FÁBIA HIROMI HAYAMA

**ESTUDO DA EXPRESSÃO DA p16 EM CASOS DE
LÍQUEN PLANO BUCAL**

São Paulo

2006

Fábia Hiromi Hayama

**Estudo da expressão da p16 em casos de
líquen plano bucal**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia
da Universidade de São Paulo, para obter o título
de Doutor, pelo Programa de Pós-Graduação em
Odontologia.

Área de Concentração: Diagnóstico Bucal

Orientador: Prof. Dr. Jayro Guimarães Jr.

São Paulo

2006

Catálogo-na-Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Hayama, Fábila Hiromi

Estudo da expressão da p16 em casos de líquen plano bucal /
Fábila Hiromi Hayama; orientador Jayro Guimarães Jr. -- São Paulo,
2006.

77p. : fig., tab., graf., 30 cm.

Tese (Doutorado - Programa de Pós-Graduação em Odontologia.
Área de Concentração: Diagnóstico Bucal) -- Faculdade de
Odontologia da Universidade de São Paulo.

1. Líquen plano bucal – Marcadores p16 e Ki-67 – Estudo 2.
Diagnóstico bucal

CDD 617.63

BLACK D62

AUTORIZO A REPRODUÇÃO E DIVULGAÇÃO TOTAL OU PARCIAL DESTE TRABALHO, POR
QUALQUER MEIO CONVENCIONAL OU ELETRÔNICO, PARA FINS DE ESTUDO E PESQUISA,
DESDE QUE CITADA A FONTE E COMUNICADO AO AUTOR A REFERÊNCIA DA CITAÇÃO.

São Paulo, ____/____/____

Assinatura:

E-mail: fabhh@uol.com.br

FOLHA DE APROVAÇÃO

Hayama FH. Estudo da expressão da p16 em casos de líquen plano bucal [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

São Paulo, / /2006.

1) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

2) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

3) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

4) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

5) Prof(a). Dr(a). _____

Titulação: _____

Julgamento: _____ Assinatura: _____

Ao Padua,

**Pelo amor e carinho,
em todos os momentos
de nossa vida**

AGRADECIMENTOS

Ao Prof. Dr. Jayro Guimarães Jr., querido professor, foi um privilégio tê-lo como orientador, exemplo de profissional e pessoa humana. A minha admiração, pela seriedade com que atua em todos os momentos.

Ao Prof. Dr. Antonio de Padua Gomes da Silva, médico patologista, pelo estímulo, contribuições e sugestões. Admiro-o mais, a cada dia que passa. Continuo me esforçando a seguir o seu exemplo de dedicação ao trabalho e generosidade com as pessoas, sempre.

À Disciplina de Semiologia, seus professores, funcionários e amigos, especialmente ao Prof. Dr. Gilberto Marcucci e à Profa. Dra. Esther Goldenberg Birman, pelo apoio desde a minha chegada a esta casa.

Ao Prof. Dr. Dante Antonio Migliari, pela preciosa colaboração em compartilhar os pacientes do grupo de estudo de líquen plano bucal.

À Disciplina de Patologia Bucal, pela cessão dos preparados histológicos.

À Dra. Maria Fernanda S. Soares, médica patologista, pela colaboração na análise do material deste trabalho.

À Audrey Behrens de O Viana, bióloga responsável pela realização dos exames imuno-histoquímicos.

Ao Prof. Dr. Aguinaldo J. Nascimento, pelas análises estatísticas realizadas neste trabalho.

Ao Laboratório Citopar e à BioSB, pelo suporte dos exames imuno-histoquímicos.

Hayama FH. Estudo da expressão da p16 em casos de líquen plano bucal [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

RESUMO

Realizar estudo imuno-histoquímico com os marcadores p16 e Ki-67 nas lesões de líquen plano bucal em pacientes assintomáticos e sintomáticos, verificando a presença e modo de marcação, analisando se existe correlação entre os resultados que possa indicar os riscos de transformação maligna. MATERIAL E MÉTODOS: nove pacientes assintomáticos e 12 sintomáticos de líquen plano bucal. Cinco amostras de hiperplasia fibrosa inflamatória foram empregadas como grupo controle. Foram utilizados anticorpos p16 (pré-diluído – BioSB/EUA) e Ki-67 (clone MIB-1 – DAKO/EUA) pela técnica Envision Labelled (DAKO). Os resultados foram analisados de acordo com os parâmetros baseados no estudo de Klaes et al. (2001) avaliando a porcentagem de células marcadas, a distribuição pela camada epitelial e a intensidade da marcação. A análise estatística procedeu ao estudo do risco relativo entre pacientes assintomáticos e sintomáticos com relação ao local da expressão celular (nuclear, citoplasmática ou ambas), com as localizações mais prevalentes da lesão (mucosa jugal e língua) e com os tipos clínicos mais comuns (reticular e atrófico). RESULTADOS: a correlação entre pacientes assintomáticos e sintomáticos foi estatisticamente significativa ($p < 0,05$) quando avaliamos a distribuição da p16 pela camada epitelial com relação ao local da expressão celular e com a localização da lesão. *Odds ratio* da marcação nuclear foi de 4,091. A total (nuclear e

citoplasmática) foi de 5,179. Já a marcação somente citoplasmática teve *odds ratio* de 8,461. A correlação com a localização resultou num *odds ratio* de 5,130 para a língua e 14,234 para a mucosa jugal. As outras categorias avaliadas, porcentagem e intensidade da p16, as características clínicas avaliadas e os resultados do Ki-67, não foram significativos em nenhum item avaliado. CONCLUSÕES: o risco relativo maior quando da marcação somente citoplasmática nos mostra que este é um importante sítio de expressão da p16, não devendo ser desprezado, como sugerido por alguns estudos. A localização apontada na literatura como de maior prevalência nos casos de transformação maligna é a língua, porém o risco relativo no nosso estudo foi maior na mucosa jugal. Como a distribuição foi o único item estatisticamente significativo, faz-se necessário estudo futuro para incluir ou excluir a presença do vírus do papiloma humano nas lesões de líquen plano bucal, visto que a proteína p16 vem sendo indicada para detectar anormalidades celulares nas amostras de cérvix uterina, sendo atribuída a sua superexpressão com a presença de HPV de alto risco, além de estudo da p16 nos casos de displasias liquenóides.

Palavras-Chave: líquen plano bucal, p16, imuno-histoquímica

Hayama FH. p16 immunoexpression in oral lichen planus [Tese de Doutorado]. São Paulo: Faculdade de Odontologia da USP; 2006.

ABSTRACT

We realized immunohistochemical procedures with p16 and Ki-67 in lesions of oral lichen planus to verify the presence and kind of its immunoexpression among the two groups of patients, asymptomatic and symptomatic, correlating the clinical and histopathological diagnosis with the immunohistochemical data in order to verify if oral lichen planus can be considered a lesion with risk of malignant transformation.

MATERIAL AND METHOD: nine asymptomatic patients and 12 symptomatic of oral lichen planus. Five cases of inflammatory fibrous hyperplasia were included as control group. For immunohistochemical studies we used p16 (prediluted–BioSB/USA) and Ki-67 (clone MIB-1–DAKO/USA) by Envision Labelled techniques (DAKO). Results were analyzed according to parameters based on Klaes et al. (2001) evaluating the immunomarked cell rates, the distribution through the epithelial layer and the immunoexpression intensity. The statistics analysis proceeded the study of relative risk between asymptomatic and symptomatic patients regarding to its cellular immunoexpression (nuclear, cytoplasmic or both), the more prevalent topography of the lesion (buccal mucosa and tongue) and clinical characteristics (atrophic and reticular types).

RESULTS: the correlation between asymptomatic and symptomatic patients was statistically significant ($p < 0.05$) when comparison was made of the distribution of p16 through the epithelial layer by analysis its cellular

immunoeexpression. The nuclear immunoeexpression of p16 showed an odds ratio of 4.091. The nuclear and cytoplasmatic were 5.179. The odds ratio for cytoplasmatic expression was 8.461. The correlation between immunoeexpression and topography resulted in an odds ratio of 5.130 for tongue and 14.234 for buccal mucosa. The other categories availed as percentage and intensity of the p16 immunoeexpression, clinical characteristics, besides the Ki-67 results gave non significant results.

CONCLUSIONS: The citoplasmatic expression results indicates that this immunoeexpression must not be discarded, as suggested by some studies. The high relative risk saw in buccal mucosa rather than tongue was an unexpected result, because the localization pointed as with greater involvement in cases of malignat transformation is the tongue. The distribution was the only one that reached a statistically significant result, so further studies must be made in order to include or exclude the human papillomavirus presence in oral lichen planus lesions, since the p16 protein is currently nowadays used as an indicator of cellular abnormalities in cervical lesions, where its overexpression is related to the presence of high risk human papillomavirus, beyond study of p16 in the cases of liquenoid dysplasia.

Keywords: Oral lichen planus, p16, immunohistochemistry

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

Gráfico 5.1- Risco relativo da distribuição da p16 pela camada epitelial entre pacientes assintomáticos e sintomáticos.....	57
Tabela 4.1 - Características clínicas dos pacientes.....	47
Tabela 5.1 - Resultados da p16.....	54
Tabela 5.2 - Resultados do Ki-67.....	55
Tabela 5.3 - Risco relativo entre pacientes assintomáticos e sintomáticos para as avaliações da p16 e Ki-67 com relação ao local da expressão celular.....	56
Tabela 5.4 - Risco relativo entre pacientes assintomáticos e sintomáticos para as avaliações da p16 e Ki-67 com relação à localização da lesão.....	56
Tabela 5.5 - Risco relativo entre pacientes assintomáticos e sintomáticos para as avaliações da p16 e Ki-67 com relação à característica clínica da lesão.....	57

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

CDK	proteína quinase dependente de ciclina
CDKI	inibidores de CDK
HFI	hiperplasia fibrosa inflamatória
HPV	vírus do papiloma humano
LP	líquen plano
LPB	líquen plano bucal
NIC	neoplasia intra-epitelial cervical
PCR	reação em cadeia da polimerase
pRb	proteína do retinoblastoma

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	13
2 REVISÃO DA LITERATURA	15
3 PROPOSIÇÃO	40
4 MATERIAL E MÉTODOS	41
5 RESULTADOS	48
6 DISCUSSÃO	58
7 CONCLUSÕES	67
REFERÊNCIAS	68
ANEXOS	72

1 INTRODUÇÃO

O líquen plano é uma doença inflamatória mucocutânea crônica que pode ter manifestações na cavidade bucal. De etiologia desconhecida, os mecanismos imunológicos, principalmente celulares, com alterações estruturais relatadas na membrana basal epitelial, proteínas da matriz extracelular, integrinas, citoplasma dos queratinócitos basais, citoqueratinas e antígenos nucleares, têm sido implicados na patogênese do líquen plano. Clinicamente, o líquen plano bucal pode apresentar-se sob as formas reticular, papular, em placa, erosiva, ulcerada e atrófica.

Essa doença tem importância devido à incidência na população em geral, ao polimorfismo muito intenso e à tendência de malignização (SCULLY et al., 1998).

O diagnóstico de líquen plano deve ser feito pela associação das características clínicas com os achados histopatológicos. Entretanto, os estudos utilizam-se de metodologias diferentes, colaborando para a controvérsia sobre os riscos de transformação maligna do líquen plano ou se os casos relatados são resultados de má interpretação inicial da lesão. Podemos ter ainda, anormalidades genéticas que ainda não foram traduzidas clinicamente.

Dessa forma, com os avanços verificados na área da biologia celular e molecular, temos observado estudos empregando marcadores imuno-histoquímicos para um melhor diagnóstico e prognóstico dos pacientes com lesões displásicas, cancerizáveis e neoplásicas. Dentre eles, os marcadores da via p16/ciclina D/CDK 4 e 6/pRb vêm sendo testados em lesões variadas de cérvix uterino, pulmão, mama, cabeça e pescoço. Seus resultados têm-se mostrado confiáveis e reproduzíveis,

melhorando a qualidade do diagnóstico e, conseqüentemente, o tratamento e prognóstico desses pacientes.

Este estudo foi proposto para avaliar a p16 nas lesões de líquen plano bucal, e sua possibilidade de ser utilizada como um marcador de valor prognóstico promissor nessas lesões, verificando se apresentam um resultado no estudo imuno-histoquímico de forma padronizada para cada grupo de queixa clínica da lesão, assintomático e sintomático, e se esta marcação pode ser utilizada como parâmetro de prognóstico nestes pacientes.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Líquen plano

Líquen plano (LP) é uma doença mucocutânea inflamatória crônica de etiologia desconhecida, descrito clinicamente por Erasmus Wilson em 1869.

Afeta geralmente indivíduos de meia-idade, com prevalência maior no sexo feminino, sendo raro em jovens e crianças.

Aproximadamente 1% da população pode manifestar LP cutâneo que se caracteriza por lesões nas superfícies flexoras das extremidades como pápulas poligonais, purpúreas e pruriginosas. A glândula peniana, a mucosa vulvar e as unhas também podem ser envolvidas.

Na mucosa bucal, dependendo da população estudada, o líquen plano bucal (LPB) atinge entre 0,1% a 4% dos indivíduos e, clinicamente, pode se manifestar como os tipos reticular, em placa e papular, em geral assintomáticos, e os tipos erosivo, ulcerado e atrófico, geralmente sintomáticos (NEVILLE et al., 1998; SCULLY et al., 1998; HUBER, 2004).

