UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA DE BAURU

FERNANDA MOMBRINI PIGATTI

**Expressão imuno-histoquímica de Bcl-2, Ki-67 e caspase-3 ativa em
líquen plano oral e leucoplasia com diferentes graus de displasia**

BAURU
2011

FERNANDA MOMBRINI PIGATTI

**Expressão imuno-histoquímica de Bcl-2, Ki-67 e caspase-3 ativa em líquen plano oral
e leucoplasia com diferentes graus de displasia**

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia de Bauru para obtenção do título de mestre em Ciências Odontológicas Aplicadas.

Área de concentração: Patologia Bucal

Orientador: Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira

Versão Corrigida

BAURU
2011

Pigatti, Fernanda Mombrini

P622e Expressão imuno-histoquímica de Bcl-2, Ki-67 e caspase-3 ativa em líquen plano oral e leucoplasia com diferentes graus de displasia/Fernanda Mombrini Pigatti – Bauru, 2011.

119 p. : il. ; 31cm.

Dissertação (Mestrado) – Faculdade de Odontologia de Bauru. Universidade de São Paulo

Nota: A versão original desta dissertação encontra-se disponível no Serviço de Biblioteca e Documentação da Faculdade de Odontologia de Bauru - FOB/USP.

Autorizo, exclusivamente para fins acadêmicos e científicos, a reprodução total ou parcial desta dissertação, por processos fotocopiadores e outros meios eletrônicos.

Assinatura:

Comitê de Ética da FOB-USP

Protocolo nº: 047/2011

FOLHA DE APROVAÇÃO

DADOS CURRICULARES

Fernanda Mombrini Pigatti

Nascimento

07 de outubro de 1985

Vitória – ES

Filiação

José Carlos Pigatti

Altêmia Maria Mombrini

2004 – 2008

Curso de Graduação em Odontologia
pela Universidade Federal de Alfenas
– Unifal/MG

2009 – 2011

Mestrado em Ciências Odontológicas
Aplicadas, área de concentração
Patologia Bucal, na Faculdade de
Odontologia de Bauru da
Universidade de São Paulo –
FOB/USP

DEDICATÓRIA

Aos meus pais, **Altêmia** e **José Carlos**, aos meus irmãos, **Juliana** e **Gabriel**, ao meu namorado, **Anderson**, a todos meus familiares e amigos, que, por diversas maneiras, me incentivaram e contribuíram para que a realização deste trabalho fosse possível.

“O essencial é invisível aos olhos.”

Antonie de Saint-Exupéry

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por me conceder a oportunidade de crescimento pessoal e profissional, sobretudo por nunca ter me desamparado nos momentos difíceis e por permitir que eu chegasse até aqui.

Aos meus pais, **Altêmia** e **José Carlos**, meus primeiros mestres, pelo exemplo de dedicação e ao constante incentivo às minhas atividades acadêmicas. Agradeço por estarem presentes em todos os momentos de minha vida, me apoiando e me dando suporte, compreendendo a necessidade da minha ausência para a realização deste trabalho. Sem vocês eu não chegaria até aqui!

Aos meus irmãos, **Juliana** e **Gabriel**, por serem meus grandes companheiros e amigos, sempre me dando confiança e coragem para seguir em frente. Obrigada pelo carinho e por compartilharem comigo esse e tantos outros momentos importantes na minha formação pessoal e profissional. A participação de vocês foi fundamental.

Ao meu grande amor, **Anderson**, pelo amor, paciência, compreensão e apoio durante esse período em que, muitas vezes, abdiquei da nossa convivência para concluir este trabalho. Agradeço todo estímulo, ensinamentos, conversas, amparos, carinho e por tudo de bom que você traz à minha vida. Amo você!

Aos meus sobrinhos, **Pedro** e **João**, meus amores, pelo carinho e alegria que me proporcionam, recarregando minhas energias. Vocês são o máximo!

Aos meus avós, **Nelsa** e **Raphael**, e ao meu padrinho, **Tio Bazinho**, pelas orações e pelo incentivo à minha carreira profissional. O carinho de vocês foi muito importante.

Aos meus **tios, tias, primos, primas, cunhados** e à **Lili** pela amizade e carinho mesmo à distância. Tenho certeza que sempre poderei contar com vocês, em qualquer situação!

À minha sogra, **Nilda**, por me receber de braços abertos, com tanta solicitude, e por torcer por essa conquista. Sou muito grata a você!

À minha grande amiga, **Carol Mussi**, pela cumplicidade, amizade e carinho. Quis o destino que nosso caminho se cruzasse pela segunda vez. Foi muito importante tê-la ao meu lado nesses últimos dois anos, compartilhando cada descoberta, desafio e conquista. Obrigada pelas inúmeras risadas e por tornar a estada em Bauru mais amena, ao seu lado as horas de estudo e os dias de exaustão foram mais felizes. Nunca me esquecerei dos momentos vividos!

Ao meu orientador, **Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira**, por confiar e acreditar em meu potencial. Agradeço pela liberdade concedida, pela paciência e por dividir comigo as expectativas deste trabalho, orientando-me de maneira brilhante. Admiro-o pelo caráter, seriedade e respeito aos alunos.

Ao **Prof. Dr. Cléverson Teixeira Soares**, médico patologista, pelo estímulo, contribuições e sugestões. Esforço-me a cada dia para seguir seu exemplo de dedicação ao trabalho e generosidade com as pessoas, sempre. Minha gratidão pela seriedade com que atua em todos os momentos.

À **Prof^a. Dr^a. Vanessa Soares Lara** minha eterna gratidão por toda a cooperação ao permitir a investigação microscópica deste trabalho dividindo seu espaço e por todo carinho com o qual sempre me recebeu.

À **Prof^a. Dr^a. Denise Tostes Oliveira** pelo auxílio e orientações durante o curso, contribuindo para meu crescimento acadêmico.

À amiga **Ana Regina** pelo auxílio na realização das fotomicrografias deste trabalho.

Às amigas **Carol Menezes, Carol Mussi e Eloisa** por toda ajuda na realização das análises estatísticas deste trabalho. Muito obrigada!

Aos professores da disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, **Prof. Dr. Alberto Consolaro, Prof^a. Dr^a. Denise Tostes Oliveira, Prof. Dr. Luís Antônio de Assis Taveira e Prof^a. Dr^a. Vanessa Soares Lara**, por dividirem ensinamentos e por toda atenção durante o curso de mestrado, contribuindo para meu desenvolvimento pessoal e profissional.

À **Cris**, secretária da disciplina de Patologia Bucal da FOB-USP, por toda alegria, bom-humor, competência e atenção com que sempre me recebeu e atendeu aos meus apelos, facilitando a realização deste trabalho.

À **Fatiminha**, técnica do laboratório de Patologia Bucal da FOB-USP, por todos os conselhos, ensinamentos e por todo apoio durante o curso.

Aos demais funcionários da FOB-USP, **Vera, Marilza, Carla e “Seu” Carlos**, pela simpatia e convívio diário.

Ao **Anderson**, funcionário do setor de compras da FOB-USP, por toda prestatividade e paciência aos meus inúmeros pedidos.

Ao **Instituto de Anatomia Patológica de Bauru (Anatomed)**, pelo suporte dos exames imuno-histoquímicos.

Aos técnicos de laboratório, **Éverson** e **Daniel**, por me acompanharem pacientemente durante a realização dos exames imuno-histoquímicos e por me receberem sempre de maneira educada e solícita.

Ao meu grande mestre, **Prof. Dr. João Adolfo Costa Hanemann**, por todo o incentivo à carreira acadêmica e por esclarecer tantas dúvidas, sua dedicação e amor à docência são fontes de inspiração. Admiro-o por sua competência e ética profissional.

Ao **Prof. Dr. Alessandro Antônio Costa Pereira**, por ajudar a trilhar esse caminho, despertando meu interesse pela pesquisa.

Ao **Prof. Dr. Heitor Marques Honório** e à **Prof^a. Dr^a. Daniela Rios**, pela amizade, simpatia e conhecimentos transmitidos.

Aos amigos, **Ana Regina**, **Adriana**, **Cristiane**, **Heliton** e **Karen**, pelo excelente convívio, repleto de carinho e alegria, mesmo nos momentos mais difíceis. A amizade de vocês foi imprescindível.

À **Priscila**, grande amiga, por ter compartilhado seus sonhos, assim pude te conhecer melhor. Obrigada pelo carinho, amizade e por simplesmente ter estado por perto. Agradeço a Deus por tê-la posto em meu caminho, você é muito especial!

À amiga, **Carol Menezes**, pelo carinho, amizade e por tantos bons momentos.

À **Elo**, que em pouco tempo se tornou uma grande amiga, por todas as experiências vivenciadas, pelas palavras positivas e pela admirável educação.

Às novas amigas, **Natália**, **Mariana** e **Nádia**, pelos momentos de alegria e descontração e por todo incentivo, me proporcionando a tranquilidade necessária ao término do curso.

Ao **Aroldo (*in memoriam*)**, por todo o carinho e atenção desde os tempos de monitoria durante a graduação.

À **Bruna Vilardi** e à **Taisa Vilardi**, pela oportunidade de conviver com vocês.

Aos demais colegas de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo: **Alexandre, Camila, Maria Carolina Goulart, Carine, Bruno, Diego Maurício, Elen, Érika, Kellen, Patrícia, Samira, Simone, Sylvie** e **Taiane**, pela partilha e ensinamentos da convivência em grupo.

Aos alunos da **XLVIII turma** da graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, pelo carinho e por permitirem o meu aprendizado, científico e humano, durante a realização do Programa de Aperfeiçoamento de Ensino (PAE).

À amiga de longa data, **Silvia Helena**, pelo carinho, apoio e igualmente pelas visitas à Bauru.

À amiga, **Renata Lilian**, por me fazer sorrir, pela companhia e por toda atenção e amabilidade.

Aos amigos de Alfenas, **Let's, Moi, Bel, Talita, Nadine, Tufo, Vinição, Lynus, Hermano, Fregnan, Aninha, Bruno, Fábio** e **Diogo**, por me apoiarem, mesmo à distância. Valeu Alfêneas!

À querida amiga, **Thassi**, exemplo de perseverança e conquistas, por me inspirar a seguir em frente e por toda a ajuda com os cálculos desse trabalho. Muito obrigada!

Às amigas de Vitória, **Paula, Pryscilla, Maíra, Luísa** e **Fabricia**, pela amizade de tantos anos e pela torcida, mesmo à distância. Vocês são muito especiais!

À **Elza, Karina, Lavínia e Mariana**, pelos dias compartilhados em Bauru e por toda alegria que vocês trouxeram à minha vida.

A **todos** que, mesmo indiretamente, contribuíram para essa importante conquista. Minha gratidão!

AGRADECIMENTOS INSTITUCIONAIS

À Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, na pessoa do **Prof. Dr. José Carlos Pereira**, diretor desta instituição.

À comissão de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, na pessoa do **Prof. Dr. Paulo César Rodrigues Conti**.

À **Prof^a. Dr^a. Denise Tostes Oliveira**, coordenadora do Programa de Pós-Graduação em Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo.

À **disciplina de Patologia Bucal** da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, pela cessão dos blocos de parafina.

Ao **Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico (CNPq)** pela bolsa de Mestrado concedida, processo número 134976/2009-6.

Aos **funcionários da Pós-Graduação** da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, por toda a eficácia.

Aos **funcionários da Biblioteca** da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo, por todos os esclarecimentos e eficiência.

“O que sabemos é uma gota; o que ignoramos é um oceano.”

Isaac Newton

Resumo

RESUMO

O líquen plano oral (LPO) é uma doença inflamatória crônica de causa desconhecida, e seu potencial de malignização é um tema bastante controverso. Diversos estudos têm sugerido que pacientes portadores de líquen plano apresentam um maior risco de desenvolver câncer. Contudo, muitos autores acreditam que não haja dados suficientes que provem uma associação entre líquen plano e câncer. Para esses autores, a maioria dos casos que sofreram transformação maligna é decorrente de falhas no diagnóstico inicial da lesão. Portanto, objetivou-se avaliar a expressão imuno-histoquímica das proteínas relacionadas à apoptose e proliferação celular, respectivamente caspase-3 ativa, Bcl-2 e Ki-67 no LPO e em displasias epiteliais na tentativa de explicar a polêmica em relação ao potencial de transformação maligna do LPO e enfatizar a importância de um acompanhamento de longo prazo dos pacientes com esta doença. Com esse propósito, foram selecionadas 14 amostras de LPO, 14 amostras de leucoplasia com displasia epitelial, além de 09 amostras de mucosa bucal normal como controle. A avaliação da expressão de caspase-3 ativa, Bcl-2 e Ki-67 foi conduzida de acordo com a técnica da imunoperoxidase. A contagem das células imunomarcadas nas amostras de LPO, de leucoplasia com displasia epitelial e de mucosa bucal normal resultou em número destas células por mm² nas diferentes regiões (camada basal, camada suprabasal e infiltrado inflamatório) para cada imunomarcador. A expressão de Bcl-2 em células epiteliais, da camada basal, ocorreu mais frequentemente no grupo da leucoplasia com displasia epitelial, com diferença estatística entre o grupo do LPO e o grupo controle. Verificou-se também, uma alta expressão da proteína Bcl-2 em células inflamatórias de lesões de LPO e de leucoplasia com displasia epitelial. A expressão do marcador Ki-67 foi superior em todos os níveis teciduais analisados nas lesões de LPO e de leucoplasia com displasia epitelial quando comparados com o grupo controle. Concluiu-se que a expressão mais elevada das proteínas Bcl-2 e Ki-67 nos casos de LPO e de leucoplasia com displasia epitelial, podem revelar a possibilidade da presença de alterações moleculares morfollogicamente imperceptíveis.

Palavras-chave: Líquen Plano. Imuno-histoquímica. Apoptose.

Abstract

ABSTRACT

Immunohistochemical expression of Bcl-2, Ki-67 and active caspase-3 in oral lichen planus and leukoplakia with different degrees of dysplasia

The oral lichen planus (OLP) is a chronic inflammatory disease of unknown cause, and its malignant potential is a very controversial issue. Several studies have suggested that patients with lichen planus have a higher risk of developing cancer. However, many authors believe that there is insufficient evidence to prove an association between lichen planus and cancer. For these authors, most of the cases that had undergone malignant transformation is due to flaws in the lesion initial diagnosis. Therefore, the aim was to evaluate the immunohistochemical expression of proteins related to apoptosis and cell proliferation, respectively active caspase-3, Bcl-2 and Ki-67 in epithelial dysplasia and LPO in an attempt to explain the controversy regarding the potential malignant transformation of OLP and emphasize the importance of a long-term monitoring of patients with this disease. For this purpose, we selected 14 samples of OLP, 14 samples of leukoplakia with epithelial dysplasia, and 09 samples of normal oral mucosa as controls. The evaluation of the expression of active caspase-3, Bcl-2 and Ki-67 was conducted in accordance with the immunoperoxidase technique. The immunostained cells counting in samples of OLP, epithelial dysplasia in leukoplakia and normal oral mucosa resulted in a number of these cells per mm² in the different regions (basal layer, suprabasal layer and inflammatory infiltrate) for each immunostained. The expression of Bcl-2 in epithelial cells, the basal layer, occurred more frequently in the group of leukoplakia with epithelial dysplasia, with statistical difference between the group of OLP and the control group. There was a high expression of Bcl-2 protein in inflammatory cells in OLP lesions and leukoplakia with epithelial dysplasia. The expression of the marker Ki-67 was superior in all analyzed tissue levels in OLP lesions and leukoplakia with epithelial dysplasia when compared to the control group. It was concluded that the highest expression of Bcl-2 protein and Ki-67 in cases of OLP and leukoplakia with epithelial dysplasia, can reveal the possible presence of molecular changes morphologically imperceptible.

Keywords: Lichen Planus. Immunohistochemistry. Apoptosis.

