

MÔNICA GHISLAINE OLIVEIRA ALVES

**AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS p53, MDM2
E SUMO-1 EM LÍQUEN PLANO BUCAL, DISPLASIA
EPITELIAL BUCAL E CARCINOMA DE CÉLULAS
ESCAMOSAS BUCAL**



2011

MONICA GHISLAINE OLIVEIRA ALVES

AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DAS PROTEÍNAS p53, MDM2 E SUMO-1 EM LÍQUEN PLANO BUCAL, DISPLASIA EPITELIAL BUCAL E CARCINOMA DE CÉLULAS ESCAMOSAS BUCAL

Dissertação apresentada à Faculdade de Odontologia, Campos de São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista, como parte dos requisitos para obtenção do título de MESTRE, pelo Programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área Patologia.

Orientadora: Profa. Adj. Janete Dias Almeida
Co-Orientador: Prof. Tit. Fabio Daumas Nunes

São José dos Campos

2011

Apresentação gráfica e normalização de acordo com:
Alvarez S, Coelho DCAG, Couto RAO, Durante APM. Guia prático para
Normalização de Trabalhos Acadêmicos da FOSJC. São José dos
Campos: FOSJC/UNESP; 2010.

A87a Alves, Mônica Ghislaine Oliveira.
Avaliação da expressão das proteínas p53, MDM2 e SUMO-1 em líquen plano bucal,
displasia epitelial bucal e carcinoma epidermóide bucal / Mônica Ghislaine Oliveira
Alves. __ São José dos Campos : [s.n.], 2011
74f. : il.

Dissertação (Mestrado em Odontologia Restauradora) – Faculdade de Odontologia de
São Jose dos Campos, Universidade Estadual Paulista, 2011.
Orientador: Profa. Dra. Janete Dias Almeida
Co-orientador: Fabio Daumas Nunes

1. Líquen plano. 2. Carcinoma epidermóide. 3. Imunoistoquímica. 4. Proteína p53
supressora de tumor. 5. Proteínas de proto-oncogene c-MDM2. 6. Proteína SUMO-1.
I. Almeida, Janete Dias. II. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Odontologia
de São José dos Campos. III. Título

tD791

Ficha catalográfica elaborada pelo Serviço Técnico de Biblioteca e Documentação da
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP

AUTORIZAÇÃO

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por
qualquer meio convencional ou eletrônico, desde que citada a fonte.

São José dos Campos, 18 de julho de 2011.

Assinatura :

E-mail: mgoliveiraalves@gmail.com

BANCA EXAMINADORA

Profa. Adj. Janete Dias Almeida (Orientadora)

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
UNESP – Univ. Estadual Paulista

Prof. Adj. Fabio Ramoa Pires

Faculdade de Odontologia
Universidade do Estado do Rio de Janeiro

Profa. Dra. Adriana Aigotti Haberbeck Brandão

Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
UNESP – Univ. Estadual Paulista

São José dos Campos, 18 de julho de 2011.

DEDICATÓRIA

À minha mãe (*in memoriam*), pelo amor, carinho, exemplo de caráter e força. Foi uma honra poder conviver e aprender com um ser de luz como você.

Ao meu marido Marcus. Esta conquista também é fruto de seu apoio, compreensão e incentivo constantes. Obrigada pelo seu amor.

Aos meus irmãos, avós, madrinha, sogros e amigos, pelo apoio através dos seus gestos e orações.

AGRADECIMENTOS

À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na pessoa do diretor da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Prof. José Roberto Rodrigues e do vice-diretor Prof. Carlos Augusto Pavanelli.

Ao Programa de Pós-graduação em Biopatologia Bucal e aos seus docentes.

A minha orientadora, Profa. Adj. Janete Dias Almeida, pelo carinho, disponibilidade, atenção, amizade, conhecimentos transmitidos e pela oportunidade que tanto me fez crescer pessoal e profissionalmente.

Ao Prof. Tit. Fabio Daumas Nunes, pela atenção, conhecimentos transmitidos e pelo suporte oferecido na realização desta pesquisa.