O LPB reticular é a forma mais comum, atingindo a mucosa jugal bilateralmente (90% dos casos), língua (30%), gengiva (13%) e, raramente, o palato ou lábios. Em geral com padrão característico de linhas ou estrias hiperkeratóticas entrelaçadas (estrias de Wickham), podendo surgir como pápulas ou placas hiperkeratóticas que se localizam preferencialmente na borda ou dorso da língua. As lesões são mutáveis, aumentando ou diminuindo de tamanho em tempos variáveis.

Os LPBs erosivo, ulcerado e atrófico incidem em menor proporção, porém, são mais significativos para o paciente devido à sintomatologia associada, como ardência ou dor na área envolvida. A periferia dessas regiões normalmente está cercada por finas estrias radiadas. Na forma atrófica adiciona-se um componente eritematoso à forma hiperkeratótica, enquanto que na forma erosiva acrescenta-se um componente ulcerativo raso à hiperkeratose. O processo é bastante dinâmico, mudando sempre o seu aspecto clínico e os pacientes podem se apresentar com qualquer combinação dos tipos de lesão e, em alguns casos, a característica hiperkeratótica pode ser mínima ou estar totalmente ausente. O sítio mais atingido é a língua e, quando presente na gengiva inserida (10% dos casos), pode produzir quadro de gengivite descamativa.

A forma erosiva tem sido mais associada a doenças crônicas do fígado, especialmente a hepatite C (NEVILLE et al., 1998; SCULLY et al., 1998; HUBER, 2004).

As células epiteliais basais são os alvos principais da reação autoimunitária do LP (Anexo C). O mecanismo do dano parece estar relacionado com um processo de imunidade celular envolvendo as células de Langerhans, os linfócitos T e os macrófagos. Graus variáveis de hiperortoceratose e hiperparaceratose podem estar presentes na superfície do epitélio, a espessura da camada espinhosa pode variar e apresentar acantose. As cristas interpapilares podem estar ausentes ou hiperplásicas, mas, classicamente, se projetam no tecido conjuntivo em forma de “dentes de serra”. A destruição da camada de células basais (degeneração hidrópica) (Anexo D) é acompanhada por um infiltrado intenso, semelhante a uma faixa, principalmente de linfócitos T e histiócitos, imediatamente subjacente ao epitélio. Há um depósito de fibrinogênio na zona da membrana basal e ceratinócitos

degenerados podem ser vistos na interface epitélio-tecido conjuntivo (corpos de Civatte, colóides, citóides ou hialinos).

A imunofluorescência direta revela a presença de fibrina e fibrinogênio ao longo da zona da membrana basal em 90% a 100% dos casos. IgM e componentes do complemento, principalmente C3, C4 e C5 têm sido observados.

Nenhum grau significativo de atipia epitelial é esperado do LPB, embora as lesões que apresentem superinfecção por *Candida albicans* possam trazer motivo de preocupação, devendo ser histopatologicamente reavaliadas após tratamento da infecção fúngica (NEVILLE et al., 1998; SCULLY et al., 1998).

Para estabelecer o diagnóstico do LP é necessária a associação das características clínicas com os achados histopatológicos. O diagnóstico diferencial pode incluir a leucoplasia, candidíase, lupus eritematoso, pênfigo vulgar, penfigóide das membranas mucosas, eritema multiforme, entre outros.

De acordo com Barnard et al. (1993) muitos autores baseiam-se somente nas características clínicas e a falta do exame histopatológico em muitos estudos de LP dificulta a análise dos resultados.

Durante o exame clínico inicial a lesão pode não se apresentar como LP, mas possuir características liquenóides ao exame histológico, ou pode ser clinicamente diagnosticado como LP e o exame histopatológico evidenciar atipias, justificando a necessidade da correlação clínica com a histologia. Além disso, como não há critério diagnóstico específico para LPB que seja aceito universalmente, alguns critérios de inclusão aplicados em estudos de série mostram diferenças nos resultados. A literatura ainda debate sobre a possibilidade de transformação maligna do LP ou se os casos relatados são resultados de má interpretação inicial da lesão (SCULLY et al., 1998).

2.2 Transformação maligna do LPB

A transformação maligna do LPB para o carcinoma epidermóide é a complicação mais temida, desde que foi descrita em 1910 por Hallopeau¹ (apud van der Meij et al., 2003).

Diversos estudos na literatura têm reportado um risco significativo entre 0,4% e 5,6% de transformação maligna em períodos de acompanhamento de 0,5 a 22 anos (FATAHZADEH; RINAGGIO; CHIODO, 2004).

Há divergências quanto à taxa de incidência justamente porque alguns estudos se utilizam somente de características clínicas ou histopatológicas, como explicado anteriormente.

As razões da malignização não são plenamente conhecidas, sendo consideradas fatores de risco o fumo e o álcool, e, provavelmente, as infecções por vírus do papiloma humano (HPV), *Candida albicans* e o vírus do herpes simples.

Os LPBs erosivo, ulcerado e atrófico têm sido apontados como os de maior risco de sofrer transformação maligna, sendo a língua e a gengiva os sítios mais afetados (BARNARD et al., 1993, SCULLY et al., 1998; HUBER, 2004).

A Organização Mundial da Saúde considera o LPB uma condição cancerizável (SCULLY et al., 1998) e esses pacientes devem ser acompanhados periodicamente devido à possibilidade do risco de desenvolvimento de câncer bucal ser maior que na população em geral.

Alguns autores acreditam na existência de uma capacidade de transformação maligna inata do LPB, enquanto outros acreditam que somente as lesões com

¹ Hallopeau H. Sur un cas de lichen de Wilson gingival avec néoplasie voisine dans la region maxillaire. Bull Soc Fr Dermatol Syphiligr 1910;17:32.

displasia que se assemelham a LPB, tenham potencial de carcinogênese (FATAHZADEH; RINAGGIO; CHIODO, 2004).

Durante o exame histopatológico de LPB, se for encontrado displasia epitelial, tem sido proposto que essas lesões sejam consideradas displasias pré-malignas com aparência liquenóide, ou simplesmente, displasias liquenóides (EISENBERG; KRUTCHKOFF, 1992; SCULLY et al., 1998).

Os achados histológicos de displasia epitelial não são exclusivos de lesões pré-neoplásicas. Assim, a presença de displasia epitelial discreta no LPB não necessariamente sugere quadro inicial de carcinoma, podendo ser uma resposta reativa.

Embora as alterações displásicas sejam freqüentemente encontradas adjacentes ao foco de carcinoma invasivo, e os estudos de longos períodos com fumantes mostrem que a displasia epitelial antecede o surgimento do câncer, não necessariamente progridem para câncer. Anormalidades leves a moderadas que não envolvam toda a espessura do epitélio podem sofrer remissão se a causa for removida (CONTRAN; KUMAR; ROBBINS, 1994; FATAHZADEH; RINAGGIO; CHIODO, 2004).

Além do quadro de displasia liquenóide, que já havia sido considerado como uma entidade histopatológica distinta com real predisposição maligna por Krutchkoff e Eisenberg (1985), podemos encontrar lesões que são definidas como reações liquenóides. Estas lesões são semelhantes às lesões de LP no exame clínico e/ou histológico, porém, possuem agente etiológico estabelecido, como medicamentos e materiais restauradores, e tendem a desaparecer com a retirada destes (NEVILLE et al., 1998).

Acompanhando 241 pacientes com diagnóstico inicial de LPB durante 10 anos, Barnard et al. (1993) observaram transformação maligna para carcinoma epidermóide bem diferenciado em oito casos e evolução para displasia severa em um caso. Todos os nove casos tinham diagnóstico inicial de LPB erosivo ou atrófico, embora quatro pacientes também apresentassem lesão tipo placa concomitantemente. Seis pacientes tinham mais de 65 anos e seis carcinomas ocorreram na língua. Os autores ressaltam que a lesão tipo placa homogênea, pode ter sido subestimada em alguns estudos porque estas placas freqüentemente parecem se tornar ulceradas ou atróficas quando há malignização, o que indicaria a necessidade de seu acompanhamento clínico periódico, especialmente se acometer o dorso da língua.

van der Meij et al. (2003) acompanharam pacientes com LPB (62 casos) e lesão liquenóide bucal (LLB) (111 casos) por um período médio de 32 meses. Os autores consideraram como LLB os casos em que as características clínicas e/ou histopatológicas eram somente compatíveis com o LPB segundo os critérios diagnósticos revistos e modificados da Organização Mundial de Saúde (Anexo B), porém sem presença de displasia epitelial. Três casos, todos do grupo da LLB, localizados na língua e clinicamente com uma mistura dos aspectos reticulares, atróficos e ulcerados, sofreram transformação maligna num período entre 11 a 70 meses (média de 33 meses).

Como as más interpretações constituem-se numa das causas de erro no diagnóstico inicial de LP, além da possibilidade de já existir uma alteração genética que venha a ser traduzida clinicamente por displasia ou carcinoma e que não pode ser evidenciada durante o exame clínico/anatomopatológico, nos últimos anos, diversos estudos vêm analisando anormalidades na citogenética de lesões de

diferentes partes do organismo, entre elas as pré-malignas e malignas bucais, na tentativa de demonstrar uma correlação entre presença de anormalidades genéticas com alterações na expressão das proteínas do ciclo celular e mecanismos de transformação maligna.

A perda de heterozigosidade nos *loci* de três cromossomos (3p, 9p e 17p) vem sendo associada com diminuição da atividade de genes de supressão tumoral com subsequente anomalia na expressão das proteínas correspondentes no ciclo celular nos diversos tumores avaliados (KRESTY et al., 2002).

De acordo com Huber (2004), o LP é a doença dermatológica com manifestação bucal mais comum e, o LPB, uma doença que o cirurgião dentista encontra freqüentemente na prática clínica. Sendo uma doença crônica, sem tratamento específico e com relatos de transformação maligna durante o seu curso que ainda não foram totalmente confirmados, justifica-se a procura por um marcador que possa fornecer melhor perspectiva a respeito do diagnóstico e prognóstico do paciente com LPB.

2.3 Ciclo celular

As células eucarióticas realizam o ciclo celular duplicando seu conteúdo e dividindo-se em duas células idênticas. Esta divisão compreende duas fases: 1) fase M, onde ocorre a mitose; 2) interfase: fase de intensa atividade que está subdividida em fase G1 (entre o final da mitose e o início da síntese de DNA), fase S (replicação do DNA) e fase G2 (final da replicação e início da mitose). Para que cada fase

aconteça de forma organizada, os eventos são controlados separadamente e regulados por diversos “pontos de checagem”, não avançando no ciclo se a fase anterior não estiver completa.

Essa sequência de eventos é dirigida por um “sistema de controle do ciclo celular” que ativam ciclicamente os processos essenciais de reprodução celular, como replicação do DNA e segregação dos cromossomos. Este controle é baseado numa família de proteínas ativadoras especializadas denominadas de ciclinas que se ligam a uma família de moléculas, as proteínas quinases dependentes de ciclina (CDKs), controlando sua habilidade de fosforilar proteínas alvos específicas (ALBERTS et al., 1994).

A progressão da fase G1 para S depende da atividade das ciclinas dos tipos D e E. A ciclina D atinge o nível máximo de expressão e forma complexos com as CDK4 ou 6 durante o meio da fase G1, enquanto a ciclina E é expressa e associada com a CDK2 próximo à passagem de G1 para a fase S (VICENTE et al., 2002; SHINTANI et al., 2002). O complexo ciclina D-CDK4 ou 6 faz a fosforilação da proteína do retinoblastoma (pRb), com subsequente liberação do fator de transcrição E2F que codifica diversos promotores que iniciam a replicação do DNA e conduzem o ciclo celular para a entrada na fase S (PANDE et al., 1998; ZHENG; LEE, 2001; KRESTY et al., 2002; MATSUMOTO et al., 2003; PIENTONG et al., 2003).

Como forma de regulação negativa do complexo descrito acima temos os inibidores de CDKs (CKIs). Os CKIs, classificados como supressores tumorais, são os responsáveis pela manutenção do ciclo celular e bloqueio da proliferação quando o desenvolvimento celular é atingido. Temos duas sub-famílias de CKIs baseadas nas semelhanças de suas seqüências e no espectro de CDKs que eles

inibem. O primeiro grupo é constituído pelas proteínas p21, p27 e p57 e o segundo grupo pelas p15, p16, p18 e p19 (PAPADIMITRAKOPOULOU et al., 1997).

2.4 p16

Dentre os CDKIs, este estudo irá se concentrar na análise da expressão da proteína p16 em lesões de LPB. Desde que foi descoberta em 1993 (HEICHMAN; ROBERTS, 1994), os estudos vêm demonstrando que a expressão dessa proteína está freqüentemente alterada em neoplasias humanas como melanomas, leucemias, linfomas e carcinomas da cérvix uterina, do esôfago e do pulmão, assim como nos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço.

No ciclo celular normal, a p16 possui habilidade bioquímica de se ligar ao complexo ciclina D-CDK4 ou 6, inibindo a fosforilação da pRb e retornando a formação do complexo pRb/E2F. Com isso, temos a finalização dos processos do “ponto de checagem” G1-S do ciclo celular (ROCCO; SIDRANSKY, 2001; von KNEBEL DOEBERITZ, 2002; AI et al., 2003; MATSUMOTO et al., 2003).

