco).

Não se conhecem benefícios a qualquer um dos tratamentos médicos (vitamina A, retinóides, beta caroteno ou carotenóides, bleomicina, chá e cetorolac) quando comparados a placebo. O tratamento com beta caroteno, licopeno e vitamina A ou retinóides, tem sido associado a rácios significativos de resolução clínica, quando comparados com placebo ou inexistência de tratamento. O tratamento com ácido retinóico e licopeno aparentemente promove melhoria histológica, ainda que a evidência se suporte em estudos com poucos pacientes. Sempre que reportado, houve um elevado rácio de recidiva. Foram descritos efeitos adversos de severidade variável. No entanto, as intervenções tendem a ser bem aceites pelos pacientes, já que as taxas de abandono foram similares entre grupos sob tratamento ou grupos controlo.⁶³

Apesar de todas as limitações, van der Waal³² apresentou em 2009 um algoritmo para a monitorização da leucoplasia oral.

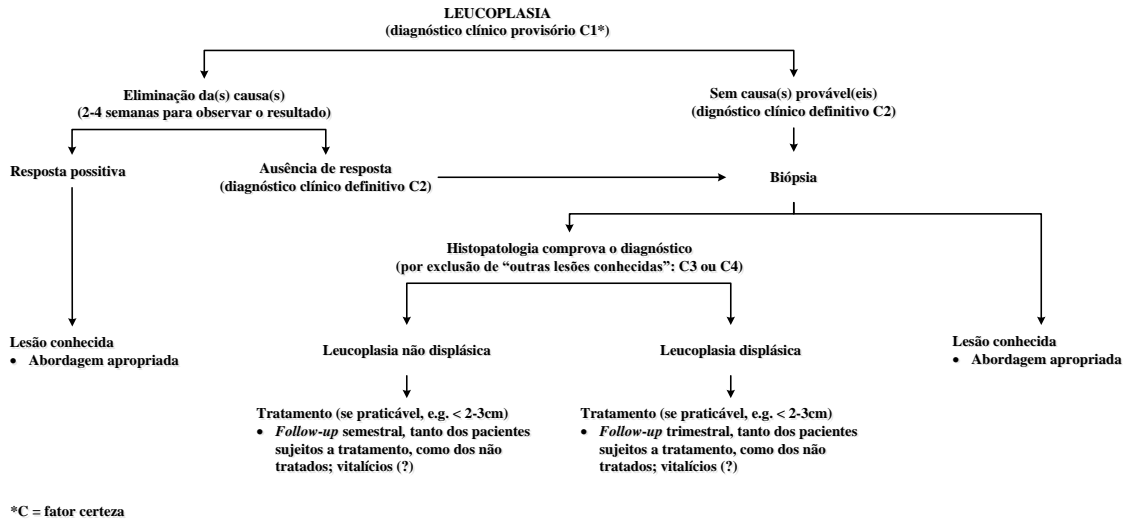


Figura 4. Abordagem da leucoplasia oral.

Fonte: van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncology*. 2009;45(4-5):317-23.³²

No que diz respeito à publicação dos resultados do tratamento de lesões leucoplásicas orais têm sido propostos alguns modelos. Ainda que não tenham sido validados, van der Waal³² sugeriu alguns parâmetros:

- A. Idade³⁵
- B. Género (feminino possivelmente com maiores taxas de malignização)³⁵
- C. Fatores etiológicos, se presentes
- D. Tipos de tratamento:
 - Cirúrgico (incluindo laser CO₂);
 - Não cirúrgico;
 - Quimioprevenção;
 - Apenas controlo.
- E. Resposta em casos não cirúrgicos ou observação sem tratamento:
 - Sem resposta – casos estáveis;
 - Resposta parcial – redução em mais de 50% do tamanho, mas sem remissão total;

- Resposta/remissão total;
 - Progressão da doença (>25% aumento em tamanho ou aparecimento de nova lesão).
- F. Recidiva: leucoplasia com a mesma localização, independentemente do intervalo entre lesões.
- G. Nova lesão primária: leucoplasia com localização diferente.
- H. Transformação maligna
- I. Patologia maligna da cabeça e pescoço, além da cavidade oral
- J. Patologia maligna além da cabeça e pescoço
- K. Duração do *follow-up*

A publicação dos resultados dos tratamentos deve ser *standardizada* tanto quanto possível, incluindo os intervalos e tempo total do *follow-up*. O tamanho da leucoplasia continua a ser a característica de maior valor na quantificação das alterações pós-terapêuticas observadas, em detrimento de outras como a coloração e textura da lesão.³²

A abordagem clínica da leucoplasia oral é dificultada pela incapacidade em determinar os avanços oncogênicos e predizer com sucesso quais os pacientes com maior risco de desenvolverem OSCC.²² O tempo decorrido até à malignização poderá ser igual ou superior a 20 anos, pelo que a completa ressecção das leucoplasia orais não reduz necessariamente o risco de OSCC.⁷¹ Atualmente não existe evidência de nenhum tratamento eficaz na prevenção de recidiva⁷⁰ ou de malignização.^{4, 63, 70}

Todavia, alguns autores indicam a excisão da lesão na presença de alterações displásicas como a opção válida, sendo a decisão médica mais adotada.^{23, 70}

OBJETIVOS

2. Objetivos

Os objetivos gerais definem-se pela revisão da evidência médica ao:

1. Clarificar os conceitos modernos da carcinogénese;
2. Apresentar dados epidemiológicos do cancro e leucoplasia oral;
3. Esclarecer o conceito de displasia epitelial oral como método de diagnóstico *gold-standard*;
4. Contextualizar a leucoplasia como desordem oral potencialmente maligna.

Os objetivos específicos dizem respeito à revisão sistemática dos biomarcadores comuns entre displasia epitelial, leucoplasia e cancro oral, que possam ser válidos na sua prevenção, diagnóstico, prognóstico e tratamento:

1. Catalogar as alterações bioquímicas e moleculares (genéticas e epigenéticas) partilhadas por diferentes etapas da oncogénese oral;
2. Identificar e organizar a informação válida;
3. Discutir as limitações da evidência atual;
4. Identificar novas linhas de investigação e terapêuticas que capacitem uma abordagem clínica mais eficaz da leucoplasia oral.

Em suma, pretende-se determinar o potencial translacional dos biomarcadores moleculares na abordagem de lesões leucoplásicas orais.

METODOLOGIA

3. Metodologia

Iniciou-se a pesquisa sistemática na Medline através dos seguintes termos MeSH: *leukoplakia, oral; biological markers; mouth e precancerous conditions*, e definiram-se os critérios de inclusão: ensaios clínicos randomizados e controlados, meta-análises e revisões sistemáticas, publicados nos últimos dez anos, até à data limite de 1 Março de 2013, em inglês, espanhol e português. Destes critérios resultaram apenas 4 artigos.

Face à não representatividade da literatura atualmente publicada para este tema, conduziu-se a investigação além da Medline (incluindo os *Clinical Queries* com os termos MeSH), através da *Embase* e *Cochrane Library* com a utilização das seguintes palavras-chave: *oral cancer, oral carcinogenesis; potentially malignant oral lesions, oral leukoplakia, oral epithelial dysplasia, biomarkers*. A *metaRegister of Controlled Trials* foi utilizada para identificar ensaios relevantes (<http://www.controlled-trials.com/>).

Selecionaram-se artigos manualmente a partir dos resultados das pesquisas anteriores, sob a supervisão do Prof. Doutor Rui Amaral Mendes, por forma a considerar os estudos de maior impacto, para biomarcadores da displasia epitelial e leucoplasia oral e evitar a perda de informação potencialmente relevante. Para estes consideraram-se os seguintes critérios de inclusão:

- a) Publicação entre 2003 e 1 de Março de 2013.
- b) Utilização de pelo menos uma das seguintes palavras-chave: *oral carcinogenesis, oral epithelial dysplasia, oral leukoplakia, biomarkers*, dando ênfase aos seguintes conceitos: *aneuploidy, miRNA, loss of heterozygosity, microsatellites, hypermethylation, telomerase, oncogenes, p53, tyrosine kinase, proliferation markers*.
- c) Definição das revistas de interesse com maior relevo científico:
 - Cancer, Eur J Oral Sci, J Dent Res, Oral Oncol, Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod, Curr Opin Oncol, Support Cancer Ther, Oral Dis, Cancer Prev Res (Phila), Int J Oral Maxillofac Surg, J Oral Pathol, J Oral Maxillofac Pathol, B Journal of Cancer, Cancer Med, Cancer Res J, Head Neck Oncol, Eur J Cancer B Oral Oncol, J Oral Maxillofac Surg, J Oral Pathol Med, Arch Otolaryngol Head Neck Surg, Clin Cancer Res, N Engl J Med, BMC Cancer, Bull Tokyo Dent Coll, Int J Oral Sci, J Cancer Res Clin Oncol, de acordo com (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/nlmcatalog/journals>).

O *abstract* de cada artigo resultante da estratégia sistemática desta revisão foi examinado por dois revisores (autor e orientador). Sempre que o orientador considerou o artigo relevante, progrediu-se para o processo de revisão integral e inclusão dos resultados.

Ao longo deste trabalho são usados vários termos anglo-saxónicos, uma vez que a sua tradução poderia refletir-se numa perda de conceitos ou interligações entre os mesmos, induzindo o leitor em erro. Do mesmo modo, o nome das proteínas e algumas técnicas de análise também são apresentados em inglês e quando pertinente, precedidos pela terminologia em português.

RESULTADOS

4. Resultados

Atualmente, a avaliação do risco das OPMDs é feita com base nos critérios histopatológicos que definem a presença e severidade de displasia. Todavia, a falta de objetividade destes critérios e a dificuldade na previsão do desfecho individual de cada caso impõe a identificação e aplicação prática de outros biomarcadores de diagnóstico e prognóstico para as OPMDs e cancro oral.³¹

Os avanços no diagnóstico e tratamento médico têm levado a um serviço cada vez mais personalizado, direcionado de forma específica a cada paciente. No seguimento deste desenvolvimento, têm surgido novas técnicas médicas que revelam a importância do nosso conhecimento sobre os biomarcadores, nomeadamente os tumorais. As anormalidades genéticas e consequentes vias de sinalização que regulam o ciclo e diferenciação celular, apoptose, estabilidade genómica, motilidade, angiogénese e metastização estão significativamente associadas ao desenvolvimento e progressão maligna da leucoplasia oral. A expressão e funções aberrantes das moléculas envolvidas nestas redes de sinalização têm sido consideradas biomarcadores para avaliação de risco de transformação maligna. Estes biomarcadores, incluindo oncogenes (e.g. EGF, EGFR, ras e myc), genes supressores de tumores (e.g. p53, p21, p27 e p16) e marcadores de proliferação (e.g. Ki67, PCNA e AgNOR) - têm sido estudados a partir de espécimes teciduais e fluidos corporais (saliva e soro). O mais recente avanço na compreensão dos fundamentos biológicos da oncologia molecular tem demonstrado que as alterações não envolvem apenas células tumorais isoladas, mas também outras não malignas, incluindo células do sistema imune inato e adquirido, fibroblastos, células epiteliais e endoteliais, num microambiente tumoral específico. Também as moléculas derivadas das células tumorais, como citocinas e fatores pró-angiogénicos, desempenham um papel fundamental na iniciação, manutenção e expansão dos neoplasmas.³¹

A introdução dos biomarcadores como termo MeSH remonta a 1989, sendo definido como um parâmetro biológico mensurável e quantificável (exemplos: concentração enzimática específica, concentração hormonal específica, distribuição fenotípica de um determinado gene, presença de substâncias biológicas), que funciona como índice de saúde ou doença, como é o exemplo dos efeitos da exposição a fatores ambientais, diagnóstico de doenças, processos metabólicos, abuso de substâncias, desenvolvimento de linhagens celulares e estudos epidemiológicos.

Definem-se assim como moléculas comuns ou específicas de estados fisiológicos e/ou patológicos. No caso de doença tumoral, estas podem ser iguais ou diferentes às do tecido de origem, sendo em todo o caso biologicamente ativas.⁴⁴ A identificação de marcadores envolvidos em diferentes momentos da oncogénese oral aumentará a sensibilidade, previsibilidade e reprodutibilidade da avaliação de risco de malignização. O progresso recente de técnicas de alto desempenho, incluindo a caracterização de perfis genéticos (*microarray*), a identificação de alterações nucleotídeas (hibridização e sequenciamento DNA), a análise miRNA e a proteómica salivar proporciona o desenvolvimento de modelos de progressão biomoleculares para a leucoplasia oral, novas técnicas de diagnóstico precoce, monitorização e tratamentos para os pacientes com OPMDs e OSCC. A aplicação clínica destes biomarcadores como coadjuvante da análise histológica permitirá diagnósticos precoces e estratégias terapêuticas mais eficazes na fase em que o cancro oral é mais facilmente curado.³¹

A tabela que se segue discrimina por data de publicação ascendente (2003-2013), os principais resultados da revisão sistemática da literatura, para os biomarcadores moleculares da leucoplasia oral.

Resultados da revisão sistemática para os biomarcadores moleculares da leucoplasia oral

Autor(es)	Ano	Título	Jornal	Biomarcador(es)	Main findings	Outras informações relevantes
Raval <i>et al.</i> ⁷²	2003	Evaluation of serum sialic acid, sialyltransferase and sialoproteins in oral cavity cancer	Oral Dis	Ácido siálico, sialiltransferase e sialoproteína α 2-6	O rácio dos níveis séricos de ácido siálico com o total de proteínas circulantes estava significativamente elevado em pacientes com cancro oral não tratado, em relação aos pacientes com OPMDs. A atividade da sialiltransferase sérica esteve significativamente aumentada em pacientes com cancro oral ($p < 0,05$).	Os pacientes que no diagnóstico de cancro oral apresentaram níveis elevados de ácido siálico ou maior concentração sérica de sialoproteína α 2-6 apresentam pior prognóstico, enquanto a diminuição dos níveis séricos da sialiltransferase associa-se a melhor prognóstico durante o <i>follow-up</i> .
Sawant <i>et al.</i> ⁷³	2003	Demonstration of cytokeratin-5 non-expression in tobacco related oral carcinogenesis--use of reverse transcriptase polymerase chain reaction as a sensitive assay.	Oral Oncol	CK5	A perda de expressão do mRNA da K5 foi identificada em 30,6% das OPMDs e 44,83% dos SCCs. A subexpressão do mRNA foi também observada em algumas amostras, nomeadamente OPMDs da mucosa jugal. Não houve no entanto associação destas alterações com o grau de displasia ou com o estadió tumoral.	Os autores concluíram que os resultados demonstram a perda de expressão da K5 por bloqueio transcricional e propõem esta proteína como marcador de diagnóstico precoce para o cancro oral relacionado com o consumo de tabaco.
Kurokawa <i>et al.</i> ⁷⁴	2003	Immunohistochemical study of <i>syndecan-1</i> down-regulation and the expression of p53 protein or Ki-67 antigen in oral leukoplakia with or without epithelial dysplasia	J Oral Pathol Med	p53, Ki-67 e <i>syndecan-1</i>	Os LIs da p53 e Ki67 tendem a aumentar com a diminuição de intensidade da marcação de <i>syndecan-1</i> ($p < 0,001$). Estes resultados demonstram que a sobreexpressão da p53 e Ki67, e a subexpressão da <i>syndecan-1</i> nos estratos inferiores do epitélio, estão associadas a alterações displásicas, sendo provavelmente a <i>syndecan-1</i> o marcador mais importante da displasia.	Não foi observada associação entre a expressão de qualquer um dos marcadores e a localização ou tipo de lesão. Foram observadas alterações significativas nos LIs da p53 e Ki67 na leucoplasia, à medida que a displasia progredia ao longo dos 3 graus de severidade ($p < 0,001$), com diferenças significativas dos LIs da p53 e Ki67 entre epitélio normal e leucoplasia ($p < 0,001$).
López <i>et al.</i> ⁶⁷	2004	Use of cytological specimens for p53 gene alteration detection in oral squamous cell carcinoma risk patients	Clin Oncol (R Coll Radiol)	p53	Foram detetadas 11 mutações do gene p53 nos espécimes citológicos orais, identificadas em 23,5% do total de pacientes com leucoplasia homogénea oral, confirmando a fase precoce em que estas acontecem na oncogénese oral. As leucoplasias orais precedidas de OSCCs parecem apresentar maior risco de desenvolverem tumores primários secundários ou recidiva da doença.	A incidência de alterações foi maior em pacientes com OSCC prévio e detetadas nas amostras recolhidas por bochecho ou citologia exfoliativa. Segundo os autores, estes dados indicam maior expansão clonal de células potencialmente malignas em pacientes com OSCC prévio.

Resultados da revisão sistemática para os biomarcadores moleculares da leucoplasia oral

Autor(es)	Ano	Título	Jornal	Biomarcador(es)	Main findings	Outras informações relevantes
Rajpura <i>et al.</i> ⁷⁵	2005	Clinical significance of total and lipid bound sialic acid levels in oral pre-cancerous conditions and oral cancer	J Oral Pathol Med	Ácido siálico total e sialolípidos	Os níveis séricos das duas formas de ácido siálico (total e sialolípidos) estavam significativamente aumentados ($p < 0,001$) em pacientes com cancro oral não tratado, quando comparados com indivíduos saudáveis e pacientes com OPMDs (leucoplasia e fibrose submucosa oral).	A análise multivariável constatou que o aumento progressivo de ácido siálico livre e sialolípidos estava significativamente associado ao estadió da doença maligna ($p = 0,0001$ e $0,039$, respetivamente)-
Campisi <i>et al.</i> ⁷¹	2005	Use of fuzzy neural networks in modeling relationships of HPV infection with apoptotic and proliferation markers in potentially malignant oral lesions	Oral Oncol	HPV	O HPV foi encontrado em 8/21 leucoplasias orais (38,1%), sendo que a survivina, PCNA e hábitos tabágicos foram associados por análise univariável ($p = 0,04$) à sua presença. Nas leucoplasias orais HPV positivas foi possível observar uma associação independente entre o consumo de álcool e os casos positivos para o PCNA e survivina.	O HPV18 foi o genótipo mais frequente (6/8), seguido pelo HPV16 (2/8). A expressão da survivina e PCNA simultânea à presença de HPV sugere que estes marcadores apoptóticos, proliferativos e virais podem ter dependência recíproca na alteração da maturação epitelial e malignização destas lesões.
Santos-García <i>et al.</i> ⁴⁷	2005	Proteic expression of p53 and cellular proliferation in oral leukoplakias	Med Oral Patol Oral Cir Bucal	p53	Observou-se um aumento da proliferação celular e da sobreexpressão da p53 com o aumento da severidade histológica. Nas lesões carcinomatosas as diferenças são significativas quando comparadas com epitélio normal, com maior marcação ao longo de todo o epitélio. As células malignas irregulares com pleomorfismo marcado foram positivas para a p53.	As alterações mais precoces corresponderam a um aumento significativo da proliferação celular (sobreexpressão do Ki67) na transição de epitélio normal para displasia, ao que se segue a sobreexpressão da p53 no desenvolvimento de CIS.
Soni <i>et al.</i> ⁷⁶	2005	Alterations of rb pathway components are frequent events in patients with oral epithelial dysplasia and predict clinical outcome in patients with squamous cell carcinoma	Oncology	pRb, p16 e ciclina D1	A perda de expressão da p16 foi considerada a alteração mais precoce da oncogénese oral. A subexpressão da pRb foi a anormalidade mais significativa na transição hiperplasia-displasia ($OR = 3,727$, $p = 0,005$). A subexpressão da pRb e sobreexpressão da p53 em simultâneo determinam maior risco de malignização e pior prognóstico para cancro oral.	Os mesmos autores propuseram um modelo de progressão genética para o desenvolvimento e prognóstico de OSCC.
Anderson <i>et al.</i> ⁷⁷	2005	Immunohistochemical assessment of Viadent-associated leukoplakia	Oral Oncol	Sanguinária	A marcação quantitativa do Ki67 e p16 não apresentou diferenças significativas entre os 3 grupos ($p > 0,05$), ao contrário da ciclina D1 e p53 ($p < 0,05$).	A análise revela valores intermédios de marcação para as lesões relacionadas com produtos Viadent®. Estes dados confirmam o potencial neoplásico da sanguinária.

Resultados da revisão sistemática para os biomarcadores moleculares da leucoplasia oral

Autor(es)	Ano	Título	Jornal	Biomarcador(es)	Main findings	Outras informações relevantes
Ma <i>et al.</i> ⁷⁸	2006	8-Nitroguanine formation in oral leukoplakia, a premalignant lesion	Nitric Oxide	8-nitroguanine	Nos pacientes com leucoplasia, a imunorreatividade da 8-nitroguanine, 8-oxodG e iNOS para a camada basal e suprabasal, foi significativamente maior do que na mucosa normal. Além disso, o PCNA e a p53 estavam expressos nas células basais 8-nitroguanine positivas.	Estes resultados sugerem que o <i>stress</i> nitrativo mediado pela formação da 8-nitroguanine através da iNOS, por sua vez induzida pela resposta inflamatória, contribui para o desenvolvimento da oncogénese oral a partir da leucoplasia por dano genético e <i>stress</i> oxidativo.
Kövesi e Szende ⁷⁹	2006	Prognostic value of cyclin D1, p27, and p63 in oral leukoplakia	J Oral Pathol Med	Ciclina D1, p27 e p63	O índice da p27 foi de 14-16% nas leucoplasias homogéneas e nodulares mas substancialmente menor, 1-2%, nas eritroleucoplasias (p<0,05). O índice médio da p63 foi de 10% nas leucoplasias homogéneas, 5% nas nodulares, mas com aumento significativo na eritroleucoplasia - 20% (p<0,05).	Os resultados deste estudo sugerem que a expressão característica da ciclina D1, p27 e p63 em vários subtipos de leucoplasia podem ser de valor preditivo.
Gires <i>et al.</i> ⁸⁰	2006	CK8 correlates with malignancy in leukoplakia and carcinomas of the head and neck	Biochem Biophys Res Commun	CK8, panCK, CK 13 e Ki67	A expressão da K8 permitiu distinguir tecido displásico, CIS e leucoplasias. A expressão da K8 correlacionou-se com áreas displásicas de leucoplasia oral, enquanto a leucoplasia hiperplásica permaneceu K8-negativa, mas notoriamente positiva para as panK e K13. A K8 parece ter grande potencial para o diagnóstico diferencial e poderá ajudar a melhorar a identificação precoce e o estadiamento de OPMDs, recidiva e células tumorais residuais	
Brailo <i>et al.</i> ⁸¹	2006	The significance of salivary interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha in patients with oral leukoplakia	Oral Oncol	IL-6 e TNF- α	Foram observados níveis salivares significativamente aumentados para a IL-6 e TNF- α em pacientes com leucoplasia oral quando comparados com controlos saudáveis (p<0,05). Os níveis das duas citocinas pleiotrópicas não se correlacionaram com o tamanho da leucoplasia nem com a sua localização (p>0,05), possíveis indicadores de lesões com maior risco de malignização.	Os níveis da IL-6 e TNF- α não foram influenciados por hábitos tabágicos, uma vez que não foram observadas diferenças significativas nas concentrações salivares de IL-6 e TNF- α entre fumadores e não fumadores, no grupo de pacientes com leucoplasia oral (p=0,243; p=0,229) ou no grupo controlo (p=0,051; p=0,845).

Resultados da revisão sistemática para os biomarcadores moleculares da leucoplasia oral

Autor(es)	Ano	Título	Jornal	Biomarcador(es)	Main findings	Outras informações relevantes
Soares <i>et al.</i> ¹⁸	2006	Quantitative cell-cycle protein expression in oral cancer assessed by computer-assisted system	Histol Histopathol	p53, KI67 e PCNA	A expressão IHC quantitativa do PCNA parece ser um marcador inapropriado para identificar processos de oncogénese oral. Pelo contrário, a sobreexpressão e padrões de imunomarcção da p53 e Ki-67, parecem em conjunto assumir bom valor preditivo positivo para a transformação maligna das OPMDs.	
Fan <i>et al.</i> ⁸²	2006	Immunohistochemical analysis of P57(kip2), p53 and hsp60 expressions in premalignant and malignant oral tissues	Oral Oncol	p53, p57(kip2) e hsp60	Entre os 3 marcadores, a p57(kip2) teve o maior potencial preditivo para o OSCC. O risco relativo de morte para pacientes p57(kip2) negativos foi 7,52 vezes maior do que para pacientes p57(kip2) positivos (p=0,031). O rácio de sobrevivência a 5 anos do grupo positivo para a p57(kip2) (n=32) foi significativamente maior do que para o grupo p57(kip2) negativo (n=35) (87,5% vs. 65,7%, p=0,038).	Deve ser estudada a provável correlação reversa da p57(kip2) com a p53. Apesar de os autores sugerirem a utilização combinada destes 2 biomarcadores moleculares com a displasia oral para avaliação do risco das OPMDs, são necessários mais estudos que validem esta opção.
Teresa <i>et al.</i> ⁸³	2007	Computer-assisted analysis of cell proliferation markers in oral lesions	Acta Histochem	AgNOR e Ki67	A evidência sugere que a análise combinada da Ki67 e dos parâmetros morfométricos de AgNORs poderá ajudar a determinar o estado proliferativo e a velocidade do ciclo celular de células epiteliais orais malignas, assim como constituir um marcador preditivo da progressão de displasia e do potencial de OPMDs.	Todavia, o significado clínico dos parâmetros morfométricos das AgNORs é contraditório, sendo necessário a otimização dos protocolos de análise, preferencialmente computorizada.
Kondoh <i>et al.</i> ⁸⁴	2007	Gene expression signatures that can discriminate oral leukoplakia subtypes and squamous cell carcinoma	Oral Oncol	Set de genes	Demonstraram que um <i>set</i> de 11 genes poderá ter maior capacidade de distinguir OSCCs das leucoplasias (>97% eficácia), enquanto 7 destes genes poderão ser utilizados para distinguir displasias de maior (moderada-severa) e menor risco (ligeira) (>95% eficácia), demonstrando que a utilização combinada, e não simplesmente o maior número de genes marcadores, é essencial para construir <i>sets</i> preditivos apropriados.	Os resultados sugerem que 27 dos 118 genes candidatos com expressão diferencial, poderão não só constituir uma ferramenta valiosa na aferição do prognóstico de pacientes com OSCC, como oferecer informação importante acerca dos mecanismos moleculares subjacentes ao desenvolvimento maligno,

Resultados da revisão sistemática para os biomarcadores moleculares da leucoplasia oral

Autor(es)	Ano	Título	Jornal	Biomarcador(es)	Main findings	Outras informações relevantes
Xia <i>et al.</i> ⁸⁵	2007	Amplifications of TAOS1 and EMS1 genes in oral carcinogenesis: association with clinicopathological features	Oral Oncol	TAOS1 e EMS1	A análise sugere que existe associação significativa entre a amplificação do TAOS1 e EMS1 com OSCC (p<0,05), ao contrário da leucoplasia oral (p=0,372). Possivelmente o TAOS1 (displasia ligeira) pode estar envolvido mais precocemente do que EMS1 (displasia moderada).	As amplificações destes dois oncogenes estiveram significativamente associadas a maior tamanho tumoral, presença de metástases das cadeias linfáticas, pior diferenciação histológica e estadio clínico avançado.
Elangovan, Mani e Malathi ⁸⁶	2008	Argyrophilic nucleolar organizer regions in inflammatory, premalignant, and malignant oral lesions: a quantitative and qualitative assessment	Indian J Dent Res	AgNOR	Foi observada diferença estatisticamente significativa no número de AgNORs entre a mucosa normal, lesões inflamatórias e carcinomas, ainda que as OPMDs não diferissem significativamente da mucosa normal (p<0,05).	Os resultados quantitativos das AgNORs são estritamente proporcionais à atividade proliferativa e não indicam necessariamente a transformação maligna. Pelo contrário, as características qualitativas das AgNORs diferenciam lesões hiperplásicas, OPMDs e doença maligna.
Lee <i>et al.</i> ⁸⁷	2008	Upregulation of heme oxygenase-1 in oral epithelial dysplasias	Int J Oral Maxillofac Surg	Heme oxigenase 1 e PCNA	A expressão da HO-1 e do PCNA correlacionou-se com o grau de displasia epitelial. A expressão de HO-1 e PCNA está significativamente elevada na progressão do epitélio normal para OED e OSCC. Os casos de OSCC também demonstraram elevada expressão da HO-1, embora com níveis não superiores aos de displasia epitelial severa ou CIS. Estes resultados sugerem que a sobrerregulação da HO-1 em OPMDs é parte do mecanismo citoprotetor precoce contra a sequência de processos oncogénicos na mucosa oral, mantendo-se estável durante a progressão invasiva do tumor.	Os resultados também demonstraram que a HO-1 se expressa nos fibroblastos da submucosa, peritumorais e células inflamatórias adjacentes a CIS e SCCs invasivos, sugerindo que esta enzima antioxidante tem um papel importante na adesão dos fagócitos (resposta imune) ou na transição epitélio-mesênquima (invasão) durante a oncogénese oral precoce.

Resultados da revisão sistemática para os biomarcadores moleculares da leucoplasia oral

Autor(es)	Ano	Título	Jornal	Biomarcador(es)	Main findings	Outras informações relevantes
Thomson <i>et al.</i> ²³	2008	Predicting recurrence after oral precancer treatment: use of cell cycle analysis	Br J Oral Maxillofac Surg	Ki67, ciclina A e B1	Foram observados aumentos significativos para a ciclina A (p=0,004) e Ki67 (p=0,028) entre displasia moderada e severa. O aparecimento de lesões em local distinto foi mais comum em pacientes com prévia lesão displásica severa (p=0,001). As lesões com maiores LIs demonstraram maior incidência de recidiva: ciclina A (p=0,01), ciclina B1 (p=0,01) e Ki67 (p=0,03), sendo que a análise combinada de ciclina A e B1 melhoraram a previsão de recidiva (p=0,005).	Utilizando os valores medianos dos LIs como índices de referência, demonstrou-se um risco significativo de progressão da doença nos pacientes com OPMDs que excediam esses valores (ciclina A p=0,02, ciclina B1 p=0,01, Ki67 p=0,025). A análise combinada da ciclina A e B aumentou a previsibilidade destes marcadores (p<0,01).
Weise <i>et al.</i> ³	2008	LOXL4 is a selectively expressed candidate diagnostic antigen in head and neck cancer	Eur J Cancer	LOXL4	Em nove amostras de leucoplasia da língua e mucosa oral, foi observada expressão da LOXL4 nos casos de displasia moderada a severa. As categorias de estadiamento TNM do HNSCC e a sobrevivência geral não se correlacionaram com os graus de imunoreatividade.	Os padrões de expressão indicam múltiplas funções na adesão celular tumoral e interações com a matriz extracelular. Os dados sugerem que a LOXL4 é um marcador tumoral útil e um alvo para o tratamento de HNSCCs.
Saintigny <i>et al.</i> ⁸⁸	2009	DeltaNp63 overexpression, alone and in combination with other biomarkers, predicts the development of oral cancer in patients with leukoplakia	Clin Cancer Res	DeltaNp63	A sobreexpressão da DeltaNp63 nas OPMDs está associada ao risco aumentado de cancro oral. Com a podoplanina e a presença de grupos de células inflamatórias intraepiteliais poderá ser utilizado no diagnóstico de OPMDs com risco substancialmente elevado de cancro oral.	
Vered, Allon e Dayan ⁸⁹	2009	Maspin, p53, p63, and Ki-67 in epithelial lesions of the tongue: from hyperplasia through dysplasia to carcinoma	J Oral Pathol Med	Maspin, p53, p63 e Ki67	A expressão marcada da <i>maspin</i> no terço médio do epitélio poderá ser considerada um sinal de displasia moderada a severa e uma indicação de carcinoma quando presente no terço superior.	As alterações da expressão da <i>maspin</i> parecem ser maioritariamente reguladas pela p63, em detrimento da p53 que se encontra inativada em células que adquirem características displásicas/malignas. O valor preditivo da <i>maspin</i> no OSCC merece investigação futura.
Khan <i>et al.</i> ⁹⁰	2009	Detection of survivin and p53 in human oral cancer: correlation with clinicopathologic findings	Head Neck	p53 e survivina	A coexpressão da survivina e p53 não esteve significativamente associada aos parâmetros clinicopatológicos, como o tamanho tumoral (p=1), estadio (p=0.6513), metástases das cadeias linfáticas (p=0.3898) e diferenciação tumoral (p=0.386). Os dados sugerem que a p53 não contribui como fator <i>major</i> na desregulação da survivina no cancro oral.	As elevadas percentagens de sobreexpressão destas proteínas em OPMDs sugerem envolvimento precoce na oncogénese oral. São necessários estudos prospetivos com amostras maiores para interpretação e validação destes resultados.

Resultados da revisão sistemática para os biomarcadores moleculares da leucoplasia oral

Autor(es)	Ano	Título	Jornal	Biomarcador(es)	Main findings	Outras informações relevantes
Wang <i>et al.</i> ⁶²	2009	Involvement of potential pathways in malignant transformation from oral leukoplakia to oral squamous cell carcinoma revealed by proteomic analysis	BMC Genomics	PA28a, b e g	Observou-se a sobreexpressão (4-6 vezes) dos mRNAs de 3 homólogos do ativador de proteassoma PA28a, b e g em células malignas relativamente a tecidos leucoplásicos.	Foram identificadas aproximadamente 85 proteínas expressas consistentemente e diferencialmente (> 2 vezes, p<0,05), incluindo 52 sobreexpressadas e 33 subexpressadas, envolvidas em diferentes processos, nomeadamente apoptose, respostas a estímulos e regulação metabólica.
Watanabe <i>et al.</i> ⁹¹	2009	Activation of PI3K-AKT pathway in oral epithelial dysplasia and early cancer of tongue	Bull Tokyo Dent Coll	PI3K-AKT	O rácio de expressão da PI3K classe III foi de 2,5 vezes e 11 vezes maior no tecido maligno precoce e displasia comparativamente com os tecidos normais, sugerindo a necessidade da sua subregulação para a progressão tumoral. Os dados sugerem que a ativação da via PI3K-AKT está associada a OPMDs e por isso à oncogénese oral precoce.	Por IHC não foram detetadas células p-Akt-positivas no tecido normal, pelo que não parece desempenhar um papel preponderante em condições fisiológicas. Os tecidos malignos precoces e displásicos demonstraram a sobreexpressão de 4 e 5 genes (≥2 vezes) face ao tecido normal.
Matta <i>et al.</i> ⁸	2009	Heterogeneous ribonucleoprotein K is a marker of oral leukoplakia and correlates with poor prognosis of squamous cell carcinoma	Int J Cancer	Ribonucleoproteína heterogénea K	A expressão da hnRNP K aumentou dos tecidos normais para leucoplasia e lesão maligna (p<0,01). A hnRNP K citoplasmática aumentou significativamente da leucoplasia para HNSCC (p<0,01) e esteve associada a pior prognóstico dos HNSCCs (p=0,011), sendo marcador independente nos pacientes com recidiva de carcinoma.	A translocação núcleo-citoplasma da hnRNP K poderá ter um papel importante na transformação maligna das OPMDs, merecendo investigação futura. O potencial da hnRNP K como marcador de risco para progressão maligna das leucoplasias deve ser avaliado.
Marincsák <i>et al.</i> ¹¹	2009	Increased expression of TRPV1 in squamous cell carcinoma of the human tongue.	Oral Dis	TRPV1	Constatou-se um aumento dramático da imunoreatividade do TRPV1 em todas as camadas do epitélio de amostras leucoplásicas e OSCCs, sugerindo que tal como para os queratinócitos da pele, epitélio brônquico e urotélio, também nos queratinócitos orais a presença do TRPV1 pode mediar o crescimento destas células. Os dados demonstram que o TRPV1 pode ter um papel central na transformação maligna do epitélio da língua,	Este é o primeiro estudo que evidencia a expressão do mRNA e respetiva proteína TRPV1 nas células epiteliais de língua humana. Aparentemente, a sua presença em lesões leucoplásicas e epitélio saudável próximo a tumores invasivos confirma a hipótese da sua sobreexpressão constituir um evento relativamente precoce da tumorigénese.

Resultados da revisão sistemática para os biomarcadores moleculares da leucoplasia oral

Autor(es)	Ano	Título	Jornal	Biomarcador(es)	Main findings	Outras informações relevantes
Schaaij-Visser <i>et al.</i> ⁹²	2010	Evaluation of cornulin, keratin 4, keratin 13 expression and grade of dysplasia for predicting malignant progression of oral leukoplakia	Oral Oncol	Cornulina, queratina 4 e 13	Não foi encontrada associação significativa entre a expressão aleatória ou combinada da cornulina, queratinas 4 e 13 e a progressão maligna. A presença e severidade de displasia estiveram significativamente associadas à transformação maligna das leucoplasias (p=0,024 e p=0,029 respetivamente).	Apesar da inexistência de correlação com a progressão maligna, a cornulina apresenta uma tendência positiva para essa associação, pelo que são necessários estudos de coorte mais alargados.
Rai <i>et al.</i> ⁹³	2010	Possible action mechanism for curcumin in pre-cancerous lesions based on serum and salivary markers of oxidative stress	J Oral Sci	Curcumina	Na leucoplasia, fibrose submucosa e líquen oral os níveis séricos e salivares de vitamina C e E aumentaram significativamente, enquanto os níveis de MDA e 8-OHdG diminuíram após 131 (15), 211 (17) e 191 (18) dias da cura clínica, respetivamente (p<0,05)	Os resultados sugerem que a curcumina aumenta significativamente o estado antioxidante local e sistémico, enquanto diminui a peroxidação lipídica e dano genético em pacientes com OPMDs, através de vias pró e anti-apoptóticas ainda por esclarecer.
Taoudi Benchekroun <i>et al.</i> ¹⁰	2010	Epidermal growth factor receptor expression and gene copy number in the risk of oral cancer	Cancer Prev Res (Phila)	EGFR	O aumento do número de cópias EGFR foi associado à progressão das OPMDs para OSCC, particularmente naquelas com sobreexpressão deste recetor. Nestes pacientes, os inibidores EGFR poderão prevenir cancro oral.	Diminuição estatisticamente significativa do tempo livre de doença a 10 anos, quando as OPMDs apresentaram aumento do número de cópias genéticas do cromossoma 7 e gene EGFR (p=0,0007).
Wang <i>et al.</i> ¹	2010	Polymorphisms in the apoptosis-associated genes FAS and FASL and risk of oral cancer and malignant potential of oral premalignant lesions in a Taiwanese population	J Oral Pathol Med	FAS/FASL	Os polimorfismos do FAS/FASL não se encontraram correlacionados com o desenvolvimento de OSCC ou com o potencial maligno de leucoplasia oral.	Os polimorfismos FAS estiveram significativamente correlacionados com o potencial maligno de fibrose submucosa oral. O impacto do consumo de substâncias carcinogénicas no desenvolvimento de OSCC poderá ser diferenciado por polimorfismos FAS.
Hamadah, Goodson e Thomson ⁶⁵	2010	Clinicopathological behaviour of multiple oral dysplastic lesions compared with that of single lesions	Br J Oral Maxillofac Surg	Ki67, ciclina A e B1	Os índices de marcação proliferativa para lesões solitárias foram maiores do que para lesões múltiplas nos 3 marcadores, com significância para a ciclina A (p=0,04) e Ki67 (p=0,01). Sete desenvolveram OSCC durante o <i>follow-up</i> , 3 dos 78 com lesões únicas e 4 dos 18 com lesões múltiplas, com expressão estatisticamente significativa (p=0,02), ainda que a progressão maligna não parecesse estar relacionada com o diagnóstico histopatológico ou índices de marcação proliferativos.	Existe a necessidade de estudos RCTs multicêntricos longitudinais que comparem as intervenções cirúrgicas associadas ou não a quimioprofilaxia sistémica na monitorização das OPMDs multifocais (e.g. leucoplasia verrucosa proliferativa).

