

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
DOUTORADO EM ODONTOLOGIA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO PATOLOGIA BUCAL**

**Taiane Berguemaier de Lima**

**ANÁLISE DO PERFIL DAS DESORDENS POTENCIALMENTE MALIGNAS  
E DO PAPEL DA AUTOFAGIA CELULAR NA PROGRESSÃO DESSAS  
LESÕES DURANTE A CARCINOGENESE BUCAL**

Porto Alegre, 2021

**UNIVERSIDADE FEDERAL DO RIO GRANDE DO SUL  
PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA  
DOUTORADO EM ODONTOLOGIA  
ÁREA DE CONCENTRAÇÃO PATOLOGIA BUCAL**

Taiane Berguemaier de Lima

**ANÁLISE DO PERFIL DAS DESORDENS POTENCIALMENTE MALIGNAS  
E DO PAPEL DA AUTOFAGIA CELULAR E NA PROGRESSÃO DESSAS  
LESÕES DURANTE A CARCINOGENESE BUCAL**

**Linha de Pesquisa: Câncer Bucal**

Tese de doutorado apresentada ao programa de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, como requisito a obtenção do título de doutor em Odontologia.

Área De Concentração: Patologia Bucal

Orientadora: Profa. Dra. Fernanda Visioli

Porto Alegre

2021

### CIP - Catalogação na Publicação

de Lima, Taiane  
ANÁLISE DO PERFIL DAS DESORDENS POTENCIALMENTE  
MALIGNAS E DO PAPEL DA AUTOFAGIA CELULAR NA  
PROGRESSÃO DESSAS LESÕES DURANTE A CARCINOGENESE  
BUCAL / Taiane de Lima. -- 2021.  
80 f.  
Orientadora: Fernanda Visioli.

Tese (Doutorado) -- Universidade Federal do Rio  
Grande do Sul, Faculdade de Odontologia, Programa de  
Pós-Graduação em Odontologia, Porto Alegre, BR-RS,  
2021.

1. Desordens potencialmente malignas. 2. Câncer  
bucal. 3. Autofagia. 4. Hidroxicloroquina. 5. Modelo  
animal. I. Visioli, Fernanda, orient. II. Título.

Elaborada pelo Sistema de Geração Automática de Ficha Catalográfica da UFRGS com os  
dados fornecidos pelo(a) autor(a).

## DEDICATÓRIA

Dedico esta tese a minha família, que representam minha base, meu porto seguro e que me ensinam e apoiam diariamente.

Ao meu Pai José Vilmar, que não mede esforços para que eu possa atingir meus objetivos, que sempre esteve comigo nos momentos de glória e dificuldades, sempre me motivando com sua fé e sabedoria. Sou eternamente grata por todas as oportunidades que me proporcionou e por estar comigo em todas elas. Teu amor e zelo foram fundamentais para eu chegar até aqui.

À minha Mãe Mara Beatriz, que sempre me proporcionou aconchego, amor e força. Te ter por perto foi fundamental para me deixar segura, otimista e me impulsionar até aqui. Obrigada por me incentivar a voar mais alto e atingir meus objetivos. Mãe tu és a minha fortaleza, sou grata por tudo o que você faz por mim.

À minha irmã Taciane, minha companheira de vida e profissão. Tu deixas a vida mais alegre e divertida. Obrigada pela amizade, cumplicidade e por estar sempre ao meu lado. Teu amor e carinho foram fundamentais para essa conquista.

Aos meus avós Renata e Vilma, por serem tão carinhosos e amorosos ao longo de toda a minha vida. Os conselhos de vocês valem ouro. Sou muito grata por ter vocês presentes e vibrando por cada conquista minha.

À Chica, que cuida de mim desde quando era bebê até os dias atuais. Muito obrigada por ter me estimulado a alcançar voo em direção aos meus sonhos.

Por fim, dedico esta tese à Lolo, pet da família. Sempre alegre, carinhosa e companheira.

Amo vocês!!

## AGRADECIMENTOS

Muito difícil encontrar palavras para descrever os momentos e as pessoas que participaram da construção deste sonho juntamente comigo. Eles foram vividos e sentidos com todos os encantos que merecem, e nada mais do que justo, agradecer a todos aqueles que me ajudaram a concretizá-lo.

A Deus, pelo dom da vida, por iluminar e abençoar o meu caminho mesmo quando tudo parece incerto, por me guiar e me dar força para superar com sabedoria todos os obstáculos impostos pela vida.

Agradeço do fundo do meu coração a minha querida orientadora Fer, por toda paciência, confiança e apoio ao longo desses anos que trabalhamos juntas. Tu me ensinaste muito sobre ser pesquisadora, professora e acima de tudo a ser uma profissional humana e com empatia. Tu és meu grande exemplo profissional. Obrigada por todos os ensinamentos compartilhados, tempo investido, carinho e aconchego ao longo desse período. Sou muito orgulhosa em te ter como orientadora e amiga.

Agradeço de forma muito especial à UFRGS e a Faculdade Odontologia, em especial aos professores e técnicos-administrativos que contribuíram de alguma forma para a realização deste doutorado. Também agradeço ao Programa de pós-graduação em Odontologia, um programa de excelência que me proporcionou oportunidades e ensinamentos. À CAPES, agradeço pela bolsa de doutorado concedida.

Gostaria de agradecer ao Hospital de Clínicas de Porto Alegre, por todo suporte para a realização desta pesquisa. E estendo meus agradecimentos a equipe da Unidade de experimentação animal pelo acolhimento e auxílio durante todo o período experimental.

Aos visiólicos agradeço por poder contar com vocês nos trabalhos em equipe. Aprendi muito com cada um de vocês e espero que eu tenha ensinado algo a vocês também. A Viviane Palmeira, agradeço por todo apoio desde o meu

primeiro dia como aluna de pós-graduação. Sempre amiga e com um abraço afetuoso.

Agradeço aos alunos de iniciação científica Natália Souza e Luan Lima, os quais tive a honra de conviver durante estes anos. Obrigada pela amizade, companheirismo e por me ajudarem a tornar este sonho possível.

Aos professores da Patologia Bucal e da Histologia Bucal, por serem exemplo de profissionais e seres humanos. Agradeço por me acolherem, pelos ensinamentos e incentivo. Vocês fizeram a diferença na minha vida profissional.

À amiga Vivi, minha dupla de pós-graduação, almoços, festas e congressos. Nossa amizade foi crescendo a cada dia, se tornando fundamental para essa conquista e também para que os dias em Porto Alegre fossem mais leves e divertidos. Tu é demais, e sou muita grata por te ter comigo em todas as etapas.

A todos os colegas de pós-graduação da Patologia Bucal, obrigada pelo convívio, amizade construída e troca de experiências. Estendo meus agradecimentos em especial as amigas Belkiss, Ingrid, Paloma e Rúbia. Vocês foram fundamentais nessa jornada fazendo com que toda angústia fosse dividida, conhecimento compartilhado e alegrias multiplicadas. Torço pelo sucesso e felicidade de vocês com todo meu coração.

Agradeço aos colegas, funcionários e pacientes do Instituto do Câncer Infantil por toda credibilidade e confiança depositada no meu trabalho e por me incentivarem a realização deste sonho. Estendo agradecimento especial aos colegas do Nap por tornarem os meus dias mais leves e descontraídos. O companheirismo de vocês foi essencial para essa trajetória.

Agradeço a Mônica Gottardi, minha “chefe”, por ser compreensível sempre que precisei me ausentar para realizar algo da pesquisa. Tua amizade, incentivo e carinho são fundamentais nesta conquista. Ao Dr. Lauro, grande

amigo, incentivador e conselheiro, nossas conversas são de grande valia para esta conquista. Sou grata por tanto carinho.

À minha dupla, amiga de todas as horas e de trabalho Thayze. Sou tão feliz com nossa cumplicidade. Teu apoio e amizade tornaram o finalzinho desta trajetória mais alegre e leve. Tu moras no meu coração. Estendo meu agradecimento à Leticia, a "Fona". Grande amiga e colega de trabalho. Sempre paciente com toda a minha euforia. Tua amizade fez a diferença nessa etapa.

Agradeço ao meu colega de faculdade Rodrigo, por me acompanhar desde a graduação até a realização desse sonho. Dividiu comigo angústias e ansiedade, mas sempre torcendo e me incentivando. Tua amizade é muito importante.

Agradeço as minhas amigas e amigos por fazerem a minha vida mais prazerosa e alegre. Fico muito feliz de ver todas as amizades que construí na infância, escola, faculdade, na cidade de Santa Maria e Porto Alegre. Me sinto sortuda por ter tantas amizades maravilhosas.

Por fim, sou somente grata a todos que participaram deste sonho.

## RESUMO

O câncer de boca é a quinta neoplasia mais comum no Brasil. Sua incidência e mortalidade variam de acordo com a localização geográfica. O diagnóstico tardio afeta na sobrevida e no prognóstico, sendo necessário melhorar o diagnóstico precoce. Algumas lesões podem preceder o câncer bucal, e são denominadas desordens potencialmente malignas orais (DPMO). O objetivo deste estudo foi realizar um levantamento das DPMO diagnosticadas a partir do serviço de Patologia Bucal da FO-UFRGS de Porto Alegre num período de 38 anos e avaliar quais são os fatores que determinam a severidade das lesões. Este estudo retrospectivo, foi realizado a partir da análise de 31663 laudos, no qual as lesões foram selecionadas de acordo com a hipótese de diagnóstico clínico (leucoplasia, eritroplasia, queilite actínica e leucoeritroplasia) e diagnóstico microscópico (alterações de proliferação e maturação epiteliais). Foram extraídos dados importantes relacionados a lesões, e para a realização da análise dos dados a localização das lesões foi agrupada em alto risco (borda de língua, assoalho bucal e palato) e baixo risco (todas as demais localizações intrabucais). Das 31663 lesões diagnosticadas 567 eram DPMO, representando 1,79% do total. A maioria da amostra é do sexo masculino (55,8%), com idade superior a 50 anos (60%) e de cor branca (78,4%). A leucoplasia (77,4%) é a DPMO mais comum e mais frequentemente localizadas nas regiões de baixo risco (67,9%). As lesões presentes em localização de alto risco apresentaram diagnósticos microscópicos mais severos (displasia epitelial/CEC), enquanto lesões não displásicas e queilite actínica estavam predominantemente localizadas em sítios de baixo risco ( $p < 0.001$ ). Na análise temporal nota-se uma mudança no perfil do paciente acometido pelas DPMO entre os anos de 2010 a 2017 no qual demonstra o predomínio de pacientes mais jovens. As queilites actínicas e eritroplasias foram menos frequentes, porém associadas a alterações histopatológicas mais severas ( $p < 0.05$ ). Ainda não é claro quais os fatores que contribuem significativamente para a progressão dessas lesões. Identificar as alterações celulares e moleculares que ocorrem durante a progressão é fundamental para a compreensão desse processo. Autofagia é o processo catabólico que ocorre nos lisossomos, e tem por finalidade degradar os

componentes celulares e proteínas que já não são mais funcionantes. O objetivo deste processo é manter o equilíbrio homeostático celular para sobrevivência adequada em condições estressantes. Diante das funções biológicas da autofagia identificadas até hoje, a relação com o processo neoplásico está sendo intensamente estudado. No entanto seu papel durante a carcinogênese oral ainda não está bem estabelecido. Além disso, a modulação da via autofágica durante a carcinogênese pode ser um potencial alvo terapêutico e quimiopreventivos. Para tal finalidade, utilizamos modelo animal de indução da carcinogênese com 4NQO em ratos Wistar, sendo um grupo tratado também com hidroxicloroquina (HCQ) 10mg/kg/dia, droga inibidora autofágica, durante um período de 20 semanas. O grupo controle (1) clinicamente não apresentou nenhuma lesão, o grupo 2 (4NQO) teve menor quantidade de lesões nas primeiras semanas, demonstrando evolução mais lenta. O grupo 3 (4NQO+HCQ) teve uma evolução mais rápida, com mais animais apresentando lesões já a partir da 13ª semana. Apresentou, também, maior quantidade de lesões nas semanas 14 a 16 ( $p < 0.05$ ). Porém ao final do estudo, na semana 20, os grupos 2 e 3 apresentaram a mesma frequência de carcinomas espinocelulares, 7 animais em cada grupo. No grupo 3 que recebeu HCQ os carcinomas desenvolvidos eram na sua maioria microinvasores. Desse modo conclui-se que a autofagia exerce papéis antagônicos em diferentes momentos da carcinogênese, sendo protetora inicialmente, porém contribuindo com a progressão das lesões quando já estabelecido o fenótipo tumoral.

**Palavras-chave:** desordens potencialmente malignas; câncer bucal; autofagia; hidroxicloroquina; modelo animal.

## ABSTRACT

Oral cancer is the fifth most common neoplasm in Brazil. Its incidence and mortality vary according to geographic location. Late diagnosis affects survival and prognosis, and it is necessary to improve early diagnosis. Some lesions may precede oral cancer and are called potentially malignant oral disorders (PMOD). The aim of this study was to carry out a survey of the PMOD diagnosed at an Oral Pathology from FO-UFRGS in Porto Alegre over a period of 38 years and to assess the factors that determine the severity of the lesions. This retrospective study was carried out from the analysis of 31663 reports, in which the lesions were selected according to the clinical diagnosis hypothesis (leukoplakia, erythroplakia, actinic cheilitis and leukoerythroplakia) and microscopic diagnosis (alterations of epithelial proliferation and maturation). Important data related to injuries were extracted, and for data analysis, the location of the injuries was grouped into high risk (tongue edge, floor of the mouth and palate) and low risk (all other intraoral locations). Of the 31663 diagnostic lesions, 567 were PMOD, representing 1.79% of the total. Most of the sample was male (55.8%), aged over 50 years (60%) and white (78.4%). Leukoplakia (77.4%) being the most frequent PMOD and located in low-risk regions (67.9%). Lesions from high-risk locations had more severe microscopic diagnoses (epithelial dysplasia/CEC), while non-dysplastic lesions and actinic cheilitis were predominantly located in low-risk sites ( $p < 0.001$ ). In the temporal analysis, there is a change in the profile of patients affected by PMOD between the years 2010 to 2017, which demonstrates the predominance of young patients. Actinic cheilitis and erythroplakia were less frequent, however, associated with more severe histopathological alterations. It is still unclear which factors significantly contribute to the progression of these lesions. Identifying the cellular and molecular changes that occur during progression is fundamental to understanding this process. Autophagy is the catabolic process that occurs in lysosomes, and its purpose is to degrade cellular components and proteins that are no longer functioning. The purpose of this process is to maintain cellular homeostatic balance for adequate survival under stressful conditions. Given the biological functions of autophagy identified to date, the relationship with the neoplastic process is being intensively studied. However,

its role during oral carcinogenesis is still not well established. Furthermore, modulation of the autophagic pathway during carcinogenesis could be a potential therapeutic and chemopreventive target. For this purpose, we used an animal model of oral carcinogenesis with 4NQO in rats Wistar and treated one group with hydroxychloroquine (HCQ) 10mg/kg/day, an autophagic inhibitory drug, during 20 weeks. The control group did not clinically present any lesions, group 2 (4NQO) had fewer lesions in the first weeks, showing a slower evolution. Group 3 (4NQO+HCQ) showed a faster evolution, with more animals showing lesions from the 13<sup>th</sup> week onwards. It also presented a greater number of injuries in weeks 14 to 16 ( $p < 0.05$ ). At the end of the study, at week 20, groups 2 and 3 had 7 animals each with malignant tongue tumors. Group 3 (4NQO + HCQ) presented mostly microinvasor carcinomas. Thus, it is concluded that autophagy plays antagonistic roles at different stages of carcinogenesis, being initially protective, however contributing to the progression of lesions when the tumor phenotype is already established.

**Keywords:** potentially malignant disorders; oral cancer; autophagy; hydroxychloroquine; animal model.

## SUMÁRIO

|   |    |
|---|----|
| LISTA DE ABREVIATURAS.....                                  | 13 |
| LISTA DE FIGURAS.....                                       | 15 |
| ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA.....                           | 16 |
| OBJETIVOS.....  | 41 |
| ARTIGO 1.....   | 42 |
| ARTIGO 2.....   | 63 |
| CONSIDERAÇÕES FINAIS.....                                   | 77 |
| CARTA DE APROVAÇÃO DO COMITE DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS.... | 80 |

## LISTA DE ABREVIATURAS

**Bcl-2** – Proteína 2 de linfoma de células B (*B-cell Lymphoma 2*)

**Becn-1** – Beclina-1 (*Beclin-1*)

**CEC** – Carcinoma espinocelular

**CQ** – cloroquina

**DMBA** – 7,12-Dimetilbenz [a] antraceno

**FIP200**- Proteína de interação com a Família FAK de 200 KD

**GDP/GTP** – guanosine triphosphate / guanosine diphosphate

**HCQ** – Hidroxicloroquina

**HIF-1** – Fator induzido por hipóxia 1 (*Hypoxia-induced Factor 1*)

**HPV** – Papilomavírus Humano

**HSC-70** – Proteína de choque térmico

**LAMP-2<sup>a</sup>**- Proteína associada a membrana do lisossomo

**LC3 I/II** – formas I e II da cadeia leve 3 das proteínas associadas a microtúbulos 1<sup>a</sup> e 2<sup>a</sup> (*Light Chain 3 of microtubule-associated protein 1<sup>a</sup> and 2<sup>a</sup>*)

**mTOR** – Proteína alvo da rapamicina em mamíferos (*Mammalian Target of Rapamycin*)

**OMS** – Organização Mundial da Saúde

**Plac8** – Proteína do gene 8

**PI3k (I a III)** – Fosfatidilinositol 3-cinase (classes I à III) (*Phosphoinositide*

*Kinase-3 class I to III)*

**Proteínas Atg** – Família de proteínas relacionadas à autofagia (*Autophagy-related protein*)

**ROS** – Espécies reativas de oxigênio

**SQSTM1** – Sequestosome 1

**ULK** - Cinasas Unc 51 like

**UVRAG**- Gene associado a resistência à radiação

**VMP1**- Proteína Transmembrana 49 – *Vacuole Membrane Protein 1*

**4NQO** – 1-óxido de 4-nitroquinolina

## LISTA DE FIGURAS

### Antecedentes e Justificativa

**Figura 1:** Evolução da severidade das alterações epiteliais e das alterações clínicas das lesões potencialmente malignas. **Fonte:** NEVILLE et al. Patologia Oral e Maxilofacial. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

**Figura 2:** Estágios da carcinogênese. Rivera, C. Int J Clin Exp Pathol, 2015.

**Figura 3:** Tipos de autofagia celular. SINGH, S. S. et al. Dual role of autophagy in hallmarks of cancer. Oncogene, v. 37, n. 9, p. 1142–1158, 2018.

**Figura 4:** Via de sinalização da autofagia. São mostradas as principais proteínas envolvidas no processo autofágico. **Fonte:** <http://www.cellsignal.com>.

**Figura 5:** Autofagia na transformação maligna e progressão tumoral. Fonte: GALLUZZI, L. et al. Autophagy in malignant transformation and cancer progression. The EMBO Journal. v.34, p.856–880, 2015.

### Artigo 1

**Figura 1.** Estimativas de razão de prevalência e seus intervalos de confiança (95%) da regressão de Poisson entre as variáveis estudadas e o desfecho displasia epitelial/CEC versus não-displásicos.

### Artigo 2

**Figura 1.** Peso dos animais ao longo de todo o estudo.

**Figura 2.** Consumo de água semanal por caixa.

**Figura 3.** Média de lesões bucais por animal durante o estudo.

**Figura 4.** Imagens representativas das línguas dos animais ao final de 20 semanas do estudo. Fotos captadas imediatamente após a eutanásia. A, grupo controle. B, grupo 4NQO, C, grupo 4NQO + HCQ.

**Figura 5.** Imagens histopatológicas representativas das lesões que os animais desenvolveram.

## 1. ANTECEDENTES E JUSTIFICATIVA

### 1.1 CÂNCER BUCAL

Na cavidade bucal, o carcinoma espinocelular (CEC) é a neoplasia maligna mais frequente. O CEC é derivado de células epiteliais de revestimento da mucosa bucal, podendo ser chamado também de carcinoma epidermóide ou carcinoma de células escamosas (BRENER et al., 2007; INCA 2020). O carcinoma espinocelular representa aproximadamente 90% das neoplasias malignas que acometem os diversos sítios anatômicos intrabucais (BRENER et al., 2007, DRAGOMIR et al., 2010). A localização anatômica mais comumente acometida pelo carcinoma espinocelular bucal é o bordo posterior da língua (além de ser a localização com as taxas mais elevadas de mortalidade), seguida pelo assoalho bucal (BRENER et al., 2007; SIEGEL et al., 2011; HASHIM et al., 2016; INCA 2020). Somente para o Brasil o número de casos novos de câncer de boca, estimado para cada ano do triênio 2020-2022, será de 11.180 casos em homens e de 4.010 em mulheres (INCA, 2020).

O câncer de boca tem como principais fatores de risco o tabagismo e o consumo de álcool, sendo que o risco é 30 vezes maior para os indivíduos que fumam e bebem do que para aquelas pessoas que não o fazem. Além disso a exposição à radiação ultravioleta (no caso do câncer em lábio inferior) e demais fatores relacionados ao estilo de vida, à infecção viral e à genética podem causar alterações sistêmicas no indivíduo e contribuir para a carcinogênese (SCULLY; BAGAN, 2009; BEZERRA et al., 2018; AMERICAN CANCER SOCIETY, 2019).

Os principais tratamentos para essa neoplasia são: cirurgia, quimioterapia e radioterapia, podendo ser utilizada a associação de mais de uma técnica terapêutica (INCA 2020). Em relação ao prognóstico do carcinoma espinocelular este depende do tamanho do tumor, do envolvimento ganglionar, da localização anatômica e da escolha do tratamento (SCULLY; BAGAN, 2009; GÖDENY, 2014).

Geralmente o prognóstico é favorável em estágios iniciais, especialmente aqueles que são bem diferenciados e não metastáticos, entretanto a maioria

das lesões é diagnosticada em uma fase tardia da doença, sendo o prognóstico desfavorável (SCULLY; BAGAN, 2009; CAROLINA et al., 2017). Recentemente têm-se buscado a detecção de biomarcadores que possam contribuir na determinação do prognóstico e assim auxiliar na escolha das abordagens terapêuticas de forma personalizada.

## 1.2 DESORDENS POTENCIALMENTE MALIGNAS

Globalmente é aceito que os carcinomas espinocelulares bucais podem ser precedidos por alterações visíveis na mucosa bucal, as quais são denominadas desordens ou lesões potencialmente malignas. Estas alterações estão presentes na forma de manchas ou placas de coloração branca e/ou vermelha na mucosa bucal (GEORGE et al., 2011; LIU et al., 2012; VAN DER WALL, 2015, WARNAKULASURIYA et al., 2007; REIBEL et al., 2017).