A proteína p16, produto do gene quinase dependente de ciclina nº2 (CDKN2), também conhecido como gene supressor tumoral múltiplo nº1 (MTS1), localizado no cromossomo 9p21, possui o *locus* INK4a/ARF. Nos últimos anos a literatura vem apresentando estudos envolvendo o cromossomo e seu *locus*, demonstrando que é freqüente a ocorrência de anormalidades nos genes, assim como alterações na expressão da proteína nas células dos diversos tumores acima descritos (CHEN et al., 1999; MORTIER et al., 2002).

Visto que a p16 inibe a proliferação celular somente nas células com pRb funcional, anormalidades na expressão da p16, e da mesma forma, anormalidades na pRb, ciclina D ou de CDKs devem predispor a célula a apresentar uma progressão anormal do ciclo celular. Uma relação recíproca tem sido vista entre expressão da p16 com a da pRb, sugerindo a presença de uma alça de controle de retroalimentação (“feedback”) negativa que permite a pRb limitar a concentração da p16 (MURPHY et al., 2003).

A inativação desses genes deve interferir com a diferenciação terminal e levar a uma proliferação irrestrita e processo tumoral. Desta forma, é esperado que a ausência ou inativação da p16 (na expressão gênica, na estrutura ou função da proteína) resulte em rompimento do controle do ciclo celular, com conseqüente desenvolvimento do tumor, o que está associado com carcinogênese de tumores que mostram deficiência da p16 (PAPADIMITRAKOPOULOU et al., 1997; MORTIER et al., 2002; WING YUEN et al., 2002; AI et al., 2003).

Os estudos vêm demonstrando que anormalidades no gene da p16 ocorrem por deleção (33%), metilação (20%) ou mutação (10%) (PANDE et al., 1998; TSAI et al., 2001; SHAHNAVAZ et al., 2001). Nos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço, Reed et al. (1996) demonstraram que a inativação do gene da p16 está presente em quase 80% dos casos, sendo a deleção responsável por quase 50% dos casos.

Além dos tumores malignos, a inativação do gene da p16 também tem sido freqüentemente reportada em lesões bucais pré-malignas, sugerindo um papel precoce importante desse gene no desenvolvimento do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço (PANDE et al., 1998).

Em acordo com os resultados das análises genéticas nos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço, a expressão da proteína p16 também se mostrou anormal. A ausência da expressão da proteína pelo método da imuno-histoquímica nesses tumores variou de 55% a 90%, com média de 74% nos estudos avaliados (Al et al., 2003).

Kresty et al. (2002) avaliaram alterações no *locus* INK4a/ARF pela técnica da reação em cadeia da polimerase (PCR) em 28 amostras bucais com diagnóstico de displasia epitelial bucal severa, para verificar a existência de correlação entre a presença de anormalidades cromossômicas com o risco de transformação maligna. Segundo os autores, perda de heterozigossidade no braço curto do cromossomo 9p é o defeito mais comum relatado nos carcinomas epidermóides de cabeça e pescoço, e também em lesões pré-malignas, encontrando correlação positiva dessa perda de heterozigossidade com a progressão histológica, desenvolvimento e recorrência do câncer bucal. Neste estudo, perda de heterozigossidade foi a alteração molecular mais freqüente (42,1%), significativa nas lesões do assoalho bucal. Metilação no gene da p16 esteve presente em 57,7% dos casos, sendo que os maiores índices ocorreram nos casos de língua e assoalho bucal. Deleção ou mutação ocorreram em 15% e 7,7%, respectivamente. Estes resultados demonstraram que essas lesões pré-malignas já possuem aberrações genéticas comumente encontradas nos estágios finais de carcinoma epidermóide bucal, indicando a p16 como marcador de acompanhamento preditivo do risco desses pacientes.

Para analisar se a perda de heterozigossidade no cromossomo 9p21 e a inativação da expressão da proteína p16 eram eventos importantes no processo de carcinogênese das lesões pré-malignas bucais, Papadimitrakopoulou et al. (1997) analisaram 74 lesões de leucoplasia por PCR e imuno-histoquímica. Dessas

biópsias, 23 demonstravam displasia epitelial e a p16 foi negativa na marcação em 10 casos (43%). Nos 51 casos restantes sem displasia epitelial, a perda ocorreu em 18 casos (35%). Dentre os casos com ausência da p16, os autores encontraram ainda perda de heterozigosidade em 80% dos casos na região 9p21. Oito pacientes do grupo de estudo desenvolveram carcinoma epidermóide invasivo, sendo que cinco (63%) eram do grupo que apresentava perda da p16. Os resultados confirmaram a hipótese de que a inativação da p16 seria um dos múltiplos eventos precoces no processo de carcinogênese, e poderia indicar que os pacientes com perda de heterozigosidade no cromossomo 9p21 poderiam desenvolver carcinoma num período menor que o grupo sem alteração genética.

Zhang et al. (1997) pesquisaram perda de heterozigosidade no cromossomo 9p21 nas displasias epiteliais bucais e nos LPBs sem displasia. Notaram um aumento progressivo na perda de heterozigosidade dos casos de displasia leve (40%), moderada (46%) a severa (81%), comparados com os LPBs (6%), o que levou os autores a concluir que os casos diagnosticados como LPB mas com evidência de perda de heterozigosidade devem ser seguidos criteriosamente, pois apresentariam tendência a ter um risco aumentado de transformação maligna comparado com os LPB sem perda.

Estudo imuno-histoquímico, confirmado por *Western Blot*, da expressão de ciclinas, CDKs e CDKIs da fase G1-S em mucosa normal, displasia epitelial e carcinoma epidermóide da cavidade bucal foi realizado por Shintani et al. (2002). Neste estudo, a p16 foi detectada em todas as mucosas normais e nas displasias de grau leve. Nas displasias com grau moderado a severo, a p16 não foi detectada em 7% e 30% dos casos, respectivamente, aumentando para quase 70% nos casos de carcinoma epidermóide bucal.

Avaliando casos de queilite actínica e carcinoma epidermóide bucal, Mortier et al. (2002) observaram que, além da mutação no gene supressor tumoral p53, a carcinogênese envolve desregulação nos caminhos da progressão celular controlados pela pRb, incluindo inativação da p16. Para determinar se anormalidades na região 9p21 resultam em anulação na expressão da p16, os autores pesquisaram perda de heterozigosidade por PCR e a expressão da p16 por imuno-histoquímica nessas lesões. Encontraram perda de heterozigosidade em 46% dos carcinomas epidermóides bucais e em 10% das queilites actínicas. A proteína p16 foi marcada em 66% das biópsias de queilite actínica e em apenas 10% dos casos de carcinoma epidermóide bucal, sugerindo que a progressão da lesão cancerizável para carcinoma envolve a inativação do supressor tumoral p16. Além disso, observaram que a proteína p16 não era vista em áreas altamente displásicas dentro das lesões de queilite actínica, justificando a natureza heterogênea destas lesões e a recomendação da aplicação deste marcador para a diferenciação dos casos de displasia pré-neoplásica das reacionais.

Para avaliar o significado clínico-patológico da p16 no tratamento cirúrgico, Wing Yuen et al. (2002) analisaram 225 casos de carcinomas epidermóides da cavidade bucal, orofaringe, hipofaringe e laringe, encontrando marcação nuclear fraca para p16 em 48% dos casos. Houve correlação significativa entre a tênue expressão da proteína p16 com estadio T mais avançado, comparado com os carcinomas precoces, e com tumores que tiveram fracasso na radioterapia. Não se observou relação significativa da proteína com o sexo, idade, grau do tumor, metástase nos linfonodos ou recorrência pós-cirúrgica. Como uma grande quantidade de carcinomas epidermóides da laringe demonstrou fraca marcação quando comparada com as outras áreas avaliadas, os autores concluíram que a

localização do tumor foi o fator independente mais importante afetando a expressão da proteína. Apesar de histologicamente semelhantes, há diferença significativa nas características clínicas, risco de metástase nos linfonodos e prognóstico entre os carcinomas avaliados. As diferentes expressões da p16 nessas áreas são algumas das anormalidades genéticas que, para os autores, devem contribuir para as diferenças no comportamento clínico.

Pande et al. (1998) analisaram por imuno-histoquímica as proteínas p16 e pRb em 35 casos de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, 22 lesões pré-malignas (leucoplasias) e 30 tecidos bucais normais, procurando correlação com o processo de tumoração bucal. Ausência da expressão da pRb foi vista em 66% dos carcinomas epidermóides e 64% das lesões pré-malignas. Para a p16, a ausência foi observada em 63% dos carcinomas epidermóides e 59% das leucoplasias. Reatividade fraca para pRb e p16 foi observada no epitélio bucal normal em 93% dos casos para ambos os marcadores. Um resultado bastante significativo foi que nas lesões bucais pré-malignas com ausência de níveis detectáveis da proteína pRb, encontraram superexpressão da p16 em praticamente todos os casos, o que reforçaria a forte correlação entre as duas proteínas no ciclo celular normal. Além disso, ausência na expressão da p16 foi significativa quando correlacionada com estadiamento tumoral mais avançado. Para os autores a ausência de marcação para as duas proteínas, na sua maioria, em pacientes com câncer bucal que eram grandes usuários de betel e tabaco foi um resultado especialmente importante visto que o estudo foi realizado na Índia, onde há alta correlação entre câncer bucal e consumo de fumo, indicando, talvez, um marcador que possa melhorar o prognóstico, especialmente dos casos de displasia leve ou moderada.

Para Tsai et al. (2001), anormalidades no gene da p16 são eventos comuns no carcinoma epidermóide bucal, sendo que o índice dessas anormalidades aumenta de forma progressiva do grau histológico bem diferenciado para o pouco diferenciado. Foram incluídas 48 amostras estudadas por PCR e pela técnica de *Western Blot*. Do total, 26 (54%) espécimes não expressaram a proteína p16, sete (14,6%) continham deleções e cinco (10,4%) apresentavam mutações. Dos 12 espécimes com anormalidades genéticas, a proteína não pode ser detectada em 11 casos. Apesar de não demonstrarem nenhuma correlação com a localização e estadiamento clínico do câncer, as anormalidades genéticas demonstraram correlação significativa com metástases para linfonodos cervicais, contribuindo também com o grau histológico das células cancerosas. Para os autores, este resultado coincide com pior prognóstico visto nos casos de leucemias linfoblásticas agudas com deleção da p16, nos quais, a perda de expressão dessa proteína se correlaciona com doença metastática.

Ai et al. (2003) analisaram ocorrência de metilação no gene com expressão da p16 em 100 casos de carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço para determinar se a hipermetilação ou a aparente perda da expressão da proteína poderiam afetar outros fatores prognósticos, a taxa de recorrência do tumor ou a sobrevida do paciente. Detectaram hipermetilação da p16 por PCR em 27% dos casos e perda da proteína por imuno-histoquímica em 74%. Vinte e três, dos 27 casos com hipermetilação demonstraram perda na expressão da proteína também, enquanto 22 dos 26 casos com alto nível da proteína eram livres da hipermetilação no gene. Não foi possível correlacionar os fatores investigados com a recorrência do tumor ou sobrevida do paciente. Entretanto, observaram que nos pacientes com estadiamento T₁ N₀, a sobrevida de cinco anos foi de 80% nos tumores p16 positivos

e 40% nos negativos. Em contraste, nos pacientes com tumor em estadiamento mais avançado T₂₋₄ N₁₋₂, a sobrevida de cinco anos foi semelhante entre os casos positivos e negativos para p16, variando de 25% a 35%. Além disso, o uso de tabaco e álcool foi significativo quando correlacionado com a perda da proteína p16, mas não com a presença de hipermetilação, como havia sido demonstrado nos carcinomas de pulmão. Para os autores, essa discrepância deve refletir mecanismos diferentes envolvendo a inativação da p16 entre estes dois tumores relacionados com fumo.

O estudo da p16, na expressão da proteína ou nas anormalidades cromossômicas, vem sendo indicado como mais uma ferramenta a ser aplicada na pesquisa do processo carcinogênico em diversas neoplasias humanas, especialmente nas lesões da cérvix uterina, onde tem sido amplamente difundida. Nas lesões da cavidade bucal, malignas e pré-malignas, alguns estudos relataram diminuição progressiva da expressão da proteína p16 do tecido normal, passando pelas displasias e para o carcinoma, como vistos nos estudos já descritos. Entretanto, esta proteína não tem demonstrado resultados uniformes e a superexpressão da p16 também tem sido relatada em alguns tipos de tumores, incluindo cabeça e pescoço.

Chen et al. (1999) analisaram por imuno-histoquímica a expressão da p16 e da CDK4 na cavidade bucal em 10 casos de hiperqueratose, 30 lesões pré-malignas (displasia leve, moderada e severa, 10 casos de cada), 15 carcinomas epidermóides (sete invasivos sem metástases e oito com metástases) e nove linfonodos dos casos com metástases. Ocorreu marcação positiva para p16 e CDK4 em 82% dos casos. De uma forma geral, houve marcação positiva da p16 no citoplasma celular, com superexpressão progressiva, a partir dos casos de tecidos normais,

hiperqueratóticos, displásicos até os carcinomas epidermóides sem metástases. Nos espécimes de carcinomas epidermóides sem metástases, a localização da expressão da p16 no tecido parecia refletir o grau de diferenciação do tumor. Nos bem diferenciados, as células positivas localizavam-se principalmente nas camadas celulares basalóides mais externas dos blocos celulares, diminuindo gradualmente em direção ao centro, onde eram negativas. Nos tumores pouco diferenciados, as células positivas foram distribuídas irregularmente, de forma difusa e fraca. Por outro lado, ocorreu decréscimo da p16 nos casos de carcinomas epidermóides metastáticos e metástases nos linfonodos, ocorrendo marcação citoplasmática, porém, bem mais fraca que as anteriores. Analisando o aumento da intensidade da marcação durante a progressão de tecido bucal normal para pré-maligno e finalmente carcinoma epidermóide invasivo sem metástase, houve correlação significativa entre a p16, o nível de CDK4 e o grau da displasia.