Resultados da revisão sistemática para os biomarcadores moleculares da leucoplasia oral

Autor(es)	Ano	Título	Jornal	Biomarcador(es)	Main findings	Outras informações relevantes
Gouvêa <i>et al.</i> ⁶⁴	2010	Clinicopathological features and immunohistochemical expression of p53, Ki-67, Mcm-2 and Mcm-5 in proliferative verrucous leukoplakia	J Oral Pathol Med	Mcm-2 e Mcm-5	Dos 12 pacientes incluídos na amostra, 4 desenvolveram OSCC e 1 carcinoma verrucoso. Os dados IHC demonstram maior positividade da p53, Ki67, Mcm-2 e Mcm-5 nos OSCCs. Contudo, alguns pacientes com displasia ligeira e moderada, particularmente aqueles que desenvolveram OSCC, apresentaram maior expressão da Mcm-2 e Mcm-5.	São necessários mais estudos que confirmem o potencial preditivo das proteínas Mcm para a leucoplasia verrucosa proliferativa.
Prado <i>et al.</i> ⁹⁴	2010	Evaluation of COX-2, EGFR, and p53 as biomarkers of non-dysplastic oral leukoplakias	Exp Mol Pathol	p53, EGFR e COX-2	Foi observada sobreexpressão da COX-2 em 79,2% das leucoplasias, enquanto o EGFR e p53 encontraram-se sobreexpressos na mucosa contralateral aparentemente normal (60% e 46% respetivamente) ($p < 0,05$).	A expressão da p53 esteve correlacionada com hábitos tabágicos e o coeficiente de correlação de Spearman demonstrou a correlação linear positiva entre os níveis de expressão da p53 e mRNA EGFR.
Tripathi <i>et al.</i> ⁵	2010	Nuclear S100A7 is associated with poor prognosis in head and neck cancer	PLoS One	S100A7	A S100A7 expressa-se em lesões orais precoces, displasia e tumores avançados. Observou-se um aumento significativo da acumulação nuclear da S100A7 no HNSCC (67%) face a leucoplasias displásicas (44%) ($p = 0,05$), estando associado a pior prognóstico, independentemente dos parâmetros clínicopatológicos.	O mecanismo oncogénico da S100A7 é ainda desconhecido, assim como o seu potencial preditivo para malignização de OPMDs.
Macha <i>et al.</i> ⁹⁵	2010	Clinical significance of TC21 overexpression in oral cancer	J Oral Pathol Med	TC21	Foi observado aumento da expressão nuclear da TC21 de tecido normal para leucoplasia e cancro oral ($p < 0,001$). Os OSCCs que demonstraram sobreexpressão da TC21 apresentaram menor sobrevivência sem doença, sugerindo que a TC21 pode funcionar como indicadora de mau prognóstico.	Foi observada maior expressão da TC21 em tumores precoces (T1/T2) em relação a tumores mais avançados (T3/T4), desconhecendo-se a possibilidade de um papel bifásico. O estudo demonstrou interações da TC21 com as proteínas Erk2, PI3K, 14-3-3 zeta e 14-3-3 sigma em células de cancro oral.

Resultados da revisão sistemática para os biomarcadores moleculares da leucoplasia oral

Autor(es)	Ano	Título	Jornal	Biomarcador(es)	Main findings	Outras informações relevantes
Bremmer <i>et al.</i> ⁹⁶	2011	Prognostic value of DNA ploidy status in patients with oral leukoplakia	Oral Oncol	Aneuploidia DNA	As lesões leucoplásicas com aneuploidia aparentemente apresentam risco significativamente aumentado para a progressão OSCC, apesar das lesões diplóides não se excluírem da progressão maligna. Como biomarcador único em casos individuais, tem valor preditivo limitado para a malignização.	O valor preditivo da aneuploidia é reduzido ainda que melhora com a associação ao estadiamento histopatológico, pese embora a subjetividade no diagnóstico de displasia e a inexistência de correlação entre os dois parâmetros.
Sudha e Hemavathy ⁹⁷	2011	Role of bcl-2 oncoprotein in oral potentially malignant disorders and squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study	Indian J Dent Res	bcl-2	Houve diferenças estatisticamente significativas na expressão topográfica da bcl-2 entre os espécimes de OSCC e leucoplasia ($p=0,0139$), tendo sido a única das OPMDs estudadas com significância estatística. Os resultados totais não apresentaram significância estatística entre OSCC e OPMDs, e entre OSCC e cada uma das OPMDs.	É necessária a investigação da coexpressão da bcl-2 e diferentes oncogenes para esclarecer o seu papel no desenvolvimento e progressão de tumores orais.
Godge e Poonja ⁹⁸	2011	Quantitative assessment of expression of cell adhesion molecule (CD44) splice variants: CD44 standard (CD44s) and v5, v6 isoforms in oral leukoplakias: an immunohistochemical study	Indian J Dent Res	CD44s, v5 e v6	Houve uma diminuição estatisticamente significativa ($p<0,05$) da expressão da CD44v6 com o aumento da severidade displásica. A CD44v6 é a única que aparentemente poderá servir como marcador de diagnóstico de leucoplasias de risco aumentado.	As diferenças entre estudos podem dever-se à aplicação de diferentes técnicas para identificar a molécula CD44, além da utilização de diferentes sistemas de classificação de displasia.
Xia <i>et al.</i> ⁹⁹	2011	Expressions of CXCR7/ligands may be involved in oral carcinogenesis	J Mol Histol	CXCR7/ligandos	Os rácios positivos do CXCR7, CXCL12 e CXCL11 na leucoplasia oral e OSCC foram significativamente maiores do que no epitélio normal ($p<0,05$).	Observou-se a expressão do CXCR7 em 85% das leucoplasias e 86% do total de 35 OSCCs. No entanto, apenas 8% (1/13) do tecido normal apresentou imunorreatividade para o CXCR7.
Hoffmann, Yurgel e Campos ¹⁰⁰	2011	Evaluation of salivary endothelin-1 levels in oral squamous cell carcinoma and oral leukoplakia	Requi Pept	Endotelina 1	Não houve diferenças estatisticamente significativas dos níveis da ET-1, nos pacientes com OSCC ou leucoplasia oral.	Os níveis salivares da ET-1 não parecem constituir um bom marcador para o estadiamento de neoplasias ou transformação maligna.

Resultados da revisão sistemática para os biomarcadores moleculares da leucoplasia oral

Autor(es)	Ano	Título	Jornal	Biomarcador(es)	Main findings	Outras informações relevantes
Sharma <i>et al.</i> ¹⁰¹	2011	Salivary IL-6 levels in oral leukoplakia with dysplasia and its clinical relevance to tobacco habits and periodontitis	Clin Oral Investig	IL-6	Houve aumento estatisticamente significativo dos níveis salivares da IL-6 nos pacientes com leucoplasia e periodontite ou apenas, quando comparados com controlos saudáveis ($p < 0,001$). No grupo da leucoplasia, os níveis da IL-6 aumentaram de acordo com a maior severidade displásica.	Não existe consenso para a associação entre o consumo de tabaco e os níveis salivares da IL-6. Ao contrário do estudo de Brailo <i>et al.</i> ⁸¹ , o consumo de tabaco foi considerado um fator predisponente ao aumento da IL-6 salivar.
Li <i>et al.</i> ¹⁰²	2011	IMP3 is a novel biomarker to predict metastasis and prognosis of tongue squamous cell carcinoma	J Craniofac Surg	IMP3	O primeiro estudo da expressão IHC da IMP3 na leucoplasia e SCC lingual sugere que esta proteína pode desempenhar um papel na oncogénese e metastização do SCC da língua. O IMP3 poderá ser um novo indicador de mau prognóstico.	São necessários mais estudos para esclarecer o papel oncogénico do IMP3 no SCC da língua.
Wei <i>et al.</i> ²⁷	2011	Salivary metabolite signatures of oral cancer and leukoplakia	Int J Cancer	Metabolitos salivares	O ácido láctico, a valina e a fenilalanina são os marcadores que com mais sucesso diferenciaram o OSCC da leucoplasia oral.	Apesar de resultados promissores, a sensibilidade (86,5%) e especificidade (82,4%) da análise de metabolitos salivares não permitem a sua aplicação no diagnóstico de OSCC.
Liu <i>et al.</i> ²²	2011	Identification of genes related to carcinogenesis of oral leukoplakia by oligo cancer microarray analysis	Oncol Rep	Microarray analysis	Os níveis de expressão dos 9 genes identificados apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre a leucoplasia oral e tecido normal ou OSCC. Os autores sugeriram que a expressão destes 9 genes pode ser representativa da malignização da leucoplasia oral.	É possível identificar por análise <i>microarray</i> , um conjunto de genes diferencialmente expressos entre tecido normal, OPMDs e lesões malignas. No entanto, não existe validação prospetiva dos resultados.
Nasser <i>et al.</i> ¹⁰³	2011	Aberrant expression of p53, p16INK4a and Ki-67 as basic biomarker for malignant progression of oral leukoplakias	J Oral Pathol Med	p53, p16INK4a e Ki67	Os autores propõem a combinação de alterações da p53/p16INK4a/Ki67 como biomarcador de pacientes com leucoplasias não displásicas de risco aumentado.	É necessário encontrar biomarcadores que pela sua expressão aberrante, melhorem o valor preditivo das combinações p53/p16INK4a (33%) e p53/p16INK4a/Ki67 (67%).

Resultados da revisão sistemática para os biomarcadores moleculares da leucoplasia oral

Autor(es)	Ano	Título	Jornal	Biomarcador(es)	Main findings	Outras informações relevantes
Chen <i>et al.</i> ¹⁰⁴	2011	Preoperative circulating C-reactive protein levels predict pathological aggressiveness in oral squamous cell carcinoma: a retrospective clinical study	Clin Otolaryngol	Proteína C-reativa	A presença de níveis séricos pré-operatórios aumentados da proteína C-reativa (>5,0mg/L) consiste num indicador de prognóstico independente do cancro oral. Níveis superiores de proteína C-reativa estão associados ao estadio tumoral e invasão locorregional, pelo que a identificação de pacientes, que beneficiam de tratamento adjuvantes, pode ser feita com base nos níveis desta proteína.	A medição dos níveis pré-operatórios de proteína C-reativa pode ser útil, porque é rápida, barata e reprodutível em ambiente clínico.
Macha <i>et al.</i> ¹⁰⁵	2011	Prognostic significance of nuclear pSTAT3 in oral cancer	Head Neck	pSTAT3	Foi observado um aumento significativo da acumulação nuclear da pSTAT3 em 49/90 leucoplasias (54,4%) e 63/94 OSCCs (67%) (<i>ptrend</i> <0,001). Foi observado um aumento significativo da expressão nuclear da pSTAT3 dos tecidos orais normais para leucoplasia (com e sem displasia) e cancro (<i>ptrend</i> <0,01).	O aumento da expressão da pSTAT3 esteve associado ao estadio tumoral (<i>p</i> =0,01), metastização das cadeias linfáticas (<i>p</i> =0,0018) e consumo de tabaco (<i>p</i> =0,004). A regressão de Cox revelou que a pSTAT3 nuclear é o marcador mais significativo para pior prognóstico (<i>p</i> =0,024, HR=2,7), superando a invasão das cadeias linfáticas.
Sharma e Saxena ²	2012	Quantification of AgNOR expression in exfoliated oral mucosal cells of tobacco chewers with and without lesion	Indian J Dent Res	AgNOR	Foi observada diferença estatisticamente significativa para o número de AgNORs por núcleo e percentagem de núcleos com >3 e >5 AgNORs (pAgNOR) entre sujeitos saudáveis, fumadores, mascadores de tabaco, pacientes com cancro oral e entre mascadores de tabaco com e sem lesões (<i>p</i> <0,001). Não foi observada diferença significativa entre fumadores e mascadores de tabaco à exceção da pAgNOR>5 (<i>p</i> >0,001).	Os pacientes com OSCCs apresentaram pontos AgNOR bizarros na forma e em número, quando comparados com amostras de pacientes saudáveis.
Nayyar e Khan ⁵⁵	2012	In search of malignant transformation: a pilot study	J Cancer Res Ther	Albumina e AOPP	As variações dos níveis séricos de albumina e dos foram estatisticamente significativas entre lesões eritroleucoplásicas e OSCCs (<i>p</i> <0,05).	Foi o primeiro estudo a considerar os níveis séricos de produtos proteicos de oxidação avançada como um dos importantes marcadores de diagnóstico em cancros orais.
Montebugnoli <i>et al.</i> ⁷⁰	2012	Histological and immunohistochemical evaluation of new epithelium after removal of oral leukoplakia with Nd:YAG laser treatment.	Lasers Med Sci	Ki67	Os resultados deste estudo sugerem que a avaliação semiquantitativa da expressão IHC da Ki67, na mucosa “normal” pós-exérese de leucoplasias a laser, pode servir como valor preditivo na sobrevivência sem doença a longo prazo, ainda que a informação seja preliminar.	Pela primeira vez um estudo prospetivo (<i>follow-up</i> médio de 35,3 ± 19,1 meses), demonstrou que a cicatrização clínica aparentemente normal de leucoplasia tratada por cirurgia a laser pode ser acompanhada de turnover celular alterado em 20% dos casos.

Resultados da revisão sistemática para os biomarcadores moleculares da leucoplasia oral

Autor(es)	Ano	Título	Jornal	Biomarcador(es)	Main findings	Outras informações relevantes
Shetty <i>et al.</i> ¹⁰⁶	2012	Salivary lactate dehydrogenase levels in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma: a biochemical and clinicopathological study	J Cancer Res Ther	LDH	Os estudos indicam que os níveis da desidrogenase lactato (LDH) salivar podem ser utilizados como marcadores fiáveis para o cancro oral-	
Jham <i>et al.</i> ¹⁰⁷	2012	Midkine expression in oral squamous cell carcinoma and leukoplakia	J Oral Pathol Med	Midkine	A expressão da <i>midkine</i> (MK) está aumentada no OSCC em comparação com OPMDs (leucoplasia) e mucosa normal. Além disso, lesões avançadas demonstram um aumento significativo da expressão da <i>midkine</i> quando comparadas com tumores precoces.	A MK parece ser promotora da progressão tumoral por sobreexpressão de moléculas anti-apoptóticas, tal como demonstrado pelo aumento da expressão da bcl-2 em tumores MK positivos.
Liu <i>et al.</i> ¹⁰⁸	2012	Exploiting salivary miR-31 as a clinical biomarker of oral squamous cell carcinoma.	Head Neck	miR-31	Observou-se aumento significativo dos níveis salivares do miR-31 em pacientes com carcinoma oral de qualquer estadio, incluindo tumores muito pequenos. No entanto, nesta análise preliminar não se observou aumento destes níveis em pacientes com leucoplasia verrucosa oral, comparativamente com os controlos saudáveis.	O miR-31 foi mais abundante na saliva do que no plasma. Após excisão do OSCC, os níveis de miR-31 diminuíram significativamente, ditando que a sobreexpressão dos mesmos ocorre pela presença de tecidos tumorais.
Reddy, Kamath e Radhakrishnan ⁵²	2012	p53 immunoprofiling of potentially malignant oral disorders: a case series analysis	Indian J Cancer	p53	Observou-se correlação entre o aumento da expressão e da localização celular da p53 com a progressão da severidade displásica, o que indica uma relação precoce na oncogénese oral.	
Visioli <i>et al.</i> ¹⁰⁹	2012	Expression of the cell cycle regulation proteins p53 and p21WAF1 in different types of non-dysplastic leukoplakias	J Appl Oral Sci	p53 e p21WAF1	Os resultados não permitiram diferenciar as lesões não displásicas por imunomarcagem da p53 e p21WAF1, embora perfis semelhantes tenham sido observados entre leucoplasias displásicas e não displásicas.	
Kumar, Kane e Rathod ¹¹⁰	2012	Coexpression of p53 and Ki67 and lack of c-erbB2 expression in oral leukoplakias in India	Braz Oral Res	p53, Ki67 e c-erbB2	A coexpressão aumentada da p53 e Ki67 poderá ser utilizada como marcador de diagnóstico de lesões de risco aumentado.	Aparentemente o c-erbB2 não desempenha um papel precoce na oncogénese oral, embora a degradação incompleta do recetor, tal como evidenciada pela marcação citoplasmática, poderá indicar estadios precoces.

Resultados da revisão sistemática para os biomarcadores moleculares da leucoplasia oral

Autor(es)	Ano	Título	Jornal	Biomarcador(es)	Main findings	Outras informações relevantes
Liu <i>et al.</i> ⁴	2013	Expression patterns of cancer stem cell markers ALDH1 and CD133 correlate with a high risk of malignant transformation of oral leukoplakia	Int J Cancer	ALDH1 e CD133	Este estudo demonstra pela primeira vez que a expressão da desidrogenase aldeído (ALDH1) e CD133 correlaciona-se com a transformação maligna, numa série de casos de pacientes com leucoplasia oral e <i>follow-up</i> a longo prazo, o que sugere que podem servir como valores preditivos para identificar as leucoplasias orais com maior risco malignização.	Evidência muito limitada.

DISCUSSÃO

5. Discussão

A progressão genética do OSCC tem sido descrita como um padrão de alterações sequenciais.⁴³ A evidência sugere a partilha de eventos genéticos e epigenéticos entre o OSCC e as OPMDs reconhecidas.^{111, 112} A semelhança é em parte dependente da presença de displasia epitelial, ainda que lesões individuais possuam alterações moleculares comuns ao OSCC na ausência de displasia.⁴³

A par dos avanços bioquímicos (e.g. análise salivar e serológica) também têm sido desenvolvidas técnicas de diagnóstico molecular para o OSCC, que podem assim facilitar a identificação e validação de novos biomarcadores.⁵⁷ As células da mucosa oral são normalmente obtidas a partir de vulgar biópsia por bisturi ou por raspagem/citologia exfoliativa. A expressão de biomoléculas chave como o DNA, RNA e proteínas é normalmente quantificada para definir o estado de transformação maligna das lesões orais clinicamente suspeitas.⁶

O desequilíbrio alélico – amplificação genética e perda de heterozigotia (LOH) – é a alteração de DNA mais documentada das OPMDs. Além destas, a aneuploidia, instabilidade do RNA microssatélite (miRNA), desregulação da telomerase, vias de sinalização por tirosino-cinases, marcadores de proliferação e diferenciação e as alterações epigenéticas (incluindo a metilação) têm sido amplamente relacionadas com a presença de displasia, leucoplasia e cancro oral.^{6, 7, 43, 52}

Face à grande amostra de resultados e ao diferente significado clínico atribuída a cada um dos biomarcadores, nem todos os resultados da revisão sistemática serão discutidos. A investigação do TAOS1 e EMS1,⁸⁵ IMP3,¹⁰² *midkine*,¹⁰⁷ psoriasina/proteína S100A7,⁵ endotelina-1,¹⁰⁰ proteína C-reativa,¹⁰⁴ metabolitos salivares,²⁷ lactato desidrogenase,¹⁰⁶ ácido siálico, sialiltransferase e sialoproteínas,^{72, 75} curcumina,⁹³ albumina e produtos proteicos de oxidação avançada,⁵⁵ heme oxigenase-1,⁸⁷ 8-nitroguanina,⁷⁸ LOXL4³ e TRPV1¹¹ ainda se encontra numa fase preliminar, pelo que não foi considerada pertinente a sua exploração. Assim, para cada uma das vias de sinalização ou biomarcadores de maior relevo oncogénico será contextualizada a sua importância na displasia epitelial, leucoplasia e carcinoma oral de células escamosas, dissertando os resultados desta revisão sistemática e apresentando o respetivo sumário e significado clínico.

5.1. Desequilíbrio alélico

O desequilíbrio alélico (AI) ocorre quando uma cópia de um marcador polimórfico (com 2 alelos ligeiramente diferentes) é perdida (LOH) ou amplificada (ganho alélico). O AI ocorre em *loci* cromossômicos ao longo do genoma no 3p (3p24-25, 3p21, 3p13-14), 9p21 (p16), 17p13 (p53) e 8p22-24, com os *loci* 13q14, 18q e 21q a serem abordados por alguns estudos.⁷

As lesões displásicas de maior severidade foram relacionadas com a desorganização do material genético no 3p e 9p.^{7, 113-115} Constatou-se um aumento da frequência do AI no 3p e/ou 9p em 22 de 23 (96%) casos de lesões displásicas de baixo grau (ligeira e moderada) que progrediram para carcinoma, comparando com 30 de 54 (56%) casos de igual severidade que não progrediram. Além disso, o risco relativo de malignização nestes indivíduos aumentou de 3,8 vezes para 33 vezes na presença de perdas adicionais (4q, 8p, 11q, 13q ou 17p).¹¹⁶ A relação entre o AI aumentado e o risco de transformação foi igualmente confirmado por estudos caso-controle utilizando marcadores no 3p, 8p, 9p e 13q nos casos que desenvolveram carcinoma e controles que não sofreram transformação maligna.¹¹⁷ Num destes estudos, o desequilíbrio alélico por perda de heterozigotia no 3p e 9p ocorreu em 35/39 (90%) dos casos que progrediram e em 28/39 (72%) dos casos que não sofreram alterações. Nestes indivíduos, apenas a LOH no 17p13 foi significativamente associada ao risco de desenvolvimento de neoplasma maligno.⁷

Ainda que não exista manifestação fenotípica consensual, entende-se que a desorganização do conteúdo genético pode ocorrer em displasia ligeira, quando a lesão é propícia à invasão tecidual.⁷ Quase todos os casos invasivos apresentaram AI no 9p e frequentemente no 3p21, mas a natureza de outros eventos como a expansão clonal e a disseminação lateral permanece desconhecida.¹¹³

Partridge *et al.*¹¹⁸ examinaram 19 *loci* frequentemente mutados em HNSCCs. Foi avaliado o AI no 3p24-26, 3p21, 3p13, 8p21-23, 9p21, 9q22, p53 e Rb em 43 SCCs primários. O desequilíbrio alélico foi detetado em todos os estadios TNM, com os carcinomas de estadio IV a demonstrarem significativamente mais aberrações. O AI num ou mais *loci* investigados foi associado a pior taxa de sobrevivência. A análise da sobrevivência demonstrou que os pacientes com AI para 3p24-26, 3p13 e 3p21 tinham um rácio de mortalidade 25 vezes superior aos pacientes com heterozigotia para estes *loci*.

Estes estudos nem sempre podem ser comparados devido às diferentes metodologias e marcadores utilizados. A medição do desequilíbrio alélico é difícil e carece de sensibilidade analítica. Para uma medição fiável, pelo menos 50% das células devem sofrer de alterações genéticas, sendo necessário o enriquecimento de áreas neoplásicas por microdissecção.⁹⁶ Por limitações dos estudos que comparam a frequência do AI e a possibilidade de malignização, a literatura não permite concluir que o AI no 3p, 9p e 17p tem valor preditivo na progressão de displasia e carcinoma.¹¹⁶ Além disso, a relação entre AI no 3p e 9p e o risco de progressão é enfraquecida em *follow-ups* a longo prazo ($p=0,09$), pelo que a utilização clínica requer validação prospetiva.^{7,119} Apesar de se estudar a associação de AI em múltiplos marcadores, a evidência não é esclarecedora,¹¹⁹ e os resultados apenas indicam dano genético.^{116,117}

5.1.1. Amplificação genética

O processo de amplificação genética consiste no aumento do número de cópias de determinados segmentos cromossómicos, que na oncogénese oral podem conter proto-oncogenes. Nos HNSCCs primários, a amplificação e reorganização do DNA no 11q13 tem sido reportada em 30-70% dos casos, sendo correlacionada com estadios avançados de maior severidade, aneuplóides, pior prognóstico, recidiva e metastização à distância.¹⁴ Os oncogenes presentes na região 11q13 incluem o int-2 (FGF-3), hst-1 (FGF-4), ciclina D1 (prad-1, bcl-1), e EMS1. O gene int-2 (FGF-3) está amplificado em 50% dos pacientes com HNSCC.¹⁴

Saranath *et al.*¹⁴ observaram um aumento de 5-10 vezes do número de cópias, de um ou mais fatores de transcrição oncogénicos c-myc, N-myc, Ki-ras, e N-ras em 56% de 23 HNSCCs primários, estando associado a estadios avançados III e IV de SCCs.

Os *loci* cromossómicos mais frequentemente afetados nos casos de cancro oral são o 11q13 (CCND1: ciclina D1, fosfatase-1-alfa), 7p13-22 (EGFR), 8q24 (myc) e 18q21 (bcl-2).⁶

5.1.2. Perda de heterozigotia

A perda de heterozigotia é por vezes utilizada para descrever o processo de desequilíbrio alélico, ainda que a amplificação ocorra mais frequentemente.⁷

Na LOH são eliminadas determinadas regiões cromossómicas que habitualmente contêm genes supressores tumorais. A inativação simultânea de dois alelos homólogos, por dano adquirido ou mecanismo hereditário, poderá levar à perda do gene supressor tumoral e

consequente desorganização de material genético, contribuindo assim para o desenvolvimento de neoplasia maligna.⁶

O aumento da LOH foi correlacionado com a progressão histopatológica no trato aerodigestivo superior.⁴³ Esta alteração do conteúdo de DNA também é comum na leucoplasia oral^{17, 120} e displasias de baixo grau. Os principais genes eliminados nas OPMDs incluem CDKN2A (p16^{INK4A}), p14 (ARF), p53 e APC.⁶ Aproximadamente 50% das leucoplasias apresentam perda alélica simultânea do 3p e 9p.⁴³ No OSCC as principais regiões cromossômicas afetadas incluem 3p14 (FHIT), 3p25 (VHL), 4q, 8p21-23, 9p21-22, 13q14 (pRb), 17p13-1 (p53) e 18q21.1 (DCC). Todos estes possivelmente úteis para prever a evolução de OPMDs.⁶

Gleich *et al.*¹²¹ analisaram a LOH no p53, Rb e cromossoma 16q, em conjunto com a análise dos níveis de mRNA da ciclina D1, p53, p16, p21 e p27 em 43 pacientes com HNSCC. Não foi encontrada qualquer correlação para uma só alteração genética, mas foi identificada uma tendência, embora não significativa, de pior *outcome* em pacientes com duas ou mais alterações.

Estes estudos, corretamente conduzidos por laboratórios de diferentes áreas geográficas, incluem OPMDs associadas a diferentes fatores de risco. No entanto, não se conhecem muitas das sequências relevantes dos *loci* afetados, podendo nestas residir oncogenes e genes supressores tumorais importantes.⁷

5.2. Aneuploidia

O conteúdo anormal de DNA nuclear - aneuploidia - é um indicador de alteração numérica cromossômica e o seu aparecimento é uma etapa crítica da sobrevivência e proliferação celular de clones malignos.⁹⁶

Da instabilidade cromossômica resulta o desequilíbrio das quantidades de DNA e a formação de clones diplóides (46 cromossomas de 23 pares) e aneuplóides (material cromossômico por defeito).¹⁷ A aneuploidia pode resultar de uma desproporção do conteúdo genético, por perda de genes supressores tumorais, ativação de genes promotores ou oncogenes e formação de genes fusionados (*fusion genes*).^{7, 17}

A evidência recorre a 3 fundamentos básicos:¹⁷

1. Diferentes metodologias detetaram aneuploidias específicas de fenótipos tumorais distintos;
2. Linhagens celulares tumorais aneuplóides e células transformadas *in vitro* manifestam elevado rácio de instabilidade cromossómica;
3. Vários genes que regulam a segregação cromossomal e formação dos centromas encontram-se mutados em células malignas humanas.

Aproximadamente 50-60% dos cancros orais são aneuplóides, havendo um estudo que reporta valores de 90%.^{7, 122, 123} A aneuploidia tem sido igualmente associada a elevadas incidências de recidiva local e metastização das cadeias linfáticas no OSCC. Diwakar *et al.*¹²² identificaram 52% OSCCs aneuplóides e 19% heterogéneos.

A relação entre aneuploidia e displasia tem sido igualmente abordada por vários estudos. Recentemente, dois estudos retrospectivos caso-controlo demonstraram que lesões orais displásicas aneuplóides apresentavam maior risco de progressão maligna.⁹⁶ Aproximadamente 20-45% das displasias orais são aneuplóides, com estudos a reportar frequências de 83%.¹²³⁻¹²⁵ Foi encontrada correlação positiva entre a aneuploidia e o grau de severidade displásica.^{124, 125} Estudos sobre a relação entre a presença de aneuploidia e localizações de maior risco de malignização demonstraram que mesmo displasias ligeiras na língua ou pavimento da boca podem ter características aneuplóides.¹²⁶ Torres-Rendon *et al.*¹²³ demonstraram que as displasias aneuplóides estão mais sujeitas a progressão maligna do que as lesões diplóides (33% vs. 11%, $p=0,01$), tendo verificado que num período de 5 anos, 53% dos casos aneuplóides progrediram para OSCC vs. 25% dos casos diplóides.

Recentemente, o valor de prognóstico da ploidia do DNA tem sido documentado para OPMDs,⁷ embora sem o valor preditivo promissor apresentado por alguns trabalhos, posteriormente invalidados por rejeição da metodologia subjacente aos resultados.⁴³ A aneuploidia pode ser quantificada com exames relativamente robustos e sensíveis, embora ultimamente a sua reputação como marcador de progressão tenha sido questionado.⁹⁶

A hibridização cromossómica *in situ* tem sido usada para detetar a replicação de DNA na leucoplasia oral. Estes estudos indicam que a maioria das leucoplasias contém um número anormal de cromossomas 7 e 17 e trissomia do cromossoma 9 em proporções superiores a 3%, com conseqüente aumento significativo do risco de transformação maligna.⁴³

Num dos estudos, 150 pacientes com leucoplasia oral displásica foram analisados para o conteúdo de DNA. Dos 106 casos diplóides, 3 (3%) desenvolveram carcinoma durante o *follow-up*, ao contrário de 21 em 25 casos aneuplóides (84%) que sofreram transformação maligna. Os rácios cumulativos de ausência de doença foram de 97, 40 e 16% para os grupos diplóide, tetraplóide e aneuplóide, respetivamente ($p < 0,001$). O *odds ratio* para o desenvolvimento de carcinoma em pacientes com lesões aneuplóides foi de 27,6 (95% CI com intervalo 18,4-36,8).^{17, 42}

Bremmer *et al.*⁹⁶ publicaram um estudo de coorte (*follow-up* mediano 69 meses), incluindo pacientes com leucoplasia oral (n=62), nos quais compararam o valor preditivo da aneuploidia por citometria de imagem e estadiamento histológico. A aneuploidia do DNA foi observada em 27 (44%) dos pacientes e esteve significativamente associada a menor tempo sem malignização. Não foi possível estabelecer correlação entre a aneuploidia e o estadiamento de displasia. O estudo permitiu demonstrar que a análise do conteúdo genético por citometria de imagem tem valor significativo na avaliação do risco de progressão maligna. No entanto, o valor preditivo para casos isolados foi mediano. Quando analisada estatisticamente a combinação da quantificação de aneuploidia e o estadiamento histopatológico, parece haver ligeira vantagem na avaliação de risco.⁹⁶

Notavelmente, mesmo lesões aparentemente sem potencialmente maligno foram associadas a alterações aneuplóides, predizendo assim a ocorrência subsequente de carcinoma. Ainda que sem validação, a aneuploidia do DNA poderá identificar indivíduos com elevado risco de desenvolvimento de cancro oral a partir de OPMDs.^{17, 42}

Sumário e significado clínico: aparentemente, as lesões leucoplásicas aneuplóides apresentam risco significativamente aumentado para OSCC, apesar das lesões diplóides não se excluírem da transformação maligna. Como biomarcador único em casos individuais, tem valor preditivo limitado para a malignização, ainda que melhore com a associação ao estadiamento histopatológico, pese embora a subjetividade no diagnóstico de displasia e a inexistência de correlação entre os dois parâmetros.

5.3. DNA microssatélite

As sequências de DNA microssatélite consistem em repetições de 1-5 pares de bases. Combinadas com o DNA satélite e minissatélite, constituem uma família conhecida como

tandemly repetitive sequences. A inserção ou deleção de pares de bases designa-se por instabilidade microssatélite (MI), sendo mais uma das características citogenéticas partilhada entre OPMDs e OSCC. Num pequeno estudo em 19 pacientes com OSCC, a deteção da perda alélica de DNA microssatélite foi analisada após citologia exfoliativa e bochecho. Em 84% dos casos analisados, a perda alélica previamente identificada por citologia exfoliativa foi igualmente detetada nos bochechos. Não foram encontradas alterações em 10 dos pacientes. O sucesso da deteção foi independente do estadió tumoral, sugerindo que esta abordagem pode ser útil para o diagnóstico precoce e *follow-up*.^{17, 42} A MI está presente em 55% das lesões leucoplásicas, aparentemente associada à progressão histológica de displasia. Os mecanismos oncogénicos subjacentes à instabilidade microssatélite ainda não foram esclarecidos, pelo que a evidência é limitada, nomeadamente no que diz respeito à sua potencialidade como biomarcador de diagnóstico precoce, prognóstico, malignização e recidiva de OSCC.⁴³

5.4. RNA microssatélite

Os miRNAs são pequenas moléculas de RNA não codificantes, de 20-22 nucleótidos, que regulam a expressão pós-transcricional (degradação e estabilização) de mRNAs alvo em vários cancros, incluindo o OSCC.^{6, 7, 108} Foram identificadas mais de 1000 destas sequências e os estudos funcionais têm comprovado que o miRNA atua maioritariamente como supressor tumoral convencional ou como oncogene.⁷

Os miRNAs da família let-7 são exemplos de supressores tumorais e encontram-se frequentemente anulados no OSCC. Genes como o bcl-2, ras, myc, HMGA, cdk4 e cdk6 são alguns alvos dos miRNAs com função supressora tumoral. Outros oncogenes como o PTEN, p27, p57, TIMP3 e BIM estão igualmente identificados como alvos de diferentes miRNAs.⁷

Além disso, a sobreexpressão do mir-181b e mir-345 tem sido associada à leucoplasia oral, estando a par do miR-21 consistentemente aumentado na displasia oral e associado à severidade da lesão.^{7, 127} Têm sido observados níveis plasmáticos aumentados do mir-21, mir-24 e mir-31 em pacientes com cancro oral. Pelo contrário a subexpressão do mir-125b e mir-100 tem sido associada às OPMDs,⁶ estando assim associados a doença precoce.⁷

5.4.1. miR-31

Todos os RNAs secretados ou presentes na saliva por lise celular de estruturas orais ou anexas, incluindo mucosa oral, glândulas salivares e bolsas periodontais (aporte sistêmico pelo fluido crevicular), podem contribuir para a amostra total dos diferentes tipos de RNA salivar. O miRNA existe de forma estável em ambientes biológicos rigorosos, como os fluidos corporais, fazendo deste ótimo marcador nestas condições (e.g. miR-31). A sobreexpressão do miR-31 tem sido identificada numa variedade de neoplasmas malignos, incluindo carcinoma de célula escamosas da cabeça e pescoço, hepatocelular e colorctal. O miR-31 está significativamente sobrerregulado no carcinoma oral, inibindo estados de hipóxia das células malignas. Além deste miRNA outros têm sido associados ao OSCC como é o caso do miR-125a e miR-200a.¹⁰⁸

Liu *et al.*¹⁰⁸ analisaram os níveis salivares do miR-31 em pacientes com carcinoma oral (n=45), leucoplasia oral verrucosa (n=10) e controlos saudáveis (n=24) por RT-PCR. Observou-se um aumento significativo dos níveis salivares do miR-31 em pacientes com carcinoma oral, incluindo tumores muito pequenos, pelo que existe a possibilidade de detetar tecido maligno residual. Neste estudo preliminar não se detetaram diferenças dos níveis salivares entre pacientes com leucoplasia verrucosa oral e controlos saudáveis. O miR-31 foi mais abundante na saliva do que no plasma, sugerindo que os níveis salivares representam um marcador mais sensível para o cancro oral. Após excisão do OSCC, os níveis de miR-31 diminuíram significativamente, indicando que a sobrerregulação dos mesmos ocorre pela presença de tecidos tumorais, potenciando assim a sua aplicação como marcador de OSCC residual ou recidiva.¹⁰⁸

Sumário e significado clínico: as sequências de RNA microssatélite podem ter potencial preditivo, uma vez que de forma isolada regulam múltiplas vias de sinalização anormais no cancro oral. Apesar dos resultados sugeriram o miR-31 salivar como possível biomarcador de deteção precoce e monitorização de carcinoma oral, é necessária a sua validação por estudos clínicos com *follow-ups* alargados e populações representativas. Além disso, é necessário esclarecer quais os mRNAs regulados por este e outros miRNAs, e quais as suas implicações em simultâneo nas vias de sinalização conhecidas para a oncogénese oral. Tendo em conta que as origens do miRNA salivar e plasmático podem ser diferentes, o aumento destes níveis pode ter diferentes implicações clínicas e patológicas. No entanto, a grande correlação entre os 2 fluidos sugere que a interpretação simultânea dos dados pode

ajudar à previsão da doença. São necessários estudos que comparem a expressão salivar destes marcadores em lesões leucoplásicas orais e controlos saudáveis. A evidência existente é insuficiente para delinear recomendações clínicas, nomeadamente a utilização da expressão de miRNA como valor preditivo para a progressão maligna de lesões displásicas orais.