LISTA DE FIGURAS

- Figura 1 - Expressão de Bcl-2 nas células inflamatórias do líquen plano oral (**A**). Em **B** observar o detalhe da imunomarcção da proteína Bcl-2 no infiltrado inflamatório. Imuno-histoquímica anti-Bcl-2. **A** e **B** (40X).....65
- Figura 2 - **A)** Expressão de Ki-67 nas células epiteliais e inflamatórias do líquen plano oral; **B)** Observar detalhe da imunomarcção nuclear. Imuno-histoquímica anti-Ki-67. **A** (10X) e **B** (40X).....67
- Figura 3 - Expressão nuclear e citoplasmática de Bcl-2 em lesão de leucoplasia com displasia epitelial (**A** e **B**). Imuno-histoquímica anti-Bcl-2. **A** (10X) e **B** (40X).....71
- Figura 4 - Expressão de Ki-67 em lesão de leucoplasia com displasia epitelial (**A**). Observar o detalhe da expressão nuclear da proteína Ki-67 (**B**). Imuno-histoquímica anti-Ki-67. **A** (10X) e **B** (40X).73
- Figura 5 - Baixa expressão da proteína Bcl-2 em fragmento de mucosa bucal normal (**A**). Observar a imunomarcção nuclear da proteína Ki-67 (**B**). Imuno-histoquímica anti-Bcl-2 **A** (40X) e anti-Ki-67 **B** (40X).77
- Figura 6 - Representação gráfica dos valores médios da porcentagem de células imunomarcadas/mm² ± desvio-padrão obtidos em lesões de líquen plano oral, a partir da expressão das proteínas Bcl-2 (**A**) e Ki-67 (**B**), em cada região tecidual analisada (camada basal, camada suprabasal e infiltrado inflamatório).....80
- Figura 7 - Representação gráfica dos valores médios da porcentagem de células imunomarcadas/mm² ± desvio-padrão obtidos em lesões de leucoplasia com displasia epitelial, a partir da expressão das proteínas Bcl-2 (**A**) e Ki-67 (**B**), em cada região tecidual analisada (camada basal, camada suprabasal e infiltrado inflamatório).81
- Figura 8 - Representação gráfica dos valores médios da porcentagem de células imunomarcadas/mm² ± desvio-padrão obtidos em fragmentos de mucosa bucal normal, a partir da expressão das proteínas Bcl-2 (**A**) e Ki-67 (**B**), em cada região tecidual analisada (camada basal, camada suprabasal e infiltrado inflamatório).....82
-
-

LISTA DE TABELAS

Tabela 1 - Distribuição da frequência dos pacientes acometidos por líquen plano oral, segundo as características demográficas e história clínica.	58
Tabela 2 - Distribuição da frequência dos pacientes acometidos por líquen plano oral, segundo as variáveis clínicas.	58
Tabela 3 - Distribuição da frequência dos pacientes acometidos por leucoplasia, segundo as características demográficas e história clínica.	60
Tabela 4 - Distribuição da frequência dos pacientes acometidos por leucoplasia, segundo as variáveis clínicas.	60
Tabela 5 - Expressão da proteína Bcl-2 em lesões de líquen plano oral.	62
Tabela 6 - Expressão da proteína Ki-67 em lesões de líquen plano oral.	63
Tabela 7 - Expressão da proteína Bcl-2 em lesões de leucoplasia com displasia epitelial.	70
Tabela 8 - Expressão da proteína Ki-67 em lesões de leucoplasia com displasia epitelial.	70
Tabela 9 - Expressão da proteína Bcl-2 em fragmentos de mucosa bucal normal.	76
Tabela 10 - Expressão da proteína Ki-67 em fragmentos de mucosa bucal normal.	76
Tabela 11 - Comparação entre a porcentagem ($\pm$ dp) de células imunomarcadas/mm ² entre as lesões de líquen plano oral, lesões de leucoplasia com displasia epitelial e fragmentos de mucosa bucal normal, pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis, para cada região tecidual analisada (camada basal, camada suprabasal e infiltrado inflamatório), a partir da expressão da proteína Bcl-2.	83
Tabela 12 - Comparação entre a porcentagem ($\pm$ dp) de células imunomarcadas/mm ² entre as lesões de líquen plano oral, lesões de leucoplasia com displasia epitelial e fragmentos de mucosa bucal normal, pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis, para cada região tecidual analisada (camada basal, camada suprabasal e infiltrado inflamatório), a partir da expressão da proteína Ki-67.	83

LISTA DE ABREVIATURAS, SIGLAS E SÍMBOLOS

%	Porcentagem
°C	Graus Celsius
<	Menor
>	Maior
nº	Número
µm	Micrometro
Anti-Bcl-2	Anticorpo contra a proteína Bcl-2
Anti-caspase-3	Anticorpo contra a proteína caspase-3
Bak	<i>Bcl-2 homologous antagonist/killer</i> (Proteína killer/antagonista homóloga a Bcl-2)
Bax	<i>Bcl-2 associated x protein</i> (Proteína x associada à Bcl-2)
Bcl-2	<i>B-cell lymphoma/leukemia 2</i> (Célula-B de linfoma/leucemia 2)
Bcl-x	<i>Bcl-2 homologous x</i> (Proteína x homóloga a Bcl-2)
CB	Camada Basal
CEP	Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos
CSP	Camada Suprabasal
DAB	<i>3'3 Diaminobenzidine Tetrahydrochloride</i> (3'3 Diaminobenzina Tetrahidroclorido)
DNA	<i>Deoxyribonucleic acid</i> (Ácido desoxirribonucleico)
dp	Desvio-padrão
G ₀	Fase G ₀ do ciclo celular
G ₁	Fase G ₁ do ciclo celular
G ₂	Fase G ₂ do ciclo celular
FOB	Faculdade de Odontologia de Bauru
HE	Hematoxilina e Eosina
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
I	Infiltrado Inflamatório
Ki-67	<i>Kiel 67</i>
LCD	Leucoplasia com Displasia
LPO	Líquen Plano Oral
MBN	Mucosa Bucal Normal
MIB-1	Antígeno Ki-67
mL	Mililitro
mm	Milímetro
mm ²	Milímetro quadrado
mM	Milimolar
p	Nível de significância
PBS	<i>Phosphate Buffered Saline</i> (Solução salina fosfatada tamponada)
pH	Potencial hidrogeniônico
OMS	Organização Mundial da Saúde
S	Fase S do ciclo celular
TNF	<i>Tumor Necrosis Factor</i> (Fator de Necrose Tumoral)
USP	Universidade de São Paulo

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	19
2	REVISÃO DE LITERATURA.....	25
2.1	LÍQUEN PLANO ORAL	27
2.2	LEUCOPLASIA	30
2.3	APOPTOSE	31
2.3.1	BCL-2	35
2.3.2	CASPASE-3.....	36
2.4	PROLIFERAÇÃO CELULAR E KI-67	38
3	PROPOSIÇÃO	41
4	CASUÍSTICA E MÉTODOS	45
4.1	SELEÇÃO DAS AMOSTRAS	47
4.2	REGISTRO DE DADOS CLÍNICOS	48
4.3	ANÁLISE MICROSCÓPICA.....	48
4.4	TÉCNICA IMUNO-HISTOQUÍMICA.....	50
4.5	AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA	53
4.6	ANÁLISE ESTAÍSTICA.....	54
4.7	AQUISIÇÃO DAS FOTOMICROGRAFIAS	54
4.8	COMITÉ DE ÉTICA	54
5	RESULTADOS	55
5.1	CARACTERIZAÇÃO DA POPULAÇÃO DE ESTUDO.....	57
5.1.1	LÍQUEN PLANO ORAL	57
5.1.2	LEUCOPLASIA.....	59
5.2	AVALIAÇÃO IMUNO-HISTOQUÍMICA	61
5.2.1	LÍQUEN PLANO ORAL	61
5.2.2	LEUCOPLASIA.....	69
5.2.3	MUCOSA BUCAL NORMAL.....	75
5.3	ANÁLISE COMPARATIVA DA EXPRESSÃO DOS IMUNOMARCADORES	79
6	DISCUSSÃO	85
6.1	CONCEPÇÃO DO TRABALHO	87
6.2	AMOSTRA.....	88
6.3	DADOS EPIDEMIOLÓGICOS	89
6.4	METODOLOGIA	89
6.5	IMUNOMARCADORES RELACIONADOS À APOPTOSE E PROLIFERAÇÃO CELULAR	92
6.5.1	BCL-2	92
6.5.2	KI-67	94
6.6	PERSPECTIVAS	96
7	CONCLUSÕES	99
	REFERÊNCIAS	103
	ANEXO	117

1 Introdução

1 INTRODUÇÃO

O líquen plano oral (LPO) é uma doença mucocutânea inflamatória crônica de causa desconhecida, que se apresenta de diferentes formas clínicas sendo reconhecido essencialmente dois tipos, o reticular e o erosivo (NEVILLE et al., 2004; EISEN et al., 2005; BRANT et al., 2008; SOUSA et al., 2008).

Embora sua patogênese não seja esclarecida, muitos estudos sugerem que o LPO trata-se de um distúrbio imunológico persistente, onde os queratinócitos basais da mucosa bucal são, provavelmente, atacados por linfócitos T (NEPPELBERG et al., 2001; BASCONES et al., 2005).

A célula atacada desencadeia uma série de complexos mecanismos moleculares projetados para interromper o ciclo celular para reparo do DNA, levando a senescência celular, ou induzir a apoptose a fim de eliminar as células com DNA gravemente danificado (LI et al., 2004; BASCONES et al., 2005). Entretanto, alguns autores demonstraram que células epiteliais do LPO frequentemente respondem a esse ataque com um aumento nas taxas de proliferação celular (TOBÓN-ARROYAVE et al., 2004). A ocorrência de mecanismos moleculares no epitélio afetado do LPO, os quais são capazes de interromper o ciclo celular, induzir apoptose e estimular a proliferação epitelial, é imprevisto e pouco compreendido (TANDA et al., 2000; HIROTA et al., 2002).

Desde 1910, quando o primeiro caso da doença foi descrito, diversos estudos têm sugerido que pacientes portadores de líquen plano apresentam um maior risco de desenvolver câncer (LODI et al., 2005; SOUSA et al., 2009). Contudo, muitos autores acreditam que não haja dados suficientes que provem uma associação entre líquen plano e câncer (SOUSA et al., 2009). Para esses autores, a maioria dos casos que sofreram transformação maligna é decorrente de falhas no diagnóstico inicial da lesão, que se baseia na presença de uma banda de infiltração de linfócitos T na interface epitélio-tecido conjuntivo (EISENBERG, 2000). Por outro lado, o potencial de algumas lesões de LPO para transformação maligna é atualmente reconhecido, embora sua etiologia e patogênese não sejam bem elucidadas (KÜFFER et al., 2002).

Algumas alterações celulares sugestivas de malignidade encontradas no LPO também podem ser encontradas na displasia epitelial, dificultando seu diagnóstico (VALENTE et al., 2001; LODI et al., 2005).

Segundo a classificação da Organização Mundial de Saúde (OMS), as leucoplasias são consideradas lesões clinicamente cancerizáveis da mucosa bucal (SOARES, 2005). Estas lesões apresentam a capacidade de se transformar em carcinomas de células escamosas, sobretudo quando apresentam alterações histopatológicas de displasia epitelial, portanto podem representar uma das etapas no processo da carcinogênese bucal (PINDBORG et al., 1997).

Lesões cancerizáveis resultam de um aumento do número de células como consequência de uma proliferação celular exacerbada e/ou diminuição dos níveis de morte celular (LIU et al., 2000).

A proliferação celular desempenha um papel importante em todas as etapas da carcinogênese, pois células submetidas a estímulos contínuos de proliferação são mais susceptíveis à persistência de lesões do DNA e aparecimento de novas mutações em células alteradas (SOARES, 2005).

Mudanças na capacidade proliferativa de lesões cancerizáveis bucais podem indicar, precocemente, risco de transformação maligna (SOARES, 2005). O aumento do índice de proliferação, apesar de não específico, pode ser um marcador prematuro do crescimento desordenado (LIU et al., 2000). Através da avaliação do Ki-67, um antígeno nuclear presente nas fases ativas do ciclo celular, que é realizada a análise imuno-histoquímica da proliferação celular (WEIDNER et al., 1994).

Recentemente a morte celular, sobretudo a apoptose, tem recebido maior atenção quanto ao estudo da carcinogênese a nível celular (LOWE et al., 2000).

O início do processo apoptótico é controlado por numerosos sinais intra e extracelulares, capazes de induzir à morte celular programada, envolvendo determinadas proteases chamadas de caspases, que são ativadas pela clivagem proteolítica em resposta a sinais que induzem a apoptose (STRASSER et al., 2000; IGNEY et al., 2002).

O processo de apoptose pode ser subdividido em uma fase de ativação, tornando as caspases ativas, e de execução, na qual tais enzimas atuam gerando a morte celular (THOMPSON, 1995; KROEMER et al., 1995). Considerando que a fase de iniciação depende do tipo de estímulo que resultará na apoptose, seja ele extrínseco ou intrínseco, as fases efetoras são comuns a todo processo apoptótico (KROEMER, 1997).

A família das proteínas relacionadas à Bcl-2 constitui uma das classes mais biologicamente relevantes da apoptose (KROEMER, 1997). Essa família é composta por mais de 20 proteínas, cuja função é regular a apoptose, sendo que as duas principais proteínas anti-apoptóticas são a Bcl-2 e Bcl-x. (KUMAR et al., 2005) Quando as células são expostas a estresse ou privadas de sinais vitais, elas perdem a expressividade de Bcl-2/Bcl-x na membrana mitocondrial que são substituídas por membros pró-apoptóticos da família (KUMAR et al., 2005).

A família das caspases pode ser dividida funcionalmente em dois grupos, dependendo da ordem que foram ativadas durante a apoptose (SALVESENET al., 1995). As caspases iniciadoras incluem a caspase-8 e a caspase-9 enquanto que várias caspases, incluindo a caspase-3 e a caspase-6, são efetoras (KUMAR et al., 2005).

Considerada como a mais prevalente nas células, a caspase-3 caracteriza-se como responsável pela maioria dos eventos apoptóticos, como por exemplo, a quebra de proteínas nucleares (ZIMMERMANN et al., 2001; OHASHI et al., 2006).

Dessa maneira, considerando-se a importância da apoptose e da proliferação celular no desenvolvimento das neoplasias, o presente estudo tem como objetivo verificar estes fenômenos pela marcação imuno-histoquímica da caspase-3 ativa, Bcl-2 e Ki-67 e correlacionar com o achados histopatológicos de lesões diagnosticadas como líquen plano oral e leucoplasia apresentado displasia epitelial, a fim de contribuir com estudos em relação ao potencial de transformação maligna do LPO e enfatizar a importância de um acompanhamento de longo prazo dos pacientes com esta doença.

Com esse propósito, foram selecionadas 14 amostras de LPO, 14 amostras de leucoplasia, sendo 08 casos com displasia epitelial moderada e 06 casos com displasia epitelial severa, além de 09 amostras de mucosa bucal normal, provenientes do arquivo do Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (FOB-USP). A avaliação da expressão de caspase-3 ativa, Bcl-2 e Ki-67 foi conduzida de acordo com a técnica da imunoperoxidase.

2 Revisão de Literatura

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Líquen plano oral

O líquen plano oral (LPO) é uma doença mucocutânea inflamatória crônica de causa desconhecida, raramente observada em indivíduos jovens acometendo principalmente mulheres entre a quinta e sexta décadas de vida (NEVILLE et al., 2004; EISEN et al., 2005; BRANT et al., 2008; SOUSA et al., 2008).

Clinicamente, o LPO possui características distintas e fáceis de serem identificadas, apresentando-se sob duas principais formas: reticular e erosiva (EDWARDS et al., 2002; EISEN et al., 2005). Outras formas de apresentação da doença não são raras e segundo Mollaoglu (2000), originalmente outras quatro formas do LPO foram descritas: papular, “em placa”, bolhosa e atrófica.

A forma reticular é mais frequente e se caracteriza por linhas entrelaçadas, conhecidas como estrias de *Wickham*, em geral circundadas por discreto halo eritematoso. No entanto, tais características podem ser menos evidentes em algumas regiões, como o dorso da língua, onde as lesões se apresentam como placas queratóticas. A forma reticular é normalmente assintomática e envolve a mucosa jugal posterior bilateralmente. Contudo, outras localizações podem estar envolvidas simultaneamente, como o dorso e a parte lateral da língua, a gengiva e o palato (MOLLAOGLU, 2000; EDWARDS et al., 2002; NEVILLE et al., 2004).

A forma erosiva, embora incida em menor proporção, é a mais significativa para o paciente, uma vez que as lesões são frequentemente sintomáticas, variando desde um pequeno desconforto até episódios de dor intensa. Clinicamente, o líquen plano erosivo se manifesta por áreas atróficas e eritematosas cercadas por finas estrias radiantes (EDWARDS et al., 2002; NEVILLE et al., 2004).

Os aspectos clínicos característicos do LPO são, muitas vezes, suficientes para o correto diagnóstico da doença. Todavia, o exame histopatológico é recomendado para confirmar o diagnóstico clínico e, principalmente, excluir a presença de atipias epiteliais (EISEN et al., 2005).

Os achados histopatológicos do LPO incluem liquefação da camada basal acompanhada por intenso infiltrado inflamatório disposto em banda, subjacente ao epitélio, composto principalmente de linfócitos T e histiócitos; presença de numerosos corpúsculos colóides eosinofílicos na interface epitélio-conjuntivo (corpos de *Civatte*); cristas epiteliais interpapilares ausentes, hiperplásicas ou, frequentemente, projetadas em “dentes de serra”; variações da espessura da camada espinhosa e graus variados de orto ou paraqueratose (EISENBERG, 2000; REGEZI et al., 2000; EDWARDS et al., 2002; NEVILLE et al., 2004).