Com o objetivo de elucidar os padrões de expressão de diversas proteínas associadas com o ciclo celular, Saito, Nakajima e Mogi (1999) analisaram a p16, p27, pRb, p53 e Ki-67 em lesões da cavidade bucal (10 mucosas normais; 23 displasias leves, 23 moderadas, 11 severas; 44 carcinomas epidermóides; 15 carcinomas verrucosos) por imuno-histoquímica. O resultado para p16 foi progressivo de mucosa normal (2,0%), displasia leve (2,65%), displasia moderada (5,35%), displasia severa (5,09%), carcinoma epidermóide (11,3%) até carcinoma verrucoso (44,9%). Para os autores, o surgimento de poucas células positivas nas displasias epiteliais deve ser o reflexo da expressão que ocorre no tecido normal e não a perda de p16 funcional. Assim, quanto mais leve for a displasia, maior a semelhança com o tecido normal, menor expressão da p16. Por outro lado, o resultado imuno-histoquímico da p16 nos carcinomas epidermóides seria resultado

da inativação do gene. O estudo destas proteínas associadas com o ciclo celular claramente demonstrou uma grande diferença de comportamento entre os carcinomas epidermóides e verrucosos. Neste sentido, os autores fazem uma importante análise a respeito da superexpressão da p16 nos casos de carcinomas verrucosos. Com base na revisão de literatura feita, afirmam que, etiologicamente, o fator de risco mais importante para o carcinoma verrucoso parece ser o HPV. Como alguns estudos têm demonstrado que a superexpressão da p16 e pRb em lesões malignas e pré-malignas da cérvix uterina são associadas com HPV de alto risco, a inativação da pRb deve ocorrer nos carcinomas verrucosos bucais atingidos pela infecção por HPV, resultando na superexpressão da p16.

2.5 Participação do vírus do papiloma humano

Entre os diversos tumores onde a p16 tem sido estudada, a sua superexpressão é reportada de forma comum na neoplasia cervical. O papel central de tipos específicos de HPVs na patogênese de lesões displásicas e neoplásicas do colo uterino está amplamente relatado na literatura, sendo os HPVs de alto risco, em particular os tipos 16 e 18, identificados em mais de 99% dos carcinomas de colo uterino. Assim sendo, a superexpressão da p16 em neoplasias cervicais tem sido associada com a infecção por HPV de alto risco e uma correlação inversa tem sido encontrada entre a função da proteína Rb e a superexpressão da p16. Dois oncogenes virais, E6 e E7, são expressos nas células cancerosas associadas ao

HPV de alto risco, e sua expressão é essencial para iniciar e manter o fenótipo maligno (KLAES et al, 2001, BIBBO et al, 2002).

A oncoproteína E6 inicia a degradação prematura do supressor tumoral p53. A oncoproteína E7 liga-se na pRb e favorece a liberação do fator de transcrição E2F do seu complexo ativo com pRb hipofosforilada. Como consequência, a transcrição dos genes regulados pela pRb é ativada e, desse modo, promove a progressão da fase G1 para S do ciclo celular. Além disso, a E7 pode mimetizar a inativação da pRb por mutação ou deleção do gene ou pelo aumento de fosforilação pela superexpressão das CDK4 ou 6 que são mecanismos oncogênicos freqüentemente observados em muitos outros tipos de carcinomas (KLAES et al., 2001).

Como já visto anteriormente, em células normais, a atividade das CDK4 e 6 é firmemente regulada por diversos CDKIs, incluindo a p16. Em muitos tumores malignos a inativação do gene da p16 resulta em redução ou ausência da expressão da sua proteína. Isto leva a um aumento da atividade das CDK4 e 6 com conseqüente fosforilação prematura e, por fim, inativação da pRb.

Se a pRb é diretamente inativada, seja no nível do ácido nucléico ou da proteína, as respectivas células são liberadas do estímulo de supressão do crescimento mediado pela p16, cujo gene continua funcionando normalmente. Cada célula prolifera mesmo na presença de níveis muito altos de p16. Além disso, como o complexo pRb-E2F faz um *feedback* negativo no gene da p16 (MATSUMOTO et al., 2003; VOLGAREVA et al., 2004), a redução ou perda da função da pRb deve resultar em aumento dos níveis de p16 nas respectivas células. Desta forma, a inativação da pRb pelo oncogene E7 do HPV de alto risco resulta em aumento da expressão da p16 que deve, portanto, ser um biomarcador sensível e específico de

células em atividade por HPV de alto risco (KLAES et al., 2001; von KNEBEL DOEBERITZ, 2002; PIENTONG et al., 2003).

Klaes et al. (2001) fizeram avaliação imuno-histoquímica para p16 e PCR para os subtipos de HPV. Observaram superexpressão difusa e forte da p16 em 150 das 152 lesões displásicas do colo uterino de alto grau (neoplasia intraepitelial cervical (NIC) II e III) e carcinomas invasivos. Não houve expressão da p16 em epitélio cervical normal (42 casos) e em sete casos de NIC I associados com HPV de baixo risco. Um caso de metaplasia e dois casos de NIC I, infectados por HPV de alto risco, apresentaram marcação difusa e intensa para p16.

Volgareva et al. (2004) também realizaram estudo em amostras do colo uterino, demonstrando que a superexpressão da proteína p16 é um achado típico em algumas amostras de forma progressiva de NIC I – II – III para carcinoma epidermóide invasivo. Não encontraram expressão nos tecidos normais de controle. Nos casos em que a lesão apresentava mais de um grau histológico no mesmo corte, como regra, a p16 apresentou-se mais pronunciada nas células pertencentes a lesão mais avançada. Entretanto também encontraram cinco NICs I, cinco NICs II e dois carcinomas epidermóides invasivos negativos para p16, embora todos os casos fossem positivos para HPV de alto risco detectados por PCR, o que estaria de acordo com os resultados de Klaes et al. (2001) que também obtiveram dois casos de carcinoma invasivo negativos para p16, porém, positivos para HPV de alto risco. O oposto também foi observado por estes últimos autores onde 14 dos 32 NICs II, nove dos 60 NICs III e cinco dos 60 carcinomas cervicais, sem infecção por HPV de alto risco, expressaram p16 de forma difusa nas células displásicas. Assim, Volgareva et al. (2004) concluem que ter um resultado negativo para p16 parece não ser uma razão suficiente para excluir a paciente do grupo de HPV de alto risco.

Matsumoto et al. (2003) analisaram a expressão da p16 por imunohistoquímica em 10 casos de carcinoma de pequenas células de colo uterino, correlacionando os resultados com a tipagem de HPV por PCR. Encontraram positividade para superexpressão de p16 em todos os 10 casos. Desses, nove foram positivos para HPV tipo 18 e um caso para HPV 16. Em relação ao HPV 16, os autores relatam que normalmente é o tipo mais comum nos casos de carcinoma epidermóide de colo uterino, e que, coincidentemente, o único caso positivo que encontraram também apresentava um componente de carcinoma epidermóide adjacente à região do carcinoma de pequenas células. Os autores ressaltam que a p16 está deficiente em muitos carcinomas humanos, incluindo melanoma, câncer do pulmão e leucemia, no entanto, a associação entre a expressão da p16 e carcinogênese do colo uterino comporta-se de maneira inversa.

Fregonesi et al. (2003) pesquisaram p16 e sua correlação com o HPV em lesões bucais, abrangendo hiperplasias, papilomas, lesões pré-malignas e carcinomas epidermóides. Para os autores, a presença focal da p16 (>10 a 30% das células marcadas) ou difusa (>30%) era preferencialmente encontrada em lesões pré-malignas e malignas, enquanto o padrão esporádico (5 a 10%) era associado com lesões benignas. Observaram forte associação entre a superexpressão da proteína p16 com as lesões bucais que eram malignas ou com alto potencial de malignização. Um dado interessante foi que a lesão de hiperplasia bucal infectada com HPV 16/18 produziu um padrão difuso de marcação da p16. Por outro lado, algumas lesões pré-malignas e malignas, negativas para o HPV de alto risco, foram p16 negativas ou tiveram marcações esporádicas. Estes resultados indicariam uma íntima associação entre a infecção de HPV de alto risco e os padrões imunohistoquímicos da p16. Entretanto, os autores também encontraram expressão focal

de p16 em nove (32%) lesões bucais, oito carcinomas epidermóides e um papiloma, que foram negativos para DNA-HPV. Este resultado sugere que a expressão moderada na ausência de DNA viral poderia ser associada com o tipo histológico e que a disfunção da p16 poderia ser causada por outro co-fator carcinogênico. Por outro lado, eles encontraram biópsias com HPV 6/11 ou 16/18 com padrão p16 negativo ou esporádico, respectivamente. Lesões com HPV 6/11 ou 16/18, mas p16 negativas foram marcadas em papilomas bucais, enquanto as combinando HPV 6/11 ou 16/18 com expressão esporádica de p16 foram encontrados em lesões pré-malignas e malignas bucais. Estes resultados também sugerem que, em algumas lesões, o HPV parece não estar envolvido na desregulação da p16.

Na cavidade bucal, Jontell et al. (1990) realizaram estudo com 20 pacientes apresentando LPB do tipo erosivo para estabelecer presença e subtipo de HPV pela técnica de hibridização *Southern Blot* e por PCR. Pela hibridização, o tipo 11 foi encontrado em seis lesões. Por PCR, HPV 11 foi detectado em oito amostras, incluindo todos os casos positivos pela hibridização. Em adição, HPV 6 foi encontrado em cinco amostras e o HPV 16 em três amostras.

2.6 Correlação com outras proteínas do ciclo celular

Sendo a p16 uma proteína presente no ciclo celular normal que se mostra com expressão alterada em diferentes tumores, embora não de forma homogênea e padronizada, outros componentes do grupo das ciclinas, CDKs ou CDKIs também devem demonstrar alterações durante o ciclo celular e, nesse sentido, diversos

estudos têm sido realizados procurando correlacionar as lesões pré-malignas e malignas com outras proteínas do ciclo celular.

No ciclo celular normal, após a ligação da p16 com as CDK4 ou 6, a ciclina D livre é degradada por uma via dependente de ubiquitina e há completa inibição do complexo ciclina E-CDK2, dependentes da fosforilação da pRb. A superexpressão da ciclina D reportada em diversos tumores humanos, incluindo carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço, resulta em aceleração na progressão pela fase G1 e entrada na fase S, com diminuição da dependência dos fatores de crescimento para proliferação (ROCCO; SIDRANSKY, 2001; von KNEBEL DOEBERITZ, 2002).

A superexpressão da ciclina D vem sendo correlacionado com grau histológico, padrão de crescimento infiltrativo do tumor e metástases nos linfonodos. Vicente et al. (2002) encontraram expressão de ciclina D em 71,4% dos casos de carcinoma epidermóide bucal estudados. Superexpressão foi vista em 17,1% ($\geq 50\%$) sendo significativo quando correlacionado ao grupo com linfonodos positivos, assim como com o tamanho do tumor (T_3 e T_4). Este risco relativo de metástase nos linfonodos nos tumores que superexpressam a ciclina D poderia sugerir um carcinoma com comportamento clínico mais agressivo e mais invasivo, apesar de não ter sido significativa a correlação com o grau histológico do tumor.

Alguns estudos também defendem que a marcação da capacidade de proliferação presente nas células cancerosas possa ter aplicação clínica e, nesse sentido, muitos têm empregado o anticorpo Ki-67. Esse marcador de proliferação celular é expresso em todas as fases do ciclo celular, exceto em G_0 . Aumento na sua expressão tem sido reportado como um bom indicador da atividade celular proliferativa. Cheung et al. (2004) demonstraram que a expressão do Ki-67 tem relevância no prognóstico do carcinoma de colo uterino.

Vicente et al. (2002) encontraram correlação significativa entre o índice de Ki-67 e o grau histológico de diferenciação do tumor, visto que nove dos 10 casos de carcinoma epidermóide da cavidade bucal do grupo com alto índice proliferativo correspondiam aos tumores pouco ou moderadamente diferenciados, o que seria interessante do ponto de vista biológico mas não como fator preditivo clínico.

Shintani et al. (2002) não detectaram as ciclinas D e E na mucosa bucal normal e nas displasias epiteliais leves. Houve marcação positiva progressiva da displasia moderada (6,3%; 6,2%), para severa (7,1%; 57,1%) e para carcinoma epidermóide (35,9%; 62,4%). As CDK2 e 4 também marcaram progressivamente de displasia leve (0%; 16,7%), para moderada (0%; 31,3%), severa (21,4%; 35,7%) e carcinoma epidermóide (66,7%; 58,9%). A perda dos CDKIs, assim como o aumento na expressão das ciclinas D e E e das CDK2 e 4 devem contribuir para a natureza multifatorial da carcinogênese bucal, elevando a fosforilação da pRb e permitindo rápida entrada das células cancerosas na fase S do ciclo celular. A superexpressão de ciclina D teve associação com pior prognóstico. Para os autores, os resultados indicam que a maioria das alterações dos reguladores do ciclo celular ocorrem nos estágios precoces do carcinoma epidermóide e não durante a fase de displasia.