5.5. Eventos epigenéticos

As alterações epigenéticas não estão codificadas no DNA embora sejam hereditárias.¹²⁸ São 3 as modificações possíveis, identificadas em várias patologias malignas: hipermetilação do DNA, silenciamento pós-transcricional associado ao RNA e modificação das histonas.⁷ A metilação do DNA é o evento mais estudado no OSCC. Nos tecidos normais, a citosina não metilada concentra-se em regiões/ilhas citosina-fosfato-guanina (CpG),⁷ situando-se próximas às regiões promotoras de 40% dos genes nos mamíferos.¹²⁸ Este estado não metilado é associado a rácios elevados de atividade transcricional,⁷ enquanto a metilação destas regiões promotoras previne a transcrição por alterar a estrutura das histonas.⁴³ A hipermetilação dos promotores, através da enzima DNA metiltransferase, resulta na inativação transcricional dos genes supressores tumorais no OSCC.^{6, 7, 43, 129}

A metilação aberrante de EDNRB, KIF1A e dos genes DCC é comum em pacientes com cancro oral. Além disso, tem sido igualmente reportada a hipermetilação de promotores com reparações *mismatch* (e.g. hMLH1 e hMSH2).⁶

No OSCC, a hipermetilação da p16 ocorre em 50-73% dos casos e da p15 em 60% dos casos.¹³⁰⁻¹³³ Existem outros genes identificados como hipermetilados no OSCC: CDH1 (16q22.1) que produz E-caderina e participa na adesão celular e inibição por contacto; gene MGMT (10q26) que produz uma enzima (O⁶-metilguanina-DNA-metiltransferase) reparadora de alterações do DNA resistentes à apoptose; DAPK1 (9q22) associada à apoptose e o gene RARB2 (3p24) que codifica um recetor nuclear, capaz de regular a proliferação celular e a diferenciação escamosa.⁷

Os genes comumente afetados em OPMDs incluem CDKN2A (p16^{INK4A}), p14 (ARF), CDH1, MGMT, CHFR e DAPK1.⁶ A hipermetilação do p14 (ARF), p16^{INK4a}, p15, MGMT, DAPK, GSTP1 e RARB tem sido observada em displasia e margens aparentemente normais de OSCC tratados. Existe alguma evidência que suporta a ligação entre a hipermetilação da p14 e a atividade da p53, sendo que lesões da língua e pavimento da boca,

consideradas de elevado risco para displasia e malignização, tendem a estar hipermetilados. Alguns estudos têm demonstrado hipermetilação da p15 e p16 em fumadores e consumidores de álcool em pacientes com leucoplasia, mas estes dados não foram confirmados por exame histopatológico.⁷

Também as margens aparentemente normais de 25-60% espécimes excisados demonstram estados hipermetilados.^{130, 132, 133} Kresty *et al.*¹³⁴ identificaram a hipermetilação do p16^{INK4a} e p14 (ARF) em 57.5% e 3,8% dos casos de displasia severa, respetivamente. A hipermetilação (assim como a mutação pontual e deleção) da p16 (9p21) anula a sua atividade de supressão tumoral via p16/R6/ciclina D1.^{131, 134} Takeshima *et al.*¹³⁵ identificaram a hipermetilação da p16 em 18% displasia ligeira vs. 55% de displasia severa; p14 em 77% displasia ligeira vs. 65% displasia severa; p15 em 50% displasia ligeira vs. 65% displasia severa e p53 em 32% displasia ligeira vs. 40% displasia severa. A hipermetilação do RARB2 foi observada em 53% das leucoplasias orais, mas o diagnóstico histológico destas lesões não foi bem definido.^{43, 136} Através de bochecho em pacientes com leucoplasia, López *et al.* demonstraram em 2 genes também metilados para o OSCC, uma incidência de 44% de metilação da p16 e de 56% da MGMT.¹³⁷

Apesar da elevada frequência destas alterações epigenéticas, os estados hipermetilados não demonstram correlação com o grau de displasia e não predizem o desenvolvimento ou recidiva de OSCC.⁷ O número de estudos é limitado pela quantidade de DNA necessária para que se torne possível a análise da metilação.⁴³ Neste momento, a evidência disponível não permite a utilização da hipermetilação como marcador preditivo da progressão de lesões displásicas.⁷ Com o avanço das técnicas de análise outros genes serão investigados, conduzindo ao esclarecimento das alterações epigenéticas na leucoplasia oral e a sua função na oncogénese precoce.⁴³ Esta informação deve no futuro ser potenciada para desenhar estratégias de prevenção para o cancro oral.⁶

5.6. Importância da telomerase

O desequilíbrio resultante da desregulação da telomerase também intervém na oncogénese oral. Os telómeros são hexâmeros no término distal de cada cromossoma, compostos por cromatina em *tandem repeats* (TTAGGG) ligados a proteínas específicas. Estes previnem a degradação e fusão cromossómica.^{17, 43} Em situações normais os telómeros são encurtados a cada divisão celular,⁴³ resultando no envelhecimento e senescência celular.

A telomerase regula a síntese e manutenção destes telómeros, assim como o alongamento destes hexâmeros nas linhagens germinativas e fetais, apresentando atividade limitada nas células somáticas. Conforme o seu encurtamento representa o ciclo de vida de uma célula, a sua perda diminui a probabilidade de desenvolvimento de cancro^{7, 17, 43} As células malignas são capazes de estabilizar os telómeros por ativação desta polimerase, evitando assim a senescência e facilitando a imortalização celular.¹³⁸

Ainda que dependa do método de análise, a atividade da telomerase foi observada em 67-100% dos OSCCs¹³⁹ e a sua sobreexpressão em 50-100% dos casos de displasia moderada e severa.¹⁴⁰ Fujita e Yajima *et al.*^{141, 142} demonstraram expressão similar da telomerase em lesões displásicas, margens de OSCCs e OSCCs. Vários estudos têm notado a correlação da atividade da telomerase com a progressão de displasia,⁴³ sugerindo que a sobreregulação transcricional, i.e. sobreexpressão do respetivo mRNA, é responsável pelo aumento da atividade na leucoplasia e conseqüente progressão maligna para OSCC.^{43, 143} O estudo de Chen *et al.*¹⁴⁰ foi o único que não encontrou diferenças entre displasias e OSCCs.

A ativação da telomerase parece ser um evento tardio durante a progressão maligna, embora a sua atividade aparentemente aumente entre lesões de menor e maior gravidade histológica, incluindo displasia e OSCC.¹⁷ Vários estudos demonstraram que até 75% das leucoplasias orais demonstram atividade da telomerase.⁴³ Aproximadamente 2/3 das leucoplasias orais e quase 9 em 10 carcinomas parecem ser positivos para a atividade da telomerase e da telomerase RNA, podendo também ser detetada precocemente na oncogénese.¹⁷

As frequências reportadas variam muito entre estudos e nem todos os cancros são candidatos a inibidores da telomerase, já que nem sempre existem diferenças na expressão desta enzima entre tecidos normais e malignos. Ainda é desconhecida a sua importância nas OPMDs.¹⁷ Além disso, não existem publicações que tenham correlacionado a atividade da telomerase com a progressão para OSCC. Atualmente, não é possível determinar o valor preditivo da telomerase no caso de lesões orais displásicas.⁷

5.7. Marcadores de proliferação

5.7.1. Ki67

O Ki67 tem sido largamente utilizado e é recomendado como um marcador IHC fiável e consistente da proliferação celular oral. O aumento da expressão da Ki67 tem sido associado à progressão de displasia e tem sido sugerido como um possível marcador precoce da transformação maligna.²³

A ciclina A tem sido considerada como um marcador útil da proliferação celular e um potencial indicador do agravamento do prognóstico para lesões displásicas e carcinomas orais, com um índice de marcação (LI) variável entre mucosa normal (5%) e carcinoma de células escamosas (SCC) (29%). Contudo não se sabe se o aumento da ciclina A se sobrepõe a outros reguladores do *turnover* celular ou se é apenas um marcador de proliferação aumentada.²³

A sobreexpressão da ciclina B1 parece resultar do descontrolo da proliferação celular. Este fenómeno tem sido observado em vários SCCs, incluindo carcinoma da mama, esófago e língua, estando frequentemente associada a pior *outcome* clínico.²³

De acordo com a evidência, Hamadah, Goodson e Thomson⁶⁵ investigaram as diferenças dos parâmetros clinicopatológicos, *outcome* clínico, fatores de malignização e padrões proliferativos (Ki67, ciclina A e B1), entre OPMDs (95 pacientes) solitárias (n=78) e múltiplas (n=18). As OPMDs displásicas (maioritariamente solitárias, sendo a displasia ligeira mais comum nas lesões múltiplas) foram excisadas e as margens vaporizadas utilizando laser de CO₂ pelo mesmo operador. A exérese completa de cada lesão teve confirmação histopatológica. Os pacientes foram seguidos por 5 anos e foi documentado o *outcome* clínico. Os espécimes excisados (n=132) foram avaliados por IHC para a ciclina A, sintetizada durante a fase S e necessária para a progressão do ciclo celular; ciclina B1, marcador da atividade em G2 que induz o movimento celular para e a partir da mitose e Ki67, um marcador geral da atividade proliferativa. Não houve associação entre tabagismo e desenvolvimento diferencial de lesões solitárias ou múltiplas (p=0,26), semelhante à inexistência de relação com o número de unidades de álcool consumidas (p=0,09). Após controlo do tabagismo, as lesões multifocais estavam mais frequentemente associadas ao consumo de fruta e vegetais inferior a 3 porções por dia (p=0,01); resultado que deve ser

interpretado com cautela pela pouca representatividade da amostra. Os índices de marcação proliferativa para lesões solitárias foram maiores do que para lesões múltiplas nos 3 marcadores, com significância para a ciclina A ($p=0,04$) e Ki67 ($p=0,01$). Dos 78 que apresentavam lesões solitárias 50 (64%) permaneceram livres de doença após excisão, enquanto 25 (32%) desenvolveram recidiva no mesmo local ou nova doença em local diferente. O *follow-up* de pacientes com lesões múltiplas foi mais difícil pela natureza disseminada das lesões. De todos os pacientes, 7 desenvolveram OSCC durante o *follow-up*, 3 dos 78 com lesões únicas e 4 dos 18 com lesões múltiplas, com expressão estatisticamente significativa ($p=0,02$), ainda que a progressão maligna não parecesse estar relacionada com o diagnóstico histopatológico (mais displasias severas em lesões solitárias) ou índices de marcação proliferativos. A maior facilidade em identificar e eliminar completamente lesões solitárias pode explicar o rácio de transformação inferior. A maior incidência de carcinoma em lesões múltiplas provavelmente reflete a instabilidade generalizada da mucosa, sendo impraticável a excisão de grandes áreas da mucosa. Em 6 pacientes, o OSCC teve origem em locais distantes das OPMDs apresentadas. Nenhum paciente faleceu durante os 5 anos de monitorização.⁶⁵

De acordo com os mesmos princípios de marcação, Thomson *et al.*²³ desenvolveram um estudo de coorte, para analisar a longo prazo, a eficácia dos mesmos marcadores na identificação de lesões de maior risco. O *outcome* clínico foi definido como ausência de recidiva no mesmo local ou nova doença em local distinto. As lesões solitárias excisadas de 40 pacientes foram reavaliadas por IHC e foram determinados os LIs para a ciclina A, B1 e Ki67 de OPMDs, predominantemente leucoplasias (65%) do pavimento da boca e face ventrolateral da língua (78%), maioria com displasia moderada a severa (95%). Os LIs da ciclina A variaram entre 3,9%-31,3%, B1 0-28,3% e Ki67 3,5%-54,5%. Observou-se forte correlação entre os 3 marcadores ($p<0,001$), no entanto sem relação significativa entre os LIs e a aparência clínica ou localização anatómica, apesar do aumento de acordo com a progressão da severidade displásica. Foram observados aumentos significativos para a ciclina A ($p=0,004$) e Ki67 ($p=0,028$) entre displasia moderada e severa. Utilizando os valores medianos dos LIs como índices de referência demonstrou-se um risco significativo de progressão histológica da doença nos pacientes com OPMDs que excediam esses valores (ciclina A $p=0,02$, ciclina B1 $p=0,01$, Ki67 $p=0,025$). A análise combinada da ciclina A e B1 aumentou a significância destes marcadores ($p<0,01$). Nenhum paciente progrediu para OSCC durante os 5 anos de monitorização; 24 não apresentaram recidiva, enquanto 16

desenvolveram doença, 7 em local distinto. Não houve relação entre o *outcome* e a aparência clínica das lesões ou local de origem. O aparecimento de lesões em local distinto foi mais comum em pacientes com prévia lesão displásica severa ($p=0,001$). As lesões com maiores LIs demonstraram maior incidência de recidiva: ciclina A ($p=0,01$), ciclina B1 ($p=0,01$) e Ki67 ($p=0,03$), sendo que a análise combinada de ciclina A e B1 aumentou a certeza ($p=0,005$). A maioria dos episódios de nova doença ocorreu durante os primeiros 18 meses após o tratamento.²³

Tal como sugerido anteriormente, o laser tem sido utilizado com crescente frequência e sucesso no tratamento da leucoplasia oral. Montebugnoli *et al.*⁷⁰ avaliaram a cura clínica (≥ 3 meses) e a possibilidade de recidiva de leucoplasia sem displasia após excisão com laser Nd:YAG. Foram incluídos 13 pacientes com leucoplasia e 13 amostras de epitélio oral normal. Após 3 meses da terapêutica cirúrgica, os pacientes foram sujeitos a repetição de biópsia no mesmo local, embora com tecido clinicamente saudável. O *turnover* celular epitelial foi avaliado antes e depois da exérese cirúrgica, pela expressão proteica do Ki67, tendo sido considerada anormal/patológica a coloração positiva superior a 20% das células, já que em nenhum estudo a mucosa normal demonstrou *cut-off* superior. Todos os pacientes cumpriram o *follow-up* mensal após a segunda biópsia, tendo sido cumprido um *follow-up* médio de $35,3 \pm 19,1$ meses. Dos 13 pacientes tratados, 8 apresentaram valores anormalmente elevados da Ki67 antes da terapia a laser (média $27,4 \pm 6,2\%$), tendo sido conseguida diminuição significativa após o tratamento ($17,6 \pm 8,5\%$; $t=2,6$, $p<0,05$). Os valores elevados da Ki67 persistiram em 3 pacientes e as recidivas locais foram observadas em 2 destes 3 pacientes. A análise Kaplan-Meier demonstrou que a diferença entre grupos (Ki67 elevado vs. Ki67 normal pós-excisão) foi estatisticamente significativa (*chi square* 7,3; $p<0,01$) para a sobrevivência sem doença. Pela primeira vez um estudo prospetivo demonstrou que a cicatrização clínica aparentemente normal de leucoplasia, tratada por cirurgia a laser, pode ser acompanhada de *turnover* celular alterado. Os resultados deste estudo sugerem que a avaliação semiquantitativa da expressão IHC da Ki67 na mucosa clinicamente normal pode servir como valor preditivo na sobrevivência sem doença, ainda que os dados de *follow-ups* alargados sejam preliminares.⁷⁰

Sumário e significado clínico: a Ki67, como marcador do *turnover* celular, pode ser de valor preditivo após excisão de lesões leucoplásicas, apesar dos resultados a longo prazo necessitarem de validação em populações representativas. A evidência inconclusiva quanto aos biomarcadores preditivos existentes, nomeadamente no que diz respeito aos marcadores

da proliferação celular, indica a necessidade de estudos RCTs multicêntricos longitudinais que comparem as intervenções cirúrgicas, associadas ou não a quimioprofilaxia sistêmica, na monitorização das OPMDs, particularmente nos pacientes com doença multifocal de elevado risco como a leucoplasia verrucosa proliferativa.

5.7.2. PCNA

A progressão do ciclo celular é dependente da regulação de diferentes proteínas (e.g. supressoras tumorais p53), envolvidas na reparação, duplicação e separação do DNA. A desregulação da atividade proliferativa (e.g. Ki67 e PCNA) também pode contribuir para o desenvolvimento de cancro oral por etapas.¹⁸

O antígeno nuclear de proliferação celular (PCNA) é um cofator proteico da DNA polimerase δ , assumindo por isso um papel importante na síntese e reparação do DNA, progressão do ciclo e proliferação celular. Apesar de alguns estudos indicarem a sua utilidade na previsão da transformação maligna por tradução dos índices proliferativos, não existe validação clínica para tumores da cabeça e pescoço, sendo o seu significado tema de debate.¹⁸

Tendo em vista a clarificação desta controvérsia, Soares *et al.*¹⁸ avaliaram a expressão IHC da p53, PCNA e Ki67 por métodos convencionais/manuais e computadorizados, com o objetivo de esclarecer a utilidade destes biomarcadores. Analisaram através de estudo retrospectivo 95 biópsias orais, 27 classificadas como hiperplasia fibrosa inflamatória (FIH), 40 leucoplasias (16 não displásicas; 24 displásicas - 50% moderada a severa), 28 OSCCs. Incluíram-se 30 controlos (tecido normal) para definição da positividade anormal da p53 (n=10), PCNA (n=10) e Ki67 (n=10). A comparação dos 4 grupos demonstrou aumentos constantes e significativos dos índices de marcação da p53 e Ki-67 entre lesões benignas, potencialmente malignas e malignas, indicando-os como potenciais biomarcadores da agressividade tumoral. A distribuição da imunomarcção da p53 e Ki67 fez-se novamente da camada basal, suprabasal e a toda a extensão do epitélio, de acordo com a lesão presente: FIH, leucoplasia e leucoplasia displásica e OSCC. Tem sido atribuído valor preditivo eficaz à p53 para a transformação maligna. No entanto, este estudo demonstrou que lesões leucoplásicas e malignas podem ser negativas para a p53. A ausência da expressão IHC da p53 não exclui a transformação maligna e outros fatores podem ter levado à disfunção da p53 (e.g. HPV, EBV e MDM2), resultando em imunexpressão negativa. Além disso, a mutação do p53 pode resultar em alterações da própria proteína, que se torna indetetável por anticorpos comerciais

menos específicos, resultando em amostras de cancro oral negativas. Pelos resultados quantitativos computadorizados da imunomarcação da Ki67, os autores sugerem que os estadios displásicos menos severos apresentam menor atividade proliferativa, implicando assim evolu o mais lenta até ao estado maligno. No entanto, a evidência confirma que mesmo lesões com displasia ligeira ou ausência de displasia sofrem maligniza o. Assumem grande importância os *follow-ups* a longo prazo de lesões leucoplásicas com e sem displasia, para distinguir a evolu o maligna ou menos rápida. Não foi possível relacionar elevados níveis de PCNA e lesões benignas ou malignas, sendo a distribui o do marcador feita em toda a extensão epitelial para todos os 4 grupos, pelo que os autores concluíram que a expressão IHC quantitativa do PCNA   provavelmente um marcador inapropriado para identificar processos de oncog nese oral, ao passo que a avalia o combinada da expressão IHC quantitativa da p53 e Ki-67 parece ser útil como marcador tumoral, pressupondo uma estimativa da desregula o do ciclo celular e do estado proliferativo oral.¹⁸

Sumário e significado clínico: a expressão quantitativa e distribui o IHC do PCNA não parecem ser capazes de diferenciar lesões orais com e sem potencial maligno, ou mesmo lesões benignas e malignas. Ao contrário deste marcador proliferativo, a sobreexpressão e os padrões de imunomarca o da p53 e o aumento do *turnover* celular quantificado pelo Ki67, podem em conjunto ter valor preditivo para a transforma o maligna.

5.7.3. AgNOR

As regiões organizadoras de nucléolos (NORs) são os segmentos dos cromossomas responsáveis pela síntese de RNA ribossomal, que refletem a síntese proteica e estão presentes em *loops* específicos do DNA de cromossomas acrocêntricos 13, 14, 15, 21 e 22.^{2, 86} Associadas a estas estão determinadas proteínas não hist nicas, acídicas e argirof licas, designadas por NORAPS (NOR *Associated Proteins*).⁸⁶ Assim, as NORs coradas de prata são também designadas por AgNORs, e quando observadas por microscopia convencional aparecem como pontos pretos/castanhos bem definidos, localizados no interior dos nucléolos sob citoplasma amarelado.^{2, 83} A facilidade e simplicidade deste sistema de marca o conduziram   sua aplica o global em diferentes patologias humanas, identificando os diferentes níveis de síntese proteica.⁸⁶ A avalia o da prolifera o celular, por anticorpos direcionados a antigénios reguladores do ciclo celular (e.g. PCNA e Ki67), tem sido amplamente estudada. Porém, a medi o da fra o em crescimento, apenas representa um parâmetro da cinética de crescimento de um tumor maligno e não tem em conta a dura o do

ciclo celular. A quantificação das proteínas AgNOR tem sido considerada como uma técnica ideal para avaliar a velocidade do ciclo celular, e estudos anteriores têm reportado uma relação direta entre a quantidade de AgNORs e o número de células proliferativas.^{83, 86} Na patologia oral, as AgNORs têm sido utilizadas por vários investigadores para diferenciar quistos odontogênicos e tumores, lesões de células gigantes recidivantes e não recidivantes, fibrose submucosa oral, diferenciação entre OSCC de lesões benignas e reativas, e também na detecção de alterações celulares incipientes. A utilidade das AgNORs foi demonstrada na marcação da progressão tumoral, na previsão da resposta ao tratamento e para detetar tecido tumoral residual.⁸⁶ Ainda que sejam consideradas úteis para estimar a atividade proliferativa dos neoplasmas, o seu valor clínico no prognóstico de tumores da cabeça e pescoço é ainda sujeito a debate.⁸³ Existe controvérsia para definir se são os parâmetros qualitativos ou quantitativos de AgNORs que diferenciam as OPMDs de tecido normal.⁸⁶ As lesões reativas hiperplásicas também apresentam aumento da proliferação celular, pelo que a inclusão deste tipo de amostras favorece a consistência destes estudos.⁸⁶

Pela primeira vez, Elangovan, Mani e Malathi⁸⁶ compararam a marcação das AgNORs em tecidos normais, reativos, potencialmente malignos e malignos, para avaliar o significado de vários parâmetros qualitativos e quantitativos das AgNORs. A amostra retrospectiva foi constituída por 10 OSCCs (5 bem e 5 moderadamente diferenciados), 10 OPMDs (5 fibrose submucosa e 5 leucoplasia oral), 5 lesões inflamatórias (granuloma piogénico) e 2 biópsias de mucosa normal como controlo. Foi observada diferença estatisticamente significativa no número de AgNORs entre a mucosa normal, lesões inflamatórias e carcinomas, ainda que as OPMDs não diferissem significativamente da mucosa normal. Em termos qualitativos, o tamanho, forma e padrão de distribuição na mucosa normal e lesões inflamatórias foi semelhante, apesar destes parâmetros em OPMDs e lesões malignas serem significativamente diferentes da mucosa normal, com pleomorfismo marcado das AgNORs entre carcinomas. Os resultados quantitativos das AgNORs foram proporcionais à proliferação epitelial e não indicam necessariamente a transformação maligna. Pelo contrário, as características qualitativas das AgNORs diferenciam lesões hiperplásicas, OPMDs e doença maligna.

Sharma e Saxena² investigaram o valor de diagnóstico e prognóstico das NORs, associado ao rácio proliferativo e comportamento tumoral. Foram obtidos raspados de 55 pacientes, 40 fumadores/mascadores de tabaco, 5 pacientes com OSCCs e 10 indivíduos saudáveis, e foram avaliadas as AgNORs por dois métodos de contagem: 1) número médio de

AgNORs por núcleo (mAgNOR) e 2) percentagem de núcleos com >3 e >5 AgNORs (pAgNOR). A recolha das amostras por citologia exfoliativa fez amostras de 3 sítios diferentes do mesmo paciente (mucosa jugal, pavimento da boca e palato), num total de 165 slides: grupo I – 20 pacientes com hábito de mascar tabaco, dos quais 10 com queratose e displasia e 10 com mucosa oral normal; grupo II – 20 fumadores, dos quais 10 com leucoplasia hiperqueratótica displásica e 10 com mucosa oral normal; grupo III – 10 indivíduos saudáveis sem hábitos tabágicos; grupo IV – 5 OSCCs. Foi observada diferença estatisticamente significativa para os dois métodos de contagem entre sujeitos saudáveis, fumadores, mascadores de tabaco, pacientes com cancro oral e entre mascadores de tabaco com e sem lesões ($p < 0,001$), com valores mais altos na presença de lesões. Não houve correlação com o número de pacotes de tabaco ou cigarros consumidos, ainda que a mucosa jugal fosse significativamente mais afetada em fumadores ($p < 0,05$), quando comparada com palato e pavimento da boca, talvez pela maior exposição a carcinogéneos. Não foi observada diferença significativa entre fumadores e mascadores de tabaco à exceção da pAgNOR >5 ($p > 0,001$), apresentando valores superiores para os que mascavam tabaco. Tal como para estudos prévios, os pacientes com OSCCs apresentaram pontos AgNOR bizarros na forma e em número, quando comparados com amostras de pacientes saudáveis.²

Teresa *et al.*⁸³ tentaram determinar se a quantificação das AgNORs e do Ki67 pode melhorar a avaliação do crescimento em lesões orais. Foram analisadas 83 biópsias orais, 20 das quais classificadas como FIH, 40 leucoplasias (22 não displásicas e 18 displásicas) e 23 OSCCs. Das leucoplasias displásicas, 67% ($n=12$) apresentaram displasia moderada a severa. A imunomarcação do Ki67 aumentou constantemente entre FIH, leucoplasia displásicas, leucoplasia sem displasia e OSCC ($p < 0,001$), indicando-o como bom marcador da fração proliferativa nas diferentes lesões e com valor preditivo da progressão tumoral. A imunomarcação quantitativa Ki-67 foi ligeiramente maior nas leucoplasias não displásicas do que na leucoplasia displásica, ainda que a diferença não seja estatisticamente significativa, sugerindo que o Ki-67 não deverá ser utilizado para determinar pequenas diferenças na atividade celular destas lesões, além de um potencial oculto de transformação destas leucoplasias aparentemente de menor risco. A ausência ou reduzida imunomarcação do Ki-67 poderá indicar diferentes clones celulares num tumor, já que nem todas as células de uma neoplasia necessariamente se encontram no mesmo estado proliferativo. Contudo, foi observada uma diferença significativa entre leucoplasia não displásica e FIH ($p < 0,05$). Pelo contrário, a análise de AgNORs discrimina claramente o estado proliferativo de lesões

benignas, potencialmente malignas e malignas. Foi observada maior contagem, dispersão e tamanho das AgNORs nos nucléolos, com o aumento da severidade de displasia, distinguindo as lesões leucoplásicas. Na tradução da atividade proliferativa celular, os valores medianos do índice morfométrico (análise computadorizada) das AgNORs foram novamente mais fiáveis do que o índice numérico. Os resultados demonstram correlações positivas, estatisticamente significativas, mas não absolutas, entre parâmetros AgNOR e resultados para o Ki-67. Os autores concluíram que a combinação entre a análise morfométrica das AgNORs e do Ki67 pode ser usada como auxiliar na previsão da progressão de displasia e na determinação do estado proliferativo no cancro oral.⁸³

Sumário e significado clínico: a detecção precoce de OPMDs relacionadas com o consumo de tabaco, fumado ou mascado, por marcadores que lhe estejam associados, pode definir populações de diferentes riscos de malignização. Apesar da evidência muito limitada os autores sugerem a citologia exfoliativa e a análise das AgNORs como um método simples, rápido e barato para detecção precoce destas desordens, uma vez que permite a recolha de amostras em quantidade e qualidade suficiente para análise correta, com risco de sobreposição ou coalescência celular mínimo. Todavia, tal como para estudos anteriores, a obtenção de um campo limpo é dificultada, talvez pela afinidade da prata por muco e resíduos da cavidade oral (e.g. alimentos). Os parâmetros quantitativos da expressão das AgNORs apenas traduzem os índices proliferativos, sendo as características qualitativas (e.g. pleomorfismo) as que diferenciam lesões hiperplásicas ou inflamatórias, OPMDs e doenças malignas. Quando associados à análise IHC da Ki67 existe maior previsibilidade na determinação do estado proliferativo e velocidade do ciclo celular de células epiteliais orais malignas. A aplicação universal dos mesmos parâmetros AgNOR e da análise computadorizada poderão ajudar a definir as características de maior significado clínico, reduzindo erros subjetivos e aumentando a eficácia, fiabilidade e reprodutibilidade em estudos futuros. Apesar da evidência bem fundamentada, são necessários estudos multicêntricos longitudinais que compreendam os mecanismos fisiopatológicos das AgNORs e associem estes dados a outros biomarcadores definidos para a oncogénese oral, correlacionado dados clinicopatológicos no diagnóstico e prognóstico a longo prazo.

5.8. Família p53

A família p53 é constituída por outros genes homólogos como a p63, p73, p21 e p27.⁷

A p53 (17p13) codifica uma proteína nuclear supressora tumoral (53kDa),¹⁷ que desempenha um papel crucial como fator de transcrição multifuncional na progressão do ciclo celular, diferenciação celular, reparação do DNA e apoptose, sendo considerada a “guardiã do genoma”.^{7, 14, 47, 52, 67} As agressões físico-químicas, após exposição a radiações, luz ultravioleta ou substâncias químicas carcinogénicas, causam alterações da proteína, através de processos desconhecidos.⁴⁷ A alteração das suas funções diminui a regulação dos *checkpoints* do ciclo celular e apoptose, diminuindo a capacidade das células responderem a *stress* e dano genético, hipóxia e ativação de oncogenes. Este défice pode levar à instabilidade genómica e acumulação de novas alterações genéticas.⁷

Vários eventos conduzem à expressão alterada da p53 incluindo mutações (perda de função) e inativação dos genes promotores, interações com proteínas virais⁴⁷ de subtipos oncogénicos do HPV16/18 e LOH. Com maior frequência, um dos alelos da p53 é perdido por deleções e o outro é mutado.⁶⁷ Assim, as células tumorais são, em sentido prático, homocigóticas para a perda do *locus* normal da p53. As mutações pontuais do gene p53 agrupam-se nos exões 5-9, sequências altamente conservadas entre espécies.¹⁴ A associação da p53 com outras proteínas que a protejam da degradação, como resultado de diferentes tipos de *stress* celular, tem sido demonstrada mediadora da sobreexpressão da p53.^{52, 109} Nas células normais, os níveis reduzidos da p53 devem-se em parte à curta semivida (20 minutos) desta proteína em estado selvagem,⁴³ sendo mesmo na maioria dos casos indetetável por IHC.^{17, 144} Determinadas mutações podem estabilizar aumentar a semivida desta proteína, resultando frequentemente na acumulação da p53 mutante em células neoplásicas, contribuindo para a sua deteção IHC.^{14, 47, 52}

As mutações da proteína p53 são as alterações genéticas mais prevalentes na doença oncológica humana^{14, 145} e são vulgarmente associadas a tumores mais agressivos e de pior prognóstico, incluindo carcinomas de células escamosas da cabeça e pescoço. Vários carcinomas apresentam mutações da p53: mama, cólon, estômago, bexiga e testicular, assim como sarcomas e melanomas. No cancro da mama, o padrão da expressão IHC da p53 é usado para a sua subclassificação.¹⁴

A mutação do gene p53 no HNSCC é normalmente apontada como um evento precoce e a incidência varia entre 40-60% de todos os HNSCC,^{67, 94, 145, 146} sendo claramente o supressor tumoral mais frequentemente sobreexpresso no OSCC (15-60%).^{47, 145} Nos HNSCCs, aproximadamente 60% das mutações deste gene ocorre entre os códons 238-248 do exão 7. Kropveld *et al.* sequenciaram a totalidade do RNA e DNA do gene p53, e descobriram alterações nos exões 1-11 em 25 pacientes (quase 100%) dos HNSCC estudados.¹⁴ O tabagismo é um risco conhecido associado ao desenvolvimento de HNSCC. Vários estudos demonstraram que o consumo de tabaco causa alterações da p53 no desenvolvimento precoce de HNSCC.¹⁴

A expressão da p53 mutante em HNSCC tem sido correlacionada com risco aumentado para tumores secundários, recidiva precoce, metastização, pior taxa de sobrevivência e resistência à quimio- e radioterapia, não só para os HNSCCs como para o cancro da mama, pulmão e cólon.^{14, 52} Poeta *et al.*¹⁴⁷ concluíram que a inativação da p53 no OSCC está associada a menor sobrevivência após tratamento cirúrgico. A detecção de mutações da p53 em margens cirúrgicas histologicamente “normais” e adenopatias cervicais está associada a maior risco de recidiva local. Vários estudos demonstraram a associação entre HPV16/18 e HNSCC, presumivelmente pela habilidade da sua oncoproteína E6 promover a degradação da p53 selvagem.¹⁴

A p53 tem sido considerada biomarcador de displasia. Todavia, também não existe consenso nesta matéria. Vários estudos IHCs têm demonstrado a correlação positiva entre a sobreexpressão da p53 pelo aumento da percentagem de células positivas,¹⁴⁸⁻¹⁵⁰ distribuição suprabasal^{89, 146} e intensidade de marcação aumentada^{148, 149} com a progressão de displasia epitelial oral. Uma meta-análise concluiu que 47% das OPMDs apresentavam expressão da p53, mas não concluíram qual o papel deste dado na oncogénese oral pela incapacidade de distinguir isoformas funcionais da p53. A detecção IHC parabasal da p53 tem demonstrado maior correlação com a progressão maligna, sugerindo a detecção da p53 como valor preditivo para a estratificação de risco para a leucoplasia oral.⁴³ Apesar da evidência mais ou menos consistente para a correlação entre a sobreexpressão da p53 e a progressão de displasia, assim como a demonstração do seu valor preditivo no desenvolvimento de OSCC; existem estudos com resultados contraditórios.⁷

Shah *et al.*¹⁵¹ demonstraram que a sobreexpressão da p53 constitui um fator de risco *major* para a transformação maligna. A imunoexpressão da p53 foi detetada em 90% das

leucoplasias orais. No entanto, não se sabe se esta elevada expressão representa a p53 mutante ou a forma estabilizada da proteína selvagem. Diferentes estudos têm demonstrado a detecção imunohistoquímica da p53 associada a outros marcadores, resultando em maior risco de progressão maligna.¹⁵²

A LOH da p53 tem sido demonstrada por RFLP em OPMDs com risco aumentado de desenvolver cancro. A SSCP é uma técnica de hibridização capaz de detetar diferenças entre o gene alterado e o *template* selvagem.⁴³ Seguida de sequenciamento, López *et al.*⁶⁷ demonstraram 11 mutações da p53 num grupo de 34 pacientes com leucoplasia oral.

A p63 e p73 apresentam homologia estrutural e funcional com a p53, cooperando na indução da apoptose e regulação do DNA.⁷

O gene p63 (3q27-29) é responsável pela transcrição de duas classes *major*, de 3 isoformas cada, que diferem por *splicing* alternativo num domínio de transativação N-terminal indutor da apoptose: Tap63 (TAp63 α , TAp63 β , TAp63 η) e Δ Np63 (Δ Np63 α , Δ Np63 β , Δ Np63 η). A variante Tap63 comporta-se tal como a p53, enquanto a Δ Np63 possui propriedades oncogénicas, por inibir funções de transativação da p53 e proteínas Tap63.^{88, 146}

A proteína p63 tem sido detetada em tecidos saudáveis incluindo a pele, mucosa esofágica e oral, pulmão, bexiga, rins, glândulas salivares, mama, exocérvix, próstata e amígdalas. Sabe-se que desempenha um papel essencial no desenvolvimento epitelial (marcador células estaminais dos queratinócitos) e proliferação de estruturas craniofaciais e membros.¹⁴⁶ A sobreexpressão da p63 tem sido encontrada em patologias da cabeça e pescoço, nomeadamente lesões pré-blastomatosas da laringe. A expressão da p63 pode ser utilizada para diagnóstico de carcinoma prostático e diferenciação entre lesões benignas e malignas da próstata.⁷⁹

Na mucosa oral normal e hiperplasia epitelial reativa, a expressão da Δ Np63 só é observada na camada basal e/ou parabasal, com expressão gradualmente diminuída nas camadas intermediárias do epitélio. No entanto, em lesões displásicas, a expressão pode estender-se à camada espinhosa e em alguns casos até quase a toda a espessura do epitélio displásico.⁸⁸ A expressão da Δ Np63 parece correlacionar-se em extensão e intensidade com a progressão histológica de displasia. Nos carcinomas, a p63 está quase sempre expressa (94,7%).¹⁵³ Contudo, as consequências desta expressão alterada na avaliação do risco de malignização são ainda desconhecidas⁸⁸ e alguns estudos não consideram o gene p63 como

verdadeiro supressor tumoral, porque a sua mutação raramente é observada em tumores primários.⁷⁹

Têm sido mencionados vários mecanismos para explicar o papel da Δ Np63 como promotora da oncogênese. No HNSCC, a Δ Np63 aumenta a expressão das queratinas 6 e 14 e subregula as queratinas 4 e 19. Tem sido também demonstrado que a Δ Np63 promove a sobrevivência no HNSCC e é um regulador positivo da via de sinalização β -catenina. Finalmente, o silenciamento da sobreexpressão da Δ Np63 está associado à inibição da proliferação, ao mesmo tempo que ocorre a sobrerregulação dos inibidores das cinases dependentes de ciclinas p27^{kip1} e p57^{kip2}.⁸⁸

Existe pouca evidência para a expressão da p63 no OSCC. A amplificação genética da p63 tem sido associada ao prognóstico de OSCC.⁷ No entanto, dados contrários publicados por Oliveira *et al.*¹⁵⁴ demonstraram que a p63, embora se encontre sobreexpressa na maioria dos casos de OSCC (64,4%), apresenta resultados conflituosos na sua associação com taxas de sobrevivência. Nos casos de mucosa oral normal e hiperplásica a expressão da proteína p63 limitou-se à camada basal e parabasal, enquanto a sua expressão se estendia a camadas mais superficiais com o aumento da severidade de displasia.^{89, 155, 156} Pelo contrário, Bortoluzzi *et al.*¹⁴⁶ não encontraram diferenças estatisticamente significativas na expressão da p63, nem sequer uma tendência desta acompanhar os 3 graus de displasia.

