

UNIVERSIDADE FEDERAL DE PELOTAS

Programa de Pós-Graduação em Odontologia



Dissertação

Avaliação de parâmetros para identificação do potencial de transformação contido em lesões orais potencialmente malignas

Deise de Avila Silva

Pelotas, 2012

DEISE DE AVILA SILVA

**AVALIAÇÃO DE PARÂMETROS PARA IDENTIFICAÇÃO DO
POTENCIAL DE TRANSFORMAÇÃO CONTIDO EM LESÕES
ORAIS POTENCIALMENTE MALIGNAS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas, como requisito parcial para obtenção do título de Mestre em Odontologia, Área de concentração Diagnóstico Bucal.

Orientador: Prof^a. Dr^a. Ana Paula Neutzling Gomes

Co-Orientador: Prof^a. Dr^a Adriana Etges

Pelotas, 2012

Banca Examinadora:

Prof^a. Dr^a. Sandra Beatriz Chaves Tarquinio

Dr^a. Ana Carolina Uchôa de Vasconcelos

Prof^a. Dr^a. Ana Paula Neutzling Gomes (orientadora)

Prof^a. Dr^a. Adriana Etges (co-orientadora)

Prof^a. Dr^a. Cristiane Furuse (suplente)

Dedicatória

Este trabalho é dedicado às pessoas mais importantes da minha vida, que sempre estiveram ao meu lado me incentivando e apoiando, que me ensinaram o valor do estudo e do trabalho honesto e que são verdadeiros exemplos para mim, meus pais: **Tereza Everanda** e **Artenio**, obrigada pelas palavras de carinho, pelo abraço afetuoso e pelo amor incondicional, essa conquista é de vocês.

Ao meu noivo **Vicente**, obrigada pela compreensão, carinho, apoio, companheirismo e por não me deixar desistir dos meus objetivos, por entender meus momentos de ausência, de choro, por suportar a saudade e por acreditar sempre que tudo o que estamos plantando hoje será colhido no futuro como belos frutos. Eu te amo muito, tu és muito importante para mim.

Agradecimentos

A **Deus**, pela dádiva da Vida e por permitir que tantas coisas boas aconteçam aprimorando meu desenvolvimento.

Durante estes dois últimos anos muitas pessoas participaram da minha vida, dentre estas, algumas se tornaram muito especiais, cada um ao seu modo, tanto na faculdade quanto na minha vida pessoal, e seria difícil não mencioná-las.

À minha Orientadora **Ana Paula** que dedicou muito do seu tempo me orientando embora tivesse outros interesses a resolver. Obrigada pelos ensinamentos, atenção e dedicação ao longo deste período.

Às Prof^{as}. Dr^{as}. **Adriana, Sandra e Cristiane** que também são responsáveis pelos meus conhecimentos, obrigada por toda ajuda, apoio e incentivo.

Às funcionárias do CDDB **Silvana, Ivana, Hilda, Ieda, Taiane e Martha**, obrigada não apenas pelo apoio técnico, mas pelas palavras de carinho e pela torcida constante.

À Prof^a. Dr^a. **Marta** Amaral ao Prof. Dr. **Max Cenci** e à Dr^a. **Ana Carolina** Uchôa pela disponibilidade em me ajudar durante a realização deste trabalho. À Prof^a. Dr^a. **Fernanda Pappen** por ser sempre tão gentil e prestativa e por ter me auxiliado na formatação desta dissertação.

Aos meus colegas de curso: **José Ricardo, Alessandro, Felipe, Guilherme, Aline, André e Rafael**, que compartilharam momentos que, certamente, jamais serão esquecidos.

Às colegas **Fernanda Nedel, Ana Paula Perroni e Karine Duarte**, obrigada pelo auxílio na coletas de dados. Às amigas **Damaris Amazonas e Juliana Spanenberg** que mesmo a distância sempre estiveram dispostas a me ajudar.

Aos colegas de PPGO **Raquel, Hugo, Lísia, Vanessa, Tânia, Eliseu, Rafael Onofre, Anelise, Jovito, Eliana, Luciana**, obrigada pela troca de experiências, risadas e pelo carinho de sempre.

À minha irmã **Luisiane**, pelo amor, incentivo e por sempre acreditar em mim. Aos meus cunhados **César, Marília e João Francisco**, meus sogros **Vera e Ricardo** e à vó **Lygia** pelo carinho de sempre. À minha sobrinha **Manuela** e ao meu afilhado **João Henrique**, obrigada por alegrarem a minha vida.

Aos colegas de “Marinha”: CT(CD) **Meyrelane**, 1ºT(CD) **Paula**, 1ºT(RM2-CD) **Karine**, 1ºT(RM2-CD) **Elisa**, 1ºT(RM2-CD) **Dametto**, 1ºT(RM2-CD) **Ricardo Lima**, 1ºT(RM2-CD) **Vanessa**, 1ºT(RM2-CD) **Sudatti**, 1ºT(RM2-CD) **Beber**, 2ºT(RM2-CD) **Vívian**, 2ºT(RM2-CD) **Caroline Bueno**, Cb. **Sardeiro**, Cb. **Abreu**, Cb. **Blanco**, Mn. **Machado**, Cb. **Vanessa** e Cb. **Lidiane** obrigada pelo incentivo e companhia diária, em especial, ao meu chefe CT(CD) **Zeleniakas**, agradeço a compreensão e incentivo.

Ao PPGO, Coordenação, funcionários e demais professores pela oportunidade de crescimento profissional e pelos ensinamentos transmitidos.

À CAPES por financiar meus estudos em boa parte deste curso.

Obrigada a todos por participarem desta etapa da minha vida, pois direta, ou indiretamente me fizeram crescer, tanto pessoalmente como profissionalmente.

Resumo

SILVA, Deise de Avila. **Avaliação de parâmetros para identificação do potencial de transformação contido em lesões orais potencialmente malignas**. 2012. 81f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Pelotas.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão imuno-histoquímica do MAGE (Y-18) em LPM e malignas de pacientes com e sem fator de risco associado, bem como verificar a variabilidade interexaminadores na classificação histológica das displasias epiteliais orais. Foram utilizadas amostras incluídas em parafina de 20 casos de displasia severa/carcinoma *in situ* e 20 casos de CEC intraoral, sendo que em cada grupo as amostras estavam distribuídas entre pacientes com e sem fator de risco associado à ocorrência da lesão (tabaco e álcool). A expressão imuno-histoquímica positiva de MAGE (Y-18) foi definida por um padrão de coloração citoplasmático, sendo utilizado um sistema de pontuação considerando a homogeneidade da reação. Para classificar as displasias epiteliais orais, 75 casos de lesões orais potencialmente malignas foram selecionados de um serviço de referência em patologia bucal. Três patologistas analisaram as lâminas de forma independente e “cega” em dois momentos. Na primeira etapa foram disponibilizadas aos examinadores as lâminas coradas em H&E juntamente com as informações clínicas de cada caso e os patologistas classificaram as lesões em sem displasia, displasia leve, moderada, severa ou carcinoma *in situ*. Na segunda etapa, os avaliadores não tiveram acesso às informações clínicas e classificaram as lâminas em duas categorias: baixo risco (lesão não displásica/displasia leve) e alto risco (displasia moderada/severa/carcinoma *in situ*). A análise das reações imuno-histoquímicas demonstrou positividade em 4/20 LPM e 17/20 CEC. Pelo teste de Kruskal-Wallis observou-se diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos de CEC e o grupo das lesões potencialmente malignas sem fator de risco. O teste de Mann-Whitney verificou diferença estatisticamente significativa entre os carcinomas e as lesões potencialmente malignas ($p < 0,001$). O teste Exato de Fischer não demonstrou diferença estatisticamente significativa entre as lesões de mesmo diagnóstico histológico quando comparadas nos subgrupos de fator de risco associado ($p = 1$). Nossos resultados sugerem que a detecção do antígeno MAGE pode ser útil na identificação de LPM com maior risco de progressão para o CEC invasivo, mas parece não ter relação com a exposição aos fatores de risco mais conhecidos. Quando na classificação das displasias, independente do sistema de classificação utilizado, a concordância entre os avaliadores e o padrão ouro variou de fraca a moderada. Na primeira etapa, o Coeficiente de Correlação Intraclass demonstrou uma concordância moderada entre os avaliadores 1 e 3 ($r = 0,479$ e $r = 0,544$) e uma concordância baixa do avaliador 2 ($r = 0,384$). No segundo momento observou-se uma concordância moderada entre os examinadores 2 e 3 e o padrão ouro ($k = 0,433$ e $k = 0,422$) e uma baixa concordância entre o avaliador 1 e o padrão ouro ($k = 0,186$). Tendo em vista que a graduação da displasia é um processo subjetivo, e que ainda não dispomos de nenhum exame que supere a observação histológica no diagnóstico das displasias epiteliais orais, entendemos que o processo de graduação entre dois ou mais observadores deve ser incentivado, a fim de auxiliar na definição mais precisa do diagnóstico.

Palavras-chave: Carcinoma Espinocelular. Leucoplasia. Displasia Epitelial Oral. MAGE (Y-18). Imuno-histoquímica. Concordância interexaminadores. Graduação histológica.

Abstract

SILVA, Deise de Avila. **Evaluation parameters for identifying the potential for change contained in potentially malignant oral lesions.** 2012. 81f. Dissertação (Mestrado). Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Universidade Federal de Pelotas

This study aims to evaluate the immunohistochemical expression of antibody MAGE-(Y18) in potentially malignant oral lesions and malignant lesions in patients with or without factor risk, and also to check the interexaminers variability on histological classification of oral epithelial dysplasia. Paraffin-embedded samples of 20 cases of severe dysplasia/carcinoma in situ and 20 cases of intraoral squamous cell carcinoma (SCC) were used in the study, and in both groups the samples had been distributed between patients with and without other risk factors associated with the occurrence of injury (tobacco and alcohol). The positive immunohistochemical expression of MAGE(Y-18) was defined by a cytoplasmic staining pattern, and it was used a scoring system considering the homogeneity of the reaction. In order to verify the interexaminer variability when performing a histological classification of oral epithelial dysplasia, 75 cases of potentially malignant oral lesions were selected from a referral service in oral disease. Slides were read independently and blindly by three pathologists in two stages. In the first stage it was made available to examiners the slides stained with H & E along with the clinical information of each case, and pathologists had to classify the lesions: no dysplasia, mild dysplasia, moderate dysplasia, severe dysplasia or carcinoma in situ. In the second stage, it was not given access to clinical information to the examiners, and they had to classify slides into two categories: low risk (non-dysplastic lesions / mild dysplasia) and high risk (moderate or severe dysplasia / carcinoma in situ). . The results were positive in 4/20 PML and 17/20 SCC. Through the Kruskal-Wallis test, it was observed a statistically significant difference ($p < 0.05$) between groups of CPB and the group of potentially malignant lesions (PML) without the risk factor. The Mann-Whitney test found a statistically significant difference between carcinomas and potentially malignant lesions ($p < 0.001$). The Fisher Exact test showed no statistically significant difference between the lesions that had the same histological diagnosis when compared in subgroups of associated risk factor ($p = 1$). Detection of MAGE antigen may be useful in identifying LPM that has a higher risk of progression to invasive SCC, but it seems to be unrelated to exposure to popular risk factors. The agreement between the examiners and the gold standard ranged from low to moderate, regardless of the classification system that was used. In the first stage, the intraclass correlation coefficient showed a moderate agreement between examiners 1 and 3 ($r = 0.479$ and $r = 0.544$) and, a low agreement of the examiner 2 ($r = 0.384$). In the second phase, it was observed a moderate agreement between examiners 2 and 3 and the gold standard ($k = 0.433$ $k = 0.422$) and, a low concordance between the examiner 1 and the gold standard ($k = 0.186$). Taking into account that grading dysplasia is a subjective process and still there is no test that outperforms the histological observation on diagnosis of oral epithelial dysplasia, it is understood that the process of grading made by two or more examiners should be encouraged, in order to assist in defining more precisely the diagnostics.

Keywords: Squamous cell carcinoma. Leukoplakia. Oral Epithelial Dysplasia. MAGE (Y-18). Immunohistochemistry. interexaminer agreement. Histological grading.

Lista de Figuras

Figura 1 Padrão da expressão imuno-histoquímica do MAGE (Y-18) em lesões orais malignas e potencialmente malignas	56
---	----

Lista de Tabelas

Tabela 1 Soros primários - especificidades, diluições, fontes e tempo de incubação.....25

Tabela 1 Distribuição dos casos de acordo com sexo e idade dos pacientes e local da lesão.....55

Tabela 2 Escores de marcação para MAGE (Y-18) nos diferentes grupos analisados.....55

Lista de Abreviaturas e Símbolos

CDDB – Centro de Diagnóstico das Doenças da Boca

CEC – Carcinoma Espinocelular

DNA – Ácido Desoxirribonucleico

FO-UFPeI – Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas

HPV – Human Papiloma Virus

INCA – Instituto Nacional do Câncer

LP – Líquen Plano

MAGE – Melanoma Antígeno associado

OMS – Organização Mundial da Saúde

PCR – Reação de Polimerase em Cadeia

Sumário

1	Projeto de Pesquisa	14
2	Relatório de Trabalho de Campo.....	38
3	Artigo 1	39
4	Artigo 2.....	61
5	Conclusões Gerais.....	71
6	Referências Gerais.....	73
7	Anexos.....	80

1 Projeto de Pesquisa

1.1 Antecedentes e justificativa

1.1.1 Carcinoma espinocelular

Mais de 90% das neoplasias malignas no trato aerodigestivo superior são carcinomas espinocelulares (CEC). Globalmente há uma grande variação geográfica (cerca de 20 vezes) na incidência deste câncer, com áreas caracterizadas por altas taxas de incidência de CEC bucal (excluindo lábio) sendo encontradas nas regiões Sul e Sudeste da Ásia (Sri Lanka, Índia, Paquistão e Taiwan), partes do oeste europeu (França) e na Europa Oriental (Hungria, Eslováquia e Eslovênia), partes da América Latina e Caribe (Brasil, Uruguai e Porto Rico) e em regiões do Pacífico (Papua Nova Guiné e Melanésia) (WARNAKULASURIYA, 2009). Esta doença debilitante corresponde a 8^a e 13^a neoplasia maligna mais comum no mundo para homens e mulheres, respectivamente (CHEONG et al., 2009).

A população masculina brasileira apresenta o terceiro maior risco mundial para o CEC bucal perdendo apenas para França e Índia (WARNAKULASURIYA, 2009). De acordo com o INCA (Instituto Nacional do Câncer) foram estimados 14.120 casos novos de CEC bucal para o ano de 2010 em todo Brasil, esta lesão corresponde ao sétimo tipo de câncer mais comum na população brasileira, sendo a distribuição dos casos bastante heterogênea em todos os estados e capitais do país. As regiões Sul e Sudeste apresentam os maiores índices deste tipo de CEC, enquanto as regiões Norte e Nordeste têm taxas mais baixas. Dos vários registros de base populacional, São Paulo e Porto Alegre registraram os números mais altos de câncer bucal.

O CEC bucal constitui um tumor maligno epitelial agressivo com cerca de 5 anos de sobrevida para menos de 50% dos pacientes. Esta taxa de sobrevida é principalmente devido ao alto índice de recorrência do câncer local, embora metástases à distância também possam ocorrer (CALDEIRA et al., 2011; WARNAKULASURIYA, 2009; YOUNG et al., 2007).

Um fator fundamental na ausência de melhora do prognóstico ao longo dos anos é o fato de uma significativa proporção de CECs bucais não serem diagnosticados ou tratados até chegarem a um estágio avançado. Este atraso no diagnóstico pode ser

causado pelo paciente, que não observa alterações incomuns na própria cavidade oral, ou pelos profissionais de saúde, que não investigam adequadamente as lesões observadas (EPSTEIN; ZANG; ROSIN, 2002; GROOME et al., 2011).

O prognóstico para pacientes com carcinoma espinocelular de boca que são tratados precocemente é muito melhor, com taxas de sobrevida em 5 anos de até 80%. Além disso, a qualidade de vida melhora depois do tratamento precoce, porque a cura pode ser alcançada com cirurgia menos complexa e tratamento menos agressivo do que o necessário para lesões avançadas (EPSTEIN; ZANG; ROSIN, 2002).