O LP é uma doença que não possui tratamento específico. Considerando a discussão presente na literatura a respeito do risco de transformação maligna do LP, e observando que até o momento os aspectos clínicos e a gradação das atipias epiteliais baseada nos achados histológicos são os principais recursos disponíveis para a previsão do comportamento dessas lesões, e que muitas vezes essa avaliação histológica é subjetiva (TURATTI; MARTINS; ARAÚJO, 2005), além de não termos um critério diagnóstico aceito universalmente, e que, mesmo entre um grupo experiente de patologistas temos discrepâncias entre os observadores

(KLAES et al., 2001), a existência de um biomarcador deve melhorar a padronização e controle de qualidade dos diagnósticos histológicos.

Para tanto, realizamos estudo imuno-histoquímico da p16 em lesões de LPB. A p16 vem sendo indicada como marcador para displasias epiteliais, e a literatura relata seu emprego em diversas lesões pré-malignas e malignas, incluindo a cavidade bucal, não havendo, entretanto o relato da p16 em lesões de LPB. Este estudo foi proposto para avaliar se a p16 pode ser utilizado como um marcador de valor prognóstico promissor nas lesões de LPB.

3 PROPOSIÇÃO

O presente estudo propõe-se a:

1. Realizar o estudo imuno-histoquímico com o marcador p16 em lesões de líquen plano bucal para verificar a presença e o modo de expressão entre os grupos de pacientes assintomáticos e sintomáticos;
2. Avaliar o índice de proliferação celular nas lesões utilizando o anticorpo Ki-67;
3. Analisar os diagnósticos clínico/histopatológicos com os dados de imuno-histoquímica para verificar se os mesmos poderiam aumentar nosso entendimento sobre a possibilidade de malignização do líquen plano bucal.

4 MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Pacientes

Este estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa Odontológica da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP) (Anexo A).

Foram selecionados 21 pacientes atendidos pela Disciplina de Semiologia da FOUSP, com diagnóstico histopatológico de LPB. Nove pacientes eram clinicamente assintomáticos e 12 pacientes eram sintomáticos. Os blocos de LPB eram provenientes dos arquivos da Disciplina de Patologia Bucal da FOUSP. Para controle de mucosa, foram selecionadas cinco amostras de quatro pacientes atendidos na Clínica de Diagnóstico Bucal da Universidade Federal do Paraná (UFPR) com diagnóstico histológico de hiperplasia fibrosa inflamatória (HFI) (Anexo E e F). Um paciente apresentava lesão em lábio inferior e fundo de vestíbulo superior (paciente nº23 – amostra a; b). Para inclusão, estes pacientes deveriam apresentar lesão de crescimento tecidual séssil ou pediculado, associado ao uso de prótese total. A mucosa deveria estar com aspecto preservado, livre de ulcerações.

O grupo de estudo foi composto por seis homens e 19 mulheres. Destes, 21 eram caucasianos e quatro não-caucasianos, com idade entre 19 e 72 anos (média de 49,08 anos). A Tabela 4.1 sumariza as características dos pacientes, os aspectos clínicos, as localizações e o tempo de duração das respectivas lesões.

4.2 Material

As amostras teciduais foram fixadas em formalina e emblocados em parafina. Todos os casos apresentavam confirmação diagnóstica histopatológica, de LPB ou HFI, pela coloração de hematoxilina e eosina (HE).

Para estudo imuno-histoquímico, foram feitos cortes de aproximadamente 4 µm que foram montados em lâminas preparadas com adesivo (CytoCoat, LUPE, SP).

Foram empregados o anticorpo monoclonal de rato p16 (pré-diluído) da BioSB (Santa Barbara, CA, EUA) e o anticorpo monoclonal de coelho Ki-67 (clone MIB-1, 1:100) da DAKO (CA, EUA).

4.3 Métodos

4.3.1 Imuno-histoquímica

O estudo imuno-histoquímico foi realizado pela técnica da Envision LaBelled (DAKO). Os cortes seguiram para desparafinização em xilol, desidratação em álcool e rehidratação em solução de TBST (“tris-buffered-saline-twin”). Peroxidase endógena foi bloqueada por imersão das lâminas em metanol com 0,5% de peróxido de hidrogênio por 15 minutos. Os cortes seguiram para recuperação antigênica em

panela de pressão por 15 minutos imersos em solução da BioSB, seguido de resfriamento na bancada por mais 15 minutos. Os cortes foram incubados com o anticorpo primário em câmara úmida e deixados por 30 minutos. Foram lavados com TBST e incubados com o anticorpo secundário e o polímero por mais 30 minutos. Após lavar com TBST, utilizou-se cromógeno DAB (DAKO) para revelação por cinco minutos. Foi lavado com água destilada, contra-corado com hematoxilina e montado com resina permanente.

O controle positivo para p16 foi realizado em lâmina de controle fornecida pelo fabricante (BioSB) contendo três amostras de células de cultura de linhagem SiHa, HeLa e CaSki (Anexo G). O controle positivo para Ki-67 foi realizado em corte de tonsila palatina com hiperplasia linfóide (Anexo H). O controle negativo para ambos os anticorpos foi realizado em corte de tonsila palatina sem a utilização do anticorpo primário.

4.4 Análise dos resultados

Os cortes submetidos ao exame imuno-histoquímico foram analisados por dois patologistas independentes em microscópio óptico Nikon Eclipse E200. A avaliação foi feita pela estimativa visual das áreas coradas positivamente.

De acordo com o fabricante (BioSB), a marcação positiva para p16 é nuclear e citoplasmática. Neste estudo, optamos por realizar análise da marcação nuclear e citoplasmática separadamente.

A expressão da p16 foi avaliada de acordo com parâmetros baseados no estudo de Klaes et al. (2001).

a) Avaliação da porcentagem de células marcadas:

- negativo;
- esporádico (<5% das células positivas);
- focal (5% a 25% das células positivas);
- difusa (>25% das células positivas).

b) Distribuição da marcação na camada epitelial:

- terço inferior;
- terço inferior e médio;
- de 2/3 a espessura completa.

c) Intensidade da marcação: de zero (negativo) a 3+ (superexpressão).

Os resultados da p16 foram classificados como positivos e negativos. Consideramos como positivo todos os casos $\geq 5\%$ das células marcadas (focal e difuso), incluindo marcação no núcleo, no citoplasma, ou em ambos. O item negativo incluiu os resultados esporádicos e negativos.

Para o Ki-67, somente a marcação nuclear foi considerada positiva. Utilizamos como parâmetros:

a) Avaliação da porcentagem de células marcadas: de zero a 100%

b) Distribuição da marcação na camada epitelial:

- camada basal,
- terço médio;
- espessura completa.

c) Intensidade da marcação: de zero (negativo) a 3+ (superexpressão).

4.5 Análise estatística

Realizou-se estudo do risco relativo entre os pacientes assintomáticos e sintomáticos de LPB com os resultados imuno-histoquímicos da p16 e do Ki-67. Para correlacionar a presença e modo de marcação quanto à porcentagem, distribuição e intensidade com os dados clínicos e histopatológicos, procedemos à análise pela razão de possibilidades (*odds ratio*), com intervalo de confiança (IC) de 95%.

Devido à variedade de sítios afetados pelo LPB, a correlação estatística foi feita com as duas localizações clínicas mais envolvidas no grupo de estudo, a mucosa jugal e a língua. O mesmo critério foi adotado com relação às características clínicas, escolhendo os dois tipos presentes em maior quantidade, os reticulares e os atróficos.

Foi realizada análise de regressão logística (*logit*), tendo como variável dependente a natureza do paciente e, como independente, diversos resultados imuno-histoquímicos. As variáveis foram codificadas da seguinte maneira:

A) Variável dependente: “0” para pacientes assintomáticos e “1” para sintomáticos.

B) Variáveis independentes:

a) avaliação da porcentagem de células coradas positivamente – p16(%): “0” para negativo (negativo ou esporádico), “1” para positivo (focal ou difuso);

b) distribuição da marcação na camada epitelial - p16(Dt): “0” para negativo, “1” para terço inferior, “2” para terço inferior e médio e “3” para 2/3 a espessura completa;

c) intensidade da marcação - p16(I): “0” para negativo, “1” para 1+, “2” para 2+ e “3” para 3+;

d) avaliação da porcentagem de células coradas positivamente - Ki-67(%): de 0 a 100%;

e) distribuição da marcação na camada epitelial - Ki-67(Dt): “0” para negativo, “1” para camada basal, “2” para terço médio e “3” para espessura completa;

f) intensidade da marcação - Ki-67(I): “0” para negativo, “1” para 1+, “2” para 2+ e “3” para 3+.

Os dados foram analisados para as seguintes categorias:

- 1) Local da expressão celular: nuclear, citoplasmática e total (nuclear + citoplasmática);
- 2) Localização da lesão: mucosa jugal e língua;
- 3) Característica clínica da lesão: atrófico e reticular.

Foi utilizado, para análises, o pacote estatístico para microcomputador Statistica 6.0 (Statsoft).

Tabela 4.1 Características clínicas dos pacientes (n=25)

Pacientes	Idade	Raça	Localização da lesão			Característica clínica			Tempo da doença (meses)			
ASSINTOMÁTICOS												
01	65	C	MJ (E)	LG (Bd)	LB (I)	A	R	P	24			
02	31	NC	MJ (D)			A			05			
03	63	C	MJ (D)			R			---			
04	45	C	MJ (E)			R			---			
05 *	48	C	MJ (B)	LG (Ds)	GV	R	P	P	12			
06	61	C	MJ(B)	LG (Bd)	AB	R	R	R	48			
07	38	NC	MJ (B)		R	R	12					
08	60	C	MJ (B)		R		12					
09	40	C	MJ (B)		R	R	36					
SINTOMÁTICOS												
10	68	NC	MJ (B)	LG (Vt-Ds)	PD	R	R – E	A	02			
11	48	C		PD	A				10			
12	54	C		PD	A				---			
13	48	C		PD	A				24			
14 *	37	C	MJ (B)	LG (Ds)	PD	R	R	R	48			
15	42	C	MJ (B)	LG (Bd)	LB (I)	A	R	A	156			
16	46	C		LG(Bd-Ds)					LB (S-I)-AB-PD	R	R - P	24
17 *	60	C		LG (Ds)					RA (I)	R	R	02
18	61	NC		LG (Bd)					P	R		144
19	42	C	MJ (B)	LG (Ds)	RA (I)	P	P / U	P	12			
20	42	C		LG (Bd)					U	06		
21	27	C		LG (Ds)						48		
GRUPO CONTROLE												
22	19	C	MJ (D)		LB (I) – FV (S)	HFI			12			
23 (a; b)	72	C				HFI	12					
24	66	C				PD	36					
25	44	C				FV (S)	24					

* Pacientes apresentando lesões cutâneas concomitantemente

(a; b) = amostra a; amostra b

C = caucasiano; NC = não caucasiano

MJ = mucosa jugal; E = esquerda; D = direita; B = bilateral

LG = língua; Bd = borda; Ds = dorso; Vt = ventre

LB = lábio; GV = gengiva; AB = assoalho bucal; PD = palato duro

RA = rebordo alveolar; FV = fundo de vestibulo

I = inferior; S = superior

HFI = hiperplasia fibrosa inflamatória

A = atrófico; R = reticular; P = placa; E = erosivo; U = ulcerado

--- = período indeterminado da doença

5 RESULTADOS

5.1 Distribuição e característica das lesões de LPB

Os pacientes do nosso grupo de estudo apresentaram, em sua maioria, lesões de LPB distribuídas em vários locais da cavidade bucal, sendo que a mucosa jugal estava envolvida em 18 casos; língua em 11 casos; lábio e palato duro, em quatro casos cada um; gengiva, assoalho bucal e fundo de vestibulo, em dois casos cada; um caso envolvendo rebordo alveolar inferior.

Verificando a característica clínica da lesão presente, independente da localização envolvida, temos:

- entre os nove pacientes assintomáticos, dois apresentavam somente lesões atróficas e cinco pacientes tinham lesões do tipo reticular;
- entre os 12 pacientes sintomáticos, somente a forma reticular estava presente em três indivíduos, a forma atrófica em três pacientes, um apresentava somente a forma ulcerada e um paciente a forma em placa.

Cinco pacientes do grupo de estudo apresentavam mais de uma característica clínica de LPB distribuídos em localizações diferentes. Somente um paciente apresentou lesão em borda de língua em placa e com ulcerações ao mesmo tempo.

Entre os sintomáticos, sete pacientes tinham queixa de ardência, quatro de dor e somente um de desconforto.

5.2 p16 em pacientes assintomáticos

Dos nove pacientes deste grupo, cinco (55,6%) foram negativos para p16, nuclear e citoplasmático. Três, desses cinco, apresentavam lesões do tipo reticular. Apenas um paciente apresentou marcação de forma esporádica no citoplasma, sendo considerado como negativo para p16.