O p73 (1p36) apresenta frequentemente deleções e parece conter múltiplos genes supressores tumorais. Num dos estudos, a expressão proteica da p73 foi detetada em células basais de epitélio normal e com expressão suprabasal significativa em displasia. Contudo, não se observaram diferenças na expressão da p73 com o aumento da severidade histológica.¹⁵⁷

O gene supressor tumoral p21 (6p21) foi associado à inativação da ciclina E/cdk-2 e dos componentes dos complexos ciclina D1, D2, D3-cdk-4, reguladores da fosforilação da pRb.¹⁴ Nos casos de dano genético, a p21, inibidora CDK, regula a paragem do ciclo celular por inativação destas ciclinas. A expressão alterada da p21 tem sido correlacionada com a biologia tumoral e *outcomes* clínicos agressivos do OSCC. Choi *et al.*¹⁵⁸ reportaram que a expressão da p21 aumentava de acordo com a progressão histológica, sem que existisse correlação significativa entre a expressão e a progressão para OSCC. Todavia, Kodani *et al.*¹⁴⁹ reportou uma tendência contrária da expressão da p21, estando a progressão maligna das lesões displásicas correlacionada com níveis significativamente reduzidos da sua expressão.

Não existe evidência suficiente que correlacione a expressão da p21 com a progressão para OSCC.⁷

O gene p27 partilha sequência homóloga com o p21 e atua como regulador negativo e independente da p53 no ciclo celular, estando envolvido na paragem em G1. O p27^{Kip1} é um membro da família CIP/KIP dos inibidores cdk, pelo que a respetiva proteína associa-se a diferentes complexos cdk, resultando na perda da sua atividade e incapacidade para fosforilar o gene retinoblastoma.^{7, 14} Ainda que raramente se encontre mutado, a subexpressão da proteína p27 tem sido associada mau prognóstico de vários tumores humanos, incluindo o OSCC. No entanto, vários trabalhos têm reportado a expressão aumentada da p27 em displasias orais e OSCC, comparativamente com epitélio normal. Os resultados têm identificado um padrão de marcação positivo na suprabasal em casos normais e de displasia ligeira, que se torna menos evidente com o aumento da severidade histológica,⁷ sugerindo que as alterações da expressão da p27 são um evento precoce da carcinogénese oral.¹⁴ No entanto, não existem dados suficientes que permitam considerar a expressão da p27 como biomarcador preditivo para a transformação maligna.⁷

Concluindo, existem dados contrários quanto ao valor da p53 como biomarcador preditivo para a progressão até OSCC. Não existem dados suficientes que determinem a expressão da p63, p73, p21 ou p27 como biomarcadores do processo de transformação maligna.⁷

5.8.1. p53

As lesões leucoplásicas apresentam normalmente alterações genéticas comuns ao OSCCs, correspondendo à explicação genética do conceito de cancerização de campo⁴⁶ apresentada por Braakhuis *et al.*¹⁵⁹, na qual os autores definiram a p53 como um dos genes sujeitos a alterações mais precoces na cancerização de campo.⁴⁷ Segundo estudos retrospectivos, o p53 encontra-se mutado em 15-19% dos casos de OPMD.⁶⁷ A LOH do p53 foi demonstrada em 22% das OPMDs, em simultâneo com a reestruturação da região 5' terminal do mesmo gene.⁴⁷

López *et al.*⁶⁷ tentaram identificar as alterações da p53 em leucoplasias orais homogéneas com (n=15) e sem (n=19) um ou mais OSCCs prévios. As amostras foram recolhidas a partir de 34 pacientes com leucoplasia oral, através de bochecho oral, citologia exfoliativa e raízes de cabelo (controlo negativo). A análise mutacional do gene p53 foi

realizada por SSCP e confirmada por sequenciamento do DNA. Foram detetadas 11 mutações do gene p53 na amostra citológica oral, identificadas em 23,5% do total de pacientes com leucoplasia homogénea oral, confirmando a fase precoce destas anormalidades na oncogénese oral. As alterações foram observadas nas amostras por citologia exfoliativa apenas em pacientes sem carcinoma prévio, e nos dois tipos de amostras orais (bochecho e exfoliativa) em pacientes com carcinoma prévio. A incidência de alterações foi maior quando precedidas de OSCC. Segundo os autores, estes dados indicam maior expansão clonal de células potencialmente malignas em pacientes com antecedentes oncológicos. Do total de pacientes, 2 tiveram recidiva da doença. Os resultados do presente estudo corroboram outras investigações, confirmando que as leucoplasias orais precedidas de OSCCs parecem apresentar maior risco de desenvolverem tumores primários secundários ou recidiva.⁶⁷

Através de um estudo retrospectivo Reddy, Kamath e Radhakrishnan⁵² avaliaram a importância da p53 na determinação do prognóstico de OPMDs, tendo por base diferentes severidades displásicas (ligeira n=10, moderada n=10 e severa n=10) de 30 casos de leucoplasia. Cada bloco de tecido foi analisado por IHC (anticorpo monoclonal) para a intensidade de marcação, localização intracelular e distribuição basal e/ou parabasal. Foram utilizados controlos negativos de 10 secções de tecido oral normal, obtido da mucosa jugal. Dos 30 casos de displasia epitelial, 21 foram imunopositivos para a p53. A intensidade da expressão da p53 foi forte em 12 casos e fraca em 9 casos ($p < 0,05$). As células positivas para a p53 na displasia ligeira encontravam-se na camada basal, enquanto na displasia severa foi demonstrada marcação basal e parabasal ($p < 0,05$). A expressão da p53 em células suprabasais na displasia moderada e severa indica que as células superficiais do epitélio se encontravam mitoticamente ativas resultando num estado anormalmente proliferativo. A marcação nuclear e citoplasmática entre e dentro dos próprios grupos foi respetivamente de F=9,207 e F=6,465, com maior significância entre displasia ligeira e severa. A correlação entre o estadiamento e a localização intracelular da p53 sugere que leucoplasias displásicas moderadas e severas têm maior potencial de malignização do que displasias ligeiras ou ausência de displasia. Sendo uma oncoproteína nuclear, a sua localização citoplasmática pode ser atribuída à regulação da p53 que é feita quer pelo *import* nuclear, diminuição do *export* nuclear ou retenção. A ligação da p53 ao MDM2 é essencial para a degradação da proteína p53 no citoplasma, por ubiquitinação. Contudo, a sequestração anormal da p53 selvagem citoplasmática pela MDM2, que é conhecida em muitas malignidades humanas, pode dever-se à sua perda de função como fator de transcrição para a paragem do ciclo celular, resultando em falsos positivos de

sobreexpressão da forma mutante. As mutações no gene p53 também resultam na acumulação intranuclear da proteína, e estudos sugerem que a tumorigênese pode resultar de um defeito na regulação do *import* nuclear do tipo selvagem da p53.⁵²

Tendo em conta o potencial valor preditivo da p53 e Ki67, Santos-García *et al.*⁴⁷ investigaram se as alterações na expressão destas proteínas figuravam de forma sequencial ao longo das diferentes etapas da cancerização de campo oral. Incluíram na análise imunohistoquímica 53 pacientes com leucoplasia oral, 11 amostras de epitélio normal, 15 de displasia ligeira a moderada, 15 CIS e 12 carcinomas microinvasivos. Observou-se um aumento da proliferação celular e da sobreexpressão da p53 com o aumento da severidade histológica. Todas as lesões foram positivas para a Ki67, da camada basal do epitélio normal ao estrato médio de displasias ligeiras a moderadas, no estrato superior de alguns casos de CIS e igual distribuição para o carcinoma microinvasor, com distribuição neste caso por camadas subepiteliais atípicas. Pelos padrões apresentados, a proliferação celular é negativa no epitélio normal, positiva em 6/15 displasias ligeiras a moderadas, aumentando para 10/15 CIS e em 10/12 carcinomas microinvasores. Houve diferenças estatisticamente significativas entre as diferentes lesões. Para a p53 o epitélio normal não apresentou marcação, havendo casos positivos com pouca extensão para lesões displásicas e moderadas. Nas lesões carcinomatosas as diferenças são significativas quando comparadas com epitélio normal, com maior marcação ao longo de toda a espessura epitelial. As células malignas irregulares com pleomorfismo marcado foram positivas para a p53. Houve assim positividade em 5/15 lesões displásicas, sobreexpressão em 7/15 e 10/12 CIS e carcinomas microinvasores, respetivamente. As alterações mais precoces corresponderam a um aumento significativo da proliferação celular e à sobreexpressão da p53 nas displasias ligeiras a moderadas. Segundo estes mesmos autores, o estudo imunohistoquímico e molecular da leucoplasia oral permitirá conhecer o perfil de alterações genéticas necessário ao diagnóstico precoce e tratamento desta patologia, com especial relevo para o estudo do Ki67 nos estadios precoces e da p53 em lesões mais avançadas.⁴⁷

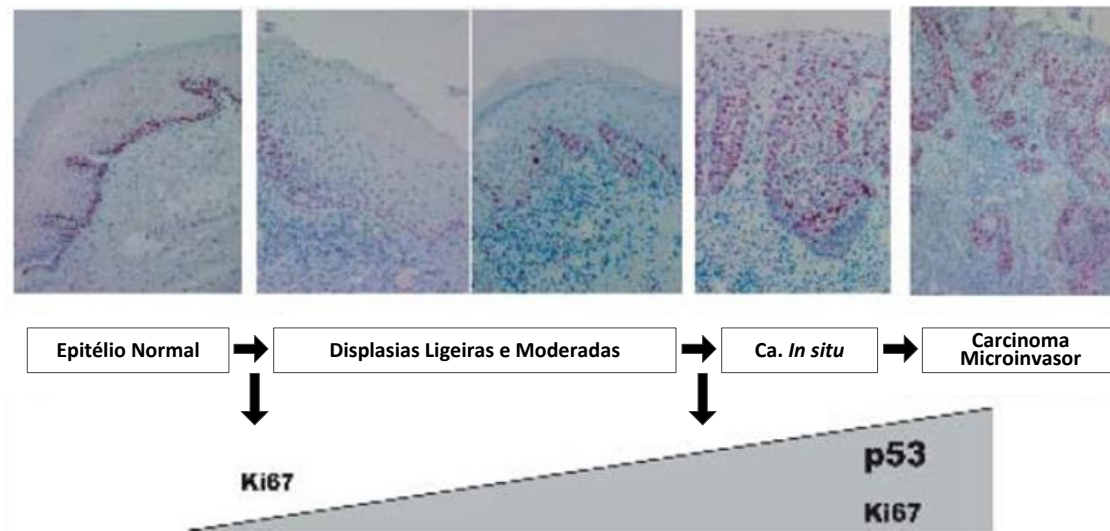


Figura 5. Alterações da expressão proteica de Ki67 e p53 em lesões leucoplásicas.

Fonte: Santos-García A, Abad-Hernández M, Fonseca-Sánchez E, Cruz-Hernández J, Bullón-Sopelana A. Proteic expression of p53 and cellular proliferation in oral leukoplakias. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2005;10(1):5-8;1-5.⁴⁷

Da mesma forma, fruto das interações múltiplas da p53, a expressão desta molécula pode ser posteriormente modulada durante a progressão da lesão. No mesmo estudo, a fraca intensidade observada em dois casos de displasia moderada e num caso de displasia severa pode ser explicada pelo papel de outros oncogenes como o H ras, C-fos, família jun, c-myc, e fatores tróficos que participam na regulação do crescimento e que, quando expressos inapropriadamente geram sinais de crescimento que se sobrepõem ao controlo celular pela p53.⁵²

Sabendo que a presença de p53 detetável não reflete necessariamente o efeito das mutações, não podem ser feitas conclusões definitivas acerca das mutações que resultam em proliferação celular, baseadas nos resultados isolados de imunohistoquímica.⁵²

O estudo de vários biomarcadores em simultâneo com a p53 não se resume à Ki67. O desenvolvimento precoce de lesões malignas caracteriza-se não só pela perda de mecanismos reguladores da progressão do ciclo celular (p53) mas também pelo desequilíbrio entre células viáveis:células em apoptose (survivina). A survivina não é detetável nos tecidos adultos altamente diferenciados mas é notavelmente expressa em muitas neoplasias malignas humanas comuns, como o cancro gástrico, coloretal, pulmonar, mamário, pancreático, prostático e linfoma não Hodgkin de elevado grau. Nas células malignas, a expressão da

survivina é sobrerregulada durante a fase G2/M do ciclo celular e tem o seu pico durante a mitose. A sobreexpressão da survivina no cancro pode sobrepor-se aos *checkpoints* do ciclo celular, facilitando assim a progressão aberrante das células transformadas através da mitose.⁹⁰ Apesar da redundância das vias de morte celular, a survivina parece ser também um fator chave na proliferação das células malignas e a interferência com funções da survivina tem sido associada a defeitos catastróficos da transição mitótica e indução da morte celular por via mitocondrial. Por fim, a sobreexpressão da survivina pode constituir um indicador fiável de mau prognóstico da doença (e.g. neuroblastoma, cancro coloretal, mama, pulmão e esófago) e a análise retrospectiva de vários tumores sólidos correlacionam a expressão da survivina à diminuição da sobrevivência, resistência à terapêutica e maior recidiva.⁷¹ No cancro gástrico e esofágico, a expressão da survivina tem sido estudada com a proteína p53, por partilharem etapas precoces da oncogénese. É possível que a p53 mutante regule negativamente a expressão da survivina. Dada a elevada frequência de mutações da p53 em todos os cancros humanos, esta regulação pode explicar a expressão alterada da survivina em diversos tumores e a sua ausência em tecidos normais vizinhos.⁹⁰

A mesma relação para o cancro oral nunca foi estudada. No entanto, a sobreexpressão da survivina tem sido reportada em 55-72% dos casos de carcinomas orais e em 44% dos pacientes com OPMDs.⁹⁰ A sua sobreexpressão não se resume a PMDs da cavidade oral, tendo sido identificada em pólipos do cólon, adenomas pancreáticos, doença de Bowen e queratose actínica hipertrófica.^{71, 90} Tem sido demonstrada uma correlação importante entre a sobreexpressão da survivina e a agressividade tumoral do OSCC, constituindo um importante valor preditivo na progressão do HNSCC.⁹⁰

Khan *et al.*⁹⁰ analisaram a expressão da survivina em relação à p53 e a sua associação com o *outcome* clínico no cancro oral, através de análise RT-PCR. Foram incluídos na amostra 29 casos de OSCC, 16 OPMDs (9 leucoplasias, 2 fibroses submucosas, 2 eritroplasias e 3 outras lesões) e controlos saudáveis (n=7). A positividade para a survivina foi observada em 7 espécimes biopsados de mucosa normal; 21 (72%) dos 29 OSCCs e 7 das 16 OPMDs, confirmando a possível participação precoce na oncogénese oral. Não se sabe a razão das células normais serem positivas para a survivina. Foi observada diferença significativa da sua expressão no que diz respeito ao estadiamento histológico. Os níveis de expressão da survivina em OSCCs primários e OPMDs foram significativamente maiores do que nos tecidos normais ($p < 0,008$ e $p > 0,04$, respetivamente). Porém, não houve diferença significativa entre OSCC e OPMDs ($p = 0,057$). Quanto à expressão da p53, todos os 7 casos

de mucosa normal foram negativos para a p53; 17/29 OSCC (59%), 2/9 leucoplasias (22%), 2/4 fibroses submucosas (50%), 1 eritroplasia (50%) e 1 das 3 outras lesões (34%) foram p53 positivas, pelo que a percentagem média foi de 6 em 16 OPMDs (38%). Uma alteração mais significativa foi observada na imunexpressão de carcinomas com envolvimento das cadeias linfáticas (73%) face aos casos sem envolvimento (47%). Não houve correlação com parâmetros clinicopatológicos. Quanto à relação survivina:p53, 28% dos OSCCs e 18% das OPMDs demonstraram expressão combinada de survivina e p53. Considerando as OPMDs, a leucoplasia apresentou mais casos positivos para a survivina (44%) em comparação com a p53 (22%). Num total de 9 pacientes com leucoplasia, 2 foram positivos para a survivina e p53. A análise estatística revelou que a coexpressão de survivina e p53 não esteve significativamente associada aos parâmetros clinicopatológicos, como o tamanho tumoral ($p=1$), estadio ($p=0.6513$), metástases das cadeias linfáticas ($p=0.3898$) e diferenciação tumoral ($p=0.386$). A sobreexpressão da survivina pode no entanto estar relacionada com a agressividade tumoral dos OSCCs incluídos na amostra.⁹⁰

A p57^{kip2} (11p15.5) é uma das proteínas inibidoras do ciclo celular que regula a progressão em G1. Pelo facto de ser inibidora das cdks e pelas demais funções bioquímicas, tem sido igualmente considerada supressora tumoral. Além disso a perda da p57^{kip2} resulta num desequilíbrio entre células proliferativas e quiescentes, pelo que a subexpressão desta proteína reguladora da progressão tumoral poderá levar ao crescimento tumoral descontrolado. Vários autores têm demonstrado que a subexpressão da proteína p57^{kip2} pode desempenhar um papel importante na oncogénese e progressão de tumores humanos ovarianos, gástricos, coloretais e linfóides. No entanto, a expressão e significância desta proteína é desconhecida na leucoplasia e OSCC.⁸²

As *heat-shock proteins* (hsps) são sintetizadas sob *stress* celular e têm sido associadas à regulação da apoptose e progressão tumoral. A sobreexpressão da hsp60 é considerada um evento precoce na oncogénese de diferentes tecidos. Também para a hsp60 os dados carecem de evidência.⁸²

Através de um estudo retrospectivo, Fan *et al.*⁸² investigaram a expressão e significado das proteínas p53, p57^{kip2} e hsp60 na malignização de lesões displásicas da mucosa oral. A expressão IHC destas proteínas foi analisada em tecidos normais (n=10); leucoplasias displásicas (n=79, ligeira 40, moderada 20 e severa 19) e OSCCs (n=67, 23 a partir de leucoplasia e 44 OSCCs primários). A expressão da p53 foi detetada na leucoplasia,

maioritariamente na camada basal, sendo mais dispersa e marcada no OSCC. Houve diminuição significativa desta marcação na leucoplasia, quando comparada com mucosa normal, e com maior diminuição no OSCC do que na leucoplasia displásica severa. Sem diferenças entre OSCC primário ou subsequente a leucoplasia. A sobreexpressão da p53 correlacionou-se com a redução da expressão da p57^{kip2} (p=0,0023) tanto na leucoplasia como no OSCC (p=0,0018). Não foi observada relação entre expressão da p53 e parâmetros clinicopatológicos, ainda que pacientes com tumores p53 positivos demonstrem tendência a pior prognóstico do que os p57^{kip2} negativos. A imunomarcagem citoplasmática da hsp60 foi maior na leucoplasia do que no epitélio normal, estando aumentada na presença de displasia moderada, em comparação com displasias ligeiras. Não se observaram diferenças significativas entre leucoplasias com displasia moderada ou severa, ou entre displasia severa e OSCC. Não se identificaram diferenças significativas da sua expressão entre OSCC primário e secundário a leucoplasia. Não houve correlação entre a hsp60, p53 ou p57^{kip2}, ou entre a hsp60 e características clínicas. Observou-se subexpressão da p57^{kip2} na leucoplasia com displasia moderada ou severa, e nova diminuição no OSCC primário ou subsequente a leucoplasia. A redução da sua expressão nesta sequência displasia-carcinoma sugere um papel na oncogênese da leucoplasia oral. Por sua vez, não foi observada diferença significativa entre mucosa normal e leucoplasia com displasia ligeira, OSCC primário ou a partir de leucoplasia e entre leucoplasias com displasia moderada ou severa. A expressão negativa da p57^{kip2} foi negativamente associada a OSCCs de maior tamanho, metastização das cadeias linfáticas e estadio clínico avançado. Neste estudo, entre os 3 possíveis marcadores, a p57^{kip2} teve o maior potencial preditivo para o OSCC. O risco relativo de morte para pacientes p57^{kip2} negativos foi 7,52 vezes maior do que para pacientes p57^{kip2} positivos (p=0,031). O rácio de sobrevivência a 5 anos do grupo positivo para a p57^{kip2} (n=32) foi significativamente maior do que para o grupo p57^{kip2} negativo (n=35) (87,5% vs. 65,7%, p=0,038). Houve fraca associação entre rácio de sobrevivência global e metastização das cadeias linfáticas no OSCC (HR=5,162, p=0,052). O tamanho tumoral, a p53 e a expressão de hsp60 não foram indicadores independentes nesta série de pacientes. De acordo com resultados de diferentes estudos, os autores sugerem a p57^{kip2} como um biomarcador com potencial valor preditivo para o OSCC.⁸²

A *maspin* (*mammary serine protease inhibitor*; 18q21.3) pertence à superfamília de serpinas inibidoras de proteases serina. A expressão desta serpina ocorre em determinadas células epiteliais, incluindo as da cavidade oral, pele e epitélio glandular/secretor (e.g. mama,

próstata e glândulas salivares). Tem sido igualmente identificada em diversos tipos de neoplasmas epiteliais malignos, como carcinomas da mama, próstata, pâncreas, endométrio, vesícula biliar e cavidade oral. A *maspin* tem demonstrado atividade supressora tumoral por inibição da motilidade celular, invasão e metastização. As variações no seu padrão de expressão são condicionadas por vários fatores, incluindo o tipo de tecido epitelial envolvido e as possíveis interações da proteína com o microambiente em que se encontra. A perda da expressão da *maspin* foi observada e associada a pior prognóstico no cancro da mama e próstata. A expressão da *maspin* no cancro da mama, próstata e pulmão assim como no adenocarcinoma coloretal é controlada por proteínas do ciclo celular, principalmente p53 e p63, através da ativação do promotor da *maspin*, com conseqüente aumento do mRNA e respetiva proteína. Existem poucos estudos que investigaram a expressão da *maspin* no OSCC, sem que nenhum averiguasse o padrão de expressão da proteína em OPMDs, nem as suas correlações com proteínas reguladoras do ciclo celular.⁸⁹

Face às limitações da evidência, Vered, Allon e Dayan⁸⁹ investigaram a expressão IHC da *maspin* em lesões epiteliais benignas e malignas da língua (leucoplasias, eritroleucoplasia e eritroplasias: hiperplasia 16, displasia ligeira 12, moderada a severa 11; 22 OSCCs e controlos positivos diferentes para cada marcador) e correlacionaram a expressão desta serpina com a p53, p63 e Ki67. A expressão IHC da *maspin* foi avaliada separadamente para cada um dos terços epiteliais (basal, médio e superior), permitindo identificar alterações de acordo com a severidade displásica. Todas as lesões epiteliais apresentaram imunomarcção positiva para a *maspin*, sendo que nas lesões benignas a marcação (citoplasmática e nuclear) mais intensa foi observada no terço basal e gradualmente diminuída até ao terço superior (sem marcação nuclear). Nas lesões displásicas e SCCs, independentemente da severidade, a marcação foi essencialmente citoplasmática. No SCC a expressão IHC desta proteína foi heterogénea entre terços e nos próprios estratos. As áreas mais diferenciadas do SCC, i.e., o centro das ilhas neoplásicas, apresentaram marcação mais intensa do que células em zonas menos diferenciadas, como a frente invasiva. O valor médio da imunomarcção da *maspin* no terço basal dos casos de displasia moderada a severa foi significativamente maior do que no terço basal de displasias ligeiras ($p=0,014$). O valor médio desta proteína no terço médio foi significativamente maior nos casos de displasia moderada a severa quando comparados aos casos de hiperplasia ($p=0,036$). O SCC foi o único grupo de lesões onde a expressão da *maspin* se tornou significativa no terço superior. Por fim, os valores médios de imunomarcção da *maspin* no terço médio e basal de lesões malignas

foram significativamente superiores aos valores médios dos respetivos terços nos grupos de lesões hiperplásicas e displasias ligeiras ($p < 0,05$). A expressão da proteína nas camadas epiteliais superiores é diferencial e progressiva à medida que se agravam as alterações displásicas e se observam lesões carcinomatosas. Para a p53, p63 e Ki67 houve uma tendência generalizada de aumento gradual da extensão de marcação (particularmente nuclear) à medida que as lesões evoluíam de hiperplasia para SCC. Observaram-se maiores diferenças entre os valores médios de SCC e lesões displásicas ligeiras ou hiperplasias. À medida que as alterações displásicas se acentuam e ocorrem em camadas epiteliais superiores, estas associam-se a um aumento simultâneo da expressão da p63 (maioria $\Delta Np63$), com valores máximos nos casos de SCCs. As alterações dos valores médios da *maspin* para os 3 terços nos diferentes grupos estiveram positivamente correlacionados com valores médios da p63 ($p = 0,001$), p53 ($p = 0,004$) e Ki67 ($p < 0,001$). De acordo com os resultados, os autores sugerem que a expressão da *maspin* no terço médio epitelial significa displasia moderada a severa, e quando presente no terço superior constitui sinal de malignidade. Estes dados podem ser úteis no diagnóstico de casos equívocos de pouco tecido oral biopsado ou quando existem variações interindividuais consideráveis. De acordo com o padrão apresentado, aparentemente específico para lesões localizadas na língua, os autores sugerem que à medida que a severidade displásica aumenta, a expressão da *maspin* nas camadas epiteliais superiores pode refletir uma tentativa de amenizar ou parar a progressão da doença.

A sobreexpressão do oncogene c-erbB-2 (cromossoma 17) tem sido observada em 75% dos pacientes com HNSCCs e correlacionada com piores taxas de sobrevivência.^{14, 110} O proto-oncogene c-erbB2 (ou Her-2) é um membro da família ErbB de recetores transmembranares tirosino-cinases (*EGFR like oncogene*). Este pode ser ativado por hetero-oligomerização com outros membros da família Erb (e.g. EGFR). Tem sido considerado determinante na génese de diferentes cancros humanos¹⁷ e a sua amplificação correlaciona-se com a deteção IHC da oncoproteína p185 em carcinomas primários da mama, ovário, estômago, pâncreas, bexiga, rim, cavidade oral e pulmões, estando frequentemente associada a pior prognóstico.¹¹⁰

Kumar, Kane e Rathod¹¹⁰ compararam a expressão da p53, Ki67 e c-erbB2 e avaliaram a relevância da sua coexpressão no diagnóstico e prognóstico de leucoplasia oral. A expressão destes marcadores foi estudada por IHC em 55 casos de leucoplasia (26 sem e 29 com displasia) e em 10 casos de epitélio normal. Os tipos clínicos e localização das lesões não se correlacionaram com o grau de displasia. A expressão nuclear dos biomarcadores p53 e

Ki67 limitou-se às camadas basais e parabasais nos casos de leucoplasia sem displasia, mas distribuiu-se às camadas suprabasais nos casos displásicos, padrão semelhante ao já apresentado por Cruz *et al.*¹⁶⁰ Vered *et al.*⁸⁹ e Nasser *et al.*¹⁰³, relacionado entretanto com o elevado risco de cancro oral.¹¹⁰ Foi observado aumento estatisticamente significativo para os LIs da p53 (p=0,003) e Ki-67 (p=0,002) com o aumento da severidade de displasia. Além disso, baseado no coeficiente de correlação de *Spearman*, a média do LI do p53 correlacionou-se significativamente com a média do LI da Ki-67 (p=0,011). Contudo, quando os LIs foram correlacionados com tipos clínicos e localizações, não foi encontrada qualquer correlação estatisticamente significativa.¹¹⁰

Neste estudo, não foi identificada marcação membranar distinta do c-erbB2. Enquanto a expressão membranar do c-erbB2 tem sido correlacionada com a amplificação genética, a importância da expressão citoplasmática do mesmo gene, que é frequentemente observada nos casos deste estudo, não é exatamente conhecida, embora se proponha que representa a incompleta degradação do recetor. Na literatura, os resultados da imunomarcação do c-erbB2 têm sido extremamente irregulares e variáveis, pelo que a marcação citoplasmática e membranar é por vezes considerada positiva e indicadora precoce de ativação oncogénica em OPMDs.¹¹⁰

O complexo Mcm tem sido indicado como possível biomarcador para a leucoplasia verrucosa proliferativa, pelo papel que possivelmente desempenha na regulação da replicação do DNA e na proliferação celular. Atendendo a estes dados, Gouvêa *et al.*⁶⁴ estudaram as características clinicopatológicas e a distribuição de biomarcadores de *turnover* celular em 12 pacientes com 18 amostras representativas de leucoplasia verrucosa proliferativa, através de análise IHC para a p53, Ki67, Mcm-2 e Mcm-5. A p53 e o Ki67 não apresentaram aumento significativo da expressão de acordo com a progressão histológica. A Mcm-2 e Mcm-5 apresentaram maior expressão do que o Ki67, o que confirma resultados de estudos anteriores com amostras de leucoplasia verrucosa proliferativa. Este facto pode ser explicado pelas diferentes fases em que as proteínas atuam no ciclo celular, sendo que a Mcm-2, ao contrário da Ki67, encontra-se expressa em células normais ou neoplásicas em G1. Ao contrário do expectável, não foi observado um aumento da expressão dos marcadores proliferativos durante as progressivas alterações epiteliais características da oncogénese oral. Interessantemente, alguns casos de displasia ligeira apresentaram células imunopositivas em 2/3 da espessura epitelial, além da camada basal e parabasal. A imunoexpressão nos casos de OSCC demonstrou o padrão descrito na literatura: casos mais diferenciados demonstraram

marcação nas ilhas tumorais periféricas, enquanto os casos menos diferenciados apresentaram distribuição difusa de células positivas. Quatro (33,3%) dos 12 pacientes desenvolveram OSCC e um progrediu para carcinoma verrucoso. Neste estudo, um número interessante de casos de displasia ligeira e moderada (4 casos), especialmente aqueles que progrediram para OSCC, demonstraram forte imunopositividade para Mcm-2 e Mcm-5. Surpreendentemente, alguns casos de displasia ligeira demonstraram LIs semelhantes a alguns SCCs. Assim, se estes casos demonstrassem comportamento agressivo num *follow-up* contínuo a longo prazo, estes marcadores do complexo Mcm poderiam ser úteis como ferramentas de diagnóstico e prognóstico da progressão celular maligna.⁶⁴

As *syndecans* são uma família de 4 proteoglicanos sulfato de heparano transmembranares, que interagem com componentes da matriz extracelular, outros componentes da superfície celular e fatores de crescimento, incluindo o fator de crescimento fibroblástico. A *syndecan-1* é reconhecida como um recetor de matriz transdutor de sinais. A subexpressão marcada da *syndecan-1* está associada a alterações displásicas do epitélio oral e a sua subregulação tem sido reportada em HNSCCs e carcinoma do cérvix uterino, quando comparados com epitélio normal correspondente. A evidência sugere que diferentes fatores preditivos contribuem para a malignização, incluindo o tipo clínico, moléculas de adesão celular (integrinas, caderinas e *syndecan-1*), e sobreexpressão da p53 e Ki67.⁷⁴

O estudo imunohistoquímico desenhado por Kurokawa H *et al.*⁷⁴ investigou a associação entre a perda de expressão da *syndecan-1* e a expressão da p53 e Ki-67, por forma a identificar marcadores fiáveis na determinação das alterações malignas de leucoplasias orais com displasia epitelial. A amostra examinada por IHC incluiu 43 casos de leucoplasia oral (13 sem e 30 com displasia) e 22 casos de epitélio normal como controlos negativos. A expressão marcada da *syndecan-1* foi observada na superfície de queratinócitos de epitélio normal. A imunorreatividade foi perdida gradualmente com o aumento da severidade displásica, particularmente nas camadas mais inferiores de displasia moderada a severa. Todos os casos de epitélio normal, leucoplasia sem displasia ou displasia ligeira e 28% (7/25) dos casos com displasia moderada a severa, apresentaram marcação intermédia a forte da *syndecan-1* ($p < 0,001$). Não foi observada associação entre a expressão de qualquer um dos marcadores e a localização ou tipo de lesão. No epitélio normal a p53 e Ki67 foram identificadas maioritariamente na camada basal celular, apresentando um padrão de distribuição mais alargado na leucoplasia. Foram observadas alterações significativas nos LIs da p53 e Ki67 na leucoplasia, à medida que a displasia progredia ao longo dos 3 graus de severidade ($p < 0,001$),

com diferenças significativas dos LIs da p53 e Ki67 entre epitélio normal e leucoplasia ($p < 0,001$). Os LIs da p53 e Ki67 tendem a aumentar com a diminuição de intensidade da marcação de *syndecan-1* ($p < 0,001$). Estes resultados demonstram que a sobreexpressão da p53 e Ki67, bem como a subexpressão da *syndecan-1* nos estratos epiteliais inferiores estão associadas a alterações displásicas.⁷⁴

Sumário e significado clínico: pela heterogeneidade das técnicas laboratoriais (métodos de marcação, anticorpos clonais, sensibilidade, quantificação e interpretação dos resultados) assim como limitações clínicas de vários estudos, o valor da p53 como biomarcador precoce/tardio de OSCC é ainda controverso. O aumento da expressão da p53 e da localização celular com o aumento da severidade displásica indica uma associação direta entre o grau de displasia epitelial e a acumulação da p53, contribuindo para a oncogénese oral. A p53 parece ser um dos alvos moleculares preferenciais dos carcinogénicos do tabaco. A p53 como marcador de prognóstico pode afirmar-se como um complemento útil à avaliação histológica do prognóstico das OPMDs, no entanto a concordância entre a mutação do gene p53 e a acumulação expressa por métodos IHC nem sempre é perfeita, além de que as várias alterações podem ter diferente valor preditivo positivo. Atualmente a imunorreactividade notada para a p53 é apenas um indicador aproximado das lesões com função alterada da p53, apesar dos métodos imunométricos mais avançados serem eficazes em diferenciar a p53 selvagem da forma mutante, em células de tumores lisados e tumores homogéneos, podendo assim descartar parte do problema de falsos positivos.

A coexpressão aumentada da p53 e Ki67 poderá ser utilizada como marcador identificativo de lesões de elevado risco. A evidência disponível da coexpressão da survivina e p53 sugere que a p53 não contribui como fator *major* na desregulação da survivina no cancro oral. Os estudos indicam que as alterações da survivina e p53 podem ser importantes na oncogénese oral por inibição da apoptose. A perda de expressão da $p57^{kip2}$ parece igualmente associar-se à oncogénese oral. A avaliação da sua expressão poderá assumir-se como um potencial candidato a biomarcador preditivo do OSCC. Estudos futuros devem analisar a provável correlação reversa da $p57^{kip2}$ com a p53. Por sua vez, a expressão marcada da *maspin* no terço médio do epitélio poderá ser considerada um sinal de displasia moderada a severa e uma indicação de carcinoma quando presente no terço superior. As correlações entre a *maspin* e fatores reguladores (e.g. p53, p63 e microambiente tumoral) podem ser eventos chave no desenvolvimento de carcinoma lingual e na compreensão de mecanismos de defesa anticancerígenos. O valor preditivo da *maspin* no OSCC merece investigação futura.

Aparentemente, o c-erbB2 não desempenha um papel precoce na oncogénese oral, embora a degradação incompleta do recetor, tal como evidenciada pela marcação citoplasmática, poderá indicar estadios precoces. A sobreexpressão do complexo Mcm (Mcm-2 e Mcm-5) na displasia ligeira e moderada poderá ajudar na identificação de lesões com elevado risco de malignização, como é o caso das leucoplasias verrucosas proliferativas. Os resultados sugerem que a *syndecan-1* está envolvida na regulação da morfologia celular, proliferação e diferenciação, e que a perda de *syndecan-1* em células de tecido potencialmente maligno poderá estar associada a proliferação descontrolada, menor adesão à matriz extracelular e diferenciação distorcida das células tumorais. Apesar dos resultados preditivos promissores através da combinação destes biomarcadores com a p53 e Ki67, é premente a construção de estudos prospetivos que confirmem as suas potencialidades no diagnóstico de alterações displásicas e por isso de maior risco de malignização das leucoplasias orais.

5.8.2. p63

O p63 é um homólogo estrutural e funcional da família p53, frequentemente amplificado e sobreexpresso em SCCs, incluindo HNSCCs.^{88, 146}

Face à controvérsia do seu papel oncogénico, Saintigny *et al.*⁸⁸ avaliaram de que forma a sobreexpressão isolada ou combinada da oncoproteína Δ Np63 pode estar associada a risco elevado de desenvolvimento de cancro oral numa amostra de 152 pacientes com OPMDs. A expressão da Δ Np63 foi positiva para 41 pacientes (27%), observando-se igualmente *clusters* de células inflamatórias intraepiteliais (EIC) em 37 (26%) pacientes e podoplanina positiva em 56 (37%) pacientes. O desenvolvimento de cancro oral foi significativamente maior para pacientes com lesões Δ Np63/EIC positivas. Através de análise multivariável, incluindo idade, tratamento e estado histológico, a expressão positiva da Δ Np63 foi independentemente associada ao aumento de risco de 3,308 (95% CI, 1,663-6,580, $p=0,0007$). O estado histológico esteve associado ao desenvolvimento de cancro oral ($p=0,05$). Foi observada associação altamente significativa entre a Δ Np63 e o estado da podoplanina ($p<0,0001$), entre o estado da Δ Np63 e a presença de *clusters* EIC ($p=0,0003$) e entre o estado de podoplanina e a presença de EIC ($p=0,0012$). Os pacientes com OPMDs podoplanina-positivas apresentaram incidência significativamente maior de cancro oral do que as podoplanina-negativas ($p<0,0001$). Os pacientes Δ Np63-positivos apresentaram maior risco de cancro oral, particularmente nos primeiros 3 anos de *follow-up* ($p<0,0001$). O risco de desenvolvimento de cancro foi menos marcado quando considerada a presença de *clusters*

EIC, ainda que estatisticamente significativo ($p=0,015$). A presença dos 3 biomarcadores positivos esteve associada à histologia displásica ($p=0,016$) e a idade mais avançada ($p=0,004$). Pacientes nos quais as lesões foram positivas para a $\Delta Np63$, podoplanina e EIC apresentaram o risco mais elevado de cancro oral, com um rácio de 4,372 (95% CI, 1,912-9,992, $p=0,0005$) e 61% de rácio de desenvolvimento de cancro oral a 5 anos, comparativamente com 15% dos outros pacientes com OPMDs ($p<0,0001$). Após 5 anos, o tempo de sobrevivência livre de cancro para os pacientes com lesões OPMDs $\Delta Np63$ -negativas foi de 89% quando comparados com os 61% de pacientes com lesões $\Delta Np63$ -positivas. Na presença de lesões positivas para os 3 biomarcadores, a sobrevivência sem cancro após 5 anos foi de 39%, significativamente menor do que 85% dos pacientes com 1, 2 ou 3 biomarcadores positivos ($p<0,001$). O tempo de *follow-up* médio foi de 7,5 anos, com 36 (24%) dos 152 pacientes a desenvolverem cancro oral invasivo, sendo que metade se desenvolveu a partir do local original da OPMD.⁸⁸

Sumário e significado clínico: o estudo clínico prospetivo (*follow-up* mediano de 7,5 anos) de quimioprevenção por Saintigny *et al.*⁸⁸ foi o primeiro a demonstrar o valor preditivo da expressão da $\Delta Np63$ no desenvolvimento de cancro oral. A importância da expressão da $\Delta Np63$ em prever o desenvolvimento de cancro oral foi comparável ao da podoplanina, provavelmente por vias comuns aos dois marcadores, pelo que a sua análise multivariável combinada pode ser difícil. A evidência sugere que a p63 está presente nos eventos precoces da oncogénese para o HNSCC. A investigação deve investigar a correlação entre o EGFR e o $\Delta Np63$, constatado para o cancro mamário, já que o EGFR é um alvo terapêutico válido. Os biomarcadores aqui apresentados (EIC, podoplanina e $\Delta Np63$) são promissores, sendo necessários estudos de coorte longitudinais prospetivos, com amostras representativas por seleção aleatória.