Apesar da melhoria contínua na reconstrução cirúrgica e regimes de radioterapia, a detecção e o diagnóstico precoce do CEC é ainda a abordagem mais eficaz para reduzir a morbidade e mortalidade. Até agora, a coleta de tecido pela biópsia e posterior análise histológica tem sido o padrão ouro para o diagnóstico das doenças bucais. Por conseguinte, a intervenção clínica adequada deve ser baseada na histopatologia da lesão. É evidente que as biópsias incisionais de lesões suspeitas têm uma reprodutibilidade limitada dentro de toda a lesão, podendo resultar em cirurgia mais ou menos agressiva e/ou abordagem por quimio ou radioterapia. Assim, a identificação de ferramentas de diagnóstico mostra-se crucial para que se obtenha uma análise mais representativa de qualquer lesão suspeita (METZLER et al., 2009).

Após a excisão de lesões potencialmente malignas e malignas, as margens podem aparecer clínica e histologicamente com limites normais, mas elas podem manter os marcadores genéticos de aumento do risco de malignização. Por isso, evidência molecular de margens livres é essencial na confirmação e acompanhamento das lesões e podem, no futuro, tornarem-se marcadores adequados de tratamento. Fatores de risco conhecidos para câncer bucal, incluindo o uso de tabaco e álcool, podem resultar em grandes áreas de mudança na mucosa oral (que é conhecido como cancerização de campo). Alterações moleculares podem estar presentes nestas áreas antes que mudanças fenotípicas celulares se tornem detectáveis por microscopia de luz (CHEONG et al., 2009, EPSTEIN; ZANG; ROSIN, 2002).

De acordo com Dahlstrom et al. (2008) o CEC dos pacientes com fator de risco associado (fumo e álcool) difere em muitas variáveis daqueles que ocorrem em pacientes não tabagistas e não etilistas, pois este último acomete principalmente pacientes mais jovens (antes dos 50 anos) e mulheres idosas (após os 70 anos)

ocorrendo com maior frequência na orofaringe e cavidade oral, afetando especialmente a língua e gengiva. Fatores como a exposição ambiental à fumaça e agentes carcinógenos, (por exemplo, os fumantes passivos), exposição à radiação ionizante e a doença do refluxo gastro-esofágico podem estar associados à ocorrência do CEC nestes pacientes. Kruse, Bredell e Klaus (2010) observaram uma média de idade mais elevada para os pacientes com CEC não fumantes do que fumantes (71,4 e 63,7 anos respectivamente).

O Papilomavírus humano tipo 16 (HPV-16) tem sido associado à etiologia do CEC da orofaringe, principalmente em não fumantes, e à crescente incidência de câncer em adultos jovens. As duas proteínas oncogênicas do HPV-16, E6 e E7, podem influenciar as vias do Rb e p53 e causar instabilidade genômica através da desregulação de importantes processos celulares, incluindo o reparo do DNA, controle do ciclo celular, e apoptose (DAHLSTROM et al., 2008; FELLER et al., 2010; KRUSE, BREDELL e KLAUS, 2010). Entretanto, Tsantoulis et al. (2007) afirmaram que o HPV sozinho é incapaz de induzir a transformação maligna. Em vez disso, a ação tumorigênica do HPV, provavelmente torna-se significativa em sinergia com carcinógenos químicos e outros fatores de risco.

O modelo de múltiplos passos da carcinogênese é amplamente aceito e requer a transição por etapas a partir de lesões potencialmente malignas para o fenótipo do tumor metastático. Uma variedade de alterações acumula-se para potencializar esta transição e aumentar gradualmente a malignidade. Progressão similar tem sido demonstrada ocorrendo em hiperplasia benigna para câncer bucal, de displasia para carcinoma *in situ* e no câncer avançado com acompanhamento de alterações genômicas. Várias lesões orais são de particular relevância como precursoras do câncer oral: leucoplasia, eritroplasia e líquen plano (TSANTOULIS et al., 2007). O grau e a quantidade de alterações genéticas nas lesões potencialmente malignas, bem como a similaridade com as encontradas no CEC é, até certo ponto, dependente da presença de atipias, contudo, lesões individuais possuem traços moleculares genéticos em comum com CEC, mesmo na ausência de displasia definida histologicamente (MITHANI et al., 2007).

Espera-se que os marcadores moleculares tornem-se essenciais no diagnóstico e manejo de pacientes com câncer bucal, orientando futuros estudos e cuidados clínicos e, em última instância levando a novas intervenções dirigidas às mudanças moleculares dos carcinomas. O uso de marcadores moleculares permite o diagnóstico

precoce e o estadiamento das alterações teciduais, antes das mudanças na morfologia celular e, certamente, antes das alterações teciduais tornarem-se clinicamente visíveis.

1.1.2 Lesões Potencialmente Malignas

A identificação de lesões orais com alto risco de transformação maligna, bem como a detecção precoce dos tumores orais continua a ser uma importante questão clínica a ser resolvida e pode constituir uma das chaves para reduzir a morbidade, mortalidade e custos de tratamento associado ao CEC (EPSTEIN; ZANG; ROSIN, 2002; SCHEIFELE; REICHART; DIETRICH, 2003).

Leucoplasia e eritroplasia são os precursores mais comuns do carcinoma espinocelular. Apesar de várias tentativas recentes na literatura para melhorar ou modificar a definição de leucoplasia e eritroplasia, o conceito fornecido pela Organização Mundial da Saúde (1978) ainda prevalece: "Leucoplasia constitui-se de mancha branca que não pode ser caracterizada clinicamente ou histopatologicamente como qualquer outra lesão definível". Na prática diária, os especialistas estendem essa definição, adicionando que a leucoplasia "não é destacável", o que facilita a distinção entre leucoplasia e candidíase pseudomembranosa, que também se apresenta como uma lesão esbranquiçada. Eritroplasia, de forma semelhante à leucoplasia, é definida como uma "mancha vermelha que não pode ser caracterizada clinicamente ou histopatologicamente como qualquer outra lesão definível".

A prevalência estimada de leucoplasia oral em todo o mundo é aproximadamente 2%. Existem algumas diferenças geográficas no que diz respeito à distribuição por sexo. Caracteriza-se por ser uma lesão mais comum entre fumantes que entre não fumantes. O álcool é tido como um fator de risco independente, mas dados definitivos são ainda inexistentes. Existem resultados contraditórios relacionados ao possível papel da infecção pelo papilomavírus humano no desenvolvimento dessa condição (HUBER, 2010; VAN DER WAAL, 2010).

Clinicamente, a leucoplasia é tradicionalmente descrita como sendo homogênea ou não homogênea. A homogênea apresenta-se como uma placa branca uniformemente lisa, fina, com fissuras rasas ou rachaduras na superfície. A não homogênea pode ter uma variedade de apresentações: salpicado (lesão vermelha misturada com branco, este predominando), nodular (pequenas excrescências polipoides vermelhas ou brancas), e verrucosas (superfície amassada ou ondulada).

Lesões sugestivas de leucoplasia devem ser biopsiadas e monitoradas periodicamente. Embora a prevalência de leucoplasia seja maior em homens, as mulheres possuem maior risco para transformação maligna. A caracterização clínica e o local de ocorrência podem afetar o risco de transformação. Leucoplasias com um componente vermelho são mais propensas a sofrer transformação maligna, assim como as que acometem língua, gengiva e assoalho de boca. Paradoxalmente, o risco de malignização é maior nos pacientes que não fazem uso do tabaco do que nos que fazem (HUBER, 2010).

As leucoplasias são reconhecidas como os progenitores mais frequentes de CEC. Tem sido relatado que entre 11 e 67% de todos os CECs desenvolvem-se a partir de tais lesões potencialmente malignas (SCHEIFELE; REICHART; DIETRICH, 2003). Além da leucoplasia, a eritroplasia e o líquen plano (LP) também são apontados pela literatura como lesões orais com elevado potencial de transformação maligna (MITHANI et al., 2007; RIES et al., 2009).

De acordo com Warnakulasuriya, Johnson e Van der Waal (2007), há controvérsias quanto à natureza potencialmente maligna do LP. A taxa de transformação maligna relatada anualmente é inferior a 0,5%, e aparentemente pode ocorrer em todos os tipos de líquen (Van der Waal, 2010). A Organização Mundial da Saúde classifica o LP como uma condição pré-cancerosa que é "um estado generalizado associado a um significativo aumento do risco de câncer" (HUBER, 2010).

A displasia liquenóide consiste em uma combinação histológica da displasia epitelial oral com certas características do líquen plano, principalmente o infiltrado inflamatório, não constitui uma variante do LP, mas uma entidade distinta que tem um verdadeiro potencial de transformação maligna. As características clínicas da displasia liquenóide são mais típicas de lesões potencialmente malignas do que as do LP (KRUTCHKOFF; EISENBERG, 1985).

1.1.3 Classificação das Displasias Epiteliais Oraís

Embora nem leucoplasia nem eritroplasia sejam sinônimo de displasia epitelial ou carcinoma, é reconhecido que estas são as lesões orais em que alterações malignas ocorrem com maior grau de frequência em comparação à mucosa oral normal (BRENNAN et al., 2007).

As displasias epiteliais são reconhecidas como precursores frequentes do CEC e apresentam-se predominantemente como lesões brancas, vermelhas ou uma mistura de branco e vermelho (ARDUINO et al., 2009).

Sob o microscópio, lesões clinicamente leucoplásicas podem demonstrar um espectro de possíveis características histopatológicas que vão desde hiperplasia epitelial não displásica e/ou hiperkeratose a achados indicativos de displasia (BRENNAN et al., 2007).

O diagnóstico e classificação das displasias epiteliais orais são baseados em uma combinação de mudanças arquitetônicas e citológicas de acordo com a espessura ou níveis em que estes ocorrem, assim, a WHO (1978), definiu os critérios arquiteturais em: estratificação epitelial irregular, perda de polaridade e/ou hiperplasia da camada de células basais, infiltração epitelial em forma de cristas, aumento do número de figuras de mitose, mitoses superficiais anormais, ceratinização prematura de células individuais (disqueratose), presença de pérolas de ceratina. Os critérios citológicos ficaram definidos como: variação anormal do tamanho e/ou forma do núcleo, variação anormal do tamanho celular e/ou do formato da célula, aumento da relação núcleo-citoplasma, figuras de mitose atípicas, aumento do número e tamanho dos nucléolos, hiperkeratose.

Quando biópsias de manchas brancas ou vermelhas diagnosticadas como leucoplasia ou eritroplasia são submetidas a exame microscópico, o patologista classifica-as em várias categorias como: sem displasia, com displasia leve, moderada ou displasia severa. A maioria dos patologistas leva em conta uma combinação de características microscópicas. Para se chegar a um grau, geralmente o pior local observado na lâmina é marcado (WARNAKULASURIYA, 2001). Dessa forma as lesões potencialmente malignas, quando analisadas histologicamente poderão ser classificadas como:

Sem displasia: ao exame histológico é observada a presença de epitélio normal, sem atipias ou distúrbios arquiteturais em toda a sua extensão.

Displasia leve: quando os distúrbios arquiteturais estiverem limitados ao terço inferior do epitélio, acompanhado por um mínimo de atipia citológica.

Displasia moderada: a alteração arquitetural chega ao terço médio do epitélio. A presença de atipia acentuada pode indicar que a lesão deve ser classificada como displasia grave, apesar de não estender no terço superior do epitélio.

Displasia severa: quando mais de dois terços do epitélio mostrarem distúrbio arquitetônico associado com atipia citológica temos esse tipo de displasia.

Carcinoma *in situ*: quando a transformação maligna ocorreu, mas a invasão não está presente. Observa-se a presença de anomalias arquitetônicas acompanhada de pronunciada atipia citológica em toda ou quase toda espessura do epitélio.

Uma das principais limitações existentes no uso de critérios histológicos para prever o potencial de transformação das displasias é a subjetividade inerente o sistema de classificação em si (BRENNAN et al., 2007).

Isto se deve principalmente à falta de critérios bem definidos que possam ser usados como diretrizes para classificação. Na graduação das displasias, a espessura (altura) em que as mudanças celulares se estendem no tecido epitelial é levada em consideração. No entanto, existe uma grande variação na espessura do epitélio pavimentoso na cavidade oral, levando a dificuldades práticas na utilização desse sistema de pontuação (WARNAKULASURIYA, 2001).

Embora a presença de displasia epitelial seja um dos preditores no prognóstico de transformação de lesões potencialmente malignas, reconhece-se que, ocasionalmente, lesões não displásicas podem se transformar em câncer, assim como regressões espontâneas também foram relatadas, sobretudo após a interrupção dos hábitos associados com o risco de CEC, por exemplo, tabaco, álcool e mudanças no estilo de vida, como a intervenção dietética (ARDUINO et al., 2009; BRENNAN et al., 2007).

Segundo Warnakulasuriya (2001), a presença e severidade da displasia são frequentemente consideradas como indicadoras do estado de risco de uma lesão potencialmente maligna e que as displasias severas indicam um risco mais elevado de desenvolvimento subsequente de câncer. Entretanto, estudos retrospectivos demonstraram que graus severos de displasia não estão necessariamente ligados a maiores taxas de transformação em CEC. Além disso, ainda faltam sistemas de classificação histológica confiáveis e marcadores de prognóstico para o CEC (ABRAHÃO et al., 2011).

Abbey et al. (1998) avaliaram o grau de concordância diagnóstica entre seis patologistas orais quando as informações clínicas dos casos foram fornecidas ou omitidas e, em uma avaliação de 120 lâminas, concluíram que quando a informação clínica foi utilizada, ocorreu a diminuição da precisão do diagnóstico.

Brothwell et al. (2003) avaliaram o grau de concordância inter e intra-examinadores no diagnóstico de displasias epiteliais orais. Após a avaliação independente de 64 lâminas por três patologistas orais e utilizando o diagnóstico inicial como padrão ouro, os autores verificaram que o grau de concordância intra-observador foi maior que o inter-observadores, o que pode ser explicado pela diferença na formação dos indivíduos, bem como por opiniões diversas em que alguns critérios sejam mais importantes que outros na categorização das displasias. Sugeriram, então, que a variação na avaliação das displasias pode diminuir se exercícios de calibração forem implementados.

Kujan et al. (2006) avaliaram a reprodutibilidade e a precisão de um sistema de classificação binária (alto e baixo risco) das displasias epiteliais orais comparando-o com a classificação da OMS de 2005. Noventa e seis lâminas coradas pelo método H&E foram avaliadas por quatro patologistas. Os resultados demonstraram um grau satisfatório de concordância quanto a distinção entre displasia leve, displasia severa e carcinoma *in situ* usando a classificação da OMS, entretanto, a avaliação da displasia moderada mostrou-se problemática. Quanto ao sistema binário, a sensibilidade e especificidade foram de respectivamente 85 e 80%, sendo que a precisão foi de 80%. Dessa forma, os autores concluíram que o novo sistema complementa a classificação da OMS (2005) e poderá ajudar nas decisões clínicas particularmente nas displasias moderadas, além disso, a pontuação binária apresentou maior consenso entre os patologistas e outras pesquisas sobre esse sistema de classificação deverão ser incentivadas.

Kujan et al. (2007) avaliaram os motivos da variação inter-observadores na classificação das displasias epiteliais orais, quatro avaliadores, sendo três patologistas orais e um patologista geral examinaram sessenta e oito lâminas de graus variáveis de displasia considerando a classificação da OMS (2005) quanto às mudanças arquiteturais e citológicas dos tecidos. Para as alterações individuais os valores de kappa inter-observadores variaram de fraco a moderado demonstrando a pouca concordância existente. Concluíram, assim, que a melhoria no padrão de concordância poderá ser alcançada com a definição universal de características arquitetônicas e citológicas, que o processo de graduação entre dois ou mais observadores deve ser incentivada a fim de ajudar a eliminar erros e que estudos futuros acerca do câncer e das lesões potencialmente malignas poderão construir uma base sólida para o diagnóstico e tratamento destas lesões.

1.1.4 MAGE-A e NY-ESO

A transição da mucosa normal para o CEC invasivo é um processo complexo de várias etapas, com uma etiologia multifatorial (KÜFFER, LOMBARDI, 2002). A carcinogênese oral é impulsionada por mudanças genéticas que ocorrem frequentemente devido aos padrões de expressão alterada de vários genes. Acredita-se que determinadas alterações são acompanhadas em definitivo por alterações histopatológicas (RIES et al., 2009).

Vários marcadores potenciais das alterações moleculares em lesões orais potencialmente malignas e malignas têm sido estudados, e o interesse na associação destas alterações genéticas com as lesões é crescente. A progressão da doença, de benigna a maligna, é um processo genético que mais tarde torna-se evidente em nível celular (alteração fenotípica) e, finalmente, em nível clínico (EPSTEIN; ZANG; ROSIN, 2002).