### 1.2.1 LEUCOPLASIA

Dentre as desordens potencialmente malignas bucais, a leucoplasia, eritroplasia e a queilite actínica são as mais comuns do ocidente (REIBEL et al., 2017). Atualmente a leucoplasia é caracterizada como uma mancha ou placa branca não removível por raspagem e que não pode ser caracterizada clinicamente ou histopatologicamente como nenhuma outra patologia (VAN DER WAAL, 2015).

A leucoplasia pode afetar qualquer local da cavidade bucal, mas acometem principalmente a região de gengiva e língua (WALDRON; SHAFER, 1975; CHATURVEDI et al., 2020). A prevalência mundial da leucoplasia bucal é de aproximadamente 4,11% no mundo (MELLO et al., 2018). No estudo realizado em pacientes no sul do Brasil observou-se uma frequência de 1,1% de leucoplasias e essas lesões predominaram em pacientes do sexo masculino, etilistas e fumantes (CARRARD et al., 2011). Corroborando com esse resultado, Pires e colaboradores em 2020, realizaram um levantamento epidemiológico na região sudeste do Brasil no período de 2005 a 2015. Identificaram 684 casos de lesões potencialmente malignas, sendo que 82% das lesões eram leucoplasias, e estas eram mais comuns em pacientes do sexo masculino, etilistas e fumantes (PIRES et al., 2020).

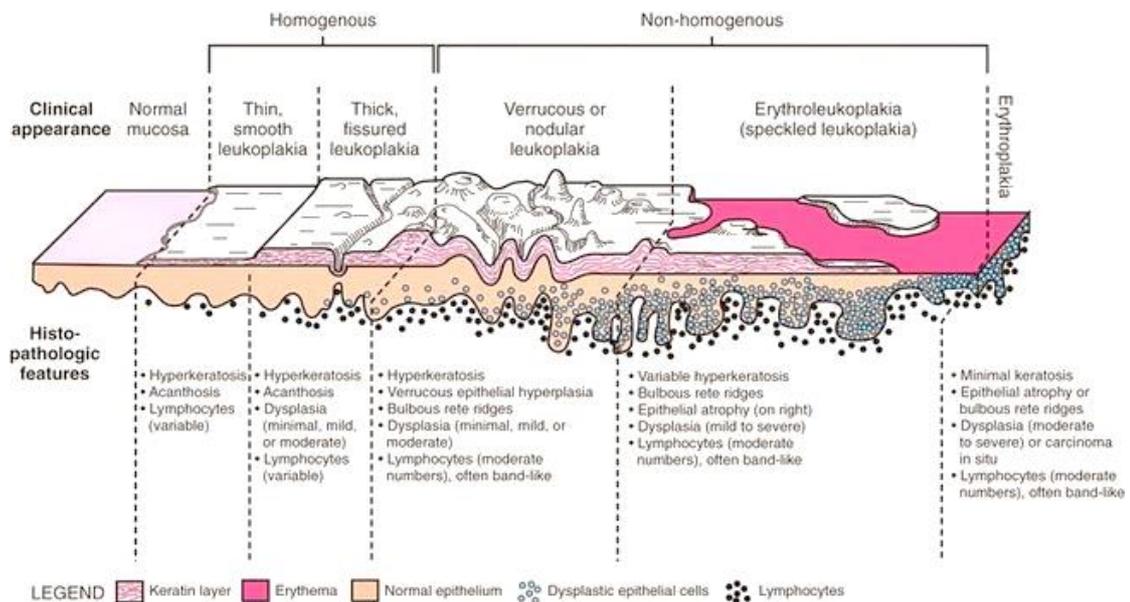
A etiologia da leucoplasia está relacionada ao estilo de vida, incluindo o uso do tabaco e do álcool (PORTER et al., 2018). Chuang e colaboradores, em 2017, observaram que usuários de tabaco e mascadores de betel apresentam 2,7 vezes mais chances de desenvolverem leucoplasia. Um estudo caso-controle realizado na Índia, constatou-se que o consumo de álcool era um fator de risco significativo para leucoplasia bucal mesmo entre não usuários de tabaco (HASHIBE et al., 2000).

Clinicamente as leucoplasias são subdivididas no tipo homogênea e não-homogênea (Figura 1). A leucoplasia do tipo homogênea é plana, fina, uniforme e de cor branca. Podendo ou não apresentar fissuras e os bordos das lesões, podem ou não, estar bem delimitados (WARNAKULASURIYA et al., 2007; VAN DER WALL, 2019). A leucoplasia do tipo não-homogênea é caracterizada predominantemente por lesões brancas e planas, associada a áreas vermelhas e/ou áreas irregulares ou nodulares. Esta variação denomina-se de leucoeritroplasia e tem um risco aumentado de malignização (WARNAKULASURIYA et al., 2007; VAN DER WAAL, 2019).

O diagnóstico da leucoplasia é clínico e por exclusão de outras patologias. Frente ao diagnóstico clínico da leucoplasia é necessário realizar uma biópsia para a identificação das alterações epiteliais (VAN DER WAAL, 2009). Microscopicamente as lesões potencialmente malignas apresentam alterações epiteliais que variam desde áreas de atrofia ou hiperplasia epitelial, acantose, hiperqueratose, displasia epitelial e até carcinoma espinocelular (Figura 1) (VAN DER WAAL, 2009; CARRARD & VAN DER WALL, 2018). As lesões que apresentam displasia epitelial, muitas vezes estão correlacionadas com o subtipo clínico não-homogêneo, sendo em geral considerado o mais importante indicador do potencial de malignização (VAN DER WAAL, 2009). De acordo com WALDRON e SHAFER (1975), após a análise microscópica de 3256 lesões diagnosticadas clinicamente como leucoplasias, 80% das lesões apresentavam combinações de hiperortoceratose, hiperparaceratose e acantose. Observou-se também a presença de 12,2% de displasia leve a moderada nas lesões, 4,5% de displasia epitelial grave ou carcinoma *in situ* e foram diagnosticados 3,1% como carcinomas espinocelulares.

Atualmente, considera-se que a taxa de transformação maligna de lesões leucoplásicas é de aproximadamente 2 a 3% anualmente (CARRARD & VAN DER WAAL, 2018). No entanto, estes dados variam na literatura. Um estudo retrospectivo realizou 101 biópsias de leucoplasias revelou que 69% dessa amostra apresentavam displasia epitelial ou carcinoma in situ. De todas as lesões, 12% desenvolveram carcinoma espinocelular após um período médio de acompanhamento de 7 anos e meio (HOLMSTRUP et al., 2007). Já Chaturvedi e colaboradores (2020), conduziram um estudo de coorte retrospectivo, sendo que 1888 pacientes com leucoplasias foram biopsiados e destas, 161 leucoplasias transformaram-se em carcinoma espinocelular e dessa amostra as displasias severas demonstraram maior risco para transformação maligna.

São considerados fatores de risco de transformação maligna: o gênero feminino, a longa duração da lesão, a leucoplasia em não-fumantes, a localização da lesão na língua ou assoalho bucal, leucoplasia não-homogêneas, idade avançada do paciente, dimensões superiores a 2cm e a presença de displasia epitelial (LIMA et al., 2012; HOLMSTRUP et al., 2006; WARNAKULASURYA et al., 2015; SPEIGHT et al., 2018).



**Figura 1:** Severidade das alterações epiteliais e das alterações clínicas das lesões potencialmente malignas. **Fonte:** NEVILLE et al. Patologia Oral e Maxilofacial. 4 ed. Rio de Janeiro: Elsevier, 2016.

### 1.2.2 ERITROPLASIA

Do mesmo modo que a leucoplasia, a eritroplasia é definido como uma mancha ou placa avermelhada que não pode ser caracterizada clinicamente ou histopatologicamente como qualquer outra doença definível (VAN DER WAAL, 2009).

A eritroplasia é pouco frequente, e existem poucos dados sobre sua prevalência, o último percentual relatado foi 0,02 a 0,2% na população (VILLA et al., 2011). A maioria dos dados é estabelecida em grupos selecionados de indivíduos, como no estudo realizado por Ferreira e colaboradores em 2016 com uma população de trabalhadores rurais do nordeste do Brasil que constatou que 0,3% das desordens potencialmente malignas bucais eram eritroplasias (FERREIRA et al., 2016).

O uso de tabaco, álcool e infecções pelo papilomavirus humano (HPV) são considerados fatores etiológicos (HOLMSTRUMP, 2017). Clinicamente se apresenta como uma lesão avermelhada, bem definida e de textura aveludada, as vezes a lesão pode ter áreas vermelhas e brancas sendo definida como eritroleucoplasia (ABATI et al., 2020). As localizações mais frequentes é o palato mole, seguido pelo ventre de língua, assoalho bucal e pilar amigdaliano (MAYMONE et al., 2018).

A eritroplasia tem maior risco de transformação maligna em comparação com todas as outras desordens potencialmente malignas bucais. O alto risco de transformação maligna baseia-se no fato de que histologicamente se apresenta comumente como displasia epitelial, carcinoma *in situ* ou já como carcinoma espinocelular (REICHART et al., 2005; ABATI et al., 2020). Atualmente não há nenhuma ferramenta diagnóstica confiável para identificar quais eritroplasias progredirão para uma neoplasia, entretanto para obter o melhor prognóstico possível para os pacientes com eritroplasias é que devem ser acompanhados em intervalos curtos, independentemente da possível relação com outras doenças ou irritantes (HOLMSTRUMP, 2017).

### 1.2.3 QUEILITE ACTÍNICA

A queilite actínica é uma desordem potencialmente maligna que ocorre exclusivamente nos lábios, sendo 95% no vermelhão dos lábios inferiores (SILVA et al., 2020). A sua prevalência mundial varia de 4,6% a 43,2%, entretanto dados de uma recente revisão sistemática e meta-análise, na qual apenas estudos com diagnóstico histopatológico de queilite actínica foram incluídos, demonstram prevalência de apenas 2,08% (SILVA et al., 2020; MELLO et al., 2018).

Essa patologia tem como principal fator etiológico a exposição crônica à radiação solar, sendo considerado população de alto risco aquelas que vivem em regiões tropicais sob exposição excessiva a radiação ultravioleta e os que exercem atividades profissionais ao ar livre. Os indivíduos do sexo masculino de pele clara na faixa etária dos 40 anos são os mais acometidos por essa condição (RODRIGUEZ-BLANCO et al., 2018; MARKOPOULOS et al., 2004). Do mesmo modo, o consumo de álcool e tabaco a longo prazo, associado à ação carcinogênica da radiação ultravioleta, aumenta muito o risco de desenvolver esta doença (LOPES et al., 2015).

Clinicamente a queilite actínica é caracterizada por atrofia do vermelhão do lábio inferior, perda de elasticidade e presença de placas que podem ser ásperas e escamosas, além de úlceras e fissuras. Um aspecto importante é a perda de nitidez entre o vermelhão do lábio e a pele (SARMENTO et al., 2014; MELLO et al., 2018).

Microscopicamente a queilite actínica apresenta alterações epiteliais que variam de hiperplasia, acantose ou atrofia do epitélio, espessamento da camada de queratina e por vezes pode apresentar displasia epitelial de leve a severa. No tecido conjuntivo a degeneração basofílica das fibras colágenas é denominada elastose solar (SARMENTO et al., 2014).

O diagnóstico precoce e o tratamento adequado são necessários para evitar a progressão para malignidade. Existem diferentes tratamentos disponíveis para pacientes com queilite actínica, dependendo da extensão clínica das lesões e das alterações epiteliais observadas microscopicamente

(GONZAGA et al., 2017). O tratamento para esse tipo de lesão tem como objetivo destruir o epitélio anormal. No entanto, qualquer tratamento será eficaz apenas com a colaboração dos pacientes e do conhecimento sobre a importância da proteção solar e de consultas regulares para controle da progressão das lesões (GONZAGA et al., 2017).

### 1.3 CARCINOGENESE

O mecanismo de formação do câncer é denominado carcinogênese, esse é um processo de etapas múltiplas tanto a nível fenotípico quanto a nível genético, resultando do acúmulo de várias mutações. Esse processo envolve três estágios para a instalação da doença, que são:

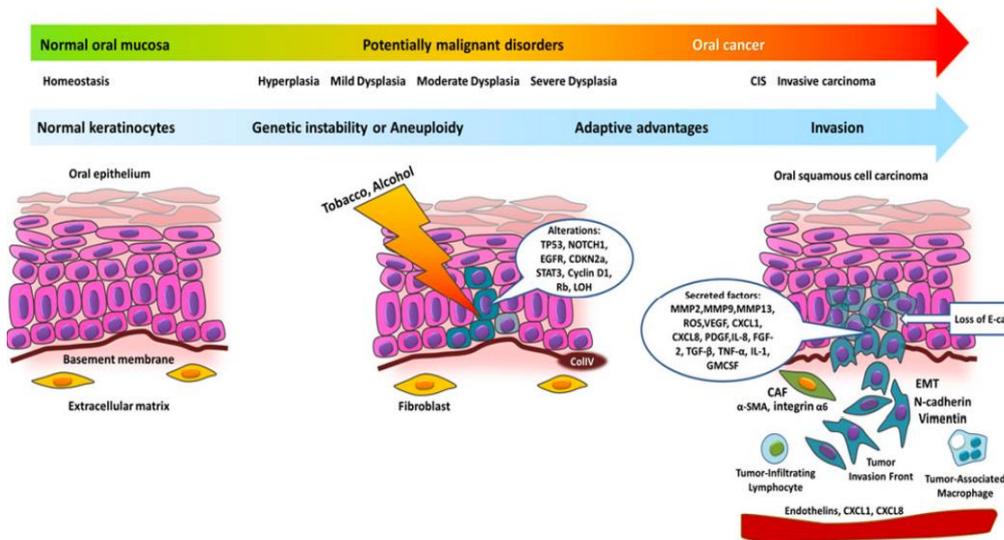
Iniciação – Primeira etapa do processo de carcinogênese, onde as células normais sofrem um dano irreversível em seu DNA pela ação de determinado agente carcinogênico tornando-se geneticamente modificada;

Promoção – Nesta segunda etapa, ocorre a atuação de agentes denominados oncopromotores que favorecem a proliferação celular enquanto afetam o mecanismo de apoptose dessas células, causando expansão clonal das células alteradas;

Progressão – Este é o último estágio o qual se caracteriza pela multiplicação descontrolada e irreversível das células alteradas que acumulam progressivamente mais danos genéticos até o estabelecimento do fenótipo maligno. Neste momento a neoplasia encontra-se instalada evoluindo até o surgimento das primeiras manifestações clínicas da doença.

Desse modo, todo o processo inicia quando determinado agente com propriedade mutagênica causa alteração no DNA celular, quadro este que pode ou não ser reparado. No caso de incapacidade de reparação do DNA, podem estar envolvidas mutações hereditárias nos genes que influenciam esse reparo e/ou também naqueles responsáveis pelo crescimento celular ou apoptose, resultando assim em uma desregulação da proliferação celular. Dessa forma, ocorrerá a ativação dos oncogenes promotores de crescimento e a inativação dos genes supressores de tumor, e ainda uma diminuição da apoptose uma vez alterados os genes que regulam esse mecanismo celular

(HANAHAN & WEINBERG, 2011).



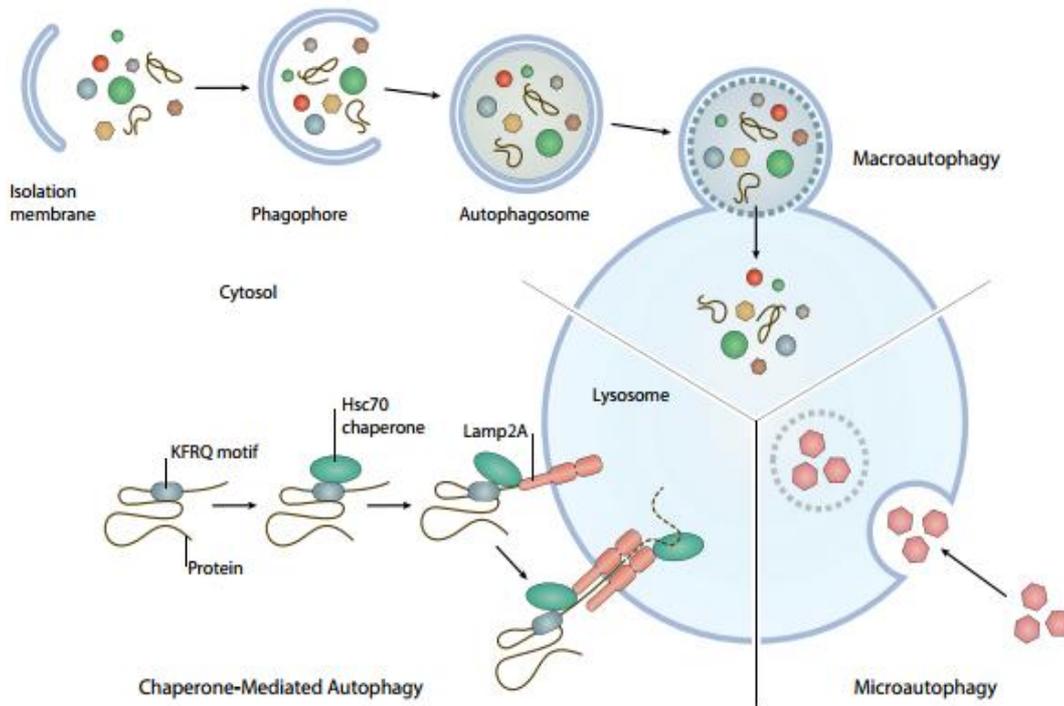
**Figura 2:** Estágios da carcinogênese. Rivera, C. Int J Clin Exp Pathol, 2015.

#### 1.4 AUTOFAGIA CELULAR

A autofagia é o processo catabólico pelo qual células degradam componentes próprios através da via lisossomal e assim mantêm a homeostasia celular. A autofagia se retém em níveis basais nas células e é induzida por diferentes estressores, principalmente privação de nutrientes e dano a componentes celulares como proteínas e organelas (MATHEW & WHITE, 2011). Desse modo, a autofagia é um processo complexo, que compreende de três vias principais de degradação, as quais diferem essencialmente nos meios de entrega para o lisossomo, que são: macroautofagia, microautofagia e autofagia mediada por chaperonas (YANG et al., 2011).

A macroautofagia, também conhecida simplesmente como autofagia é iniciada pela formação de uma membrana ao redor de organelas e proteínas, denominada fagóforo (Figura 2). Este pode ser originado a partir da membrana citoplasmática, do retículo endoplasmático ou da membrana mitocondrial externa. A fusão das extremidades do fagóforo origina uma estrutura fechada de dupla membrana, designada autofagossomo. A

membrana externa do autofagossomo se funde com o lisossomo originando o autolisossomo que é responsável pela digestão celular (GALUZZI et al., 2015).

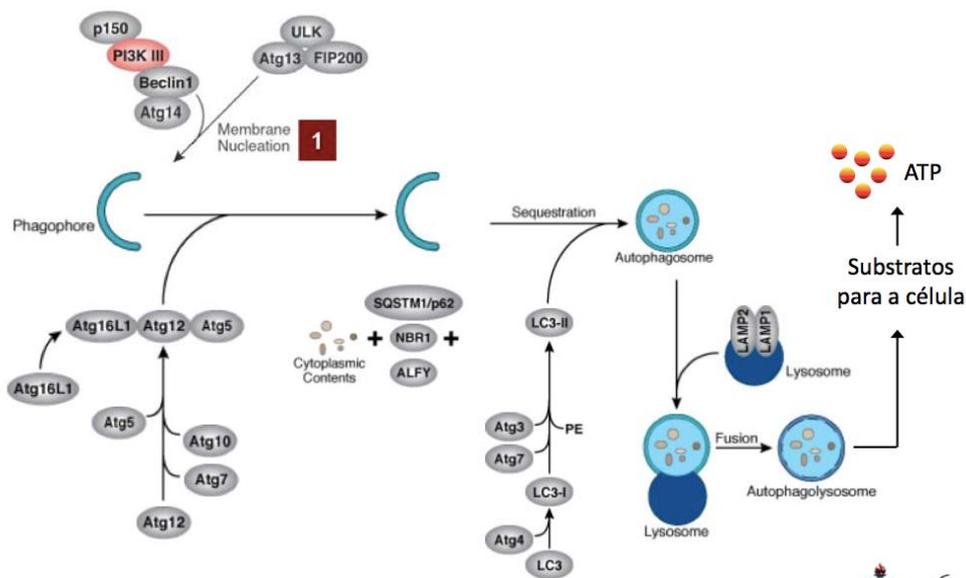


**Figura 3:** Tipos de autofagia celular. SINGH, S. S. et al. Dual role of autophagy in hallmarks of cancer. *Oncogene*, v. 37, n. 9, p. 1142–1158, 2018.

Na microautofagia, o próprio lisossoma envolve pequenos componentes do citoplasma por invaginação interna da membrana lisossomal. A autofagia mediada por chaperonas, é responsável por degradar proteínas citosólicas por meio da atuação principal de duas proteínas, denominadas de HSC-70 e LAMP-2A, sendo que a proteína LAMP-2A atua como um receptor no lisossomo (MIZUSHIMA & KOMATSU, 2011).

Na macroautofagia, a via autofágica é controlada pelas proteínas da família ATG (Figura 3). Essas proteínas são responsáveis pela formação do fagóforo e fechamento do autofagossomo (YANG & KLIONSKY, 2010; HAVAKI et al., 2017). O processo autofágico tem início com a formação do Complexo ULK, este é composto pelas proteínas Ulk1, ATG13 e FIP200. Esse

complexo sinaliza a iniciação do segundo complexo, o PI3K. Após, o processo de alongamento do fagóforo se inicia. Nesse instante o complexo ULK e PI3K sinalizam para ativar a proteína ATG7, a qual se conjuga as proteínas ATG5 e ATG12. As quais irão se ligar a proteína ATG16L1 para ocorrer o alongamento da membrana do fagóforo. O fechamento do fagóforo em autofagossomo ocorre devido à conjugação da fosfatidiletanolamida (PE) à proteína LC3 I, através das proteínas ATG7 e ATG3. O LC3 é modificado pela proteína Atg4 na forma de LC3-I, a qual permanece dispersa no citoplasma. O LC3-I é modificado pelas proteínas Atg7 e Atg3 levando à formação do LC3-II, o qual é responsável pelo fechamento do autofagossomo (YANG & KLIONSKY, 2010; HAVAKI et al., 2017).



**Figura 4 :** Via de sinalização da autofagia. São mostradas as principais proteínas envolvidas no processo autofágico. **Fonte:** <http://www.cellsignal.com>.