5.8.3. p21

Na tentativa de parar o ciclo celular, a p53 induz a transcrição da proteína p21^{WAF1}, que é codificada pelo gene WAF-1. A proteína p21^{WAF1} forma um complexo quaternário com a ciclina, cdk e o PCNA, ignorando assim a fosforilação da proteína pRb pelo complexo ciclina-cdk ativo e inibindo a progressão do ciclo celular a partir de G1. Além disso, quando ligada ao PCNA, a p21^{WAF1} inibe diretamente a replicação do DNA durante a fase S. A marcação imunohistoquímica da p21^{WAF1} está também alterada durante o processo de carcinogénese oral, aumentando em número e intensidade consoante progride a severidade

histológica. Assim, tem sido sugerido que alterações na expressão da p21^{WAF1} podem contribuir para a oncogénese epitelial oral.¹⁰⁹

Visioli *et al.*¹⁰⁹ compararam a imunexpressão da p53 e p21^{WAF1} entre leucoplasias não displásicas (acantose e/ou hiperqueratose) e displásicas. Apesar da leucoplasia não displásica ser encarada na maioria dos estudos como um só grupo não divisível, não se sabe quais as diferenças entre os diferentes subtipos de alterações histológicas. Através de um estudo de coorte prospetivo (*follow-up* de 3-6 anos) envolvendo 36 pacientes, a amostra de leucoplasias orais homogéneas foi dividida 4 grupos: 6 espécimes de acantose, 9 de hiperqueratose, 10 de acantose combinada com hiperqueratose e 11 de displasia epitelial. Todas as amostras de leucoplasia foram p53 e p21^{WAF1} positivas. A percentagem média de marcação da p53 foi similar para as camadas basal e parabasal, variando entre 42 e 53% nos 4 grupos, ao contrário das condições normais onde a expressão desta proteína deve restringir-se a poucas células da basal. A marcação da p21^{WAF1} foi diferente entre camadas: na camada basal apenas 3-4% das células estavam marcadas, enquanto na camada parabasal entre 16-27% das células epiteliais estavam marcadas nos 4 grupos. A distribuição da p21^{WAF1} esteve de acordo com resultados de estudos anteriores. Não foi encontrada diferença estatisticamente significativa ($p > 0,05$) entre grupos para a marcação imunohistoquímica de p53 e p21^{WAF1}.¹⁰⁹

A razão do aumento da expressão da p21^{WAF1} na carcinogénese oral ainda não foi completamente elucidada. Este aumento pode representar uma tentativa de controlar a proliferação celular, que é possivelmente superada por outros fatores que estimulam a carcinogénese e sobrecarregam a função inibitória da p21^{WAF1}. Por outro lado, a ação levada a cabo pela p21^{WAF1} pode favorecer a proliferação celular, já que a função inibitória da p21^{WAF1} é estequiometricamente regulada, i.e., são necessárias muitas moléculas da p21^{WAF1} para inibir o complexo ciclina-cdk, enquanto uma única molécula pode favorecer a ligação do complexo ciclina-cdk ativo.¹⁰⁹

Apesar de neste estudo não se observarem diferenças entre os subtipos de leucoplasias não displásicas, Hildebran *et al.*¹⁶¹ analisaram o rácio de proliferação celular através da marcação das AgNORs e verificaram que entre diferentes subtipos de leucoplasias não displásicas, somente o grupo com acantose demonstrou um comportamento proliferativo similar ao encontrado na displasia epitelial.

Sumário e significado clínico: os estudos não permitem diferenciar as lesões não displásicas por imunomarcção da p53 e p21^{WAF1}, uma vez que se observam perfis semelhantes entre leucoplasias com e sem displasia. Não existe consenso quanto à abordagem mais apropriada de leucoplasias não displásicas. Enquanto esta questão não é resolvida, todos os pacientes com OPMDs devem seguir monitorizações clínicas regulares, de preferência com especialistas.

5.8.4. p27

O gene p27 é um inibidor das cdks, estando presente nas células em repouso, especialmente nas não proliferativas, nos queratinócitos diferenciados, nas camadas basais e parabasais. A sobreexpressão deste gene pode ser observada em vários carcinomas humanos. O grau de expressão da p27 está inversamente correlacionado com a transformação maligna de lesões pré-blastomatosas nas glândulas mamárias e brônquios. A diminuição da expressão da p27 sugere crescimento agressivo e mau prognóstico da doença neoplásica.⁷⁹

A expressão da ciclina D1 nas células epiteliais representa a transição G1-S no ciclo celular e a sua marcação IHC localiza-se na camada suprabasal, tal como a p63. A sobreexpressão da ciclina D1 é o resultado de rearranjo genético e conseqüentemente a amplificação deste gene aparece frequentemente em tumores malignos. A sobreexpressão da ciclina D1 é um sinal de transformação maligna iminente, em lesões pré-blastomatosas do trato respiratório superior. A amplificação da ciclina D1 em conjunto com o EGF tem sido observada em estudos de carcinomas hipofaríngeos. Os carcinomas linguais que demonstram sobreexpressão da ciclina D1 têm uma sobrevivência a 5 anos de 39%, enquanto 62% dos pacientes com carcinomas linguais sem sobreexpressão deste gene, sobrevivem nos primeiros 5 anos.⁷⁹

De acordo com a evidência, Kövesi e Szende⁷⁹ investigaram de que forma a expressão IHC da ciclina D1, p27 e p63 se correlacionava com as características clínicas e histológicas de leucoplasias orais não homogêneas (nodulares, *speckled* e eritroleucoplasias) de 18 pacientes. Observou-se aumento da expressão da ciclina D1 de acordo com a severidade da leucoplasia, assim como correlação positiva entre a severidade displásica e o tipo clínico de leucoplasia. O índice da p27 foi de 14-16% nas leucoplasias homogêneas e nodulares, mas substancialmente menor nas eritroleucoplasias (1-2%) (p<0,05). Este aumento inesperado da marcação da p27 em leucoplasias nodulares pode dever-se a um mecanismo defensivo contra

a transformação maligna. O índice médio da p63 foi de 10% nas leucoplasias homogêneas, 5% nas leucoplasias nodulares ou *speckled*, mas com aumento significativo na eritroleucoplasia - 20% ($p < 0,05$). Os resultados da p63 na leucoplasia nodular foram os esperados, com diminuição da sua expressão. No entanto, na eritroleucoplasia este mecanismo parece falhar, talvez pela existência de amplificação genética. Os resultados deste estudo sugerem que a expressão característica da ciclina D1, p27 e p63 em vários subtipos de leucoplasia pode ter valor preditivo.⁷⁹

Sumário e significado clínico: os estudos da p27 raramente respeitam amostras representativas. Além disso não são incluídos em grande número os diferentes tipos clínicos e histológicos de leucoplasia. No estudo citado não indicação das isoformas da p63 avaliadas, tendo este aspeto metodológico grande importância na interpretação dos resultados diferenciais. São necessários estudos que associem vários marcadores, preferencialmente de diferentes vias inter-relacionadas, através de amostras leucoplásicas significativas acompanhadas por longos períodos de *follow-up*, para validar o potencial preditivo da ciclina D1, p27 e p63.

Tal como discutido, nenhum dos membros da família p53 tem valor confirmado no diagnóstico e prognóstico de lesões displásicas, leucoplasia oral e OSCC.⁷

5.9. Família Rb

Os genes desta família – Rb e p16 – controlam a progressão do ciclo celular a partir de G1, à semelhança do que acontece para a ciclina D1 e p53.⁷⁶

O gene Rb foi o primeiro a ser identificado e desempenha um papel importante na regulação da proliferação celular. Quando ativado é capaz de reunir as proteínas necessárias à replicação celular. A proteína pRb é o componente central da via de sinalização que controla a progressão celular em G1, por interações com o complexo ciclina D1-cdk4/6, por sua vez inibidas pela p16. Atualmente conhecem-se mais de 20 proteínas que se ligam à pRb.¹⁴ A formação do complexo ciclina D1-cdk é capaz de fosforilar a pRb e dissociar o fator de transcrição E2F, resultando em proliferação celular aumentada. A evidência sugere que diferentes componentes da via Rb estão alterados na doença oncológica, incluindo o OSCC. O comportamento da proteína Rb no OSCC varia entre estudos, desde a perda à sobreexpressão. Existe pouca informação acerca da expressão desta proteína e consequente via nas displasias e

OPMDs.⁷ Soni *et al.*⁷⁶ reportaram uma perda significativa da pRb na transição entre hiperplasia e displasia. É necessária mais investigação para compreender e definir o potencial de diagnóstico/preditivo da via de sinalização pela Rb.⁷

A inativação do p16 é um dos eventos comuns da doença maligna e pode ser um dos primeiros genes supressores tumorais inativados no OSCC. No HNSCC, a alteração da proteína p16 ocorre precocemente e pode ser afetada pelo HPV. Geralmente, a alteração da proteína p16 ocorre em 70% destes carcinomas, com mutações somáticas do gene CDKN2A em 10% e deleção homozigótica em 50% dos casos. A metilação do CDKN2A é outro importante mecanismo que causa a inativação do gene nos HNSCCs.¹⁴

Os resultados da expressão IHC da p16 são contraditórios. Gologan, Barnes e Hunt¹⁶² demonstram uma correlação significativa entre o aumento da expressão da p16 e o aumento da severidade displásica. Por outro lado, vários investigadores têm demonstrado uma correlação significativa entre a diminuição da expressão da p16 e o grau histológico de displasia.¹⁶³

A sua perda está associada à progressão descontrolada do ciclo celular no cancro oral. Além disso, a senescência replicativa/imortalidade de células malignas é atribuída à ativação descontinuada da telomerase e à inativação da pRb/p16.⁷⁶

5.9.1. pRb

Através de um estudo prospetivo, Soni *et al.*⁷⁶ analisaram a expressão IHC da pRb, p16 e ciclina D1 em pacientes com displasia epitelial oral ou OSCC, para determinar se estas alterações partilham de efeitos cooperativos ou sinérgicos no desenvolvimento e prognóstico de cancro oral. A amostra foi constituída por 220 OSCCs, 90 OPMDs (52 hiperplásicas, 38 displasias) e 81 tecidos normais, com diagnóstico confirmado por histopatologia. Estabeleceram-se relações entre a expressão IHC e os parâmetros clinicopatológicos. Dos 220 OSCCs, 98 pacientes foram seguidos por um período máximo de 94 meses com sobrevivência mediana geral de 21 meses. A perda de expressão da p16 foi observada em 55% dos tecidos histologicamente normais obtidos a partir de locais distantes de OPMDs e OSCCs, sugerindo que a perda de expressão desta proteína precede alterações histológicas na mucosa oral, sendo considerada a mais precoce destas vias. Pelo contrário, a acumulação da p53 e perda da pRb foi observada em 39 e 47% dos tecidos histologicamente normais obtidos de pacientes com OSCCs, enquanto os tecidos normais obtidos de pacientes com OPMDs não evidenciaram

expressão aberrante destas proteínas, sugerindo que as alterações ocorrem em etapas mais tardias da carcinogénese. A expressão alterada de pelo menos uma das proteínas da via pRb foi observada em 75 de 90 (83%) OPMDs e em 198 de 220 (90%) OSCCs, enquanto 10 de 90 (8 das quais displásicas) OPMDs (10%) e 40 de 220 OSCCs (18%) apresentaram expressão alterada dos 3 componentes estudados. A expressão alterada dos 3 membros da via pRb em lesões hiperplásicas poderá ter levado à progressão destas lesões para displasia (11%), que assim adquiriram fenótipo mais agressivo com a acumulação da p53 alterada em 5% destas lesões. Após análise estatística destes dados a alteração combinada da p53 e pRb esteve igualmente presente na transição de displasia para lesão maligna, em 5% das OPMDs de maior risco. Num modelo multivariável, a perda da pRb foi a anormalidade mais significativa na transição hiperplasia-displasia (OR=3,727, p=0,005). A transição das OPMDs para estadios malignos foi associada ao fenótipo pRb-/ciclina D1+ (OR=2,294, p=0,001) e fenótipo p53+ (OR = 2.230, p = 0.002). O fenótipo pRb-/p53+ foi associado à progressão histológica dos tumores e à aquisição de potencial invasivo. A análise multivariável de risco revelou que o fenótipo pRb-/p53+ é a condição com pior prognóstico para a sobrevivência sem doença (HR= 2.642, p = 0.004). De acordo com estes resultados os autores propõem um modelo de progressão genética para o desenvolvimento e pior prognóstico de cancro oral.⁷⁶

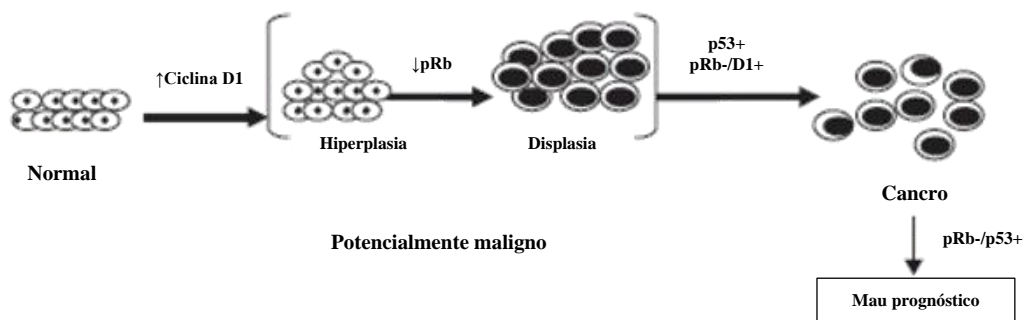


Figura 6. Representação da transformação maligna da mucosa oral normal.

Fonte: Soni S, Kaur J, Kumar A, Chakravarti N, Mathur M, Bahadur S, et al. Alterations of rb pathway components are frequent events in patients with oral epithelial dysplasia and predict clinical outcome in patients with squamous cell carcinoma. *Oncology*. 2005;68(4-6):314-25.⁷⁶

5.9.2. p16

A proteína p16 (CDKN2A, MTS-1 *multiple tumour suppressor 1*) localiza-se no 9p21 e também apresenta funções de supressora tumoral. Interage com complexos ciclina D1-cdk4/6 e funciona como regulador negativo da proliferação de celular através da pRb, permitindo a correção de possíveis danos. Não sendo possível a reparação ativa mecanismos apoptóticos.¹⁴

Através de uma amostra retrospectiva, Nasser *et al.*¹⁰³ avaliaram o valor preditivo de padrões de expressão IHC aberrantes das proteínas p16^{INK4a}, p53 e Ki67 na malignização de leucoplasia oral (n=39, 35 com e 4 sem displasia). Os autores propuseram a identificação de alterações simultâneas nestes marcadores, com o intuito de aumentar o valor preditivo, já que de forma isolada, estes apresentam frequência de aberrações superiores ao rácio de progressão. Além destes, incluíram a ciclina D1 e o pRb, porque a expressão reduzida ou perda de expressão da pRb, acompanhada de sobreexpressão da p16^{INK4a}, é um possível marcador para o envolvimento oncogénico do HPV16/18 na carcinogénese oral/orofaríngea. Foi observada sobreexpressão da p53, Ki67 e ciclina D1 e perda de expressão da p16^{INK4a} em 45,9%, 38,9%; 29,4% e 32,4% das leucoplasias sem displasia, respetivamente. Apesar de todas as alterações se acentuarem com a progressão histológica, apresentaram pouco valor preditivo positivo. Os dados do presente estudo confirmam a correlação positiva já demonstrada entre a p53 e a proliferação medida pela expressão da Ki67. Também se

confirmou que a combinação Ki67/p53 pode claramente discriminar leucoplasias displásicas das não displásicas. De forma semelhante, a combinação Ki67/p16^{INK4a} diferencia claramente leucoplasias com e sem displasia. A inclusão da Ki67 em padrões de aberração p53/p16^{INK4a}, em detrimento da ciclina D1 no presente estudo, melhora consideravelmente a distinção de leucoplasias não displásicas com risco de progressão. A sobreexpressão da ciclina D1 tem sido demonstrada com candidata para biomarcador da progressão maligna, sem que no entanto tenha melhorado o valor preditivo positivo, talvez porque a ciclina D1 reside no mesmo *loop* regulatório do ciclo celular do que a p16^{INK4a} (juntamente com a pRB e cdks) e a sua expressão aberrante pode representar um mecanismo alternativo à perda de p16^{INK4a}. Dos 35 pacientes com leucoplasias não displásicas, 6 (17,1%) apresentaram sobreexpressão para a p53 e perda simultânea da p16^{INK4a}, sendo os dois eventos observados durante o *follow-up* (mediano de 108 meses) destas lesões. Além disso, a prevalência da aberração combinada p53/p16^{INK4a} demonstrou uma forte correlação com a proliferação, assim como com o estado histopatológico das lesões - displasia. Com sensibilidade de 100% e especificidade de 88%, os autores concluíram que a aberração combinada da p53/p16^{INK4a} indica um risco aumentado de progressão maligna. Em simultâneo, estes dois marcadores podem formar uma excelente base para a pesquisa de um biomarcador proteico combinado para a avaliação de risco das leucoplasias.¹⁰³

No entanto, a combinação da expressão aberrante de p53/p16^{INK4a}/Ki67 ocorreu em apenas 3 casos (9%), sendo que em 2 destes pacientes (66,7%) houve progressão para displasia e carcinoma *in situ*. As alterações combinadas de p53/p16^{INK4a}/Ki67 tiveram uma sensibilidade de 100%, especificidade de 97% e valor preditivo positivo de 67%. Pelo contrário, a combinação de alterações p53/p16^{INK4a}/ciclinaD1 teve sensibilidade de 50%, especificidade de 90% e apenas 25% de valor preditivo positivo.¹⁰³

A perda de pRb e concomitante sobreexpressão de p16^{INK4a} não foi observada, excluindo o desenvolvimento de HPV nesta amostra de lesões leucoplásicas e confirmando a baixa prevalência conhecida para o cancro oral.¹⁰³

Torna-se necessário encontrar proteínas que pela sua expressão aberrante, melhorem o valor preditivo da p53/p16^{INK4a} dos atuais 33% e o valor preditivo positivo da p53/p16^{INK4a}/Ki67 dos atuais 67%.¹⁰³

Sumário e significado clínico: os estudos sugerem que a perda da p16 é o evento mais precoce no desenvolvimento de cancro oral. Além disso, a sobreexpressão da ciclina D1

é determinante na aquisição de fenótipo potencialmente maligno (displasia). A perda de pRb interfere na transição de hiperplasia para displasia, enquanto a dupla desregulação das vias pRb e p53 está associada à aquisição de fenótipo maligno e pior prognóstico para o OSCC. A combinação de alterações na p53/p16^{INK4a}/Ki67 tem sido proposta como biomarcador de pacientes com leucoplasias não displásicas de alto risco. São necessários estudos para validar estes resultados e identificar outras proteínas que possam aumentar o valor preditivo positivo das combinações de marcadores propostas. São necessários estudos multicêntricos longitudinais com longos *follow-ups* para determinar quais os marcadores que definem as OPMDs de maior risco.

5.10. Recetores tirosino-cinases

Recentemente, a análise proteômica revelou diferentes vias de sinalização envolvidas na leucoplasia oral e OSCC,⁶² nas quais se incluem as que ativam o EGFR, JAK/STAT, PI3K-Akt-mTOR, Wnt- β catenina, Ras-Raf-MEK-MAPK e VEGF.⁶ Diferentes fatores de crescimento, incluindo o fator de crescimento derivado de plaquetas (PDGF), fator de crescimento epidérmico, FGF, fator de crescimento neural (NGF), e membros da família do fator de crescimento transformante alfa (TGF- α), desencadeiam vias de sinalização por dimerização e ativação de recetores que são proteínas tirosino-cinases.¹⁴ A modificação destas vias interdependentes pode afetar a sobrevivência, proliferação e morfologia celular e angiogénese.⁷

5.10.1. EGFR/TNF- α

A via pelo recetor EGF (EGFR) figura um papel importante na proliferação celular (e.g. via ciclina D1), apoptose, invasão, angiogénese e metastização. A sobreexpressão do EGFR ocorre precocemente nos carcinomas de células escamosas (HNSCCs, pulmão, mama, bexiga e pâncreas) e é crítica na perda de controlo do crescimento.^{14, 94} A expressão do EGFR no epitélio oral normal deve ser sempre positiva, já que a renovação da mucosa se deve à secreção do respetivo EGF por glândulas salivares.⁹⁴ O mRNA do EGFR encontra-se aumentado 69 vezes em 92% dos tumores, quando comparado com a mucosa normal.¹⁴ A sobreexpressão do EGF é associada a uma variedade de cancros humanos, no qual se incluem os HNSCCs.¹⁷ A coexpressão do TGF- α e EGFR pode representar um evento precoce na displasia epitelial precedente de OSCC.^{10, 17} A sobrerregulação do EGFR e TGF- α é observada

na maioria dos OSCCs com pior prognóstico. A sobreexpressão do EGFR, do seu mRNA bem como a sua amplificação são igualmente importantes na progressão displásica das OPMDs.¹⁷ A sobreexpressão do EGFR ocorre em 80-100% das OPMDs e lesões malignas da cavidade oral. A expressão alterada e o número anormal de cópias genéticas do EGFR estão associados a pior prognóstico de HNSCC.⁹⁴ O anticorpo anti-EGFR (endovenoso) está aprovado para tratamento do HNSCC, além dos inibidores anti-EGFR (*per os*) atualmente em fase experimental.¹⁰

A expressão do EGFR está subregulada na leucoplasia oral, sendo que os níveis de expressão parecem aumentar na camada espinhosa. Este padrão de sobreexpressão do EGFR é mais marcado para cancros invasivos.⁹⁴

Num estudo RCT de Taoudi Benchekroun *et al.*¹⁰ foram biopsadas OPMDs (leucoplasias e eritroplasias orais; 1/3 das lesões com displasias de diferente severidade) de 162 pacientes livres de OSCC, aleatoriamente distribuídos por 3 grupos de intervenção: metade dos pacientes no grupo 1) ácido 13-cis-retinóico (13cRA); outra metade nos grupos 2) β -caroteno (BC) + retinil palmitato (RP) e 3) retinil palmitato (RP). Não foram incluídas amostras de tecido normal ou de lesões inflamatórias. A avaliação IHC da expressão do EGFR foi semiquantitativa (n=145) e quantitativa automatizada (n=127). O número de cópias genéticas do EGFR foi avaliado por hibridização fluorescente *in situ* (FISH) num subgrupo de 49 OPMDs com elevada expressão por análise semiquantitativa. Definiram-se controlos positivos e negativos. Foi analisada a associação entre anormalidades na expressão membranar e citoplasmática e o número de cópias do EGFR com o desenvolvimento de OSCC, por *follow-up* médio de 7,5 anos, combinado entre *chart review* e *phone interview*. Dos 145 pacientes, 35 (24%) desenvolveram cancro oral, 17 dos quais no local diagnosticado previamente para OPMD, e 18 contralaterais e/ou num local diferente. A elevada expressão do EGFR foi detetada em 103 das 145 OPMDs (71%) e associada a risco aumentado de OSCC, embora não significativo (p=0,10). Das 49 OPMDs avaliadas por FISH, 20 (41%) apresentaram aumento do número de cópias genéticas do EGFR – FISH-*positive*. Os pacientes com lesões FISH-*positive* apresentaram incidência significativamente aumentada de OSCC (p=0,0007): Dos 11 OSCCs que se desenvolveram no local diagnosticado para as respetivas OPMDs, 10 (91%) eram do grupo FISH-*positive* (p<0,0001). Os pacientes com OPMDs e expressão EGFR aumentada apresentaram menor tempo livre de doença com significado estatístico a 10 anos, se também demonstrassem aumento das cópias genéticas do cromossoma 7 e gene EGFR (16%; 95% CI, 0,05-0,53) vs. pacientes com número normal de

cópias genéticas EGFR (67%; 95% CI, 0,5-0,9) ($p=0,0007$). Estes dados demonstram que o aumento do número de cópias do cromossoma 7 e do gene EGFR representa um evento precoce na oncogénese oral e tem valor preditivo no desenvolvimento de OSCC.¹⁰

Nenhum outro trabalho estudou este marcador de risco através de uma grande amostra de OPMD, longitudinal e prospetiva, com origem num RCT tão longo. A identificação e validação do EGFR poderá permitir a seleção de populações de risco aumentado e potenciar os seus inibidores com ação terapêutica.¹⁰

Os dados do estudo sugerem que um aumento no número de cópias do gene EGFR em OPMDs é um precursor da amplificação genética do EGFR em HNSCC e por isso um importante moderador da oncogénese oral. Vários estudos de análise genómica e tecnologia *microarray* confirmam estes resultados. De acordo com a evidência, os autores sugerem que o EGFR é um contributo independente *major* da oncogénese oral tal como progride continuamente da instabilidade cromossomal à trissomia EGFR, polissomia EGFR e por fim amplificação do gene EGFR, resultando numa polissomia desequilibrada do cromossoma 7 (cromossoma 7p11.2). Segundo a evidência de estudos *in vitro* e *in vivo* as alterações do número de cópias EGFR talvez reflitam na sua maioria a aneuploidia e polissomia do cromossoma 7 em vez das alterações relacionadas com o EGFR. No presente estudo, pacientes com mais de 3 cópias do cromossoma 7 (trissomia) em pelo menos 3% das células epiteliais apresentaram maior risco de malignização (HR=1,85, 95% CI, 1,05-3,25; $p=0,03$).¹⁰

O efeito dos agentes quimiopreventivos neste estudo clínico poderá representar um fator de confundimento nos resultados. Embora não existam diferenças significativas no desenvolvimento de cancro oral entre os grupos em tratamento, não foi determinado se qualquer tratamento ou tratamentos deste ensaio interagem com a expressão do EGFR e o seu número de cópias nas OPMDs.¹⁰ Além disso não foram incluídas amostras de tecido normal ou de lesões reativas/inflamatórias. A classificação de displasia não é descrita para cada uma das OPMDs, não sendo estas claramente identificadas como leucoplasias e eritroplasias orais.

Uma vez que não têm sido observadas diferenças no número de cópias do gene EGFR entre tumores da laringe, faringe e cavidade oral, os autores sugerem que os dados deste estudo podem ser úteis para várias estruturas da cabeça e pescoço.¹⁰

A via de sinalização JAK/STAT é responsável pela transdução de sinais e ativação de fatores de transcrição. Nas culturas de células de HNSCC, a estimulação do EGFR inicia a sinalização, via ativação persistente de proteínas STAT seletivas.¹⁴

Grandis *et al.* foram os primeiros a fornecer evidência de que a STAT2 ativada constitutivamente representa um evento precoce da oncogênese da cabeça e pescoço, que contribui para a perda de controlo de crescimento, através de um mecanismo anti-apoptótico.¹⁴

O STAT participa na resposta celular normal a citocinas e fatores de crescimento. Está normalmente presente no citoplasma e é ativado por tirosino-quinases (JAK) ou fatores de crescimento como a IL-6, EGF, PDGF e VEGF. Nas células normais, a ativação da STAT3 é um processo temporário, de minutos a horas. Pelo contrário, esta encontra-se persistentemente tirosino-fosforilada/ativada (pSTAT3) em tumores, pelo que é translocada para o núcleo onde regula a transcrição de genes alvo. A desregulação desta proteína tem sido associada à transformação e progressão de vários cancros, incluindo mieloma múltiplo, mama, ovário, pulmão, próstata e tumores da cabeça e pescoço.¹⁰⁵

A pSTAT3 atua como mediador comum de várias cascatas sinalizadoras, fazendo a ponte entre diferentes mecanismos pró-inflamatórios (e.g. PGE2, IL-6, TNF- α , COX2 e NF- κ B), de transformação e proliferação celular. Além da inflamação, os carcinogêneos do tabaco são conhecidos por induzir a fosforilação da STAT3 (pSTAT3) via Ras/Raf/Erk e recetores tirosino-quinases. A ativação da STAT3 regula a expressão oncogénica de mediadores do ciclo celular (ciclina D1, c-fos, c-myc, p21 e p27), inibe a apoptose (bcl-xl, mcl-1, survivina), angiogénese (VEGF) e metaloproteinases de matriz (MMP-1, MMP-2, MMP-9 e MMP-10). A ativação da STAT3 por hipóxia resulta na resistência química de células malignas do cancro da mama e ovário. A STAT3 tem sido proposta como alvo de futuros agentes quimiopreventivos e terapêuticos, por indução da apoptose em células malignas da cabeça e pescoço.¹⁰⁵

Macha *et al.*¹⁰⁵ investigaram o significado preditivo da pSTAT3 em OSCCs. Por IHC foi observado um aumento significativo da acumulação nuclear da pSTAT3 em 49/90 leucoplasias (54,4%), 35 sem e 55 com displasia, e 63/94 OSCCs (67%) (*ptrend*<0,001). Foi observado um aumento significativo da expressão nuclear da pSTAT3 dos tecidos orais normais para leucoplasia (com e sem displasia) e cancro (*ptrend*<0,01). A acumulação nuclear da proteína na leucoplasia sem displasia demonstrou uma especificidade de 100%, revelando

o potencial deste biomarcador para a distinção de tecidos orais normais. Foram incluídos tecidos não malignos, confirmados por histopatologia, recolhidos de local distante do OSCC, não tendo sido detetada marcação nuclear da pSTAT3. O aumento da expressão da STAT3 ativada esteve associado ao estadió tumoral ($p=0,01$), metastização das cadeias linfáticas ($p=0,0018$) e consumo de tabaco ($p=0,004$). Dos 94 pacientes com OSCC, 71 (75,5%) foram seguidos regularmente em *follow-ups* (máximo 102 meses) após tratamento de carcinoma primário. Foi detetada recidiva locorregional/morte em 51/71 pacientes (72%) monitorizados. A análise Kaplan-Meier demonstrou que os OSCCs com aumento da pSTAT3 nuclear apresentavam sobrevivência sem doença significativamente reduzida (13 meses), quando comparado com pacientes sem expressão nuclear da pSTAT3 (64 meses, $p=0,019$): A regressão de Cox revelou que a pSTAT3 nuclear é o marcador mais significativo para pior prognóstico ($p = 0,024$; HR=2,7), superando a invasão das cadeias linfáticas.¹⁰⁵

Sumário e significado clínico: o EGFR parece ser um dos marcadores mais promissores do risco de cancro oral bem como sinalizador da resposta à quimioprevenção por anticorpos anti- EGFR e inibidores tirosino-cinases. A análise da sua expressão proteica e do número de cópias genéticas poderá levar à seleção de pacientes com maior necessidade e capacidade de resposta a inibidores do EGFR, em futuros ensaios quimiopreventivos para o cancro oral.

As alterações da STAT3 parecem ocorrer em etapas precoces do desenvolvimento maligno das OPMDs e são consideradas como biomarcadores de mau prognóstico para o OSCC. Apesar de ser sugerido como marcador de distinção entre epitélio normal e lesões benignas/Malignas, não se sabe a sua eficácia na distinção de OPMDs de maior e menor risco de transformação maligna.

São por isso necessários estudos de coorte com *follow-ups* alargados para confirmar o valor preditivo positivo dos diferentes componentes da via EGFR/TNF- α (e.g. STAT3).

5.10.2. PI3K/Akt

O EGFR estimula outros eventos de sinalização, nomeadamente a via PI3K/Akt que contribui para o crescimento maligno e potencial metastático do cancro oral. A PI3K é uma cinase lipídica indutível, classificada em 3 classes com base na sua estrutura (I, II e III), que fosforila o fosfatidil-1D-mio-inositol (PI), constituinte da membrana celular.^{7,91} A ativação da PI3K por fatores de crescimento ou outros mediadores dá origem a PI(3,4)P2 e PI(3,4,5)P3,

mensageiros secundários ativadores de proteínas Akt e PDK1, relacionadas com a sobrevivência e proliferação celular. A ativação da via PI3K (e.g. PI3K classe I e III) tem sido associada à malignização de vários tumores humanos, incluindo fases precoces da oncogénese oral, cólon, pulmão, mama e ovário por estímulo da proliferação celular e supressão da apoptose, através por exemplo da ativação persistente da Akt membranar, atualmente proposta como alvo de agentes terapêuticos.⁹¹

Kaur *et al.*¹⁶⁴ avaliaram a expressão da PI sintase por análise IHC e observaram a sua sobreexpressão precoce em lesões leucoplásicas, sendo consistente ao longo do desenvolvimento e progressão para OSCC. A ativação da Akt tem sido demonstrada como um evento precoce da oncogénese oral e a sua expressão correlacionou-se com pior *outcome* na presença de cancro oral. Massarelli *et al.*¹⁶⁵ reportaram a expressão frequente da p-Akt na displasia oral, com a sua ativação a ser notada em 55% dos casos que progrediram para OSCC.

Watanabe *et al.*⁹¹ analisaram a importância da via PI3K/Akt por cDNA *microarray* e IHC em 6 pacientes, 3 com OPMDs e 3 com cancro lingual precoce. As amostras de epitélio normal, displasia epitelial e tecido maligno foram recolhidas por microdissecção a laser, a que se seguiu a extração do RNA e conversão dos sinais para valores numéricos. A análise IHC foi realizada com anticorpo anti-p-Akt. Da análise genética realizada, o tecido displásico demonstrou a expressão de 5 genes num rácio pelo menos 2 vezes superior ao tecido normal, enquanto tecidos malignos precoces demonstraram 4 genes com aumento da expressão pelo menos 2 vezes superior. O rácio de expressão da PI3K classe III foi de 2,5 vezes a 11 vezes maior no tecido maligno precoce e displasia comparativamente com os tecidos normais. A análise IHC confirmou estes dados, tendo sido identificadas células p-Akt-positivas até à camada espinhosa de tecidos displásicos e malignos, sem qualquer expressão no tecido normal. Estes dados sugerem que a ativação da via PI3K/Akt está associada a OPMDs e por isso à oncogénese oral precoce.⁹¹

Sumário e significado clínico: através de cDNA *microarray*, o gene PI3K classe III foi encontrado sobreexpresso na displasia e OSCC precoce, com maior notoriedade nos casos de displasia epitelial. A IHC utilizando anticorpos contra p-Akt revelou células positivas na displasia e cancro precoce; sendo a expressão de p-Akt mais elevada na displasia. Porém, o significado clínico desta via e da importância dos seus diferentes componentes não é claro. Os estudos existentes não incluem amostras representativas, havendo heterogeneidade nos

métodos de detecção e proteínas estudadas. Apesar da relação óbvia entre a via PI3K/Akt e a transformação maligna das OPMDs, são necessários estudos com *follow-ups* alargados de lesões leucoplásicas, para validação como marcador preditivo de fases precoces da oncogénese oral.

5.10.3. ERK/MAPK

As vias de sinalização por cinases, reguladas por sinais extracelulares (ERK/MAPK), estão envolvidas na diferenciação, proliferação e sobrevivência celular. As MAPKs incluem duas isoformas (p44MAPK/ERK1 e p42MAPK/ERK2) e são ativadas/translocadas para o núcleo por fatores de crescimento como o EGF, NGF e PDGF.⁷

Estas cinases têm um papel central na sinalização mitogénica, representada por uma cascata de fosforilações envolvendo recetores da superfície celular, Ras, Raf e MEK ou proteína cinase C, Raf e MEK.⁷ A ativação da via ERK/MAPK é frequentemente o resultado da estimulação da sinalização EGFR, com os estudos a demonstrarem que no OSCC, a via Ras/Raf/MAPK poderá ser constitutivamente ativada devido a mutações funcionais nos genes Ras, ou por estimulação persistente autócrina/parácrina do EGFR e outros recetores de fatores de crescimento, nomeadamente o FGFR.¹⁶⁶

Ainda que as alterações na via de sinalização ERK/MAPK estejam identificadas na displasia, bem como em lesões de maior risco, são necessários estudos adicionais que determinam a sua utilidade no diagnóstico e prognóstico de OPMDs.⁷

5.10.4. Ciclina D1

A ciclina D1 (CCND1) é uma das proteínas chave na regulação da transição G1-S no ciclo celular. O CCND1 foi inicialmente identificado como gene bcl-1 (11q13) cromossoma 11q13, no local de translocação t(11:14) (q13;q32) em patologias malignas de células B. A sobreexpressão da ciclina D1 acelera a transição G1-S, mediante formação e complexos com cdk's e fosforilação da pRb, enquanto a sua inibição resulta na paragem do ciclo celular.⁷ A amplificação do gene ciclina D1 foi reportada em 34% dos casos de HNSCC, como consequência da desregulação precoce da sua expressão. A sobrevivência a 5 anos para HNSCC com amplificação genética ou sobreexpressão proteica da ciclina D1 foi

significativamente menor, comparativamente com pacientes com baixos níveis de ciclina D1 ($p < 0,0001$).¹⁴

Kövesi e Szende⁷⁹ demonstraram que a expressão da ciclina D1 aumentava de acordo com a severidade de displasia. Turrati *et al.*¹⁶⁷ também reportaram que os fatores de transcrição c-Jun/c-Fos e a ciclina D1 estão alterados no epitélio displásico e OSCC, sendo que a expressão da ciclina D1 aumenta com a diferenciação histológica de epitélio normal a displasia moderada e OSCC. Ishida *et al.*¹⁶⁸ avaliaram a relação entre a expressão de componentes da via Wnt e a progressão da displasia na leucoplasia oral, e demonstraram que dois dos genes alvo da via Wnt/ β -cat – c-myc e ciclina D1 – estavam sobreexpressos na leucoplasia. Estes autores reportaram um aumento da expressão de ciclina D1 durante a progressão histológica da severidade das leucoplasias orais, com a sobreexpressão a ser novamente mais evidente na presença de displasia. Ye *et al.*¹⁶⁹ avaliaram a interação complexa entre SNPs de genes reguladores do ciclo celular, os hábitos tabágicos e o risco geral das OPMDs. Os investigadores demonstraram que o polimorfismo CCND1 P241P nas OPMDs estava significativamente associado a um risco de malignização aumentado de 2,5 vezes. Huang *et al.*¹⁷⁰ caracterizaram os SNPs do CCND1 num estudo caso controlo com 115 OPMDs e 230 controlos e demonstraram que indivíduos com uma ou mais cópias da variante CCND1 G870A no alelo A tinham um risco aumento de desenvolverem OPMDs.