O prognóstico ruim dos pacientes que sofrem de carcinoma espinocelular bucal avançado é em grande parte devido à ausência de marcadores sensíveis e específicos para a detecção precoce de tumores primários ou células malignas que podem ser usados para determinar o risco de desenvolvimento de tumor em lesões precursoras, uma vez que tumores primários podem se originar de lesões potencialmente malignas, como a leucoplasia, a eritroplasia e o líquen plano (RIES et al., 2009).

A década de 1990, principalmente, se caracterizou pelo isolamento de um grande número de genes que codificam antígenos humanos específicos do tumor, incluindo famílias de antígeno melanoma MAGE, BAGE, GAGE, LAGE (NY-ESO-1). Desde então, essas famílias de genes tem crescido constantemente e os genes MAGE têm atraído a atenção como alvos potenciais para a imunoterapia devido à sua expressão quase tumor específica (FORSLUND; NORDQVIST, 2001; HAIER, 2006). Em 1991, os pesquisadores isolaram o primeiro antígeno melanoma associado, MAGE-A1. Nos anos seguintes, dezenas de novas proteínas foram identificadas. Embora vários trabalhos tenham investigado a expressão dos genes MAGE-A, relativamente pouco é conhecido de suas funções (XIAO; CHEN, 2004).

Em tecidos adultos, a maioria dos genes MAGE é expressa apenas no testículo e os padrões de expressão sugerem que esta família de genes está envolvida em células germinativas de desenvolvimento (FORSLUND; NORDQVIST, 2001; HAIER, 2006).

Antígenos melanoma-associado MAGE-A não são expressos em tecidos adultos normais, com exceção das células germinais masculinas, mas muitas vezes são expressos em uma variedade de tecidos tumorais. Por exemplo, MAGE-A é expresso em uma alta porcentagem de tumores de boca, mas não na mucosa oral normal e saudável (JUNGBLUTH 2000; RIES et al., 2009). Assim, se antígenos MAGE-A estão presentes, uma lesão benigna pode ser claramente distinguida de uma lesão maligna com a tecnologia adequada, com altíssima precisão (KRAUSS et al., 2010; RIES et al., 2009).

Cuffel et al. (2010), avaliando a expressão em PCR e imuno-histoquímica de antígenos MAGE-A e NY-ESO-1 em CEC de cabeça e pescoço, verificaram que 88% das amostras que mostraram positividade para MAGE-A3 ou MAGE-A4 no PCR também foram positivas para imuno-histoquímica e dos 12 casos testados com PCR para o NY-ESO-1, sete mostraram positividade em imuno-histoquímica, sugerindo, assim que estes genes podem ser utilizados como marcadores prognóstico para estes tipos de CEC.

Em um estudo de 2009, Ries et al. utilizando o NY-ESO em RT-PCR em amostras de CEC bucal, notou uma significativa correlação deste antígeno com o tamanho do tumor, relacionando sua maior expressão ao estadiamento tumoral. Cabe salientar que, neste estudo, o NY-ESO foi verificado em 27,7% dos tumores examinados. A taxa de expressão não foi tão alta quanto a esperada e, portanto, este antígeno não poderia ser usado como um marcador diagnóstico biológico mas seria um instrumento útil a ser empregado dentro da análise múltipla de biomarcadores, especialmente MAGE-A, aumentando a sensibilidade de detecção de células tumorais e de células neoplásicas que são indetectáveis em microscópio.

De acordo com Haier et al. (2006) a especificidade relativamente elevada de expressão do MAGE-A em células tumorais qualifica essas proteínas de superfície como potenciais marcadores de prognóstico.

Krauss et al. (2010), avaliaram a marcação imuno-histoquímica do MAGE-A em lesões benignas, pré-malignas e malignas da mucosa oral. Retrospectivamente, biópsias de diferentes lesões orais foram selecionadas: 64 lesões benignas (25 lesões traumáticas, 13 folículos dentários, e 26 épulis), 26 líquens planos orais, 123 lesões potencialmente malignas do epitélio (32 hiperplasias epiteliais encontradas em leucoplasias, 24 de displasia epitelial, 26 eritroplasias com displasias epiteliais orais, e 41 carcinomas *in situ* em eritroleucoplasias). Os espécimes foram submetidos a

reação com imuno-histoquímica para anticorpos poli-MAGE-A 57B, e os resultados foram comparados. Os autores verificaram que o grau de marcação de lesões potencialmente malignas ou malignas variou de 33% para 65%. Dessa forma, os antígenos MAGE-A poderiam facilitar a diferenciação entre lesões potencialmente malignas e malignas da mucosa oral.

Os antígenos MAGE-A podem melhorar significativamente o diagnóstico e diferenciação das lesões orais, o seu valor real tem de ser validado por estudos de acompanhamento clínico. (KRAUSS et al., 2010). Os antígenos MAGE-A podem ser ainda um importante objeto para futuros estudos em CEC e melhorar a estimativa do risco individual dos pacientes (MÜLLER-RICHTER et al., 2010).

1.2 Objetivo

1.2.1 Objetivo Geral

- a. O objetivo deste trabalho será avaliar a expressão imuno-histoquímica dos anticorpos multi-MAGE- α , MAGE-A1, MAGE-(Y-18), MAGE-A10 e NY-ESO em lesões potencialmente malignas e malignas de pacientes com e sem fator de risco associado.
- b. Verificar a variabilidade interexaminadores na classificação histológica das displasias epiteliais orais.

1.2.2 Objetivos Específicos

- a. 1) Verificar se detecção pela marcação imuno-histoquímica de células epiteliais transformadas pode servir como preditor do comportamento clínico das lesões potencialmente malignas orais.
- a. 2) Comparar o padrão de marcação imuno-histoquímica em lesões de pacientes com e sem fator de risco associado, buscando identificar a existência de vias moleculares distintas atuando no processo de carcinogênese.
- b. 1) Obter subsídios, por meio da verificação da variabilidade na classificação das displasias, para a elaboração de estratégias futuras na rotina do diagnóstico histológico.

1.3 Metodologia

Expressão de multi-MAGE- α , MAGE-A1, MAGE-(Y-18), MAGE-A10 e NY-ESO em carcinomas espinocelulares e leucoplasias de pacientes com e sem fator de risco associado

1.3.1 Seleção dos casos e análise morfológica

Quarenta espécimes fixados em formol 10% e incluídos em parafina serão obtidos dos Arquivos do Centro de Diagnóstico das Doenças da Boca (CDDDB) da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Pelotas. Serão utilizadas 20 amostras de casos de displasia liquenóide/displasia severa/carcinoma *in situ* e 20 amostras de carcinoma espinocelular intraoral, sendo que em cada grupo, dez amostras serão de pacientes com fator de risco associado à ocorrência da lesão (tabaco e álcool), e dez sem fator de risco relatado.

As lâminas referentes aos casos selecionados e coradas pelo método da hematoxilina e eosina (H & E) serão submetidas a estudo morfológico em microscopia de luz para confirmação do diagnóstico previamente obtido.

Os dados referentes a sexo, idade, local da lesão e exposição a fatores de risco serão obtidos dos registros dos arquivos do CDDDB.

Todos os casos serão submetidos a estudo imuno-histoquímico utilizando-se os anticorpos multi-MAGE- α , MAGE-A1, MAGE-(Y18), MAGE-A10 e NY-ESO.

1.3.2 Imuno-histoquímica

A avaliação das proteínas MAGE e NY-ESO será realizada com o auxílio da técnica imuno-histoquímica pelo método streptavidina-biotina (SABC, do inglês Streptavidina-Biotin Complex).

Todas as amostras utilizadas foram ou serão fixadas em formol 10% e emblocadas em parafina. A reação imuno-histoquímica será realizada sobre secções teciduais de 3 μ m de espessura, estendidas em lâminas de vidro previamente limpas e desengorduradas, preparadas com adesivo à base de 3-aminopropyltriethoxy-silano (1:9). Inicialmente, os cortes serão desparafinizados em dois banhos de xilol, sendo o primeiro a 60°C por 30 minutos e o segundo a temperatura ambiente por 20 minutos. Os cortes serão reidratados em cadeia descendente de etanol, a partir de três passagens em etanol absoluto, seguidos por etanol 95, 85 e 80%, durante 5 minutos

cada, e imersos por 10 minutos em solução de hidróxido de amônia a 10% para remoção do pigmento formólico. Após, proceder-se-á a lavagem em água corrente por 10 minutos e em duas passagens por água destilada.

As secções teciduais serão então submetidas ao tratamento para recuperação antigênica, o qual será realizado através da colocação das amostras histológicas em cuba contendo solução tampão de ácido cítrico pH 6,0, no microondas (1,3KW), em três ciclos de 5 minutos cada.

A seguir será realizado o bloqueio da peroxidase endógena tecidual, através de duas passagens de 5 minutos em solução de peróxido de hidrogênio 20 volumes em metanol (1:1, v/v).

Após, as secções teciduais serão incubadas com os anticorpos primários (multi-MAGE- α , MAGE-A1, MAGE-A10 e NY-ESO – doação do Prof. Dr. Giulio Spagnoli) por 18h (overnight), à 4°C e nas condições de trabalho especificadas na tab. 1. Após duas lavagens em tampão Tris-HCl (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro-RJ) por 5 minutos cada, os cortes receberão o kit LSAB (Dako Corporation, Carpinteira, CA, USA), com período de incubação de 30 minutos à temperatura ambiente, tanto para o anticorpo secundário como para o complexo terciário.

As lâminas que serão incubadas com o MAGE-(Y18), após o bloqueio da peroxidase endógena, serão incubadas por 1h seguido por duas lavagens de cinco minutos cada, com tampão Tris-HCl. Em seguida, os cortes histológicos serão incubados com o anticorpo secundário Rabbit anti-Goat IgG (Pierce® - Rockford, IL USA) por trinta minutos, seguido, novamente, por dupla lavagem em tampão Tris-HCl. Logo após, a incubação com o complexo terciário (Vectastain ABC Kit – Vector Laboratories, Inc.) será de 30 minutos.

Para todos os anticorpos, a revelação da reação será realizada com solução cromógena de diaminobenzidina (3,3'-diamino-benzidina, DakoCytomation, Inc. 6392 Via Real Carpinteria, California 93013 USA), como recomendado pelo fabricante. Os cortes serão lavados em água corrente por 10 minutos, passados duas vezes por água destilada, contra-corados com hematoxilina de Mayer por 5 minutos e novamente lavados. Após a desidratação e diafanização, montagem das lâminas será feita em Permount® (Fischer Scientific, Fair Lawn, NJ, USA).

Como controle positivo, serão utilizadas amostras de testículo de rato cedidas pelo Laboratório de Histologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal

do Rio Grande do Sul (UFRGS). Os controles negativos serão obtidos através da omissão dos anticorpos primários.

Tabela 1 Soros primários - especificidades, diluições, fontes e tempo de incubação

Especificidade	Fonte	Diluição	Tempo de incubação
Multi-MAGE- α^*	57B	Sem diluição	18 horas
MAGE-A1*	57B	Sem diluição	18 horas
MAGE-(Y-18)**		1:50 a 1:500	1 hora
MAGE-A10*	57B	Sem diluição	18 horas
NY-ESO*		Sem diluição	18 horas

* Cedido pelo Prof. Dr. Giulio Spagnoli - Switzerland

** SANTA CRUZ BIOTECHNOLOGY, INC.

1.3.3 Análise dos resultados

A expressão imuno-histoquímica positiva de multi-MAGE- α , MAGE-A1, MAGE-(Y-18), MAGE-A10 e NY-ESO será definida por um padrão de coloração citoplasmático e nuclear, por meio de análise por microscopia de luz nos quatro grupos estudados.

Para a avaliação da marcação imuno-histoquímica, um sistema de pontuação será utilizado considerando a homogeneidade da reação (escores: 0 - negativo; 1 - células positivas <25%; 2 - células positivas 25-50%; 3 - células positivas 50-75%; 4 - células positivas > 75%).

Correlação de Pearson, teste exato de Fisher, Kruskal-Wallis e Mann Whitney serão utilizados para fins estatísticos, e serão realizados com o programa Sigma-Stat 3.5 (Systat Software Inc.). Um valor de p inferior a 0,05 ($p < 0,05$) será considerado estatisticamente significativo.

Avaliação de concordância interexaminadores na classificação histológica das displasias epiteliais orais

1.3.4 Seleção dos Casos

O cálculo do tamanho amostral foi realizado usando o programa Sigma-Stat 3.5 (Systat Software Inc.). Pressupondo que a experiência dos examinadores é alta e que a concordância nos diagnósticos histopatológicos também será alta, usando os parâmetros poder estatístico 90%, erro tipo I de 5%, e coeficiente de correlação esperado de 0,75, o tamanho amostral calculado foi de 15 amostras por grupo. Serão selecionados retrospectivamente dos arquivos do CDDb 150 (cento e cinquenta) lâminas histopatológicas de casos diagnosticados como displasias epiteliais orais com diferentes graus de severidade.

Os casos selecionados para o estudo deverão ter recebido diagnóstico clínico de leucoplasia, leucoeritroplasia ou eritroplasia e possuírem ficha de biópsia contendo as seguintes informações: localização intra-oral, além de dados relativos a sexo, idade, e fatores de risco.

Um patologista bucal (examinador 1) fará uma pré-seleção dos casos, de maneira a garantir a qualidade da análise, procurando incluir casos histopatologicamente não displásicos, com displasia leve, moderada e severa ou carcinoma *in situ*. Dentre os 150 casos pré-selecionados, os 75 casos que constituirão a amostra serão escolhidos de maneira randômica pelo programa de computador Excel (Microsoft Windows Office 2010) de acordo com cada categoria de diagnóstico, de modo a assegurar que um número igual de casos de cada grau de displasia seja selecionado.

1.3.5 Desenho experimental

Três patologistas do CDDb com experiência em patologia oral (examinadores 2, 3 e 4), professores da FO-UFPel, e que rotineiramente fazem diagnósticos histopatológicos, examinarão as lâminas de forma independente e “cega”, ou seja, sem o conhecimento do diagnóstico inicial. Para cada caso selecionado uma única lâmina dos arquivos do CDDb, corada com hematoxilina-eosina será examinada por microscopia de luz.

Na primeira etapa do estudo, serão disponibilizados aos examinadores as lâminas selecionadas juntamente com as informações referentes à idade, sexo, fatores de risco e localização da lesão (Anexo 1). Os examinadores serão instruídos a

concluir o estudo em até duas semanas, por meio de exame criterioso da lâmina, determinando a presença e a severidade da displasia. Para determinação do diagnóstico serão considerados os critérios estabelecidos pela Organização Mundial da Saúde (OMS) em 2005.

Não haverá treinamento para padronização na aplicação dos critérios classificatórios pelos patologistas, pois será avaliada, neste momento, a variabilidade de diagnóstico na rotina do Serviço de Patologia do CDDB.

Cada profissional deverá classificar os casos em dois momentos diferentes, com intervalo de 30 dias, utilizando duas escalas:

Escala 1 – classificar o caso em lesão sem displasia, displasia leve, displasia moderada, displasia severa ou carcinoma in situ;

Escala 2 – seguindo a orientação do The Working Group (OMS, 2005) considerar duas categorias:

A – Baixo risco (lesão não displásica/duvidosa/displasia);

B – Alto risco (moderada/severa/carcinoma in situ).

O diagnóstico histopatológico inicial será obtido dos registros de CDDB e utilizado como “padrão ouro”, assim como no trabalho de Brothwel et al. (2003) e Abbey et al. (1998).

1.3.6 Análise estatística

Os níveis de concordância entre os examinadores serão analisados separadamente para escalas de cinco e dois pontos. O cálculo de correlação interexaminadores será obtido pelo teste de Spearman.

