

PERFIL IMUNOHISTOQUÍMICO DE KI-67, 8-OHDG, BAX E BCL-2 EM LEUCOPLASIA ORAL E CARCINOMA ESPINOCELULAR EM PACIENTES COM ATÉ 40 ANOS: DADOS PRELIMINARES DE UMA ANÁLISE COMPARATIVA

ALINI CARDOSO SOARES¹; ANA PAULA NEUTZLING GOMES²; LAUREN FRENZEL SCHUCH³; FELIPE MARTINS SILVEIRA⁴; ANA CAROLINA UCHOA VASCONCELOS⁵

¹Universidade Federal de Pelotas – alinicardoso07@gmail.com

²Universidade Federal de Pelotas – apngomes@gmail.com

³Universidad de la República – laurenfrenzel@gmail.com

⁴Universidad de la República – fp.martinss@gmail.com

⁵Universidade Federal de Pelotas – carolinauv@gmail.com

1. INTRODUÇÃO

As desordens orais potencialmente malignas (DOPMs) são definidas como alterações na mucosa oral associadas com aumento de risco de desenvolvimento de câncer (WARNAKULASURIYA, 2021). A leucoplasia oral (LO), a mais comum entre as DOPMs, tem prevalência estimada entre 2,60% e 4,11% (MELLO, 2018), com o tabaco e o consumo excessivo de álcool constituindo seus principais fatores de risco. Estima-se que a taxa global de transformação maligna da LO varie entre 1,1% e 40,8%, - o que pode ser atribuído à diversidade de patologias sob esse diagnóstico clínico (AGUIRRE-URIZAR, 2021). A graduação histopatológica da displasia epitelial oral (DEO) representa o principal método para avaliar o risco de transformação maligna em DOPMs. No entanto, a falta de consenso entre os patologistas sobre a avaliação histológica da presença e do grau de displasia é evidente. (ODELL, 2021).

Estudos epidemiológicos apontam um aumento da incidência do carcinoma espinocelular (CEC) em indivíduos com menos de 40 anos (NG, 2017). Neste contexto, a literatura destaca que os biomarcadores são essenciais no entendimento não apenas da transformação como da progressão do CEC. Um exemplo é a proteína Ki-67, uma importante indicadora da proliferação celular e agressividade tumoral (ESPINOSA, 2022). Adicionalmente, o estresse oxidativo - que resulta de um desequilíbrio entre radicais livres e defesas antioxidantes, causando danos ao DNA - tem sido associado ao processo de carcinogênese (BARROS, 2022). Ainda, as proteínas antiapoptóticas, como Bcl-2, e pró-apoptóticas, como Bax, explicam a regulação da apoptose associada à progressão tumoral (NOGUTI, 2014).

A falta de consenso sobre a avaliação histológica da presença e do grau de DEO tem promovido a busca por métodos diagnósticos alternativos (CELENTANO, 2021). Até o momento, há uma escassez na literatura de estudos comparativos entre LO e CEC em pacientes jovens. Desse modo, o presente estudo tem como objetivo avaliar e comparar as características clínicas, demográficas, histopatológicas, e imunohistoquímicas (IHQ) para LO e CEC em indivíduos com até 40 anos de idade, com base em um estudo retrospectivo em dois centros de referência em Patologia Oral.

2. METODOLOGIA

Estudo retrospectivo, transversal, em modelo humano, conduzido de acordo com as diretrizes do guideline *STrengthening the Reporting of OBservational studies in Epidemiology* (STROBE). A amostra de conveniência foi obtida a partir de dois Centros de referência em patologia oral do Brasil. Foram selecionados casos de pacientes com até 40 anos de idade, com diagnóstico clínico de LO,

atendidos no período de 2000 a 2023 - cujo diagnóstico histológico tenha sido compatível (acantose e/ou hiperqueratose (AH), displasia epitelial leve (DEL), moderada (DEM) ou severa (DES)). Adicionalmente, foram incluídos casos com diagnóstico histopatológico de CEC, em pacientes com até 40 anos. Amostras de mucosa normal foram coletadas como controle. Foram excluídos os casos de LO em múltiplos sítios e aqueles localizados no lábio. Casos de CEC em lábio também foram excluídos da amostra. Para cada caso selecionado, foram coletados: idade e sexo do paciente, hábitos deletérios, localização anatômica, aparência clínica, tamanho, tempo de evolução, tipo de biópsia (casos de LO) e diagnóstico histopatológico (casos de LO). Os dados foram padronizados e categorizados em uma planilha Excel® (Microsoft Windows, Redmond, Washington, EUA).