A avaliação de biomarcadores foi ampliada à associação entre o consumo de produtos de saúde oral e o desenvolvimento de OPMDs. Damm *et al.*¹⁷¹ relacionaram o desenvolvimento de lesões leucoplásicas orais atípicas, de localização e aparência microscópica invulgar, com a utilização de produtos de saúde oral Viadent[®] contendo sanguinária.⁷⁷ A utilização de *Sanguinaria canadensis* na medicina humana ainda é controversa. Embora alguns estudos contrariem os dados publicados por Damm *et al.*¹⁷¹, outros, mais recentes, têm demonstrado que a utilização de Viadent[®] não é só um fator de risco, como é independente no desenvolvimento de leucoplasia oral. Além disso, o estudo de Eversole, Eversole e Kopcik¹⁷² demonstraram que as lesões associadas à utilização de sanguinária apresentavam perfis genéticos mais próximos de lesões displásicas de baixo grau do que lesões queratóticas benignas.⁷⁷

A estrutura química da sanguinária apresenta homologia muito próxima de carcinogéneos orais já estabelecidos, como os hidrocarbonetos aromáticos policíclicos (PAHs). Este xenobiótico ativa enzimas capazes de bioativar (fase I) ou destoxificar (fase I e

II) o seu potencial carcinogénico. Os autores propõem que a sanguinária é metabolizada por enzimas de fase I e II da mucosa oral e particularmente bioativa (fase I) em indivíduos geneticamente suscetíveis a carcinogéneos químicos (e.g. alterações da p53). Em conjunto, os dados experimentais e clínicos sugerem que a sanguinária pode atuar como agente carcinogéneo no epitélio oral humano.⁷⁷

Através de um estudo retrospectivo, Anderson *et al.*⁷⁷ compararam perfis de marcação da p53, p16, ciclina D1, Ki67 e bcl-x entre leucoplasias (n=20) associadas a sanguinária e espécimes normais (n=20) ou displásicos (n=20). O perfil de marcação do biomarcador apoptótico bcl-x foi muito variável pelo que não se procedeu à análise quantitativa. A Ki67 apresentou marcação nuclear basal e parabasal intensa em amostras normais, hiperqueratóticas. A displasia demonstrou maior variação na marcação da Ki67, com menor intensidade do que no tecido normal e localização predominantemente basal. Os espécimes associados ao consumo de Viadent[®] apresentaram padrões de expressão semelhantes ao tecido normal, maioritariamente basal, ainda que com maior dispersão de células positivas. A marcação quantitativa do Ki67 e do p16 não apresentou diferenças significativas entre os 3 grupos (p>0,05), ao contrário da ciclina D1 e p53 (p<0,05). A maior intensidade de marcação da ciclina D1, Ki67 e p16 foi observada em tecido normal, enquanto a proteína p53 apresentou maior imunoreatividade em tecido displásico. Para a ciclina D1 observou-se uma redução da marcação em relação ao tecido normal e para a p53 uma elevação destes níveis entre tecido normal, associado a Viadent[®] e displasia. A tendência da análise revela valores intermédios de marcação para as lesões relacionadas com produtos Viadent[®]. Os dados confirmaram o potencial pré-neoplásico da sanguinária.⁷⁷

Sumário e significado clínico: a utilização de diferentes biomarcadores conhecidos da malignização de leucoplasia oral permite estudar o significado clínico da sanguinária. Ainda assim, ao contrário da maioria dos trabalhos, o aumento da intensidade de marcação da Ki67 não esteve de acordo com a progressão histológica, desconhecendo-se com certeza o motivo da diferença destes resultados. Especula-se que a diferença nas metodologias como a utilização de diferentes técnicas e anticorpos, ou a própria natureza reativa inflamatória das lesões ditas normais/hiperqueratóticas, possam ter alterado o padrão normal destes valores. Por outro lado, alguns autores sugerem que o aumento da imunoreatividade em lesões associadas a Viadent[®] face à displasia, se deve aos próprios produtos metabólicos carcinogéneos (e.g. espécies reativas de oxigénio). Martin e Barret¹⁷³ demonstraram que em doses baixas, as espécies reativas de oxigénio foram capazes de estimular a proliferação

celular, resultando no aumento da expressão do Ki67. A tendência da marcação da ciclina D1, de acordo com a progressão histológica, também é controversa. Alguns investigadores sugerem que a sanguinária provoca mutações no DNA, provocando a paragem em G1 por supressores tumorais, mecanismo que pode explicar a maior prevalência da ciclina D1 em tecido associado a Viadent[®] do que em tecido displásico.⁷⁷ Não é claro o potencial oncogénico deste produto de saúde oral, pelo que cabe ao clínico identificar os efeitos deletérios deste componente, sendo necessário esclarecer os seus mecanismos patológicos.

Hoje sabe-se que as alterações na via ciclina D1 (e.g. rearranjos, amplificação, sobreexpressão, polimorfismos) estão presentes na oncogénese oral. Contudo, não existe informação que valide este biomarcador como de valor preditivo para displasias de risco aumentado.⁷

5.10.5. VEGF

A angiogénese é um *hallmark* comum a qualquer processo oncogénico e tem sido associada à formação aumentada de metástases e à diminuição das possibilidades de sobrevivência em vários tumores, incluindo o HNSCC. No HNSCC o fator de crescimento endotelial vascular (VEGF), a interleucina-8 (IL-8) e o FGF 1/2 são considerados iniciadores de sinais angiogénicos. Por sua vez, a trombospondina-1 que se liga à CD36, atua como inibidor da angiogénese na superfície de células endoteliais. A ligação do VEGF aos seus recetores endoteliais (VEGFR-1, VEGFR-2, VEGFR-3) aumenta a permeabilidade dos vasos e promove a proliferação, migração e diferenciação do endotélio. A expressão do VEGF está aumentada na displasia e HNSCC.⁷ A expressão dos membros VEGF-A e VEGF-C no HNSCC tem sido associada a maior risco de metastização das cadeias linfáticas. Os marcadores da angiogénese para o HSNCC, têm sido usados em fase experimental como possíveis alvos terapêuticos. Muitos dos inibidores da angiogénese investigados demonstraram efeitos antitumorais em ensaios pré-clínicos e clínicos. A remissão parcial foi observada e aparentemente poderão ser futuros candidatos para utilização clínica na terapia do HNSCC.¹⁴

No que diz respeito às OPMDs, Johnstone e Logan^{174, 175} reportaram uma sobreregulação significativa do VEGF durante a transformação maligna, ainda que não fosse observada correlação com a severidade displásica. Além disso, alguns estudos sugerem que a indução da angiogénese nas OPMDs ocorre via mecanismos alternativos ao VEGF, pelos

níveis reduzidos de expressão que apresentou na displasia e OSCC. De facto, Hasina *et al.*¹⁷⁶ demonstraram que a angiogénese no OSCC ocorre por diferentes vias, com enorme impacto na definição de terapêuticas anti-angiogénicas.

Atualmente, a evidência sugere que existe heterogeneidade na expressão do VEGF na displasia e OSCC: Os resultados manifestam que a seleção de um único fator ou via angiogénica pode ser de valor limitado na previsão da progressão para OSCC.

Existe muita investigação direcionada para a identificação destes biomarcadores, no entanto escasseiam alguns estudos quanto à incidência e *timing* das vias alteradas nas OPMDs.⁷

5.11. Apoptose

5.11.1. Bcl-2

A apoptose é um processo de morte celular programada altamente regulado, distinguido pela ativação de uma família de proteases cisteína-aspartato, designadas por caspases. A bcl-2 (inibidora) e a bax (catalisadora) medeiam os processos apoptóticos. O rácio bcl2:bax parece determinar em a suscetibilidade celular à apoptose em resposta a estímulos externos.¹⁴

A expressão da bcl-2 nem sempre tem apresentado o valor preditivo positivo esperado para o OSCC. Todavia, tem sido demonstrada uma diminuição da expressão da bcl-2 em comparação com a mucosa oral normal, assim como a correlação da expressão da bax com o estadiamento histológico de OSCC.¹⁴

A bcl-2 é uma proteína anti-apoptótica, codificada pelo proto-oncogene bcl-2 pela primeira vez isolado em linfomas de células B. A expressão anormal da bcl-2 resulta na desregulação e bloqueio da apoptose, prolongando assim a sobrevivência celular e aquisição de mutações necessárias à transformação maligna. Geralmente, esta oncoproteína encontra-se sobreexpressa em OPMDs e OSCCs.⁹⁷ Apesar da desregulação da apoptose ser considerada uma etapa precoce fundamental da carcinogénese oral, o papel da bcl-2 ainda não é claro.⁷¹

Os estudos retrospectivos mais recentes sugerem que a sobrerregulação da bcl-2 pode ser um evento precoce da oncogénese epitelial. Na mucosa oral normal, a bcl-2 não é

detetável ou está expressa apenas ocasionalmente em células basais. A sobreexpressão da bcl-2 é normalmente observada nas áreas adjacentes ao cancro oral ou em epitélio displásico. Ainda que não exista clarificação do mecanismo oncogénico da bcl-2 no cancro oral, um estudo em particular observou que o nível de diferenciação era menor em queratinócitos alterados por plasmídeos que expressavam a bcl-2. Também neste estudo, a maior sobreexpressão da bcl-2 pareceu estar associada a carcinomas menos diferenciados, de estadió precoce.⁹⁷

A sobreexpressão da proteína bcl-2 também tem sido observada noutros tumores malignos, incluindo cancro do pulmão, ovário, cólon, próstata, esófago e mama. Além disso tem sido observada em OPMDs do sistema coloretal, cavidade oral, estômago e esófago. Estes dados sugerem que a bcl-2 pode estar associada à oncogénese precoce destes órgãos. Inclusivamente, Singh BB *et al.* demonstraram a expressão da bcl-2 em células basais e parabasais de epitélio não displásico contíguo a epitélio neoplásico. Isto sugere que as alterações da bcl-2 precedem o aparecimento de OPMDs e lesões neoplásicas.⁹⁷

Com o objetivo de averiguar a potencialidade como marcadora tumoral, Sudha e Hemavathy⁹⁷ compararam o aspeto topográfico e o grau da sua sobreexpressão IHC da bcl-2 entre OPMDs com confirmação histopatológica, incluindo a leucoplasia (n=10), fibrose submucosa oral (n=10) e líquen plano (n=10), e o OSCC (n=30). Foram incluídos controlos positivos. Nos casos de leucoplasia oral, 2 (20%) demonstraram maior marcação positiva na camada suprabasal e 8 (80%) na camada basal. Dos 30 casos de OSCC, 11 (36,7%) demonstraram maior marcação suprabasal, 15 (50%) maior marcação na basal e 4 (13,3%) sem marcação convincente. Houve diferenças estatisticamente significativas na expressão topográfica entre os espécimes de OSCC e leucoplasia ($p=0,0139$). Aliás, das 3 OPMDs estudadas, a leucoplasia foi a única com significância estatística. A maioria dos casos apresentou 25-50% de células positivas para a bcl-2. Os resultados totais não apresentaram significância estatística entre OSCC e OPMDs, e entre OSCC e cada uma das OPMDs.⁹⁷

Sumário e significado clínico: os autores têm demonstrado por IHC que existe um aumento da expressão da bcl-2 entre leucoplasia oral e OSCC. São necessários estudos com amostras maiores para confirmar diferenças dos padrões topográficos de expressão da bcl-2, bem com a sua intensidade e percentagem de células positivas. O papel da bcl-2 no desenvolvimento e progressão da neoplasia oral necessita de mais investigação, preferencialmente em simultâneo com outros oncogenes.

5.11.2. FAS e FASL

A resistência à apoptose por evasão do sistema imune é uma característica comum a todos os tipos de cancro. As alterações de expressão do sistema FAS/FASL poderão contribuir desta forma para o desenvolvimento de OSCC. Os SNPs têm sido propostos como fatores de maior suscetibilidade genética ao cancro, por alterarem a expressão genética ou atividades enzimáticas com potencial risco de malignização. No entanto, e apesar de alguns polimorfismos estarem associados a diferentes níveis de expressão do sistema FAS/FASL, não se sabe qual o impacto no desenvolvimento de OSCC a partir de OPMDs, como a leucoplasia ou a fibrose submucosa oral. Têm sido estudados vários de polimorfismos do sistema FAS/FASL no cancro da mama, pulmão, cérvix e esófago. No entanto os dados não são coerentes e nem sempre se investigam as mesmas variantes destes genes apoptóticos.¹

Wang *et al.*¹ avaliaram a relação entre as variantes genéticas de FAS (-1377G>A e -670A>G) e FASL (-844C>T) e o risco de cancro oral. Os polimorfismos destes genes foram avaliados por PCR-RFLP em 294 casos de OSCCs, 53 pacientes com fibrose submucosa oral e 84 com leucoplasia oral (61% com displasia), assim como 333 controlos saudáveis. Foram recolhidos dados clinicopatológicos e possíveis fatores de confundimento. Segundo os resultados de regressão logística simples e multivariável, os polimorfismos destes dois genes não se encontram correlacionados com o desenvolvimento de OSCC ou com o potencial maligno de leucoplasia oral. No entanto registou-se uma diferença de 2 a 4 vezes no risco de desenvolvimento de OSCC quando hábitos de consumo de álcool, tabaco e *betel quid* estavam presentes entre pacientes com diferentes polimorfismos FAS. Estes resultados sugerem que o consumo destas 3 substâncias viciantes podem constituir risco para o desenvolvimento de OSCC através de polimorfismos FAS funcionais. Os polimorfismos FAS [FAS A(-1377)-G(-670)] estiveram significativamente correlacionados com o potencial maligno de fibrose submucosa oral por análise multivariável.¹

Sumário e significado clínico: os polimorfismos FAS e FASL não parecem estar correlacionados com o desenvolvimento de OSCC ou o com potencial maligno da leucoplasia oral. O impacto do consumo de substâncias carcinogénicas no desenvolvimento de OSCC poderá ser diferenciado por polimorfismos FAS funcionais. São necessários estudos prospetivos, para verificar a associação dos polimorfismos do sistema FAS/FASL com a malignização de leucoplasia oral.

5.11.3. TC21

O TC21/R-Ras2 é um membro da superfamília Ras, envolvido em diversas funções celulares incluindo proliferação, crescimento e diferenciação celular, apoptose, organização do citoesqueleto, transporte de vesículas e nuclear. Além das vias de sinalização partilhadas com a Ras, a TC21 desencadeia novas cascatas de transdução de sinais. É conhecida por ativar a Akt, resultando em aumento da proliferação celular, transformação e sobrevivência através de numerosos efetores, incluindo Bad, GSK-3_B, e mTOR. Ainda que o envolvimento das vias Ras/Raf, PI3K/Akt e Nf-κB estejam identificadas para o OSCC, o papel da proteína TC21 na carcinogénese é desconhecido. A sobreexpressão deste marcador encontra-se nas fases precoces dos SCCs do trato aerodigestivo superior, assim como sobrerregulado no cancro da mama e coloretal.¹⁰⁵

Macha *et al.*⁹⁵ investigaram o significado clínico da TC21 no cancro oral. Através de análise IHC em 120 leucoplasias (62 não displásicas, 58 com displasia), 83 OSCCs e 30 tecidos não malignos de local distante de OSCC, a expressão proteica da TC21 foi correlacionada com parâmetros clinicopatológicos e prognóstico da doença. O estudo incluiu controlos positivos e negativos. Após confirmação da IHC por *immunoblotting*, utilizou-se a co-imunoprecipitação para identificar possíveis interações desta proteína. Foi observado aumento significativo da expressão nuclear TC21 de tecido normal para leucoplasia e cancro oral ($p < 0,001$). A sobreexpressão IHC da TC21 foi observada em 74,2% das leucoplasias sem displasia, 75,9% das lesões displásicas e em 79,5% dos OSCCs. Foi igualmente observada maior expressão da TC21 em tumores precoces (T1/T2) em relação a tumores mais avançados (T3/T4). Desconhece-se esta possibilidade de um papel bifásico da TC21 na carcinogénese oral, já que pode ser necessária a sua subregulação para progressão do tumor. Dos 83 pacientes com OSCC, 57 foram seguidos em *follow-up* (mediano de 31 meses, máximo de 73), sendo que a recidiva locorregional ou morte foi observada em 38/57 (68,4%) dos pacientes. Em comparação com tecido não maligno, os valores preditivos positivos para a leucoplasia sem displasia, leucoplasia displásica e OSCCs foram de 95,8%, 95,6% e 97,1%, respetivamente. Os OSCCs que demonstraram sobreexpressão da TC21 apresentaram menor sobrevivência sem doença, sugerindo que a TC21 pode funcionar como indicadora de mau prognóstico. O estudo demonstrou interações da TC21 com as proteínas Erk2, PI3K, 14-3-3 zeta e 14-3-3 sigma em células de cancro oral.¹⁰⁵

A 14-3-3s (*standard*) é conhecida como proteína transferidora citoplasma-núcleo sob diferentes condições fisiológicas. Neste contexto, foi demonstrado que a 14-3-3θ é essencial para a acumulação nuclear da telomerase em células HeLa. Utilizando células de cancro oral, foi demonstrada interação das isoformas 14-3-3ζ e 14-3-3σ com a proteína TC21. Estas interações podem resultar na acumulação nuclear desta proteína em tecido maligno.¹⁰⁵

Sumário e significado clínico: segundo os autores citados, este foi o primeiro estudo a demonstrar a localização nuclear da proteína TC21 na leucoplasia e OSCC. Aparentemente, a sobreexpressão da TC21 é um evento precoce e está associada a mau prognóstico do OSCC. Desconhece-se no entanto, a possibilidade de papel bifásico desta proteína na progressão da oncogénese oral, bem como a natureza das possíveis interações com diferentes proteínas e respetivas vias de sinalização. A evidência é muito limitada, não havendo possibilidade de aplicação clínica, apesar dos resultados promissores, particularmente na aferição do valor preditivo positivo da leucoplasia oral.

5.12. Adesão celular

5.12.1. CD44

As CD44 são glicoproteínas transmembranares de superfície e adesão celular e pertencem a uma subfamília CAM, as hialaderinas. A isoforma CD44s (*standard*) é a variante mais pequena e abundante desta família de proteínas polimórficas e monogénica (11p13). A CD44 encontra-se expressa em linfócitos e numa grande variedade de tecidos epiteliais. Funcionalmente a CD44 está envolvida na integridade orgânica por transdução de sinais da matriz extracelular, sendo co-recetora de numerosas proteínas transmembranares como as metaloproteinases de matriz, membros da família ERB de recetores tirosino-cinases e de antigénios associados a tumores EpCAM (CD326, ESA1). Após investigação, confirma-se a sobreexpressão das isoformas CD44 em vários tipos de cancro (exceção aparente do HNSCC e neuroblastoma). A CD44v5 tem sido encontrada sobreexpressa no carcinoma colorretal, gástrico e mamário, enquanto se encontra subregulado nos carcinomas endometriais. A evidência disponível de PMDs na bexiga e adenomas do cólon, assim como de cancros precoces, indica que a expressão desregulada deste gene inicia-se quando o neoplasma está em formação e aumenta com o desenvolvimento, invasão e metastização do tumor. De forma semelhante, a perda da expressão da CD44 em epitélio benigno pode ser encarado como

fenômeno precoce da oncogênese na língua. Parece existir um papel específico para cada variante da CD44 no desenvolvimento e metastização da doença maligna.⁹⁸

Os resultados do estudo de Piffko *et al.*¹⁷⁷ sugerem que a expressão da CD44v5 e v6 não se encontra alterada em diferentes tecidos benignos e malignos orais (OSCC) com e sem metastização, pelo que parecem ser fatores irrelevantes na previsão do prognóstico deste tipo de cancro. Resultados de outros estudos sugerem que a expressão das mesmas isoformas não se encontra alterada durante o desenvolvimento e progressão de carcinomas orais. Herold-Mende¹⁷⁸ analisou a imunexpressão da CD44s e de outras isoformas em epitélio normal e displásico, assim como em SCC primário e metastático, tendo observado padrões semelhantes de expressão para a CD44v5 e v6. Porém, Spafford *et al.*¹⁷⁹ observaram correlação entre a subexpressão da CD44s e a diminuição da sobrevivência e aumento da metastização do SCC laríngeo.

As alterações na expressão da CD44v6 têm sido correlacionadas com pior prognóstico de diferentes doenças malignas humanas. A expressão elevada da CD44v6 tem sido observada em epitélio coloretal benigno e maligno, tumores cerebrais primários, linfomas cutâneos e certos tipos de adenocarcinomas gástricos. Pelo contrário, outros trabalhos têm no entanto reportado, que o epitélio CD44v6 positivo apresenta uma tendência para a subregulação durante a progressão tumoral e disseminação metastática.⁹⁸ Esta tendência tem sido reportada em vários tumores humanos que derivam do epitélio da pele, endométrio, urotélio, mucosa laríngea e oral. Salmi *et al.*¹⁸⁰ demonstraram que existe diminuição da expressão da variante v6 em SCC, sendo maior a perda em regiões menos diferenciadas, i.e., mais agressivas. Bahar *et al.*¹⁸¹ estudaram e compararam a expressão da proteína CD44v6 em lesões epiteliais orais benignas, potencialmente malignas e malignas (SCC) com o padrão apresentado pela mucosa normal, tendo observado uma subregulação clara em OPMDs severas e na maioria dos SCCs. Também Sneath e Mangham¹⁸² revelaram a subregulação da expressão da CD44v6 em displasia, comparando-a com lesões epiteliais benignas e tecido normal. Por outro lado, Rautava¹⁸³ não encontrou correlação estatisticamente significativa entre a expressão da CD44v6 e displasia, mas os resultados refletiram a maturação epitelial desorganizada em displasias e carcinomas.

Godge e Poonja⁹⁸ conduziram um estudo prospetivo, através da análise semiquantitativa da expressão IHC (% de células positivas e intensidade) da CD44s e isoformas CD44v5 e CD44v6, tendo por objetivo avaliar a eficácia destes marcadores

moleculares na detecção de leucoplasias de elevado risco. Foram incluídos após diagnóstico clínico e histológico, 40 casos de leucoplasia oral (8 hiperqueratose sem displasia, 13 displasia ligeira, 10 displasia moderada e 9 displasia severa) e 10 casos de mucosa normal. Nos espécimes de epitélio normal a CD44s, v5 e v6 estavam expressas como proteínas de superfície membranar de células epiteliais. A camada basal e espinhosa expressou forte marcação positiva para CD44s, v5 e v6 que se foi tornando negativa na camada epitelial mais superficial (córnea). Os valores médios da CD44s e v5 dos casos normais foram comparáveis aos casos de estudo, não sendo significativamente estatística a diferença ($p > 0,05$). Houve no entanto, uma diminuição estatisticamente significativa ($p < 0,05$) da expressão da CD44v6 com o aumento da severidade displásica quando comparado com mucosa normal, nos 3 estratos epiteliais considerados (basal, espinhoso e córnea). No entanto, nos casos de displasia ligeira a diminuição da intensidade de marcação não foi significativa face aos controlos normais. Além disso células claramente pleomórficas demonstraram subregulação com tendência a expressão negativa, enquanto as células normais ou não pleomórficas expressaram a CD44v6 na mesma secção da amostra.⁹⁸

A correlação entre a severidade de displasia e a subregulação da CD44v6, poderá refletir as alterações precoces das interações intercelulares e entre células e matriz extracelular, predispondo-as à invasão quando realmente se tornam malignas. Assim, estes resultados sugerem que a perda de CD44v6 pode facilitar a perda da coesão intercelular, libertação da membrana basal e subsequente invasão do tecido subjacente.⁹⁸

Sumário e significado clínico: entre a CD44s e as suas isoformas v5 e v6, a v6 é a única que aparentemente poderá servir como marcador na detecção de leucoplasias de elevado risco. A diferença de resultados pode dever-se à aplicação de diferentes técnicas para visualizar a molécula CD44, além dos diferentes sistemas de classificação de displasia utilizados. Não é clara a associação entre a sub- ou sobreexpressão de cada uma das isoformas da CD44 e a progressão histológica. São necessários estudos prospetivos com amostras representativas para validar os dados promissores da CD44v6.

5.12.2. CD133

O CD133/*prominin-1*/antigénio AC133 foi inicialmente descrito como um marcador da superfície celular em células estaminais hematopoiéticas e células progenitoras da medula óssea. Os trabalhos têm demonstrado que o CD133 tem sido usado como marcador de células

estaminais malignas de câncros sólidos primários do pulmão e cabeça e pescoço. Além disso, a imunoposição do CD133 tem sido demonstrada como marcador preditivo de sobrevivência em casos de OSCC.⁴

A ALDH1 é uma isoforma da desidrogenase aldeído (ALDH) humana, responsável pela destoxificação citoplasmática de aldeídos intracelulares e pela oxidação do retinol em ácido retinóico, na diferenciação precoce de células estaminais. Estudos recentes têm demonstrado que a ALDH1 é um marcador específico para a identificação de HNSCCs, desempenhando um papel crucial na manutenção de propriedades de auto-renovação e tumorigênese. Além disso, a imunoposição da ALDH1 tem sido indicada como valor preditivo na sobrevivência a HNSCC.⁴ Visus *et al.*¹⁸⁴ observaram a sobreexpressão da ALDH1 em amostras de HNSCC e displasia oral, e sugeriram-na como marcador diferencial entre células malignas e potencialmente malignas. É também considerado um epítipo essencial para o desenvolvimento de vacinas terapêuticas para o HNSCC.⁴

Recentemente, Ma *et al.*¹⁸⁵ demonstraram que a coexpressão de ALDH1 e CD133 pode caracterizar a tumorigenicidade de subpopulações específicas do SCC hepático. Jiang *et al.*¹⁸⁶ observaram a coexpressão das proteínas ALDH1 e CD133 no SCC pulmonar.

Liu *et al.*⁴ analisaram a expressão IHC de marcadores de células estaminais malignas – ALDH1 e CD133 – em 141 pacientes com leucoplasia oral (confirmada por histopatologia) e determinaram os seus valores no prognóstico de malignização, sob um período de *follow-up* médio de 5,5 anos. A expressão da ALDH1 e CD133 foi observada em 54 (38,3%) e 32 (22,7%) dos 141 pacientes com leucoplasia oral, respetivamente. Foi observada uma correlação significativa entre a expressão da ALDH1 e CD133 na leucoplasia ($p=0,001$). Por análise Kaplan-Meier demonstrou-se que 41% dos pacientes com leucoplasias ALDH1 positivas desenvolveram cancro oral, comparando com 12,6% dos casos negativos para ALDH1 ($p<0,001$). Entretanto, 59,4% dos pacientes com leucoplasias CD133 positivas malignizaram, comparativamente com os 16,5% nos casos CD133 negativos ($p<0,001$). A análise multivariável revelou que a expressão de ALDH1 e CD133 na leucoplasia oral estava associada a um risco de malignização aumentado de 4,17 (95% CI, 1,96-8,90; $p<0,001$) e 2,86 (95% CI, 1,48-5,55; $p=0,002$), respetivamente. Segundo este estudo, os valores de prognóstico de ambos os marcadores foram superiores ao estadiamento histológico, estando associados a um risco aumentado de 2,36 vezes ($p<0,01$). Neste estudo de coorte com *follow-up*, 26,2% dos pacientes com leucoplasia oral desenvolveram OSCC. Mais uma vez, não

foram observadas diferenças entre os tratamentos administrados aos pacientes com leucoplasia oral ($p < 0,05$).⁴

Sumário e significado clínico: este estudo demonstrou pela primeira vez que a coexpressão de ALDH1 e CD133 correlaciona-se com a transformação maligna, numa série de casos de pacientes com leucoplasia oral sobre *follow-up* a longo prazo, o que sugere que podem servir como valores preditivos para identificar as leucoplasias orais com maior risco de malignização. Existe no entanto evidência muito limitada quanto à utilidade destes marcadores no contexto do OSCC.

5.13. Marcadores de diferenciação

5.13.1. Carboidratos da superfície celular

Os carboidratos da superfície celular estão copiosamente distribuídos nos tecidos humanos. O termo *histo-blood group antigens* tem sido sugerido para antígenos de grupo sanguíneo localizados nas células além dos eritrócitos. Estes antígenos dos sistemas ABH, Lewis e T/Tn são identificados na superfície de células epiteliais do epitélio escamoso oral. Durante a diferenciação celular do epitélio escamoso estratificado, existe um alongamento sequencial dos carboidratos precursores dos *histo-blood antigens* por ação das glicosiltransferases.³³ Durante o desenvolvimento de lesões malignas, a síntese destes antígenos é desregulada, possivelmente por perda alélica destas enzimas ou silenciamento pós-transcricional.³³

Há 40 anos atrás, Dabelsteen e Pindborg (1973) demonstraram pela primeira vez que o *histo-blood group antigen A* estava perdido em OPMDs que desenvolviam carcinomas orais. Além disso, nas displasias epiteliais orais havia a perda da expressão normal dos *histo-blood group antigens* (A ou B) na camada espinhosa, e um número aumentado de camadas epiteliais marcadas para a molécula precursora (antígeno H), que normalmente expressa apenas nas células parabasais. No epitélio normal, o *histo-blood group antigen Le^y* está presente nas células parabasais, enquanto nas displasias epiteliais a expressão deste antígeno é observada na camada espinhosa, possivelmente refletindo a perda da diferenciação epitelial normal. Um padrão semelhante da expressão de *simple mucin type carbohydrate antigens* (T/Tn) tem sido reportado nas leucoplasias e eritroplasias orais. Alguns destes padrões aberrantes têm sido igualmente observados em OPMDs sem displasia epitelial, sugerindo que

as alterações do *histo-blood group antigen* ocorram precocemente no desenvolvimento de lesões malignas. Alterações dos *histo-blood group antigens* semelhantes às que ocorrem na DEO têm sido demonstradas no desenvolvimento de cancro da bexiga.³³

No carcinoma do cérvix uterino, cabeça e pescoço e oral, a expressão dos *histo-blood group antigens* tem sido relacionada com o prognóstico. Vários estudos demonstraram que a perda de expressão do *histo-blood group antigen A/B* se associa a maior mobilidade de células tumorais, invasão e oncogénese em modelos animais. Algumas das alterações observadas nas OPMDs e lesões malignas são também observadas em circunstâncias não neoplásicas como é o caso da cicatrização. Assim, o valor preditivo da expressão de *histo-blood group antigen* nas OPMDs é ainda desconhecido. O valor dos *histo-blood group antigens* como marcadores do desenvolvimento maligno das OPMDs carece de estudos de *follow-up* bem desenhados.³³

5.13.2. Queratina 5

As queratinas/citoqueratinas (K/CK) são proteínas filamentosas intermédias que constituem especificamente o citoesqueleto das células epiteliais. São conhecidas cerca de 20 queratinas, numeradas de 1-20, estando organizadas em pares de membros das duas subfamílias existentes. Cada tecido humano expressa 2-4 destes pares, sendo que a expressão básica do epitélio oral é representada pelo par K5/14 na camada basal, ainda que esteja dependente do estado de diferenciação e queratinização. A mucosa jugal não queratinizada expressa os pares K4/13 (camada espinhosa) e K5/14, enquanto a gengiva queratinizada expressa o par K1/10 (camada espinhosa) e K5/15. Os estudos demonstram que a expressão das queratinas se encontra alterada em diversos quadros patológicos como a psoríase, gengivite, hiperqueratose, leucoplasia, fibrose submucosa e cancro oral. No entanto, durante o desenvolvimento maligno, ocorrem alterações no tipo e distribuição destas proteínas. Os trabalhos têm enunciado 2 tipos de alterações: 1) ausência de expressão das K básicas, e.g. a perda de expressão da CK5 13 e 14 tem sido consistente em OPMDs e no OSCC; e 2) expressão aberrante de algumas K (e.g. 1, 8, 18 e 19 associados a leucoplasia e OSCC) que normalmente não são identificadas em tecido normal saudável.^{33, 73} Globalmente, a distribuição do mRNA das K envolve maior número de células epiteliais do que as proteínas correspondentes, indicando que estes genes estão sob controlo pós-transcricional.³³

As queratinas K4/K5 normalmente expressas na camada basal estão igualmente presentes na camada parabasal e espinhosa do epitélio displásico, possivelmente por hiperplasia basal frequente nas displasias. Além disso os pares K1/K10 e K4/K13 estão subexpressos ou ausentes em epitélio displásico, possivelmente com relação entre o padrão de expressão e a severidade histológica.³³

No epitélio oral normal, as queratinas 8 e 18 são geralmente indetetáveis por IHC, ainda que os respectivos mRNAs estejam presentes na camada basal e espinhosa inferior. Contudo, nas displasias epiteliais orais, estas queratinas foram detetadas por IHC em mais de metade dos casos. Não se sabe se a expressão destas proteínas se deve à reversão do bloqueio pós-transcricional ou à supressão da sua degradação rápida. Outra queratina associada a epitélio normal, a K19, foi identificada na camada basal de epitélio oral sem camada córnea e ausente nas amostras com camada córnea. Na displasia moderada a severa e CIS foi identificada marcação forte da K19 nas camadas basal e suprabasal. Foram obtidos resultados semelhantes a partir de um outro estudo, embora a marcação da K19 fosse mais heterogénea entre e as próprias amostras. No entanto, o epitélio gengival inflamado também exibiu marcação difusa da K19. Assim, é difícil avaliar o significado da K19 na displasia epitelial.³³

A subregulação da K5 tem sido observada no cancro da mama e a sua perda associada a carcinoma de células renais e oncogénese oral precoce mediada pelo tabaco.⁷³ Sawant *et al.*⁷³ tentaram determinar se a perda de expressão da K5 se deve a bloqueio transcricional ou translacional, para avaliar o potencial de diagnóstico precoce de cancro oral induzido pelo tabaco. A amostra, constituída por 36 OPMDs (24 leucoplasias, 8 fibroses submucosas e 4 lesões com apresentação mista de leucoplasia e fibrose submucosa), 29 SCCs da mucosa jugal, 10 controlos saudáveis (contralaterais de 10/29 SCCs) e 10 controlos negativos (linfócitos), foi examinada por RT-PCR e confirmada por sequenciamento do cDNA, sendo observada perda da K5 em 11/36 OPMDs e 13/29 SCCs. A subexpressão do mRNA foi observada em algumas amostras, nomeadamente OPMDs da mucosa jugal. A ausência de expressão do mRNA da CK5 foi identificada em 30,6% das OPMDs e 44,83% dos SCCs. Não houve no entanto associação destas alterações com o grau de displasia. Os autores concluíram que a perda de expressão da K5 ocorreu por bloqueio transcricional e propuseram a proteína como marcador de diagnóstico precoce para o cancro oral relacionado com o consumo de tabaco.⁷³

Sumário e significado clínico: os linfócitos são utilizados como controlos negativos para a CK5, pelo que existe menor probabilidade de confundimento na identificação e interpretação dos resultados na presença de tecido linfocitário inflamatório, comum nas OPMDs e OSCC: Apesar dos resultados promissores da K5 como marcador precoce da presença de lesões malignas, os resultados sofrem de variações entre estudos, provavelmente pelos diferentes métodos de deteção utilizados e inclusão de amostras heterogéneas e pouco representativas. É necessário uniformizar metodologias para permitir a reprodutibilidade dos estudos e comparação dos resultados, com a inclusão de amostras representativas de OPMDs e cancro oral induzidos pelo tabaco.

5.13.3. Queratina 4 e 13

As proteínas estruturais de queratinócitos diferenciados que compõem o envelope cornificado, como a cornulina, também têm sido associadas à progressão maligna de tumores epiteliais da cavidade oral. A subexpressão significativa da cornulina, K4 e K13 prevê com eficácia a malignização de OPMDs de elevado risco, assim como o prognóstico e recidiva de lesões malignas.⁹²

Schaaij-Visser *et al.*⁹² analisaram a expressão IHC semiquantitativa destas 3 proteínas em 48 biópsias de pacientes com leucoplasia oral (28 não displásicas; 20 displásicas: ligeira 7, moderada 7 e severa 6), incluindo controlos positivos (tecido normal) e negativos (tecido tumoral). As leucoplasias apresentaram subexpressão das 3 proteínas, sendo que a K4 não foi detetada em 42 dos 48 espécimes. Das 48 lesões leucoplásicas, 12 progrediram para cancro, num tempo de *follow-up* médio de 69 meses. Ao contrário de outros estudos, não foi encontrada associação significativa entre a expressão aleatória ou combinada da cornulina, K4/K13 e a progressão maligna. No entanto, foi observada correlação significativa entre a presença de hiperqueratose e a subexpressão de cornulina ($p=0,01$) e de K13 ($p=0,002$). Todavia, a presença e severidade de displasia epitelial estiveram significativamente associadas à transformação maligna das leucoplasias ($p=0,024$ e $p=0,029$, respetivamente). Os autores concluíram que as alterações na expressão destas proteínas resultam sobretudo da heterogeneidade da diferenciação tecidular aberrante das lesões leucoplásicas (com e sem hiperqueratose), o que dificulta a relação entre a subexpressão destes marcadores e a progressão maligna. Apesar da inexistência de correlação com a progressão maligna, a cornulina apresenta uma tendência positiva para essa associação.⁹²

Sumário e significado clínico: os marcadores de diferenciação não parecem ter importância significativa na previsão malignização através de estudos IHC. São necessários de coorte mais alargados, que confirmem ou neguem a tendência de valor preditivo da cornulina para a transformação maligna.