1.4 Referências

- ABBEY, L. M.; KAUGARS, G.E.; GUNSOLLEY, J. C.; BUMS, J. C.; PAGE, D. G.; SVIRSKY, J. A.; EISENBERG, E.; KMTCHKOFF, D. J. The effect of clinical information on the histopathologic diagnosis of oral epithelial dysplasia. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontics**, v. 85, n. 1, p. 74-77, 1998.
- ABRAHAO, A. C.; BONELLI, B. V.; NUNES, F. D.; DIAS, E.P.; CABRAL, M. G. Immunohistochemical expression of p53, p16 and hTERT in oral squamous cell carcinoma and potentially malignant disorders. **Brazilian Oral Research**, v. 25, n. 1, p. 34-41, 2011.
- ARDUINO, P. G.; SURACE, A.; CARBONE, M.; ELIA, A.; MASSOLINI, G.; GANDOLFO, S.; BROCCOLETTI, R. Outcome of oral dysplasia: a retrospective hospital-based study of 207 patients with a long follow-up. **Journal Oral Pathology & Medicine**, v. 38, n. 6, p. 540–544, 2009.
- BRENNAN, M.; MIGLIORATI, C. A.; LOCKHART, P. B.; WRAY, D.; AL-HASHIMI, I.; AXÉLL, T.; BRUCE, A. J.; CARPENTER, W.; EISENBERG, E.; EPSTEIN, J. B.; HOLMSTRUP, P.; JONTELL, M.; NAIR, R.; SASSER, H.; SCHIFTER, M.; SILVERMAN, B.; THONGPRASOM, K.; THORNHILL, M.; WARNAKULASURIYA, S.; VAN DER WAAL, I. Management of oral epithelial dysplasia: a review. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontics**, v. 103, n. 3, Suppl:S19.e1-12, 2007.
- BROTHWELL, D. J.; LEWIS, D. W.; BRADLEY, G.; LEONG, I.; JORDAN, R. C. K.; MOCK, D.; LEAKE, J. L. Observer agreement in the grading of oral epithelial dysplasia. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, v. 31, n. 4, p. 300–305, 2003.
- CALDEIRA, P. C.; ABREU, M. H.; BATISTA, A. C.; DO CARMO, M. A. hMLH1 immunoexpression is related to the degree of epithelial dysplasia in oral leukoplakia. **Journal Oral Pathology & Medicine**. v. 40, n. 2, p. 153-159, 2011.
- CHEONG, S.C.; CHANDRAMOULI, G.V.R.; SALEH, A.; ZAIN, R.B.; LAU, S.H.; SIVAKUMAREN, S.; PATHMANATHAN, R.; PRIME, S.S.; TEO, S.H.; PATEL, V.; GUTKIND, J.S. Gene expression in human oral squamous cell carcinoma is influenced by risk factor exposure. **Oral Oncology**, v. 45, n. 8, p. 412-419, 2009.
- CUFFEL, C.; RIVALS, J. P.; ZAUGG, Y.; SALVI, S.; SEELENTAG, W.; SPEISER, D.E.; LIÉNARD, D.; MONNIER, P.; ROMERO, P.; BRON, L.; RIMOLDI, D. Pattern and clinical significance of cancer-testis gene expression in head and neck squamous cell carcinoma. **International Journal of Cancer**, v. 128, n. 11, p. 2625-2634, 2011.
- DAHLSTROM, K. R.; LITTLE, J. A.; ZAFEREO, M. E.; LUNG, M.; WEI, Q.; STURGIS, E. M. Squamous cell carcinoma of the head and neck In never smoker–never drinkers: a descriptive Epidemiologic study. **Head & Neck**, v. 30,n. 1, p. 75-84, 2008.

EPSTEIN, J. B.; ZHANG, L.; ROSIN, M. Advances in the Diagnosis of Oral Premalignant and Malignant Lesions. **Journal of the Canadian Dental Association**, v. 68, n. 10, p. 617-621, 2002.

FELLER, L.; WOOD, N. H.; KHAMMISSA, R. A.; LEMMER J. Human papillomavirus-mediated carcinogenesis and HPV-associated oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. Part 2: Human papillomavirus associated oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Head & Face Medicine**. v.15, p. 1-6, 2010.

FORSLUND, K. O.; NORDQVIST, K. The Melanoma Antigen Genes—Any Clues to Their Functions in Normal Tissues? **Experimental Cell Research**. v. 265, n. 2,p. 185–194, 2001.

GROOME, P. A.; ROHLAND, S. L.; IRISH, J.; MACKILLOP, W. J.; O'SULLIVAN, B. A population-based study of factors associated with early versus late stage oral cavity cancer diagnoses. **Oral Oncology**. v. 47, n. 7, p. 642-647, 2011.

HAIER, J.; OWZCARECK, M.; GULLER, U.; SPAGNOLI, G. C.; BÜRGER, H.; SENNINGER, N.; KOCHER, T. Expression of MAGE-A cancer/testis antigens in esophageal squamous cell carcinomas. **Anticancer Research**. v. 26, n. 3B, p. 2281-2287, 2006.

HUBER, M. A. White oral lesions, actinic cheilitis, and leukoplakia: confusions in terminology and definition: facts and controversies. **Clinics in Dermatology**. v. 28, n. 3, p.262-8, 2010.

Instituto Nacional do Câncer – INCA; Estatísticas do Câncer. Disponível em: <www.inca.gov.br/vigilancia>. Acesso em 10 de julho de 2011

JUNGBLUTH, A. A.; BUSAM, K. J.; KOLB, D.; IVERSEN, K.; COPLAN, K.; CHEN, Y. T.; SPAGNOLI, G. C.; OLD, L. J. Expression of MAGE-antigens in normal tissues and cancer. **International Journal of Cancer**. v. 85, n. 4, p. 460-465, 2000.

KRAUSS, E.; RAUTHE, S.; GATTENLÖHNER, S.; REUTHER, T.; KOHEL, M.; KRIEGEBAUM, U.; KÜBLER, A. C.; MÜLLER-RICHTER, U. D. A. MAGE-A antigens in lesions of the oral mucosa. **Clinical Oral Investigation**, v. 15, n. 3, p. 315-320, 2011.

KRUSE, A. L.; BREDELL, M.; GRÄTZ, K. W. Oral squamous cell carcinoma in non-smoking and non-drinking patients. **Head & Neck Oncology**. v. 4, n. 2, 2010.

KRUTCHKOFF, D.J.; EISENBERG, E. Lichenoid dysplasia: a distinct histopathologic entity. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology**. v. 60, n. 3, p. 308-315, 1985.

KÜFFER, R.; LOMBARDI, T. Premalignant lesions of the oral mucosa. A discussion about the place of oral intraepithelial neoplasia (OIN). **Oral Oncology**, v. 38, n. 2, p. 125-130, 2002.

KUJAN, O.; OLIVER, R. J.; KHATTAB, A.; ROBERTS, S. A.; THAKKER, N.; SLOAN, P. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. **Oral Oncology**, v. 42, p. 987– 993, 2006.

KUJAN, O.; KHATTAB, A.; OLIVER, R. J.; ROBERTS, S. A.; 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**, v. 43, n. 3, p. 224– 231, 2007.

METZLER, P.; MOLLAOGLU, N.; SCHWARZ, S.; NEUKAM, F. W.; NKENKE, E.; RIES, J. MAGE-A as a novel approach in the diagnostic accuracy of oral squamous cell cancer: a case report. **Head & Neck Oncology**, v.1, n.39, p.1-6 2009.

MITHANI, S. K.; MYDLARZ, W. K.; GRUMBINE, F. L.; SMITH, I. M.; CALIFANO J.A. Molecular genetics of premalignant oral lesions. **Oral Diseases**, v. 13, n. 2, p. 126-133, 2007.

MÜLLER-RICHTER, D. A.; DOWEJKO, A.; PETERS, S.; RAUTHE, S.; REUTHER, T.; GATTENLÖHNER, S.; REICHERT, T. E.; DRIEMEL, O.; KÜBLER, A. C. MAGE-A antigens in patients with primary oral squamous cell carcinoma. **Clinical Oral Investigations**, v. 14, n. 3, p. 291–296, 2010.

RIES, J.; PONADER, S.; MOLLAOGLU, N.; VAIRAKTARIS, E.; NEUKAM, F. W.; NKENKE, E. Early findings of a novel established molecular diagnostic technique for the prediction of malignant transformation in leukoplakia. **Molecular Medicine Reports**, v. 2, n. 6, p. 947-952, 2009.

RIES, J.; MOLLAOGLU, N.; VAIRAKTARIS, E.; NEUKAM, F.W.; NKENKE, E. Diagnostic and therapeutic relevance of NY-ESO-1 expression in oral squamous cell carcinoma. **Anticancer Research**. v. 29, n. 12, p. 5125-5130, 2009.

SCHEIFELE, C.; REICHART, P. A.; DIETRICH, T. Low prevalence of oral leukoplakia in a representative sample of the US population. **Oral Oncology**, v. 39, n. 6, p. 619-625, 2003.

TSANTOULIS, P. K.; KASTRINAKIS, N. G.; TOURVAS, A. D.; LASKARIS, G.; GORGOLIS, V. G. Advances in the biology of oral cancer. **Oral Oncology**. v. 43, n. 6, p. 523-534, 2007.

VAN DER WAAL, I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; present concepts of management. **Oral Oncology**. v. 46, n. 6, p. 423-425, 2010.

WARNAKULASURIYA, S. Histological grading of oral epithelial dysplasia: revisited. **Journal Pathology**, v. 194, n. 3, p. 294–297, 2001.

WARNAKULASURIYA, S.; JOHNSON N. W.; VAN DER WAAL, I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 36, n. 10, p. 575-580, 2007.

WARNAKULASURIYA, S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. **Oral Oncology**, v. 45, n.4,p. 309-316, 2009.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology**, v. 46, n. 4, p. 528-539, Oct. 1978.

XIAO, J.; CHEN, H. S. Biological functions of melanoma-associated antigens. **World Journal of Gastroenterology**, v. 10, n. 13, p.1849-1853, 2004.

YOUNG, M. R. I.; NEVILLE, B. W.; CHI, A. C.; LATHERS, D. M. R.; GILLESPIE, M. B.; DAY, T. A. Oral premalignant lesions induce immune reactivity to both premalignant oral lesions and head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 56, n. 7, p. 1077–1086, 2007.

1.5 Orçamento

1. Anticorpos	
1.1. multi-MAGE- α	doação
1.2. MAGE-A1.....	doação
1.3. MAGE-(Y-18).....	R\$ 1.150,00
1.4. MAGE-A10.....	doação
1.5. NY-ESO.....	doação
1.6. Anticorpo secundário Rabbit anti-Goat IgG.....	R\$ 1.100,00
2. Reagentes.....	R\$ 5.000,00
3. Total	R\$ 7.250,00

1.7 Anexo 1

	Dados				
Lâminas	Idade	Sexo	Fator de risco	Localização	Gradação
1					
2					
3					
4					
5					
6					
7					
8					
9					
10					

2 Relatório de Trabalho de Campo

Neste capítulo estão relatadas as complementações e as mudanças realizadas na pesquisa, sugeridas pela banca examinadora do projeto de qualificação, realizado em outubro de 2011.

2.1 Título

Foi sugerida mudança no título, unindo os dois trabalhos por meio da utilização dos mesmos casos na avaliação da concordância interexaminadores e na avaliação imuno-histoquímica.

2.2 Antecedentes e Justificativas

Neste tópico foram realizadas alterações, conforme sugestão da banca, a fim de deixá-lo mais claro e objetivo, melhorando a estrutura de alguns parágrafos e acrescentando informações pertinentes ao trabalho.

A sugestão de utilização de casos comuns entre os dois trabalhos foi parcialmente implementada (casos de displasia severa e carcinoma *in situ*), já que existiam diferenças quanto à característica da amostra nos dois estudos.

No trabalho em que utilizou-se a imuno-histoquímica, detalhamos o local da lâmina a ser avaliado em cada caso (local mais marcado – *hot spot*) e como isso foi realizado, conforme sugestão da banca examinadora.

Os anticorpos cedidos pelo Prof. Dr. Giulio Spagnoli (multi-MAGE- α , MAGE-A1, MAGE-A10 e NY-ESO) acabaram não sendo utilizados neste trabalho, pois não obtivemos sucesso na sua otimização. Além disso, optou-se por retirar os casos de displasia liquenóide devido à variação de graduação histológica entre os casos.

3 Artigo 1

Expressão de MAGE (Y-18) em lesões malignas e potencialmente malignas de pacientes com e sem fator de risco associado.

Autores:

Deise de Avila Silva

Mestranda em Odontologia - Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

Adriana Etges

Phd em Patologia Oral - Departamento de Semiologia e Clínica, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

Ana Paula Neutzling Gomes

Doutora em Patologia Oral - Departamento de Semiologia e Clínica, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

Autor para Correspondência:

Ana Paula Neutzling Gomes

Faculdade de Odontologia - Universidade Federal de Pelotas

Rua Gonçalves Chaves, 457/602

Fone: (53) 3225 6741 - ramal 133

apngomes@gmail.com

Fonte de apoio: CAPES/CNPq

#Formatado segundo normas da *Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology*, à exceção do idioma.

Abstract:

The MAGE antigens are only present in malignant cells and germ cells, and they may be useful as indicators of the potential for transformation in potentially malignant oral lesions (PML). This study aimed to investigate the immunohistochemical expression of MAGE (Y-18) antibody in premalignant and malignant lesions in patients with or without an associated risk factor. Paraffin-embedded samples of 20 cases of severe dysplasia/carcinoma *in situ* and 20 cases of intraoral squamous cell carcinoma (SCC) were used in the study, and in both groups the samples had been distributed between patients with and without other risk factors associated with the occurrence of injury (tobacco and alcohol). The positive immunohistochemical expression of MAGE(Y-18) was defined by a cytoplasmic staining pattern, and it was used a scoring system considering the homogeneity of the reaction. The results were positive in 4/20 PML and 17/20 SCC. Through the Kruskal-Wallis test, it was observed a statistically significant difference ($p < 0.05$) between groups of SCC and the group of potentially malignant lesions (PML) without the risk factor. The Mann-Whitney test found a statistically significant difference between carcinomas and potentially malignant lesions ($p < 0.001$). The Fisher Exact test showed no statistically significant difference between the lesions that had the same histological diagnosis when compared in subgroups of associated risk factor ($p = 1$). Detection of MAGE antigen may be useful in identifying LPM that has a higher risk of progression to invasive SCC, but it seems to be unrelated to exposure to popular risk factors.

Key words: immunohistochemical, MAGE (Y-18), premalignant oral lesions, malignant oral lesions, risk factors.

Introdução:

Mais de 90% das neoplasias malignas no trato aerodigestivo superior são carcinomas espinocelulares (CEC). Globalmente há uma grande variação geográfica (cerca de 20 vezes) na incidência deste câncer, com áreas caracterizadas por altas taxas de incidência de CEC bucal (excluindo lábio) sendo encontradas nas regiões Sul e Sudeste da Ásia (Sri Lanka, Índia, Paquistão e Taiwan), partes do oeste europeu (França) e na Europa Oriental (Hungria, Eslováquia e Eslovênia), partes da América Latina e Caribe (Brasil, Uruguai e Porto Rico) e em regiões do Pacífico (Papua Nova Guiné e Melanésia)¹. Esta doença debilitante corresponde a 8ª e 13ª neoplasia maligna mais comum no mundo para homens e mulheres, respectivamente.²

A transição da mucosa normal para o CEC invasivo é um processo complexo de várias etapas, com uma etiologia multifatorial.³ A carcinogênese oral é impulsionada por mudanças genéticas que ocorrem frequentemente devido aos padrões de expressão alterada de vários genes. Acredita-se que determinadas alterações são acompanhadas em definitivo por alterações histopatológicas.⁴ Vários marcadores potenciais das alterações moleculares têm sido estudados, e o interesse na associação destas alterações genéticas com as lesões é crescente.⁵

O prognóstico ruim dos pacientes que sofrem de carcinoma espinocelular bucal avançado é em grande parte devido à ausência de marcadores sensíveis e específicos para a detecção precoce de tumores primários ou células malignas que podem ser usados para determinar o risco de desenvolvimento de tumor em lesões precursoras.⁴

O CEC dos pacientes com fator de risco associado, especialmente fumo e álcool, difere em muitas variáveis daqueles que ocorrem em pacientes não tabagistas

e não etilistas, pois este último acomete principalmente pacientes mais jovens (antes dos 50 anos) e mulheres idosas (após os 70 anos) ocorrendo com maior frequência na orofaringe e cavidade oral, afetando especialmente a língua e gengiva.⁶

A década de 1990, principalmente, se caracterizou pelo isolamento de um grande número de genes que codificam antígenos humanos específicos do tumor, incluindo famílias de antígeno melanoma MAGE, BAGE, GAGE, LAGE (NY-ESO-1). Desde então, essas famílias de genes tem crescido constantemente e os genes MAGE têm atraído a atenção como alvos potenciais para a imunoterapia devido à sua expressão quase tumor específica.^{7,8}

Antígenos melanoma-associado MAGE-A não são expressos em tecidos adultos normais, com exceção das células germinais masculinas, mas muitas vezes são detectados em uma variedade de tecidos tumorais. Por exemplo, MAGE-A é expresso em uma alta porcentagem de tumores de boca, mas não na mucosa oral normal e saudável.^{4,9} Assim, se antígenos MAGE-A estão presentes, uma lesão benigna pode ser claramente distinguida de uma lesão maligna, com altíssima precisão.^{4,10}

Espera-se que os marcadores moleculares tornem-se essenciais no diagnóstico e manejo de pacientes com câncer bucal, orientando futuros estudos e cuidados clínicos. A identificação de marcadores moleculares, neste contexto, poderá auxiliar o diagnóstico precoce e o estadiamento das alterações teciduais, antes mesmo que as mudanças na morfologia celular e tecidual tornem-se clinicamente visíveis.