Quatro pacientes foram positivos para p16. Dois, dos quatro pacientes (22,2%), um com lesão atrófica e outro reticular, apresentaram marcação focal nuclear e citoplasmática. Marcação difusa somente no citoplasma e focal no núcleo foi visto nos outros dois pacientes, um com lesão atrófica e outro reticular. Nenhum paciente deste grupo assintomático demonstrou marcação difusa no núcleo e no citoplasma ao mesmo tempo (Anexo L e M).

No item distribuição avaliada, quando presente, a p16 nuclear e citoplasmática, ocorreu no terço inferior. Os resultados estão apresentados na Tabela 5.1.

5.3 p16 em pacientes sintomáticos

Quatro pacientes (33,3%) foram considerados como negativos para p16, sendo que dois tinham lesões reticulares e um paciente o tipo atrófico. Neste grupo tivemos mais marcações esporádicas comparadas com o grupo dos pacientes assintomáticos, sendo quatro ocorrências no núcleo e três no citoplasma.

Do total de 12 pacientes, três tiveram resultados positivos de padrão difuso no núcleo e no citoplasma, sendo que um deles apresentava lesão reticular e, os demais, em placa.

O resultado da marcação positiva focal foi muito heterogêneo. A marcação simultânea no núcleo e no citoplasma ocorreu em dois casos. Um caso do tipo atrófico e o segundo numa lesão ulcerada. A marcação focal somente citoplasmática ocorreu em três casos, sendo um do tipo atrófico e dois em associações de características e localizações clínicas (Anexo N e O).

Na distribuição, a p16 nuclear ocorreu no terço inferior em cinco casos e no terço inferior e médio em quatro casos. A p16 citoplasmática ocorreu no terço inferior em oito casos, no terço inferior e médio em dois casos e somente um caso teve distribuição na espessura completa (Anexo P). Os resultados estão demonstrados na Tabela 5.1.

5.4 Ki-67

Dentre os 21 pacientes com LPB, 19 tiveram marcações positivas, todos na camada basal, variando de 10 a 90% (média de 52,6%) (Anexo Q, R, S e T). Os resultados estão apresentados na Tabela 5.2.

Uma amostra foi negativa (lesão atrófica na mucosa jugal), e uma amostra mostrou-se insatisfatória por dobra no corte.

Uma amostra apresentou marcação no terço médio, além da camada basal, de forma intensa (3+). Este resultado ocorreu numa amostra de língua, a única lesão exclusivamente ulcerada dentro da amostra pesquisada.

5.5 Pacientes do grupo controle

O resultado da p16 foi negativo, nuclear e citoplasmático, nas cinco amostras testadas (Anexo I).

O Ki-67 marcou, na camada basal, em todas as amostras testadas (Anexo J).

5.6 Resultado estatístico

Avaliamos o risco relativo dos diversos resultados imuno-histoquímicos da p16 e do Ki-67 obtidos no estudo considerando o grupo de pacientes assintomáticos e sintomáticos do LPB. As correlações ocorreram com o local da expressão celular (nuclear, citoplasmática ou total), com a localização clínica da lesão (mucosa jugal ou língua) e com a característica clínica (reticular ou atrófico).

5.6.1 local da expressão celular

Ao correlacionarmos os pacientes assintomáticos com os sintomáticos e os resultados do local da expressão celular, somente nuclear, citoplasmática ou total, os resultados foram estatisticamente significativos ($p<0,05$), nas três localizações, quando consideramos a distribuição da p16 pela camada epitelial, como mostra a Tabela 5.3.

- a) total, a curva de declividade dos pacientes assintomáticos para os sintomáticos foi de 5,179 (IC:1,856 a 14,450), $p<0,05$;
- b) nuclear, a razão de possibilidades foi de 4,091 (IC: 1,074 a 15,587), $p<0,05$;
- c) citoplasma, a razão de possibilidades foi de 8,461 (IC: 1,538 a 46,554), $p<0,05$.

5.6.2 localização da lesão

Avaliando as duas localizações clínicas mais prevalentes, também tivemos resultados estatisticamente significativos ($p<0,05$) na distribuição da p16 pela camada epitelial dos pacientes assintomáticos para os sintomáticos, como mostra a Tabela 5.4.

- a) mucosa jugal, a razão de possibilidades foi de 14,234 (IC: 3,287 a 61,629), $p<0,05$;
- b) língua, a razão de possibilidades foi de 5,130 (IC:1,153 a 22,827); $p<0,05$.

As outras duas categorias avaliadas, porcentagem e intensidade da marcação da p16 pela camada epitelial, não foram estatisticamente significativas. Da mesma

forma, as características clínicas avaliadas, atrófico e reticular, e os resultados do Ki-67, também não foram significativos em nenhum item avaliado.

O gráfico 5.1 exemplifica a curva de declividade que demonstra o risco relativo da incidência da distribuição da p16 pela camada epitelial entre o grupo de pacientes assintomáticos e sintomáticos. Os pacientes assintomáticos tiveram marcação negativa ou distribuída no terço inferior da camada epitelial. Por outro lado, os pacientes sintomáticos tiveram marcação em todos os níveis, porém, somente estes apresentaram distribuição pelo terço inferior e médio e em toda a espessura da camada epitelial.

Tabela 5.1 Resultados da p16 (n=26)

Pacientes	n (%)	n (Dt)	n (I)	c (%)	c (Dt)	c (I)
ASSINTOMÁTICOS						
1	P (F)	A	3	P (D)	A	3
2	P (F)	A	3	P (F)	A	2
3	N	N	N	N	N	N
4	N	N	N	N	N	N
5	N	N	N	N	N	N
6	N	N	N	N	N	N
7	P (F)	A	2	P (D)	A	2
8	N	N	N	N (E)	A	1
9	P (F)	A	1	P (F)	A	2
SINTOMÁTICOS						
10	N	N	N	N (E)	A	1
11	P (D)	B	3	P (D)	D	3
12	P (F)	A	2	P (F)	A	2
13	N (E)	A	1	P (F)	A	1
14	N (E)	A	1	N (E)	A	1
15	N	N	N	N	N	N
16	N (E)	A	1	N (E)	A	1
17	N (E)	A	2	P (F)	A	2
18	N	N	N	P (F)	A	1
19	P (D)	B	3	P (D)	B	3
20	P (D)	B	2	P (D)	B	2
21	P (F)	B	2	P (F)	A	3
GRUPO CONTROLE						
22	N	N	N	N	N	N
23 a) (LB)	N	N	N	N	N	N
23 b) (FV)	N	N	N	N	N	N
24	N	N	N	N	N	N
25	N	N	N	N	N	N

n = nuclear; c = citoplasmático

% = porcentagem; Dt = distribuição; I = intensidade

P = positivo; F = focal; D = difuso

N = negativo; E = esporádico

A = terço inferior

B = terço inferior e médio

D = 2/3 a espessura completa

LB = lábio; FV = fundo de vestibulo

Tabela 5.2 Resultados do Ki-67 (n=26)

Pacientes	n (%)	n (Dt)	n (I)
ASSINTOMÁTICOS			
1	90	C	3
2	20	C	3
3	Insat.	Insat.	Insat.
4	80	C	3
5	10	C	1
6	40	C	3
7	80	C	3
8	90	C	3
9	90	C	3
SINTOMÁTICOS			
10	10	C	1
11	40	C	3
12	40	C	3
13	N	N	N
14	40	C	3
15	25	C	3
16	25	C	3
17	15	C	3
18	15	C	3
19	90	C	3
20	90	C	3
21**	90	C	3
GRUPO CONTROLE			
22	10	C	2
23 a) (LB)	80	C	3
23 b) (FV)	75	C	3
24	90	C	3
25	75	C	3

n = nuclear

% = porcentagem; Dt = distribuição; I = intensidade

C = camada basal

N = negativo

Insat. = insatisfatório

LB = lábio; FV = fundo de vestíbulo

** Apresentou adicionalmente 10% de marcação no terço médio de forma intensa (3)

Tabela 5.3 Risco relativo entre pacientes assintomáticos e sintomáticos para as avaliações da p16 e Ki-67 com relação ao local da expressão celular

Expressão	Ensaio	Razão de possibilidades	Intervalo de confiança		p
Total (nuclear + citoplasmática)	p16 (%)	1,477	0,434	a 5,031	p>0,05 ^{ns}
	p16 (Dt)	5,179	1,856	a 14,450	p<0,05 *
	p16 (I)	1,509	0,856	a 2,659	p>0,05 ^{ns}
	Ki-67 (%)	0,979	1,007	a 0,952	p>0,05 ^{ns}
	Ki-67 (Dt)	0,000	---	---	p>0,05 ^{ns}
	Ki-67 (I)	0,783	2,347	a 0,261	p>0,05 ^{ns}
Nuclear	p16 (%)	0,893	5,116	a 0,156	p>0,05 ^{ns}
	p16 (Dt)	4,091	1,074	a 15,587	p<0,05 *
	p16 (I)	1,381	0,642	a 2,968	p>0,05 ^{ns}
	Ki-67 (%)	0,979	1,007	a 0,952	p>0,05 ^{ns}
	Ki-67 (Dt)	0,000	---	---	p>0,05 ^{ns}
	Ki-67 (I)	0,783	2,347	a 0,261	p>0,05 ^{ns}
Citoplasmática	p16 (%)	2,500	0,430	a 14,540	p>0,05 ^{ns}
	p16 (Dt)	8,461	1,538	a 46,554	p<0,05 *
	p16 (I)	1,696	0,723	a 3,981	p>0,05 ^{ns}

% = porcentagem; Dt = distribuição; I = intensidade.

* significativo.

^{ns} não significativo.

Tabela 5.4 Risco relativo entre pacientes assintomáticos e sintomáticos para as avaliações da p16 e Ki-67 com relação à localização da lesão

Localização da lesão	Ensaio	Razão de possibilidades	Intervalo de confiança		p
Mucosa Jugal	p16 (%)	1,607	0,416	a 6,210	p>0,05 ^{ns}
	p16 (Dt)	14,234	3,287	a 61,629	p<0,05 *
	p16 (I)	1,618	0,835	a 3,138	p>0,05 ^{ns}
	Ki-67 (%)	0,969	1,001	a 0,937	p>0,05 ^{ns}
	Ki-67 (Dt)	0,838	2,702	a 0,260	p>0,05 ^{ns}
	Ki-67 (I)	0,000	---	---	p>0,05 ^{ns}
Língua	p16 (%)	2,000	0,291	a 13,725	p>0,05 ^{ns}
	p16 (Dt)	5,130	1,153	a 22,827	p<0,05 *
	p16 (I)	2,095	0,814	a 5,394	p>0,05 ^{ns}
	Ki-67 (%)	1,002	0,958	a 1,048	p>0,05 ^{ns}
	Ki-67 (Dt)	2,000	---	---	p>0,05 ^{ns}
	Ki-67 (I)	2,646	0,466	a 15,009	p>0,05 ^{ns}

% = porcentagem; Dt = distribuição; I = intensidade.

* significativo.

^{ns} não significativo.

Tabela 5.5 Risco relativo entre pacientes assintomáticos e sintomáticos para as avaliações da p16 e Ki-67 com relação à característica clínica da lesão

Característica Clínica	Ensaio	Razão de possibilidades	Intervalo de confiança			p
Atrófico	p16 (%)	0,000	---	---		$p > 0,05$ ^{ns}
	p16 (Dt)	0,000	---	---		$p > 0,05$ ^{ns}
	p16 (I)	0,000	---	---		$p > 0,05$ ^{ns}
	Ki-67 (%)	0,945	---	---		$p > 0,05$ ^{ns}
	Ki-67 (Dt)	0,000	---	---		$p > 0,05$ ^{ns}
	Ki-67 (I)	0,000	---	---		$p > 0,05$ ^{ns}
Reticular	p16 (%)	0,500	7,078	a	0,035	$p > 0,05$ ^{ns}
	p16 (Dt)	2,757	0,449	a	16,912	$p > 0,05$ ^{ns}
	p16 (I)	1,852	0,585	a	5,860	$p > 0,05$ ^{ns}
	Ki-67 (%)	0,939	---	---		$p > 0,05$ ^{ns}
	Ki-67 (Dt)	1,000	---	---		$p > 0,05$ ^{ns}
	Ki-67 (I)	1,000	---	---		$p > 0,05$ ^{ns}

% = porcentagem; Dt = distribuição; I = intensidade.

^{ns} não significativo.

Gráfico 5.1 Risco relativo da distribuição da p16 pela camada epitelial entre pacientes assintomáticos e sintomáticos

Eixo Vertical:

0 = paciente assintomático

1 = paciente sintomático

Eixo Horizontal:

0 = negativo

1 = terço inferior

2 = terço inferior e médio

3 = 2/3 a espessura completa

6 DISCUSSÃO

Avanços recentes na área da biologia celular e molecular têm elucidado mecanismos do sistema de controle do ciclo celular, demonstrando que a desregulação em algumas de suas vias são fatos comuns encontrados em tumores de várias partes do organismo. Desta forma, nos últimos anos, diversos marcadores moleculares vêm sendo descobertos e empregados na tentativa de avaliar melhor o diagnóstico e prognóstico desses pacientes.