### 1.5 AUTOFAGIA E CARCINOGENESE

No câncer, há altos níveis de autofagia e este processo ocorre em decorrência de estresses presentes no microambiente tumoral como a hipóxia, privação de nutrientes e a acidose. A hipóxia se encontra presente em diversas regiões dos tumores sólidos e resulta de um desequilíbrio entre produção e o consumo de oxigênio. A hipóxia no tumor é causada pela perfusão tecidual limitada e a vasculatura anormal do tumor (HOOGSTEEN et al., 2007). As evidências indicam que 60% dos tumores se desenvolvem em

condições de hipóxia (YANG et al., 2015). A hipóxia induz a expressão do fator de transcrição HIF-1<sup>α</sup> (fator de indução de hipóxia) e desencadeia uma resposta celular que aumenta a expressão de proteína a qual bloqueia o BCL-2 e induz autofagia (SINGH et al., 2018).

A privação de fatores de crescimento no microambiente tumoral ocorre devido à intensa proliferação celular e deficiente aporte sanguíneo. A oscilação entre autofagia e apoptose promove a homeostase do tecido e proporciona que as células resistentes à apoptose utilizem a autofagia como mecanismo de sobrevivência quando os fatores de crescimento são limitados e a absorção dos nutrientes diminui (ALTMAN; RATHMELL, 2009). Também em ambientes de baixo pH, a autofagia foi observada pela identificação de proteínas como LC3 e pela presença de vacúolos de dupla membrana, os chamados autofagossomos (WOJTKOWIAK; GILLIES, 2012).

No entanto, as funções da autofagia no câncer são complexas, apresentando um papel dual. Além do papel pró-tumoral auxiliando na sobrevivência celular, de certo modo as funções da autofagia atuam também como um mecanismo supressor de tumor, evitando o acúmulo de organelas e proteínas danificadas (ZHI; ZHONG, 2015). Além disso, a autofagia nessa fase também degrada agentes tóxicos e citotóxicos, atuando assim como um mecanismo preventivo de estresse oxidativo. Dessa forma, a autofagia atua limitando a instabilidade do genoma e dano tecidual, o que é benéfico para prevenir a carcinogênese (CUI et al., 2013). Entretanto, se o processo de carcinogênese avança, as células necessitam da autofagia para sobreviverem ao microambiente que surge devido ao aumento da atividade proliferativa, passando então a autofagia para uma função pró-tumoral (ALTMAN; RATHMELL, 2009).

A literatura prévia evidencia que o aumento dos níveis de autofagia celular ocorre durante o processo de carcinogênese antes do surgimento do câncer, no entanto, não é claro se nesse momento a autofagia exerce um papel anti ou pró-carcinogênico. Estudos *in vitro* que expõem células a substâncias carcinogênicas, a transformação maligna celular é acompanhada de maiores níveis de autofagia. Células epiteliais de pulmão humano e células neoplásicas pulmonares expostas ao metal Níquel tiveram o aumento da conversão de LC3-I em LC3-II de maneira dependente da dose e do tempo,

enquanto essa conversão não foi tão intensa nas células neoplásicas pulmonares (SON et al., 2017). Células epiteliais de câncer de próstata, após serem expostas ao metal cádmio também apresentaram indução do processo autofágico, mediado por Plac8, e sofreram o processo de transformação maligna (KOLLURU et al., 2017).

Já foi demonstrado também que na carcinogênese bucal os níveis de autofagia aumentam. Foi observado que células positivas para LC3-II aumentavam em carcinomas espinocelulares em relação às lesões potencialmente malignas orais e à mucosa normal, porém sem associação com pior prognóstico e sobrevida desses pacientes. Nesse mesmo estudo foi observado aumento de células positivas em lesões leucoplásicas displásicas e com pior evolução em comparação com amostras de leucoplasias não-displásicas e com boa evolução (DE LIMA et al., 2017).

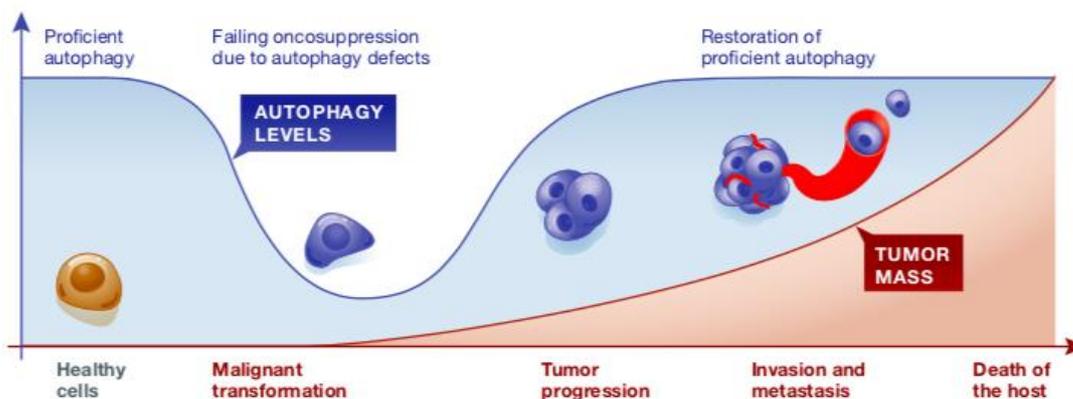
Portanto, inicialmente será apresentada a evidência de um papel protetor da autofagia nas fases iniciais da carcinogênese e então, aqueles encontrados como eventos pró-carcinogênicos nas etapas posteriores desse processo. Nas células normais a autofagia, contribui para a manutenção da integridade celular e eliminação dos agentes pró-carcinógenos. Dessa forma, este mecanismo auxilia na manutenção das células normais, contribuindo também para a manutenção do metabolismo energético normal, degradação de proteínas potencialmente oncogênicas, sobrevivência de células imunes e imunovigilância antitumoral e controle dos níveis inflamatórios teciduais (GALLUZZI et al., 2015).

Uma das relações mais importantes entre autofagia e supressão tumoral está relacionada a regulação das espécies reativas de oxigênio (ROS). O aumento da produção de ROS induz alterações nas bases de DNA, acelerando a mutagênese, e aumentando a ativação de oncogenes, estimulando assim a carcinogênese. As mitocôndrias são as principais fontes de ROS intracelular e sua produção aumenta à medida que estas organelas envelhecem ou ficam danificadas. Neste contexto, a autofagia ajuda a evitar danos através da degradação seletiva de mitocôndrias defeituosas (mitofagia). Consequentemente, em etapas iniciais do câncer a inibição da autofagia facilita a instabilidade genômica ao ativar oncogenes e efeitos genotóxicos indutores, conforme observado em células defeituosas para

autofagia. Assim, a remoção seletiva de mitocôndrias potencialmente danificadas reduz o excesso de ROS e assim limita os efeitos de promoção tumoral (GOMES et al., 2011; FILOMENI et al., 2015).

Em animais geneticamente modificados *knockout* para genes da autofagia, como o Beclin-1, ocorre o surgimento de tumores espontaneamente, do tipo pólipos intestinais (NISHIUMI et al., 2012). Em um estudo foi demonstrado pela primeira vez que a disfunção da via autofágica através da deleção do Beclin-1 (*BECN1*) aumentava a proliferação celular e a frequência de neoplasias malignas como tumores de pulmão, fígado e linfomas (LIANG et al., 1999). A proteína Beclin-1 atua regulando e ligando-se ao BCL-2 e ATG14 (gene 14 relacionado à autofagia) e VMP1 (Vacúolo proteína de membrana 1) que são genes importantes para a formação de autofagossomos (TANG et al., 2014). Outro mecanismo pelo qual a Beclin-1 é uma proteína promotora da autofagia, é por regular as funções supressoras de tumor por meio de seus reguladores, como UVRAG e fator-1 de interação com Bax (ALEXANDRA et al., 2020).

De forma semelhante, animais geneticamente modificados *Knockout* para os genes ATG5 ou ATG7, também demonstraram o surgimento de lesões pancreáticas pré-malignas (ROSENFELDT et al., 2013). Além disso, a exclusão de genes fundamentais para a ocorrência do processo autofágico como Beclin-1 e a perda homozigótica do gene ATG5, em modelos animais está relacionada à maior predisposição ao desenvolvimento de tumores pulmonares (GALLUZZI et al., 2016).



**Figura 5:** Autofagia na transformação maligna e progressão tumoral.

Fonte: GALLUZZI, L. et al. Autophagy in malignant transformation and cancer progression. *The EMBO Journal*. v.34, p.856–880, 2015.

Foi hipotetizado que na fase de iniciação tumoral a literatura relata que ocorre a perda ou desligamento temporário da atividade autofágica. Isso ocorre por sinais ambientais ou alterações epigenéticas que favorecem o desenvolvimento tumoral (GALLUZZI et al., 2015). No entanto, durante a promoção e progressão tumoral a autofagia é reativada, passando a atuar como mecanismo de adaptação, favorecendo a manutenção e o crescimento celular. Isto ocorre devido a oferta de substratos energéticos derivados dos produtos de degradação da autofagia, que contribuem para a adaptação à hipóxia e ao déficit de nutrientes causados pela elevada demanda metabólica e angiogênese incipiente (GALLUZZI et al., 2015).

Além disso, a autofagia exerce outras duas funções igualmente importantes que permitem a progressão tumoral: a resistência à morte celular desencadeada pelo desprendimento da matriz tumoral, permitindo que células neoplásicas possam invadir o tecido saudável e desenvolver metástases, e também a sobrevivência de células-tronco tumorais, subpopulação envolvida na iniciação, manutenção e recorrência neoplásica (GALLUZZI et al., 2015).

A ativação do oncogene RAS nas células tumorais está associada a altos níveis de autofagia basal e dependência desse mecanismo para sua sobrevivência. Acredita-se que a autofagia promova a sobrevivência das células tumorais, aumentando a tolerância ao estresse e fornecendo nutrientes para suprir suas necessidades energéticas. As pequenas GTPases da família RAS estão envolvidas em vias de sinalização importantes para a proliferação, sobrevivência celular e metabolismo. A ativação do oncogene RAS é iniciada por receptores de superfície celular, que induzem RasGEFs (fatores de troca de nucleotídeo guanina) a trocar GDP por GTP em RAS. Uma vez ativado, o RAS estimula diversos efetores a jusante, levando ao início de uma série de redes de sinalização celular, incluindo a via de autofagia AMPK / UVRAG (PYLAYEVA et al., 2011). Desse modo tumores que abrigam mutações ativadoras de RAS são fortemente dependentes de autofagia e têm uma alta taxa basal de autofagia, mesmo em condições de

crescimento (SINGH et al., 2018).

O oncogene RAS é ativado através de mutações na carcinogênese, que podem resultar em três isoformas de mutações gene RAS como Hras, Kras e Nras. No CEC bucal, já foi relatado todas as três isoformas do gene RAS, entretanto as mutações do Hras parecem ser altamente prevalentes em detrimento de Kras e o Nras (MURUGAN et al., 2012). O Hras tem alta incidência de mutações em populações asiáticas que possuem o hábito de mascar tabaco, betel e fazer uso de cigarro. Entretanto, mutações nos genes RAS mostraram ser menos prevalentes em CEC bucal da população ocidental. A incidência da mutação RAS em cada etnia foi documentada como muito diferente e descrito que a diferença da mutação RAS pode refletir a etiologia e a origem étnica (MURUGAN et al., 2012).

O gene FIP200 quando inibido resulta em múltiplos defeitos de autofagia, incluindo acúmulos de agregados de proteínas ubiquitinadas e P62/SQSTM1, conversão deficiente de LC3 e aumento do número de mitocôndrias com morfologia anormal nas células tumorais. Autores observaram que a ablação FIP200 aumenta o número de mitocôndrias com morfologia anormal nas células tumorais mamárias e reduz significativamente sua proliferação. Na literatura em modelo de câncer de mama, a inibição da autofagia pela deleção FIP200 suprime o início e a progressão do tumor mamário (WEI et al., 2011).

A revisão de literatura demonstrou até o momento que o processo autofágico está alterado durante a carcinogênese. Dessa forma, é relevante avaliar se a manipulação do processo autofágico pode interferir no desfecho de desenvolvimento do câncer e na evolução da neoplasia.

## 1.6 MODULAÇÃO DA AUTOFAGIA

Atualmente um dos inibidores de autofagia mais estudados é a hidroxicloroquina (HCQ). A hidroxicloroquina é uma droga utilizada há décadas como tratamento para a malária. Atualmente são conhecidas outras propriedades desse fármaco com atuação anti-inflamatória, capacidade imunomodulatória e também anti-neoplásica. Dentre os inúmeros mecanismos

associados à terapia anti-neoplásica, um dos principais mecanismos é a inibição do processo autofágico (THOMÉ et al., 2013; BISHOP, 2018). Existem vários outros inibidores de autofagia, que inibem diferentes fases da autofagia, mas o único inibidor de autofagia clinicamente aprovado para uso em humano é a cloroquina (CQ) e seus derivados, como hidroxicloroquina (HCQ) (BISHOP, 2018).

A hidroxicloroquina atua acumulando-se no interior dos lisossomos, na sua forma não protonada, e assim sequestra os prótons levando ao aumento do pH lisossomal. O aumento do pH lisossomal impede que o lisossomo se fusione com os autofagossomos formados, impedindo assim a degradação do conteúdo presente no autofagossomo (KIMURA et al., 2012). A inibição da atividade lisossômica pela hidroxicloroquina paralisa a última etapa da autofagia, a degradação do autolisossomo, e conseqüentemente resulta na falha em fornecer energia através da via da autofágica. Como a autofagia contribuiu para promoção de neoplasias, a hidroxicloroquina pode sensibilizar as células cancerígenas através da inibição da autofagia (KIMURA et al., 2012). Também se sabe que a combinação da hidroxicloroquina com outros fármacos quimioterápicos como o 5-fluorouracila, bortezomib e cisplatina, diminui a proliferação de células tumorais (LIANG et al., 2014).

No entanto a dose necessária de hidroxicloroquina para inibir a autofagia celular *in vivo* não está estabelecida. Estudos como de Amaravadi e colaboradores (2007) demonstraram que o potencial da inibição farmacêutica da hidroxicloroquina na autofagia não deve ser superior a 50 mg/kg/dia em modelos animais, pois nessa dose, os autofagossomos ineficazes se acumulam nas células neoplásicas, indicando que a hidroxicloroquina sistêmica pode impedir a autofagia *in vivo* (AMARAVADI et al., 2007). Do mesmo modo, discute-se sobre qual é a dose segura em mg/kg da cloroquina *in vivo*. Considera-se que uma dose inferior a 10mg/kg/dia é considerada ideal por não ocasionar efeitos colaterais em seres humanos. Entretanto, o efeito da cloroquina em concentrações inferiores a 10mg/kg/dia utilizada em estudos *in vivo* em animais e *in vitro* não foi avaliada para a inibição do processo autofágico (PASCOLO, 2016). Dessa forma, a dose ideal para esse fim, ainda deve ser determinada.

A literatura relata estudo com animais que utilizaram hidroxicloroquina

para inibir a autofagia celular. No estudo de Carchman e colaboradores em 2016, camundongos transgênicos HPV16 (K14E6/E7) e camundongos não transgênicos (FVB/N) foram tratados topicamente com o carcinógeno químico, 7,12-Dimetilbenz [a] antraceno (DMBA), para induzir o câncer anal. Alguns animais receberam concomitantemente hidroxicloroquina na dosagem de 3,5 mg/Kg através de injeção intraperitoneal 5 dias por semanas, durante 20 semanas. Em ambos os camundongos transgênicos e não transgênicos tratados com DMBA e fazendo uso de hidroxicloroquina observou-se aumento significativo no desenvolvimento do câncer anal, sem diferença entre os grupos.

De modo semelhante o estudo de Rademacher e colaboradores (2017), avaliou a modulação autofágica na carcinogênese anal de camundongos. Os camundongos K14E6/E7 foram tratados com o carcinógeno tópico DMBA semanalmente e avaliados quanto a tumores ao longo de 20 semanas. Ao mesmo tempo, eles receberam cloroquina para inibir a autofagia na dosagem de 3,5 mg/kg através de injeção intraperitoneal 5 dias por semana, durante 20 semanas e os demais animais recebiam BEZ235 para induzir a autofagia, respectivamente. Ambos os grupos desenvolveram tumores anais, entretanto todos os camundongos que receberam cloroquina e DMBA desenvolveram tumores anais muito mais cedo em comparação com os que não receberam cloroquina.

O conjunto de informações apresentadas até o momento evidenciam a necessidade de ampliar a pesquisa sobre o papel da autofagia na carcinogênese bucal e quais os efeitos são esperados da modulação desse processo *in vivo*. Essas informações podem contribuir para o desenvolvimento de estratégias terapêuticas na prevenção do câncer bucal.

## REFERÊNCIAS

ABATI, S. et al. Oral cancer and precancer: A narrative review on the relevance of early diagnosis. **International Journal of Environmental Research and Public Health**, v. 17, n. 24, p. 1–14, 2020.

ALEXANDRA, T. et al. Autophagy—a hidden but important actor on oral cancer scene. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 21, n. 23, p. 1–19, 2020.

ALTMAN, B. J.; RATHMELL, J. C. Autophagy: Not good OR bad, but good AND bad. **Autophagy**. v. 5, p. 569–570, 2009.

AMARAVADI, R. K. et al. Autophagy inhibition enhances therapy- induced apoptosis in a Myc-induced model of lymphoma. **J. Clin. Invest** 117, p.326–336, 2007.

BEZERRA, N. V. F. et al. Impact of the anatomical location, alcoholism and smoking on the prevalence of advanced oral cancer in Brazil. **Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v.23, p.295–301, 2018.

BISHOP, E.; BRADSHAW, T. D. Autophagy modulation: a prudent approach in cancer treatment? **Cancer Chemotherapy and Pharmacology**, v. 82, n. 6, p. 913–922, 2018.

BRENER, S. et al. Carcinoma de células escamosas bucal: uma revisão de literatura entre o perfil do paciente, estadiamento clínico e tratamento proposto. **Rev. Bras. Cancerol.** v. 53, n.1, p.63–69, 2007.

CARCHMAN, E. H. et al. Dysregulation of Autophagy Contributes to Anal Carcinogenesis. **Plos One**. v.5, 2016.

CAROLINA, A. et al. Low Survival Rates of Oral and Oropharyngeal Squamous Cell Carcinoma. **International Journal of Dentistry**, p.1–8, 2017.

CARRARD, V. C. et al. Prevalence and risk indicators of oral mucosal lesions in an urban population from South Brazil. **Oral Diseases**. v.17, p. 171-179, 2011.

CARRARD, V. C.; VAN DER WAAL, I. A clinical diagnosis of oral leukoplakia; A guide for dentists. **Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v. 23, n. 1, p. e59–e64, 2018.

CHATURVEDI, A. K. et al. Oral leukoplakia and risk of progression to oral cancer: A population-based cohort study. **Journal of the National Cancer Institute**. v. 112, n.10, p.1047–1054, 2020.

CHUANG, S. L. et al. Population-based screening program for reducing oral cancer mortality in 2,334,299 Taiwanese cigarette smokers and/or betel quid chewers. **Cancer**. v. 123, n.9, p.1597–1609, 2017.

CUI, J. et al. The role of autophagy in liver cancer: Molecular mechanisms and potential therapeutic targets. **Biochimica et Biophysica Acta**, v. 1836, n. 1, p.15-26, 2013.

DE LIMA, T.B. et al. Autophagy analysis in oral carcinogenesis. **Pathology Research and Practice**, v. 213, p.1072-1077, 2017.

DE SANTANA SARMENTO, D. J. et al. Actinic cheilitis: Clinicopathologic profile and association with degree of dysplasia. **International Journal of Dermatology**, v. 53, n. 4, p. 466–472, 2014.

DRAGOMIR, L. P. et al. Clinical, Epidemiological and Histopathological Prognostic Factors In Oral Squamous Carcinoma. **Current Health Sciences Journal**, v. 36, n. 4, 2010.

FERREIRA, A. M. et al. Prevalence and factors associated with oral potentially malignant disorders in Brazil's rural workers. **Oral Diseases**, v. 22, n. 6, p. 536–542, 2016.

FILOMENI, G. et al. Oxidative stress and autophagy: The clash between damage and metabolic needs. **Cell Death and Differentiation**, v. 22, n. 3, p. 377–388, 2015.

GALLUZZI, L. et al. Autophagy in malignant transformation and cancer progression. **The EMBO Journal**. v.34, p.856–880, 2015.

GALLUZZI, L. et al.  Autophagy Mediates Tumor Suppression Via Cellular Senescence. **Trends In Cell Biology**, v. 26, p.1-3, 2016.

GEORGE, A. et al. Potentially Malignant Disorders of oral Cavity. **Oral Maxillof Pathol J.** v. 2, p. 95-99, 2011.

GÖDENY, M. et al. Prognostic factors in advanced pharyngeal and oral cavity cancer; significance of multimodality imaging in terms of 7<sup>th</sup> edition of TNM. **Cancer Imaging.** v. 14, p. 15, 2014.

GOMES, L. et al. During autophagy mitochondria elongate, are spared from degradation, and sustain cell viability. **Nature Cell Biology**, v. 13, n. 5, p. 589–598, 2011.

GONZAGA, A. K. G. et al. Diclofenac sodium gel therapy as an alternative to actinic cheilitis. **Clinical Oral Investigations**, v. 22, n. 3, p. 1319–1325, 2018.

HANAHAN, D.; WEINBERG, R. A. Hallmarks of cancer: The next generation. **Cell**, v. 144, n. 5, p. 646–674, 2011.

HASHIBE, M. et al. Alcohol drinking, body mass index and the risk of oral leukoplakia in an Indian population. **International Journal of Cancer**, v. 88, n. 1, p. 129–134, 2000.

HASHIM, D. et al. The role of oral hygiene in head and neck cancer: Results from International Head and Neck Cancer Epidemiology (INHANCE) Consortium. **Annals of Oncology Advance Access published**, 2016.

HAVAKI, S. et al. Monitoring autophagy immunohistochemically and ultra-structurally during human head and neck carcinogenesis. Relationship with the DNA damage response pathway. **International Journal of Molecular Sciences**, v. 18, n. 9, p. 1–17, 2017.

HOLMSTRUP, P. et al. Long-term treatment outcome of oral premalignant lesions. **Oral Oncol.** v. 42, p. 461-74, 2006.

HOLMSTRUP, P. et al. Oral premalignant lesions: is a biopsy reliable? **J Oral Pathol Med.**v. 36, p. 262–266, 2007.

HOLMSTRUP, P. Oral erythroplakia—What is it? **Oral Diseases**, v. 24, n. 1–2, p. 138–143, 2018.