Outras condições, entretanto, podem apresentar características histopatológicas semelhantes às encontradas no LPO, incluindo reações liquenóides, lúpus eritematoso, leucoplasia, eritroleucoplasia, leucoplasia verrucosa proliferativa, dentre outras (LODI et al., 2005).

Embora sua patogênese não seja esclarecida, muitos estudos sugerem que o LPO trata-se de um distúrbio imunológico persistente, onde os queratinócitos basais da mucosa bucal são, provavelmente, atacados por linfócitos T (NEPPELBERG et al., 2001; BASCONES et al., 2005).

A célula atacada desencadeia uma série de complexos mecanismos moleculares projetados para interromper o ciclo celular para reparo do DNA, levando a senescência celular, ou induzir a apoptose a fim de eliminar as células com DNA gravemente danificado (LI et al., 2004; BASCONES et al., 2005). Entretanto, alguns autores demonstraram que células epiteliais do LPO frequentemente respondem a esse ataque com um aumento nas taxas de proliferação celular (TOBÓN-ARROYAVE et al., 2004). A ocorrência de mecanismos moleculares no epitélio afetado do LPO, os quais são capazes de interromper o ciclo celular, induzir apoptose e estimular a proliferação epitelial, é imprevisível e pouco compreendido (TANDA et al., 2000; HIROTA et al., 2002).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera o LPO uma desordem potencialmente maligna e esses pacientes devem ser acompanhados periodicamente devido à possibilidade do risco de desenvolvimento de câncer bucal ser maior que na população geral (VAN DER WAAL, 2009).

Desde 1910, quando o primeiro caso da doença foi descrito, diversos estudos têm sugerido que pacientes portadores de líquen plano apresentam um maior risco de desenvolver câncer (LODI et al., 2005; SOUSA et al., 2009). Contudo, muitos autores acreditam que não haja dados suficientes que provem uma associação entre líquen plano e câncer (SOUSA et al., 2009). Para esses autores, a maioria dos casos que sofreram transformação maligna é decorrente de falhas no diagnóstico inicial da lesão, que se baseia na presença de uma banda de infiltração de linfócitos T na interface epitélio-tecido conjuntivo (EISENBERG, 2000). Por outro lado, o potencial de algumas lesões de LPO para transformação maligna é atualmente reconhecido, embora sua etiologia e patogênese não sejam bem elucidadas (KÜFFER et al., 2002).

Algumas alterações celulares sugestivas de malignidade encontradas no LPO também podem ser encontradas na displasia epitelial, dificultando seu diagnóstico (VALENTE et al., 2001; LODI et al., 2005). Ainda assim, não são poucos os estudos que destacam o potencial de malignização do líquen plano, sobretudo na mucosa bucal (EISEN, 2002; LANFRANCHI-TIZEIRA et al., 2003; GANDOLFO et al., 2004; XUE et al., 2005).

Entretanto, não se tem certeza dos mecanismos que levam a tal transformação. Para Mignogna et al. (2004), atualmente existem indícios que sugiram que processos crônicos, como o observado no LPO, propiciariam um microambiente baseado em citocinas capaz de influenciar a sobrevivência das células, além de seu crescimento, proliferação e diferenciação, contribuindo consequentemente com a iniciação, promoção e progressão do câncer.

Por outro lado, alguns autores acreditam que a malignização das lesões de LPO seja favorecida por alterações na expressão de proteínas que regulam os mecanismos de proliferação celular e apoptose (TANDA et al., 2000; DA SILVA et al., 2001; VALENTE et al., 2001; BASCONES et al., 2005; LEE et al., 2005; GONZÁLES-MOLES et al., 2006).

2.2 Leucoplasia

Segundo a classificação da OMS, as leucoplasias são consideradas lesões clinicamente cancerizáveis da mucosa bucal (SOARES, 2005). Estas lesões apresentam a capacidade de se transformar em carcinomas de células escamosas, sobretudo quando apresentam alterações histopatológicas de displasia epitelial, portanto podem representar uma das etapas no processo da carcinogênese bucal (PINDBORG et al., 1997).

A leucoplasia acomete, predominantemente, homens na quinta década de vida (PETTI, 2003). Clinicamente, as leucoplasias são classificadas em homogêneas e não homogêneas. Leucoplasias homogêneas são lesões planas com superfície lisa, corrugada, pregueada ou estriada sendo responsável por 90% dos casos de leucoplasia oral. Maior risco de transformação maligna é observado na leucoplasia não homogêneas que se apresentam como lesões brancas ou branco-avermelhadas, de superfície irregular, nodular ou verrucosa (PINDBORG et al., 1997; VAN DER WAAL et al., 1997).

O diagnóstico da leucoplasia é clínico, uma vez que não apresenta aspectos histopatológicos específicos, entretanto pode-se observar microscopicamente um aumento da camada de queratina na superfície do epitélio (hiperqueratose) e/ou aumento da camada espinhosa (acantose). A camada de queratina pode consistir de ortoqueratose, paraqueratose ou ambos. Células inflamatórias crônicas podem ser notadas no tecido conjuntivo subjacente. Displasia epitelial está presente em 5 a 25% das leucoplasias orais. As alterações displásicas das células epiteliais se assemelham às encontradas no carcinoma de células escamosas e incluem: núcleos e células maiores e pleomórficos, nucléolos grandes e proeminentes, aumento da proporção núcleo/citoplasma, núcleos hipercromáticos, disqueratose, aumento do número de mitoses e mitoses atípicas (PINDBORG et al., 1997; REGEZI et al., 2000; NEVILLE et al., 2004).

Consumo crônico do tabaco e do álcool, infecção por *Candida sp*, características clínicas e grau de displasia, são alguns fatores associados à incidência da leucoplasia e sua taxa de transformação maligna (DIETRICH et al., 2004).

O hábito de fumar mais de 20 cigarros por dia foi associado à ocorrência da leucoplasia, aumentando o risco de aparecimento dessa lesão em 2,4 a 15 vezes (DIETRICH et al., 2004). Paradoxalmente, leucoplasia em indivíduos não tabagistas parecem ter maior risco para o desenvolvimento de malignização das lesões (NAPIER et al., 2008).

O papel do álcool como agente da leucoplasia ainda é controverso, mas o consumo excessivo de bebidas alcóolicas pode ter efeito sinérgico ao cigarro, uma vez que fumantes quando são também etilistas possuem maior risco a desenvolver neoplasias malignas orais que somente fumantes. Esse efeito ocorre possivelmente porque a ingestão crônica de álcool causa o aumento da penetração de carcinógenos na mucosa oral, sejam através do aumento da permeabilidade da mucosa a estas substâncias nocivas presentes no tabaco (WIGHT et al., 1998; REICHART, 2001).

Lesões cancerizáveis resultam de um aumento do número de células como consequência de uma proliferação celular exacerbada e/ou diminuição dos níveis de morte celular (LIU et al, 2000).

2.3 Apoptose

O processo de morte celular programada, ou apoptose, é geralmente caracterizado por particularidades morfológicas distintas e mecanismos bioquímicos intracelulares altamente regulados, no qual as células destinadas a morrer ativam enzimas que degradam seu DNA nuclear e as proteínas citoplasmáticas (KUMAR et al., 2005; ELMORE, 2007).

A apoptose é fundamental para o desenvolvimento e o funcionamento normal dos organismos multicelulares, uma vez que o número de células em um órgão é determinado pelas taxas de imigração celular, divisão celular e morte celular (RAFF, 1996; STRASSER et al., 2000; IGNEY et al., 2002).

O fenômeno de morte celular fisiológica foi descoberto, independentemente, diversas vezes ao longo dos últimos 150 anos (KERR et al., 1972; SULSTON et al., 1977). O impacto desse processo sobre a produção de células e homeostase foi

amplamente reconhecida, porém, somente após a descoberta de que a morte celular em organismos multicelulares está sujeita ao controle genético e após a demonstração de que anormalidades na regulação da morte celular podem causar doenças como o câncer, a autoimunidade e, possivelmente, doenças degenerativas (ELLIS et al., 1986; VAUX et al., 1988; STRASSER et al., 1990; McDONNELL et al., 1991; THOMPSON, 1995; STRASSER et al., 2000; IGNEY et al., 2002).

A microscopia ótica e eletrônica têm identificado as diversas alterações morfológicas que ocorrem durante a apoptose (HÄCKER, 2000). Durante o processo inicial da apoptose fenômenos como retração celular e picnose são visíveis ao microscópio óptico (KERR et al., 1972). Com a retração das células há uma diminuição do tamanho celular, o citoplasma apresenta-se mais denso e as organelas mais compactadas (KERR et al., 1972; ELMORE, 2007). No exame histológico corado pela técnica de hematoxilina-eosina (HE), a apoptose consiste em células individuais ou pequenos aglomerados de células (IGNEY et al., 2003; ELMORE, 2007). A célula apoptótica aparece como uma massa arredondada ou oval com citoplasma eosinofílico e fragmentos basofílicos de cromatina nuclear (KERR et al., 1972; TAKANO et al., 1991; ELMORE, 2007).

Ocorre uma extensa formação de bolhas na membrana plasmática seguida por separação de fragmentos de células em corpos apoptóticos, ligados à membrana, compostos de citoplasma e organelas bem compactadas, com ou sem a presença de fragmentos nucleares (STRASSER et al., 2000; KUMAR et al., 2005; ELMORE, 2007). Esses corpos são subsequentemente fagocitados por macrófagos e degradados nos lisossomos e as células saudáveis adjacentes migram e proliferam para substituir o espaço pela célula apoptótica eliminada (TAKANO et al., 1991; IGNEY et al., 2003; KUMAR et al., 2005; ELMORE, 2007).

Não há essencialmente nenhuma reação inflamatória associada com o processo de apoptose, nem com a remoção das células apoptóticas visto que as células apoptóticas não liberam seus constituintes dentro do espaço intersticial, são rapidamente fagocitados por células vizinhas, assim, provavelmente evitando a necrose secundária e a fagocitose das células não produz citocinas anti-inflamatórias (SAVILL et al., 2000; KUROSAKA et al., 2003).

Em princípio, existem dois caminhos alternativos que induzem a apoptose: um mediado por marcadores de morte celular na superfície da célula, algumas vezes chamado de via extrínica ou extracelular, e o outro mediado pela mitocôndria, chamado de via intrínica ou intracelular (KRAMMER, 1999; SCHMITZ et al., 2000; STRASSER et al., 2000; IGNEY et al., 2003). Em ambas as vias, um grupo de proteases específicas, as caspases, ativam e clivam substratos celulares, levando a mudanças bioquímicas e morfológicas, que são características da apoptose (STRASSER et al., 2000; IGNEY et al., 2003).

O processo de apoptose pode ser subdividido em uma fase de ativação, tornando as caspases ativas, e de execução, na qual tais enzimas atuam gerando a morte celular (THOMPSON, 1995; KROEMER et al., 1995). Considerando que a fase de iniciação depende do tipo de estímulo que resultará na apoptose, seja ele extrínico ou intrínico, as fases efetoras são comuns a todo processo apoptótico (KROEMER, 1997).

A fase de iniciação é induzida por uma variedade de modificações bioquímicas que são as bases das alterações estruturais descritas anteriormente, incluindo, danos ao DNA, hipóxia, a falta de nutrientes, fatores de crescimento ou hormônios, e ativação de receptores de morte (HENGARTNER, 2000; LORO et al., 2003).

A regulação da apoptose envolve vários grupos de moléculas, como a família do gene Bcl-2, a família do receptor/ligante do fator de necrose tumoral (TNF), nos genes supressores de tumor, oncogenes, fatores mitocondriais e uma série de caspases (LORO et al., 2003).

A apoptose é induzida por uma cascata de eventos moleculares que podem ser iniciados de maneiras distintas, culminando na ativação das caspases (STRASSER et al., 2000).

Duas principais vias de apoptose têm sido reconhecidas, a via extrínica envolve interações de receptores de morte transmembrana presentes em várias células (WALLACH et al., 1999). Estes receptores são membros da família de receptores do fator de necrose tumoral (TNF), que induzem à ativação da caspase-8 (LOCKSLEY et al., 2001). A via intrínica é resulta do aumento mitocondrial e da

liberação de moléculas pró-apoptóticas no citoplasma, sem a participação dos receptores de morte (RAVAGNAN et al., 2002; SCORRANO et al., 2003).

As alterações moleculares nas células advindas de um câncer começam a ser compreendidas e relacionadas aos mecanismos que regulam a divisão celular normal, a proliferação e a morte celular. Mudanças nos genes que regem a apoptose acarretam em um maior acúmulo de células neoplásicas por induzir uma elevada taxa de crescimento celular e diminuição nos níveis de destruição das células mutadas (KING et al., 1995; EVAN et al., 2001; IGNEY et al., 2002; KUMAR et al., 2005). Sendo assim, há um descontrole entre a produção celular tumoral e a capacidade individual das células cancerígenas em se autodestruírem (TERZIAN et al., 2007).

O acúmulo de células neoplásicas pode ocorrer não somente pela ativação dos oncogenes ou pela inativação dos genes supressores de tumor, mas também pelas mutações nos genes que regulam a apoptose (KORSMEYER, 1999; EVAN et al., 2001; IGNEY et al., 2003).

De fato, a supressão da apoptose durante a carcinogênese é pensado para desenvolver um papel central no desenvolvimento e progressão de alguns tipos de cânceres (KERR et al., 1994). Há uma variedade de mecanismos moleculares que as células tumorais fazem uso para suprimir a apoptose (ELMORE, 2007).

As células tumorais podem adquirir resistência à apoptose pela expressão de proteínas anti-apoptóticas como Bcl-2 ou pela regulação ou mutação de proteínas pró-apoptóticas como o Bax (IGNEY et al., 2003; ELMORE, 2007). Portanto, a resistência das células tumorais à apoptose é uma característica essencial do desenvolvimento do câncer (IGNEY et al., 2003).

Como a proliferação desregulada e inibição da apoptose estão no cerne de todo o desenvolvimento do tumor, eles apresentam dois alvos óbvios para a intervenção terapêutica em todos os cânceres (EVAN et al., 2001).

2.3.1 Bcl-2

A família das proteínas relacionadas à Bcl-2, constitui uma das classes mais biologicamente relevantes da apoptose (KROEMER, 1997).

Essa família recebeu o nome da proteína Bcl-2, que foi originalmente identificada como um oncogênico em um linfoma de células B que produz as proteínas Bcl-2, cuja função biológica é suprimir a morte celular programada induzida por vários estímulos (KUMAR et al., 2005).

A família Bcl-2 é composta por dois grupos de proteínas: as proteínas antiapoptóticas e as proteínas pró-apoptóticas, cuja função é regular a apoptose, sendo que as duas principais proteínas antiapoptóticas são a Bcl-2 e Bcl-x (KUMAR et al., 2005). Essas proteínas antiapoptóticas normalmente estão localizadas nas membranas mitocondriais e no citoplasma das células (KROEMER, 1997).

Quando as células são expostas a estresse ou privadas de sinais vitais, elas perdem a expressividade de Bcl-2/Bcl-x na membrana mitocondrial que são substituídas por membros pró-apoptóticos dessa família, como a Bax e Bak (KUMAR et al., 2005). Com isso, a membrana mitocondrial se torna permeável e como resultado, o citocromo c é liberado para o citosol, levando à ativação da cascata de caspases e indução de morte celular por apoptose (LESSENE et al., 2008).

Em epitélios com proliferação normal, a proteína Bcl-2 é expressa em células indiferenciadas (células tronco), bem como as da camada basal, onde as previne de morrer. A expressão de Bcl-2 nas camadas suprabasais de lesões cancerizáveis bucais sugere um alto potencial de transformação maligna (TANDA et al., 2000).

A descoberta da superexpressão de Bcl-2 em vários tipos de células cancerígenas, levou à visão de que deficiências na apoptose é um passo crítico no desenvolvimento tumoral (VAUX et al., 1988). O tumor surge a partir de uma redução na mortalidade celular, ao invés de uma proliferação celular explosiva (HANAHAHAN et al., 2000).

A expressão de Bcl-2 em carcinomas experimentais demonstrou variar, de acordo com a localização anatômica do carcinoma (SCHWARTZ et al., 2000).

A superexpressão dos membros da família Bcl-2 de proteínas é geralmente associada à patogênese desfavorável do câncer (LESSENE et al., 2008). Constitutivamente, altos níveis de Bcl-2 têm sido relacionados com um fenótipo maligno mais agressivo e/ou resistência a drogas para várias categorias de reagentes quimioterápicos em neoplasias hematológicas e tumores sólidos (KANG et al., 2009).

2.3.2 Caspase-3

Caspases são centrais para a execução da apoptose (DENAULT et al., 2008). Sua atividade proteolítica é responsável pela morte de células em diversos estados fisiológicos e patológicos (DENAULT et al., 2008).