As lâminas histopatológicas coradas em hematoxilina e eosina (H&E) serão avaliadas por duas patologistas calibradas e cegadas, que usarão os critérios contidos na última classificação da OMS para a graduação dos casos com displasia epitelial (WHO, 2022). Será realizada análise de IHQ dos imunomarcadores Ki-67, 8-OHdG, Bax e Bcl-2, por meio da técnica de contagem semiautomatizada. As lâminas submetidas à IHQ serão digitalizadas utilizando um sistema de escaneamento digital de lâminas (Motic EasyScan One, Kowloon, Hong Kong), e a avaliação das imagens será realizada por dois examinadores submetido à calibração inter-observador prévia. Para a análise dos resultados da coloração de IHQ, será empregado um escore semiquantitativo conhecido como escore imunorreativo (IRS). Os dados serão analisados por meio do software *Statistical Package for the Social Science*, versão 25.0 (SPSS, IBM®, New York, EUA). Será realizada análise descritiva das características clínico-patológicas e demográficas. Para a análise estatística de associação das variáveis quantitativas, será adotado o nível de significância de $p < 0,05$.

3. RESULTADOS E DISCUSSÃO

Até o momento, foram coletados os dados clínico-demográficos dos casos selecionados. A técnica de IHQ foi realizada na Faculdade de Odontologia da *Universidad de la República* (UDELAR- UY), atualmente em fase de análise. Após aplicados os critérios de inclusão e exclusão, foram identificados 64 casos de LO e 28 de CEC. Entre os pacientes com LO, a média de idade foi de 33,1 anos com predileção pelo sexo masculino ($n=34/53,1\%$). Em sua revisão sistemática, Roza e colaboradores (2021) analisaram as características clínicas e demográficas de indivíduos com LO e/ou eritroplasia oral (EO) com até 40 anos. Dos 1246 pacientes diagnosticados, 115 (9,2%) estavam na faixa etária de 20 a 40 anos de idade, com predominância do sexo masculino ($n=36/87,8\%$) (ROZA, 2021). Esses achados vão ao encontro de estudos prévios que mostram que a LO é uma condição infrequente em pacientes jovens. No presente estudo, nos casos onde houve informações sobre hábitos deletérios, nove (14,0%) apresentaram ser tabagistas, dois (3,1%) tabagistas e/ou etilistas, e cinco (7,9%) negaram. O consumo de tabaco e álcool são fatores de risco bem estabelecidos e fortemente associados ao desenvolvimento de DOPMs, além de aumentar o risco de progressão do CEC (SPEIGHT, 2018). A localização anatômica preferencial das LOs foi borda lateral de língua ($n=21/31,8\%$) seguida da gengiva ($n=10/15,7\%$). Quanto ao aspecto clínico, 61 LOs (95,3%) eram homogêneas e três (4,7%), não-homogêneas. O tamanho médio das LOs foi de 1,1 cm e o tempo de evolução médio foi de 19,8 meses. A literatura aponta algumas características fortemente associadas ao aumento do risco de progressão maligna para a LO: tamanho da lesão (>200 mm), aparência (não homogênea) e localização (língua e

assoalho bucal) (SPEIGHT, 2018). Em relação ao tipo de biópsia, 33 (51,6%) foram incisionais e 31 (48,4%), excisionais. Porto e colaboradores (2024), em um estudo retrospectivo, compararam a LO e EO em indivíduos com >40 e <40 anos. Os autores observaram um predomínio das biópsias excisionais (52,1%) e incisionais (65,6%) para os jovens e adultos, respectivamente. A escolha por biópsias excisionais em pacientes mais jovens pode ser atribuída à consideração da idade na decisão entre procedimentos mais invasivos, além de menor frequência de comorbidades observadas neste grupo (PORTO, 2024). Vinte e cinco casos (39,0%) da presente pesquisa receberam diagnóstico histopatológico de DEL, vinte e cinco (39,0%) de DEM, doze (18,8%) de AH e dois (3,2%) de DES. Contrariamente ao observado no presente estudo, Roza e colaboradores (2021), observaram que 73 LOs (64,6%) não apresentaram DEO, enquanto 40 casos (35,3%) apresentaram algum grau de DEO.