HOOGSTEN, I. J. et al. The hypoxic tumor microenvironment, patient selection and hypoxia-modifying treatments. **Clinical Oncology**, v.19, n.6, p.385-396, 2007.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Estimativa 2021:Incidência de Câncer no Brasil. 2016. Disponível em <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/> > Acesso em: 12 de abril de 2021, 19:00 horas.

KIMURA, T. et al. Chloroquine in Cancer Therapy: A Double-Edged Sword of Autophagy. **Cancer Res**, v.73, p. 3–7, 2012.

KOLLURU, V. et al. Induction of Plac8 promotes pro-survival function of autophagy in cadmium-induced prostate carcinogenesis. **Cancer Letters**, v.408, p.121-129, 2017.

LIANG, X,H. et al. Induction of autophagy and inhibition of tumorigenesis by beclin 1. **Nature**. v.402, p.672–676, 1999.

LIANG, X. et al. Suppression of autophagy by chloroquine sensitizes 5-fluorouracil-mediated cell death in gallbladder carcinoma cells. **Cell & Bioscience**, v.10 ,p.2-11, 2014.

LIMA, J, S. et al. Oral leukoplakia manifests differently in smokers and non-smokers. **Oral Pathol**. v. 26, p. 543-549, 2012.

LIU, W. et al. Oral cancer development in patients with leukoplakia-clinopathological factors affecting outcome. **Plos One**. v.7, n. 4, p.1-7, 2012.

LOPES, M. L. D. DE S. et al. Clinicopathological profile and management of 161 cases of actinic cheilitis. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 90, n. 4, p. 347–350, 2015.

MARKOPOULOS, A. et al. Actinic cheilitis: Clinical and pathologic characteristics in 65 cases. **Oral Diseases**, v. 10, n. 4, p. 212–216, 2004.

MATHEW, R. WHITE, E. Autophagy, stress, and cancer metabolism: what

doesn't kill you makes you stronger. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol.** p. 389-396, 2011.

MAYMONE, M. B. C. et al. Premalignant and malignant oral mucosal lesions: Clinical and pathological findings. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 81, n. 1, p. 59–71, 2019.

MELLO, F. W. et al. Intraoral Potentially Malignant Disorders in a Brazilian Oral Pathology Service: **Epidemiological, Clinical, and Histopathological Findings.** **Journal of Oncology.** p.1–8, 2018.

MIZUSHIMA, N.; KOMATSU, M. Autophagy: Renovation of cells and tissues. **Cell**, v. 147, n. 4, p. 728–741, 2011.

MURUGAN, A. K. et al. Ras oncogenes in oral cancer: The past 20 years. **Oral Oncology**, v. 48, n. 5, p. 383–392, 2012.

NISHIUMI, S. et al. Autophagy in the intestinal epithelium is not involved in the pathogenesis of intestinal tumors. **Biochemical and Biophysical Research Communications**, v.421, p.768–772, 2012.

PASCOLO S. Time to use a dose of Chloroquine as an adjuvant to anti-cancer chemotherapies. **European Journal of Pharmacology**, v.771, p.139–144, 2016.

PIRES, F. R. et al. Oral potentially malignant disorders: Clinical-pathological study of 684 cases diagnosed in a brazilian population. **Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal.** v.25, n.1, p. e84–e88, 2020.

PORTER, S. et al. Risk factors and etiopathogenesis of potentially premalignant oral epithelial lesions. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology.** v.125, n.6, p.603–611, 2018.

PYLAYEVA-GUPTA, Y et al. RAS oncogenes: weaving a tumorigenic web. **Nat Rev Cancer**, v.11, n.11, p.761–774, 2013.

RADEMACHER, B.L. et al. The role of pharmacologic modulation of autophagy on anal cancer development in an HPV mouse model of carcinogenesis.

**Virology**.v. 507, p.82–88, 2017.

REIBEL J, GALE N. et al. Oral potentially malignant disorders and oral epithelial dysplasia. **WHO classification of head and neck tumours**. Lyon: IARC; p. 112–115, 2017.

REICHART, P. A.; PHILIPSEN, H. P. Oral erythroplakia - A review. **Oral Oncology**, v. 41, n. 6, p. 551–561, 2005.

RODRÍGUEZ-BLANCO, I. et al. Actinic cheilitis prevalence and risk factors: A cross-sectional, multicentre study in a population aged 45 years and over in north-west Spain. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 98, n. 10, p. 970–974, 2018.

ROSENFELDT, M, T. et al. p53 status determines the role of autophagy in pancreatic tumour development. **Nature**, v.504, p.296 – 300, 2013.

SCULLY, C.; BAGAN, J. Oral squamous cell carcinoma overview. **Oral Oncology**. v. 45, p. 301–308, 2009.

SIEGEL, R. et al. Cancer statistics, 2011: the impact of eliminating socioeconomic and racial disparities on premature cancer deaths. **CA Cancer J Clin**. v.61, n. 4, p. 212-236, 2011.

SIEGEL, R. L. et al. Cancer statistics, 2019. **CA: A Cancer Journal for Clinicians**, v. 69, n. 1, p. 7–34, 2019.

SILVA, L. V. DE O. et al. Demographic and Clinicopathologic Features of Actinic Cheilitis and Lip Squamous Cell Carcinoma: a Brazilian Multicentre Study. **Head and Neck Pathology**, v. 14, n. 4, p. 899–908, 2020.

SINGH, S. S. et al. Dual role of autophagy in hallmarks of cancer. **Oncogene**, v. 37, n. 9, p. 1142–1158, 2018.

SON, Y.; PRATHEESHKUMAR, P.; DIVYA, S. P.; ZHANG, Z.; SHI, X. Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 enhances carcinogenesis by suppressing apoptosis and promoting autophagy in nickel-transformed cells. **J. Biol. Chem**. v.292, p. 8315–8330, 2017.

SPEIGHT, P. et al. Oral potentially malignant disorders: risk of progression to malignancy. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology and Oral Radiology**, v. 125, n. 6, p. 612–627, 2018.

TANG, M. K. S. et al. BRCA1 deficiency induces protective autophagy to mitigate stress and provides a mechanism for BRCA1 haploinsufficiency in tumorigenesis. **Cancer Letters**, v. 346, n. 1, p. 139–147, 2014.

THOMÉ, R.; LOPES, S. C. P.; COSTA, F. T. M.; VERINAUD, L. Chloroquine: Modes of action of an undervalued drug. **Immunology Letters**, v.153, p. 50–57, 2013.

VAN DER WAAL, I. Oral leukoplakia, the ongoing discussion on definition and terminology. **Medicina Oral, Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v.2, n.6, p. e685–e692, 2015.

VAN DER WAAL, I. Oral leukoplakia; a proposal for simplification and consistency of the clinical classification and terminology. **Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v. 24, n. 6, p. e799–e803, 2019.

VAN DER WAAL, I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification, and present concepts of management. **Oral Oncol.** v. 45, p. 317–323, 2009.

VILLA, A.; VILLA, C.; ABATI, S. Oral cancer and oral erythroplakia: An update and implication for clinicians. **Australian Dental Journal**, v. 56, n. 3, p. 253–256, 2011

WALDRON, C.; SHAFER, W. Leukoplakia revisited a clinicopathologic study 3256 Oral Leukoplakias. **Cancer.** v. 36, n. 4, p.1386-1392, 1975.

WALDRON, C.; SHAFER, W. Leukoplakia revisited a clinicopathologic study 3256 Oral Leukoplakias. **Cancer.** v. 36, n. 4, p.1386-1392, 1975.

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

WARNAKULASURIYA, S.; ARIYAWARDANA, A. Malignant transformation of oral leukoplakia: A systematic review of observational studies. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 45, n. 3, p. 155–166, 2016.

WEI, H. et al. Suppression of autophagy by FIP200 deletion inhibits mammary tumorigenesis. **Genes and Development**, v. 25, n. 14, p. 1510–1527, 2011.

WOJTKOWIAK, J. W.; GILLIES, R. J. Autophagy on acid. **Autophagy**, v. 8, n. 11, p. 1688–1689, 2012.

YANG, S. W.; LEE, Y. S.; CHEN, T. A. Human papillomavirus in oral leukoplakia is no prognostic indicator of malignant transformation. **Cancer Epidemiology**. v.33, p.118-122, 2009.

YANG, Z. J. et al. The Role of Autophagy in Cancer: Therapeutic Implications. **Mol Cancer Ther**. v. 10, p.1533–1541, 2011.

YANG, Z. KLIONSKY, D,J. Mammalian autophagy: core molecular machinery and signaling regulation. **Curr Opin Cell Biol**. v.22, p.124-131, 2010.

ZHI, X.; ZHONG, Q. Autophagy in cancer. **F1000Prime Reports**. v.7, p. 18, 2015.

## **2. OBJETIVOS**

### **2.1 OBJETIVO GERAL**

Caracterizar as desordens potencialmente malignas ao longo do tempo em um serviço de diagnóstico em Patologia Bucal de Porto Alegre e verificar os efeitos da modulação do processo autofágico na carcinogênese bucal.

### **2.2 OBJETIVOS ESPECIFICOS**

- Realizar um levantamento das desordens potencialmente malignas (queilite actínica, leucoplasia e eritroplasia) no serviço de Patologia Bucal da UFRGS;
- Correlacionar as variáveis clínico-patológicas das desordens potencialmente malignas para identificação de fatores que possam determinar o risco de progressão dessas lesões;
- Realizar uma análise temporal das desordens potencialmente malignas para detectar mudanças nos perfis dos indivíduos acometidos por essas patologias;
- Avaliar *in vivo* os efeitos do inibidor de autofagia hidroxyclo-roquina durante o processo de carcinogênese oral em modelo animal.

### 3. ARTIGO 1

## PERFIL DAS DESORDENS POTENCIALMENTE MALIGNAS BUCAIS E SUAS VARIAÇÕES AO LONGO DAS DÉCADAS

A ser submetido no periódico Oral Diseases (ISSN:1601-0825)

### RESUMO

O câncer de boca é a quinta neoplasia mais comum no Brasil. Sua incidência e mortalidade variam de acordo com a localização geográfica. O diagnóstico tardio afeta na sobrevivência e no prognóstico, sendo necessário melhorar o diagnóstico precoce. Algumas lesões podem preceder o câncer bucal, e são denominadas desordens potencialmente malignas orais (DPMO). No ocidente as DPMO mais prevalentes são: líquen plano, leucoplasia, eritroplasia e queilite actínica. O objetivo deste estudo foi realizar um levantamento das DPMO diagnosticadas a partir de um serviço de Patologia de Porto Alegre num período de 38 anos e avaliar quais são os fatores que determinam a severidade das lesões. Este estudo retrospectivo, foi realizado a partir da análise de 31663 laudos, no qual as lesões foram selecionadas de acordo com a hipótese de diagnóstico clínico (leucoplasia, eritroplasia, queilite actínica e leucoeritroplasia) e diagnóstico microscópico (alterações de proliferação e maturação epiteliais). Foram extraídos dados importantes relacionados a lesões, e para a realização da análise dos dados a localização das lesões foi agrupada em alto risco (borda de língua, assoalho bucal e palato) e baixo risco (todas as demais localizações intrabucais). Das 31663 lesões diagnosticadas 567 eram DPMO, representando 1,79% do total. A maioria da amostra é do sexo masculino (55,8%), com idade superior a 50 anos (60%) e da raça branca (78,4%). A leucoplasia (77,4%) foi DPMO mais frequente, se localizando principalmente nas regiões de baixo risco (67,9%). As lesões presentes em localização de alto risco apresentaram diagnósticos microscópicos mais severos (displasia epitelial/CEC), enquanto lesões não displásicas e queilite actínica estavam predominantemente localizadas em sítios de baixo risco ( $p < 0.001$ ). Na análise temporal nota-se uma mudança no perfil do paciente acometido pelas DPMO entre os anos de 2010 a 2017 no qual demonstra uma diminuição de pacientes jovens. Desse modo o perfil dos pacientes acometidos por DPMO na nossa população é semelhante ao demonstrado em outros estudos, sendo a leucoplasia a lesão mais frequente, e localizada mais comumente em regiões de baixo risco e microscopicamente diagnosticada como não-displásica. As queilites actínicas e eritroplasias foram menos frequentes, porém associadas a alterações histopatológicas mais severas.

**Palavras-chave:** Câncer bucal; leucoplasia; eritroplasia; queilite actínica; desordens potencialmente malignas.

## INTRODUÇÃO

O câncer da cavidade bucal é a 11ª neoplasia maligna mais comum no mundo (GHANTOUS & ABU ELNAAJ, 2017). Atualmente, no Brasil, o câncer bucal ocupa a quinta posição entre as neoplasias mais comuns que afetam o sexo masculino, com mortalidade de 4891 pessoas por ano. A incidência e mortalidade deste tumor apresentam variabilidade de acordo com a localização geográfica em que é diagnosticado (INCA, 2020).

O diagnóstico tardio do câncer bucal é o fator mais importante que afeta a sobrevida geral e o prognóstico, portanto, é necessário um esforço significativo para melhorar o diagnóstico precoce. O diagnóstico precoce desse tipo de câncer só é realizado em cerca de 15% dos casos e a maioria dos pacientes já apresenta metástases no início do tratamento (LE CAMPION et al., 2017).

Algumas lesões podem preceder o câncer bucal, e são chamadas de desordens potencialmente malignas orais (DPMO) (WARNAKULASURIYA et al., 2007; REIBEL et al., 2017). É de extrema importância a identificação precoce do DPMO pelos profissionais de saúde, uma vez que o diagnóstico precoce melhora o prognóstico e a sobrevida desses pacientes. As DPMO podem ser definidas como alterações morfológicas e moleculares da mucosa oral, cuja evolução pode culminar no desenvolvimento de tumores malignos onde se encontram (REIBEL et al., 2017).

As DPMO são classificadas em leucoplasia, eritroplasia, queilite actínica, fibrose submucosa oral, lesão palatina associada ao tabagismo reverso, líquen plano oral, lúpus eritematoso discoide, disceratose congênita e epidermólise bolhosa (WARNAKULASURIYA et al., 2007; GANESH et al., 2018). No ocidente as DOPM mais prevalentes são: líquen plano, leucoplasia, eritroplasia e queilite actínica (VAN DER WALL, 2009). Devido ao fato de o potencial de cancerização do líquen plano ainda ser discutido (GONZALEZ-MOLES et al., 2008) e que a inclusão dessa patologia necessitaria de dados clínicos mais abrangentes essa lesão não foi incluída neste levantamento.

De acordo com a OMS, leucoplasia é definida como uma mancha ou

placa branca não removível por raspagem e que não pode ser caracterizada clinicamente ou histopatologicamente como nenhuma outra patologia (OMS, 2017; VAN DER WAAL, 2009; SCULLY; BAGAN, 2009). A prevalência mundial da leucoplasia bucal é de aproximadamente 4,11% no mundo (MELLO et al., 2018). O diagnóstico clínico da leucoplasia é realizado por exclusão, descartando outras patologias semelhantes da mucosa bucal (VAN DER WAAL, 2009). Frente ao diagnóstico clínico de leucoplasia, a realização do exame histopatológico é mandatória para a identificação das alterações epiteliais (VAN DER WAAL, 2009). Atualmente, considera-se que a taxa de transformação maligna de lesões leucoplásicas é de aproximadamente 2 a 3% anualmente (CARRARD & VAN DER WAAL, 2018). Porém, estudos indicam que existe uma possibilidade de 36% de transformação maligna da leucoplasia oral quando essa apresenta microscopicamente displasia epitelial (LIMA, 2012).

Do mesmo modo que a leucoplasia, a eritroplasia é definido como uma mancha ou placa avermelhada que não pode ser caracterizada clinicamente ou histopatologicamente como qualquer outra doença definível (VAN DER WAAL, 2009). A eritroplasia é pouco frequente, existem poucos dados sobre sua prevalência, a maioria dos dados é estabelecida em grupos selecionados de indivíduos. No estudo realizado por Ferreira e colaboradores em 2016 com uma população de trabalhadores rurais do nordeste do Brasil constatou-se que 0,3% das desordens potencialmente malignas bucais eram eritroplasias (FERREIRA et al., 2016). O uso de tabaco, álcool e infecções por Papilomavirus humano (HPV) são considerados fatores etiológicos (HOLMSTRUMP, 2018). A eritroplasia tem o maior risco de transformação maligna em comparação com todas as outras desordens potencialmente malignas bucais. O alto risco de transformação maligna baseia-se no fato de que histologicamente se apresenta comumente como displasia epitelial, carcinoma *in situ* ou já como carcinoma espinocelular (REICHART et al., 2005). Atualmente não há nenhuma ferramenta diagnóstica confiável para identificar quais eritroplasias progredirão para uma neoplasia, entretanto para obter o melhor prognóstico possível para os pacientes com eritroplasias é que devem ser acompanhados em intervalos curtos, independentemente da

possível relação com outras doenças ou irritantes (HOLMSTRUMP, 2018).

A queilite actínica é uma DPMO que ocorre exclusivamente nos lábios, e tem como principal fator etiológico a exposição excessiva e prolongada aos raios ultravioletas (GONZAGA, 2017). A sua prevalência varia de 0,24% a 2,4% na população, entretanto em estudos que investigam os grupos populacionais envolvidos em atividades ao ar livre, as prevalências variaram entre 4,2 e 43,2% (ZANETTI et al., 2007; SARMENTO et al., 2014). As características clínicas são variáveis e incluem atrofia do vermelhão do lábio inferior, áreas eritematosas ou leucoplásicas, úlceras e fissuras. Um aspecto importante é a perda de nitidez entre o vermelhão do lábio e a pele (SARMENTO et al., 2014, GONZAGA, 2017). Histologicamente, apresenta alterações epiteliais que variam de hiperplasia, acantose ou atrofia do epitélio, espessamento da camada de ceratina e por vezes pode apresentar displasia epitelial de leve a severa. No tecido conjuntivo a degeneração basofílica das fibras colágenas é denominada elastose solar (PILATI, 2016; SARMENTO et al., 2014). Não é possível prever quais lesões sofrerão transformação maligna, entretanto o prognóstico depende da severidade das alterações histopatológicas e da mudança de hábitos do paciente.

O diagnóstico e conduta adequada de indivíduos portadores de DPMO são fatores cruciais para melhorar o prognóstico e os índices de mortalidade do câncer bucal. Para tanto, é fundamental conhecer o perfil desses indivíduos, sendo que esse perfil pode apresentar variações regionais. Portanto, o objetivo deste estudo é realizar um levantamento das DPMO diagnosticadas a partir de um serviço de Patologia Bucal de Porto Alegre num período de 38 anos e avaliar quais são os fatores que determinam a severidade das lesões.

## **METODOLOGIA**

### **Considerações éticas**

O estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal do Rio Grande do Sul, Brasil (protocol number 4.095.472).

## **Desenho do estudo e amostra**

Este estudo retrospectivo, foi realizado a partir da análise dos arquivos do laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal do Rio Grande do Sul (UFRGS), em Porto Alegre. Os dados foram coletados a partir de fichas de biópsias realizados de 1979 até 2017, por 4 pesquisadores calibrados previamente.

As lesões foram selecionadas de acordo com a hipótese de diagnóstico clínico e diagnóstico microscópico. Foram incluídas aquelas lesões que tiveram um diagnóstico clínico de leucoplasia, eritroplasia, leucoeritroplasia ou queilite actínica. Histopatologicamente, as lesões deveriam apresentar diagnósticos de alterações de proliferação e maturação epiteliais. Também foram incluídas lesões em que os clínicos que enviaram o espécime o diagnosticaram como carcinoma espinocelular, porém não eram lesões ulceradas e nem apresentavam diagnóstico histopatológico de malignidade, mas sim de alterações epiteliais compatíveis com DPMO. As lesões que apresentaram diagnóstico histopatológico diverso foram excluídas do estudo. Foram revisados 31663 laudos, sendo incluídos no estudo dados de 567 espécimes de 480 pacientes compatíveis com DPMO registrados no laboratório. A partir das fichas de biópsias foram extraídas informações sobre idade, sexo, raça, hábitos relacionados ao tabagismo, consumo de álcool, exposição solar e consumo de chimarrão, além de dados relacionados às lesões, como localização anatômica, aspecto clínico, tipo de biopsia, diagnóstico clínico e diagnóstico histopatológico. Para realização da análise dos dados a localização das lesões foi agrupada em alto risco (borda de língua, assoalho bucal e palato) e baixo risco (todas as demais localizações intrabucais). Os diagnósticos histopatológicos de hiperplasia epitelial, hiperkeratose/hiperparakeratose e acantose foram agrupados e definidos como não-displásicos.

## **Análise estatística**

As associações entre as variáveis estudadas e o diagnóstico clínico e diagnóstico histopatológico foram realizadas pelo teste de qui-quadrado

somente para os casos válidos. Quando significativa a análise local foi verificada pela análise de resíduos padronizados ajustados, enfatizando as categorias com valores maiores ou iguais que 1,96. O nível de significância adotado foi de 0,05.

Para o desfecho diagnóstico histopatológico, usando como referência a categoria “não displásico” analisando o efeito da categoria “displasia epitelial ou CEC”, utilizamos o modelo de regressão de Poisson para estimar razões de prevalência (RP) brutas e ajustadas e seus respectivos IC95%. A significância estatística das razões de prevalências obtidas nos modelos de regressão de Poisson foi avaliada pela estatística de Wald. Inicialmente foi realizada a análise bruta das variáveis estudadas entre os desfechos. As variáveis com significância menores, ou iguais, a 0,10, foram incluídas como candidatas no modelo multivariável e com uma seleção *backward* das variáveis, só permaneceram no modelo final as com um nível de significância de menor ou igual a 0,05. As análises foram realizadas no SPSS v.25. O gráfico da regressão univariável foi realizada no software R com o pacote *beeswarm*.

## RESULTADOS

Das 31663 lesões bucais diagnosticadas no período estudado, 567 eram DPOM, representando 1,79% do total. O estudo incluiu uma amostra de 567 espécimes provenientes de 480 pacientes, 87 (18,12%) tiveram mais de uma lesão biopsiada. Observa-se que a maior parte da amostra é do sexo masculino (55,8%), com idade superior a 50 anos (60%) e da raça branca (78,4%). Em relação à exposição aos fatores de risco, a maior parte das fichas não continha essas informações, porém, considerando as informações disponíveis a maioria dos indivíduos era fumante (28,4%) ou relatou já ter fumado (6,7%). A respeito da ingestão de álcool, o maior percentual é de não consumidores (19,2%), seguida de etilistas (16,7%) e ex-etilistas (4,05%).