Todos os sinais típicos da apoptose são resultado final de uma cascata de eventos bioquímicos complexos (VERMEULEN et al., 2005). Os eventos moleculares e bioquímicos que envolvem a morte celular por apoptose têm sido extensivamente estudados (JIN et al., 2005).

Quatorze caspases foram identificadas até agora, todas partilhando de algumas propriedades comuns, das quais dois terços desempenham um papel na apoptose (O'DONOVAN et al., 2003; FAN et al., 2005). Dentre elas, a caspase-3 vem sendo o foco de diversos estudos relacionados ao mecanismo da apoptose, tornando-se peça-chave no entendimento dos mecanismos de morte celular, uma vez que é ativada em resposta a vários estímulos, como drogas quimioterápicas (TERZIAN et al., 2007).

As caspases são proteases, grupo de enzimas proteolíticas (*cystenil aspartate specific proteases*), que utilizam a cisteína como grupo nucleofílico na clivagem de substratos, desencadeando a apoptose (CHANG et al., 2000; GRUTTER, 2000).

Essas proteases são sintetizadas como precursores inativos e são ativados em consequência de sinalização induzida por uma ampla gama de estímulos fisiológicos e patológicos (KAUFMANN et al., 2008).

Após a ativação, estas enzimas clivam substratos específicos e, assim, medeiam muitas das alterações morfológicas típicas da apoptose, tais como o encolhimento celular, condensação da cromatina, fragmentação de DNA e extensa formação de bolhas na membrana plasmática, assim a detecção da caspase ativa pode ser usada como um marcador bioquímico da apoptose (KÖHLER et al., 2002; ZHIVOTOVSKY, 2003).

A família das caspases pode ser dividida funcionalmente em dois grupos, dependendo da ordem que foram ativadas durante a apoptose (SALVESEN et al., 1995). As caspases iniciadoras incluem a caspase-8 e a caspase-9 enquanto que várias caspases, incluindo a caspase-3 e a caspase-6, são efetoras (KUMAR et al., 2005).

São os membros do segundo grupo que degradam as proteínas de múltiplas células e são responsáveis pelas alterações morfológicas da apoptose (O'DONOVAN et al., 2003).

A caspase-3 cliva uma ampla gama de substratos celulares, incluindo as proteínas estruturais e enzimas de reparo de DNA, e também ativa uma endonuclease DNase caspase-ativada, que causa uma fragmentação do DNA característica da apoptose (O'DONOVAN et al., 2003).

Dentre as caspases efetoras, a caspase-3 foi identificada como sendo uma protease mais claramente associada com a morte celular, uma vez que cliva proteínas-chave no processo de reparação celular. A caspase-3 foi encontrada em diversos tecidos normais e vários estudos têm demonstrado que sua expressão está relacionada com a evolução clínica de determinadas neoplasias (KRAJEWSKA et al., 1997; DONOGHUE et al., 1999; KUMAMOTO et al., 2001; TOBÓN-ARROYAVE et al., 2004).

2.4 Proliferação celular e Ki-67

Independente de suas causas primárias, as neoplasias exibem distúrbios no controle do ciclo celular, induzindo a um aumento da proliferação celular, perda da diferenciação e instauração de massas tumorais (RABENHORST, 1994).

A detecção e a quantificação das células em proliferação constituem parâmetros importantes na identificação de neoplasias associada aos graus de malignidade (RABENHORST, 1994; SAKAI et al., 2002).

Segundo Weidner et al. (1994) a proliferação de células tumorais está relacionada com o prognóstico em muitos tumores.

Através da avaliação do Ki-67, um antígeno nuclear presente nas fases ativas do ciclo celular, que se realiza a análise imuno-histoquímica da proliferação celular (WEIDNER et al., 1994).

O Ki-67 é uma proteína não histona, cujo gene se localiza no cromossomo 10 (10q25), com peso molecular aparente de 345 a 349, que não é expressa em células na fase G_0 , mas que pode ser detectada nas fases ativas do ciclo celular (G_1 , S, G_2 e mitose), sua expressão aumenta na segunda metade da fase S, alcançando sua maior expressão em G_2 e mitose (RABENHORST, 1994; BARBOSA et al., 2003; TERZIAN et al., 2007).

Schliephake (2003) menciona a proteína Ki-67 como pertencente ao grupo de moléculas que estimula o crescimento tumoral através do aceleração do ciclo celular e da proliferação.

O anticorpo monoclonal desenvolvido para marcar esta proteína em tecidos fixados em formol é denominado MIB-1, apresentando-se aumentado em tecidos em proliferação (BRENER, 2009). A porcentagem de células imunorreativas para esse anticorpo correlaciona bem com as características morfológicas de proliferação celular, particularmente índice mitótico e grau de diferenciação do tumor (DE NARDI, 2007).

Diante da presença de neoplasias indiferenciadas, o Ki-67 é um eficiente marcador de proliferação celular altamente disponível, permitindo estabelecer uma relação direta com o prognóstico (BARBOSA et al., 2003).

De acordo com Peña et al. (1998) valores aumentados de Ki-67 têm correlação positiva com metástase, morte pela neoplasia e menor tempo de sobrevida. O desequilíbrio entre a proliferação celular e apoptose pode estar relacionado com a resposta à radioterapia e quimioterapia, ou seja, uma redução na apoptose e uma aumento da proliferação celular pode implicar em maior índice de recorrência (BRENER, 2009).

A atividade proliferativa celular determinada por meio de marcação imuno-histoquímica pode também ser relacionada à susceptibilidade do tumor à quimioterapia, uma vez que grande parte das drogas antineoplásicas atua em células que se encontram no ciclo de divisão celular e tumores com alto índice de crescimento são mais susceptíveis a estes fármacos (DE NARDI, 2007).

3 Proposição

3 PROPOSIÇÃO

A partir da análise de um total de 28 espécimes (14 amostras de líquen plano oral, 08 amostras de leucoplasia com displasia epitelial moderada e 06 amostras de leucoplasia com displasia epitelial severa) e 09 espécimes controle (09 amostras de mucosa bucal normal), o presente estudo teve como objetivos:

1. Analisar a participação da inibição e indução da apoptose nas células epiteliais, da camada basal e suprabasal, e nas células do infiltrado inflamatório por meio da expressão imuno-histoquímica das proteínas Bcl-2 e caspase-3;
 2. Avaliar o índice de proliferação celular determinado pela expressão imuno-histoquímica da proteína Ki-67 nas células epiteliais, da camada basal e suprabasal, e nas células do infiltrado inflamatório;
 3. Comparar a imunomarcagem dos anticorpos Bcl-2, Ki-67 e caspase-3 entre as lesões de líquen plano oral, leucoplasia com displasia epitelial e fragmentos de mucosa bucal normal;
 4. Correlacionar, a partir dos achados imuno-histoquímicos, alterações relacionadas à carcinogênese nas amostras de líquen plano com as de leucoplasia com displasia epitelial.
-

4 Casuística e Métodos

4 CASUÍSTICA E MÉTODOS

4.1 Seleção das amostras

Foram selecionados, a partir dos arquivos do Laboratório de Patologia Bucal da FOB-USP, 28 fichas de requerimento de exame de pacientes que tiveram suas biópsias analisadas histopatologicamente e os diagnósticos confirmados. Destes, 14 casos correspondem a lesões diagnosticadas como líquen plano oral, 08 como leucoplasia com displasia epitelial moderada e 06 casos de leucoplasia com displasia epitelial severa. As amostras, fixadas em formol a 10%, foram processadas rotineiramente e incluídas em blocos de parafina. Para o grupo controle, foram utilizados 09 fragmentos de mucosa bucal normal, comprovadas histologicamente estar sem inflamação, obtidas a partir do arquivo do Laboratório de Patologia Bucal da FOB-USP. A amostragem constou de 14 lesões de LPO, 14 lesões de leucoplasia com displasia epitelial e 09 fragmentos de mucosa considerada histopatologicamente normal, como grupo controle.

Os seguintes critérios de inclusão foram adotados para a seleção das amostras:

- ♦ Amostras de líquen plano oral com diagnóstico confirmado por exame histopatológico;
- ♦ Amostras de leucoplasia com displasia epitelial moderada ou severa com diagnóstico confirmado por exame histopatológico;
- ♦ Disponibilidade dos blocos de parafina contendo os respectivos fragmentos para análise microscópica;
- ♦ Possibilidade de realização de novos cortes nos blocos de parafina contendo as lesões a serem analisadas;
- ♦ Disponibilidade de informações clínicas relevantes à pesquisa.

Os critérios de exclusão foram:

- ♦ Presença de outras lesões simultâneas no mesmo paciente;
-

- ♦ Amostras de líquen plano oral próximas às restaurações de amálgama;
- ♦ Casos de LPO com dúvida em relação ao correto diagnóstico;
- ♦ Amostras de leucoplasia sem displasia epitelial ou com displasia epitelial leve com diagnóstico confirmado por exame histopatológico.

4.2 Registro de dados clínicos

As informações clínicas referentes aos pacientes foram obtidas dos laudos das biópsias analisadas após a permissão do Laboratório de Patologia Bucal da FOB-USP e complementadas, quando possível, pela análise das respectivas fichas de requerimento de exame que acompanhavam as peças cirúrgicas enviadas para exame anatomopatológico. Estes registros incluem identificação e os dados demográficos dos pacientes, informações relativas à história clínica e ao exame locorregional.

As variáveis analisadas neste estudo incluíram a coleta de dados demográficos relativos aos pacientes como gênero (masculino ou feminino) e idade.

Quanto à história clínica dos pacientes, pesquisou-se o tempo de história (em meses), tabagismo (fumante, ex-fumante ou não fumante) e etilismo (etilista ou não etilista). Registrou-se também, a presença de sintomas relacionados às lesões como dor ou queimação.

No exame locorregional, a localização das lesões foi registrada como: língua, mucosa jugal, rebordo alveolar e gengiva inserida.

4.3 Análise microscópica

Secções histológicas receberam a coloração de Hematoxilina e Eosina (HE) para verificação do diagnóstico histológico de acordo com o critério de Eisenberg (2000) para LPO:

Características essenciais:

- ♦ Liquefação das células da camada basal;
- ♦ Infiltrado linfocitário intenso disposto em banda subjacente ao epitélio com apagamento da camada basal;
- ♦ Padrão normal de maturação das células epiteliais.

Outras características (não essenciais):

- ♦ Cristas interpapilares em forma de dentes de serra;
- ♦ Hiperparaqueratose;
- ♦ Corps de *Civatte*;
- ♦ Separação do epitélio da lâmina própria.

E as lesões de leucoplasia foram classificadas de acordo com a Organização Mundial da Saúde (GALE et al., 2005) em:

- ♦ *Hiperplasia epitelial*: aumento do número de células da camada espinhosa (acantose) e/ou da camada basal/suprabasal, porém sem atipia celular;
- ♦ *Displasia epitelial leve*: alteração da arquitetura epitelial limitada ao terço inferior do epitélio com presença de atipia celular;
- ♦ *Displasia epitelial moderada*: alteração da arquitetura epitelial estendendo-se ao terço médio, com atipia celular;
- ♦ *Displasia epitelial severa*: mais de 2/3 do epitélio com alteração da arquitetura epitelial associado à atipia celular;
- ♦ *Carcinoma in situ*: alterações da arquitetura epitelial atingindo toda ou quase toda espessura do epitélio associada à acentuada atipia celular com presença de figuras de mitose e/ou mitoses superficiais atípicas.

Foram consideradas alteração da arquitetura epitelial:

- Estratificação irregular do epitélio;
 - Perda da polaridade das células basais;
 - Cristas epiteliais em forma de gota;
-

- Aumento do número de figuras mitóticas;
- Mitoses superficiais atípicas;
- Queratinização prematura das células individuais (disqueratose);
- Pérolas de queratina no interior das cristas epiteliais.

As seguintes alterações celulares foram consideradas:

- Alteração no tamanho do núcleo (anisonucleose);
- Alteração na forma do núcleo (pleomorfismo nuclear);
- Alteração no tamanho da célula (anisocitose);
- Alteração na forma da célula (pleomorfismo celular);
- Alteração na relação núcleo/citoplasma;
- Núcleo com tamanho aumentado;
- Figuras de mitoses atípicas;
- Aumento no número e tamanho dos nucléolos.

4.4 Técnica imuno-histoquímica

Os cortes microscópicos de 3µm de espessura das lesões de líquen plano oral e leucoplasia com displasia epitelial moderada e severa e das amostras de mucosa bucal foram obtidos a partir dos blocos de parafina originais dos espécimes teciduais para investigação das proteínas de apoptose (Bcl-2 e caspase-3 ativa) e de proliferação celular (Ki-67) de acordo com a técnica da imunoperoxidase por meio do sistema de detecção ADVANCETMHRP (K4068, Dako), seguindo-se as especificações do fabricante e a metodologia utilizada no Instituto de Anatomia Patológica de Bauru (ANATOMED), como descrita a seguir:

- ♦ Os cortes foram estendidos em lâminas de vidro do tipo silanizadas (25 X 75 X 1mm, ImmunoSlide, EasyPath) para aumento da aderência entre o corte tecidual e a lâmina;
 - ♦ As lâminas contendo os cortes dos espécimes teciduais foram desparafinizadas em estufa a 65°C por 24 horas, imersas por três vezes
-

em xilol a 60°C por 10 minutos cada e, em seguida, foram submetidas a quatro imersões em álcool absoluto por 30 segundos cada;

- ♦ Na sequência procedeu-se a lavagem das lâminas em água corrente e destilada;
- ♦ Realizou-se o bloqueio da peroxidase endógena mediante a incubação dos cortes teciduais em solução de 3% Peróxido de Hidrogênio (H₂O₂) (Synth) durante 15 minutos;
- ♦ Procedeu-se a lavagem das lâminas em água corrente e destilada;
- ♦ Procedeu-se a lavagem das lâminas solução salina tamponada com fosfatos (PBS = *Phosphate Buffered Saline*) a 10mM e pH7,2 por 5 minutos;
- ♦ Para a recuperação antigênica, as lâminas foram colocadas em um tampão de citrato de sódio 10mM pH6,0 em panela de pressão (Pascal S2800, Dako) preenchida com 450mL de água destilada e tampada até a temperatura de 121°C ser atingida, durante cerca de 03 minutos, quando a panela foi então desligada e sua refrigeração gradual atingiu aproximadamente a temperatura de 90°C. As lâminas foram retiradas da panela e aguardou-se seu resfriamento por 20 minutos;
- ♦ Procedeu-se a lavagem das lâminas solução salina tamponada com fosfatos (PBS = *Phosphate Buffered Saline*) a 10mM e pH7,2;
- ♦ Em uma bandeja, as lâminas foram dispostas lado a lado e, com o auxílio de um sugador, retirou-se a solução de PBS;
- ♦ As amostras foram, então, delimitadas com caneta hidrofóbica (Dako Pen S2002, Dako);
- ♦ Em seguida, os cortes foram incubados com solução bloqueadora proteica (Protein Block Serum-Free X0909, Dako), por 10 minutos;
- ♦ Retirou-se o bloqueador de proteína com o auxílio de um sugador;

As amostras foram, então, incubadas por 18 horas a 4°C em câmara úmida com cada um dos seguintes anticorpos primários:

- Anticorpo monoclonal anti-Bcl-2 (Clone 124 M0887, Dako), diluição de 1:200;
 - Anticorpo policlonal anti-caspase-3 (Policlonal NBP1-20086, Novus Biologicals), diluição de 1:200;
-

- Anticorpo monoclonal anti-Ki-67 (Clone MIB-1 M7240, Dako), diluição de 1:200;
- ◆ Após incubação, as lâminas foram mantidas em temperatura ambiente por 30 minutos;
- ◆ Lavagem das lâminas em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada;
- ◆ Incubação com o anticorpo secundário ADVANCETMHRP Link (Complexo AB, Dako) por um período de 30 minutos em temperatura ambiente;
- ◆ Lavagem das lâminas em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada;
- ◆ Incubação com o anticorpo secundário ADVANCETMHRP Enzyme (Complexo AB, Dako) por um período de 30 minutos em temperatura ambiente;
- ◆ Lavagem das lâminas em tampão PBS com 3 trocas de 3 minutos cada;
- ◆ O produto final da reação antígeno-anticorpo foi visualizado por meio da incubação das lâminas em solução substrato: 3'3 *Diaminobenzidine Tetrahydrochloride* (DAB); 1mL de H₂O₂ a 6% (água oxigenada 20 volumes), 100mL de PBS, por 5 minutos a 37°C ao abrigo da luz;
- ◆ Visualização ao microscópio óptico, nas lâminas controle, do desenvolvimento de precipitado castanho dourado, como produto final da reação;
- ◆ Lavagem em água corrente e água destilada por 3 minutos;
- ◆ Os cortes foram corados em Hematoxilina de Harris por 1 minuto;
- ◆ Lavagem em água corrente e destilada durante 20 minutos;
- ◆ Os cortes contendo os fragmentos teciduais foram desidratados em concentrações graduais de álcool (80%, 95% e absoluto) em 2 trocas de 30 segundos cada, mergulhados em solução de xilol 4 vezes, por 30 segundos cada;
- ◆ Montagem das lâminas com a utilização de resina (Entellan Neu, Merck) e lamínulas.