Em relação aos casos de CEC, observou-se que 15 (53,6%) dos presentes casos eram do sexo masculino e 13 (46,4%), do feminino. A média de idade foi de 35,3 anos. Costa e colaboradores (2022) analisaram a frequência de CEC em pacientes jovens em centros de referência mundiais. Similarmente ao apresentado pelo presentes casos, os autores observaram uma predileção pelo do sexo masculino (n=358/57,2%), e uma idade média no diagnóstico de 33,4 anos (COSTA, 2022). Sobre os hábitos deletérios, onze (39,2%) dos presentes casos de CEC apresentaram ser tabagistas, cinco (17,8%) tabagistas e/ou etilistas, e nove (32,2%) negaram hábitos deletérios. Em sua revisão sistemática, Batistella e colaboradores (2022) compararam o consumo de tabaco e álcool em pacientes jovens (45<) e mais velhos (>45) com diagnóstico de CEC. Entre os pacientes jovens, 39,5% relataram tabagismo, 30,9% consumo de álcool, e 24,4% tinham o hábito de fumar e ingerir bebidas alcoólicas concomitantemente (BATISTELLA, 2022). Esses achados reforçam a importância das políticas públicas de saúde para combater os hábitos deletérios. A localização anatômica mais frequente para os casos de CEC foi a borda lateral da língua (n=14/50,0%), seguida pelo assoalho bucal (n=3/10,7%). Esses achados são semelhantes aos de Costa e colaboradores (2022), que avaliaram, retrospectivamente, 626 pacientes jovens com CEC. A língua e o assoalho bucal costumam ser acometidos simultaneamente em casos avançados de CEC, compartilhando fatores etiológicos e comportamento biológico semelhantes (COSTA, 2022). A apresentação clínica mais comum foi de lesão nodular com ulceração (n=9/32,1%), com um tempo médio de evolução de 9,8 meses e tamanho médio de 3,0 cm. Achados similares foram observados pelo estudo retrospectivo de Falaki e colaboradores (2011). Os autores analisaram 21 CECs em pacientes jovens, e observaram que a apresentação clínica predominante foi de lesão exofítica com ulceração, com duração das lesões variando entre 2 semanas e 7 meses (FALAKI, 2011). No entanto, em um estudo de coorte que avaliou as características clinicopatológicas de 150 pacientes jovens com CEC, foi percebido que, destes, 102 (72,0%) casos apresentaram lesões com tamanho ≤ 2 cm (MNEIMNEH, 2021).

4. CONCLUSÕES

De acordo com os presentes dados preliminares conclui-se que pacientes jovens com LO e CEC são, majoritariamente, acometidos na sua quarta década de vida, com predomínio pelo sexo masculino, com lesões localizadas preferencialmente, em borda lateral da língua e presença de algum hábito deletério. Histologicamente, a maioria das LOs apresentaram algum grau de displasia epitelial. Em conjunto, esses dados preliminares devem alertar os

clínicos sobre a importância de realizar um exame intraoral minucioso, além de reforçar a necessidade de conscientização sobre os hábitos deletérios. Ao final do estudo, espera-se que os autores contribuam para a literatura sobre esse tema.

5. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

- AGUIRRE-URIZAR, J. M.; LAFUENTE-IBÁÑEZ DE MENDOZA, I.; WARNAKULASURIYA, S. Malignant transformation of oral leukoplakia: Systematic review and meta-analysis of the last 5 years. **Oral Diseases**. v. 27, n. 8, p 1881–1895, 2021.
- BATISTELLA, E. A.; GONDAK, R.; RIVERO, E. R. C.; WARNAKULASURIYA, S.; GUERRA, E.; PORPORATTI, A. L.; CANTO, G. L. Comparison of tobacco and alcohol consumption in young and older patients with oral squamous cell carcinoma: a systematic review and meta-analysis. **Clinical Oral Investigation**, v. 26, n. 12, p.6855-6869, 2022.
- BARROS, C. C. S.; FREITAS, R. A.; MIGUEL, M. C. C.; SILVEIRA, E. J. D. DNA damage through oxidative stress is an important event in oral leukoplakia. **Archives of Oral Biology**. v. 135, n. 105359, 2022.
- CELENTANO A.; GLURICH, I.; BORGNACKE, W. S.; FARAH, C. S.. World Workshop on Oral Medicine VII: Prognostic biomarkers in oral leukoplakia and proliferative verrucous leukoplakia - A systematic review of retrospective studies. **Oral Diseases**. v. 27, n. 4, p. 848-880, 2021.
- COSTA, R. F.; ET AL. Oral Squamous Cell Carcinoma Frequency in Young Patients from Referral Centers Around the World. **Head and Neck Pathology**. v.16, n. 3, p755-762, 2022.
- FALAKI, F.; DALIRSANI, Z.; PAKFETRAT, A.; FALAKI, A.; SAGHRAVANIAN, N.; NOSRATZEHI, T.; PAZOUKI, M. Clinical and histopathological analysis of oral Squamous cell carcinoma of young patients in Mashhad, Iran: A retrospective study and review of literatures. **Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal**. v. 16, n. 4, p e473-477, 2011.
- MELLO, F. W.; MIGUEL, A. F. P.; DUTRA, K. L.; PORPORATTI, A. L.; WARNAKULASURIYA, S.; GUERRA, E. N. S.; RIVERO E. R. C.. Prevalence of oral potentially malignant disorders: A systematic review and meta-analysis. **Journal of Oral Pathology & Medicine**. v. 47, n. 7, p 633-640, 2018
- MNEIMNEH, W. S.; XU, B.; GHOSSEIN, C.; ALZUMAILI, B.; SETHI, S.; GANLY, I.; KHIMRAJ, A.; DOGAN, S.; KATABI, N. Clinicopathologic Characteristics of Young Patients with Oral Squamous Cell Carcinoma. **Head and Neck Pathology**. v. 15, n. 4, p 1099-1108, 2021.
- NG, J. H.; IYER, N. G.; TAN, M.H.; EDGREN, G. . Changing epidemiology of oral squamous cell carcinoma of the tongue: A global study. **Head and Neck**, v. 39, n. 2, p. 297–304, 2017.
- NOGUTI, J.; ALVARENGA, T. A.; MARCHI, P.; OSHIMA C. T. F.; ANDERSEN M. L.; RIBEIRO, D. A. The influence of sleep restriction on expression of apoptosis regulatory proteins p53, Bcl-2 and Bax following rat tongue carcinogenesis induced by 4-nitroquinoline 1-oxide. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 44, n. 3, p. 222-228, 2015.
- ODELL, E.; KUJAN, O.; WARNAKULASURIYA, S.; SLOAN, P.. Oral epithelial dysplasia: Recognition, grading and clinical significance. **Oral Diseases**. v. 27, n. 8, p. 1947–1976, 2021.
- PORTO, U.N.; LAUREANO N.K.; DOS SANTOS, N. S.; RODRIGUES, A. Z.; FERRI, C. A.; DE LIMA, T. B.; RADOS, P. V.; HILDEBRAND, L. C.; MARTINS, M. A. T.; CARRARD, V. C.; VISIOLI, F. Leukoplakia and erythroplakia in youngsters versus older individuals: a clinicopathological retrospective study. **Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal**. v. 29, n. 5, p e665-e672, 2024.
- ROZA, A. L. O. C.; KOWALSKI, L. P.; JR, W. N. W.; JR, G. de C.; CHAVES, A. L. F.; ARAÚJO, A. L. D.; RIBEIRO, A. C. P.; BRANDÃO, T. B.; LOPES, M. A.; VARGAS, P. A.; SANTOS-SILVA, A. R.. Oral leukoplakia and erythroplakia in young patients: a systematic review. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology**. v. 131, n. 1, p 73-84, 2021.
- SPEIGHT, P. M.; KHURRAM, S. A.; KUJAN, O.. Oral potentially malignant disorders: risk of progression to malignancy. **Oral and Maxillofacial Pathology**. v. 125, n. 6, p 612-627, 2018.
- WARNAKULASURIYA, S. Oral potentially malignant disorders: A comprehensive review on clinical aspects and management. **Oral Oncology**. v. 102, n.104550, p. 1-5, 2020.
- WARNAKULASURIYA, S.; KUJAN, O.; AGUIRRE-URIZAR, J. M.; BAGAN, J. V.; GONZÁLEZ-MOLES, M. A.; KERR, A. R.; LODI, G.; MELLO, F. W.; MONTEIRO, L.; OGDEN, G. R.; SLOAN, P.; JOHNSON, N. W. Oral potentially malignant disorders: A consensus report from an international seminar on nomenclature and classification, convened by the WHO Collaborating Centre for Oral Cancer. **Oral Diseases**. v. 27, n. 8, p 1862-1880, 2021.
- WHO. Classification of Head and Neck Tumours. **International Agency for Research on Cancer (IARC)**. [s.l.: s.n.]. v. 5, 2022.