A categorização da amostra de acordo com o diagnóstico clínico está apresentada na tabela 1. A DPOM mais frequente foi a leucoplasia,

representando 77,4% do total. A localização das lesões leucoplásicas foi preferencialmente nas regiões de baixo risco (67,9%), enquanto, para as lesões eritroplásicas/leucoeritroplásicas houve uma mesma distribuição entre as localizações de alto e baixo risco. No grupo das lesões leucoplásicas a maior parte dos pacientes que informaram sobre seus hábitos relataram que fumam e fazem uso de álcool, enquanto no grupo das eritroplasias/leucoeritroplasias o uso de álcool não foi predominante. No grupo da queilite actínica o fumo foi comumente reportado, mas não o uso de álcool entre os pacientes que informaram sobre seus hábitos.

Como esperado, em relação ao diagnóstico clínico observamos uma associação estatisticamente significativa com o aspecto clínico, ou seja, entre leucoplasia e lesão de cor branca ( $p < 0,001$ ), entre eritroplasia/leucoeritroplasia e lesão vermelha ( $p < 0,001$ ), enquanto a queilite actínica foi associada aos diagnósticos clínicos de queilite ou CEC ( $p < 0,001$ ) (tabela 1).

Quanto à localização anatômica foi observada uma associação significativa ( $p < 0,001$ ) entre a queilite actínica e localizações de baixo risco, visto que esta é uma lesão exclusiva do lábio inferior, enquanto o diagnóstico clínico de CEC foi associado a localizações de alto risco.

Comparando os diagnósticos histopatológicos e as variáveis estudadas observamos que nas lesões diagnosticadas clinicamente como leucoplasias o diagnóstico histopatológico mais observado foi o não-displásico, observado em 78,4% dos casos. Já nas lesões eritroplásicas/leucoeritroplásicas o diagnóstico microscópico mais comum foi de displasia epitelial/CEC em 70% dos casos. As queilites actínicas diagnosticadas clinicamente obtiveram diagnóstico histopatológico compatível em 41,7% dos casos, no entanto, 41,7% também obtiveram diagnóstico histopatológico de displasia epitelial/CEC. Semelhantemente, em relação à variável aspecto clínico, encontrou-se associação significativa entre histopatologia não-displásica e lesão branca, displasia epitelial/CEC com lesão vermelha, e lesão branca/vermelha com queilite actínica (tabela 2).

**Tabela 1 - Associações entre o diagnóstico clínico e as variáveis estudadas.**

|                              | Diagnóstico Clínico    |   |                                |                 |                  | p                |
|------------------------------|------------------------|---|--------------------------------|-----------------|------------------|------------------|
|                              | Leucoplasia<br>(n=439) | Eritroplasia /<br>Leucoeritroplasia<br>(n=10) | Queilite<br>actínica<br>(n=24) | CEC<br>(n=7)    | Não<br>Informado |                  |
|                              | n (%)                  | n (%)   | n (%)                          | n (%)           | n (%)            |                  |
| <b>Década</b>                |                        |   |                                |                 |                  |                  |
| até 1990                     | 18 (4,1)               | 0 (0)   | 0 (0)                          | <u>2 (28,6)</u> | 19 (21,8)        | <b>&lt;0,001</b> |
| 1991 – 2000                  | 39 (8,9)               | 1 (10)  | 0 (0)                          | 1 (14,3)        | 22 (25,3)        |                  |
| 2001 – 2010                  | <u>165 (37,6)</u>      | 0 (0)   | 1 (4,2)                        | 1 (14,3)        | 29 (33,3)        |                  |
| 2011 – 2017                  | 217 (49,4)             | <u>9 (90)</u>                                 | <u>23 (95,8)</u>               | 3 (42,9)        | 17 (19,5)        |                  |
| <b>Sexo</b>                  |                        |   |                                |                 |                  |                  |
| Mulher                       | 193 (44,2)             | 5 (50)  | 6 (25)                         | 4 (57,1)        | 42 (48,3)        | 0,229            |
| Homem                        | 244 (55,8)             | 5 (50)  | 18 (75)                        | 3 (42,9)        | 44 (50,6)        |                  |
| Não informado                | 2 (0,5)                | 0 (0)   | 0 (0)                          | 0 (0)           | 1 (1,1)          |                  |
| <b>Idade</b>                 |                        |   |                                |                 |                  |                  |
| até 40 anos                  | 60 (14,2)              | 1 (10)  | 1 (4,3)                        | 1 (14,3)        | 21 (24,1)        | 0,684            |
| 41 a 50 anos                 | 107 (25,2)             | 1 (10)  | 8 (34,8)                       | 2 (28,6)        | 14 (16,1)        |                  |
| acima de 51 anos             | 257 (60,6)             | 8 (80)  | 14 (60,9)                      | 4 (57,1)        | 44 (50,6)        |                  |
| Não informado                | 15 (3,4)               | 0 (0)   | 1 (4,2)                        | 0 (0)           | 8 (9,2)          |                  |
| <b>Raça</b>                  |                        |   |                                |                 |                  |                  |
| Branco                       | 348 (86,4)             | 6 (60)  | 21 (95,5)                      | 6 (100)         | 64 (73,6)        | 0,089            |
| Preto                        | 39 (9,7)               | 2 (20)  | 0 (0)                          | 0 (0)           | 5 (5,7)          |                  |
| Outros                       | 16 (4)                 | 2 (20)  | 1 (4,5)                        | 0 (0)           | 0 (0)            |                  |
| Não informado                | 36 (8,2)               | 0 (0)   | 2 (8,3)                        | 1 (14,3)        | 18 (20,7)        |                  |
| <b>Aspecto Clínico</b>       |                        |   |                                |                 |                  |                  |
| Lesão branca                 | <u>369 (95,1)</u>      | 5 (50)  | 15 (68,2)                      | 3 (60)          | 50 (57,5)        | <b>&lt;0,001</b> |
| Lesão vermelha               | 14 (3,6)               | <u>3 (30)</u>                                 | 2 (9,1)                        | 0 (0)           | 10 (11,5)        |                  |
| Lesão branca/vermelha        | 4 (1)                  | <u>1 (10)</u>                                 | 1 (4,5)                        | 0 (0)           | 2 (2,3)          |                  |
| Queilite                     | 1 (0,3)                | 1 (10)  | <u>4 (18,2)</u>                | <u>2 (40)</u>   | 6 (6,9)          |                  |
| Não informado                | 51 (11,6)              | 0 (0)   | 2 (8,3)                        | 2 (28,6)        | 19 (21,8)        |                  |
| <b>Fumo</b>                  |                        |   |                                |                 |                  |                  |
| Não                          | 62 (26,5)              | 3 (42,9)                                      | 8 (50)                         | 1 (33,3)        | 5 (5,7)          | 0,422            |
| Sim                          | 138 (59)               | 3 (42,9)                                      | 6 (37,5)                       | 2 (66,7)        | 10 (11,5)        |                  |
| Ex-fumante                   | 34 (14,5)              | 1 (14,3)                                      | 2 (12,5)                       | 0 (0)           | 1 (1,1)          |                  |
| Não informado                | 205 (46,7)             | 3 (30)  | 8 (33,3)                       | 4 (57,1)        | 71 (81,6)        |                  |
| <b>Álcool</b>                |                        |   |                                |                 |                  |                  |
| Não                          | 87 (45,3)              | 5 (83,3)                                      | 7 (46,7)                       | 1 (50)          | 8 (9,2)          | 0,057            |
| Sim                          | 87 (45,3)              | 0 (0)   | 4 (26,7)                       | 1 (50)          | 3 (3,4)          |                  |
| Ex-etilista                  | 18 (9,4)               | 1 (16,7)                                      | 4 (26,7)                       | 0 (0)           | 0 (0)            |                  |
| Não informado                | 247 (56,3)             | 4 (40)  | 9 (37,5)                       | 5 (71,4)        | 76 (87,4)        |                  |
| <b>Exposição Solar</b>       |                        |   |                                |                 |                  |                  |
| Não                          | 6 (75)                 | 0 (0)   | 1 (33,3)                       | 0 (0)           | 0 (0)            | 0,491            |
| Sim                          | 2 (25)                 | 0 (0)   | 2 (66,7)                       | 0 (0)           | 0 (0)            |                  |
| Não informado                | 431 (98,2)             | 10 (100)                                      | 21 (87,5)                      | 7 (100)         | 87 (100)         |                  |
| <b>Chimarrão</b>             |                        |   |                                |                 |                  |                  |
| Não                          | 6 (66,7)               | 0 (0)   | 0 (0)                          | 0 (0)           | 0 (0)            | -                |
| Sim                          | 3 (33,3)               | 0 (0)   | 0 (0)                          | 0 (0)           | 0 (0)            |                  |
| Não informado                | 430 (97,9)             | 10 (100)                                      | 24 (100)                       | 7 (100)         | 87 (100)         |                  |
| <b>Trauma Local</b>          |                        |   |                                |                 |                  |                  |
| Não                          | 87 (56,1)              | 2 (40)  | 11 (73,3)                      | 0 (0)           | 8 (9,2)          | 0,178            |
| Sim                          | 68 (43,9)              | 3 (60)  | 4 (26,7)                       | 2 (100)         | 6 (6,9)          |                  |
| Não informado                | 284 (64,7)             | 5 (50)  | 9 (37,5)                       | 5 (71,4)        | 73 (83,9)        |                  |
| <b>Tipo de Biópsia</b>       |                        |   |                                |                 |                  |                  |
| Incisional                   | 217 (55,4)             | 7 (87,5)                                      | 14 (58,3)                      | 3 (60)          | 20 (23)          | 0,347            |
| Excisional                   | 175 (44,6)             | 1 (12,5)                                      | 10 (41,7)                      | 2 (40)          | 26 (29,9)        |                  |
| Não informado                | 47 (10,7)              | 2 (20)  | 0 (0)                          | 2 (28,6)        | 41 (47,1)        |                  |
| <b>Localização Anatômica</b> |                        |   |                                |                 |                  |                  |
| Alto risco                   | 137 (32,1)             | 5 (50)  | 0 (0)                          | <u>5 (83,3)</u> | 16 (18,4)        | <b>&lt;0,001</b> |
| Baixo risco                  | 290 (67,9)             | 5 (50)  | <u>23 (100)</u>                | 1 (16,7)        | 68 (78,2)        |                  |
| Não informado                | 12 (2,7)               | 0 (0)   | 1 (4,2)                        | 1 (14,3)        | 3 (3,4)          |                  |

Teste qui-quadrado

As lesões presentes em localização de alto risco apresentaram diagnósticos microscópicos mais severos (displasia epitelial/CEC), enquanto lesões não displásicas e queilite actínica estavam predominantemente localizadas em sítios de baixo risco ( $p < 0.001$ ) (tabela 2).

Os casos com diagnóstico histopatológico não-displásico tiveram uma associação com mulheres e os de queilite actínica com homens. Também foi encontrada uma associação significativa entre diagnóstico histopatológico de displasia epitelial ou CEC e pacientes acima de 41 anos, e do mesmo modo entre diagnóstico não-displásico com pacientes com idade inferior a 40 anos (tabela 2).

Observamos que a proporção de DPMO com diagnósticos histopatológicos mais severos (displasia epitelial ou CEC) aumentou ao longo das décadas, assim como as lesões diagnosticadas como queilite actínica (tabela 2).

Através da análise temporal dos dados observa-se que no período de 1965 a 1990 a maioria dos casos acometiam homens (58%) de idade acima de 51 anos (43,58%). Com relação a localização das lesões, a maior parte encontra-se em região de baixo risco (84,61%) e com aspecto clínico de lesão branca (51,28%). Já o diagnóstico clínico predominante foi a leucoplasia (46,15%) com o diagnóstico histopatológico não-displásico (76,92%) (Tabela 3).

Nos anos de 1991 até 2000 observa-se uma alteração do perfil predominando os casos em mulheres (50,79%) brancas (84,12%) acima de 51 anos (41,27%). A localização das lesões permaneceu majoritariamente nas regiões de baixo risco (74,60%) com aspecto clínico de lesão branca (71,42%). Os diagnósticos clínicos mais prevalentes foram de leucoplasia (61,9%) com diagnóstico histopatológico como não-displásico (79,36%) (Tabela 3).

**Tabela 2 - Comparação das proporções entre o diagnóstico histopatológico e as variáveis estudadas.**

|                                  | Diagnóstico Histopatológico |                                       |                             | p                |
|----------------------------------|-----------------------------|---------------------------------------|-----------------------------|------------------|
|                                  | Não displásico<br>(n=410)   | Displasia epitelial /<br>CEC (n= 127) | Queilite Actínica<br>(n=30) |                  |
|                                  | n (%)                       | n (%)                                 | n (%)                       |                  |
| <b>Diagnóstico Clínico</b>       |                             |                                       |                             |                  |
| Leucoplasia                      | <u>344 (78,4)</u>           | 80 (18,2)                             | 15 (3,4)                    | <b>&lt;0,001</b> |
| Eritroplasia / Leucoeritroplasia | 3 (30,0)                    | <u>7 (70,0)</u>                       | 0 (0)                       |                  |
| Queilite actínica                | 4 (16,7)                    | <u>10 (41,7)</u>                      | <u>10 (41,7)</u>            |                  |
| CEC                              | 1 (14,3)                    | <u>6 (85,7)</u>                       | 0 (0)                       |                  |
| <b>Década</b>                    |                             |                                       |                             |                  |
| até 1990                         | 30 (7,3)                    | 9 (7,1)                               | 0 (0)                       | <b>0,029</b>     |
| 1991 - 2000                      | 50 (12,2)                   | 12 (9,4)                              | 1 (1,6)                     |                  |
| 2001 - 2010                      | <u>153 (37,3)</u>           | 34 (26,8)                             | 9 (4,6)                     |                  |
| 2011 - 2017                      | 177 (43,2)                  | <u>72 (56,7)</u>                      | <u>20 (7,4)</u>             |                  |
| <b>Sexo</b>                      |                             |                                       |                             |                  |
| Mulher                           | <u>198 (79,2)</u>           | 47 (18,8)                             | 5 (2)                       | <b>&lt;0,001</b> |
| Homem                            | 209 (66,6)                  | 80 (25,5)                             | <u>25 (8)</u>               |                  |
| Não informado                    | 3 (0,7)                     | 0 (0)                                 | 0 (0)                       |                  |
| <b>Idade</b>                     |                             |                                       |                             |                  |
| até 40 anos                      | <u>71 (84,5)</u>            | 11 (13,1)                             | 2 (2,4)                     | <b>0,049</b>     |
| 41 a 50 anos                     | 88 (66,7)                   | 37 (28)                               | 7 (5,3)                     |                  |
| acima de 51 anos                 | 233 (71,3)                  | 73 (22,3)                             | 21 (6,4)                    |                  |
| Não informado                    | 18 (4,4)                    | 6 (4,7)                               | 0 (0)                       |                  |
| <b>Raça</b>                      |                             |                                       |                             |                  |
| Branco                           | 321 (72,1)                  | 97 (21,8)                             | 27 (6,1)                    | 0,930            |
| Preto                            | 35 (76,1)                   | 10 (21,7)                             | 1 (2,2)                     |                  |
| Outros                           | 14 (73,7)                   | 4 (21,1)                              | 1 (5,3)                     |                  |
| Não informado                    | 40 (9,8)                    | 16 (12,6)                             | 1 (3,3)                     |                  |
| <b>Aspecto Clínico</b>           |                             |                                       |                             |                  |
| Lesão branca                     | <u>335 (75,8)</u>           | 86 (19,5)                             | 21 (4,8)                    | <b>&lt;0,001</b> |
| Lesão vermelha                   | 11 (37,9)                   | <u>15 (51,7)</u>                      | 3 (10,3)                    |                  |
| Lesão branca/vermelha            | 4 (50)                      | 3 (37,5)                              | 1 (12,5)                    |                  |
| Queilite                         | 4 (28,6)                    | <u>10 (71,4)</u>                      | 0 (0)                       |                  |
| Não informado                    | 56 (13,7)                   | 13 (10,2)                             | 5 (16,7)                    |                  |
| <b>Fumo</b>                      |                             |                                       |                             |                  |
| Não                              | 50 (63,3)                   | 25 (31,6)                             | 4 (5,1)                     | 0,163            |
| Sim                              | 117 (73,6)                  | 34 (21,4)                             | 8 (5)                       |                  |
| Ex fumante                       | 25 (65,8)                   | 8 (21,1)                              | 5 (13,2)                    |                  |
| Não informado                    | 218 (53,2)                  | 60 (47,2)                             | 13 (43,3)                   |                  |
| <b>Álcool</b>                    |                             |                                       |                             |                  |
| Não                              | 74 (68,5)                   | 28 (25,9)                             | 6 (5,6)                     | 0,110            |
| Sim                              | 69 (72,6)                   | 21 (22,1)                             | 5 (5,3)                     |                  |
| Ex etilista                      | 10 (43,5)                   | 10 (43,5)                             | 3 (13)                      |                  |
| Não informado                    | 257 (62,7)                  | 68 (53,5)                             | 16 (53,3)                   |                  |
| <b>Exposição Solar</b>           |                             |                                       |                             |                  |
| Não                              | 6 (85,7)                    | 0 (0)                                 | 1 (14,3)                    | 0,491            |
| Sim                              | 2 (50)                      | 0 (0)                                 | 2 (50)                      |                  |
| Não informado                    | 402 (98)                    | 127 (100)                             | 27 (90)                     |                  |
| <b>Chimarrão</b>                 |                             |                                       |                             |                  |
| Não                              | 6 (100)                     | 0 (0)                                 | 0 (0)                       | 0,333            |
| Sim                              | 2 (66,7)                    | 1 (33,3)                              | 0 (0)                       |                  |
| Não informado                    | 402 (98)                    | 126 (99,2)                            | 30 (100)                    |                  |
| <b>Trauma Local</b>              |                             |                                       |                             |                  |
| Não                              | 69 (63,9)                   | 30 (27,8)                             | 9 (8,3)                     | 0,255            |
| Sim                              | 61 (73,5)                   | 19 (22,9)                             | 3 (3,6)                     |                  |
| Não informado                    | 280 (68,3)                  | 78 (61,4)                             | 18 (60)                     |                  |
| <b>Tipo de Biópsia</b>           |                             |                                       |                             |                  |
| Incisional                       | 183 (70,1)                  | 65 (24,9)                             | 13 (5)                      | 0,190            |
| Excisional                       | 161 (75,2)                  | 39 (18,2)                             | 14 (6,5)                    |                  |
| Não informado                    | 66 (16,1)                   | 23 (18,1)                             | 3 (10)                      |                  |
| <b>Localização Anatômica</b>     |                             |                                       |                             |                  |
| Alto risco                       | 102 (62,6)                  | <u>61 (37,4)</u>                      | 0 (0)                       | <b>&lt;0,001</b> |
| Baixo risco                      | <u>293 (75,7)</u>           | 64 (16,5)                             | <u>30 (7,8)</u>             |                  |
| Não informado                    | 15 (3,7)                    | 2 (1,6)                               | 0 (0)                       |                  |

Ao analisarmos o período entre os anos de 2001 e 2010 voltamos a encontrar perfil predominante de homens (55,61%) de raça branca (80,6%) com idade acima de 51 anos (51,53%). Observa-se um padrão semelhante aos períodos anteriores quanto a localização anatômica, aspecto clínico, diagnóstico clínico e diagnóstico histopatológico, em que a maioria dos casos são de baixo risco (69,38%), lesão branca (84,69%), leucoplasias (84,18%) e diagnóstico histopatológico não-displásico (78,06%) (Tabela 3).

Nos anos entre 2011 e 2017 observa-se alteração do perfil dos pacientes, em que a maioria dos casos acometeram mulheres (43,86%) brancas (78,81%) acima de 51 anos (68,02%). O hábito de fumar está presente em 40,89% dos pacientes e 33,45% relataram não fazer consumo de álcool. O padrão da localização e do aspecto clínico manteve-se em baixo risco (63,56) e lesão branca (78,43%), assim como o diagnóstico clínico de leucoplasia (80,66%), entretanto o diagnóstico histopatológico mais prevalente foi displasia epitelial (21,93%) (Tabela 3).