Um controle positivo e um controle negativo foram incluídos em cada reação imuno-histoquímica realizada. Para o controle positivo utilizou-se espécimes de tonsilas palatinas humanas e para o controle negativo um corte do mesmo tecido foi utilizado, porém com a substituição do anticorpo primário por solução de PBS.

4.5 Avaliação imuno-histoquímica

A expressão imuno-histoquímica das proteínas Bcl-2, Ki-67 e caspase-3 foram identificadas nas células epiteliais da camada basal e suprabasal e nas células do infiltrado inflamatório.

A avaliação da expressão foi realizada a partir da quantificação das células marcadas positivamente, determinadas pela coloração acastanhada, sem levar em consideração a intensidade da coloração. Foram consideradas positivas para a Bcl-2 as células que apresentaram marcação de coloração acastanhada no núcleo e no citoplasma, para a proteína Ki-67 no núcleo e para a caspase-3 no citoplasma. Foram obtidas em separado as contagens das células da camada basal, da camada suprabasal e do infiltrado inflamatório. O número de células imunopositivas foi dividido pelo número total de células em 4 campos microscópicos em grande aumento (40X) e as porcentagens de expressão foram calculadas para cada caso.

A análise da expressão dos anticorpos anti-Bcl-2, anti-Ki-67 e anti-caspase-3 nas células epiteliais da camada basal e suprabasal e nas células do infiltrado inflamatório foi realizada em 4 campos microscópicos de grande aumento (40X), escolhidos aleatoriamente em um microscópio óptico binocular (Axiolab, Zeiss) associado a ocular com retículo de integração quadrado em forma de rede (Netzmikrometer 12,5x, Zeiss). Foi utilizada uma objetiva de 40X para a contagem, sendo a medida do lado do retículo de integração obtida por meio de uma lâmina milimetrada, que correspondeu a 0,31mm. A área do retículo (A) foi determinada pela expressão matemática: $A=L \times L$, o que resultou em $A=0,0961\text{mm}^2$.

Os casos foram atribuídos a uma das seguintes categorias, de acordo com o critério de González-Moles (2006):

- ♦ 0% de células positivas (-);
 - ♦ <10% de células positivas (+);
 - ♦ 10-25% de células positivas (++);
 - ♦ 26-50% de células positivas (+++);
 - ♦ >50% de células positivas (++++).
-

A avaliação da expressão imuno-histoquímica do Bcl-2, do Ki-67 e da caspase-3 foi realizada pelo mesmo examinador sem o conhecimento prévio das informações clínicas do paciente.

4.6 Análise estatística

Para a descrição das idades convencionou-se a utilização das medianas, em função das variações de 32 anos a 76 anos para as lesões de LPO e de 41 anos a 73 anos para as lesões de leucoplasia com displasia epitelial moderada e severa.

A comparação entre a expressão dos diferentes marcadores entre os grupos de líquen plano oral, leucoplasia com displasia epitelial e o grupo controle, e ainda entre a expressão dos marcadores entre cada região tecidual avaliada (camada basal, camada suprabasal, infiltrado inflamatório) para cada grupo com finalidade de avaliação de significância estatística, baseou-se no método não paramétrico de Kruskal-Wallis. Com auxílio na elaboração dos testes estatísticos foi utilizado o software *GraphPad Prism 5*.

4.7 Aquisição das fotomicrografias

As fotomicrografias apresentadas neste trabalho foram obtidas por meio de um microscópio óptico binocular (Axiostar plus, Zeiss) acoplado a um microcomputador contendo um sistema de aquisição e análise de imagens (AxioCam MRc, Zeiss).

4.8 Comitê de ética

O Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo (CEP-FOB/USP) aprovou o projeto de pesquisa em reunião realizada no dia 27 de abril de 2011, sob o nº047/2011 (ANEXO A).

5 Resultados

5 RESULTADOS

5.1 Caracterização da população de estudo

5.1.1 Líquen plano oral

A análise dos 14 pacientes com líquen plano oral diagnosticados no Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo revelou a predominância do gênero feminino, com 10 mulheres (71,43%) e 04 homens (28,57%), sendo que 22,22% dos pacientes eram tabagistas, 22,22% ex-tabagistas e 22,22% etilistas, como demonstra a Tabela 1.

A idade mínima no momento do diagnóstico foi de 32 anos e a idade máxima de 76 anos, média de 50,5 (desvio padrão = 14,02) e mediana de 47,5 anos. Um total de 50% dos pacientes apresentava idade acima de 47,5 anos (Tabela 1).

A Tabela 2 mostra que as lesões de LPO localizavam-se principalmente em mucosa jugal (35,71%) e em língua (35,71%), entretanto, lesões de LPO foram encontradas também em outra localização anatômica bucal como gengiva inserida (28,58%).

O menor tempo de evolução das lesões de líquen plano oral, de acordo com a ficha do paciente, foi de 03 meses e o maior de 36 meses (tempo médio de 11,5 meses e desvio padrão de 12,7).

Sintomas associados com as lesões, como dor e queimação, foram relatados por 07 (77,78%) dos pacientes.

Tabela 1 - Distribuição da frequência dos pacientes acometidos por líquen plano oral, segundo as características demográficas e história clínica.

Características	Número de pacientes	%
Gênero		
Feminino	10	71,43%
Masculino	04	28,57%
Idade[#]		
≤ 47,5 anos	06	50,00%
> 47,5 anos	06	50,00%
Tabagismo*		
Sim	02	22,22%
Não	07	77,78%
Ex-tabagista*		
Sim	02	22,22%
Não	07	77,78%
Etilismo*		
Sim	02	22,22%
Não	07	77,78%
TOTAL	14	100

[#] idade considerada a partir da mediana de 47,5 anos

* excluídos pacientes com informações ignoradas

Tabela 2 - Distribuição da frequência dos pacientes acometidos por líquen plano oral, segundo as variáveis clínicas.

Variáveis	N	%
Localização das lesões		
Mucosa jugal	05	35,71%
Gengiva inserida	04	28,58%
Língua	05	35,71%
Tempo de evolução*		
≤ 06 meses	03	37,50%
> 06 meses	02	25,00%
Indeterminado	03	37,50%
Sintomatologia dolorosa*		
Sim	07	77,78%
Não	02	22,22%
TOTAL	14	100

n = número de LPO

* excluídos pacientes com informações ignoradas

5.1.2 Leucoplasia

A análise dos 14 pacientes com leucoplasia com displasia epitelial moderada e severa diagnosticados no Laboratório de Anatomia Patológica da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo revelou a predominância do gênero masculino, com 08 homens (57,14%) e 06 mulheres (42,86%), sendo que 37,50% dos pacientes eram tabagistas, 25% ex-tabagistas e 12,50% etilistas, como demonstra a Tabela 3.

A idade mínima no momento do diagnóstico foi de 41 anos e a idade máxima de 73 anos, média de 60,6 (desvio padrão = 8,79) e mediana de 61,5 anos. Um total de 60% pacientes apresentava idade menor ou igual a 61,5 anos (Tabela 3).

A Tabela 4 mostra que as lesões de leucoplasia com displasia epitelial moderada e severa localizavam-se principalmente no rebordo alveolar em 50% dos pacientes, seguido pela localização em língua (28,57% dos pacientes), entretanto, lesões de leucoplasia com displasia epitelial foram encontradas também outra localização anatômica bucal como mucosa jugal (21,43%).

O menor tempo de evolução das lesões de leucoplasia com displasia epitelial, de acordo com a ficha do paciente, foi de 21 dias e o maior de 36 meses (tempo médio de 17,97 meses e desvio padrão de 13,55).

Sintomatologia dolorosa associada com as lesões foi relatada por apenas 01 (11,11%) dos pacientes.

Tabela 3 - Distribuição da frequência dos pacientes acometidos por leucoplasia, segundo as características demográficas e história clínica.

Características	Número de pacientes	%
Gênero		
Feminino	06	42,86%
Masculino	08	57,14%
Idade[#]		
≤ 61,5 anos	06	60,00%
> 61,5 anos	04	40,00%
Tabagismo*		
Sim	03	37,50%
Não	05	62,50%
Ex-tabagismo*		
Sim	02	25,00%
Não	06	75,00%
Etilismo*		
Sim	01	12,50%
Não	07	87,50%
TOTAL	14	100

[#] idade considerada a partir da mediana de 61,5 anos

* excluídos pacientes com informações ignoradas

Tabela 4 - Distribuição da frequência dos pacientes acometidos por leucoplasia, segundo as variáveis clínicas.

Variáveis	N	%
Localização das lesões		
Rebordo alveolar	07	50,00%
Língua	04	28,57%
Mucosa jugal	03	21,43%
Tempo de evolução*		
≤ 06 meses	02	28,57%
> 06 meses	03	42,86%
Indeterminado	02	28,57%
Sintomatologia dolorosa*		
Sim	01	11,11%
Não	08	88,89%
TOTAL	14	100

n = número de leucoplasias com displasia epitelial

* excluídos pacientes com informações ignoradas

5.2 Avaliação imuno-histoquímica

As lâminas testadas para o anticorpo anti-caspase-3 apresentaram um forte *background*, o que impossibilitou uma análise segura das marcações positivas. Adequações à reação foram realizadas, porém sem apresentar resultados satisfatórios. Assim, optou-se por não incluir este marcador na análise dos resultados.

As células evidenciadas pela coloração imuno-histoquímica nas amostras de LPO, de leucoplasia com displasia epitelial e de mucosa bucal normal apresentaram coloração acastanhada, ora densa ora discreta. Observaram-se, ainda, frequentes áreas difusamente coradas. A contagem das células imunomarcadas resultou em número destas células por mm² nas diferentes regiões (camada basal, camada suprabasal e infiltrado inflamatório) para cada imunomarcador.

Os valores médios do número de células imunomarcadas/mm² foram utilizados para uma comparação entre as três regiões (camada basal, camada suprabasal e infiltrado inflamatório) avaliadas em coloração imuno-histoquímica, por cada proteína utilizada.

5.2.1 Líquen plano oral

A Tabela 5 mostra os resultados obtidos da expressão da proteína Bcl-2 em lesões de líquen plano oral (Figura 1).

A expressão nuclear e citoplasmática de Bcl-2 em células da camada basal foi negativa 13 lesões (92,86%) e foi detectada em <10% das células em apenas uma lesão (07,14%). A expressão em células da camada suprabasal em <10% das células foi observada em 01 lesão (07,14%) enquanto 13 lesões (92,86%) foram negativas como demonstrado na Tabela 5. Em relação à expressão da proteína Bcl-2 em células do infiltrado inflamatório, a Tabela 5 mostra que a maioria das lesões (57,14%) de LPO teve expressão em 26-50% das células inflamatórias, 03 lesões tiveram >50% das células com expressão positiva (21,43%), 02 lesões (14,29%)

tiveram expressão em <10% das células inflamatórias e somente 01 lesão (7,14%) foi negativa para a expressão da proteína Bcl-2.

Em relação à expressão do Ki-67, a Tabela 6 e a Figura 2 mostram que a maioria das lesões de líquen plano oral (06 lesões; 42,86%) apresentou uma expressão positiva em mais de 50% das células da camada basal. A expressão desta proteína foi positiva em <10% das células da camada suprabasal de 12 lesões de LPO (85,71%), enquanto apenas 02 lesões tiveram expressão nuclear negativa (14,29%). A expressão nuclear do Ki-67 em células do infiltrado inflamatório foi positiva em <10% das células de 78,57% dos LPO (11 lesões) e 03 lesões (21,43%) tiveram de 26-50% das células inflamatórias positivas.

Tabela 5 – Expressão da proteína Bcl-2 em lesões de líquen plano oral.

Variáveis	N	%
Na camada basal		
-	13	92,86%
+	01	07,14%
Na camada suprabasal		
-	13	92,86%
+	01	07,14%
No infiltrado inflamatório		
-	01	07,14%
+	02	14,29%
+++	08	57,14%
++++	03	21,43%
TOTAL	14	100

n = número de LPO

Tabela 6 – Expressão da proteína Ki-67 em lesões de líquen plano oral.

Variáveis	N	%
Na camada basal		
+	01	07,14%
++	03	21,43%
+++	04	28,57%
++++	06	42,86%
Na camada suprabasal		
-	02	14,29%
+	12	85,71%
No infiltrado inflamatório		
+	11	78,57%
++	03	21,43%
TOTAL	14	100

n = número de LPO

Figura 1 – Expressão de Bcl-2 nas células inflamatórias do líquen plano oral (A). Em B observar o detalhe da imunomarcagem da proteína Bcl-2 no infiltrado inflamatório. Imuno-histoquímica anti-Bcl-2. A e B (40X).

Figura 2 – **A)** Expressão de Ki-67 nas células epiteliais e inflamatórias do líquen plano oral; **B)** Observar detalhe da imunomarcacão nuclear. Imuno-histoquímica anti-Ki-67. **A** (10X) e **B** (40X).

5.2.2 Leucoplasia

A Tabela 7 mostra os resultados obtidos da expressão da proteína Bcl-2 em lesões de leucoplasia com displasia epitelial (Figura 3).

A expressão nuclear e citoplasmática de Bcl-2 em células da camada basal foi detectada em <10% das células em 12 lesões (85,71%) e em 10-25% das células em apenas 02 lesões (14,29%). A expressão em células da camada suprabasal foi negativa em 06 lesões (42,86%) enquanto 08 lesões de leucoplasia com displasia epitelial (57,14%) mostraram positividade em <10% das células. Em relação à expressão da proteína Bcl-2 em células do infiltrado inflamatório, a Tabela 7 mostra que 02 lesões (14,29%) tiveram expressão em <10% das células inflamatórias, 05 lesões (35,71%) tiveram 10-25% das células com expressão positiva, 05 lesões (35,71%) tiveram expressão em 26-50% das células inflamatórias e 02 lesões (14,29%) tiveram expressão da proteína Bcl-2 em >50% das células.

Em relação à expressão do Ki-67, a Tabela 8 e a Figura 4 mostram que a maioria das lesões de leucoplasia com displasia epitelial (09 lesões; 64,29%) apresentou uma expressão positiva em mais de 50% das células da camada basal e 35,71% das lesões (05 lesões) apresentaram positividade em 26-50% das células. A expressão desta proteína foi positiva em <10% das células da camada suprabasal de 13 lesões de leucoplasia com displasia epitelial (92,86%), enquanto apenas 01 lesão teve expressão nuclear negativa (07,14%). A expressão nuclear do Ki-67 em células do infiltrado inflamatório foi positiva em <10% das células de 85,71% das lesões de leucoplasia com displasia epitelial (12 lesões) e 02 lesões (14,29%) tiveram de 10-25% das células inflamatórias positivas.

Tabela 7 – Expressão da proteína Bcl-2 em lesões de leucoplasia com displasia epitelial.

Variáveis	N	%
Na camada basal		
+	12	85,71%
++	02	14,29%
Na camada suprabasal		
-	06	42,86%
+	08	57,14%
No infiltrado inflamatório		
+	02	14,29%
++	05	35,71%
+++	05	14,29%
++++	02	35,71%
TOTAL	14	100

n = número de leucoplasias com displasia epitelial

Tabela 8 – Expressão da proteína Ki-67 em lesões de leucoplasia com displasia epitelial.

Variáveis	N	%
Na camada basal		
+++	05	35,71%
++++	09	64,29%
Na camada suprabasal		
-	01	07,14%
+	13	92,86%
No infiltrado inflamatório		
+	12	85,71%
++	02	14,29%
TOTAL	14	100

n = número de leucoplasias com displasia epitelial

Figura 3 – Expressão nuclear e citoplasmática de Bcl-2 em lesão de leucoplasia com displasia epitelial (A e B). Imuno-histoquímica anti-Bcl-2. A (10X) e B (40X).

Figura 4 – Expressão de Ki-67 em lesão de leucoplasia com displasia epitelial (A). Observar detalhe da expressão nuclear da proteína Ki-67 (B). Imuno-histoquímica anti-Ki-67. A (10X) e B (40X).

5.2.3 Mucosa bucal normal

A Tabela 9 mostra os resultados obtidos da expressão da proteína Bcl-2 em fragmentos de mucosa bucal normal (Figura 5).