5.13.4. Queratina 8

A identificação de antígenos mediada por autoanticorpos (AMIDA) tem sido desenvolvida para isolar e identificar antígenos associados a tumores. A análise de diferentes tecidos e linhagens celulares malignas permite a identificação de um *set* de proteínas com potencial imunogénico, incluindo as queratinas (6d, 8, 9 mutante e 16), moléculas sinalizadores (Grb2, ZNF-70), *chaperones* (Grp78, Hsp27 e Hsc70), proteínas associadas ao metabolismo (E-FABP, *cytidine deaminase*, e eIF3S2) e proteínas nucleares (hnRNP H, PSP-1). A validação experimental subsequente tem demonstrado que os pacientes oncológicos apresentam imunomarcção significativamente aumentada para a K8, E-FABP e Grp78. Além disso, notou-se a presença da CK8 na superfície celular externa das células tumorais, enquanto estava ausente no tecido saudável à exceção dos hepatócitos. As ferramentas bioquímicas têm demonstrado a capacidade desta K se associar a sistemas enzimáticos que conduzem à ativação de plasmina. Assim, diferentes linhas de evidência sugerem a CK8 como um possível antígeno associado a tecido tumoral. Além dos carcinomas da cabeça e pescoço, a CK8 encontra-se sobreexpressa noutras doenças malignas, como os carcinomas sinonasais indiferenciados, gástricos, esofágicos, entre outros.⁸⁰

Com base neste conhecimento, Gires *et al.*⁸⁰ compararam a especificidade e sensibilidade do antígeno K8 identificado por tecnologia AMIDA, com a reatividade de marcadores já estabelecidos para o carcinoma, i.e., panK, K13 e Ki67. Diferentes secções de tecido da mucosa oral normal (n=9), leucoplasia oral (n=10) e 26 HNSCCs (2 com metastização das cadeias linfáticas) foram marcados, com anticorpos específicos para os antígenos selecionados. Na mucosa saudável, a K8 apenas se expressou em células da membrana basal, ao contrário das panK (K1, 2, 5, 6, 7, 8, 11, 14, 16, 17 e 18) e K13, que estiveram presentes com altos níveis de expressão ao longo de todo o epitélio saudável. Pelo contrário, a maioria dos HNSCCs e metástases expressaram de forma marcada a K8. Notavelmente, a K8 apresentou-se com imunomarcção notória em áreas de carcinoma, sem se manifestar no estroma adjacente ou células imunitárias (e.g. linfócitos), ao contrário do Ki67. A expressão da K8 permitiu distinguir tecido displásico, CIS e leucoplasia

assintomática ou hiperplásica. A expressão da K8 correlacionou-se com áreas displásicas de leucoplasia oral, enquanto a leucoplasia hiperplásica permaneceu K8-negativa, mas notoriamente positiva para as panK e K13. Além disso, a K13 não se expressou de forma homogênea ao longo de leucoplasias displásicas e massas tumorais, o que pode resultar neste caso da indiferenciação de células tumorais e perda concomitante desta K. Apesar da forte correlação entre a K8 e Ki67, a K8 apresentou-se mais fiável para deteção de células malignas, margens tumorais, com maior diferença para as células malignas metastizadas, incluindo células disseminadas. Ao contrário do Ki67, a expressão da CK8 estende ao longo de toda a lesão displásica. Assim, a CK8 parece ter grande potencial para o diagnóstico diferencial e poderá ajudar a melhorar a identificação precoce e o estadiamento de OPMDs, recidiva e células tumorais residuais.⁸⁰

Sumário e significado clínico: a K8 apresenta elevada especificidade e sensibilidade para tecido em transformação, i.e., células malignas de carcinoma, metástases, mas também displasia e leucoplasia oral. A exceção desta norma foi detetada em células epiteliais saudáveis da laringe. Tal como a K5, não foi detetada em tecido aparentemente linfocitário. Apresenta grande potencial no diagnóstico diferencial de lesões malignas, metástases, recidiva e células tumorais residuais, displasia e leucoplasia, com maior especificidade do que as panK (e.g. K5) e K13. Porém, são necessários estudos com amostras mais representativas da população, diferentes subtipos de lesões leucoplásicas com e sem displasia, lesões inflamatórias e malignas, que possam validar estes resultados promissores, bem como aferir o seu potencial preditivo na doença maligna.

A perda de diferenciação relacionada com as queratinas nas lesões displásicas poderá ser um marcador promissor da displasia e desenvolvimento maligno. São necessários estudos com amostras representativas e período de *follow-up* alargado, que permitam relacionar a expressão das queratinas ao processo reativo/inflamatório e oncogénico a longo prazo.³³

5.14. Ribonucleoproteína heterogénea K

A ribonucleoproteína heterogénea K (hRNP K) pertence à família de proteínas ligantes do RNA e tem diversas funções como a regulação da cromatina, transcrição, mRNA e translação proteica, com possível papel na tumorigénese. Liga-se especificamente ao DNA da região promotora do proto-oncogene *c-myc*, aumentando a sua transcrição e promovendo a proliferação, sobrevivência e migração celular. Em resposta ao dano genético, a p53 e a

hnRNP K são simultaneamente recrutadas para promotores de genes reguladores dos *checkpoints* do ciclo celular. A expressão desta proteína ligante está aumentada em várias doenças oncológicas, incluindo a leucemia mieloide crônica e alguns tumores sólidos como o cancro do esófago, pulmão, nasofaringe e coloretal. Está envolvida na invasão, disseminação e migração tumoral, tornando-a um potencial alvo na terapêutica de metástases. O envolvimento da hnRNP K na oncogénese reflete-se também na regulação por fatores de crescimento. Apesar de amplamente estudada para diferentes cancros, o contributo da hnRNP K nas OPMDs permanece por explorar.⁸

Matta *et al.*⁸ investigaram a importância clínica da hnRNP K na identificação precoce da leucoplasia oral e no prognóstico de OSCCs, através de análise IHC de 100 OSCCs (sujeitos a cirurgia curativa e/ou radioterapia), 199 leucoplasias (115 sem displasia, 84 displásicas: ligeira 68, moderada 12 e severa 4), 55 tecidos não malignos (30 de locais distantes de OSCC e 25 de pacientes saudáveis), controlos positivos e negativos, acompanhados por um período médio de *follow-up* igual a 24 meses. A expressão da hnRNP K aumentou dos tecidos normais para leucoplasia e lesão maligna ($p < 0,01$). A hnRNP K citoplasmática aumentou significativamente da leucoplasia para OSCC ($p < 0,01$) e esteve associada a pior prognóstico dos OSCCs ($p = 0,011$), sendo marcador independente nos pacientes com recidiva de HNO SCC. Pela primeira vez, estes autores demonstraram o sobreexpressão IHC da hnRNP K na leucoplasia oral. A expressão nuclear aumentada desta proteína ligante de RNA, em lesões leucoplásicas sem displasia, aponta para uma alteração precoce no desenvolvimento de OPMDs e está de acordo com o seu papel regulador nos processos de transcrição, promoção dos genes *myc* e *src* e na proliferação celular. No citoplasma, a hnRNP K funciona como reguladora translacional de mRNAs específicos, incluindo mRNA *c-myc*, renina e HPV16 L2 *capsid protein*.⁸

Sumário e significado clínico: a expressão da hnRNP K é precoce nas OPMDs, sendo a sua translocação núcleo-citoplasma um potencial contributo para a transformação maligna. Pelos resultados promissores aqui apresentados, a hnRNP K deve ser avaliada para a leucoplasia oral como marcador de possível malignização.

5.15. Marcadores inflamatórios

5.15.1. Interleucina-6

Os níveis salivares de determinadas citocinas inflamatórias (e.g. IL-6 e IL-8) apresentam-se consistentemente aumentados em câncros da cabeça e pescoço com envolvimento avançado das cadeias linfáticas, tendo sido a IL-6 nestes casos demonstrada como importante biomarcador sérico da capacidade de sobrevivência e resposta a terapêuticas. A IL-6 é uma citocina multifuncional ativadora de recetores tirosino-cinases da família JAK, múltiplas vias de sinalização (MAPKs, PI3Ks, STATs) e outras proteínas identificadas na cascata oncogénica do OSCC e OPMD.¹⁰¹

A expressão da IL-6 parece ser induzida pelo fator de transcrição NF- κ B sob ambientes de hipóxia, correlacionados com o crescimento tumoral agressivo e pior prognóstico. Este efeito negativo da hipóxia tem sido atribuído a um aumento dos níveis do factor-1 α . Este fator é mediado através de um elemento que surge na via iniciada pela IL-6, a STAT3. A STAT3 regula a progressão do ciclo celular de G1 para S assim como a prevenção da apoptose. Assim o eixo IL-6/gp130/STAT3 tem sido investigado como via fundamental para a transformação maligna.¹⁰¹

A mudança da secreção parácrina para autócrina da IL-6 tem sido sugerida como um fator chave na progressão de hiperplasia benigna para lesão maligna. Possivelmente, os níveis aumentados da IL-6, produzida por estimulação autócrina, são capazes de inibir a p53 por hipermetilação do seu promotor em lesões leucoplásicas orais.^{81, 101} Tem sido reportado que a p53 selvagem e a pRb inibem o promotor do gene IL-6. A regulação recíproca também acontece, havendo por isso diferentes resultados de supressão e estímulo da proliferação de queratinócitos.¹⁰¹

Sharma *et al.*¹⁰¹ investigaram a existência de correlação entre os níveis salivares de IL-6 e a severidade de displasia. Os níveis da IL-6 foram avaliados por ELISA em 3 grupos: 1) 20 pacientes com leucoplasia (displasia confirmada por histopatologia) e periodontite; 2) 20 pacientes com periodontite sem leucoplasia e 3) 20 controlos saudáveis. Observou-se elevação estatisticamente significativa da IL-6 nos pacientes com leucoplasia e periodontite ou periodontite apenas quando comparados com controlos saudáveis ($p < 0,001$). Na leucoplasia, os níveis da IL-6 aumentaram de acordo com a severidade displásica. O consumo

de tabaco foi considerado um fator predisponente ao aumento da IL-6 salivar. Ao contrário de estudos anteriores, todos os pacientes com leucoplasia apresentavam periodontite, o que pode ter contribuído para valores aumentados da IL-6 face às leucoplasias sem periodontite estudadas nos mesmos módulos. O grande número de bactérias gram-negativas periodontopatogénicas presentes na placa subgingival parece ser a causa mais óbvia para este aumento, através da ativação da via de sinalização pelo NF- κ B.^{81, 101} A doença periodontal tem sido investigada como potencial contributo para a aceleração da carcinogénese. Estes estudos sugerem que a periodontite crónica é um fator de risco independente para o OOSCC e que o tabaco atua nesta associação de forma sinérgica.¹⁰¹

Tal como para a interleucina-6, têm sido reportados níveis aumentados do fator de necrose tumoral alfa (TNF- α) em pacientes com cancro e OPMDs (e.g. líquen plano e fibrose submucosa oral), sendo-lhes atribuídas funções de supressão tumoral.⁸¹

Brailo *et al.*⁸¹ compararam por ELISA níveis salivares da IL-6 e TNF- α entre 30 pacientes sem periodontite e leucoplasia não displásica (confirmada por histopatologia) e 34 controlos. Foram observados níveis salivares significativamente superiores para a IL-6 e TNF- α em pacientes com leucoplasia oral quando comparados com controlos saudáveis ($p < 0,05$). Os níveis das duas citocinas pleiotrópicas não se correlacionaram com o tamanho da leucoplasia nem com a sua localização ($p > 0,05$). Neste estudo, os níveis da IL-6 e TNF- α não foram influenciados por hábitos tabágicos, uma vez que não foram observadas diferenças significativas nas concentrações salivares de IL-6 e TNF- α entre fumadores e não fumadores, no grupo de pacientes com leucoplasia oral ($p = 0,243$; $p = 0,229$) ou no grupo controlo ($p = 0,051$; $p = 0,845$). Os autores concluíram que os níveis salivares aumentados destas duas citocinas podem desempenhar um papel na progressão da leucoplasia oral.⁸¹

Sumário e significado clínico: os estudos sugerem que a presença de leucoplasia e periodontite contribuem para níveis elevados de IL-6, atribuindo-lhe potencial marcador na malignização de OPMDs. No entanto a evidência é muito limitada, nomeadamente para os efeitos tabágicos na concentração local e sistémica da IL-6. No que diz respeito ao TNF- α a evidência define-o como potencial interveniente na progressão da leucoplasia oral. A associação entre a expressão da IL-6/TNF- α e leucoplasias com tamanho e localização de risco acrescentado não é clara. Normalmente a literatura constrói-se sobre populações pouco representativas, as quais correspondem a critérios de exclusão muito restritos. São necessários

ensaios multicêntricos que estabeleçam a relação entre a interleucina-6 e a fisiopatologia das OPMDs associadas ao tabaco.

5.15.2. COX-2

A COX-2 é uma isoforma indutível da ciclooxigenase, sendo indetetável na maioria dos tecidos normais e rapidamente induzida na resposta a estímulos inflamatórios ou mitogênicos, incluindo citocinas, fatores de crescimento e promotores tumorais. A expressão da COX-2 está presente em vários neoplasmas coloretais, pulmonares, gástricos, pancreáticos, mamários, urinários, esofágicos e da bexiga. Existem vários mecanismos que conduzem à sobreexpressão da COX-2, como a regulação transcricional e pós-translacional, ou regulação do rácio síntese vs. degradação enzimática.⁹⁴ Atua em diferentes processos oncogênicos como a apoptose, angiogénese e invasão tecidular, ainda que a importância relativa de cada um dos efeitos seja desconhecida. A sobreexpressão da COX-2 parece estar relacionada com a aneuploidia do DNA, nomeadamente em OPMDs.⁹⁴

A sobreexpressão do mRNA da COX-2 tem sido reportada no cancro oral.¹⁸⁷ A COX-2 tende a estar aumentada nas OPMDs de risco elevado, pressupondo o desenvolvimento de inibidores seletivos da COX-2 (COXibs) como agentes quimiopreventivos, apesar dos resultados contraditórios em pacientes com OPMDs de alto risco.^{17, 42} Os inibidores seletivos da COX-2 induzem a paragem do ciclo celular em G0/G1 e da apoptose. Estão em curso ensaios quimiopreventivos com COXibs em pacientes com leucoplasia oral e esófago de Barret.⁹⁴

A contribuição da sobreexpressão desta ciclooxigenase na tumorigénese está possivelmente relacionada com o aumento da produção de metabolitos mutagénicos (malonaldeído) que podem ser produzidos por isomerização enzimática da PGH₂. À semelhança de outras doenças malignas, o tecido carcinomatoso da cabeça e pescoço produz mais PGs do que os tecidos normais onde estes se formam, sendo capazes de mediar a proliferação, angiogénese, resposta imunológica e apoptose. A síntese aumentada destas citocinas pode ser consequência da sobreexpressão da COX-2. Outros carcinogénicos podem ser formados por oxidação de amins e derivados de PAHs. Desta forma, a sobreexpressão da COX-2 pode contribuir para dano genético com potencial oncogénico. Por outro lado tem-se prestado atenção ao papel da COX-2 na inibição da apoptose e promoção da angiogénese, através da produção de fatores pró-angiogénicos, incluindo VEGF, TGF-1, PDGF e

endotelina-1. A COX-2 também é regulada por vários oncogenes, incluindo v-src, v-Ha-ras, HER-2/neu e genes Wnt. A COX-2 regula indiretamente as interações entre a sinalização Wnt e o fator reparador do DNA Ku. Trabalhos recentes têm estudado a possível indução da COX-2 por ativação do EGFR. Por outro lado, as prostaglandinas sintetizadas pela COX-2 podem induzir ativação do EGFR. Os dois inibem a apoptose e induzem a angiogénese. Além disso, a interação entre as duas vias pode ter um papel sinérgico no processo oncogénico. No presente estudo observou-se ligeira diminuição da expressão do EGFR na leucoplasia oral, i.e., o mesmo recetor encontrava-se sobreexpresso na mucosa contralateral aparentemente normal quando comparada com a leucoplasia oral e mucosa normal de indivíduos saudáveis (superior a 12 vezes), indicando a possível indução da cancerização de campo. Estes resultados estão de acordo com publicações anteriores, que dão conta da sobreexpressão do EGFR e dos seus ligandos. TGF- α ou EGF, em epitélio normal adjacente a cancro invasivo, comparativamente com controlos normais de pacientes saudáveis. Assim, várias linhas de investigação demonstram que a COX-2 tem um papel significativo na oncogénese oral, estando sobreexpressa em desordens potencialmente malignas ou malignas, respetivamente a leucoplasia oral e o HNSCC.⁹⁴

Num estudo caso-controlo, Prado *et al.*⁹⁴ estudaram por Q-PCR a expressão da COX-2, EGFR e p53 em 24 biópsias de leucoplasia oral não displásica (sem componente inflamatória; confirmadas por histologia) e mucosa contralateral aparentemente normal, tendo como termo de comparação uma amostra de mucosa oral de doadores aparentemente saudáveis (n=19). Foi observada sobrerregulação da COX-2 em 79,2% das leucoplasias, enquanto o EGFR e p53 encontravam-se sobreexpressos na mucosa contralateral aparentemente normal (60% e 46% respetivamente) ($p < 0,05$). A expressão da p53 esteve correlacionada a hábitos tabágicos e o coeficiente de correlação de Spearman demonstrou a correlação linear positiva entre os níveis de expressão da p53 e mRNA EGFR.⁹⁴

Sumário e significado clínico: além de componente inflamatório, a sobreexpressão COX-2 é indicada como biomarcador para a leucoplasia oral. Além disso, os autores indicam novamente a p53 como um alvo dos carcinogénicos relacionados com o tabaco e a coexpressão da p53 e EGFR como mediadora na oncogénese das OPMDs. São necessários estudos mais detalhados que expliquem a associação do EGFR à p53 e COX-2.

5.15.3. CXCR7/ligandos

As quimiocinas são um grupo de pequenas citocinas quimiotáticas que se ligam a receptores transmembranares específicos, acoplados a proteínas G, sendo mais conhecidas por amplificarem a resposta inflamatória e mediar a migração leucocitária. Têm sido sugeridas na iniciação e progressão de cânceros do pulmão, cólon, fígado, mama, cérvix, próstata, bexiga, ovário, esôfago, pele e sistema linfático. Além do processo inflamatório, a ligação das quimiocinas aos seus receptores (e.g. CXCR7) inicia a ativação de várias redes de sinalização, que regulam a proliferação, apoptose, adesão, migração celular e invasão tecidual. Os estudos revelam que as células epiteliais malignas produzem níveis aumentados de quimiocinas e dos seus receptores, comparativamente com células epiteliais normais, por forma a estabelecer um microambiente favorável à evolução do tumor, facilitando a angiogénese, crescimento tumoral e metastização.⁸⁵

A sobreexpressão das quimiocinas e dos respetivos receptores tem sido observada no OSCC. Xia *et al.*⁸⁵ observaram por análise *microarray* um aumento superior ao dobro dos níveis mRNA de 9 quimiocinas (CCL18, CXCL10, CCL8, CCL13, CCL3, CCL19, CXCL6, CCL14, CCL21) e 3 receptores (CCR1, CXCR7, DARC) na leucoplasia oral (n=20) comparativamente a tecido normal (n=13). Posteriormente, selecionaram o CXCR7 para confirmação dos resultados por RT-PCR e estudo IHC. Observou-se a sua expressão em 85% das leucoplasias e 86% do total de 35 OSCCs. No entanto, apenas 8% (1/13) do tecido normal apresentou imunorreatividade para o CXCR7. Os rácios positivos do CXCR7, CXCL12 e CXCL11 não apresentaram diferenças significativas entre leucoplasia oral e OSCC, mas foram significativamente maiores do que no epitélio normal ($p < 0,05$). Entretanto, o CXCR7 encontrou-se sempre expresso com os seus ligandos na leucoplasia oral e OSCC. Estes resultados indicam que o eixo CXCR7-CXCL12/CXCL11 pode desempenhar papéis importantes na oncogénese oral, nomeadamente na iniciação e progressão tumoral, por mediar processos como a sobrevivência e adesão celular, desenvolvimento neoplásico e metastização. Os autores sugerem que o bloqueio do CXCR7 durante a promoção do cancro oral poderá ser opção de futuras estratégias terapêuticas.⁸⁵

Sumário e significado clínico: além do eixo CXCR7-CXCL12/CXCL11, tinham sido associados a OSCC os pares CCL3/CCR1 e CCL21/CCR7. À luz da evidência atual, o CXCR7 apresenta maior expressão na superfície de células tumorais. Este é também encontrado na superfície de células endoteliais ativadas, células hepáticas fetais e raramente

noutras células normais. Apesar do número crescente de trabalhos, pouco se sabe das funções biológicas destas e de outras quimiocinas e respetivos recetores no cancro oral. Até à publicação do estudo por Xia *et al.*⁸⁵, nenhum trabalho tinha investigado estas alterações em OPMDs.

5.16. Sets multigénicos

Os estudos independentes por diferentes grupos de pesquisa indicam que os OSCCs apresentam um perfil de transcrição genética único, que difere das células normais. A literatura suporta a análise *microarray* da doença oncológica como sistema de diagnóstico mais promissor do que a histopatologia convencional.²²

Apesar do desenvolvimento de ferramentas genómicas de alta performance, que permitem a seleção rápida de genes associados à carcinogénese, incluindo casos de leucoplasia oral; a concordância entre resultados de diferentes estudos ainda é baixa, em parte pelas diferentes tecnologias de *microarray* utilizadas e pelas diferenças demográficas das amostras.²²

Como resposta a algumas limitações, o desenvolvimento de ferramentas bioinformáticas tem por objetivo organizar dados genómicos e proteómicos através de bases de dados disponíveis *online*. A ontologia genética descreve o papel de um determinado gene nos processos biológicos, moleculares e celulares. Associada à análise de vias de interação são utilizadas para compreender a complexidade da expressão proteica nos diferentes processos celulares.⁶²

A aplicação crescente de ferramentas eficazes na observação de uma grande variedade de alterações genéticas no cancro oral tem por objetivo diagnosticar eficazmente populações de risco.⁸⁴

5.16.1. Análise *microarray*

Tsui *et al.*¹⁶⁶ aplicaram a análise *microarray* ao genoma DNA de 50 displasias (21 CIS, 22 displasias severas, 6 displasias ligeiras/moderadas e 1 hiperplasia) que posteriormente progrediram para cancro. A amplificação do DNA e deleções homozigóticas foram observadas em 40% das lesões displásicas e 43,5% dos casos de OSCC. Além disso, 25 lesões orais (1 lesão de baixo grau progressiva, 14 displasias de alto risco e 10 OSCC) demonstraram

amplificação genética elevada de diferentes genes envolvidos em redes de sinalização que incluem ERK/MAPK, FGF, p53, PTEN e PI3K/Akt. Se em 34% das lesões de menor risco que progrediram para OSCC estavam presentes estas alterações, não foram encontradas aberrações semelhantes nas displasias de menor risco que não progrediram.¹⁶⁶

Kuribayashi *et al.*¹⁸⁸ tentaram identificar um novo sistema de diagnóstico não invasivo para a displasia epitelial. Foi utilizada um padrão *microarray* oligonucleotídeo para analisar padrões de expressão de 29952 genes em 10 pacientes com leucoplasia oral. Os padrões entre displasia ligeira e severa foram comparados. Dos 96 genes candidatos identificados como sobrerregulados na displasia oral, foram selecionados 16 com maior expressão diferencial. No estudo por Kuribayashi *et al.*¹⁸⁸, à semelhança de outros do mesmo género, não foram testados os *profiles* genéticos que sucessivamente estão sobre e subregulados, na transição dos tecidos orais normais para leucoplasia oral e desta para OSCC. Determinados genes podem estar sobrerregulados várias vezes na transição entre tecido normal e leucoplásico e novamente sobrerregulados na transição entre leucoplasia e OSCC. Estes padrões podem ter significado na carcinogénese da leucoplasia oral.²²

Odani *et al.*¹⁸⁹ analisaram a expressão de 8800 genes na leucoplasia oral humana (n=4) e OSCCs (n=2), utilizando o sistema *Affymetrix GeneChip* com confirmação dos resultados por RT-PCR. Dos 8800 genes, 8 genes estavam sobrerregulados (>2 vezes) e 10 estavam subregulados (<0,5 vezes) em todas as leucoplasias analisadas com o *GeneChip*. Em particular, o *loricrin* e as queratinas apresentaram maiores diferenças entre o tecido normal e a leucoplasia. Alguns dos 18 genes expressos de forma alternativa estavam marcadamente subregulados no OSCC comparativamente com leucoplasia. Os autores sugerem que alterações das proteínas do citoesqueleto podem ser responsáveis pelo desenvolvimento e progressão de leucoplasia oral.¹⁸⁹

Liu W *et al.*²², utilizando o *Oligo GEArray*[®] *Human Cancer Microarray*, pretenderam identificar genes com valor preditivo de malignização em pacientes com leucoplasia oral. Esta ferramenta contém 440 genes, incluindo supressores tumorais, oncogenes, moléculas transdutoras de sinais, fatores de crescimento, recetores de fatores de crescimento e fatores angiogénicos. A descoberta e validação por RT-PCR semiquantitativa dos possíveis biomarcadores incluíram amostras de tecido normal, leucoplasia oral e OSCC, com diagnóstico confirmado por histopatologia. Identificaram-se 206 genes expressos diferencialmente entre tecido oral normal e leucoplasia oral (p<0,01), 143 expressos

diferencialmente entre leucoplasia oral e OSCC ($p < 0,01$) e 147 expressos diferencialmente entre tecido oral normal e OSCC ($p < 0,01$). Com base nos resultados de microarray, foram identificados 9 genes sucessivamente sobrerregulados ou subregulados mais do que 2 vezes, entre o grupo normal e leucoplasias orais, e novamente entre o grupo de leucoplasias orais e os OSCCs. Os níveis de expressão dos 9 genes identificados apresentaram diferenças estatisticamente significativas ($p < 0,05$) entre a leucoplasia oral e tecido normal ou OSCC. Os autores sugeriram que a expressão destes 9 genes pode ser representativa da oncogênese da leucoplasia oral. Porém, o estudo apresenta limitações: 1) a amostra é pequena, 2) não se consideraram parâmetros clinicopatológicos e 3) não foi avaliada a importância dos biomarcadores a nível proteico.

Kondoh *et al.*⁸⁴ tentaram identificar um *set* de genes capaz de discriminar os subtipos leucoplásicos de OSCC, através da expressão genética diferencial entre os espécimes biopsado destas lesões, avaliada por cDNA *microarray*. A expressão dos 118 candidatos a marcadores genéticos foi posteriormente avaliada por QRT-PCR em 27 OSCC e 19 leucoplasias orais (4 hiperplásicas, 3 displasia ligeira, 7 moderada e 5 severa). Foram identificados 12 genes sobrerregulados e 15 subexpressos em tecidos malignos comparados a leucoplasias. Utilizando a análise discriminante linear de Fisher, os autores demonstraram que um set de 11 genes poderá ter maior capacidade em distinguir OSCCs das leucoplasias (>97% eficácia), enquanto 7 destes genes poderão ser utilizados para distinguir displasias de maior (superior a moderada) e menor risco (inferior a ligeira) (>95% eficácia), demonstrando que a utilização combinada e não simplesmente o maior número de genes marcadores é essencial para construir sets preditivos apropriados. Estes *sets* multigênicos poderão ser utilizados futuramente no diagnóstico da transição maligna das OPMDs. Além disso, os resultados do estudo citado sugerem que estes genes (27 de 118 candidatos) com expressão diferencial poderão não só constituir uma ferramenta valiosa na aferição do prognóstico de pacientes com OSCC, como oferecer informação importante acerca dos mecanismos moleculares subjacentes ao desenvolvimento maligno.⁸⁴

Seguindo os mesmos conceitos de investigação, Wang *et al.*⁶² para tentaram identificar proteínas com expressão diferencial em 6 pares de tecidos diagnosticados como leucoplasia oral e OSCCs, através de eletroforese bidimensional seguida de ESI-Q-TOF-LC-MS/MS, sendo que cada par correspondia ao mesmo paciente para diminuição da heterogeneidade das amostras. Foram identificadas aproximadamente 85 proteínas expressas constantemente e diferencialmente (> 2 vezes, $p < 0,05$), incluindo 52 sobrerreguladas e 33

subreguladas, envolvidas em diferentes processos, nomeadamente apoptose, respostas a estímulos e regulação metabólica. Os métodos de ontologia genética foram aplicados para reconhecer os processos biológicos sobrerrepresentados na carcinogénese. As redes biológicas também foram construídas para revelar as potenciais ligações entre proteínas candidatas. Entre elas, os mRNAs de 3 homólogos do ativador de proteassoma PA28 a, b e g estavam sobrerregulados (4-6 vezes) em células malignas relativamente a tecidos leucoplásicos.⁶²

Nos finais da década de 90, o PA28ab foi identificado como interveniente na apresentação imunológica classe I, de acordo com os elevados níveis deste complexo nos tecidos imunes, a indução pelo IFN γ e a produção direta de alguns destes epítomos classe I, pelo complexo proteassómico PA28ab. Os resultados do estudo de Wang *et al.*⁶² reforçam a ligação entre PA28ab e a imunidade celular, ao demonstrarem que proteínas chave para a apresentação de antígenos MHC I – PA28, proteassomas, HSP70 e HSP90 - se encontram sobrerreguladas nos tecidos malignos.⁶²

Sumário e significado clínico: é possível identificar por análise *microarray*, um conjunto de genes diferencialmente expressos entre tecido normal, OPMDs e lesões malignas. No entanto, a validação de qualquer resultado deve ser feita através de estudos de coorte independentes com amostras representativas. Deve igualmente considerar-se a validação dos marcadores a nível proteico, assim como as suas funções na rede de transdução de sinais.

A utilização de ferramentas bioinformáticas e da ontologia médica tem sido uma tendência recente da investigação oncológica, nomeadamente no que à cavidade oral diz respeito. No entanto, a sua aplicação clínica não é tão linear quanto possa parecer. A identificação de um *set* de genes capaz de discriminar os diferentes subtipos de leucoplasia e OSCC é difícil, envolve técnicas laboratoriais avançadas e difíceis de reproduzir entre estudos, apesar dos resultados promissores na caracterização da transição maligna de OPMDs. A demonstração do papel dos 3 homólogos do PA28 (a, b e g) na transformação maligna é um dos exemplos dos estudos biológicos sistemáticos, no qual se utilizam técnicas de proteómica funcional para ajudar a elucidar os mecanismos e o potencial envolvimento de determinadas proteínas. O estudo de Wang *et al.*⁶² confirma a sobreexpressão da PA28 na oncogénese oral, sendo no entanto necessário estudar as relações da imunomarcação com o rácio de sobrevivência e recidiva.⁶² Apesar de ser uma avaliação alargada às diferentes redes de sinalização comuns às OPMDs e OSCC, escasseiam estudos que permitam a sua translação

para a prática clínica, pelo que não se pode sobrepor ao conhecimento clínico e histológico já protelado.

5.17. HPV

A importância das estirpes oncogénicas HPV16/18 na transformação maligna das OPMDs não é conhecida. Alguns investigadores definem a etiologia viral como sendo importante no desenvolvimento de OSCC, especialmente na ausência de hábitos tabágicos e alcoólicos. A maior prevalência de HPV em leucoplasias orais tem sido associada a um risco significativamente maior (OR=4,17; 95% IC: 1,41-12,18), embora o OSCC que deriva desta condição apresente na maioria das vezes melhor prognóstico. O racional de um papel carcinogénico destas estirpes é atribuído a duas oncoproteínas: HPV-E6 que promove a degradação da p53 e HPV-E7 que modifica a função do pRb, induzindo a proliferação celular aumentada e consequente carcinogénese.⁷¹

Partindo também destas incertezas, Campisi *et al.*⁷¹ avaliaram em 21 casos de leucoplasia oral a relação entre a infeção por HPV e marcadores apoptóticos (bcl-2, survivina) e proliferativo (PCNA), bem como com parâmetros clinicopatológicos. A presença de DNA HPV foi investigada em células exfoliadas da mucosa oral por PCR, e o genótipo do HPV determinado por sequenciamento do DNA. Todos os marcadores foram avaliados por IHC. O DNA HPV foi encontrado em 8/21 leucoplasias orais (38,1%), sendo que a survivina, PCNA e hábitos tabágicos foram associados por análise univariável ($p=0,04$) à presença de DNA HPV. Nas leucoplasias orais HPV positivas foi possível observar uma associação independente entre o consumo de álcool e os casos positivos para o PCNA e survivina. O HPV18 foi o genótipo mais frequente (6/8), seguido pelo HPV16 (2/8). Em todos os casos HPV positivos, estavam expressos a survivina e o PCNA. A expressão da survivina e PCNA neste estudo sugere que a apoptose e proliferação celular podem estar envolvidas na desregulação da maturação epitelial mediada pelo HPV e que reciprocamente, o HPV pode ter um papel na expressão destes marcadores. Os autores sugerem que a presença de infeção oral por HPV deve ser determinada em qualquer diagnóstico de leucoplasia, simultaneamente com a avaliação de marcadores apoptóticos e proliferativos, em *follow-ups* a longo prazo de lesões HPV positivas.⁷¹

Sumário e significado clínico: segundo os autores citados, este trabalho foi o primeiro a avaliar em leucoplasia orais a infeção por HPV e diferentes marcadores IHCs. A

incerteza quanto ao papel etiológico das estirpes virais oncogénicas do HPV, nomeadamente no que diz respeito aos mecanismos patogénicos, pode ser esclarecida através da associação a marcadores conhecidos de diferentes vias de sinalização implicadas na oncogénese oral. As prevalências da infeção por HPV em OPMDs e cancro oral são muito variáveis de acordo com a localização geográfica. São necessários estudos que esclareçam estas dúvidas, através de formatos multicêntricos, para que se possa validar a sua utilidade clínica.

Os objetivos gerais e específicos propostos foram plenamente cumpridos. Foi conseguida a revisão sistemática do potencial translacional dos marcadores bioquímicos e moleculares mais recentes no diagnóstico, tratamento e prognóstico das lesões leucoplásicas orais.

CONCLUSÃO

6. Conclusão

O desenvolvimento de modelos de progressão genética para o cancro oral poderá desempenhar um papel chave na sua prevenção. Embora se conheçam algumas alterações bioquímicas e moleculares da leucoplasia oral, não é conhecido nenhum padrão de alterações ou via de sinalização que possa prever o risco individual de malignização. A identificação de biomarcadores moleculares com potencial translacional e valor preditivo para a transformação maligna, articulada com um sistema de classificação universal para a displasia epitelial oral, poderá ajudar a uma abordagem clínica mais adequada da leucoplasia. Todavia, os protocolos médicos ou cirúrgicos de prevenção maligna são pouco eficazes, ou pelo menos controversos.

A evidência sugere que o significado clínico de cada biomarcador ou via de sinalização pode ser melhorado pela construção e entendimento de uma rede dinâmica biologicamente ativa, permitindo desvendar as etapas da oncogénese oral e atuar precocemente nos momentos reversíveis da carcinogénese. Todavia, poucos trabalhos investigam diferentes biomarcadores na progressão de leucoplasia em amostras representativas, pelo que a heterogeneidade das metodologias de análise e interpretação dos resultados, quase sempre impossibilita a sua reprodutibilidade e comparação.

Os investigadores e clínicos sugerem que a evolução histológica e temporal de desordens orais potencialmente malignas nem sempre é linear, pelo que a intervenção médica deverá ser sempre proactiva, desde as consultas de prevenção primária.

A displasia epitelial oral continua a ser considerada como o parâmetro de maior valor preditivo para o potencial maligno.

Não existe nenhum estudo indexado que aplique os conhecimentos biomoleculares na abordagem da leucoplasia oral. Será necessária a combinação de novos dados histológicos, clínicos e moleculares, com o objetivo de personalizar as decisões médicas, através de estudos multicêntricos prospetivos, clínicos randomizados e controlados para os principais biomarcadores.

REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

7. Referências bibliográficas

1. Wang L, Ting S, Chen C, Tsai C, Lung O, Liu T, et al. Polymorphisms in the apoptosis-associated genes FAS and FASL and risk of oral cancer and malignant potential of oral premalignant lesions in a Taiwanese population. *J Oral Pathol Med*. 2010;39(2):155-61.
2. Sharma A, Saxena S. Quantification of AgNOR expression in exfoliated oral mucosal cells of tobacco chewers with and without lesion. *Indian J Dent Res*. 2012;23(2):251-6.
3. Weise J, Rudolph P, Heiser A, Kruse M, Hedderich J, Cordes C, et al. LOXL4 is a selectively expressed candidate diagnostic antigen in head and neck cancer. *Eur J Cancer*. 2008;44(9):1323-31.
4. Liu W, Wu L, Shen X, Shi L, Zhang C, Xu L, et al. Expression patterns of cancer stem cell markers ALDH1 and CD133 correlate with a high risk of malignant transformation of oral leukoplakia. *Int J Cancer*. 2013;132(4):868-74.
5. Tripathi S, Matta A, Kaur J, Grigull J, Chauhan S, Thakar A, et al. Nuclear S100A7 is associated with poor prognosis in head and neck cancer. *PLoS One*. 2010;5(8):e11939.
6. Mishra R. Biomarkers of oral premalignant epithelial lesions for clinical application. *Oral Oncology*. 2012;48(7):578-84. Epub 2012 Feb 18.
7. Lingen M, Pinto A, Mendes R, Franchini R, Czerninski R, Tilakaratne W, et al. Genetics/epigenetics of oral premalignancy: current status and future research. *Oral Dis*. 2011;17(1):7-22.
8. Matta A, Tripathi S, DeSouza L, Grigull J, Kaur J, Chauhan S, et al. Heterogeneous ribonucleoprotein K is a marker of oral leukoplakia and correlates with poor prognosis of squamous cell carcinoma. *Int J Cancer*. 2009;125(6):1398-406.
9. Liu W, Bao Z, Shi L, Tang G, Zhou Z. Malignant transformation of oral epithelial dysplasia: clinicopathological risk factors and outcome analysis in a retrospective cohort of 138 cases. *Histopathology*. 2011;59(4):733-40. Epub 2011 Sep 14.
10. Taoudi Benchekroun M, Saintigny P, Thomas S, El-Naggar A, Papadimitrakopoulou V, Ren H, et al. Epidermal growth factor receptor expression and gene copy number in the risk of oral cancer. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2010;3(7):800-9. Epub 2010 Jun 22.
11. Marincsák R, Tóth B, Czifra G, Márton I, Rédl P, Tar I, et al. Increased expression of TRPV1 in squamous cell carcinoma of the human tongue. *Oral Dis*. 2009;15(5):328-35.
12. Cancer incidence in five continents [Internet]. 2010 [cited July 2013]. Available from: <http://www-dep.iarc.fr>.
13. Brocklehurst P, Kujan O, Glenny A, Oliver R, Sloan P, Ogden G, et al. Screening programmes for the early detection and prevention of oral cancer. *Cochrane Database Syst Rev*. 2010 (11). Epub 2010 Nov 10.
14. Chin D, Boyle G, Theile D, Parsons P, Coman W. Molecular introduction to head and neck cancer (HNSCC) carcinogenesis. *Br J Plast Surg*. 2004;57(7):595-602.
15. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncology*. 2009;45(4-5):309-16. Epub Epub 2008 Sep 18.
16. Pindborg J, Reichart P, Smith C, van der Waal I. Histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa. 2nd ed. Tumours WJHC, editor: Springer; 1997.
17. Sudbø J, Reith A. Which putatively pre-malignant oral lesions become oral cancers? Clinical relevance of early targeting of high-risk individuals. *J Oral Pathol Med*. 2003;32(2):63-70.
18. Soares C, Zuanon J, Teresa D, Fregonezi P, Neto C, Oliveira M, et al. Quantitative cell-cycle protein expression in oral cancer assessed by computer-assisted system. *Histol Histopathol*. 2006;21(7):721-8.
19. Cancer Research UK [Internet]. [cited July 2013]. Available from: <http://www.cancerresearchuk.org/cancer-info/>.
20. Scully C, Bagan J. Oral squamous cell carcinoma overview. *Oral Oncol*. 2009;45(4-5):301-8.
21. Petti S. Pooled estimate of world leukoplakia prevalence: a systematic review. *Oral Oncology*. 2003;39(8):770-80.
22. Liu W, Zheng W, Xie J, Zhang B, Ma W, Chen X. Identification of genes related to carcinogenesis of oral leukoplakia by oligo cancer microarray analysis. *Oncol Rep*. 2011;26(1):265-74.
23. Thomson P, Hamadah O, Goodson M, Cragg N, Booth C. Predicting recurrence after oral precancer treatment: use of cell cycle analysis. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2008;46(5):370-5.
24. Country factsheets: European Cancer Observatory; 2012 [cited 2013 14 July]. Available from: <http://eco.iarc.fr/EUCAN/Country.aspx?ISOCountryCd=620>.
25. Bray F, Ren J, Masuyer E, Ferlay J. Global estimates of cancer prevalence for 27 sites in the adult population in 2008. *Int J Cancer*. 2013;132(5):1133-45.

26. Bremmer J, Braakhuis B, Ruijter-Schippers H, Brink A, Duarte H, Kuik D, et al. A noninvasive genetic screening test to detect oral preneoplastic lesions. *Lab Invest*. 2005;85(12):1481-8.
27. Wei J, Xie G, Zhou Z, Shi P, Qiu Y, Zheng X, et al. Salivary metabolite signatures of oral cancer and leukoplakia. *Int J Cancer*. 2011;129(9):2207-17.
28. Jemal A, Siegel R, Ward E, Hao Y, Xu J, Murray T, et al. Cancer statistics, 2008. *CA Cancer J Clin*. 2008;58(2):71-96. Epub Epub 2008 Feb 20.
29. Tabor M, Braakhuis B, van der Wal J, van Diest P, Leemans C, Brakenhoff R, et al. Comparative molecular and histological grading of epithelial dysplasia of the oral cavity and the oropharynx. *J Pathol*. 2003;199(3):354-60.
30. Fischer D, Epstein J, Morton T, Schwartz S. Interobserver reliability in the histopathologic diagnosis of oral pre-malignant and malignant lesions. *J Oral Pathol Med*. 2004;33(2):65-70.
31. Jin G. Using biomarkers to detect oral cancer holds potential for saving lives when the cancer is most curable. *Biomark Med*. 2010;4(6):835-8.
32. van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncology*. 2009;45(4-5):317-23.
33. Reibel J. Prognosis of oral pre-malignant lesions: significance of clinical, histopathological, and molecular biological characteristics. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003;14(1):47-62.
34. Warnakulasuriya S, Johnson N, van der Waal I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. *J Oral Pathol Med*. 2007;36:575-80.
35. Napier S, Speight P. Natural history of potentially malignant oral lesions and conditions: an overview of the literature. *J Oral Pathol Med*. 2008;37(1):1-10.
36. Barnes L, Eveson J, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. Lyon: IARC Press; 2005.
37. Bascones A, Seoane J, Aguado A, Quintanilla J. Cáncer y precáncer oral. Bases clínico-quirúrgicas y moleculares. Madrid2003. 313 p.
38. Ho P, Chen P, Warnakulasuriya S, Shieh T, Chen Y, Huang I. Malignant transformation of oral potentially malignant disorders in males: a retrospective cohort study. *BMC Cancer*. 2009;9(260).
39. Arduino P, Surace A, Carbone M, Elia A, Massolini G, Gandolfo S, et al. Outcome of oral dysplasia: a retrospective hospital-based study of 207 patients with a long follow-up. *J Oral Pathol Med*. 2009;38(6):540-4. Epub 2009 May 18.
40. Warnakulasuriya S, Reibel J, Bouquot J, Dabelsteen E. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. *J Oral Pathol Med*. 2008;37(3):127-33.
41. Pitiyage G, Tilakaratne W, Tavassoli M, Warnakulasuriya S. Molecular markers in oral epithelial dysplasia: review. *J Oral Pathol Med*. 2009;38(10):737-52.
42. Scully C, Sudbø J, Speight P. Progress in determining the malignant potential of oral lesions. *J Oral Pathol Med*. 2003;32(5):251-6.
43. Mithani S, Mydlarz W, Grumbine F, Smith I, Califano J. Molecular genetics of premalignant oral lesions. *Oral Dis*. 2007;13(2):123-33.
44. McKinnell R, Parchment R, Perantoni A, Pierce G, Damjanov I. The biological basis of cancer: Cambridge University Press; 2006.
45. Hanahan D, Weinberg R. Hallmarks of cancer: the next generation. *Cell*. 2011;144:29.
46. Slaughter D, Southwick H, Smejkal W. Field cancerization in oral stratified squamous epithelium; clinical implications of multicentric origin. *Cancer*. 1953;6(5):963-8.
47. Santos-García A, Abad-Hernández M, Fonseca-Sánchez E, Cruz-Hernández J, Bullón-Sopelana A. Proteic expression of p53 and cellular proliferation in oral leukoplakias. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2005;10(1):5-8;1-5.
48. Califano J, van der Riet P, Westra W, Nawroz H, Clayman G, Piantadosi S, et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer Res*. 1996;56(11):2488-92.
49. Fleskens S, Slootweg P. Grading systems in head and neck dysplasia: their prognostic value, weaknesses and utility. *Head Neck Oncol*. 2009;1(11).
50. Nankivell P, Williams H, Matthews P, Suortamo S, Snead D, McConkey C, et al. The binary oral dysplasia grading system: validity testing and suggested improvement. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol*. 2013;115(1):87-94.
51. Holmstrup P, Vedtofte P, Reibel J, Stoltze K. Long-term treatment outcome of oral premalignant lesions. *Oral Oncology*. 2006;42(5):461-74.
52. Reddy V, Kamath A, Radhakrishnan R. p53 immunoprofiling of potentially malignant oral disorders: a case series analysis. *Indian J Cancer*. 2012;49(1):27-32.
53. Kujan O, Oliver R, Khattab A, Roberts S, Thakker N, Sloan P. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. *Oral Oncology*. 2006;42(10):987-93.

54. Kujan O, Khattab A, Oliver R, Roberts S, Thakker N, Sloan P. Why oral histopathology suffers inter-observer variability on grading oral epithelial dysplasia: an attempt to understand the sources of variation. *Oral Oncology*. 2007;43(3):224-31.
55. Nayyar A, Khan M. In search of malignant transformation: a pilot study. *J Cancer Res Ther*. 2012;8(2):277-81.
56. Abbey L, Kaugars G, Gunsolley J, Burns J, Page D, Svirsky J, et al. Intraexaminer and interexaminer reliability in the diagnosis of oral epithelial dysplasia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1995;80(2):188-91.
57. Smith J, Rattay T, McConkey C, Helliwell T, Mehanna H. Biomarkers in dysplasia of the oral cavity: a systematic review. *Oral Oncology*. 2009;45(8):647-53. Epub 2009 May 12.
58. Mehanna H, Rattay T, Smith J, McConkey C. Treatment and follow-up of oral dysplasia - a systematic review and meta-analysis. *Head Neck*. 2009;31(12):1600-9.
59. Kramer I, Lucas R, Pindborg J, Sobin L. Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1978;46(4):518-39.
60. I. van der Waal KPS, E.H. van der Meij. A modified classification and staging system for oral leukoplakia. *Oral Oncology*. 2000;36:264-6.
61. Wu J, Yi C, Chung H, Wang D, Chang W, Lee S, et al. Potential biomarkers in saliva for oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2010;46(4):226-31.
62. Wang Z, Feng X, Liu X, Jiang L, Zeng X, Ji N, et al. Involvement of potential pathways in malignant transformation from oral leukoplakia to oral squamous cell carcinoma revealed by proteomic analysis. *BMC Genomics*. 2009;10:383.
63. Lodi G, Sardella A, Bez C, Demarosi F, Carrassi A. Interventions for treating oral leukoplakia. *Cochrane Database Syst Rev*. 2006 (4).
64. Gouvêa A, Vargas P, Coletta R, Jorge J, Lopes M. Clinicopathological features and immunohistochemical expression of p53, Ki-67, Mcm-2 and Mcm-5 in proliferative verrucous leukoplakia. *J Oral Pathol Med*. 2010;39(6):447-52.
65. Hamadah O, Goodson M, Thomson P. Clinicopathological behaviour of multiple oral dysplastic lesions compared with that of single lesions. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2010;48(7):503-6.
66. Iamaroon A, Khemaleelakul U, Pongsiriwet S, Pintong J. Co-expression of p53 and Ki67 and lack of EBV expression in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med*. 2004;33(1):30-6.
67. López M, Aguirre J, Cuevas N, Anzola M, Videgain J, Aguirregaviria J, et al. Use of cytological specimens for p53 gene alteration detection in oral squamous cell carcinoma risk patients. *Clin Oncol (R Coll Radiol)*. 2004;16(5):366-70.
68. Brocklehurst P, Baker S, Speight P. Oral cancer screening: what have we learnt and what is there still to achieve? *Future Oncol*. 2010;6(2):299-304.
69. Kujan O, Glenny A, Duxbury J, Thakker N, Sloan P. Evaluation of screening strategies for improving oral cancer mortality: a Cochrane systematic review. *J Dent Educ*. 2005;69(2):255-65.
70. Montebugnoli L, Frini F, Gissi D, Gabusi A, Cervellati F, Foschini M, et al. Histological and immunohistochemical evaluation of new epithelium after removal of oral leukoplakia with Nd:YAG laser treatment. *Lasers Med Sci*. 2012;27(1):205-10.
71. Campisi G, Di Fede O, Giovannelli L, Capra G, Greco I, Calvino F, et al. Use of fuzzy neural networks in modeling relationships of HPV infection with apoptotic and proliferation markers in potentially malignant oral lesions. *Oral Oncol*. 2005;41(10):994-1004.
72. Raval G, Patel D, Parekh L, Patel J, Shah M, Patel P. Evaluation of serum sialic acid, sialyltransferase and sialoproteins in oral cavity cancer. *Oral Dis*. 2003;9(3):119-28.
73. Sawant S, Naresh K, D'Cruz A, Ogale S, Vaidya M. Demonstration of cytokeratin-5 non-expression in tobacco related oral carcinogenesis--use of reverse transcriptase polymerase chain reaction as a sensitive assay. *Oral Oncol*. 2003;39(8):789-95.
74. Kurokawa H, Matsumoto S, Murata T, Yamashita Y, Tomoyose T, Zhang M, et al. Immunohistochemical study of syndecan-1 down-regulation and the expression of p53 protein or Ki-67 antigen in oral leukoplakia with or without epithelial dysplasia. *J Oral Pathol Med*. 2003;32(9):513-21.
75. Rajpura K, Patel P, Chawda J, Shah R. Clinical significance of total and lipid bound sialic acid levels in oral pre-cancerous conditions and oral cancer. *J Oral Pathol Med*. 2005;34(5):263-7.
76. Soni S, Kaur J, Kumar A, Chakravarti N, Mathur M, Bahadur S, et al. Alterations of rb pathway components are frequent events in patients with oral epithelial dysplasia and predict clinical outcome in patients with squamous cell carcinoma. *Oncology*. 2005;68(4-6):314-25.
77. Anderson K, Stoner G, Fields H, Chacon G, Dohar A, Gregg B, et al. Immunohistochemical assessment of Viadent-associated leukoplakia. *Oral Oncol*. 2005;41(2):200-7.
78. Ma N, Tagawa T, Hiraku Y, Murata M, Ding X, Kawanishi S. 8-Nitroguanine formation in oral leukoplakia, a premalignant lesion. *Nitric Oxide*. 2006;14(2):137-43.

79. Kövesi G, Szende B. Prognostic value of cyclin D1, p27, and p63 in oral leukoplakia. *J Oral Pathol Med.* 2006;35(5):274-7.
80. Gires O, Mack B, Rauch J, Matthias C. CK8 correlates with malignancy in leukoplakia and carcinomas of the head and neck. *Biochem Biophys Res Commun.* 2006;343(1):252-9.
81. Brailo V, Vucićević-Boras V, Cekić-Arambasin A, Alajbeg I, Milenović A, Lukac J. The significance of salivary interleukin 6 and tumor necrosis factor alpha in patients with oral leukoplakia. *Oral Oncol.* 2006;42(4):370-3.
82. Fan G, Chen J, Ping F, Geng Y. Immunohistochemical analysis of P57(kip2), p53 and hsp60 expressions in premalignant and malignant oral tissues. *Oral Oncol.* 2006;42(2):147-53.
83. Teresa D, Neves K, Neto C, Fregonezi P, de Oliveira M, Zuanon J, et al. Computer-assisted analysis of cell proliferation markers in oral lesions. *Acta Histochem.* 2007;109(5):377-87.
84. Kondoh N, Ohkura S, Arai M, Hada A, Ishikawa T, Yamazaki Y, et al. Gene expression signatures that can discriminate oral leukoplakia subtypes and squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2007;43(5):455-62.
85. Xia J, Chen Q, Li B, Zeng X. Amplifications of TAOS1 and EMS1 genes in oral carcinogenesis: association with clinicopathological features. *Oral Oncol.* 2007;43(5):508-14.
86. Elangovan T, Mani N, Malathi N. Argyrophilic nucleolar organizer regions in inflammatory, premalignant, and malignant oral lesions: a quantitative and qualitative assessment. *Indian J Dent Res.* 2008;19(2):141-6.
87. Lee J, Lee S, Lee B, Lee H, Cho N, Yoon J, et al. Upregulation of heme oxygenase-1 in oral epithelial dysplasias. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2008;37(3):287-92.
88. Saintigny P, El-Naggar A, Papadimitrakopoulou V, Ren H, Fan Y, Feng L, et al. DeltaNp63 overexpression, alone and in combination with other biomarkers, predicts the development of oral cancer in patients with leukoplakia. *Clin Cancer Res.* 2009;15(19):6284-91. Epub 2009 Sep 22.
89. Vered M, Allon I, Dayan D. Maspin, p53, p63, and Ki-67 in epithelial lesions of the tongue: from hyperplasia through dysplasia to carcinoma. *J Oral Pathol Med.* 2009;38(3):314-20.
90. Khan Z, Tiwari R, Mulherkar R, Sah N, Prasad G, Shrivastava B, et al. Detection of survivin and p53 in human oral cancer: correlation with clinicopathologic findings. *Head Neck.* 2009;31(8):1039-48.
91. Watanabe S, Sato K, Okazaki Y, Tonogi M, Tanaka Y, Yamane G. Activation of PI3K-AKT pathway in oral epithelial dysplasia and early cancer of tongue. *Bull Tokyo Dent Coll.* 2009;50(3):125-33.
92. Schaaïj-Visser T, Bremmer J, Braakhuis B, Heck A, Slijper M, van der Waal I, et al. Evaluation of cornulin, keratin 4, keratin 13 expression and grade of dysplasia for predicting malignant progression of oral leukoplakia. *Oral Oncol.* 2010;46(2):123-7.
93. Rai B, Kaur J, Jacobs R, Singh J. Possible action mechanism for curcumin in pre-cancerous lesions based on serum and salivary markers of oxidative stress. *J Oral Sci.* 2010;52(2):251-6.
94. Prado S, Cedrún J, Rey R, Villaamil V, García A, Ayerbes M, et al. Evaluation of COX-2, EGFR, and p53 as biomarkers of non-dysplastic oral leukoplakias. *Exp Mol Pathol.* 2010;89(2):197-203.
95. Macha M, Matta A, Sriram U, Thakkar A, Shukla N, Datta Gupta S, et al. Clinical significance of TC21 overexpression in oral cancer. *J Oral Pathol Med.* 2010;39(6):477-85.
96. Bremmer J, Brakenhoff R, Broeckaert M, Beliën J, Leemans C, Bloemena E, et al. Prognostic value of DNA ploidy status in patients with oral leukoplakia. *Oral Oncol.* 2011;47(10):956-60.
97. Sudha V, Hemavathy S. Role of bcl-2 oncoprotein in oral potentially malignant disorders and squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study. *Indian J Dent Res.* 2011;22(4):520-5.
98. Godge P, Poonja L. Quantitative assessment of expression of cell adhesion molecule (CD44) splice variants: CD44 standard (CD44s) and v5, v6 isoforms in oral leukoplakias: an immunohistochemical study. *Indian J Dent Res.* 2011;22(3):493-4.
99. Xia J, Wang J, Chen N, Dai Y, Hong Y, Chen X, et al. Expressions of CXCR7/ligands may be involved in oral carcinogenesis. *J Mol Histol.* 2011;42(2):175-80.
100. Hoffmann R, Yurgel L, Campos M. Evaluation of salivary endothelin-1 levels in oral squamous cell carcinoma and oral leukoplakia. *Requi Pept.* 2011;166(1-3):55-8.
101. Sharma M, Bairy I, Pai K, Satyamoorthy K, Prasad S, Berkovitz B, et al. Salivary IL-6 levels in oral leukoplakia with dysplasia and its clinical relevance to tobacco habits and periodontitis. *Clin Oral Investig.* 2011;15(5):705-14.
102. Li H, Han J, Huang Z, Wang L, Chen W, Shen X. IMP3 is a novel biomarker to predict metastasis and prognosis of tongue squamous cell carcinoma. *J Craniofac Surg.* 2011;22(6):2022-5.
103. Nasser W, Flechtenmacher C, Holzinger D, Hofele C, Bosch F. Aberrant expression of p53, p16INK4a and Ki-67 as basic biomarker for malignant progression of oral leukoplakias. *J Oral Pathol Med.* 2011;40(8):629-35.
104. Chen H, Chen I, Liao C, Wei F, Lee L, Huang S. Preoperative circulating C-reactive protein levels predict pathological aggressiveness in oral squamous cell carcinoma: a retrospective clinical study. *Clin Otolaryngol.* 2011;36(2):147-53.

105. Macha M, Matta A, Kaur J, Chauhan S, Thakar A, Shukla N, et al. Prognostic significance of nuclear pSTAT3 in oral cancer. *Head Neck*. 2011;33(4):482-9.
106. Shetty S, Chadha R, Babu S, Kumari S, Bhat S, Achalli S. Salivary lactate dehydrogenase levels in oral leukoplakia and oral squamous cell carcinoma: a biochemical and clinicopathological study. *J Cancer Res Ther*. 2012;8(1):S123-5.
107. Jham B, Costa N, Silva J, de Miranda A, Oliveira J, Silva T, et al. Midkine expression in oral squamous cell carcinoma and leukoplakia. *J Oral Pathol Med*. 2012;41(1):21-6.
108. Liu C, Lin S, Yang C, Cheng H, Chang K. Exploiting salivary miR-31 as a clinical biomarker of oral squamous cell carcinoma. *Head Neck*. 2012;34(2):219-24.
109. Visioli F, Lauxen I, Sant'ana Filho M, Rados P. Expression of the cell cycle regulation proteins p53 and p21WAF1 in different types of non-dysplastic leukoplakias. *J Appl Oral Sci*. 2012;20(3):369-75.
110. Kumar P, Kane S, Rathod G. Coexpression of p53 and Ki 67 and lack of c-erbB2 expression in oral leukoplakias in India. *Braz Oral Res*. 2012;26(3):228-34.
111. Ha P, Califano J. The molecular biology of mucosal field cancerization of the head and neck. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2003;14(5):363-9.
112. Ha P, Benoit N, Yochem R, Sciubba J, Zahurak M, Sidransky D, et al. A transcriptional progression model for head and neck cancer. *Clin Cancer Res*. 2003;9(8):3058-84.
113. Tsui I, Rosin M, Zhang L, Ng R, Lam W. Multiple aberrations of chromosome 3p detected in oral premalignant lesions. *Cancer Prev Res (Phila)*. 2008;1(6):424-9.
114. Zhang L, Williams M, Poh C, Laronde D, Epstein J, Durham S, et al. Toluidine blue staining identifies high-risk primary oral premalignant lesions with poor outcome. *Cancer Res*. 2005;65(17):8017-21.
115. Epstein J, Zhang L, Poh C, Nakamura H, Berean K, Rosin M. Increased allelic loss in toluidine blue-positive oral premalignant lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003;95(1):45-50.
116. Rosin M, Cheng X, Poh C, Lam W, Huang Y, Lovas J, et al. Use of allelic loss to predict malignant risk for low-grade oral epithelial dysplasia. *Clin Cancer Res*. 2000;6(2):357-62.
117. Partridge M PS, Phillips E, Emilion GG, A'Hern RP, Langdon JD. A case-control study confirms that microsatellite assay can identify patients at risk of developing oral squamous cell carcinoma within a field of cancerization. *Cancer Res*. 2000;60(14):3893-8.
118. Partridge M, Emilion G, Pateromichelakis S, A'Hern R, Lee G, Phillips E, et al. The prognostic significance of allelic imbalance at key chromosomal loci in oral cancer. *Br J Cancer*. 1999;79(11-12):1821-7.
119. Chen L, Wong M, Cheung L, Samaranyake L, Baum L, Samman N. Frequent allelic loss of 21q11.1 approximately q21.1 region in advanced stage oral squamous cell carcinoma. *Cancer Genet Cytogenet*. 2005;159(1):37-43.
120. Lee J, Hong W, Hittelman W, Mao L, Lotan R, Shin D, et al. Predicting cancer development in oral leukoplakia: ten years of translational research. *Clin Cancer Res*. 2000;6(5):1702-10.
121. Gleich L, Li Y, Wang X, Stambrook P, Gluckman J. Variable genetic alterations and survival in head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1999;125(9):949-52.
122. Diwakar N, Sperandio M, Sherriff M, Brown A, Odell E. Heterogeneity, histological features and DNA ploidy in oral carcinoma by image-based analysis. *Oral Oncol*. 2005;41(4):416-22.
123. Torres-Rendon A, Stewart R, Craig G, Wells M, Speight P. DNA ploidy analysis by image cytometry helps to identify oral epithelial dysplasias with a high risk of malignant progression. *Oral Oncol*. 2009;45(6):468-73.
124. Pentenero M, Giaretti W, Navone R, Demurtas A, Rostan I, Bertolusso G, et al. DNA aneuploidy and dysplasia in oral potentially malignant disorders: association with cigarette smoking and site. *Oral Oncol*. 2009;45(10):887-90.
125. Donadini A, Maffei M, Cavallero A, Pentenero M, Malacarne D, Di Nallo E, et al. Oral cancer genesis and progression: DNA near-diploid aneuploidization and endoreduplication by high resolution flow cytometry. *Cell Oncol*. 2010;32(5-6):373-83.
126. Islam M, Kornberg L, Veenker E, Cohen D, Bhattacharyya I. Anatomic site based ploidy analysis of oral premalignant lesions. *Head Neck Pathol*. 2010;4(1):10-4.
127. Cervigne N, Reis P, Machado J, Sadikovic B, Bradley G, Galloni N, et al. Identification of a microRNA signature associated with progression of leukoplakia to oral carcinoma. *Hum Mol Genet*. 2009;18(24):4818-29.
128. Egger G, Liang G, Aparicio A, Jones P. Epigenetics in human disease and prospects for epigenetic therapy. *Nature*. 2004;429(6990):457-63.
129. Ha P, Califano J. Promoter methylation and inactivation of tumour-suppressor genes in oral squamous-cell carcinoma. *Lancet Oncol*. 2006;7(1):77-82.
130. Wong T, Man M, Lam A, Wei W, Kwong Y, Yuen A. The study of p16 and p15 gene methylation in head and neck squamous cell carcinoma and their quantitative evaluation in plasma by real-time PCR. *Eur J Cancer* 2003;39(13):1881-7.

131. Goldenberg D, Harden S, Masayeva B, Ha P, Benoit N, Westra W, et al. Intraoperative molecular margin analysis in head and neck cancer. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg.* 2004;130(1):39-44.
132. Kulkarni V, Saranath D. Concurrent hypermethylation of multiple regulatory genes in chewing tobacco associated oral squamous cell carcinomas and adjacent normal tissues. *Oral Oncol.* 2004;40(2):145-53.
133. Kato K, Hara A, Kuno T, Mori H, Yamashita T, Toida M, et al. Aberrant promoter hypermethylation of p16 and MGMT genes in oral squamous cell carcinomas and the surrounding normal mucosa. *J Cancer Res Clin Oncol.* 2006;132(11):735-43.
134. Kresty L, Mallery S, Knobloch T, Song H, Lloyd M, Casto B, et al. Alterations of p16(INK4a) and p14(ARF) in patients with severe oral epithelial dysplasia. *Cancer Res.* 2002;62(18):5295-300.
135. Takeshima M, Saitoh M, Kusano K, Nagayasu H, Kurashige Y, Malsantha M, et al. High frequency of hypermethylation of p14, p15 and p16 in oral pre-cancerous lesions associated with betel-quid chewing in Sri Lanka. *J Oral Pathol Med.* 2008;37(8):475-9.
136. Youssef E, Lotan D, Issa J, Wakasa K, Fan Y, Mao L, et al. Hypermethylation of the retinoic acid receptor-beta(2) gene in head and neck carcinogenesis. *Clin Cancer Res.* 2004;10(5):1733-42.
137. López M, Aguirre J, Cuevas N, Anzola M, Videgain J, Aguirregaviria J, et al. Gene promoter hypermethylation in oral rinses of leukoplakia patients--a diagnostic and/or prognostic tool? *Eur J Cancer.* 2003;39(16):2306-9.
138. Shay J, Wright W. Telomeres and telomerase in normal and cancer stem cells. *FEBS Lett.* 2010;584(17):3819-25.
139. Pannone G, De Maria S, Zamparese R, Metafora S, Serpico R, Morelli F, et al. Prognostic value of human telomerase reverse transcriptase gene expression in oral carcinogenesis. *Int J Oncol.* 2007;30(6):1349-57.
140. Chen H, Yu C, Wang J, Liu B, Wang Y, Sun A, et al. Expression of human telomerase reverse transcriptase (hTERT) protein is significantly associated with the progression, recurrence and prognosis of oral squamous cell carcinoma in Taiwan. *Oral Oncol.* 2007;43(2):122-9.
141. Fujita H, Nagata M, Hoshina H, Nagashima K, Seki Y, Tanaka K, et al. Clinical significance and usefulness of quantification of telomerase activity in oral malignant and nonmalignant lesions. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2004;33(7):693-9.
142. Yajima Y, Noma H, Furuya Y, Nomura T, Yamauchi T, Kasahara K, et al. Quantification of telomerase activity of regions unstained with iodine solution that surround oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 2004;40(3):314-20.
143. Luzar B, Poljak M, Marin I, Eberline A, Klopčič U, Gale N. Human telomerase catalytic subunit gene re-expression is an early event in oral carcinogenesis. *Histopathology.* 2004;45(1):13-9.
144. Smeenk L, Lohrum M. Behind the scenes: unravelling the molecular mechanisms of p53 target gene selectivity (Review). *Int J Oncol.* 2010;37(5):1061-70.
145. Vousden K, Lane D. p53 in health and disease. *Nat Rev Mol Cell Biol.* 2007;8(4):275-83.
146. Bortoluzzi M, Yurgel L, Dekker N, Jordan R, Regezi J. Assessment of p63 expression in oral squamous cell carcinomas and dysplasias. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2004;98(6):698-704.
147. Poeta M, Manola J, Goldwasser M, Forastiere A, Benoit N, Califano J, et al. TP53 mutations and survival in squamous-cell carcinoma of the head and neck. *N Engl J Med.* 2007;357(25):2552-61.
148. Brennan M, Migliorati C, Lockhart P, Wray D, Al-Hashimi I, Axéll T, et al. Management of oral epithelial dysplasia: a review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2007;103.
149. Kodani I, Shomori K, Osaki M, Kuratate I, Ryoke K, Ito H. Expression of minichromosome maintenance 2 (MCM2), Ki-67, and cell-cycle-related molecules, and apoptosis in the normal-dysplasia-carcinoma sequence of the oral mucosa. *Pathobiology.* 2001;69(3):150-8.
150. Schoelch M, Le Q, Silverman SJ, McMillan A, Dekker N, Fu K, et al. Apoptosis-associated proteins and the development of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 1999;35(1):77-85.
151. Shah N, Trivedi T, Tankshali R, Goswami J, Shah J, Jetly D, et al. Molecular alterations in oral carcinogenesis: significant risk predictors in malignant transformation and tumor progression. *Int J Biol Markers.* 2007;22(2):132-43.
152. Kövesi G, Szende B. Changes in apoptosis and mitotic index, p53 and Ki67 expression in various types of oral leukoplakia. *Oncology.* 2003;65(4):331-6.
153. Choi H, Batsakis J, Zhan F, Sturgis E, Luna M, El-Naggar A. Differential expression of p53 gene family members p63 and p73 in head and neck squamous tumorigenesis. *Hum Pathol.* 2002;33(2):158-64.
154. Oliveira L, Ribeiro-Silva A, Costa J, Simões A, Matteo M, Zucoloto S. Prognostic factors and survival analysis in a sample of oral squamous cell carcinoma patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2008;106(5):685-95.
155. Chen Y, Hsue S, Lin L. Expression of p63 protein and mRNA in oral epithelial dysplasia. *J Oral Pathol Med.* 2005;34(4):232-9.
156. Takeda T, Sugihara K, Hirayama Y, Hirano M, Tanuma J, Semba I. Immunohistological evaluation of Ki-67, p63, CK19 and p53 expression in oral epithelial dysplasias. *J Oral Pathol Med.* 2006;35(6):369-75.

157. Chen Y, Hsue S, Lin L. p73 expression for human buccal epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma: does it correlate with nodal status of carcinoma and is there a relationship with malignant change of epithelial dysplasia? *Head Neck*. 2004;26(11):945-52.
158. Choi H, Tucker S, Huang Z, Gillenwater A, Luna M, Batsakis J, et al. Differential expressions of cyclin-dependent kinase inhibitors (p27 and p21) and their relation to p53 and Ki-67 in oral squamous tumorigenesis. *Int J Oncol*. 2003;22(2):409-14.
159. Braakhuis B, Tabor M, Kummer J, Leemans C, Brakenhoff R. A genetic explanation of Slaughter's concept of field cancerization: evidence and clinical implications. *Cancer Res*. 2003;63(8):1727-30.
160. Cruz I, Napier S, van der Waal I, Snijders P, Walboomers J, Lamey P, et al. Suprabasal p53 immunoreactivity is strongly associated with high grade dysplasia and risk for malignant transformation in potentially malignant oral lesions from Northern Ireland. *J Clin Pathol*. 2002;55(2):98-104.
161. Hildebrand L, Carrard V, Lauxen I, de Quadros O, Chaves A, Sant' Ana-Filho M. Evaluation of cell proliferation rate in non-dysplastic leukoplakias. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2010;15(2):e328-34.
162. Gologan O, Barnes E, Hunt J. Potential diagnostic use of p16INK4A, a new marker that correlates with dysplasia in oral squamoproliferative lesions. *Am J Surg Pathol*. 2005;29(6):792-6.
163. Bradley K, Budnick S, Logani S. Immunohistochemical detection of p16INK4a in dysplastic lesions of the oral cavity. *Mod Pathol*. 2006;19(10):1310-6.
164. Kaur J, Sawhney M, Dattagupta S, Shukla N, Srivastava A, Ralhan R. Clinical significance of phosphatidylinositol synthase overexpression in oral cancer. *BMC Cancer*. 2010;10(168).
165. Massarelli E, Liu D, Lee J, El-Naggar A, Lo Muzio L, Staibano S, et al. Akt activation correlates with adverse outcome in tongue cancer. *Cancer*. 2005;104(11):2430-6.
166. Tsui I, Poh C, Garnis C, Rosin M, Zhang L, Lam W. Multiple pathways in the FGF signaling network are frequently deregulated by gene amplification in oral dysplasias. *Int J Cancer*. 2009;125(9):2219-28.
167. Turatti E, da Costa Neves A, de Magalhães M, de Sousa S. Assessment of c-Jun, c-Fos and cyclin D1 in premalignant and malignant oral lesions. *J Oral Sci*. 2005;47(2):71-6.
168. Ishida K, Ito S, Wada N, Deguchi H, Hata T, Hosoda M, et al. Nuclear localization of beta-catenin involved in precancerous change in oral leukoplakia. *Mol Cancer*. 2007;6:62.
169. Ye Y, Lippman S, Lee J, Chen M, Frazier M, Spitz M, et al. Genetic variations in cell-cycle pathway and the risk of oral premalignant lesions. *Cancer*. 2008;113(9):2488-95.
170. Huang M, Spitz M, Gu J, Lee J, Lin J, Lippman S, et al. Cyclin D1 gene polymorphism as a risk factor for oral premalignant lesions. *Carcinogenesis*. 2006;27(10):2034-7.
171. Damm D, Curran A, White D, Drummond J. Leukoplakia of the maxillary vestibule--an association with Viadent? *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1999;87(1):61-6.
172. Eversole L, Eversole G, Kopcik J. Sanguinaria-associated oral leukoplakia: comparison with other benign and dysplastic leukoplakic lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2000;89(4):455-64.
173. Martin K, Barrett J. Reactive oxygen species as double-edged swords in cellular processes: low-dose cell signaling versus high-dose toxicity. *Hum Exp Toxicol*. 2002;21(2):71-5.
174. Johnstone S, Logan R. The role of vascular endothelial growth factor (VEGF) in oral dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol*. 2006;42(4):337-42.
175. Johnstone S, Logan R. Expression of vascular endothelial growth factor (VEGF) in normal oral mucosa, oral dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2007;36(3):263-6.
176. Hasina R, Whipple M, Martin L, Kuo W, Ohno-Machado L, Lingen M. Angiogenic heterogeneity in head and neck squamous cell carcinoma: biological and therapeutic implications. *Lab Invest*. 2008;88(4):342-53.
177. Piffkò J, Bänkfalvi A, Klauke K, Dreier R, Joos U, Böcker W, et al. Unaltered strong immunohistochemical expression of CD44-v6 and -v5 isoforms during development and progression of oral squamous cell carcinomas. *J Oral Pathol Med*. 1996;25(9):502-6.
178. Herold-Mende C, Seiter S, Born A, Patzelt E, Schupp M, Zöller J, et al. Expression of CD44 splice variants in squamous epithelia and squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Pathol*. 1996;179(1):66-73.
179. Spafford M, Koeppel J, Pan Z, Archer P, Meyers A, Franklin W. Correlation of tumor markers p53, bcl-2, CD34, CD44H, CD44v6, and Ki-67 with survival and metastasis in laryngeal squamous cell carcinoma. *Arch Otolaryngol Head Neck Surg*. 1996;122(6):627-32.
180. Salmi M, Grön-Virta K, Sointu P, Grenman R, Kalimo H, Jalkanen S. Regulated expression of exon v6 containing isoforms of CD44 in man: downregulation during malignant transformation of tumors of squamocellular origin. *J Cell Biol*. 1993;122(2):431-42.
181. Bahar R, Kunishi M, Kayada Y, Yoshiga K. CD44 variant 6 (CD44v6) expression as a progression marker in benign, premalignant and malignant oral epithelial tissues. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 1997;26(6):443-6.
182. Sneath R, Mangham D. The normal structure and function of CD44 and its role in neoplasia. *Mol Pathol*. 1998;51(4):191-200.

183. Rautava J, Soukka T, Inki P, Leimola-Virtanen R, Saloniemi I, Happonen R, et al. CD44v6 in developing, dysplastic and malignant oral epithelia. *Oral Oncol.* 2003;39(4):373-9.
184. Visus C, Ito D, Amoscato A, Maciejewska-Franczak M, Abdelsalem A, Dhir R, et al. Identification of human aldehyde dehydrogenase 1 family member A1 as a novel CD8+ T-cell-defined tumor antigen in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res.* 2007;67(21):10538-45.
185. Ma S, Chan K, Lee T, Tang K, Wo J, Zheng B, et al. Aldehyde dehydrogenase discriminates the CD133 liver cancer stem cell populations. *Mol Cancer Res.* 2008;6(7):1146-53.
186. Jiang F, Qiu Q, Khanna A, Todd N, Deepak J, Xing L, et al. Aldehyde dehydrogenase 1 is a tumor stem cell-associated marker in lung cancer. *Mol Cancer Res.* 2009;7(3):330-8.
187. Wenghoefer M, Pantelis A, Najafi T, Deschner J, Allam J, Novak N, et al. Gene expression of oncogenes, antimicrobial peptides, and cytokines in the development of oral leukoplakia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010;110(3):351-6.
188. Kuribayashi Y, Morita K, Tomioka H, Uekusa M, Ito D, Omura K. Gene expression analysis by oligonucleotide microarray in oral leukoplakia. *J Oral Pathol Med.* 2009;38(4):356-61.
189. Odani T, Ito D, Li M, Kawamata A, Isobe T, Iwase M, et al. Gene expression profiles of oral leukoplakia and carcinoma: genome-wide comparison analysis using oligonucleotide microarray technology. *Int J Oncol.* 2006;28(3):619-24.