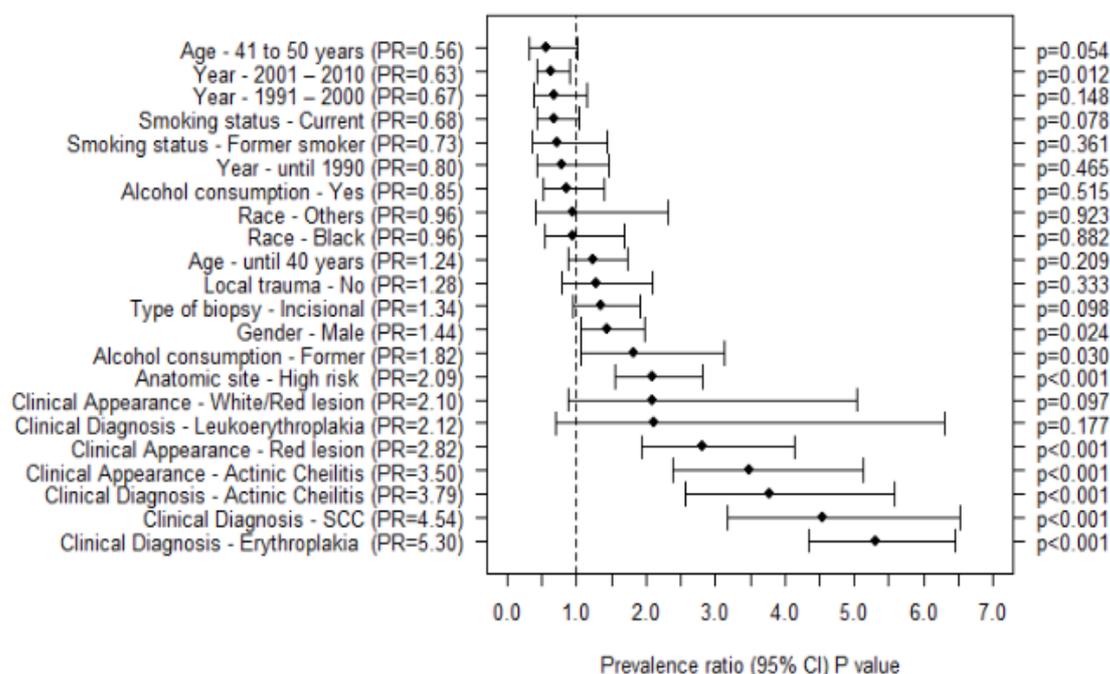
**Tabela 3-** Distribuição das variáveis de acordo com o período analisado.

|                                  | Até 1990<br>(n=39) | 1991 a 2000<br>(n= 63) | 2001 a 2010<br>(n=196) | 2011 a 2017<br>(n=269) | p         |
|----------------------------------|--------------------|------------------------|------------------------|------------------------|-----------|
|                                  | n (%)              | n (%)                  | n (%)                  | n (%)                  |           |
| <b>Diagnóstico clínico</b>       |                    |                        |                        |                        |           |
| Leucoplasia                      | 18 (46,15)         | 39 (61,9)              | 165 (84,18)            | 217 (80,66)            | 0.164*    |
| Eritroplasia / Leucoeritroplasia | 0 (0)              | 1 (1,58)               | 0 (0)                  | 9 (3,34)               |           |
| Queilite actínica                | 0 (0)              | 0 (0)                  | 1 (0,51)               | 23 (8,55)              |           |
| CEC                              | 2 (5,12)           | 1 (1,58)               | 1 (0,51)               | 3 (1,15)               |           |
| NI                               | 19 (48,71)         | 22 (34,92)             | 29 (14,79)             | 17 (6,31)              |           |
| <b>Diagnóstico HP</b>            |                    |                        |                        |                        |           |
| Não-displásico                   | 30 (77)            | 50 (79,36)             | 153 (78,06)            | 177 (65,79)            |           |
| Displasia Epitelial              | 8 (20,51)          | 12 (19,04)             | 32 (16,32)             | 59 (21,93)             | 0,0254*   |
| CEC                              | 1 (2,56)           | 0 (0)                  | 2 (1,02)               | 13 (4,83)              |           |
| Queilite Actínica                | 0 (0)              | 1 (1,58)               | 9 (4,59)               | 20 (7,43)              |           |
| <b>Sexo</b>                      |                    |                        |                        |                        |           |
| Mulher                           | 15 (38,46)         | 32 (50,79)             | 87 (44,38)             | 118 (43,86)            | 0,695*    |
| Homem                            | 23 (58,97)         | 31 (49,21)             | 109 (55,61)            | 151 (56,13)            |           |
| Não informado                    | 1 (2,56)           | 0 (0)                  | 0 (0)                  | 0 (0)                  |           |
| <b>Idade</b>                     |                    |                        |                        |                        |           |
| até 40 anos                      | 15 (38,46)         | 19 (30,15)             | 28 (14,28)             | 22 (8,17)              | < 0.0001* |
| 41 a 50 anos                     | 6 (15,38)          | 16 (25,39)             | 57 (29,08)             | 53 (19,70)             |           |
| acima de 51 anos                 | 17 (43,58)         | 26 (41,26)             | 101 (51,53)            | 183 (68,02)            |           |
| Não informado                    | 1 (2,56)           | 2 (3,17)               | 10 (5,10)              | 11 (4,08)              |           |
| <b>Raça</b>                      |                    |                        |                        |                        |           |
| Branco                           | 22 (56,41)         | 53 (84,12)             | 158 (80,61)            | 212 (78,81)            | < 0.0001* |
| Preto                            | 2 (5,12)           | 2 (3,17)               | 22 (11,22)             | 20 (7,43)              |           |
| Outros                           | 0 (0)              | 0 (0)                  | 3 (1,53)               | 16 (5,94)              |           |
| Não informado                    | 15 (38,46)         | 8 (12,69)              | 13 (6,63)              | 21 (7,8)               |           |
| <b>Aspecto clínico</b>           |                    |                        |                        |                        |           |
| Lesão branca                     | 20 (51,28)         | 45 (71,42)             | 166 (84,69)            | 211 (78,43)            | < 0.0001* |
| Lesão vermelha                   | 5 (12,82)          | 9 (14,28)              | 2 (1,02)               | 13 (4,83)              |           |
| Lesão branca/vermelha            | 0 (0)              | 2 (3,17)               | 0 (0)                  | 6 (2,23)               |           |
| Queilite                         | 1 (2,56)           | 0 (0)                  | 1 (0,51)               | 12 (4,46)              |           |
| Não informado                    | 13 (33,33)         | 7 (11,11)              | 27 (13,77)             | 27 (10,03)             |           |
| <b>Fumo</b>                      |                    |                        |                        |                        |           |
| Não                              | 0 (0)              | 0 (0)                  | 12 (6,12)              | 67 (24,90)             | 0.0265*   |
| Sim                              | 5 (12,82)          | 8 (12,69)              | 36 (18,36)             | 110 (40,89)            |           |
| Ex fumante                       | 0 (0)              | 0 (0)                  | 5 (2,55)               | 33 (12,26)             |           |
| Não informado                    | 34 (87,17)         | 55 (87,31)             | 143 (72,95)            | 59 (21,93)             |           |
| <b>Álcool</b>                    |                    |                        |                        |                        |           |
| Não                              | 0 (0)              | 0 (0)                  | 18 (9,18)              | 90 (33,45)             | 0.9257*   |
| Sim                              | 0 (0)              | 1 (1,58)               | 14 (7,14)              | 80 (29,73)             |           |
| Ex etilista                      | 0 (0)              | 0 (0)                  | 4 (2,04)               | 19 (7,06)              |           |
| Não informado                    | 39 (100)           | 62 (98,42)             | 160 (81,63)            | 80 (29,73)             |           |
| <b>Trauma</b>                    |                    |                        |                        |                        |           |
| Não                              | 0 (0)              | 0 (0)                  | 10 (5,10)              | 98 (36,43)             | 0,0838**  |
| Sim                              | 0 (0)              | 0 (0)                  | 15 (7,65)              | 67 (24,90)             |           |
| Não informado                    | 39 (100)           | 63 (100)               | 171 (87,25)            | 104 (38,66)            |           |
| <b>Chimarrão</b>                 |                    |                        |                        |                        |           |
| Não                              | 38 (97,43)         | 0 (0)                  | 5 (2,55)               | 1 (0,37)               | < 0.0001* |
| Sim                              | 1 (2,56)           | 2 (3,17)               | 0 (0)                  | 0 (0)                  |           |
| Não informado                    | 0 (0)              | 61 (96,83)             | 191 (97,45)            | 268 (99,63)            |           |
| <b>Exposição solar</b>           |                    |                        |                        |                        |           |
| Não                              | 0 (0)              | 0 (0)                  | 5 (2,55)               | 2 (0,74)               | NA        |
| Sim                              | 0 (0)              | 0 (0)                  | 1 (0,51)               | 3 (1,15)               |           |
| Não informado                    | 39 (100)           | 63 (100)               | 190 (96,93)            | 263 (97,76)            |           |
| <b>Tipo de Biópsia</b>           |                    |                        |                        |                        |           |
| Incisional                       | 4 (10,25)          | 7 (11,11)              | 93 (47,44)             | 157 (58,36)            | 0,0287*   |
| Excisional                       | 1 (2,56)           | 14 (22,22)             | 92 (46,93)             | 107 (39,77)            |           |
| Não informado                    | 34 (87,17)         | 42 (66,66)             | 11 (5,61)              | 5 (1,85)               |           |
| <b>Localização</b>               |                    |                        |                        |                        |           |
| Alto risco                       | 6 (15,38)          | 12 (19,04)             | 56 (28,57)             | 89 (33,08)             | 0,0307*   |
| Baixo risco                      | 33 (84,61)         | 47 (74,60)             | 136 (69,38)            | 171 (63,56)            |           |
| Não informado                    | 0 (0)              | 4 (6,34)               | 4 (2,04)               | 9 (3,34)               |           |

\*Teste qui-quadrado, \*\* Fisher's exact test, NA, not available

## Regressão de Poisson multivariável

A seleção das variáveis incluídas na regressão multivariável está apresentada na figura 1. A partir da análise multivariável observamos que o diagnóstico microscópico mais severo, como displasia epitelial/CEC é 155% mais prevalente em indivíduos com eritroplasias e 315% mais prevalente naqueles com queilite actínica biopsiada, do que nos indivíduos com leucoplasias. Em consonância com o diagnóstico clínico, a presença de áreas clínicas vermelhas também aumenta a chance de maior severidade de alteração microscópica. Os pacientes com lesões vermelhas possuem uma prevalência 149% maior de displasia epitelial ou CEC quando comparados com a prevalência dos indivíduos com lesão branca. Outro fator que contribui para a severidade da lesão é a localização anatômica, as lesões presentes em áreas conhecidas como alto risco possuem uma prevalência 115% maior de displasia epitelial ou CEC quando comparadas com a prevalência das lesões em localização de baixo risco.



**Figura 1.** Estimativas de razão de prevalência e seus intervalos de confiança (95%) da regressão de Poisson entre as variáveis estudadas e o desfecho displasia epitelial/CEC versus não-displásicos.

**Tabela 4** - Análise multivariável por Regressão de Poisson entre as variáveis estudadas selecionadas e o desfecho de diagnóstico histopatológico displasia epitelial / CEC versus não-displásico.

|                                  | Regressão de Poisson |              |          |
|----------------------------------|----------------------|--------------|----------|
|                                  | RP                   | [IC95%]      | <i>p</i> |
| <b>Ano de diagnóstico</b>        |                      |              |          |
| até 2000                         | 0,909                | [0,12; 6,85] | 0,926    |
| 2001 - 2010                      | 1,137                | [0,64; 2,03] | 0,665    |
| 2011 - 2017                      | ref                  |              |          |
| <b>Idade</b>                     |                      |              |          |
| até 40 anos                      | ref                  |              |          |
| 41 a 50 anos                     | 1,541                | [0,51; 4,63] | 0,441    |
| acima de 51 anos                 | 1,348                | [0,49; 3,73] | 0,565    |
| <b>Sexo</b>                      |                      |              |          |
| Feminino                         | ref                  |              |          |
| Masculino                        | 1,340                | [0,94; 1,90] | 0,101    |
| <b>Fumo</b>                      |                      |              |          |
| Não                              | ref                  |              |          |
| Sim                              | 0,807                | [0,49; 1,32] | 0,390    |
| Ex fumante                       | 1,091                | [0,50; 2,38] | 0,826    |
| <b>Álcool</b>                    |                      |              |          |
| Não                              | ref                  |              |          |
| Sim                              | 0,667                | [0,38; 1,17] | 0,160    |
| Ex etilista                      | 1,145                | [0,61; 2,15] | 0,674    |
| <b>Diagnóstico Clínico</b>       |                      |              |          |
| Leucoplasia                      | ref                  |              |          |
| Eritroplasia / Leucoeritroplasia | 2,087                | [1,31; 3,33] | 0,002    |
| Queilite actínica                | 4,265                | [2,42; 7,52] | <0,001   |
| CEC                              | 2,472                | [1,45; 4,20] | 0,001    |
| <b>Aspecto Clínico</b>           |                      |              |          |
| Lesão branca                     | ref                  |              |          |
| Lesão vermelha                   | 2,491                | [1,61; 3,86] | <0,001   |
| Lesão branca/vermelha            | 2,540                | [1,57; 4,12] | <0,001   |
| Queilite                         | 1,694                | [0,93; 3,10] | 0,087    |
| <b>Localização Anatômica</b>     |                      |              |          |
| Alto risco                       | 2,152                | [1,49; 3,11] | <0,001   |
| Baixo risco                      | ref                  |              |          |

Regressão de Poisson Multivariável

RP = razão de prevalência

Ref = categorias de referência

Desfecho: ter displasia epitelial / CEC vs Não-displásico (ref)

## DISCUSSÃO

O câncer bucal ainda apresenta altas taxas de mortalidade, sendo que a principal causa para esse desfecho é o diagnóstico tardio. Logo, a identificação do perfil dos pacientes acometidos por lesões potencialmente malignas é indispensável para estabelecer o diagnóstico precoce e estratégias de prevenção da transformação maligna dessas lesões (PIRES et al., 2020).

Dentre as 31.663 lesões diagnosticadas no Laboratório de Patologia Bucal entre 1973 e 2017, 567 (1,79%) eram desordens orais potencialmente malignas. Uma revisão sistemática e meta-análise recente que inclui 22 estudos de diferentes continentes detectou que prevalência geral de DPMO no mundo era de 4.47% (95% CI; 2.43 - 7.08), variando entre 0,11% na América do Norte a 10,54% na Ásia, sendo de 3,94% (95% CI, 2.43 - 5.77) na América do Sul e Caribe (MELLO et al., 2018). Essa grande variação pode ser explicada pelas diferenças ambientais e de exposição aos fatores de risco (NAPIER SS, SPEIGHT PM, 2007).

Na nossa amostra encontramos uma maior prevalência de leucoplasia oral, seguido por queilite actínica, eritroplasia, o que foi semelhante a maioria dos estudos encontrados na literatura (HAAS et al., 2011; MAIA et al., 2016). A mesma revisão sistemática e meta-análise de prevalência de DPMO citada anteriormente detectou que a lesão mais prevalente era a fibrose submucosa oral, lesão muito comum no oriente devido a hábitos como fumo invertido e marcar betel. Na sequência as lesões mais prevalentes foram leucoplasia, seguida de queilite actínica e eritroplasia, semelhantemente aos nossos achados (MELLO et al., 2018). No presente estudo, dentre as DPMO, 77,4% eram leucoplasia, representando uma prevalência de 1,38%, sendo uma frequência semelhante a outros estudos realizados na população brasileira que observaram prevalências que variavam entre 0,63 e 2,88 % (SILVEIRA et al., 2009; QUEIROZ et al., 2014; PIRES, 2020). Além disso, o perfil dos pacientes com leucoplasia observados neste estudo foi semelhante ao perfil já descrito de indivíduos com DPMO, havendo predileção pelo sexo masculino e pela raça branca, na faixa etária acima dos 51 anos. Adicionalmente, quando informado, a maioria informou fazer uso de tabaco e álcool, que são fatores de risco bem estabelecidos pela literatura, tanto para DPMO quanto para CEC (QUEIROZ et al, 2014; ARIYAWARDANA et al., 2007; CASTELLSAGUÉ et al., 2004).

A queilite actínica predominou em indivíduos brancos e do sexo masculino, o que pode ser justificado por essa lesão acometer usualmente pessoas de pele clara e pelo tipo predominante de atividade profissional na região sul do Brasil, como a prática da agricultura e pecuária, nas quais os

indivíduos se expõem cronicamente a radiação solar (RODRIGUEZ-BLANCO et al., 2018; MARKOPOULOS et al., 2004). Nossa amostra consta com apenas 24 lesões de queilite actínica, esse número pouco significativo deve-se ao fato de que, ao contrário da leucoplasia e eritroplasia onde a biópsia é mandatória, somente casos clínicos mais severos de queilite são biopsiadas. Esse fato é confirmado com a forte associação observada com diagnóstico microscópico mais severo, sendo a presença de displasia epitelial ou CEC 315% mais prevalente nos indivíduos com queilite actínica biopsiada em comparação à leucoplasia.

Usualmente em casos leves ou moderados de queilite actínica a conduta é a orientação quanto aos fatores de proteção solar e o acompanhamento clínico da lesão (RODRIGUEZ-BLANCO et al., 2018). No entanto, um estudo recente que buscou alcançar um consenso sobre a taxinomia, diagnóstico e manejo da QA entre especialistas e experts utilizando uma metodologia Delphi, determinou que esta é uma desordem potencialmente maligna e que a determinação dos achados histopatológicos é fundamental para o correto manejo dessas lesões (SEOANE et al., 2021). Ainda não é possível prever quais casos de QA sofrerão uma transformação maligna, no entanto a literatura apresenta a taxa de malignização de 3,07% (DANCYCER et al., 2018), portanto, o diagnóstico precoce e tratamento adequado são necessários (ULRICH et al., 2010).

O perfil demográfico das lesões de eritroplasia também foi semelhante ao já publicado na literatura prévia, sendo mais frequente na raça branca e na faixa etária acima dos 51 anos (VAN DER WAAL, 2009; HOLMSTRUP, 2018). Histologicamente 70% das eritroplasias apresentaram diagnóstico de displasia epitelial/CEC, também semelhante aos achados da literatura prévia (YANG et al., 2014; HOLMSTRUP, 2018). A severidade da eritroplasia está relacionado ao grau de maturação epitelial, e também com alterações moleculares (REICHART & PHILIPSEN 2005, HOLMSTRUP 2018). Em nossa amostra das 567 desordens orais potencialmente malignas, apenas 10 eram eritroplasias, sendo essa considerada uma lesão menos comum. Acredita-se também que sua baixa incidência esteja relacionada a dificuldade de sua identificação pois as lesões vermelhas apresentam menor contraste com a mucosa oral do que as lesões brancas e são muitas vezes confundidas com reações inflamatórias.

Existe ainda a possibilidade de que como a maioria sofre transformação maligna, possivelmente são diagnosticadas quando já progrediram para CEC (YANG et al., 2014).

As DPMO podem acometer qualquer região da cavidade bucal, no entanto, as que acometem localizações de alto risco requerem cuidado especial por serem relacionadas com a maior incidência de câncer bucal (VAN DER WAAL, 2009). Assim como na literatura, em nosso estudo, a localização anatômica de alto risco foi relacionada significativamente com o diagnóstico clínico de CEC. Dessa forma, encoraja-se que seja feita uma avaliação clínica minuciosa para que se detecte precocemente quaisquer alterações presentes e possibilite o acompanhamento a longo prazo desses pacientes. Tendo em vista que a localização anatômica é um fator essencial a ser considerado pelos clínicos, uma vez que é um importante fator de risco associado as DPMO.

Na análise temporal do presente estudo, observamos uma mudança no perfil do paciente acometido pelas DPMO. Entre os anos de 1965 e 1990 houve uma maioria de indivíduos do sexo masculino, com idade acima de 51 anos, sendo a leucoplasia a DPMO mais encontrada. Já na década seguinte, observa-se um discreto predomínio de mulheres da mesma faixa etária, entretanto permanecendo a leucoplasia como lesão mais frequente. Isso se deve em parte pelo maior autocuidado das mulheres em relação à saúde, fazendo com que as mesmas consultem os profissionais da saúde com mais frequência que os homens, e também pode estar associada ao aumento da frequência de exposição a agentes carcinogênicos como fumo e álcool na população feminina.(CAMERON et al., 2010, PIRES et al.,2020).

Entre os anos de 2001 e 2010, o perfil epidemiológico dos pacientes com DPMO, voltou a predominar no sexo masculino, raça branca, com idade superior a 51 anos. Entretanto podemos observar na análise longitudinal entre os anos 2010 e 2017 uma mudança no perfil epidemiológico, no qual houve uma diminuição de pacientes jovens (até 40 anos) acometidos por DPMO, em contrapartida houve aumento de indivíduos acima de 51 anos. Estudos demonstram que o câncer de boca tem se tornado mais frequente em pacientes jovens, entretanto sua incidência é baixa e variável de acordo com a

região geográfica, e seu comportamento não difere quando comparado a uma população de maior faixa etária (TOMO et al., 2020). Nossos achados sugerem que esse fenômeno não ocorre em relação as DPMO da nossa amostra.

A principal limitação do estudo se refere a fonte de informações dos casos que ocorreu a partir das fichas de biópsia. As fichas se encontravam muitas vezes incompletamente preenchidas, principalmente as informações relacionadas aos hábitos e os fatores de risco, principalmente nas fichas mais antigas. Com o passar do tempo houve uma melhora na quantidade de informações preenchidas. Os pontos fortes do estudo são o tamanho amostral, bastante expressivo e consideravelmente maior que outros estudos semelhantes sobre o tema e o período abrangente de coleta dos casos que permite realizar amostras temporais.

O perfil dos pacientes acometidos por DPMO na nossa população é semelhante ao demonstrado em outros estudos, sendo a leucoplasia a lesão mais frequente, sendo esta presente principalmente em localizações de baixo risco e microscopicamente diagnosticada como não-displásica. As queilites actínicas e eritroplasias foram menos frequentes, porém associadas a alterações histopatológicas mais severas. Observamos que ao longo das décadas aumentou o número de lesões diagnosticadas como queilite actínica, assim como lesões com diagnósticos histopatológicos mais severos. Concluímos que lesões com aspecto clínico vermelho e em local de alto risco, devem ser manejadas cuidadosamente pois apresentam maior risco de malignização.

## REFERÊNCIAS

- ARIYAWARDANA, A. et al. Prevalence of oral cancer and pre-cancer and associated risk factors among tea estate workers in the central Sri Lanka. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 36, n. 10, p. 581–587, 2007.
- CAMERON, K. A. et al. Gender Disparities in Health and Healthcare Use Among Older Adults. **JOURNAL OF WOMEN'S HEALTH** v. 19, n 9, 2010.
- CARRARD, V. C.; VAN DER WAAL, I. A clinical diagnosis of oral leukoplakia; A guide for dentists. **Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v. 23, n. 1, p. e59–e64, 2018.
- CASTELLSAGUÉ, X. et al. The role of type of tobacco and type of alcoholic beverage in oral carcinogenesis. **International Journal of Cancer**, v. 108, n. 5, p. 741–749, 2004.
- DANCYGER, A. et al. Malignant transformation of actinic cheilitis: A systematic review of observational studies. **Journal of investigative and clinical dentistry**, v. 9, n. 4, p. e12343, 2018.
- DE SANTANA SARMENTO, D.J. et al. Actinic cheilitis: clinicopathologic profile and association with degree of dysplasia. **Int J Dermatol.** v.53, p. 466-472, 2014.
- FERREIRA, A. M. et al. Prevalence and factors associated with oral potentially malignant disorders in Brazil's rural workers. **Oral Diseases**, v. 22, n. 6, p. 536–542, 2016.
- GANESH, D. et al. Potentially malignant oral disorders and cancer transformation. **Anticancer Research**, v. 38, n. 6, p. 3223–3229, 2018.
- GHANTOUS Y., ABU ELNAAJ I. Global incidence and risk factors of oral cancer. **Harefuah.** v.156, p.645–649, 2017.
- GONZAGA, A. K. G. et al. Diclofenac sodium gel therapy as an alternative to actinic cheilitis. **Clinical Oral Investigations**, v. 22, n. 3, p. 1319–1325, 2018.
- GONZALEZ-MOLES, M.A. et al. Oral lichen planus: controversies surrounding malignant transformation. **Oral Dis.** v.14, n.3, p.229–43, 2008.
- HAAS JUNIOR, O. L. et al. Definição do grupo de risco para leucoplasias bucais: estudo retrospectivo entre os anos de 1999 e 2009. **Rfo Upf**, v. 16, n. 3, p. 261–266, 2011.

HOLMSTRUP, P. Oral erythroplakia—What is it? **Oral Diseases**, v. 24, n. 1–2, p.138–143, 2018.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Estimativa 2020:Incidência de Câncer no Brasil. 2016. Disponível em <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/> > Acesso em: 19 de abril de 2021, 19:00 horas.

LE CAMPION, A.C.O.V. et al. Caracterização do atraso no diagnóstico do câncer de boca e orofaringe em dois centros de referência. **Cad. Saúde Colet.**, v.24, n.2, p. 178-184, 2016.

LIMA, J. S. et al. Oral leukoplakia manifests differently in smokers and non smokers. **Oral Pathol.** v. 26, p. 543-549, 2012.