A expressão nuclear e citoplasmática de Bcl-2 em células da camada basal foi detectada em <10% das células em apenas 02 fragmentos de mucosa bucal normal (22,22%), enquanto 07 fragmentos (77,78%) foram negativos. A expressão em células da camada suprabasal foi negativa em 08 fragmentos de mucosa bucal normal (88,89%) e apenas 01 fragmento (11,11%) mostrou positividade em <10% das células. Em relação à expressão da proteína Bcl-2 em células do infiltrado inflamatório, a Tabela 9 mostra que 03 fragmentos de mucosa bucal normal (33,33%) foram negativos, 05 fragmentos (55,56%) tiveram <10% das células com expressão positiva e 01 fragmento (11,11%) teve expressão da proteína Bcl-2 em 10-25% das células.

Em relação à expressão do Ki-67, a Tabela 10 e a Figura 5 mostram que a expressão desta proteína nas células da camada basal foi negativa em 02 fragmentos de mucosa bucal normal (22,22%), revelou-se positiva em <10% das células basais de 02 fragmentos (22,22%), 04 fragmentos (44,45%) tiveram 10-25% das células epiteliais da camada basal com expressão nuclear positiva e apenas 01 fragmento (11,11%) mostrou positividade em 26-50% das células da camada basal. A maioria dos fragmentos de mucosa bucal normal (08 fragmentos; 88,89%) apresentou uma expressão nuclear negativa para o Ki-67 nas células da camada suprabasal e somente 01 fragmento (11,11%) teve <10% das células com expressão positiva. A expressão nuclear do Ki-67 em células do infiltrado inflamatório foi negativa em 66,67% dos fragmentos de mucosa bucal normal (06 fragmentos), enquanto 03 fragmentos (33,33%) tiveram <10% das células inflamatórias positivas.

Tabela 9 – Expressão da proteína Bcl-2 em fragmentos de mucosa bucal normal.

Variáveis	N	%
Na camada basal		
-	07	77,78%
+	02	22,22%
Na camada suprabasal		
-	08	88,89%
+	01	11,11%
No infiltrado inflamatório		
-	03	33,33%
+	05	55,56%
++	01	11,11%
TOTAL	09	100

n = número de fragmentos de mucosa bucal normal

Tabela 10 – Expressão da proteína Ki-67 em fragmentos de mucosa bucal normal.

Variáveis	N	%
Na camada basal		
-	02	22,22%
+	02	22,22%
++	04	44,45%
+++	01	11,11%
Na camada suprabasal		
-	08	88,89%
+	01	11,11%
No infiltrado inflamatório		
-	06	66,67%
+	03	33,33%
TOTAL	09	100

n = número de fragmentos de mucosa bucal normal

Figura 5 – Baixa expressão da proteína Bcl-2 em fragmento de mucosa bucal normal (A). Observar a imunomarcagem nuclear da proteína Ki-67 (B). Imuno-histoquímica anti-Bcl-2 A (40X) e anti-Ki-67 B (40X).

5.3 Análise comparativa da expressão dos imunomarcadores

Os valores médios da porcentagem de células imunomarcadas/mm² $\pm$ desvio-padrão foram utilizados para uma comparação entre as três amostras (líquen plano oral, leucoplasia com displasia epitelial e mucosa bucal normal) avaliadas em coloração imuno-histoquímica, para cada região analisada (camada basal, camada suprabasal e infiltrado inflamatório) a partir da expressão dos marcadores (Bcl-2 e Ki-67) utilizados (Figuras 6, 7 e 8). Para uma comparação geral entre os grupos (líquen plano oral, leucoplasia com displasia epitelial e mucosa bucal normal), utilizou-se as médias ($\pm$ dp) dos valores obtidos para cada região (camada basal, camada suprabasal e infiltrado inflamatório) por cada marcador imuno-histoquímico utilizado (Bcl-2 e Ki-67), seguida pelo teste não paramétrico de Kruskal-Wallis (Tabelas 11 e 12).

Figura 6 – Representação gráfica dos valores médios da porcentagem de células imunomarcadas/mm² ± desvio-padrão obtidos em lesões de líquen plano oral, a partir da expressão das proteínas Bcl-2 (A) e Ki-67 (B), em cada região tecidual analisada (camada basal, camada suprabasal e infiltrado inflamatório).

Figura 7 – Representação gráfica dos valores médios da porcentagem de células imunomarcadas/mm² ± desvio-padrão obtidos em lesões de leucoplasia com displasia epitelial, a partir da expressão das proteínas Bcl-2 (**A**) e Ki-67 (**B**), em cada região tecidual analisada (camada basal, camada suprabasal e infiltrado inflamatório).

Figura 8 – Representação gráfica dos valores médios da porcentagem de células imunomarcadas/mm² ± desvio-padrão obtidos em fragmentos de mucosa bucal normal, a partir da expressão das proteínas Bcl-2 (**A**) e Ki-67 (**B**), em cada região tecidual analisada (camada basal, camada suprabasal e infiltrado inflamatório).

Tabela 11 – Comparação entre a porcentagem ($\pm$ dp) de células imunomarcadas/mm² entre as lesões de líquen plano oral, lesões de leucoplasia com displasia epitelial e fragmentos de mucosa bucal normal, pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis, para cada região tecidual analisada (camada basal, camada suprabasal e infiltrado inflamatório), a partir da expressão da proteína Bcl-2.

Variáveis	LPO (média $\pm$ dp) (n=14)	LCD (média $\pm$ dp) (n=14)	MBN (média $\pm$ dp) (n=9)	P
CB	0,06 $\pm$ 0,22 ^A	4,54 $\pm$ 3,95 ^B	1,89 $\pm$ 3,57 ^A	0,00*
CSB	0,07 $\pm$ 0,26 ^A	0,57 $\pm$ 0,78 ^B	0,16 $\pm$ 0,46 ^{AB}	0,01*
I	36,13 $\pm$ 19,52 ^A	26,41 $\pm$ 14,07 ^A	2,49 $\pm$ 3,73 ^B	0,00*

*Estatisticamente significante para $p < 0,05$.

Legenda:

n = número de amostras analisadas
 LPO = Líquen plano oral
 LCD = Leucoplasia com displasia epitelial
 MBN = Mucosa bucal normal
 CB = Camada basal
 CSB = Camada suprabasal
 I = Infiltrado inflamatório

Tabela 12 – Comparação entre a porcentagem ($\pm$ dp) de células imunomarcadas/mm² entre as lesões de líquen plano oral, lesões de leucoplasia com displasia epitelial e fragmentos de mucosa bucal normal, pelo teste não paramétrico Kruskal-Wallis, para cada região tecidual analisada (camada basal, camada suprabasal e infiltrado inflamatório), a partir da expressão da proteína Ki-67.

Variáveis	LPO (média $\pm$ dp) (n=14)	LCD (média $\pm$ dp) (n=14)	MBN (média $\pm$ dp) (n=9)	p
CB	44,41 $\pm$ 18,79 ^A	53,80 $\pm$ 15,27 ^A	12,51 $\pm$ 9,66 ^B	0,00*
CSB	3,90 $\pm$ 3,38 ^A	2,17 $\pm$ 1,80 ^A	0,38 $\pm$ 1,09 ^B	0,00*
I	4,50 $\pm$ 4,71 ^A	4,56 $\pm$ 3,25 ^A	0,64 $\pm$ 0,96 ^B	0,00*

*Estatisticamente significante para $p < 0,05$.

Legenda:

n = número de amostras analisadas
 LPO = Líquen plano oral
 LCD = Leucoplasia com displasia epitelial
 MBN = Mucosa bucal normal
 CB = Camada basal
 CSB = Camada suprabasal
 I = Infiltrado inflamatório

6 *Díscussão*

6 DISCUSSÃO

6.1 Concepção do trabalho

As lesões de leucoplasia e de líquen plano oral, definidas pela OMS como lesões cancerizáveis da mucosa bucal, são descritas como um tecido benigno, morfológicamente alterado, que apresenta um maior risco de do que o normal de transformação maligna (SOARES, 2005; VAN DER WAAL, 2009). Porém, muitos autores acreditam que não haja dados suficientes que prove a associação entre LPO e câncer (SOUSA et al., 2009). Diversos trabalhos nessa área são realizados a fim de definir critérios histopatológicos, além de obter informações mais valiosas sobre a evolução e prognósticos dessas lesões (EISENBERG, 2000). Por vezes, somente a análise morfológica não revela o verdadeiro comportamento dessas lesões, podendo ser subestimadas clinicamente quanto ao seu tratamento e preservação.

Não são poucos os estudos que destacam o potencial de malignização do líquen plano, sobretudo na mucosa bucal (EISEN, 2002; LANFRANCHI-TIZEIRA et al., 2003; GANDOLFO et al., 2004; XUE et al., 2005). Entretanto, não se tem certeza dos mecanismos que levam a tal transformação. Alguns autores acreditam que a malignização de lesões de LPO seja favorecida por alterações na expressão de proteínas que regulam os mecanismos de proliferação celular e apoptose (TANDA et al., 2000; DA SILVA et al., 2001; VALENTE et al., 2001; BASCONES et al., 2005; LEE et al., 2005; GONZÁLES-MOLES et al., 2006).

A fim de desvendar quais as alterações moleculares ocorrem nas lesões de líquen plano oral que não podem ainda ser visualizadas morfológicamente, podendo provocar a evolução dessas lesões para o carcinoma de células escamosas, o presente trabalho propôs-se a estudar histológica e imuno-histoquimicamente as lesões de LPO e correlaciona-las com as lesões de leucoplasia com displasia epitelial moderada e severa e fragmentos de mucosa bucal normal.

6.2 Amostra

O presente estudo apresenta-se como um trabalho retrospectivo, onde foram utilizados três diferentes grupos de tecidos em blocos de parafina em arquivo. A casuística do nosso estudo foi composta por 37 pacientes, sendo 14 portadores de líquen plano oral, 08 portadores de leucoplasia com displasia epitelial moderada, 06 portadores de leucoplasia com displasia epitelial severa além de 09 fragmentos de mucosa considerada histopatologicamente normal, diagnosticados no Laboratório de Anatomia Patológica da FOB-USP.

O foco de interesse, o grupo dos líquens planos, limitou-se a lesões distantes de restaurações de amálgama devido à possibilidade de se tratar de lesões reacionais. Já os fragmentos de mucosa bucal normal foram utilizados como controle negativo, onde se esperava que a expressão dos marcadores fosse compatível com o padrão de lesões de comportamento reacional benigno. O outro grupo estudado, das leucoplasias com displasia epitelial moderada e severa, foi utilizado com controle positivo, principalmente por representar uma das etapas no processo de carcinogênese bucal, onde se esperava que obtivessem mais expressão dos marcadores que nos outros grupos.

Não há na literatura uma definição quanto ao número ideal da amostra. Diversas vezes detêm-se ao que seria estatisticamente significativo. Na prática esse número pode se apresentar limitado devido a inúmeros fatores. A apresentação clínica do LPO pode se assemelhar a lesões reacionais, excluindo da amostra lesões próximas a restaurações de amálgama ou a grampos de próteses parciais removíveis. Além disso, os critérios de inclusão do material de biópsias utilizados neste trabalho, como a quantidade e qualidade do tecido presente no bloco são outros fatores que auxiliam na redução do número de amostras.

Outra limitação encontrada na realização deste trabalho foi utilização somente de biópsias incisionais, material disponível nos arquivos do Laboratório de Patologia Bucal da FOB-USP. Os fragmentos recolhidos, muitas vezes não representa o padrão de comportamento predominante da lesão. Amostras pequenas das lesões impossibilitam também a realização de diversas análises, como a limitação do

número de marcadores no estudo imuno-histoquímico e a análise do tecido sadio adjacente à lesão.

As biópsias incisionais utilizadas neste trabalho foram as de melhor qualidade e quantidade de tecido para possibilitar a análise dos resultados sem prejuízos para a proposta deste estudo.

6.3 Dados epidemiológicos

A maioria dos pacientes com LPO foi do gênero feminino com idade média de 50,5 anos e as lesões estavam localizadas principalmente em mucosa jugal e língua. Esse perfil corrobora com aquele encontrado na literatura para o líquen plano oral (NEVILLE et al., 2004; EISEN et al., 2005; BRANT et al., 2008; SOUSA et al., 2008). No que se refere aos hábitos e vícios, 22,22% dos pacientes eram tabagistas, ex-tabagistas e/ou etilistas. Quanto ao tempo de evolução, as lesões apresentavam tempo médio de 11,5 meses e a maioria dos pacientes relataram sintomas associados com a lesão, como dor e queimação, de acordo com a Tabela 2.

Em concordância com a literatura, a maioria dos pacientes com leucoplasia com displasia epitelial moderada e severa foi do gênero masculino com idade média de 60,6 anos (PETTI, 2003). Notamos que 37,50% dos pacientes eram tabagistas, 25% ex-tabagistas e 12,50% etilistas. As lesões estavam localizadas principalmente em rebordo alveolar, com tempo médio de evolução de 17,97 meses e com apenas 11,11% dos pacientes apresentando sintomatologia dolorosa associada com a lesão, de acordo com as Tabelas 3 e 4.

6.4 Metodologia

Para verificação do diagnóstico histológico de acordo com o critério de Eisenberg (2000), as 14 amostras de LPO foram submetidas a novas secções histológicas receberam coloração de HE. As lesões de leucoplasia foram classificadas de acordo com a Organização Mundial da Saúde (GALE et al., 2005). No presente trabalho, das 14 amostras de leucoplasia selecionadas, 08 amostras

foram classificadas com displasia epitelial moderada e 06 casos apresentaram displasia epitelial severa. A classificação histológica das leucoplasias também foi realizada em lâminas contendo novos cortes histológicos corados em HE.

A técnica imuno-histoquímica consiste em uma reação que compreende um conjunto de procedimentos utilizando anticorpos como reagentes específicos para a detecção de antígenos presentes nas células e nos tecidos (POLAK et al., 1997). Essa técnica caracteriza-se pela fácil aplicabilidade e baixo custo, sendo amplamente utilizada na maioria dos trabalhos com proposta de avaliar a expressão de proteínas. Porém, sua aplicação deve ser cautelosa e bem empregada, além de serem reconhecidas suas restrições.

Os materiais de arquivo, como os blocos de parafina utilizados neste trabalho apresentam algumas limitações durante as reações imuno-histoquímicas, uma vez que o tipo e o tempo de fixação, a inclusão do tecido, as condições de armazenamento dentre outros fatores, podem dificultar desde a visualização de marcadores até a desnaturação de proteínas do tecido. A realização de testes prévios à pesquisa para o estabelecimento da diluição primária do anticorpo, do tipo de reação antigênica e do tempo de revelação das lâminas, contribui para o sucesso da reação.

Alguns marcadores, como o Bcl-2 e o Ki-67, já eram usados rotineiramente no laboratório de imuno-histoquímica do Instituto de Anatomia Patológica de Bauru (ANATOMED) e os testes realizados tiveram como objetivo apenas ajustar o protocolo para o material do presente estudo. A caspase-3 consistiu em um marcador adquirido recentemente e por isso fez-se necessário estabelecer um protocolo com base na literatura e na bula do próprio anticorpo.

Durante a realização dos testes, obteve-se um resultado pouco satisfatório para o marcador caspase-3, onde apresentou um intenso *background* dificultando a visualização da positividade. A não utilização dos resultados obtidos com a caspase-3 neste trabalho foi escolhida pela obtenção de resultados inadequados mesmo após a realização de inúmeros testes com variações na diluição do anticorpo primário, na recuperação antigênica, no anticorpo secundário e com a utilização de solução inibidora de ligações inespecíficas.

A inclusão desses anticorpos no presente trabalho foi baseada no envolvimento destes imunomarcadores na regulação da apoptose e da proliferação celular e por estarem diretamente relacionados ao processo de carcinogênese bucal (VAUX et al., 1988; KRAJEWSKA et al, 1997; DONOGHUE et al, 1999; HANAHAN et al., 2000; SCHWARTZ et al., 2000; KUMAMOTO et al., 2001; BARBOSA et al., 2003; SCHLIEPHAKE, 2003; TOBÓN-ARROYAVE et al., 2004; DE NARDI, 2007; LESSENE et al., 2008; BRENER, 2009; KANG et al., 2009).

Após a realização das reações e análise das lâminas, foi possível identificar que em uma mesma bateria havia cortes histológicos com imunomarcações mais fortes e outros mais fracos. Provavelmente, justifica-se pelas divergências no tratamento prévio dos tecidos, como a técnica cirúrgica empregada para remoção dos fragmentos, a qualidade e tempo de uso da solução fixadora e armazenamento dos blocos de parafina.

A análise dos resultados de todos os grupos deste trabalho foi avaliada por dois observadores, de maneira independente sem o conhecimento prévio das informações clínicas do paciente, e em caso de dúvida, um terceiro avaliador foi consultado.