A literatura tem relatado anormalidades genéticas ocorrendo no cromossomo 9p21, que codifica, entre outras, a proteína p16, demonstrando o papel e o significado desta proteína na regulação do ciclo celular. Ela vem sendo testada em lesões pré-malignas e malignas, na tentativa de marcar anormalidades celulares que possam esclarecer o processo de transformação maligna dessas lesões. Este estudo aplicou a p16 em lesões de LPB, procurando observar se os resultados imuno-histoquímicos, correlacionados com os dados clínicos e histológicos, possam aumentar nosso entendimento sobre a possibilidade de transformação maligna do LPB. Foi usada a técnica de imuno-histoquímica que tem se mostrado efetiva na detecção da expressão da p16.

Nas células normais, a função bioquímica da p16 é regular a fosforilação da pRb e conseqüentemente a progressão do ciclo celular pelo “ponto de checagem” G1/S (ROCCO; SIDRANSKY, 2001) sendo um dos responsáveis pela manutenção e parada do ciclo celular (PANDE et al., 1998). Muitos estudos demonstram alta expressão dessa proteína em tecido normal, a qual vai diminuindo conforme aumenta o grau de displasia epitelial até o quadro de carcinoma epidermóide

invasivo, o que caracterizaria a sua inativação como um fator importante no processo de carcinogênese (PANDE et al., 1998; MORTIER et al., 2002; SHINTANI et al., 2002). Se observarmos os resultados de diversos estudos, tanto na área de cabeça e pescoço, como em outros órgãos, vamos obter um leque de resultados, revelando um complexo panorama para este marcador (CHEN et al, 1999; SAITO et al, 1999; KRESTY et al, 2002).

Papadimitrakopoulou et al. (1997) já demonstraram expressão negativa para p16 em maior quantidade no grupo de lesões bucais com displasias epiteliais, comparadas com o grupo sem alteração celular, o que indicaria que a proteína diminui a sua expressão conforme aumenta o grau da displasia.

Mortier et al. (2002), ao determinarem que as lesões de queilite actínica sejam relativamente livres de alterações no cromossomo 9p21, ao contrário dos casos de carcinoma epidermóide bucal, mostraram dados que indicaram que a progressão da lesão pré-neoplásica para neoplasia requer inativação da p16. As áreas altamente displásicas dentro da lesão de queilite actínica negativas para p16 poderiam indicar a presença de transformação precoce dessas células, o que contribuiria para o desenvolvimento de carcinoma epidermóide. Sendo assim, o estudo da p16 estaria indicado para verificar o grau de inativação desta proteína e estabelecimento do protocolo de tratamento, pois lesões com diferentes expressões podem ter comportamento clínico distintos.

Entre os resultados obtidos por Pande et al. (1998), observou-se também que dois casos de mucosa normal adjacente ao local das lesões bucais analisadas foram negativos para p16, enquanto as demais mucosas normais, contra-laterais a lesão ou de indivíduos sadios, apresentaram expressão positiva. Esse resultado indicaria a presença de uma alteração celular, porém, sem tradução clínica e histopatológica

ainda. Correlação significativa entre marcação negativa com aumento da severidade do tumor (T_3 e T_4) também foi determinada, o que foi mais tarde confirmado no estudo de Wing Yuen et al. (2002) que observaram subexpressão da proteína p16 contribuindo para um carcinoma de comportamento mais proliferativo.

Chen et al. (1999) obtiveram resultado inverso. Observaram superexpressão da p16 nos casos de carcinomas avaliados. A alta proporção de células tumorais positivas para p16 foi associada com estadio e grau avançado do tumor, além de pior prognóstico nas pacientes com câncer ovariano.

Outros estudos demonstraram aumento da expressão da p16 em células tumorais, sendo baixa, ou mesmo ausente, a sua expressão no tecido normal e nas displasias leves (NG et al, 2002; BIBBO et al, 2002; SAQUI et al, 2002).

No presente estudo, fizemos a divisão dos pacientes de acordo com as queixas clínicas iniciais, em assintomáticos e sintomáticos. Não foi possível realizar divisão por característica clínica ou localização, visto que muitos pacientes apresentavam mais de um local envolvido; cinco pacientes apresentavam mais de uma forma clínica da doença, distribuída em diferentes locais da cavidade bucal. Dois pacientes assintomáticos apresentavam lesões atróficas, que usualmente são classificadas como sintomáticos na literatura. Três pacientes sintomáticos tinham a forma reticular e um, a forma em placa, geralmente classificada como assintomáticos.

Como nem sempre foi possível verificar o local exato da origem do fragmento da biópsia que estudamos, nos casos em que a doença acometia vários locais na cavidade bucal, não foi realizado a correlação de cada um dos dados obtidos da p16 com características específicas da lesão para cada paciente. Definimos, para tanto, que seria realizado estudo considerando os resultados de uma forma global,

correlacionando com as localizações mais comuns, de forma generalizada, entre os pacientes assintomáticos e sintomáticos. A análise estatística comparou o cálculo do risco relativo entre esses dois grupos e pacientes com os vários resultados imuno-histoquímicos obtidos.

A distribuição da p16 foi dividida em terço inferior, terço inferior e médio e 2/3 a espessura completa. Os resultados estatísticos indicaram que o risco relativo para a distribuição da p16 quando passamos do grupo de pacientes assintomáticos para o grupo dos sintomáticos é significativo quando correlacionamos os resultados imuno-histoquímicos com o local da expressão celular e com a localização clínica da lesão.

Quando analisamos somente a distribuição, podemos verificar, pelo Gráfico 5.1, que nos pacientes assintomáticos a expressão foi negativa ou só ocorreu expressão da p16 no terço inferior. Para os pacientes sintomáticos, essa distribuição ocorreu em todas as camadas. Isso significa que quando passamos a ter um paciente sintomático, o risco dele apresentar expressão positiva da p16 em camadas mais altas no epitélio é significativo.

Com relação ao local da expressão celular, todas as marcações, (nuclear, citoplasmática ou total), foram estatisticamente significativas. As marcações nuclear e total produziram um risco relativo do grupo de pacientes assintomáticos para os sintomáticos de forma muito próxima, tendo razão de possibilidades de 4,091 e 5,179, respectivamente. A chance de ocorrer marcação citoplasmática foi praticamente o dobro da marcação nuclear, resultando numa razão de possibilidades de 8,461.

O resultado acima indica que a marcação citoplasmática é um sítio importante e expressivo, resultado semelhante ao estudo de Klaes et al. (2001) que observaram

expressão predominantemente citoplasmática, não devendo ser desprezado, como sugerido por alguns estudos que consideram a marcação nuclear como único resultado positivo para p16. Os nossos resultados estão de acordo com as normas do fabricante do anticorpo empregado neste estudo, que orienta que ambas as marcações sejam consideradas como resultados positivos para p16.

Correlacionando a distribuição com a localização da lesão, observamos que na língua, o risco relativo dessa distribuição entre o paciente assintomático e o sintomático resultou numa razão de possibilidades de 5,130. Resultado inesperado foi com relação à mucosa jugal, onde a razão de possibilidades foi de 14,234, uma possibilidade quase 2,8 vezes maior que na língua. Esse último resultado foi surpreendente, visto que a localização apontada como de maior envolvimento nos casos de transformação maligna é a língua. Além disso, a mucosa jugal é o local mais comumente envolvido nas lesões de LPB.

Os demais itens avaliados de porcentagem e intensidade da p16, além da correlação com as características clínicas, não foram estatisticamente significativas, embora a literatura relate que as lesões erosivas, ulceradas e atróficas são os tipos com maiores chances de sofrerem transformação maligna.

Os resultados do Ki-67 não foram estatisticamente significativos em nenhum item avaliado.

O fato da distribuição da marcação da p16 pela camada epitelial ser estatisticamente significativa, em relação ao local da expressão celular e a localização da lesão, é particularmente expressivo ao observarmos que o estudo imuno-histoquímico da p16 vem sendo indicado para análise das displasias da cérvix uterina, e, por consequência, das displasias epiteliais (KLAES et al., 2001; KALOF et al., 2005).

No estudo de Klaes et al. (2001), 28 dos 47 (60%) NIC I exibiram expressão difusa e forte das células displásicas dentro do terço inferior do respectivo epitélio. Nos 2/3 superiores, a p16 estava geralmente ausente ou, quando presente, de forma fraca. Em 10 dos 47 (21%) NIC I foi observada marcação focal. Expressão esporádica ou negativa foi vista em nove de 47 (19%). Todos os 92 casos de displasias de alto grau (32 NIC II e 60 NIC III) demonstraram marcação difusa e intensa para p16 nas células epiteliais displásicas. Células epiteliais diferenciadas na camada superficial do NIC demonstraram expressão reduzida da p16, enquanto todas as camadas epiteliais dos casos de NIC III marcaram fortemente pela p16.

Correlacionando os resultados acima com a presença de HPV de alto ou baixo risco, Klaes et al. (2001) obtiveram correlação significativa de HPV de alto risco com expressão difusa e intensa da p16. Isso significa que, quanto maior o grau da displasia, temos envolvimento das camadas epiteliais mais altas pelas alterações celulares e, portanto, maior distribuição da expressão da p16 pelas camadas epiteliais. Transferindo estes resultados para o carcinoma cervical, sabemos que essa neoplasia é resultado de infecção por HPV de alto risco, e que, conforme aumenta o grau da displasia, o vírus vai se disseminando pelas camadas epiteliais, desde a camada basal até a superficial, sendo esperado que, quanto maior o grau da displasia, maior envolvimento da altura da camada epitelial e, maior distribuição da marcação da p16 pela camada epitelial.

O fato de ocorrer carcinogênese e, portanto, proliferação celular, significa que a p16 está livre e não exercendo sua função de supressão tumoral. Então, deve ocorrer alta marcação conforme aumenta o grau de proliferação tumoral, o que foi uma conclusão do estudo de Chen et al. (1999), porém os autores não realizaram pesquisa para HPV.

O HPV tem sido implicado na patogênese de vários tipos de tumores malignos. Na mucosa bucal, o HPV também tem sido envolvido em diferentes tipos de doenças, embora o tecido bucal normal também possa apresentar presença de HPV. Estudos investigativos a respeito da participação do HPV, em especial os de alto risco, nas lesões de LPB fazem-se necessários para melhor estabelecimento se os resultados da expressão da p16 nestas lesões podem ser uma resposta anormal pela presença do E7 do HPV de alto risco.

O nosso grupo controle foi negativo para p16, indicando ausência de displasias e de efeito citopático viral por HPV de alto risco, sendo a positividade do Ki-67, indicador de atividade/proliferação celular.

A possibilidade de transformação maligna do LPB ainda é um tema bastante debatido na literatura. Se observarmos os resultados presentes na literatura, podemos concluir que entre 1% e 5% dos pacientes com LPB desenvolverão carcinoma epidermóide se forem observados ao longo dos anos.

Não se sabe, exatamente, se existe ou não qualquer predisposição. Ao invés disso, se existe um potencial pré-maligno verdadeiro no LPB, isto não tem sido adequadamente demonstrado.

Se as alterações displásicas incipientes na presença de características liquenóides não são reconhecidas ou são subestimadas, uma má interpretação diagnóstica pode acontecer. Além disso, alterações genéticas, que ainda não foram traduzidas clinicamente, ou mais de uma doença podem estar presentes concomitantemente no mesmo paciente (FATAHZADEH; RINAGGIO; CHIODO, 2004).

A existência de um marcador que possa indicar a existência de anormalidades celulares, contribuindo no prognóstico das lesões com riscos de

transformação maligna, seria de grande utilidade no estudo de diversas lesões, não somente nos casos de LP.

De acordo com Krutchkoff e Eisenberg (1985) a displasia epitelial com características liquenóides constitui-se numa entidade histopatológica distinta, esta sim, com verdadeira predisposição de sofrer transformação maligna. Dessa forma, análise futura da p16 nas displasias liquenóides comparando-as com o LPB também se fazem necessários. Em publicação de 1992, os mesmos autores ressaltam que muitos dos estudos publicados sobre transformação maligna em LP ocorreram em pacientes com história conhecida de exposição a substâncias reconhecidamente carcinógenas, como fumo e álcool, o que contribuiria para a manutenção da controvérsia a respeito do potencial de transformação maligna.

Para Fatahzadeh, Rinaggio e Chiodo (2004), embora alguns exemplos de transformação maligna do LPB tenham sido adequadamente demonstrados, o verdadeiro índice deste evento provavelmente é muito menor do que o estimado nos estudos de série.

Faz-se necessário que todo caso com suspeita de LP seja confirmado histologicamente. O acompanhamento minucioso e prolongado é especialmente importante se a lesão inicial for de LP atrófico ou erosivo e estiver localizado na língua. Lesões de LP tipo placa, homogênea, particularmente envolvendo dorso da língua, também devem ser avaliados com maior cuidado e critério.

Mesmo que, hipoteticamente, a malignização ocorra só em 0,4% a 0,5% dos casos de LPB, isso já significa uma chance 10 a 20 vezes maior de carcinoma epidermóide bucal que na população em geral (BARNARD et al., 1993), o que justificaria o seguimento cuidadoso dessa população.

O presente estudo obteve correlação significativa da distribuição da p16 pela camada epitelial com o local da expressão celular e com a localização clínica da lesão. Face ao exposto sobre a correlação da p16 como marcador de displasia epitelial e com o envolvimento do HPV, faz-se necessário a complementação deste estudo para incluir ou excluir o HPV nas lesões de LPB além de estudo comparativo com os casos de displasias liquenóides.