O objetivo deste trabalho foi avaliar a expressão imuno-histoquímica do anticorpo MAGE (Y-18) em lesões potencialmente malignas e malignas de pacientes com e sem fator de risco associado e comparar o padrão de marcação imuno-histoquímica nestas lesões.

Seleção dos casos e análise morfológica

Este trabalho foi submetido à aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pelotas obtendo aprovação para sua realização sob o parecer OF.51/12.

Quarenta espécimes fixados em formol 10% e incluídos em parafina foram obtidos dos arquivos de um centro de referência em Patologia Oral. Foram utilizadas 20 amostras de casos de displasia severa/carcinoma *in situ* e 20 amostras de carcinoma espinocelular intraoral, sendo que em cada grupo as amostras estavam distribuídas entre pacientes com fator de risco associado à ocorrência da lesão (tabaco e álcool) e sem fator de risco relatado.

As lâminas referentes aos casos selecionados e coradas pelo método da hematoxilina e eosina (H & E) foram submetidas a estudo morfológico em microscopia de luz para confirmação do diagnóstico previamente obtido. Os dados referentes a sexo, idade, local da lesão e exposição a fatores de risco foram obtidos dos registros de biópsia, não foram especificados os critérios estabelecidos para a classificação dos fatores de risco: tipo, tempo, quantidade do tabagismo/etilismo. Todos os casos foram submetidos a estudo imuno-histoquímico utilizando-se o anticorpo MAGE (Y-18).

Imuno-histoquímica

A avaliação das proteínas MAGE foi realizada com o auxílio da técnica imuno-histoquímica pelo método streptavidina-biotina (SABC, do inglês Streptavidina-Biotin Complex).

A recuperação antigênica foi realizada com ácido cítrico pH 6,0, em banho-maria a 90°C por 30 minutos. Para o bloqueio da peroxidase endógena tecidual foi utilizada solução de H₂O₂ 20% e metanol (1:1, v/v). As secções teciduais foram incubadas com o anticorpo primário MAGE (Y-18) (Santa Cruz Biotechnology, Inc. Europe) na diluição de 1:200, por uma hora em temperatura ambiente, e após lavadas com tampão Tris-HCl (Vetec Química Fina Ltda, Rio de Janeiro-RJ, Brasil). Os cortes foram então incubados com o anticorpo secundário Rabbit anti-Goat IgG (Pierce® - Rockford, IL USA) por 30 minutos, seguido por lavagem em tampão Tris-HCl. Logo após, a incubação com o complexo terciário (Vectastain ABC Kit – Vector Laboratories, Inc. CA USA) foi de 30 minutos. A revelação da reação foi realizada com solução cromógena de diaminobenzidina (3,3'-diamino-benzidina, DakoCytomation, Inc. 6392 Via Real Carpinteria, California 93013 USA), como recomendado pelo fabricante. O controle negativo foi obtido pela omissão do anticorpo primário e como controle positivo foi usado um carcinoma oral indiferenciado.

Análise dos resultados

A expressão imuno-histoquímica positiva de MAGE (Y-18) foi definida por um padrão de coloração citoplasmático, por meio de análise por microscopia de luz nos quatro grupos estudados.

Para a avaliação da marcação imuno-histoquímica, um sistema de pontuação foi utilizado considerando a homogeneidade da reação na região mais marcada (escores: 0 - negativo; 1 - células positivas <25%; 2 - células positivas 25-50%; 3 - células positivas 50-75%; 4 - células positivas > 75%).

De cada lâmina corada foi selecionada visualmente a área mais marcada (*hot spot*) e deste local foram feitas 5 fotos em 5 campos consecutivos, em microscopia de luz, com aumento de 40x. Após capturar a imagem da área mais marcada, foram

obtidas mais quatro fotos movimentando o botão micrométrico em 1/8 de volta à direita, esquerda, acima e abaixo do primeiro campo. Utilizando o aplicativo (Image ProPlus para Windows 4.5.1), um único observador contabilizou as células marcadas em cada campo. O escore final do caso foi obtido pela média dos 5 campos. Para que o estudo tivesse maior confiabilidade, em um primeiro momento foram contadas as células de dez campos, e a análise foi repetida dez dias depois para que fosse obtido o coeficiente de correlação intraclasse do avaliador. Nos campos utilizados para calibração, o coeficiente de correlação intraclasse obtido foi excelente, tanto para a identificação de células negativas quanto positivas ($r=0,997$ e $r=0,987$ respectivamente, com $p<0,001$).

Correlação de Pearson, teste exato de Fisher, Kruskal-Wallis e Mann Whitney foram utilizados para fins estatísticos, e foram realizados com o programa Sigma-Stat 3.5 (Systat Software Inc.). Um valor de p inferior a 0,05 ($p<0,05$) foi considerado estatisticamente significativo.

Resultados

As informações gerais sobre as características de nossa amostra encontram-se resumidas na Tabela 1.

A Figura 1 demonstra a marcação obtida em alguns casos e a maneira pela qual estes foram avaliados e quantificados, bem como o controle positivo utilizado no trabalho.

A expressão imuno-histoquímica do MAGE (Y-18) foi observada em 1/11 (9,1%) no grupo das lesões potencialmente malignas sem fator de risco e em 3/9 (33,3%) lesões potencialmente malignas com fator de risco associado. Em uma das lesões deste último grupo, foi observada marcação citoplasmática e nuclear. Entre

os carcinomas, 7/8 (87,5%) lesões sem fator de risco associado apresentaram positividade para o MAGE (Y-18), com um caso exibindo positividade nuclear e citoplasmática, enquanto 10/12 (83,3%) lesões com fator de risco foram positivas para o anticorpo estudado. Os escores de marcação em cada grupo estão ilustrados na Tabela 2.

A lesão utilizada como controle positivo (carcinoma espinocelular oral indiferenciado) apresentou, em todos os campos analisados, 100% das células marcadas em citoplasma.

Fazendo o cruzamento da média de células positivas nos campos cada lâmina analisada entre os grupos avaliados, pelo teste de Kruskal-Wallis observou-se diferença estatisticamente significativa ($p < 0,05$) entre os grupos CEC sem fator de risco e do CEC com fator de risco com as lesões potencialmente malignas sem fator de risco.

Quanto foi efetuada a mesma comparação desconsiderando a presença ou ausência de fator de risco, o teste de Mann-Whitney verificou diferença estatisticamente significativa entre os carcinomas e as lesões potencialmente malignas ($p < 0.001$).

Pelo teste Exato de Fischer não foi verificada diferença estatisticamente significativa entre as lesões de mesmo diagnóstico histológico quando comparadas nos subgrupos de fator de risco associado ($p = 1$).

Discussão

O carcinoma espinocelular (CEC) representa mais de 90% das lesões malignas que se desenvolvem na boca e o prognóstico para pacientes com CEC oral que são tratados precocemente é muito melhor, com taxas de sobrevida em cinco anos de até

80%. Além disso, a qualidade de vida também é influenciada pelo tratamento precoce, já que a cura pode ser alcançada com cirurgias menos complexas e tratamentos menos agressivos do que o necessário para lesões avançadas.⁵

De acordo com o conceito atual, a carcinogênese é entendida como um processo de múltiplas etapas, envolvendo danos genéticos e podendo ser representada em suas fases iniciais pelo desenvolvimento de lesões que precedem a neoplasia francamente estabelecida. Estas lesões são então chamadas pré-malignas ou potencialmente malignas, já que em dado momento podem sofrer transformação dando origem ao câncer.

Atualmente, os critérios disponíveis para avaliação do comportamento biológico das lesões potencialmente malignas são o aspecto clínico e o diagnóstico histológico baseado na graduação de displasia epitelial. No entanto, a dificuldade em diagnosticar e classificar corretamente lesões com displasia tem sido enfatizada por vários autores.¹¹⁻¹³

Além disso, é importante considerar que a displasia epitelial não está presente de maneira uniforme nas lesões potencialmente malignas. Estudos apontam para o fato de que a presença da displasia epitelial aumenta o risco de desenvolvimento do carcinoma, mas a malignidade pode originar-se em um epitélio não displásico.^{14,15} Por outro lado, estudos retrospectivos demonstraram que graus severos de displasia não estão necessariamente ligados a maiores taxas de transformação em CEC.¹⁶

Há uma perspectiva atualmente de que os marcadores moleculares tornem-se essenciais no diagnóstico e manejo de pacientes com câncer bucal, orientando futuros estudos e cuidados clínicos e, em última instância, levando a intervenções terapêuticas baseadas em tais alterações moleculares. Dessa forma, o uso de

marcadores moleculares permitiria o diagnóstico precoce e o estadiamento das alterações teciduais, antes das mudanças na morfologia celular e, certamente, antes das alterações teciduais tornarem-se clinicamente visíveis.

Assim, a investigação das alterações moleculares envolvidas na carcinogênese, buscando identificar entre as lesões potencialmente malignas aquelas com maior risco de transformação, pode incrementar de forma significativa as medidas de prevenção e diagnóstico do câncer. Vários trabalhos são encontrados na literatura com este objetivo¹⁷⁻¹⁹ e nosso estudo também reflete esta busca.

Este trabalho investigou a expressão imuno-histoquímica do anticorpo MAGE (Y-18) em lesões potencialmente malignas e malignas de pacientes com e sem fator de risco relatado (tabagistas e etilistas). Na clínica diária estas lesões são encontradas frequentemente e a obtenção do diagnóstico mais adequado é crucial para que o tratamento seja efetivo e se obtenha a cura da doença.

O MAGE (Y-18) é um anticorpo policlonal de cabra criado a partir do MAGE-A1 de origem humana. De acordo com vários autores, os antígenos MAGE não são expressos em tecidos adultos normais, à exceção das células germinativas masculinas, mas são expressos em uma variedade de tecidos tumorais, incluindo uma alta porcentagem dos tumores de boca.^{7,8,10}

A etiologia do CEC oral é multifatorial e os fatores de risco estão agrupados em não modificáveis e modificáveis. Neste último grupo estão os hábitos e estilo de vida, sendo o mais importante o uso do tabaco, seguido pelo excessivo consumo de álcool e uso do betel quid. Estes fatores atuam tanto individualmente quanto sinergicamente. O risco atribuído à ocorrência de CEC oral em pacientes tabagistas e etilistas está estimado em mais de 80%. A infecção pelo vírus do HPV também tem sido

relacionada à carcinogênese oral, especialmente em tonsilas e orofaringe de pacientes jovens.²⁰

O CEC dos pacientes com fatores de risco tradicionais difere em muitas variáveis daqueles que ocorrem em pacientes não tabagistas e não etilistas, como por exemplo idade e localização mais frequentes.⁶ Kruse *et al.* observaram uma média de idade mais elevada para os pacientes com carcinoma não fumantes do que fumantes (71,4 anos e 63,7 anos, respectivamente).²¹ Nosso trabalho concorda com os achados destes autores, já que observamos que os pacientes sem fator de risco associado ao câncer apresentaram uma média de idade maior do que aqueles que fumavam ou bebiam, tanto nas lesões malignas quanto nas potencialmente malignas. É importante destacar, entretanto, que a diferença observada foi pequena, assim como o tamanho da amostra.

Com relação ao sexo, no grupo dos carcinomas observamos diferenças bem estabelecidas. No grupo dos pacientes sem fator de risco, as mulheres foram maioria, enquanto entre as lesões associadas a fumo e álcool, os homens predominaram. Concordando com a literatura, provavelmente estes achados refletem a atuação de outros fatores etiológicos para o desenvolvimento do câncer de boca no sexo feminino.

Aqui também é interessante destacar que no grupo das LPM, associadas ou não aos fatores de risco tradicionais, predominaram as pacientes do sexo feminino. Como é amplamente reconhecido que as mulheres procuram atendimento mais prontamente ao perceberem alguma alteração, podemos sugerir que no sexo feminino, com mais frequência, o diagnóstico seja realizado em uma fase precoce do processo de carcinogênese.

Em 2010, Cuffel *et al.*²² avaliaram a expressão de antígenos MAGE-A e NY-ESO-1 em CECs de cabeça e pescoço, através de PCR e imuno-histoquímica. Os autores verificaram que mais de 80% das amostras mostraram positividade para pelo menos um dos genes avaliados. Observaram, ainda, que tumores positivos para o MAGE-A4 ou para múltiplos genes apresentaram menor sobrevida, sugerindo assim que estes genes podem ser utilizados como marcadores prognóstico para estes tipos de CEC.

Discordando deste achado, Haier *et al.*⁷ observaram que em tumores de esôfago a expressão de MAGE-A não teve relação com o prognóstico. Os autores observaram positividade em 50% dos CECs avaliados, mas sem correlação com estadiamento clínico, graduação histológica ou idade dos pacientes. No entanto, sugerem que a expressão elevada do MAGE-A em células tumorais qualifica essas proteínas como potenciais alvos para a imunoterapia.

Da mesma forma, Figueiredo *et al.*²³ avaliaram a expressão imuno-histoquímica dos antígenos MAGE-A4, MAGE-C1, MAGE-A1, MAGE-A3, MAGE-C2, NY-ESO-1 e GAGE em 63 casos carcinomas espinocelulares de laringe, encontrando positividade para um dos antígenos em 67% dos casos. Embora esta expressão não tenha sido relacionada à sobrevida, da mesma forma que Haier *et al.*⁷ os autores concluíram que a família de antígenos MAGE-A pode ser alvo de vacinas, em estratégias envolvendo a imunoterapia para tumores de laringe.

Achado semelhante foi encontrado por Montoro *et al.*²⁴ investigando a expressão imuno-histoquímica dos antígenos MAGE-A4 e MAGE-C1 em CECs orais. Estes autores observaram positividade para pelo menos um dos antígenos em 78% dos pacientes, mas esta expressão não teve relação com sobrevida ou outras variáveis clínico-patológicas.

Em nosso trabalho, como já era esperado em função dos resultados da literatura, o percentual de casos de CECs positivos também foi alto. Dezesete dos vinte casos de CEC avaliados expressaram o MAGE (Y-18), representando 85% do grupo das malignidades. No entanto, esta expressão não esteve associada à presença ou ausência dos fatores de risco tradicionais, o que nos leva a sugerir que o aparecimento destes antígenos no processo de carcinogênese é independente dos fatores etiológicos envolvidos.

Por outro lado, observamos positividade para o MAGE em apenas quatro das vinte lesões potencialmente malignas (20%). Em nosso estudo só incluímos lesões potencialmente malignas com alto grau de displasia epitelial, procurando observar diferenças relacionadas à associação ou não com os fatores de risco principais para o desenvolvimento do CEC.

Krauss *et al.*¹⁰ avaliaram a marcação imuno-histoquímica do MAGE-A em lesões benignas e potencialmente malignas da mucosa oral, não encontrando positividade em lesões benignas. O percentual de marcação nas lesões potencialmente malignas foi de 33% para lesões não displásicas, 65% para diferentes graus de displasia e 56% para o grupo dos carcinomas *in situ*. Os autores já consideraram o carcinoma *in situ* como lesão maligna, de forma diferente do nosso estudo. Em nosso entendimento, na ausência do fenótipo invasivo, o carcinoma *in situ* ainda não representa a neoplasia francamente estabelecida. Neste trabalho não foram testadas lesões benignas ou mucosa oral normal, mas por meio dele demonstramos a expressão do MAGE (Y-18) em lesões orais potencialmente malignas e, principalmente, nos CEC estabelecidos.

Observamos a falta de resultados estatisticamente significativos entre as lesões potencialmente malignas e malignas quando comparadas entre si nos

subgrupos de fator de risco associado, no entanto não temos como afirmar se a marcação do MAGE está relacionada ao processo de carcinogênese, sem relação com os fatores etiológicos, ou tem relação com o pequeno número de casos avaliados. Com relação ao escore de marcação nos casos positivos, não foram observadas diferenças entre os grupos, fato que também pode estar relacionado ao tamanho de nossa amostra.