A análise imuno-histoquímica foi realizada a partir da quantificação das células marcadas positivamente, determinadas pela coloração acastanhada, sem levar em consideração a intensidade da coloração. Os valores médios do número de células imunomarcadas/mm² foram utilizados para uma comparação entre as 3 regiões (camada basal, camada suprabasal e infiltrado inflamatório) avaliadas em coloração imuno-histoquímica, por cada proteína utilizada.

A análise estatística foi realizada com a finalidade de avaliar a existência de resultados significantes entre a expressão dos diferentes marcadores entre os grupos de LPO, leucoplasia com displasia epitelial e o grupo controle, e ainda entre a expressão dos marcadores entre cada região tecidual avaliada para cada grupo.

6.5 Imunomarcadores relacionados à apoptose e proliferação celular

6.5.1 Bcl-2

A família Bcl-2 é composta por dois grupos de proteínas: as antiapoptóticas e as pró-apoptóticas, cuja função é regular a apoptose, sendo que as duas principais proteínas antiapoptóticas são a Bcl-2 e Bcl-x (KUMAR et al., 2005). Em epitélios com proliferação normal, a proteína Bcl-2 é expressa em células indiferenciadas (células tronco), bem como as da camada basal, onde as previne de morrer. A expressão de Bcl-2 nas camadas suprabasais de lesões cancerizáveis bucais sugere um alto potencial de transformação maligna (TANDA et al., 2000).

A expressão imuno-histoquímica da proteína Bcl-2 no grupo do líquen plano oral mostrou-se positiva em 92,86% dos casos analisados na região de infiltrado inflamatório, sendo que a maioria das lesões (57,14%) de LPO teve expressão em 26-50% das células inflamatórias, 21,43% das lesões tiveram >50% das células com expressão positiva, 14,29% tiveram expressão em <10% das células inflamatórias e somente 01 lesão (7,14%) foi negativa para a expressão da proteína Bcl-2 (Tabela 5; Figura 1). A presença do infiltrado inflamatório é um importante requisito em lesões de LPO, sendo que a proteína Bcl-2 constitui um mecanismo importante para a persistência das células inflamatórias (TANDA et al., 2000; VALENTE et al., 2001; GONZÁLES-MOLES et al., 2006).

Nas células epiteliais basais e suprabasais das lesões de LPO, uma ausência ou baixa frequência de expressão (<10%) de Bcl-2 foi encontrada. Em células da camada basal, a proteína Bcl-2 foi negativa 92,86% das lesões e foi detectada em <10% das células em apenas uma lesão (07,14%).

A expressão em células da camada suprabasal em <10% das células foi observada em 01 lesão (07,14%) enquanto 13 lesões (92,86%) foram negativas, como visto na Tabela 5, sugerindo que a baixa frequência da apoptose não é uma consequência das ações antiapoptóticas mediada pela proteína Bcl-2.

No grupo das leucoplasias com displasia epitelial a expressão nuclear e citoplasmática de Bcl-2 em células da camada basal e suprabasal foi baixa (<10%) ou negativa. Em células da camada basal, a expressão de Bcl-2 foi detectada em

<10% das células em 85,71% das lesões e em 10-25% das células em apenas 02 lesões (Tabela 7; Figura 3).

A expressão em células da camada suprabasal foi negativa em 42,86% das lesões enquanto 57,14% das lesões de leucoplasia com displasia epitelial mostraram positividade em <10% das células, como demonstrado na Tabela 7.

Em relação à expressão da proteína Bcl-2 em células do infiltrado inflamatório, dos 14 casos de leucoplasia com displasia epitelial analisados, todos demonstraram positividade. A Tabela 7 mostra que 14,29% das lesões tiveram expressão em <10% das células inflamatórias, 35,71% tiveram 10-25% das células com expressão positiva, 35,71% tiveram expressão em 26-50% das células inflamatórias e 14,29% tiveram expressão da proteína Bcl-2 em >50% das células.

Vários relatos têm demonstrado a superexpressão de Bcl-2 na displasia epitelial (JORDAN et al., 1996; SINGH et al., 1998; RAVI et al., 1999). Enquanto outros relataram uma expressão esporádica ou total falta de expressão de Bcl-2 (SCHOELCH et al., 1999; McALINDEN et al., 2000). Os resultados mistos disponíveis sobre a expressão de Bcl-2 em displasias epiteliais parecem não ajudar em nossa compreensão sobre o papel dessa proteína na progressão da displasia.

No grupo controle (fragmentos de mucosa bucal normal) a expressão nuclear e citoplasmática de Bcl-2 em células da camada basal e suprabasal foi baixa ou ausente, sendo que a expressão da proteína foi notada em <10% das células em apenas 22,22% dos fragmentos de mucosa bucal normal, enquanto 77,78% dos fragmentos foram negativos (Tabela 9).

A expressão em células da camada suprabasal foi negativa em 88,89% dos fragmentos de mucosa bucal normal e apenas 11,11% mostrou positividade em <10% das células (Tabela 9).

Em relação à expressão da proteína Bcl-2 em células do infiltrado inflamatório, a Tabela 9 mostra que 33,33% dos fragmentos de mucosa bucal normal foram negativos, 55,56% dos fragmentos tiveram <10% das células com expressão positiva e 11,11% teve expressão da proteína Bcl-2 em 10-25% das células.

A correlação da expressão de Bcl-2 nos diversos níveis teciduais apresentada na Tabela 11 mostrou que houve diferença estatística significativa entre os grupos analisados. Foi possível encontrar significância na expressão de Bcl-2 nas células epiteliais da camada basal entre o grupo da leucoplasia com displasia epitelial quando comparado com o grupo de líquen plano oral e quando comparado com o grupo controle (fragmentos de mucosa bucal normal) ($p = 0,00$). Também foi notada diferença significativa na expressão de Bcl-2 nas células da camada suprabasal entre o grupo de líquen plano oral e o grupo das lesões de leucoplasia com displasia epitelial ($p = 0,01$). Em relação à expressão de Bcl-2 no infiltrado inflamatório, o grupo do líquen plano oral mostrou significância estatística quando comparado ao grupo controle ($p = 0,00$). Também notamos diferença estatística ($p = 0,00$) entre o grupo da leucoplasia com displasia epitelial e o grupo controle em relação à expressão da proteína Bcl-2 nas células inflamatórias. Como descrito em outras doenças inflamatórias crônicas, o infiltrado linfocitário e suas quimiocinas podem representar um forte fator de transformação maligna (BALKWILL et al., 2001; GONZÁLEZ-MOLES et al., 2006). Desta maneira, o infiltrado inflamatório pode ser responsável pela inibição da apoptose e pelo aumento da proliferação celular epitelial nessas doenças por ações do fator de inibição de macrófagos, quiminocinas reguladas sob ativação normalmente expressada e secretada por células T (RANTES) e ciclo-oxigenase-2 (COX 2) (GONZÁLEZ-MOLES et al., 2006).

Estes resultados sugerem que a expressão da proteína Bcl-2 poderia exercer uma função dupla no contexto do desenvolvimento e progressão tumoral. Se por um lado ela poderia estar exercendo efeitos relacionados com o desenvolvimento tumoral mediado por sua inibição à apoptose das células displásicas da camada basal, por outro lado, poderia também contribuir com a transformação maligna das lesões, provavelmente pela persistência do infiltrado inflamatório.

6.5.2 Ki-67

A detecção e a quantificação das células em proliferação, através da avaliação do Ki-67, constituem parâmetros importantes na identificação de neoplasias associada aos graus de malignidade (RABENHORST, 1994; SAKAI et al., 2002).

Em relação à expressão do Ki-67, a maioria das lesões de líquen plano oral (42,86%) apresentou uma expressão positiva em mais de 50% das células da camada basal (Tabela 6).

A expressão desta proteína foi positiva em <10% das células da camada suprabasal em 85,71% das lesões de LPO, enquanto apenas 14,29% das lesões tiveram expressão nuclear negativa (Tabela 6).

A expressão nuclear do Ki-67 em células do infiltrado inflamatório foi positiva em <10% das células de 78,57% dos LPO e 21,43% tiveram de 26-50% das células inflamatórias positivas (Tabela 6).

Estes resultados sugerem que o aumento da taxa de proliferação celular no epitélio, que ajudam a manter a arquitetura epitelial, pode ser a base para uma predisposição ao câncer em LPO. Além disso, a proliferação de células inflamatórias em lesões de líquen plano oral pode contribuir para o aparecimento e persistência do intenso infiltrado inflamatório nesta doença.

A maioria das lesões de leucoplasia com displasia epitelial (64,29%) apresentou uma expressão positiva da proteína Ki-67 em mais de 50% das células da camada basal e 35,71% das lesões apresentaram positividade em 26-50% das células.

A expressão desta proteína foi positiva em <10% das células da camada suprabasal em 92,86% das lesões de leucoplasia com displasia epitelial, enquanto apenas 07,14% das lesões teve expressão nuclear negativa.

A expressão nuclear do Ki-67 em células do infiltrado inflamatório foi positiva em <10% das células de 85,71% das lesões de leucoplasia com displasia epitelial e 14,29% tiveram de 10-25% das células inflamatórias positivas.

Esses achados reforçam a ideia de que o anticorpo anti-Ki-67 clone MIB-1 apresenta-se como um marcador confiável na determinação da atividade proliferativa de lesões de leucoplasia com displasia epitelial e apto a diferenciar um epitélio normal de um epitélio com displasia epitelial.

A expressão de Ki-67 em fragmentos de mucosa normal nas células da camada basal foi negativa em 22,22% dos fragmentos de mucosa bucal normal,

revelou-se positiva em <10% das células basais em 22,22% dos fragmentos, 04 44,45% dos fragmentos tiveram 10-25% das células epiteliais da camada basal com expressão nuclear positiva e apenas 11,11% dos fragmentos mostrou positividade em 26-50% das células da camada basal.

A maioria dos fragmentos de mucosa bucal normal (88,89%) apresentou uma expressão nuclear negativa para o Ki-67 nas células da camada suprabasal e somente 11,11% teve <10% das células com expressão positiva. A expressão nuclear do Ki-67 em células do infiltrado inflamatório foi negativa em 66,67% dos fragmentos de mucosa bucal normal, enquanto 33,33% dos fragmentos tiveram <10% das células inflamatórias positivas.

Na Tabela 12, observamos uma correlação estatística entre os grupos de líquen plano oral e o grupo da leucoplasia com displasia epitelial em todas as regiões analisadas (camada basal, camada suprabasal e infiltrado inflamatório) para a expressão do Ki-67.

A taxa de proliferação celular em todos os níveis teciduais analisados são superiores nas lesões de LPO e leucoplasia com displasia epitelial quando comparados com a amostra controle. Nesse contexto, propomos que a expressão da proteína Ki-67 em qualquer nível tecidual, poderia ser considerada um marcador adjuvante na avaliação da atividade proliferativa de lesões com potencial maligno.

6.6 Perspectivas

O desenvolvimento do câncer é considerado atualmente como um processo de alterações oncogênicas somatórias.

A identificação de marcadores imuno-histoquímicos e a expressão de genes associados com a proliferação celular e regulação da apoptose tem se tornado alvo de muitos estudos na linha de pesquisa da carcinogênese bucal objetivando sua aplicabilidade na rotina da patologia.

A associação da expressão da proteína Bcl-2 com a presença da expressão de Ki-67, quando comparado às lesões de líquen plano oral e de leucoplasia com

displasia epitelial, nos faz pensar que as células epiteliais em proliferação estão sendo intensamente atacadas por células inflamatórias em proliferação e que não entram em apoptose, o que poderia levar a um acúmulo de eventos mutagênicos e possivelmente a um fenótipo maligno.

O valor prognóstico dos imunomarcadores estudados neste trabalho, na rotina da avaliação de lesões cancerizáveis bucais, necessita de novos estudos. Outras pesquisas, com amostras maiores e análise desses e de outros genes, bem como seus produtos também envolvidos na carcinogênese bucal, serão de grande valia, a fim de direcionar melhor a conduta clínica dos profissionais, propiciando uma atuação preventiva nos pacientes.

7 Conclusões

7 CONCLUSÕES

A análise imuno-histoquímica da proteína Bcl-2 e do Ki-67 nas 37 amostras (14 lesões de líquen plano oral, 14 lesões de leucoplasia com displasia epitelial e 09 fragmentos de mucosa bucal normal) permitiu verificar:

- que a expressão de Bcl-2 em células epiteliais, da camada basal e suprabasal, ocorreu mais frequentemente no grupo da leucoplasia com displasia epitelial, sugerindo um mecanismo relacionado com o desenvolvimento tumoral mediado por sua inibição à apoptose das células displásicas da camada basal;
 - que provavelmente a alta expressão da proteína Bcl-2 em células inflamatórias de lesões de LPO e de leucoplasia com displasia epitelial contribuiria também, com a persistência do infiltrado inflamatório;
 - que a expressão do marcador Ki-67 foi superior em todos os níveis teciduais analisados nas lesões de LPO e de leucoplasia com displasia epitelial, indicando que este poderia ser considerado um marcador adjuvante na avaliação da atividade proliferativa de lesões com potencial maligno;
 - que a expressão mais elevada das proteínas Bcl-2 e Ki-67 nos casos de líquen plano oral e de leucoplasia com displasia epitelial, podem revelar a possibilidade da presença de alterações moleculares morfologicamente imperceptíveis.
-

Referências

REFERÊNCIAS

Barbosa TV, Rosa MP, Costa AC, Rapoport A. Valor prognóstico do Ki-67 no carcinoma indiferenciado de grandes células de glândula salivar maior: estudo de 11 casos. *Rev Bras Otorrinolaringol.* 2003;69(5):629-34.

Balkwill F, Mantovani A. Inflammation and cancer: back to virchow? *Lancet.* 2001;357(9255):539-45.

Bascones C, Gonzales-Moles MA, Esparza G, Bravo M, Acevedo A, Gil-Montoya JA, et al. Apoptosis and cell cycle arrest in oral lichen planus Hypothesis on their possible influence on its malignant transformation. *Arch Oral Biol.* 2005;50(10):873-81.

Brant JM, Vasconcelos AC, Rodrigues LV. Role of apoptosis in erosive and reticular oral lichen planus exhibiting variable epithelial thickness. *Braz Dent J.* 2008;19(3):179-85.

Brener S. Expressão da substância P e de seu receptor Neuroquinina-1 em carcinomas espinocelulares de boca e sua implicação na atividade proliferativa tumoral. [tese]. Bauru (SP): Faculdade de Odontologia de Bauru, Universidade de São Paulo; 2009.

Chang HY, Yang X. Proteases for cell suicide: functions and regulation of caspases. *Microbiol Mol Biol Rev.* 2000;64(4):821-46.

Da Silva LMF, Do Carmo MAV. Identification of the AgNORs, PCNA and ck16 proteins in oral lichen planus lesions. *Oral Dis.* 2001;7(6):344-8.

De Nardi, AB. Correlação da ciclooxigenase-2 com Ki-67, p53 e caspase-3 nas neoplasias de mama em cadelas. [tese]. Jaboticabal (SP). Faculdade de Ciências Agrárias, Universidade Estadual Paulista; 2007.

Denault JB, Salvesen GS. Apoptotic caspase activation and activity. *Methods Mol Biol.* 2008;(414):191-220.

Dietrich T, Reichart PA, Scheifele C. Clinical risk factors of oral leukoplakia in a representative sample of the US population. *Oral Oncol.* 2004;40(2):158-63.

Donoghue S, Baden HS, Lauder I, Sobolewski S, Pringle JH. Immunohistochemical localization of caspase-3 correlates with clinical outcome in B-cell diffuse large-cell lymphoma. *Cancer Res.* 1999;59(20):5386-91.

Edwards PC, Kelsch R. Oral lichen planus: clinical presentation and management. *J Can Dent Assoc.* 2002;68(8):494-9.

Eisen D. The clinical features, malignant potential and systemic associations of the oral lichen planus: a study of 723 patients. *J Am Acad Dermatol.* 2002;46(2):207-14.

Eisen D, Carrozzo M, Bagan Sebastian JV, Thongprason K. Number V Oral lichen planus: clinical features and management. *Oral Dis.* 2005;11(6):338-49.

Eisenberg E. Oral lichen planus: a benign lesion. *J Oral Maxillofac Surg.* 2000;58(11):1278-85.

Ellis HM, Horvitz HR. Genetic control of programmed cell death in the nematode *C. elegans*. 1986;44(6):817-29.

Elmore S. Apoptosis: a review of programmed cell death. *Toxicol Pathol.* 2007;35(4):495-516.

Evan GI, Voudsen KH. Proliferation, cell cycle and apoptosis in cancer. *Nature.* 2001;411(6835):342-8.

Fan TJ, Han LH, Cong RS, Liang J. Caspase family proteases and apoptosis. *Acta Biochim Biophys Sin.* 2005;37(11):719-27.