7 CONCLUSÕES

Os resultados desse estudo permitiram concluir que:

- 1) A distribuição da p16 pela camada epitelial foi estatisticamente significativa quando calculamos o risco relativo entre pacientes assintomáticos e sintomáticos de LPB com relação ao local da expressão celular e com a localização clínica da lesão;
- 2) Os demais itens analisado, porcentagem e intensidade da p16, correlação com a característica clínica de LPB e os resultados do Ki-67 não foram estatisticamente significativos;
- 3) Faz-se necessário estudo futuro para incluir ou excluir a presença do HPV nas lesões de LPB e estudo comparativo da p16 nos casos de displasias liquenóides.

REFERÊNCIAS¹

- Ai L, Stephenson KK, Ling W, Zuo C, Mukunyadzi P, Suen JY, et al. The p16 (CDKN2a/INK4a) tumor-suppressor gene in head and neck squamous cell carcinoma: a promoter methylation and protein expression study in 100 cases. *Mod Pathol* 2003;16(9):944-50.
- Alberts B, Bray D, Lewis J, Raff M, Roberts K, Watson JD. *Molecular Biology of the cell*. 3rd ed. New York: Garland Publishing Inc.; 1994. cap. 17, p.863-906.
- Barnard NA, Scully C, Eveson JW, Cunningham S, Porter SR. Oral cancer development in patients with oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 1993;22:421-4.
- Bibbo M, Klump WJ, DeCarcinoma epidermóideco J, Kovatich AJ. Procedure for immunocytochemical detection of p16^{INK4a} antigen in thin-layer, liquid-based specimens. *Acta Cytol* 2002;46(1):25-9.
- Chen QM, Luo G, Li BQ, Samaranayake LP. Expression of p16 and CDK4 in oral premalignant lesions and oral squamous cell carcinomas: a semi-quantitative immunohistochemical study. *J Oral Pathol Med* 1999;28:158-64.
- Cheung AN, Chiu PM, Tsun KL, Khoo US, Leung BS, Nigan HY. Chromosome in situ hybridisation, Ki-67 and telomerase immunocytochemistry in liquid based cervical cytology. *J Clin Pathol* 2004;57(7):721-7.
- Cotran RS, Kumar V, Robbins SL. *Pathologic basis of disease*. 5th ed. Philadelphia, Pennsylvania: W.B. Saunders Company; 1994. cap. 7, p.241-330.
- Eisenberg E, Krutchkoff DJ. Lichenoid lesions of oral mucosa. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1992;73:699-704.
- Fatahzadeh M, Rinaggio J, Chiodo T. Squamous cell carcinoma arising in an oral lichenoid lesion. *JADA* 2004;135(6):754-.
- Fregonesi PAG, Teresa DB, Duarte RA, Benatti Neto C, Oliveira MRB, Soares CP. p16^{INK4a} immunohistochemical overexpression in premalignant and malignant oral lesions infected with human papillomavirus. *J Histochem Cytochem* 2003;51:1291-7.
- Heichman KA, Roberts JM. Rules to replicate by. *Cell* 1994;79:557-60.
- Huber, MA. Oral lichen planus. *Quintessence Int* 2004;35:731-52.

¹ De acordo com Estilo Vancouver. Abreviatura de periódicos segundo base de dados MEDLINE.

Jontell M, Watts S, Wallström M, Levin L, Sloberg K. Human papillomavirus in erosive oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 1990;19:273-7.

Kalof AN, Evans MF, Simmons-Arnold L, Beatty BG, Cooper K. p16^{INK4a} immunoexpression and HPV in situ hybridization signal patterns: potential markers of high-grade cervical intraepithelial neoplasia. *Am J Surg Pathol* 2005;29(5):674-9.

Klaes R, Friedrich T, Spitkovsky D, Ridder R, Rudy W, Petry U, et al.. Overexpression of p16^{INK4a} as a specific marker for dysplastic and neoplastic epithelial cells of the cervix uteri. *Int J Cancer* 2001;92:276-84.

Kresty LA, Mallery SR, Knobloch TJ, Song H, Lloyd M, Casto BC, et al. Alterations of p16^{INK4a} and p14^{ARF} in patients with severe oral epithelial dysplasia. *Cancer Res* 2002;62:5295-300.

Krutchkoff DJ, Eisenberg E. Lichenoid dysplasia: a distinct histopathologic entity. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1985;60(3):308-15.

Krutchkoff DJ, Eisenberg E, Anderson C. Dysplasia of oral mucosa: a unified approach to proper evaluation. *Mod Pathol* 1991;4(11):113-9.

Matsumoto N, Fujii T, Ishikawa M, Saito M, Iwata T, Fukuchi T, et al. p16^{INK4a} overexpression and human papillomavirus infection in small cell carcinoma of the uterine cervix. *Human Pathol* 2003;34(8):778-783.

Mortier L, Marchetti P, Delaporte E, Martin de Lassale E, Thomas P, Piette F, et al. Progression of actinic keratosis to squamous cell carcinoma of the skin correlates with deletion of the 9p21 region encoding the p16^{INK4a} tumor suppressor. *Cancer* 2002;176:205-214.

Murphy N, Ring M, Killalea AG, Uhlmann V, O'Donovan M, Mulcahy F, et al. p16^{INK4a} as a marker for cervical dyskaryosis: CIN and cGIN in cervical biopsies and ThinPrep smears. *J Clin Pathol* 2003;56(1):56-63.

Navas IC, Algara P, Mateo M, Martinez P, Garcia C, Rodriguez JL, et al.. p16(INK4a) is selectively silenced in the tumoral progression of mycosis fungoides. *Lab Invest* 2002;82(2):123-32.

Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. *Patologia Oral & Maxilofacial*. 1ª ed. Trad. de Luiz Carlos Moreira. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998. cap.16, p.559-63.

Ng CS, Zhang J, Wan S, Lee TW, Arifi AA, Mok T, et al. Tumor p16 is a possible marker of advanced stage in non-small cell lung cancer. *J Surg Oncol* 2002;70(2):101-6.

Pande P, Mathur M, Shukla NK, Ralhan R. pRb and p16 protein alterations in human oral tumorigenesis. *Oral Oncol* 1998;34:396-403.

Papadimitrakopoulou V, Izzo J, Lippman SM, Lee JS, Fan YH, Clayman G, et al. Frequent inactivation of p16^{INK4a} in oral premalignant lesions. *Oncogene* 1997;14:1799-1803.

Pientong C, Ekalaksananan T, Swadpanich U, Kongyingyoes B, Kritpetcharat O, Yuenyao P, et al. Immunocytochemical detection of p16^{INK4a} protein in scraped cervical cells. *Acta cytol* 2003;47(4):616-23.

Reed AI, Califano J, Cairns P, Westra WH, Jones RM, Koch W, et al.. High frequency of p16(CDKN2/MTS1/INK4A) inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. *Cancer Res* 1996;56:3630-3

Regezzi JA, Sciubba JJ. Patologia Bucal. correlações clinicopatológicas. 1ª ed Trad. de José C. B. Teles, Sylvio Bevilacqua. Rio de Janeiro: Ed. Guanabara Koogan; 1991. cap.3, p. 71-6.

Rocco JW, Sidransky D. p16(MTS-1/CDKN2/INK4a) in cancer progression. *Exp Cell Res* 2001;264:42-55.

Saito T, Nakajima T, Mogi K. Immunohistochemical analysis of cell cycle-associated proteins p16, pRb, p53, p27 and Ki-67 in oral cancer and precancer with special reference to verrucous carcinomas. *J Oral Pathol Med* 1999;28:226-32.

Saqi A, Pasha TL, McGrath CM, Yu GH, Zhang P, Gupta P. Overexpression of p16^{INK4a} in liquid-based specimens (SurePath) as marker of cervical dysplasia and neoplasia. *Diagn Cytopathol* 2002;27(6):365-70.

Scully C, Beyli M, Ferreiro MC, Ficarra G, Gill Y, Griffiths M, et al.. Update on oral lichen planus: etiopathogenesis and management. *Crit Rev Oral Biol Med* 1998;9(1):86-122.

Shahnavaz SA, Bradley G, Regezi JA, Thakker N, Gao L, Hogg D, et al. Patterns of CDKN2A gene loss in sequential oral epithelial dysplasias and carcinomas. *Cancer Res* 2001;61:2371-5.

Shintani S, Mihara M, Nakahara Y, Kiyota A, Ueyama Y, Matsumura T, et al. Expression of cell cycle control proteins in normal epithelium, premalignant and malignant lesions of oral cavity. *Oral Oncol* 2002;38:235-43.

Tsai CH, Yang CC, Chou LSS, Chou MY. The correlation between alteration of p16 gene and clinical status in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2001;30:527-31.

Turatti E, Martins MT, Araújo VC. Avaliação da expressão das citoqueratinas no líquen plano e na displasia líquenóide. *RPG Rev Pós Grad* 2005;12(1):118-24.

van der Meij EH, Schepman KP, van der Waal I. The possible premalignant character of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: a prospective study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003;96:264-71.

Vicente JC, Herrero-Zapatero A, Fresno MF, López-Arranz JS. Expression of cyclin D1 and Ki-67 in squamous cell carcinoma of the oral cavity: clinicopathological and prognostic significance. *Oral Oncol* 2002;38:301-8.

Volgareva G, Zavalishina L, Andreeva Y, Frank G, Krutikova E, Golovina D, et al. Protein p16 as a marker of dysplastic and neoplastic alterations in cervical epithelial cells. *BMC Cancer* 2004;4:58-70.

von Knebel Doeberitz M. New markers for cervical dysplasia to visualise the genomic chaos created by aberrant oncogenic papillomavirus infections. *Eur J Cancer* 2002;38:2229-42.

Wing Yuen P, Man M, Yin Lam K, Lam Kwong Y. Clinicopathological significance of p16 gene expression in the surgical treatment of head and neck squamous cell carcinomas. *J Clin Pathol* 2002;55(1):58-60.

Zhang L, Michelsen C, Cheng X, Zeng T, Priddy R, Rosin MP. Molecular analysis of oral lichen planus. *Am J Oral Pathol* 1997;151:323-7.

Zheng L, Lee WH. The retinoblastoma gene: a prototypic and multifunctional tumor suppressor. *Exp Cell Res* 2001;264:2-18.

ANEXO A

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

PARECER DE APROVAÇÃO
Protocolo 237/04

O Grupo de Trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa, **APROVOU** o protocolo de pesquisa "*Estudo da imunomarcagem do p16^{INK4a} nas lesões de líquen plano bucal*", de responsabilidade da Pesquisadora **Fábia Hiromi Hayama**, sob orientação do Professor Doutor **Jayro Guimarães Júnior**.

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados a este Comitê relatórios anuais referentes ao andamento da pesquisa e ao término cópia do trabalho em "cd". Qualquer emenda do projeto original deve ser apresentada a este CEP para apreciação, de forma clara e sucinta, identificando a parte do protocolo a ser modificada e suas justificativas.

São Paulo, 13 de dezembro de 2004

Profª Drª **ROSA HELENA MIRANDA GRANDE**
Coordenadora do CEP-FOUSP

ANEXO B

Proposta de critérios diagnósticos modificados da OMS para LPB e LLB

Critério clínico *

Presença de lesão bilateral, geralmente simétrica

Presença de finas estrias esbranquiçadas (padrão reticular)

Lesão erosiva, atrófica, bolhosa e em placa (aceito como um subtipo somente na presença de lesões reticulares em qualquer outro local da mucosa bucal)

Critério histopatológico #

Presença de uma zona bem definida de infiltrado celular, principalmente de linfócitos, em faixa, confinado ao córion superficial

Sinais de “degeneração hidrópica” na camada de células basais

Ausência de displasia epitelial

Diagnóstico final de LPB e LLB

Para atingir o diagnóstico final, devem-se incluir os critérios clínico e histopatológico

O diagnóstico de LPB requer o preenchimento de ambos os critérios.

O termo LLB deve ser usado somente sob as seguintes condições:

1. Clínico: LPB típico; Histopatológico: somente compatível com LPB
 2. Clínico: somente compatível com LPB; Histopatológico: LPB típico
 3. Clínico e Histopatológico: somente compatível com LPB
-

OMS: Organização Mundial da Saúde.

LPB: Líquen plano bucal.

LLB: Lesão liquenóide bucal.

* Em todas as outras lesões que lembrem LPB mas que não completam os critérios acima mencionados, o termo “compatível clinicamente” deve ser usado.

Quando as características histopatológicas são menos evidentes, o termo “compatível histopatologicamente” deve ser usado.

ANEXO C - LPB - HE(40X)

ANEXO D - LPB - HE (400X)
Degeneração hidrópica na camada basal

ANEXO E - HFI - HE (100X)

ANEXO F - HFI - HE (400X)

ANEXO G - p16 controle positivo (400X)

ANEXO H - Ki-67 controle positivo (100X)

ANEXO I - HFI - p16 negativo(100X)

ANEXO J - HFI - Ki-67 positivo (100X)

ANEXO L - LPB - p16 positivo – (100X)

ANEXO M - LPB - p16 positivo – (400X)

ANEXO N - LPB - p16 positivo - (100X)

ANEXO O - LPB - p16 positivo - (400X)

ANEXO P - LPB - p16 positivo (100X)

ANEXO Q - LPB – Ki-67 positivo (100X)

ANEXO R - LPB – Ki-67 positivo (400X)

ANEXO S - LPB – Ki-67 positivo (100X)

ANEXO T - LPB – Ki-67 positivo (400X)