Ries *et al.*¹⁹ avaliaram a utilidade da expressão de MAGE-A na predição da transformação maligna em leucoplasias bucais. Inicialmente, relataram um único caso de um paciente acompanhado por um ano⁵; na sequência, os autores avaliaram amostras de pacientes acompanhados por pelo menos 5 anos e observaram que o MAGE-A só foi expresso em casos que sofreram transformação em CEC.¹⁹ Segundo seus resultados, houve uma correlação estatisticamente significativa entre a expressão do MAGE-A e a transformação maligna, mas não entre a expressão do MAGE-A e o grau de displasia epitelial, sugerindo que a detecção deste antígeno seja útil em identificar as lesões com maior risco de transformação, independentemente da graduação de displasia.

Seguindo esta linha, com base em nossos resultados podemos sugerir que os casos de lesões potencialmente malignas que exibiram marcação para o MAGE (Y-18) poderiam apresentar maior chance de transformação, justificando a adoção de um plano de tratamento mais agressivo e a necessidade de um acompanhamento cuidadoso do paciente. Do ponto de vista clínico, entretanto, estes achados não representam uma mudança de conduta, já que todos os pacientes com diagnóstico histológico de displasia grave são tratados desta maneira em nosso Serviço.

Por outro lado, como poucos estudos são encontrados sobre o papel do MAGE na carcinogênese bucal, não podemos considerar de forma categórica a marcação positiva como evidência de transformação maligna em nossos casos. Na realidade, só o acompanhamento clínico pode complementar resultados como estes, nos permitindo aceitar ou rejeitar certos aspectos como características “benignas” ou “malignas” das lesões potencialmente malignas. A associação da identificação das alterações moleculares ocorrendo nestas lesões com a observação do comportamento biológico por elas apresentado é essencial para que se consiga realmente desenvolver marcadores mais específicos e confiáveis na determinação do risco de transformação contido em cada caso.

O anticorpo MAGE, quando utilizado em imuno-histoquímica, normalmente demonstra marcação citoplasmática e de membrana. Em nosso trabalho observamos em dois casos a ocorrência de marcação nuclear. Este achado também foi relatado em outros trabalhos^{8,22,25}, mas como pouco se conhece sobre o papel do MAGE, é difícil determinar se ele possui alguma relevância.

Sudbø *et al.*¹⁸ destacam a clara necessidade do desenvolvimento de métodos para identificação, em um estágio precoce, das lesões que irão progredir para carcinomas. Estes autores compararam o valor prognóstico da graduação histológica de atipia epitelial e da análise de ploidia do DNA em leucoplasias bucais. De acordo com suas conclusões, a avaliação da ploidia do DNA tem valor prognóstico para estas lesões, ao contrário da graduação histológica.

Em nossa opinião, considerando que nas fases iniciais do processo de carcinogênese as alterações moleculares podem não ter resultado em qualquer alteração fenotípica, a avaliação da probabilidade de transformação maligna não deve ser totalmente vinculada à avaliação de displasia epitelial, sendo justificados os

esforços empreendidos no sentido de se buscar marcadores mais precisos para avaliação do comportamento das lesões orais potencialmente malignas.

Estudos recentes tem sugerido que o MAGE pode ser útil neste sentido, mas seu real valor no diagnóstico de lesões displásicas precisa ser validado por estudos prospectivos de acompanhamento clínico.

Referências:

1. Warnakulasuriya S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. *Oral Oncol* 2009;45:309 316.
2. Cheong SC, Chandramouli GVR, Saleh A, et al. Gene expression in human oral squamous cell carcinoma is influenced by risk factor exposure. *Oral Oncol* 2009;45:412 419.
3. Küffer R, Lombardi T. Premalignant lesions of the oral mucosa. A discussion about the place of oral intraepithelial neoplasia (OIN). *Oral Oncol* 2002;38:125 130.
4. Ries J, Mollaoglu N, Vairaktaris E, et al. Diagnostic and therapeutic relevance of NY-ESO-1 expression in oral squamous cell carcinoma. *Anticancer Res* 2009;29:5125 5130.
5. Epstein JB, Zhang L, Rosin M. Advances in the Diagnosis of Oral Premalignant and Malignant Lesions. *J Can Dent Assoc* 2002;68:617 621.
6. Dahlstrom KR, Little JA, Zafereo ME, et al. Squamous cell carcinoma of the head and neck In never smoker–never drinkers: a descriptive Epidemiologic study. *Head Neck* 2008;30:75 84.
7. Haier J, Owzcareck M, Guller U, et al. Expression of MAGE-A cancer/testis antigens in esophageal squamous cell carcinomas. *Anticancer Res* 2006;26: 2281 2287.
8. Forslund KO, Nordqvist K. The Melanoma Antigen Genes—Any Clues to Their Functions in Normal Tissues? *Exp Cell Res* 2001;265:185 194.

9. Jungbluth AA, Busam KJ, Kolb D, et al. Expression of MAGE-antigens in normal tissues and cancer. *Int J Cancer* 2000;85:460 465.
10. Krauss E, Rauthe S, Gattenlöhner S, et al. MAGE-A antigens in lesions of the oral mucosa. *Clin Oral Invest* 2011;15:315 320.
11. Pindborg JJ, Reibel J, Holmstrup P. Subjectivity in evaluating oral epithelial dysplasia, carcinoma in situ and initial carcinoma. *J Oral Pathol* 1985;14:698 708.
12. Abbey LM, Kaugars GE, Gunsolley JC, et al. Intraexaminer and interexaminer reliability in diagnosis of oral epithelial dysplasia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1998;80:189 191.
13. Warnakulasuriya S. Histological grading of oral epithelial dysplasia: revisited. *J Pathol* 2001;194:294 297.
14. Silverman S, Gorosky M, Lozada F. Oral leukoplakia and malignant transformation: a follow-up study of 257 patients. *Cancer* 1984;53:563-568.
15. Karabulut A, Reibel J, Therkildsen MH, et al. Observer variability in the histologic assessment of oral premalignant lesions. *J Pathol Med* 1995;24:198 200.
16. Abrahão AC, Bonelli BV, Nunes FD, et al. Immunohistochemical expression of p53, p16 and hTERT in oral squamous cell carcinoma and potentially malignant disorders. *Braz Oral Res* 2011;25:34 41.
17. Warnakulasuriya S. Lack of molecular markers to predict malignant potential of oral precancer. *J Pathol* 2000;190:407 409.

18. Sudbø J, Bryne M, Johannessen AC, et al. A comparison of histological grading and large-scale genomic status (DNA ploidy) as prognostic tools in oral dysplasia. *J Pathol* 2001;194:303 310.
19. Ries J, Agaimy A, Vairaktaris E, et al. Evaluation of MAGE-A expression and grade of dysplasia for predicting malignant progression of oral leukoplakia. *Int J Oncol* 2012;41:1085 1093.
20. Warnakulasuriya S. Living with oral cancer: Epidemiology with particular reference to prevalence and life-style changes that influence survival. *Oral Oncol* 2010;46:407 410.
21. Kruse AL, Bredell M, Grätz KW. Oral squamous cell carcinoma in non-smoking and non-drinking patients. *Head Neck Onco* 2010;4:1 3.
22. Cuffel C, Rivals JP, Zaugg Y, et al. Pattern and clinical significance of cancer-testis gene expression in head and neck squamous cell carcinoma. *Int J Cancer* 2011;128:2625 2634.
23. Figueiredo DLA, Mamede RCM, Spagnoli GC, et al. High expression of cancer testis antigens MAGE-A, MAGE-C1/CT7, MAGE-C2/CT10, NY-ESO-1, and GAGE in advanced squamous cell carcinoma of the larynx. *Head & Neck* 2011;33:702 707.
24. Montoro JRMC, Mamede RCM, Serafini LN, et al. Expression of cancer-testis antigens MAGE-A4 and MAGE-C1 in oral squamous cell carcinoma. *Head & Neck* 2011;34:1123 1128.

25. Napoletano C, Bellati F, Tarquini E, et al. MAGE-A and NY-ESO-1 expression in cervical cancer: prognostic factors and effects of chemotherapy. *Am J Obstet Gynecol* 2008;198:99e17.

Tabela 1 Distribuição dos casos de acordo com sexo e idade dos pacientes e local da lesão

Grupo	Sexo	Idade	Local	Total
LPM sem fator de risco	9 F – 2 M	50-88 (68,5)	língua (7), palato (2), mucosa jugal (1), rebordo alveolar(1)	11
LPM com fator de risco	8 F – 1 M	42-77 (59,1)	região retromolar (3), assoalho (2), língua (1), palato (1), mucosa jugal (1), fundo de sulco (1)	9
CEC sem fator de risco	6 F – 2 M	33-83 (62,6)	língua (4), mucosa jugal (2), rebordo alveolar (1), palato (1)	8
CEC com fator de risco	2 F – 10 M	35-81 (60,2)	língua (10), assoalho (2)	12

Tabela 2 Escores de marcação para MAGE(Y-18) nos diferentes grupos analisados.

Grupo	Escore 0	Escore 1 (<25%)	Escore 2 (25-50%)	Escore 3 (50-75%)	Escore 4 (>75%)	Total de positivos	Total
LPM sem fator de risco	10	0	0	0	1	1	11
LPM com fator de risco	6	0	0	1	2	3	9
CEC sem fator de risco	1	0	0	1	6	7	8
CEC com fator de risco	2	0	1	3	6	10	12

Figura

Legenda:

Figuras 1: Padrão da expressão imuno-histoquímica do MAGE (Y-18) em lesões orais malignas e potencialmente malignas

(A) controle positivo utilizado no trabalho, com 100% das células com marcação positiva em imuno-histoquímica. (B) Displasia severa, sem fator de risco associado, com marcação positiva para imuno-histoquímica. (C) mesmo caso de “B” demonstrando o escore 4 (>75%) de marcação com 88% de células positivas. (D) carcinoma espinocelular, com fator de risco associado, com marcação positiva para imuno-histoquímica. (E) mesma lâmina de “D” demonstrando o escore 2 (25-50%) com 39% de células positivas. (F) carcinoma espinocelular, com fator de risco associado, com marcação positiva para imuno-histoquímica. (G) mesmo caso de “F” demonstrando o escore 3 (50-75%) com 55% de células positivas. (H) carcinoma espinocelular, com fator de risco associado, com marcação positiva para imuno-histoquímica (I) mesmo caso de “H” demonstrando o escore 4 (>75%) com 100% das células marcadas positivamente. Os pontos vermelhos indicam as células com marcação positiva e os verdes as células epiteliais sem marcação para imuno-histoquímica.

4 Artigo 2

Avaliação de concordância interexaminadores na classificação histológica das displasias epiteliais orais

Concordância na classificação de displasias

Autores:

Deise de Avila Silva

Programa de Pós-Graduação em Odontologia, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

Adriana Etges

Departamento de Semiologia e Clínica, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

Ana Paula Neutzling Gomes

Departamento de Semiologia e Clínica, Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Pelotas, Pelotas, Rio Grande do Sul, Brasil

Autor para Correspondência:

Ana Paula Neutzling Gomes

Faculdade de Odontologia - Universidade Federal de Pelotas

Rua Gonçalves Chaves, 457/602

Fone: (53) 3225 6741 - ramal 133

apngomes@gmail.com

#Formatado segundo normas da *Brazilian Dental Journal*, à exceção do idioma.

Summary:

Evaluation of interexaminers agreement when performing a histological classification of oral epithelial dysplasia

In order to verify the interexaminer variability when performing a histological classification of oral epithelial dysplasia, 75 cases of potentially malignant oral lesions were selected from a referral service in oral disease. Slides were read independently and blindly by three pathologists in two stages. In the first stage it was made available to examiners the slides stained with H & E along with the clinical information of each case, and pathologists had to classify the lesions: no dysplasia, mild dysplasia, moderate dysplasia, severe dysplasia or carcinoma in situ. In the second stage, it was not given access to clinical information to the examiners, and they had to classify slides into two categories: low risk (non-dysplastic lesions / mild dysplasia) and high risk (moderate or severe dysplasia / carcinoma in situ). The agreement between the examiners and the gold standard ranged from low to moderate, regardless of the classification system that was used. In the first stage, the intraclass correlation coefficient showed a moderate agreement between examiners 1 and 3 ($r = 0.479$ and $r = 0.544$) and, a low agreement of the examiner 2 ($r = 0.384$). In the second phase, it was observed a moderate agreement between examiners 2 and 3 and the gold standard ($k = 0.433$ and $k = 0.422$) and, a low concordance between the examiner 1 and the gold standard ($k = 0.186$). Taking into account that grading dysplasia is a subjective process and still there is no test that outperforms the histological observation on diagnosis of oral epithelial dysplasia, it is understood that the process of grading made by two or more examiners should be encouraged, in order to assist in defining more precisely the diagnostics.

Key Words: dysplasia epithelial, agreement, leukoplakia, oral pathology, oral observer variation

INTRODUÇÃO

A identificação de lesões orais com alto risco de transformação maligna, bem como a detecção precoce dos tumores orais, continua a ser uma importante questão clínica a ser resolvida e pode constituir uma das chaves para reduzir a morbidade, mortalidade e custos de tratamento associado ao carcinoma espinocelular oral (CEC) (1-2).

As leucoplasias são reconhecidas como os precursores mais frequentes do CEC. Tem sido relatado que entre 11 e 67% de todos os CECs desenvolvem-se a partir de tais lesões potencialmente malignas (1). Embora nem leucoplasia nem eritroplasia sejam sinônimo de displasia epitelial ou carcinoma, é reconhecido que estas são as lesões bucais em que alterações malignas ocorrem com maior frequência em comparação à mucosa oral normal (3).

Ao microscópio, lesões com diagnóstico clínico de leucoplasia podem demonstrar um espectro de possíveis características histopatológicas que vão desde hiperplasia epitelial não displásica e/ou hiperqueratose a achados indicativos de displasia (3). Quando biópsias de leucoplasias ou eritroplasias são submetidas a exame microscópico, o patologista classifica-as em categorias, considerando a presença ou ausência de displasia epitelial, bem como o grau desta alteração. Para tal, a maioria dos patologistas leva em conta uma combinação de características microscópicas, sendo que para definição da severidade, o sítio que exhibe maior alteração na lâmina é considerado (4).

Uma das principais limitações existentes no uso de critérios histológicos para prever o potencial de transformação das displasias é a subjetividade inerente ao processo de classificação em si. Isto se deve principalmente à falta de critérios bem definidos que possam ser usados como diretrizes para classificação (3).

Na tentativa de definir estes critérios, muitos sistemas de graduação para a displasia epitelial têm sido propostos, os quais, de forma geral, estão estruturados de acordo com o risco provável de transformação maligna. No sistema de Smith e Pindborg cada característica microscópica é observada fotograficamente e graduada como ausente, leve ou intensa. A partir desta observação é estabelecido um escore que classifica as alterações epiteliais em sem displasia, displasia leve, moderada ou severa (5). O sistema da OMS define e enumera 12 características histológicas que caracterizam as displasias nos graus leve, moderada e severa, de acordo com a localização epitelial em que se encontram (6). O sistema de Brothwell *et al.* (7) classifica as alterações em uma escala de cinco pontos – sem displasia, leve, moderada, severa e carcinoma *in situ* – de acordo com as atipias celulares presentes. Em um “workshop” ocorrido em 2005, um grupo de colaboradores da OMS (The Working Group) elaborou um

sistema de classificação binário para as displasias epiteliais, classificando estas lesões em alto e baixo risco de transformação maligna, a fim de aumentar a probabilidade de concordância entre os patologistas no diagnóstico destas alterações (6).

Apesar destas tentativas, vários estudos demonstram uma ampla variabilidade no diagnóstico e graduação da displasia epitelial oral (7-10).

Assim, este trabalho objetivou verificar a variabilidade interexaminadores na classificação histológica das displasias epiteliais orais em um serviço de referência em Patologia Bucal, com vistas a obter subsídios para a elaboração de estratégias futuras na rotina do diagnóstico histopatológico.

METODOLOGIA

Este trabalho foi submetido à aprovação pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Pelotas obtendo aprovação para sua realização sob o parecer OF.52/12.

Seleção dos casos

Setenta e cinco lâminas histológicas foram selecionadas dos arquivos do serviço de Patologia Bucal por um patologista bucal (examinador 1), de modo a garantir a qualidade da análise. Para o cálculo do tamanho amostral foi utilizado o programa Sigma-Stat 3.5 (Systat Software Inc.). Pressupondo que a experiência dos examinadores era alta e que a concordância nos diagnósticos histopatológicos também seria alta, utilizaram-se os parâmetros: poder estatístico 90%, erro tipo I de 5% e coeficiente de correlação esperado de 0,75. O tamanho amostral calculado foi de 15 amostras por categoria. Assim, com base no diagnóstico histopatológico inicial, foram selecionados casos não displásicos, com displasia leve, moderada, severa e carcinoma *in situ*. O diagnóstico histopatológico inicial foi obtido dos registros do Serviço e utilizado como “padrão ouro”, assim como no trabalho de Brothwel *et al.* (7) e Abbey *et al.* (8).