MAIA, H. C. DE M. et al. Potentially malignant oral lesions: clinicopathological correlations. **Einstein (Sao Paulo, Brazil)**, v. 14, n. 1, p. 35–40, 2016.

MARKOPOULOS, A. et al. Actinic cheilitis: Clinical and pathologic characteristics in 65 cases. **Oral Diseases**, v. 10, n. 4, p. 212–216, 2004.

MELLO F.W. et al. Prevalence of oral potentially malignant disorders: a systematic review and meta-analysis. **J Oral Pathol Med.** v.47, p. 633-640, 2018.

NAPIER, S. S.; SPEIGHT, P. M. Natural history of potentially malignant oral lesions and conditions: An overview of the literature. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 37, n. 1, p. 1–10, 2008.

PILATI, S. F. M. et al. Histopathologic features in actinic cheilitis by the comparison of grading dysplasia systems. **Oral Dis, Amsterdam**, v. 23, n. 2, p. 219-224, 2017.

PIRES, F. R. et al. Oral potentially malignant disorders: Clinical-pathological study of 684 cases diagnosed in a brazilian population. **Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v. 25, n. 1, p. e84–e88, 2020.

QUEIROZ, S. I. M. L. et al. Clinical and histopathological evaluation and habits associated with the onset of oral leukoplakia and erythroplakia. **Jornal Brasileiro de Patologia e Medicina Laboratorial**, v. 50, n. 2, p. 144–149, 2014.

REIBEL J, GALE N. et al. Oral potentially malignant disorders and oral epithelial dysplasia. In: El-Naggar AK, Chan JKC, Grandis JR, Takata T, Slotweg P, et al., editors. **WHO classification of head and neck tumours. 4**. Lyon: IARC; 2017. p. 112–115.

REICHART, P. A.; PHILIPSEN, H. P. Oral erythroplakia - A review. **Oral Oncology**, v. 41, n. 6, p.551–561, 2005.

RODRÍGUEZ-BLANCO, I. et al. Actinic cheilitis prevalence and risk factors: A cross-sectional, multicentre study in a population aged 45 years and over in north-west Spain. **Acta Dermato-Venereologica**, v. 98, n. 10, p. 970–974, 2018.

SCULLY, C.; BAGAN, J. Oral squamous cell carcinoma overview. **Oral Oncology**. v. 45, p. 301–308, 2009.

SEOANE, J. et al. Assembling a consensus on actinic cheilitis: A Delphi study. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, p. 1–9, 2021.

SILVEIRA, E.J. et al. Potentially malignant oral lesions: clinical and morphological analysis of 205 cases. **J Bras Patol Med Lab**. v.45, p. 233-238, 2009.

TOMO, S.; MIYAHARA, G. I.; SIMONATO, L. E. History and future perspectives for the use of fluorescence visualization to detect oral squamous cell carcinoma and oral potentially malignant disorders. **Photodiagnosis and Photodynamic Therapy**, v. 28, p. 308–317, 2019.

ULRICH, M. et al. Non-invasive diagnosis and monitoring of actinic cheilitis with reflectance confocal microscopy. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 25, n. 3, p. 276–284, 2011.

VAN DER WAAL, I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification, and present concepts of management. **Oral Oncol**. v. 45, p. 317–323, 2009.

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

YANG, S. W. et al. Outcome of excision of oral erythroplakia. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 53, n. 2, p. 142–147, 2015.

ZANETTI, R. et al. Prevalence of actinic cheilitis in an oral health campaign in the city of Campinas, SP. **J Appl Oral Sci**. v.15, p. 353-354, 2007.

#### 4. ARTIGO 2

### EFEITO DA INIBIÇÃO DA AUTOFAGIA CELULAR NA CARCINOGENESE BUCAL – UM ESTUDO *IN VIVO*

A ser submetido no periódico Carcinogenesis (ISSN 0143-3334)

#### Resumo

Autofagia é o processo catabólico que ocorre nos lisossomos, e tem por finalidade degradar os componentes celulares e proteínas que já não são mais funcionantes. O objetivo deste processo é manter o equilíbrio homeostático celular para sobrevivência adequada em condições estressantes. Diante das funções biológicas da autofagia identificadas até hoje, a relação com o processo neoplásico está sendo intensamente estudado. No entanto seu papel durante a carcinogênese oral ainda não está bem estabelecido. Além disso, a modulação da via autofágica durante a carcinogênese pode ser um potencial alvo terapêutico e quimiopreventivos. Para tal finalidade, utilizamos modelo animal de indução da carcinogênese com 4NQO em ratos Wistar, sendo um grupo tratado também com hidroxicloroquina (HCQ) 10mg/kg/dia, droga inibidora autofágica, durante um período de 20 semanas. O grupo controle (1) clinicamente não apresentou nenhuma lesão, o grupo 2 (4NQO) teve menor quantidade de lesões nas primeiras semanas, demonstrando evolução mais lenta. O grupo 3 (4NQO+HCQ) teve uma evolução mais rápida, com mais animais apresentando lesões já a partir da 13<sup>o</sup> semana. Apresentou, também, maior quantidade de lesões nas semanas 14 a 16 ( $p < 0.05$ ). Porém ao final do estudo, na semana 20, os grupos 2 e 3 apresentaram a mesma frequência de carcinomas espinocelulares, 7 animais em cada grupo. No grupo 3 que recebeu HCQ os carcinomas desenvolvidos eram na sua maioria microinvasores. Desse modo conclui-se que a autofagia exerce papéis antagônicos em diferentes momentos da carcinogênese, sendo protetora inicialmente, porém contribuindo com a progressão das lesões quando já estabelecido o fenótipo tumoral.

**Palavras-chave:** Autofagia; Carcinogênese bucal; Hidroxicloroquina; Modelo animal.

## INTRODUÇÃO

O câncer é um importante problema de saúde pública, responsável pelas altas taxas de morbimortalidade no mundo. De acordo com a Organização Mundial da Saúde (OMS), projeta-se que os novos casos de câncer e as mortes relacionadas ao câncer em todo o mundo atinjam aproximadamente 26 milhões e 17 milhões até 2030, respectivamente (INCA 2020). Dentre as neoplasias que acometem a cavidade bucal, o carcinoma espinocelular é o mais prevalente, sendo o tabaco e o álcool os principais fatores etiológicos (PRADO et al., 2020). O seu prognóstico é favorável em estágios iniciais, mas infelizmente a maioria das lesões é diagnosticada tardiamente, sendo a taxa de sobrevida baixa (CARRARD & VAN DER WAAL, 2018).

O carcinoma espinocelular bucal pode ser precedido por alterações visíveis na mucosa bucal, as quais são denominadas lesões potencialmente malignas (VAN DER WAAL, 2009). Dentre elas a leucoplasia oral é a lesão potencialmente maligna mais frequente, podendo ocorrer em qualquer local da cavidade bucal. Sua prevalência mundial é de aproximadamente 4,11% e o seu diagnóstico é clínico e por exclusão de outras patologias (MELLO et al., 2018). Clinicamente as leucoplasias são subdivididas em homogênea e não-homogênea. Apesar do diagnóstico ser clínico é necessário realizar biópsia para identificar as alterações epiteliais, que variam de hiperqueratose, displasia epitelial e até mesmo carcinoma, sendo que as leucoplasias não-homogêneas possuem maior chance de apresentar alterações epiteliais mais severas (VAN DER WAAL, 2019).

Atualmente, considera-se que a taxa de transformação maligna dessas lesões leucoplásicas é de aproximadamente 2 a 3% anualmente (CARRARD & VAN DER WAAL, 2018). Independente das características da lesão, não é possível prever com certeza se a leucoplasia irá ou não evoluir para transformação maligna. Assim, o uso de biomarcadores para detectar as lesões com potenciais de transformação maligna são necessários, pois estes sinalizam as mudanças precoces no epitélio, correlacionando positivamente com o prognóstico da lesão (SINEVICI; O'SULLIVAN, 2016). Os biomarcadores sinalizam alterações celulares relacionado a diferentes funções que podem estar associadas à carcinogênese e progressão tumoral. Desse

modo uma importante função celular para manter sua homeostasia em situações de estresse é a autofagia.

A autofagia é o processo catabólico pelo qual células degradam componentes próprios através da via lisossomal e assim mantêm a homeostase celular. O papel da autofagia no câncer é controverso, por um lado elimina organelas danificadas e protege as células contra estresse oxidativo, entretanto por outro lado tem atuação pró-tumoral em pois permite que a células sobreviva em situações de estresse como a privação de nutrientes, hipóxia e tratamento com diferentes quimioterápicos (ZHI; ZHONG, 2015). Desse modo a autofagia pode possuir papel dual no câncer, atuando em vias moleculares envolvidas na promoção e supressão tumoral (GALUZZI et al., 2015). Em relação a carcinogênese oral foi observado que os níveis de LC3B, considerado um marcador de autofagia, aumenta em lesões leucoplásicas de pior evolução, demonstrando que o processo autofágico se encontra alterado (DE LIMA et al., 2017). Dessa forma, a manipulação do processo autofágico pode interferir no desfecho do desenvolvimento do câncer e na evolução da neoplasia.

A Hidroxicloroquina, além de ser utilizada para o tratamento da malária, apresenta propriedades anti-neoplásicas e capacidade imunomodulatória. Dentre os inúmeros mecanismos associados à terapia anti-neoplásica, um dos principais mecanismos é a inibição do processo autofágico (THOMÉ et al., 2013). A hidroxicloroquina atua inibindo a última etapa da via autofágica denominada degradação do autolisossomo, conseqüentemente resulta na falha em fornecer energia através da autofagia para a célula (KIMURA et al., 2012). Desse modo o objetivo do estudo é avaliar *in vivo* a ativação do processo autofágico e os efeitos do inibidor de autofagia Hidroxicloroquina durante o processo de carcinogênese oral em modelo animal.

## **METODOLOGIA**

Foi utilizado para o estudo ratos wistar machos com idade de 60 dias, pesando aproximadamente 250g. Durante o experimento os animais foram mantidos em caixas-moradia coletivas contendo de 2-4 animais por caixa. Após a quarentena, os animais foram alocados randomicamente para seus

respectivos grupos experimentais considerando o peso ponderal a partir dos extratos representados pelos quartis de peso. Os animais e as caixas foram identificados de acordo com o grupo experimental. Os animais foram distribuídos em 3 grupos experimentais:

Grupo 1 (controle n=6): os animais receberam água *ad libitum* e administração de solução salina intraperitoneal 5 vezes por semana ao longo de todo o estudo (20 semanas).

Grupo 2 (4NQO n=13): receberam água com 50ppm de 4-NQO (1-óxido de 4-nitroquinolina) *ad libitum* e administração de solução salina intraperitoneal 5 vezes por semana ao longo de todo o estudo (20 semanas).

Grupo 3 (4NQO+HCQ n=13): receberam água com 50ppm de 4-NQO *ad libitum* e administração de Hidroxicloroquina na dose determinada no estudo piloto, intraperitoneal 5 vezes por semana ao longo de todo o estudo (20 semanas).

### **Indução da carcinogênese**

Foi realizada a indução da carcinogênese através da substância química 4NQO. Os grupos experimentais receberam 4NQO (Sigma-Aldrich, USA) na concentração de 50 ppm, o qual foi previamente diluído em água. O frasco contendo a solução de água e 4NQO foi armazenado em um bebedouro âmbar para evitar a exposição à luz. A frequência de troca dos líquidos foi realizada duas vezes por semana, e o volume de líquidos consumido foi registrado.

### **Tratamento**

A partir do início do estudo foi administrada a droga inibidora de autofagia hidroxicloroquina na dosagem de 10mg/kg, via injeção intraperitoneal cinco vezes por semana, sendo o intervalo entre as doses de aproximadamente 24 horas (CARCHMAN et al., 2016).

## **Avaliação Clínica dos Animais**

A avaliação bucal foi realizada nos animais a partir da 12 semana sendo realizada semanalmente. A avaliação clínica foi realizada sob inalação de isoflurano na concentração de >5%, a fim de verificar a ocorrência de lesões. As lesões encontradas foram classificadas em mancha, placa, nódulo ou úlcera. Após a eutanásia e coleta das línguas e as lesões foram fotografadas com distância padronizada.

## **Análise histopatológica**

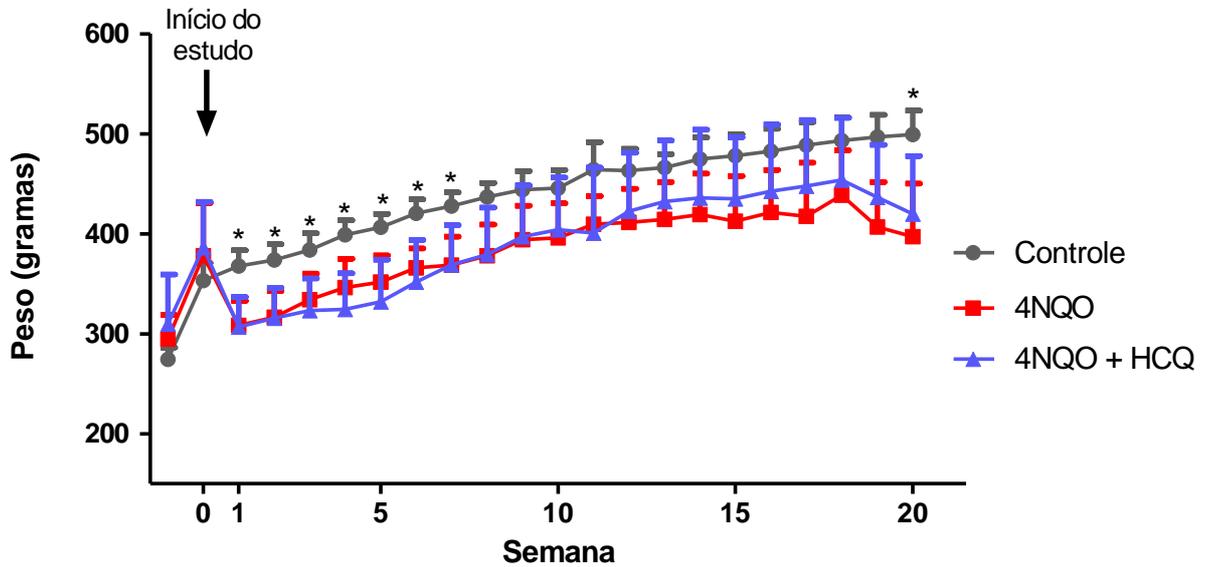
Após a eutanásia dos animais e análise clínica, as línguas foram imersas em solução de formalina tamponada 10% para fixação e posterior processamento. Foram realizados cortes histológicos de 3µm para coloração de hematoxilina e eosina (HE). A partir da análise histopatológica, os espécimes foram classificados em: sem alterações, hiperplasia epitelial, hiperqueratose, displasia epitelial e carcinoma espinocelular, adicionalmente lesões displásicas serão classificadas em alto e baixo grau de acordo com a classificação proposta por Kujan (WARNAKULASURIYA, 2007).

## **RESULTADOS**

O peso dos animais foi monitorado semanalmente ao longo de todo o estudo. O início da carcinogênese resultou em perda de peso significativo nos grupos 2 e 3 até a semana 8. A seguir os animais se adaptaram e passaram a apresentar peso semelhante ao grupo controle. Da mesma forma, ao final do processo na semana 20 os grupos 2 e 3 apresentaram média de peso significativamente menor que o grupo controle (Figura 1). Observamos um menor consumo médio semanal de líquidos nos grupos 2 e 3, porém sem diferença estatística entre eles (Figura 2).

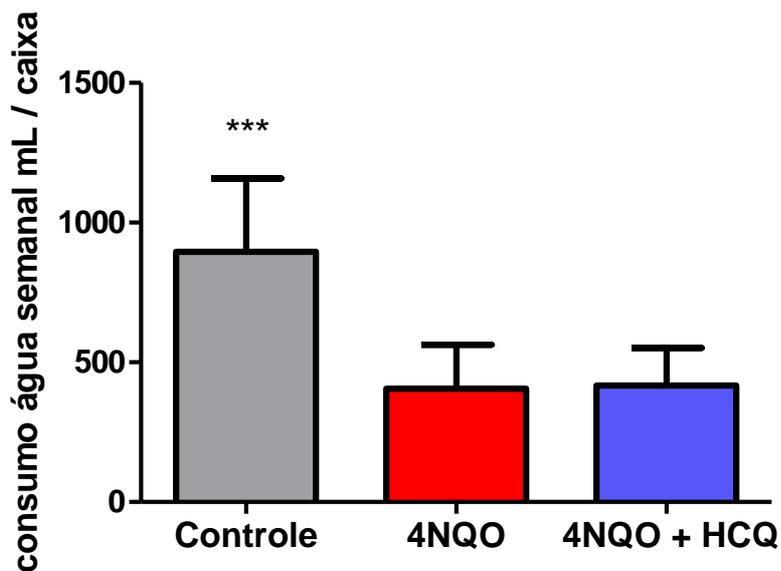
O grupo 1 não desenvolveu nenhum tipo de lesão bucal potencialmente maligna ou maligna ao longo do estudo. Nos grupos em que a carcinogênese foi induzida com o químico 4NQO, os animais começaram a desenvolver lesões bucais a partir da 13ª semana, sendo todas as lesões observadas em língua. O grupo 2 teve menor quantidade de lesões nas primeiras semanas, demonstrando evolução mais lenta. O grupo 3 teve uma evolução mais rápida,

com mais animais apresentando lesões já a partir da 13ª semana. Apresentou, também, maior quantidade de lesões nas semanas 14 a 16 ( $p < 0.05$ ). Ao final do estudo, na semana 20, os grupos 2 e 3 apresentaram 7 animais cada com tumores malignos em língua (Figura 3).



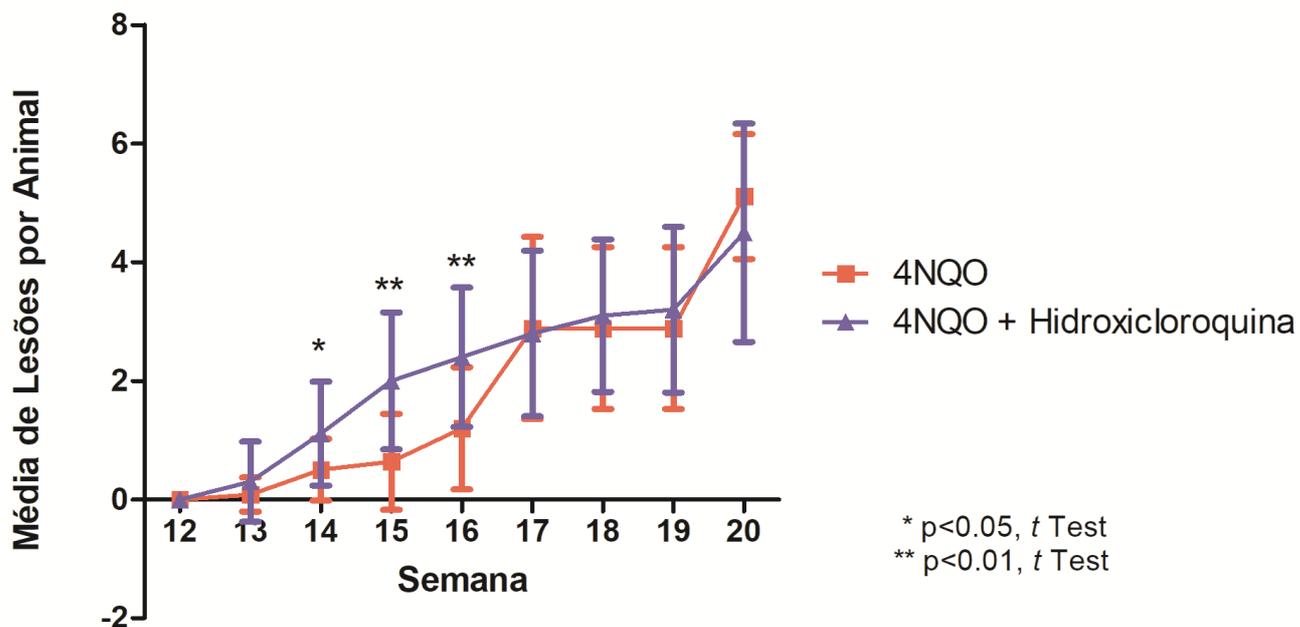
\* Two-way ANOVA  $P < 0.05$

Figura 1: Peso dos animais ao longo de todo o estudo.



ANOVA,  $p < 0.0001$

Figura 2: Consumo de água semanal por caixa.



**Figura 3:** Média de lesões bucais por animal durante o estudo.



**Figura 4:** Imagens representativas das línguas dos animais ao final de 20 semanas do estudo. Fotos captadas imediatamente após a eutanásia. A, grupo controle. B, grupo 4NQO, C, grupo 4NQO + HCQ.

Em ambos os grupos onde a carcinogênese foi induzida, houve perda de 4 animais ao longo do estudo. O grupo 2 teve o número de óbitos dos animais concentrado nas semanas finais (semanas 7, 15, 16 e 17). Já o grupo

3 apresentou os óbitos concentrados nas primeiras semanas (semanas 2, 4, 11 e 12).