Gale N, Pilch BZ, Sidransky D, El Naggar A, Westra W, Califano J, et al. Epithelial precursor lesions. In: Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. *World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and genetics: head and neck tumours.* Lyon: IARC Press; 2005.

Gandolfo S, Richiard L, Carrozzo M, Broccoletti R, Carbone M, Pagano M, et al. Risk of oral squamous cell carcinoma in 402 patients with oral lichen planus: a follow-up study in an Italian population. *Oral Oncol.* 2004;40(1):77-83.

González-Moles MA, Bascones-Iludain C, Gil-Montoya JA, Ruiz-Avila I, Delgado-Rodriguez M, Bascones-Martinez A. Cell cycle regulating mechanisms in oral lichen planus: molecular basis in epithelium predisposed to malignant transformation. *Arch Oral Biol.* 2006;51(12):1093-103.

Grutter GM. Caspases: key players in programmed cell death. *Curr Opin Struct Biol.* 2000;10(6):649-55.

Häcker G. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res.* 2000;301(1):5-17.

Hanahan D, Weinberg RA. The hallmarks of cancer. *Cell.* 2000;100(1):57-70.

Hengartner MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature.* 2000;407(6805):685-7.

Hirota M, Ito T, Okudela K, Kawabe R, Yazawa T, Hayashi H, et al. Cell proliferation activity and the expression of cell cycle regulatory proteins in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med.* 2002;31(4):204-12.

Igney FH, Krammer PH. Death and anti-death: tumour resistance to apoptosis. *Nat Rev Cancer*. 2002;2(4):277-88.

Jin Z, El-Deiry WS. Overview of cell death signaling pathways. *Cancer Biol Ther*. 2005;4(2):139-63.

Jordan RC, Catzavelos GC, Barret AW, Speight PM. Differential expression of bcl-2 and bax in squamous cell carcinomas of the oral cavity. *Eur J Cancer B Oral Oncol*. 1996;32B(6):394-400.

Kang MH, Reynolds CP. Bcl-2 inhibitors: targeting mitochondrial apoptotic pathways in cancer therapy. *Clin Cancer Res*. 2009;15(4):1126-32.

Kaufmann SH, Lee SH, Meng XW, Loegering DA, Kottke TJ, Henzing AJ, et al. Apoptosis-associated caspase activation assays. *Methods*. 2008;44(3):262-72.

Kerr JF, Wyllie AH, Currie AR. Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide-ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972;26(4):239-57.

Kerr JF, Winterford CM, Harmon BV. Apoptosis. Its significance in cancer and cancer therapy. *Cancer*. 1994;73(8):2013-16.

King KL, Cidlowski JA. Cell cycle and apoptosis: common pathways to life and death. *J Cell Biochem*. 1995;58(2):175-80.

Köhler C, Orrenius S, Zhivotovsky B. Evaluation of caspase activity in apoptotic cells. *J Immunol Methods*. 2002;265(1-2):97-110.

Korsmeyer SJ. Programmed cell death and the regulation of homeostasis. *Harvey Lect*. 1999;(95):21-41.

Krajewska M, Wang HG, Krajewski S, Zapata A, Shabaik A, Gascoyne R, et al. Immunohistochemical analysis of in vivo patterns of expression of CCP32 (Caspase-3), a cell death protease. *Cancer Res.* 1997;57(8):1605-13.

Krammer PH. CD95(APO-1/Fas)-mediated apoptosis: live and let die. *Adv Immunol.* 1999;71:163-210.

Kroemer G, Petit P, Zamzami N, Vayssière JL, Mignotte B. The biochemistry of programmed cell death. *FASEB J.* 1995;9(13):1277-87.

Kroemer G. The proto-oncogene Bcl-2 and its role in regulating apoptosis. *Nat Med.* 1997;3(6):614-20.

Küffer R, Lombardi T. Premalignant lesions of the oral mucosa. A discussion about the place of oral intraepithelial neoplasia (OIN). *Oral Oncol.* 2002;38(2):125-30.

Kumamoto H, Kimi K, Ooya K. Immunohistochemical analysis of apoptosis-related factors (Fas, Fas ligand, caspase-3, and single-stranded DNA) in ameloblastomas. *J Oral Pathol Med.* 2001;30(10):596-602.

Kumar V, Abbas AK, Fausto N. *Patologia: Bases Patológicas das Doenças*. 7. ed. Rio de Janeiro: Elsevier; 2005.

Lanfranchi-Tizeira HE, Aguas SC, Sano SM. Malignant transformation of atypical oral lichen planus: a review of 32 cases. *Med Oral.* 2003;8(1):2-9.

Kurosaka K, Takahashi M, Watanabe N, Kobayashi Y. Silent cleanup of very early apoptotic cells by macrophages. *J Immunol.* 2003;171(9):4672-9.

Lee JJ, Kuo MJ, Cheng SJ, Chiang CP, Jeng JH, Chang HH, et al. Higher expressions of p53 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in atrophic oral lichen planus and patients with areca quid chewing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005;100(2):164-78.

Lessene G, Czabotar PE, Colman PM. Bcl-2 family antagonists for cancer therapy. *Nat Rev Drug Discov.* 2008;7(12):989-1000.

Li MH, Ito D, Sanada M, Odani T, Hatori M, Iwase M, Naqumo M. Effect of 5-fluorouracil on G1 phase cell cycle regulation in oral cancer cell lines. *Oral Oncol.* 2004;40(1):63-70.

Liu SC, Klein-Szanto AJ. Marker of proliferation in normal and leukoplakic oral epithelia. *Oral Oncol.* 2000;36(2):145-51.

Locksley RM, Killeen N, Lenardo MJ. The TNF and TNF receptor superfamilies: integrating mammalian biology. *Cell.* 2001;104(4):487-501.

Lodi G, Scully C, Carrozzo M, Griffiths M, Suqerman PB, Thongprson K. Current controversies in oral lichen planus: report of an international consensus meeting. Part 2. Clinical management and malignant transformation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2005;100(2):164-78.

Loro LL, Vintermyr OK, Johannessen AC. Cell death regulation in oral squamous cell carcinoma: methodological considerations and clinical significance. *J Oral Pathol Med.* 2003;32(3):125-38.

Lowe SW, Lin AW. Apoptosis in cancer. *Carcinogenesis.* 2000;21(3):485-95.

Neppelberg E, Johannessen AC, Jonsson R. Apoptosis in oral lichen planus. *Eur J Oral Sci.* 2001;109(5):361-4.

McAlinden RL, Maxwell P, Napier S, Hamilton P, Cowan CG, Lundy FT, et al. Bcl-2 expression in sequential biopsies of potentially malignant oral mucosal lesions assessed by immunocytochemistry. *Oral Dis.* 2000;6(5):318-6.

McDonnell TJ, Korsmeyer SJ. Progression from lymphoid hyperplasia to high-grade malignant lymphoma in mice transgenic for the t(14;18). *Nature*. 1991;349(6306):254-6.

Mignogna MD, Fedele S, Lo Russo L, Lo Muzio, Bucci E. Immune activation and chronic inflammation as the cause of malignancy in oral lichen planus: is there any evidence? *Oral Oncol*. 2004;40(2):120-30.

Mollaoglu N. Oral lichen planus: a review. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2000;38(4):370-7.

Napier SS, Speight PM. Natural history of potentially malignant oral lesions and conditions: an overview of the literature. *J Oral Pathol Med*. 2008;37(1):1-10.

Neville BW, Damm DD, Allen CM, Bouquot JE. *Oral and bucomaxillofacial pathology*. 2 nd ed. Philadelphia: WB Saunder; 2004.

O'Donovan N, Crown J, Stunell H, Hill AD, McDermott E, O'Higgins N, et al. Caspase 3 in breast cancer. *Clin Cancer Res*. 2003;9(2):738-42.

Ohashi E, Miyajima N, Nakagawa T, Takahashi T, Kagechika H, Mochizuki M, et al. Retinoids induce growth inhibition and apoptosis in mast cell tumor cell lines. *J Vet Med Sci*. 2006;68(8):797-802.

Petti S. Pooled estimate of world leukoplakia prevalence: a systematic review. *Oral Oncol*. 2003;39(8):770-80.

Peña LL, Nieto AI, Pérez-Alenza D, Cuesta P, Castaño M. Immunohistochemical detection of Ki-67 and PCNA in canine mammary tumors: relationship to clinical and pathologic variables. *J Vet Diagn Invest*. 1998;10(3):237-46.

Pindborg JJ, Reichart PA, Smith CJ, van der Waal I, Sobin LH. World Health Organization. International classification of tumors: histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa. 3rd ed. Berlin: Springer; 1997.

Rabenhorst, SH. Ciclo celular: mecanismos reguladores e marcadores bioquímicos. Rev Bras Cancerol. 1994;40(2):141-47.

Raff MC. Size control: the regulation of cell numbers in animal development. Cell. 1996;86(2):173-5.

Ravagnan L, Roumier T, Kroemer G. Mitochondria, the killer organelles and their weapons. J Cell Physiol. 2002;192(2):131-7.

Ravi D, Ramadas K, Mathew BS, Nalinakumari KR, Nair MK, Pillai MR. De novo programmed cell death in oral cancer. Histopathology. 1999;34(3):241-9.

Regezi JC, Sciubba JJ. Patologia bucal: correlações clínico-patológicas. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000.

Reichert PA. Identification of risk groups for oral precancer and cancer and preventive measures. Clin Oral Invest. 2001;5(4):207-13.

Sakai H, Noda A, Shirai N, Iidaka T, Yanai T, Massey T, et al. Proliferative activity of canine mast cell tumours evaluated by bromodeoxyuridine incorporation and Ki-67 expression. J Comp Pathol. 2002;127(4):233-8.

Salvesen GS, Dixit VM. Caspases: intracellular signaling by proteolysis. Cell. 1995;91(4):443-6.

Savill J, Fadok V. Corpse clearance defines the meaning of cell death. Nature. 2000;407(6805):784-8.

Schliephake H. Prognostic relevance of molecular markers of oral cancer – a review. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2003;32(3):233-45.

Schmitz I, Kirchhoff S, Krammer PH. Regulation of death receptor-mediated apoptosis pathways. *Int J Biochem Cell Biol.* 2000;32(11-12):1123-36.

Schoelch ML, Le QT, Silverman Junior S, McMillan A, Dekker NP, Fu KK, et al. Apoptosis-associated proteins and the development of oral squamous cell carcinoma. *Oral Oncol.* 1999;35(1):77-85.

Schwartz JL, Gu X, Kittles RA, Baptiste A, Shklar G. Experimental oral carcinoma of the tongue and buccal mucosa: possible biologic markers linked to cancers at two anatomic sites. *Oral Oncol.* 2000;36(2):225-35.

Scorrano L, Korsmeyer SJ. Mechanisms of cytochrome c release by proapoptotic Bcl-2 family members. *Biochem Biophys Res Commun.* 2003;304(3):437-44.

Singh BB, Chandler Junior FW, Whitaker SB, Forbes-Nelson AE. Immunohistochemical evaluation of bcl-2 oncoprotein in oral dysplasia and carcinoma. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1998;85(6):692-8.

Soares FD. Avaliação da expressão das proteínas p53, Bcl-2 e antígeno da proliferação celular Ki-67 em lesões hiperplásicas, cancerizáveis e carcinomas de células escamosas bucais [tese]. Niterói (RJ): Universidade Federal Fluminense; 2005.

Sousa FA, Rosa LE. Oral lichen planus: clinical and histopathological considerations. *Braz J Otorhinolaryngol.* 2008;74(2):284-92.

Sousa FA, Paradella TC, Carvalho YR, Rosa LE. Immunohistochemical expression. Of PCNA, p53, bax and bcl-2 in oral lichen planus and epithelial dysplasia. *J Oarl Sci.* 2009;51(1):117-21.

Strasser A, O'Connor L, Dixit VM. Apoptosis signaling. Annu Rev Biochem. 2000;69:217-45.

Sulston JE, Horvitz HR. Post-embryonic cell lineages of nematode, *Caenorhabditis elegans*. 1977;56(1):110-56.

Takano YS, Harmon BV, Kerr JF. Apoptosis induced by mild hyperthermia in human and murine tumor cell lines: a study using electron microscopy and DNA gel electrophoresis. J Pathol. 1991;163(4):329-36.

Tanda N, Mori S, Saito K, Ikawa K, Sakamoto S. Expression of apoptotic signaling proteins in leukoplakia and oral lichen planus: quantitative and topographical study. J Oral Pathol Med. 2000;29(8):385-93.

Terzian ACB, Zuccari DAPC, Pereira RS, Pavam MV, Ruiz CM, Sueiro FAR, et al. Avaliação da caspase-3 e Ki-67 como marcadores prognósticos nas neoplasias mamárias em cadelas. Braz J Vet Anim Sci. 2007; 44(2):96-102.

Tobón-Arroyave SI, Villegas-Acosta FA, Ruiz-Restrepo SM, Vieco-Durán B, Restrepo-Misas M, Londoño-López ML. Expression of caspase-3 and structural changes associated with apoptotic cell death of keratinocytes in oral lichen planus. Oral Dis. 2004;10(3):173-8.

Thompson CB. Apoptosis in the pathogenesis and treatment of disease. Science. 1995;267(5203):1456-62.

Valente G, Pagano M, Carrozzo M, Carbone M, Bobba V, Palestro G, et al. Sequential immunohistochemical p53 expression in biopsies of oral lichen planus undergoing malignant evolution. J Oral Pathol Med. 2001;30(3):135-40.

van der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. Oral Oncol. 2009;45(4-5):317-23.

Vaux DL, Cory S, Adams JM. Bcl-2 gene promotes hematopoietic cell survival and cooperates with c-myc to immortalize pre-B cells. *Nature*. 1988;335(6189):440-2.

Vermeulen K, Van Bockstaele DR, Berneman ZN. Apoptosis: mechanisms and relevance in cancer. *Ann Hematol*. 2005;84(10):627-39.

Wallach D, Varfolomeev EE, Malinin NL, Goltsev YV, Kovalenko AV, Boldin MP. Tumor necrosis factor receptor and Fas signaling mechanisms. *Annu Rev Immunol*. 1999;(17):331-67.

Weidner N, Moore DH 2nd, Vartanian R. Correlation of Ki-67 antigen expression with mitotic figure index and tumor grade in breast carcinomas using the novel "paraffin"-reactive MIB1 antibody. *Hum Pathol*. 1994;25(4):337-42.

Wight AJ, Ogden GR. Possible mechanisms by which alcohol may influence the development of oral cancer-a review. *Oral Oncol*. 1998;34(6):441-7.

Xue JL, Fan MW, Wang SZ, Chen XM, Li Y, Wang L. A clinical study of 674 patients with oral lichen planus in China. *J OralPathol Med*. 2005;34(8):467-72.

Zhivotovsky B. Caspases: the enzyme of death. *Essays Biochem*. 2003;(39):25-40.

Zimmermann KC, Green DR. How cells die: apoptosis pathways. *J Allergy Clin Immunol*. 2001;108(4):99-103.

Anexo

ANEXO A – Aprovação do Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEP)
da Faculdade de Odontologia de Bauru da Universidade de São Paulo.

Universidade de São Paulo
Faculdade de Odontologia de Bauru

Al. Dr. Octávio Pinheiro Brisolla, 9-75 – Bauru-SP – CEP 17012-901 – C.P. 73
PABX (0XX14)3235-8000 – FAX (0XX14)3223-4679

Comitê de Ética em Pesquisa (14)3235-8356
e-mail: mferrari@fob.usp.br

Processo nº 047/2011

Bauru, 29 de abril de 2011.

Senhor Professor,

O projeto de pesquisa encaminhado a este Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos, denominado **"Expressão imuno-histoquímica de Bcl-2, Ki-67 e caspase 3 ativa em líquen plano oral e leucoplasia com diferentes graus de displasia"**, de autoria de Fernanda Mombrini Pigatti, que será desenvolvido sob sua orientação, foi enviado ao relator para avaliação e apreciado em reunião realizada no dia **27 de abril de 2011**.

"O CEP-FOB/USP considerou o projeto **APROVADO** lembrando que a condição de aprovação da pesquisa propriamente dita exige o que segue:

- que sejam encaminhados ao CEP-FOB/USP relatórios anuais sobre o andamento da pesquisa (parciais e finais), conforme o cronograma apresentado;
- que sejam notificados ao CEP-FOB/USP, com a devida justificativa, qualquer modificação na metodologia e/ou título e a inclusão ou exclusão de autores;
- na apresentação do relatório final, incluir todos os TCLEs e/ou termos de doação de dentes devidamente assinados e rubricados.

Atenciosamente,

Prof. Dr. Flávio Augusto Cardoso de Faria
Vice-Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
FOB-USP
Prof. Dr. Flávio Augusto Cardoso de Faria
Coordenador do Comitê de Ética em Pesquisa
FOB-USP

Prof. Dr. Luis Antonio de Assis Taveira
Docente do Departamento de Estomatologia