Os casos selecionados para o estudo deveriam ter recebido diagnóstico clínico de leucoplasia, leucoeritroplasia ou eritroplasia e possuírem ficha de biópsia contendo as informações referentes à localização intraoral, sexo, idade e associação com fatores de risco (fumo e álcool).

Desenho experimental

Três patologistas com experiência em patologia oral (examinadores 2, 3 e 4) e que rotineiramente fazem diagnósticos histopatológicos, analisaram as lâminas de forma independente e “cega”, ou seja, sem o conhecimento do diagnóstico inicial. Para cada caso selecionado uma única lâmina corada com hematoxilina-eosina foi examinada por microscopia de luz.

Na primeira etapa do estudo, foram disponibilizadas aos examinadores as lâminas selecionadas juntamente com as informações referentes à idade, sexo, fatores de risco e localização da lesão. Os examinadores foram instruídos a concluir o estudo em até duas semanas, por meio de exame criterioso da lâmina, determinando a presença e a severidade da displasia, classificando os casos em: sem displasia, displasia leve, displasia moderada, displasia severa ou carcinoma *in situ*.

Não houve treinamento para padronização na aplicação dos critérios classificatórios pelos patologistas, pois foi avaliada, neste momento, a variabilidade de diagnóstico na rotina do Serviço de Patologia Bucal.

Passados 30 dias da primeira análise, ocorreu a segunda etapa do trabalho, na qual cada profissional classificou as lâminas de acordo com a orientação do The Working Group (OMS, 2005) (6) considerando duas categorias:

A – Baixo risco (lesão não displásica/displasia leve);

B – Alto risco (displasia moderada/displasia severa/carcinoma *in situ*).

Para esta etapa, os diagnósticos considerados como “padrão ouro”, obtidos nos registros do serviço, foram automaticamente transformados para a classificação binária de alto e baixo risco. Neste segundo momento, os avaliadores não tiveram acesso às informações clínicas referentes a cada caso.

Análise estatística

Os níveis de concordância entre os examinadores foram analisados separadamente para escalas de cinco e dois pontos. O cálculo de correlação interexaminadores foi obtido pelo coeficiente de correlação intraclass e teste kappa.

RESULTADOS

Assim como em estudos anteriores que avaliaram concordância interexaminadores, os valores encontrados neste trabalho foram inferiores aos considerados satisfatórios.

Na primeira etapa, por meio do Coeficiente de Correlação Intraclass, com um intervalo de confiança de 95% observou-se uma concordância moderada interexaminadores ($r=0,415$ e $p<0,001$). Quando comparados individualmente com o padrão ouro, ocorreu uma concordância moderada entre os avaliadores 1 e 3 ($r=0,479$ e $r=0,544$, respectivamente), e uma concordância baixa do avaliador 2 com o padrão ouro ($r=0,384$).

Já no segundo momento da avaliação, quando as lâminas foram classificadas apenas em dois padrões (alto e baixo risco), observou-se uma baixa concordância entre o avaliador 1 e o padrão ouro ($k=0,186$, com sensibilidade de 77,8% e especificidade de 40,0%) e uma concordância moderada entre os examinadores 2 e 3 e o padrão ouro ($k=0,433$, com sensibilidade de 60,0% e especificidade de 86,7% e $k=0,422$, com sensibilidade de 53,3% e especificidade de 93,3%, respectivamente).

DISCUSSÃO

O carcinoma espinocelular representa mais de 90% das lesões malignas que se desenvolvem na boca. Alguns destes carcinomas são precedidos por lesões potencialmente malignas, geralmente leucoplasias ou eritroplasias, lesões estas cujo diagnóstico histopatológico pode variar de uma hiperplasia sem displasia a diferentes graus de displasia epitelial ou carcinoma *in situ* (11).

A leucoplasia é a lesão potencialmente maligna mais comum da cavidade bucal, sendo definida pela OMS como uma lesão branca que não pode ser caracterizada como qualquer outra entidade patológica (12). A incidência anual de transformação maligna varia em diferentes partes do mundo, provavelmente como resultado de diferentes hábitos com relação ao uso do tabaco (13). De forma geral, cerca de 6% de todas as leucoplasias sofrem transformação para o câncer em um período de 10 anos. No entanto, entre lesões com diagnóstico histológico de displasia este valor pode variar de 16-36% (14-15).

Neste sentido, a presença e intensidade da displasia epitelial são considerados aspectos importantes na avaliação do risco de transformação contido nestas lesões (4). Entretanto, a graduação de displasia epitelial é reconhecidamente um critério subjetivo, havendo concordância entre os patologistas em que mesmo observadores experientes podem interpretar de forma diferente o grau de displasia epitelial no mesmo corte histológico (16,17). Pindborg *et al.* (16) destacam que o reconhecimento da displasia epitelial, assim como a avaliação de seu grau de importância, variam não só de observador para observador, mas também no mesmo observador em diferentes momentos.

Warnakulasuriya (4) salienta que lesões inflamatórias ou reativas podem demonstrar alguns aspectos considerados como displasia epitelial. Além disso, a displasia epitelial não está presente de maneira uniforme nas lesões potencialmente malignas. Estudos apontam para o fato de que a presença da displasia epitelial aumenta o risco de desenvolvimento do carcinoma, mas a malignidade pode originar-se em um epitélio não displásico (14,18). Por outro lado, estudos retrospectivos demonstraram que graus severos de displasia não estão necessariamente ligados a maiores taxas de transformação em CEC (19).

A maioria dos sistemas de classificação encontrados na literatura segue critérios similares aos usados para graduação de lesões de cérvix uterino, onde a espessura (altura) em que as mudanças celulares se estendem no tecido epitelial é levada em consideração (20). No epitélio cervical há uma clara distinção entre camadas normais e anormais e esta característica torna o processo de diagnóstico mais simples e resulta em grande concordância intra e interobservadores (21). Na cavidade oral, no entanto, existe uma grande variação na espessura do epitélio pavimentoso, levando a dificuldades práticas na utilização desse sistema de pontuação (4,22).

Vários trabalhos tem demonstrado ampla variabilidade na concordância intra e interobservadores no diagnóstico e graduação da displasia epitelial oral, o que pode representar um grande problema, já que um diagnóstico incorreto pode resultar em um tratamento inadequado, alterando o prognóstico.

No trabalho de Abbey *et al.* (8) foi avaliado o grau de concordância diagnóstica entre seis patologistas orais quando as informações clínicas dos casos foram fornecidas ou omitidas e, em uma avaliação de 120 lâminas, os autores concluíram que quando a informação clínica foi utilizada, ocorreu uma diminuição da precisão do diagnóstico. Já em nosso estudo não foram observadas diferenças significativas na graduação da displasia epitelial com relação ao fornecimento ou não das informações clínicas de cada caso, o que foi demonstrado pelo fato de haver, nos dois momentos de avaliação, uma concordância moderada interexaminadores.

De acordo com Manchanda e Shetty (22), quando o cirurgião encaminha uma peça para realização da biópsia deve estar ciente que as informações clínicas contidas em anexo influenciarão o diagnóstico histológico do patologista. Desta forma, o profissional deve ter cuidado quanto à clareza na descrição da lesão, bem como deve estar ciente desse viés no momento de optar pelo tratamento mais adequado.

Nós optamos por realizar a graduação de displasia sem calibração ou orientação prévia dos examinadores, com a intenção de mimetizar o processo que ocorre rotineiramente no Serviço.

Brothwell *et al.* (7) avaliaram o grau de concordância inter e intra-examinadores no diagnóstico de displasias epiteliais orais, após a análise independente de 64 lâminas por três patologistas orais e utilizando o diagnóstico inicial como padrão ouro. Os autores verificaram que o grau de concordância intra-observador foi maior que o interobservadores, o que poderia ser explicado pela diferença na formação dos indivíduos, bem como por opiniões diversas em relação à valorização de alguns critérios na categorização das displasias. Com base neste resultado, sugerem que as discordâncias na avaliação das displasias podem diminuir se exercícios de calibração forem implementados.

No trabalho de Fischer *et al.* (23) foi observado um aumento no grau de concordância interobservadores quando o diagnóstico foi simplificado para somente três categorias (hiperplasia, displasia e carcinoma *in situ* ou carcinoma). Kujan *et al.* (9) propuseram um sistema binário de classificação (alto e baixo risco), que demonstrou ser eficiente na previsão do potencial de transformação maligna. Os autores, ao avaliarem a reprodutibilidade e a precisão do sistema de classificação binária verificaram que a sensibilidade e especificidade foram de respectivamente 85 e 80%, sendo que a precisão foi de 80%, concluindo, assim, que o novo sistema complementaria a classificação da OMS (2005) e poderia ajudar nas decisões clínicas, particularmente nas displasias moderadas.

Com o intuito de verificar se este sistema seria capaz de aumentar a concordância entre os examinadores de nosso Serviço quando comparado ao sistema convencional de cinco pontos, em um dos momentos de análise das lâminas os patologistas foram orientados a utilizá-lo. Ao contrário da nossa expectativa, quando avaliada a classificação binária observou-se uma concordância de baixa a moderada entre os examinadores, fato este que no nosso entendimento pode ser explicado justamente pela dúvida gerada na classificação dos casos de displasia moderada como “alto risco”.

Em nosso estudo, os valores de kappa de fraco a moderado nas avaliações individuais demonstraram a pouca concordância existente na graduação das displasias epiteliais orais, fato que reforça o caráter subjetivo do processo.

De acordo com Manchanda e Shetty (22), a subjetividade na avaliação dos critérios estabelecidos, a falta de calibração quanto aos critérios que serão utilizados e a falta de

conhecimento suficiente quanto à importância de cada critério são os principais motivos atribuídos à falta de concordância na classificação das displasias epiteliais.

Assim, consideramos que a melhoria no padrão de concordância somente poderá ser alcançada com o emprego de parâmetros bem definidos de avaliação, os quais dependem de um maior conhecimento molecular acerca do câncer e das lesões potencialmente malignas. A menos que critérios claros sejam utilizados, a ausência de concordância continuará acontecendo, não pela incapacidade dos patologistas, mas devido à subjetividade de tal processo.

Assim, tendo em vista que a graduação da displasia não é uma ciência exata, e que até o momento não dispomos de nenhum exame que supere a observação histológica no diagnóstico e previsão do comportamento das displasias epiteliais orais, da mesma forma que Kujan *et al.* (10) entendemos que o processo de graduação entre dois ou mais observadores deve ser incentivado, a fim de auxiliar na definição mais precisa possível do diagnóstico.

Resumo

Com o objetivo de verificar a variabilidade interexaminadores na classificação histológica das displasias epiteliais orais, 75 casos de lesões orais potencialmente malignas foram selecionados de um serviço de referência em patologia bucal. Três patologistas analisaram as lâminas de forma independente e “cega” em dois momentos. Na primeira etapa foram disponibilizadas aos examinadores as lâminas coradas em H&E juntamente com as informações clínicas de cada caso e os patologistas classificaram as lesões em sem displasia, displasia leve, moderada, severa ou carcinoma *in situ*. Na segunda etapa, os avaliadores não tiveram acesso às informações clínicas e classificaram as lâminas em duas categorias: baixo risco (lesão não displásica/displasia leve) e alto risco (displasia moderada/severa/carcinoma *in situ*). Independente do sistema de classificação utilizado, a concordância entre os avaliadores e o padrão ouro variou de fraca a moderada. Na primeira etapa, o Coeficiente de Correlação Intraclass demonstrou uma concordância moderada entre os avaliadores 1 e 3 ($r=0,479$ e $r=0,544$) e uma concordância baixa do avaliador 2 ($r=0,384$). No segundo momento observou-se uma concordância moderada entre os examinadores 2 e 3 e o padrão ouro ($k=0,433$ e $k=0,422$) e uma baixa concordância entre o avaliador 1 e o padrão ouro ($k=0,186$). Tendo em vista que a graduação da displasia é um processo subjetivo, e que ainda não dispomos de nenhum exame que supere a observação histológica no diagnóstico das displasias epiteliais

orais, entendemos que o processo de graduação entre dois ou mais observadores deve ser incentivado, a fim de auxiliar na definição mais precisa do diagnóstico.

Palavras chave: displasia epitelial, concordância, leucoplasia, patologia oral, variação na observação.

REFERÊNCIAS

1. Scheifele C, Reichart PA, Dietrich T. Low prevalence of oral leukoplakia in a representative sample of the US population. *Oral Oncol* 2003; 39:619-625.
2. Epstein JB, Zhang L, Rosin M. Advances in the Diagnosis of Oral Premalignant and Malignant Lesions. *J Can Dent Assoc* 2002; 68:617-621.
3. Brennan M, Migliorati CA, Lockhart PB, 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; 103:1-12.
4. Warnakulasuriya S. Histological grading of oral epithelial dysplasia: revisited. *J Pathol* 2001; 194:294–297.
5. Pindborg JJ, Reichart P, Smith CJ, van der Waal I. World Health Organization: histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa. Berlin: Springer-Verlag 1997.
6. 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; 37:127-133.
7. Brothwell DJ, Lewis DW, Bradley G, Leong I, Jordan RCK, Mock D, *et al.* Observer agreement in the grading of oral epithelial dysplasia. *Community Dent Oral Epidemiol* 2003; 31:300–305.
8. Abbey LM, Kaugars GE, Gunsolley JC, Bums JC, Page DG, Svirsky JA, *et al.* The effect of clinical information on the histopathologic diagnosis of oral epithelial dysplasia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1998; 85:74-77.
9. Kujan O, Oliver RJ, Khattab A, Roberts SA, Thakker N, Sloan P. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. *Oral Oncol* 2006; 42:987–993.
10. Kujan O, Khattab A, Oliver RJ, Roberts SA, 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 Oncol* 2007; 43:224–231.

11. Tosios KI, Kapranos N, Papanicolaou SI. Loss of basement membrane components laminin and type IV collagen parallels the progression of oral epithelial neoplasia. *Histopathology* 1998; 33:261-268.
12. World Health Organization. *Histological Typing of Cancer and Precancer of the Oral Mucosa*. 2. ed. Spring-Verlag: Berlin, 1997.
13. Warnakulasuriya S. Lack of molecular markers to predict malignant potential of oral precancer. *J Pathol*, London 2000; 190:407-409.
14. Silverman S, Gorosky M, Lozada F. Oral leukoplakia and malignant transformation: a follow-up study of 257 patients. *Cancer*, Bruxelles 1984; 53:563-568.
15. Lumerman H, Freedman P, Kerpel S. Oral epithelial dysplasia and the development of invasive squamous carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1995; 79:321-329.
16. Pindborg JJ, Reibel J, Holmstrup P. Subjectivity in evaluating oral epithelial dysplasia, carcinoma in situ and initial carcinoma. *J Oral Pathol* 1985; 14:698-708.
17. Abbey LM, Kaugars GE, Gunsolley JC, Burns JC, Page DG, Svirsky JA, Eisenberg E. *et al.* Intraexaminer and interexaminer reliability in diagnosis of oral epithelial dysplasia. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1995; 80:189-191.
18. Karabulut A, Reibel J, Therkildsen MH, Praetorius F, Nielsen HW, Dabelsteen E. Observer variability in the histologic assessment of oral premalignant lesions. *J Pathol Med* 1995; 24:198-200.
19. Abrahão AC, Bonelli BV, Nunes FD, Dias EP, Cabral MG. Immunohistochemical expression of p53, p16 and hTERT in oral squamous cell carcinoma and potentially malignant disorders. *Braz Oral Res* 2011; 25:34-41.
20. Scully RE, Bonfiglio TA, Kurman RJ, Silverberg SG, Wilkinson: *Histological Typing of female genital tract tumours (International histological classification of tumours)* Berlin: Springer; 1994.
21. Fleskens S, Slootweg P. Grading systems in head and neck dysplasia: their prognostic value, weaknesses and utility. *Head Neck Oncol* 2009, 11:1-11.

22. Manchanda A, Shetty DC. Reproducibility of grading systems in oral epithelial dysplasia. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal* 2012. [Epub ahead of print]
23. Fischer DJ, Epstein JB, Morton TH, Schwartz SM. Interobserver reliability in the histopathologic diagnosis of oral pre-malignant and malignant lesions. *J Oral Pathol Med* 2004; 33:65-70.