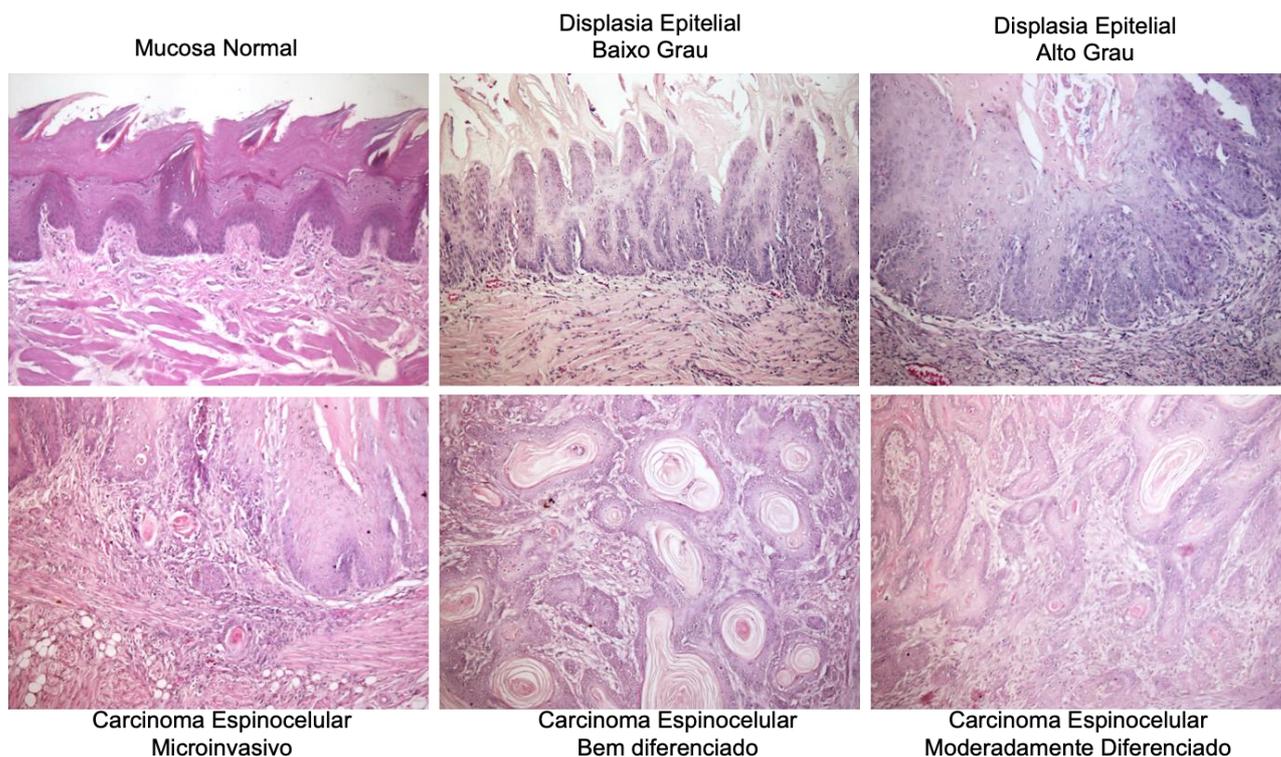
**Tabela 1.** Diagnóstico clínico das lesões induzidas nos grupos 4NQO e 4NQO + HCQ

| <b>SEMANAS</b>                      |                     | 13       |      | 14        |     | 15        |     | 16        |     | 17        |     | 18        |     | 19        |     | 20        |     |
|-------------------------------------|---------------------|----------|------|-----------|-----|-----------|-----|-----------|-----|-----------|-----|-----------|-----|-----------|-----|-----------|-----|
| <b>GRUPO 2<br/>- 4NQO</b>           | Leucoplasia         | 0        | 0%   | 1         | 17% | 3         | 43% | 5         | 38% | 16        | 55% | 11        | 38% | 11        | 34% | 15        | 37% |
|                                     | Leucoeritroplasia   | 1        | 100% | 3         | 50% | 3         | 43% | 4         | 31% | 6         | 21% | 4         | 14% | 6         | 19% | 3         | 7%  |
|                                     | Eritroplasia        | 0        | 0%   | 2         | 33% | 1         | 14% | 4         | 31% | 7         | 24% | 14        | 48% | 15        | 47% | 16        | 39% |
|                                     | CEC                 | 0        | 0%   | 0         | 0%  | 0         | 0%  | 0         | 0%  | 0         | 0%  | 0         | 0%  | 0         | 0%  | 7         | 17% |
|                                     | Total animais       | 12       |      | 11        |     | 10        |     | 9         |     | 9         |     | 9         |     | 9         |     | 9         |     |
|                                     | <b>Total Lesões</b> | <b>1</b> |      | <b>6</b>  |     | <b>7</b>  |     | <b>13</b> |     | <b>29</b> |     | <b>29</b> |     | <b>32</b> |     | <b>41</b> |     |
| <b>GRUPO 3<br/>- 4NQO +<br/>HCQ</b> | Leucoplasia         | 0        | 0%   | 4         | 36% | 9         | 45% | 10        | 42% | 10        | 33% | 10        | 34% | 11        | 35% | 13        | 30% |
|                                     | Leucoeritroplasia   | 2        | 67%  | 6         | 55% | 9         | 45% | 9         | 38% | 10        | 33% | 8         | 28% | 9         | 29% | 8         | 19% |
|                                     | Eritroplasia        | 1        | 33%  | 1         | 9%  | 2         | 10% | 5         | 21% | 10        | 33% | 11        | 38% | 11        | 35% | 15        | 35% |
|                                     | CEC                 | 0        | 0%   | 0         | 0%  | 0         | 0%  | 0         | 0%  | 0         | 0%  | 0         | 0%  | 0         | 0%  | 7         | 16% |
|                                     | Total animais       | 9        |      | 9         |     | 9         |     | 9         |     | 9         |     | 9         |     | 9         |     | 9         |     |
|                                     | <b>Total Lesões</b> | <b>3</b> |      | <b>11</b> |     | <b>20</b> |     | <b>24</b> |     | <b>30</b> |     | <b>29</b> |     | <b>31</b> |     | <b>43</b> |     |

**Tabela 2.** Diagnóstico Histopatológico ao final de 20 semanas do estudo.

| Diagnóstico Histopatológico    | controle |     | 4NQO |       | 4NQO+HCQ |       | <i>p</i> ** |
|--------------------------------|----------|-----|------|-------|----------|-------|-------------|
|                                | n        | %   | n    | %     | n        | %     |             |
| Sem alterações                 | 6        | 100 | 0    | 0     | 0        | 0     |             |
| Não-displásica                 | 0        | 0   | 0    | 0     | 0        | 0     |             |
| DE Baixo Grau                  | 0        | 0   | 2    | 20,00 | 1        | 11,11 |             |
| DE Alto Grau                   | 0        | 0   | 1    | 10,00 | 1        | 11,11 | 0.592       |
| CEC microinvasor               | 0        | 0   | 2    | 20,00 | 4        | 44,44 |             |
| CEC bem-diferenciado           | 0        | 0   | 3    | 30,00 | 2        | 22,22 |             |
| CEC moderadamente diferenciado | 0        | 0   | 2    | 20,00 | 1        | 11,11 |             |

\*\* Teste Exato de Fischer



**Figura 5:** Imagens histopatológicas representativas das lesões que os animais desenvolveram.

## DISCUSSÃO

A autofagia é um processo catabólico que consiste na degradação e reciclagem dos componentes celulares e assim mantém a homeostasia celular (ZHI; ZHONG, 2015). Diante disso, nosso estudo buscou avaliar *in vivo* os efeitos do inibidor de autofagia Hidroxicloroquina durante o processo de carcinogênese oral em modelo animal.

O modelo de carcinogênese quimicamente induzido é amplamente utilizado pois é capaz de mimetizar a complexidade e as múltiplas etapas da carcinogênese bucal. O carcinógeno utilizado 4NQO é capaz de induzir alterações moleculares semelhantes àsquelas ocasionadas pelo consumo de tabaco, principal fator de risco para o câncer de boca(REFERENCIA). Dessa forma foi possível confirmar a hipótese já estabelecida a partir de achados *in vitro* por Galuzzi e colaboradores em 2015.

Demostramos que a autofagia tem fator protetor nas etapas iniciais,

pois houve um desenvolvimento acelerado de lesões no grupo onde a autofagia foi inibida. Porém ao final do estudo este grupo apresentou lesões menos severas do que o grupo onde a autofagia não foi inibida.

Os resultados sugerem que na fase da iniciação tumoral pode ocorrer a perda ou desligamento temporário da atividade autofágica. Os mecanismos que explicam esse efeito estão relacionados a sinais ambientais e ou alterações epigenéticas que favorecem o desenvolvimento tumoral (GALLUZI et al., 2015). O efeito protetor da autofagia está relacionado a diferentes mecanismos, entre eles podemos citar o fato de que a eliminação e reciclagem de organelas e proteínas envelhecidas diminui o potencial de gerar estresse oxidativo (GUO et al., 2016; SCHERZ-SHOUVAL; ELAZAR, 2011). Estudos prévios demonstraram que o efeito carcinogênico do 4NQO está diretamente relacionando a regulação das espécies reativas de oxigênio (ROS). Isso pode ser explicado pelo fato do 4NQO ser um potente carcinógeno químico cuja ação carcinogênica é iniciada pela redução enzimática de seu grupo nitro, dessa reação resulta o produto 4HAQO, o qual quando é metabolizado reage com o DNA celular formando o substrato (8OHdG) que é responsável pelo dano oxidativo (RIVERA, 2012). A inibição da autofagia com o uso de hidroxicloroquina parece ter potencializado o estresse gerado pelo 4NQO.

Apesar do desenvolvimento precoce de lesões no grupo 4NQO + HCQ ao final do tempo experimental esse grupo de animais desenvolveu lesões menos severas que o grupo 4NQO, sugerindo que uma autofagia funcional é necessária para a etapa final da progressão tumoral. Também já foi demonstrado que a carcinogênese oral induzida pelo tratamento com 4NQO causa ativação do oncogene H-RAS (YUAN et al., 1994). A carcinogênese induzida por RAS depende da autofagia para aliviar o estresse causado pela oncogênese para manter níveis nutricionais adequados, metabolismo mitocondrial e diminuição do estresse oxidativo (GUO et al., 2016; SCHERZ-SHOUVAL; ELAZAR, 2011). Dessa forma é possível sugerir que o grupo 4NQO+HCQ não conseguiu desenvolver lesões maiores e agressivas devido a inibição da autofagia, ou seja, a reativação da autofagia é necessária para a etapa final da carcinogênese e consequente progressão dos tumores.

A análise de amostras de desordens potencialmente malignas bucais constatou maiores níveis do marcador autofágico LC3-II em lesões leucoplásicas do que na mucosa bucal normal, principalmente naquelas lesões com pior evolução e prognóstico (DE LIMA et al., 2017). Do mesmo modo Yoshida e colaboradores em 2019, detectaram que maiores níveis de P62 estavam presentes leucoplasias com alterações mais severas, corroborando assim com os achados deste estudo em que a ativação da autofagia é importante para a progressão da carcinogênese (YOSHIDA et al., 2019).

É importante ressaltar que a autofagia não foi totalmente inibida, mas sim ocorreu de forma intermitente. Mesmo assim foi possível detectar um efeito significativo no modelo estudo. Além do mais o grupo que recebeu HCQ apresentou altas taxas de perdas precoces, salientando a importância da autofagia na homeostase celular. Dessa forma, possivelmente não seria possível estabelecer um modelo com inibição total desse processo pois não seria compatível com a sobrevivência dos animais. Em contrapartida o grupo 4NQO ocorreu a perda do mesmo número de animais, porém em etapas mais tardias da carcinogênese possivelmente devido ao comprometimento causado por tumores maiores e já avançados.

Os achados deste estudo mostraram que a manipulação da autofagia altera o desfecho da carcinogênese bucal. No entanto, a manipulação desse processo de forma clínica requer maiores investigações com estudos epidemiológicos de grande populações como, por exemplo, estudos de caso-controle de indivíduos que usam esses medicamentos cronicamente para outras condições e as taxas de desenvolvimento de câncer em comparação a indivíduos que não utilizam esse fármaco. Interessantemente um estudo que avaliou 5.858 pacientes com lúpus eritematoso sistêmico e investigou a associação entre risco de câncer e medicações utilizadas por essa população, observou uma associação significativa com uma frequência menor de uso de HCQ em pacientes com lúpus e que desenvolveram câncer do que o grupo controle pareado sem câncer (GUO et al.,2020). Porém neste estudo não foi investigado o câncer de boca.

De acordo com os achados do estudo realizado, pode-se concluir que a inibição autofágica através do uso de HCQ potencializa o carcinógeno 4NQO, ocasionando maior número de lesões neoplásicas nas primeiras semanas, entretanto menos severas, sugerindo que a autofagia é necessária para a etapa final da progressão tumoral. Desse modo ficou evidente que a autofagia exerce papéis antagônicos em diferentes momentos da carcinogênese, sendo protetora inicialmente, porém contribuindo com a progressão das lesões quando já estabelecido o fenótipo tumoral.

## REFERÊNCIAS

CARCHMAN, E. H. et al. Dysregulation of Autophagy Contributes to Anal Carcinogenesis. **Plos One**. v.5, 2016.

CARRARD, V. C.; VAN DER WAAL, I. A clinical diagnosis of oral leukoplakia; A guide for dentists. **Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v. 23, n. 1, p. e59–e64, 2018.

DE LIMA, T.B. et al. Autophagy analysis in oral carcinogenesis. **Pathology Research and Practice**, v. 213, p.1072-1077, 2017.

GALLUZZI, L. et al. Autophagy in malignant transformation and cancer progression. **The EMBO Journal**. v.34, p.856–880, 2015.

GUO, J. et al. The relationship between cancer and medication exposure in patients with systemic lupus erythematosus: a nested case-control study. **Arthritis Research & Therapy**. v.22, p.1-8, 2020.

GUO, J. Y. et al. Autophagy provides metabolic substrates to maintain energy charge and nucleotide pools in Ras-driven lung cancer cells. **Genes and Development**, v. 30, n. 15, p. 1704–1717, 2016.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Estimativa 2021: Incidência de Câncer no Brasil. 2016. Disponível em <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/> > Acesso em: 12 de abril de 2021, 19:00 horas.

KIMURA, T. et al. Chloroquine in Cancer Therapy: A Double-Edged Sword of Autophagy. **Cancer Res**, v.73, p. 3–7, 2012.

MELLO, F. W. et al. Intraoral Potentially Malignant Disorders in a Brazilian Oral Pathology Service: **Epidemiological, Clinical, and Histopathological Findings**. **Journal of Oncology**. p.1–8, 2018.

PRADO, N.S. et al. Awareness on oral cancer among patients attending dental school clinics in Brazil. **Med Oral Patol Oral Cir Bucal**. v.25, p.e89-95, 2020.

RIVERA, M. C. A. 4NQO carcinogenesis: a model of oral squamous cell carcinoma. **Int. J. Morphol.**, v.30, n.1, p. 309-314, 2012.

SCHERZ-SHOUVAL, R.; ELAZAR, Z. Regulation of autophagy by ROS: Physiology and pathology. **Trends in Biochemical Sciences**, v. 36, n. 1, p. 30–38, 2011.

SINEVICI, N.; O'SULLIVAN, J. Oral cancer: Deregulated molecular events and their use as biomarkers. **Oral Oncology**. v. 61, p.12–18, 2016.

THOMÉ, R.; LOPES, S. C. P.; COSTA, F. T. M.; VERINAUD, L. Chloroquine: Modes of action of an undervalued drug. **Immunology Letters**, v.153, p. 50–57, 2013.

VAN DER WAAL, I. Oral leukoplakia; a proposal for simplification and consistency of the clinical classification and terminology. **Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v. 24, n. 6, p. e799–e803, 2019.

VAN DER WAAL, I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification, and present concepts of management. **Oral Oncol**. v. 45, p. 317–323, 2009.

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

YOSHIDA, T. et al. Association between p62 expression and

clinicopathological characteristics in oral leukoplakia. **Clin. Exp. Dent. Res.** v.25, p.389-397.

YUAN, B. et al. Harvey ras (H-ras) Point Mutations Are Induced by 4-Nitroquinoline-1-oxide in Murine Oral Squamous Epithelia, while Squamous Cell Carcinomas and <sup>[11]</sup><sub>SEP</sub> Loss of Heterozygosity Occur without Additional Exposure. **Cancer Research.** v.54, p. 5310-5317, 1994.

ZHI, X.; ZHONG, Q. Autophagy in cancer. **F1000Prime Reports.** v.7, p. 18, 2015.

## 5. CONSIDERAÇÕES FINAIS

O câncer bucal é uma dos mais frequentes em homens brasileiros, suas taxas de mortalidade são consideradas altas e melhora limitada ocorreu nas últimas décadas (INCA, 2020). As lesões que precedem o câncer de boca são denominadas desordens potencialmente malignas, dentre elas a leucoplasia, eritroplasia e queilite actínica são as mais prevalentes. A identificação precoce e estratégias de prevenções como o acompanhamento regular das lesões, mudanças de hábitos do pacientes são de extrema importância para a melhora do prognóstico e da sobrevida dos pacientes (CARRARD & VAN DER WAAL, 2018). Entretanto, ao mesmo tempo é difícil prever a evolução e identificar quais os fatores que contribuem significativamente para a progressão dessas lesões. Dessa forma, estudos regionais identificando o perfil e características dos indivíduos com estas desordens é necessário para definição de estratégias de rastreamento e tratamento destas condições para diminuir a mortalidade do câncer bucal.

Além de conhecer o perfil dos indivíduos que desenvolvem o câncer bucal e as lesões que o antecedem, identificar as alterações celulares e moleculares que ocorrem durante a progressão é fundamental para a compreensão desse processo. A autofagia é o processo catabólico que tem por função degradar os componentes celulares danificados da própria célula, através da via lisossomal e assim manter a homeostasia celular (MATHEW & WHITE, 2011). No câncer, sabe-se que os níveis de autofagia são aumentados e este processo ocorre devido ao estresse ocasionado pelas mudanças metabólicas no microambiente tumoral (GALLUZZI et al., 2015).

Para entender a importância da autofagia no processo de carcinogênese bucal nossa equipe realizou previamente um estudo sobre os níveis de autofagia em neoplasias e em desordens potencialmente malignas bucais e correlacionou com os parâmetros clínicos e a evolução dessas lesões. Para tal finalidade foi utilizado a técnica de imunistoquímica com o marcador LC3-II, o qual demonstrou que na carcinogênese bucal os níveis de autofagia aumentam. Também foi observado que células positivas para LC3-II

umentavam em carcinomas espinocelulares em relação às lesões potencialmente malignas bucais e à mucosa normal, porém sem associação com pior prognóstico e sobrevida desses pacientes. Nesse mesmo estudo foi observado também aumento de células positivas em lesões leucoplásicas displásicas e com pior evolução em comparação com amostras de leucoplasias não-displásicas e com boa evolução (DE LIMA et al., 2017).

Em vista desses resultados observou-se a necessidade de novos estudos para comprovar que a autofagia interfere significativamente na carcinogênese bucal e pode ser um biomarcador de prognóstico em leucoplasias bucais, por isso nosso grupo de pesquisa desenvolveu o estudo em modelos animais de carcinogênese quimicamente induzida na presença concomitante de um inibidor de autofagia para comprovar a relevância da autofagia no processo de transformação maligna.

No entanto, durante a realização desse estudo nos deparamos com algumas limitações as quais podem ser responsáveis por alguns resultados diferentes ao que a literatura relata. Dentre elas podemos destacar ausência de tempos intermediários da eutanásia para análise microscópica e que o processo de inibição da autofagia não foi completo, aconteceu em alguns momentos isolados (5 dias por semana), mas foi o suficiente para alterar o processo carcinogênico.

A autofagia tem por função manter a homeostase celular e, em células saudáveis essa atividade homeostática constitui uma barreira contra a transformação maligna. Nas células neoplásicas a autofagia constitui uma forma de lidar com o estresse intracelular e ambiental, favorecendo a progressão tumoral. Isso demonstra que em alguns casos os oncogenes podem levar a uma inibição temporária da autofagia ou um ganho de funções moleculares que antagonizam sua atividade oncosupressora. Nosso estudo fundamenta essa hipótese visto a morte prematura dos animais do grupo 3 (que utilizou o inibidor de autofagia HCQ). Além disso, análises adicionais serão realizadas para complementar estes achados. Os níveis dos principais marcadores do processo autofágico LC3II, p62 e beclin1 serão investigados por imunistoquímica.

Neste estudo em modelo animal ficou evidente que a autofagia exerce papéis antagônicos em diferentes momentos, sendo protetora inicialmente,

porém contribuindo com a progressão das lesões quando já estabelecido o fenótipo tumoral. Considerando esse papel dual, a aplicabilidade clínica da manipulação do processo autofágico deve ser avaliada cuidadosamente de acordo com as características microscópicas e moleculares das lesões potencialmente malignas.

## REFERÊNCIAS

CARRARD, V. C.; VAN DER WAAL, I. A clinical diagnosis of oral leukoplakia; A guide for dentists. **Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal**, v. 23, n. 1, p. e59–e64, 2018.

DE LIMA, T.B. et al. Autophagy analysis in oral carcinogenesis. **Pathology Research and Practice**, v. 213, p.1072-1077, 2017.

GALLUZZI, L. et al. Autophagy in malignant transformation and cancer progression. **The EMBO Journal**. v.34, p.856–880, 2015.

INSTITUTO NACIONAL DE CÂNCER. Estimativa 2021:Incidência de Câncer no Brasil. 2016. Disponível em <http://www.inca.gov.br/estimativa/2016/> > Acesso em: 12 de abril de 2021, 19:00 horas.

MATHEW, R. WHITE, E. Autophagy, stress, and cancer metabolism: what doesn't kill you makes you stronger. **Cold Spring Harb Symp Quant Biol**. p. 389-396, 2011.

## 6. DOCUMENTO DE APROVAÇÃO DO PROJETO



### HOSPITAL DE CLÍNICAS DE PORTO ALEGRE

#### Grupo de Pesquisa e Pós Graduação

#### Carta de Aprovação

Certificamos que o projeto abaixo, que envolve a produção, manutenção ou utilização de animais pertencentes ao filo Chordata, subfilo Vertebrata (exceto humanos), para fins de pesquisa científica, encontra-se de acordo com os preceitos da Lei nº 11.794, de 8 de outubro de 2008, do Decreto nº 6.899, de 15 de julho de 2009, e com as normas editadas pelo Conselho Nacional de Controle de Experimentação Animal (CONCEA), e foi aprovada pela COMISSÃO DE ÉTICA NO USO DE ANIMAIS (CEUA) e pelas áreas de apoio indicadas pelo pesquisador.

**Projeto:** 2018/0562

**Título:** MODULAÇÃO DO PROCESSO AUTOFÁGICO NA CARCINOGENESE BUCAL

**Pesquisador Responsável:** FERNANDA VISIOLI

**Equipe de Pesquisa:**

VINICIUS COELHO CARRARD

NATÁLIA DE SOUZA SANTOS

EDUARDO LIBERATO DA SILVA

TAIANE BERGUEMAIER DE LIMA

**Data de Aprovação:**

**Data de Término:** 01/10/2022

| Espécie/Linhagem  | Sexo/Idade  | Quantidade |
|-------------------|-------------|------------|
| RATO HETEROGÊNICO | M/60 Dia(s) | 68         |

- Os membros da CEUA/HCPA não participaram do processo de avaliação onde constam como pesquisadores.
- Toda e qualquer alteração do Projeto deverá ser comunicada à CEUA/HCPA.
- O pesquisador deverá apresentar relatórios semestrais de acompanhamento e relatório final ao CEUA/HCPA.



Assinado digitalmente por:  
PATRICIA ASHTON PROLLA

Grupo de Pesquisa e Pós-graduação  
13/02/2019 08:27:20

<https://aghu-sistema.hcpa.edu.br/pesquisa/publico/cadastros/pesquisador/conferenciaArquivo.xhtml?cc=0&seq=449202>

Impresso do sistema AGHU-Pesquisa por RAFAEL LEAL ZIMMER em 22/01/2019 20:40:10