5 Conclusões Gerais

Neste trabalho o percentual de casos de CECs positivos para marcação imuno-histoquímica do MAGE (Y-18) alto, dezessete dos vinte casos de CEC avaliados expressaram o anticorpo, representando 85% do grupo das malignidades. No entanto, esta expressão não esteve associada à presença ou ausência dos fatores de risco associados, o que nos leva a concluir que o aparecimento destes antígenos no processo de carcinogênese é independente dos fatores etiológicos envolvidos. Observou-se, ainda, positividade para o MAGE em apenas quatro das vinte lesões potencialmente malignas (20%). Deve-se levar em consideração o pequeno número de amostras avaliadas, o que pode ter influenciado significativamente os resultados obtidos, assim, estudos posteriores, com ampliação da amostra devem ser incentivados.

Quanto à classificação das displasias epiteliais orais, percebeu-se uma concordância de fraca a moderada entre os avaliadores nos dois momentos estudados, o que reforça o caráter subjetivo do processo e confirma a necessidade de critérios claros e parâmetros objetivos de avaliação.

6 Referências Gerais

ABBEY, L. M.; KAUGARS, G.E.; GUNSOLLEY, J. C.; BUMS, J. C.; PAGE, D. G.; SVIRSKY, J. A.; EISENBERG, E.; KMTCHKOFF, D. J. The effect of clinical information on the histopathologic diagnosis of oral epithelial dysplasia. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontics**, v. 85, n. 1, p. 74-77, 1998.

ABRAHAO, A. C.; BONELLI, B. V.; NUNES, F. D.; DIAS, E.P.; CABRAL, M. G. Immunohistochemical expression of p53, p16 and hTERT in oral squamous cell carcinoma and potentially malignant disorders. **Brazilian Oral Research**, v. 25, n. 1, p. 34-41, 2011.

ARDUINO, P. G.; SURACE, A.; CARBONE, M.; ELIA, A.; MASSOLINI, G.; GANDOLFO, S.; BROCCOLETTI, R. Outcome of oral dysplasia: a retrospective hospital-based study of 207 patients with a long follow-up. **Journal Oral Pathology & Medicine**, v. 38, n. 6, p. 540-544, 2009.

BRENNAN, M.; MIGLIORATI, C. A.; LOCKHART, P. B.; WRAY, D.; AL-HASHIMI, I.; AXÉLL, T.; BRUCE, A. J.; CARPENTER, W.; EISENBERG, E.; EPSTEIN, J. B.; HOLMSTRUP, P.; JONTELL, M.; NAIR, R.; SASSER, H.; SCHIFTER, M.; SILVERMAN, B.; THONGPRASOM, K.; THORNHILL, M.; WARNAKULASURIYA, S.; VAN DER WAAL, I. Management of oral epithelial dysplasia: a review. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontics**, v. 103, n. 3, Suppl:S19.e1-12, 2007.

BROTHWELL, D. J.; LEWIS, D. W.; BRADLEY, G.; LEONG, I.; JORDAN, R. C. K.; MOCK, D.; LEAKE, J. L. Observer agreement in the grading of oral epithelial dysplasia. **Community Dentistry and Oral Epidemiology**, v. 31, n. 4, p. 300-305, 2003.

CALDEIRA, P. C.; ABREU, M. H.; BATISTA, A. C.; DO CARMO, M. A. hMLH1 immunoexpression is related to the degree of epithelial dysplasia in oral leukoplakia. **Journal Oral Pathology & Medicine**. v. 40, n. 2, p. 153-159, 2011.

CHEONG, S.C.; CHANDRAMOULI, G.V.R.; SALEH, A.; ZAIN, R.B.; LAU, S.H.; SIVAKUMAREN, S.; PATHMANATHAN, R.; PRIME, S.S.; TEO, S.H.; PATEL, V.; GUTKIND, J.S. Gene expression in human oral squamous cell carcinoma is influenced by risk factor exposure. **Oral Oncology**, v. 45, n. 8, p. 412-419, 2009.

CUFFEL, C.; RIVALS, J. P.; ZAUGG, Y.; SALVI, S.; SEELENTAG, W.; SPEISER, D.E.; LIÉNARD, D.; MONNIER, P.; ROMERO, P.; BRON, L.; RIMOLDI, D. Pattern and clinical significance of cancer-testis gene expression in head and neck squamous cell carcinoma. **International Journal of Cancer**, v. 128, n. 11, p. 2625-2634, 2011.

DAHLSTROM, K. R.; LITTLE, J. A.; ZAFEREO, M. E.; LUNG, M.; WEI, Q.; STURGIS, E. M. Squamous cell carcinoma of the head and neck In never smoker–never drinkers: a descriptive Epidemiologic study. **Head & Neck**, v. 30,n. 1, p. 75-84, 2008.

EPSTEIN, J. B.; ZHANG, L.; ROSIN, M. Advances in the Diagnosis of Oral Premalignant and Malignant Lesions. **Journal of the Canadian Dental Association**, v. 68, n. 10, p. 617-621, 2002.

FELLER, L.; WOOD, N. H.; KHAMMISSA, R. A.; LEMMER J. Human papillomavirus-mediated carcinogenesis and HPV-associated oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. Part 2: Human papillomavirus associated oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. **Head & Face Medicine**. v.15, p. 1-6, 2010.

FIGUEIREDO, D. L. A.; MAMEDE, R. C. M.; SPAGNOLI, G. C.; SILVA, W. A.; ZAGO, M.; NEDER, L.; JUNGBLUTH, A. A.; SAGIORO, F. P. High expression of câncer testis antigens MAGE-A, MAGE-C1/CT7, MAGE-C2/CT10, NY-ESO-1, and GAGE in advanced squamous cell carcinoma of the larynx. **Head & Neck**, v. 33, n. 5, p. 702-707, 2011.

FISCHER, D. J.; EPSTEIN, J. B.; MORTON, T. H.; SCHWARTZ, S. M. Interobserver reliability in the histopathologic diagnosis of oral pre-malignant and malignant lesions. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v.33, n.4, p.65-70, 2004.

FLESKENS, S.; SLOOTWEG, P. Grading systems in head and neck dysplasia: their prognostic value, weaknesses and utility. **Head Neck Oncology**, v. 11, n. 1, p. 1-11, 2009.

FORSLUND, K. O.; NORDQVIST, K. The Melanoma Antigen Genes—Any Clues to Their Functions in Normal Tissues? **Experimental Cell Research**. v. 265, n. 2,p. 185–194, 2001.

GROOME, P. A.; ROHLAND, S. L.; IRISH, J.; MACKILLOP, W. J.; O'SULLIVAN, B. A population-based study of factors associated with early versus late stage oral cavity cancer diagnoses. **Oral Oncology**. v. 47, n. 7, p. 642-647, 2011.

HAIER, J.; OWZCARECK, M.; GULLER, U.; SPAGNOLI, G. C.; BÜRGER, H.; SENNINGER, N.; KOCHER, T. Expression of MAGE-A cancer/testis antigens in esophageal squamous cell carcinomas. **Anticancer Research**. v. 26, n. 3B, p. 2281-2287, 2006.

HUBER, M. A. White oral lesions, actinic cheilitis, and leukoplakia: confusions in terminology and definition: facts and controversies. **Clinics in Dermatology**. v. 28, n. 3, p.262-8, 2010.

Instituto Nacional do Câncer – INCA; Estatísticas do Câncer. Disponível em: <www.inca.gov.br/vigilancia>. Acesso em 10 de julho de 2011

JUNGBLUTH, A. A.; BUSAM, K. J.; KOLB, D.; IVERSEN, K.; COPLAN, K.; CHEN, Y. T.; SPAGNOLI, G. C.; OLD, L. J. Expression of MAGE-antigens in normal tissues and cancer. **International Journal of Cancer**. v. 85, n. 4, p. 460-465, 2000.

KARABULUT, A.; REIBEL, J.; THEKILDSSEN, M. H.; PRAETORIUS, F.; NIELSEN, H. W.; DABELSTEEN, E. Observer variability in the histologic assessment of oral premalignant lesions. **Journal of Oral pathology and Medicine**. v. 24, n. 5, p. 198-200, 1995.

KRAUSS, E.; RAUTHE, S.; GATTENLÖHNER, S.; REUTHER, T.; KOCHER, M.; KRIEGEBAUM, U.; KÜBLER, A. C.; MÜLLER-RICHTER, U. D. A. MAGE-A antigens in lesions of the oral mucosa. **Clinical Oral Investigation**, v. 15, n. 3, p. 315-320, 2011.

KRUSE, A. L.; BREDELL, M.; GRÄTZ, K. W. Oral squamous cell carcinoma in non-smoking and non-drinking patients. **Head & Neck Oncology**. v. 4, n. 2, 2010.

KRUTCHKOFF, D.J.; EISENBERG, E. Lichenoid dysplasia: a distinct histopathologic entity. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology**. v. 60, n. 3, p. 308-315, 1985.

KÜFFER, R.; LOMBARDI, T. Premalignant lesions of the oral mucosa. A discussion about the place of oral intraepithelial neoplasia (OIN). **Oral Oncology**, v. 38, n. 2, p. 125-130, 2002.

KUJAN, O.; OLIVER, R. J.; KHATTAB, A.; ROBERTS, S. A.; THAKKER, N.; SLOAN, P. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. **Oral Oncology**, v. 42, p. 987– 993, 2006.

KUJAN, O.; KHATTAB, A.; OLIVER, R. J.; ROBERTS, S. A.; 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**, v. 43, n. 3, p. 224– 231, 2007.

LUMERMAN, H.; FREEDMAN, P.; KERPEL, S. Oral epithelial dysplasia and the development of invasive squamous carcinoma. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology**, v.79, n. 4, p. 321-329, 1995.

MANCHANDA, A.; SHETTY, D. C. Reproducibility of grading systems in oral epithelial dysplasia. **Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugía Bucal** 2012. [Epub ahead of print]

METZLER, P.; MOLLAOGLU, N.; SCHWARZ, S.; NEUKAM, F. W.; NKENKE, E.; RIES, J. MAGE-A as a novel approach in the diagnostic accuracy of oral squamous cell cancer: a case report. **Head & Neck Oncology**, v.1, n.39, p.1-6 2009.

MITHANI, S. K.; MYDLARZ, W. K.; GRUMBINE, F. L.; SMITH, I. M.; CALIFANO J.A. Molecular genetics of premalignant oral lesions. **Oral Diseases**, v. 13, n. 2, p. 126-133, 2007.

MONTORO, J. R. M. C.; MAMEDE, R. C. M.; SERAFINI, L. N.; SAGGIORO, F. P.; FIGUEIREDO, D. L.; SILVA, W. A. Jr.; JUNGBLUTH, A. A.; SPAGNOLI, G. C.; ZAGO, M. A. Expression of câncer-testis antigens MAGE-A4 and MAGE-C1 in oral squamous cell carcinoma. **Head & Neck**, v. 34, n. 8, p. 1123-1128, 2011.

MÜLLER-RICHTER, D. A.; DOWEJKO, A.; PETERS, S.; RAUTHE, S.; REUTHER, T.; GATTENLÖHNER, S.; REICHERT, T. E.; DRIEMEL, O.; KÜBLER, A. C. MAGE-A antigens in patients with primary oral squamous cell carcinoma. **Clinical Oral Investigations**, v. 14, n. 3, p. 291–296, 2010.

NAPOLETANO, C.; BELLATI, F.; TARQUINI, E.; TOMAO, F.; TAURINO, F.; SPAGNOLI, G. C.; RUGHETTI, A.; MUZZI, L.; NUTI, M.; BENEDETTI PANICI, P. MAGE-A and NY-ESO-1 expression in cervical câncer: prognostic factors and effects of chemotherapy. **American Journal of Obstetric & Gynecology**, v. 198, n. 1, p. 99e1 7, 2008.

PINDBORG, J. J.; REIBEL, J.; HOLMSTRUP, P. Subjectivity in evaluating oral epithelial dysplasia, carcinoma in situ and initial carcinoma. **Journal of Oral Pathology**, v. 14, n. 9, p. 698-707, 1985.

RIES, J.; PONADER, S.; MOLLAOGLU, N.; VAIRAKTARIS, E.; NEUKAM, F. W.; NKENKE, E. Early findings of a novel established molecular diagnostic technique for the prediction of malignant transformation in leukoplakia. **Molecular Medicine Reports**, v. 2, n. 6, p. 947-952, 2009.

RIES, J.; MOLLAOGLU, N.; VAIRAKTARIS, E.; NEUKAM, F.W.; NKENKE, E. Diagnostic and therapeutic relevance of NY-ESO-1 expression in oral squamous cell carcinoma. **Anticancer Research**, v. 29, n. 12, p. 5125-5130, 2009.

RIES, J.; AGAIMY, A.; VAIRAKTARIS, E.; KWON, Y.; NEUKAM, F. W.; STRASSBURG, L. H.; NKENKE, E. Evaluation of MAGE-A expression and grade of dysplasia for predicting malignant progression of oral leukoplakia. **International Journal Oncology**, v. 41, n. 3, p. 1085-1093, 2012.

SCHEIFELE, C.; REICHART, P. A.; DIETRICH, T. Low prevalence of oral leukoplakia in a representative sample of the US population. **Oral Oncology**, v. 39, n. 6, p. 619-625, 2003.

SCULLY, R. E.; BONFIGLIO, T. A.; KURMAN, R. J.; SILVERBERG, S. G. Wilkinson: Histological Typing of female genital tract tumours (International histological classification of tumours) Berlin: Springer; 1994.

SILVERMAN, S.; GOROSKY, M.; LOZADA, F. Oral leukoplakia and malignant transformation: a follow-up study of 257 patients. **Cancer**, v. 53, n. 3, p. 563-568, 1984.

SUDBØ, J.; BRYNE, M.; JOHANNESSEN, A. C.; KILDAL, W.; DANIELSEN, H. E.; REITH, A. Comparison of histological grading and large-scale genomic status (DNA ploidy) as prognostic tools in oral dysplasia. **Journal Pathology**, v. 194, n. 3, p. 303-310, 2001.

TSANTOULIS, P. K.; KASTRINAKIS, N. G.; TOURVAS, A. D.; LASKARIS, G.; GORGOLIS, V. G. Advances in the biology of oral cancer. **Oral Oncology**, v. 43, n. 6, p. 523-534, 2007.

TOSIOS, K. I.; KAPRANOS, N.; PAPANICOLAOU, S. I. Loss of basement membrane components laminin and type IV collagen parallels the progression of oral epithelial neoplasia. **Histopathology**, v. 33, n. 3, p. 261-268, 1998.

VAN DER WAAL, I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; present concepts of management. **Oral Oncology**, v. 46, n. 6, p. 423-425, 2010.

WARNAKULASURIYA, S. Lack of molecular markers to predict malignant potential of oral precancer. **Journal Pathology**, v. 190, n. 4, p. 407-409, 2000.

WARNAKULASURIYA, S. Histological grading of oral epithelial dysplasia: revisited. **Journal Pathology**, v. 194, n. 3, p. 294-297, 2001.

WARNAKULASURIYA, S.; JOHNSON N. W.; VAN DER WAAL, I. Nomenclature and classification of potentially malignant disorders of the oral mucosa. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 36, n. 10, p. 575-580, 2007.

WARNAKULASURIYA, S.; REIBEL, J.; BOUQUOT, J.; DABELSTEEN, E. Oral epithelial dysplasia classification systems: predictive value, utility, weaknesses and scope for improvement. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 37, n. 3, p. 127-133, 2008.

WARNAKULASURIYA, S. Global epidemiology of oral and oropharyngeal cancer. **Oral Oncology**, v. 45, n.4,p. 309-316, 2009.

WARNAKULASURIYA, S. Living with oral cancer: epidemiologywith particular reference to prevalence and life-style changes that influence survival. **Oral Oncology**, v. 46, n. 6, p. 407-410, 2010.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology**, v. 46, n. 4, p. 528-539, Oct. 1978.

WORLD HEALTH ORGANIZATION. Histological Typing of Cancer and Precancer of the Oral Mucosa. 2. ed. Spring-Verlag: Berlin, 1997.

XIAO, J.; CHEN, H. S. Biological functions of melanoma-associated antigens. **World Journal of Gastroenterology**, v. 10, n. 13, p.1849-1853, 2004.

YOUNG, M. R. I.; NEVILLE, B. W.; CHI, A. C.; LATHERS, D. M. R.; GILLESPIE, M. B.; DAY, T. A. Oral premalignant lesions induce immune reactivity to both premalignant oral lesions and head and neck squamous cell carcinoma. **Cancer Immunology, Immunotherapy**, v. 56, n. 7, p. 1077-1086, 2007.