Ao Prof. Adj. Luiz Antonio Guimarães Cabral, pela convivência e disponibilidade em transmitir seus conhecimentos e sua filosofia de trabalho.

Aos funcionários da FOSJC-UNESP e FOUSP, que sempre me ajudaram a superar os obstáculos do cotidiano.

Aos colegas da pós-graduação, pelo convívio e troca de conhecimentos, em especial aos amigos Celina, Luis Felipe, Luana, Daniel e Jucely.

As alunas de Iniciação Científica: Bruna, Nathália e Paloma, pela disponibilidade, atenção e amizade.

As meninas do CEBAPE, pela ajuda nos momentos difíceis.

Ao Laboratório CIPAX, na pessoa do Dr. Ricardo Silvestre Macarenco, pelo empréstimo do bloco de seminoma.

Ao CNPq, FUNDUNESP E FUJEPO pelo financiamento deste trabalho.

À CAPES pela auxílio financeiro através da bolsa de mestrado.

Vá até onde puder ver. Quando lá
chegar, poderá ver ainda mais longe.

Johann Wolfgang Von Goethe

SUMÁRIO

LISTA DE FIGURAS	09
LISTA DE QUADROS E TABELAS	10
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	11
RESUMO	12
ABSTRACT	13
1 INTRODUÇÃO	14
2 REVISÃO DE LITERATURA	17
2.1 Líquen plano	17
2.1.1 Potencial de transformação maligna	22
2.2 Mecanismo de constituição das neoplasias malignas.....	26
2.3 Proteínas p53, MDM2 e SUMO-1 – Definições e funções	
básicas.....	27
2.3.1 Proteína p53.....	27
2.3.2 Proteína MDM2	28
2.3.3 SUMO proteína 1	29
2.4 Proteínas p53, MDM2 e SUMO-1 – Expressão em neoplasias e	
no líquen plano bucal	31
3 PROPOSIÇÃO	35
4 MATERIAL E MÉTODO.....	36
4.1 Casuística	36
4.2 Critérios Diagnósticos	37
4.3 Técnica Imunoistoquímica	41
4.4 Análise das lâminas	44
4.5 Análise estatística	45
5 RESULTADOS.....	46
5.1 Avaliação da técnica de Histoquímica.....	46

5.2	Avaliação da técnica de Imunoistoquímica.....	48
5.2.1	Expressão Imunoistoquímica da proteína p53	48
5.2.2	Expressão Imunoistoquímica da proteína MDM2.....	50
5.2.3	Expressão Imunoistoquímica da proteína SUMO-1.....	52
5.2.4	Expressão de p-53, MDM2, SUMO-1 versus gradação das displasias epiteliais.....	54
5.2.5	Expressão de p-53, MDM2, SUMO-1 versus gradação dos carcinomas epidermóides.....	54
6	DISCUSSÃO	56
7	CONCLUSÃO.....	63
8	REFERÊNCIAS.....	64
	ANEXOS	73

LISTA DE FIGURAS

Figura 1 - Expressão da p53 nas amostras estudadas por escores.	48
Figura 2 - Padrão de marcação do anticorpo anti-p53 (200x).....	49
Figura 3 - Expressão da MDM2 nas amostras estudadas por escores..	50
Figura 4 - Padrão de marcação do anticorpo anti-MDM2 (200x)	51
Figura 5 - Expressão da SUMO-1 nas amostras estudadas por escores	52
Figura 6 - Padrão de marcação do anticorpo anti-SUMO-1 (200x).....	53

LISTA DE QUADROS E TABELAS

Quadro 1 - Critérios histológicos para o diagnóstico do líquen plano bucal (Eisenberg, 2000).....	38
Quadro 2 - Critérios histológicos para o diagnóstico da displasia epitelial (Barnes et al., 2005)	39
Quadro 3 - Critérios histológicos para o diagnóstico da displasia epitelial (Barnes et al., 2005)	39
Quadro 4 - Critérios histológicos para o diagnóstico da displasia epitelial (Kujan et al., 2006)	40
Quadro 5 - Critérios histológicos para o diagnóstico do carcinoma de células escamosas (Barnes et al., 2005)	41
Quadro 6 - Anticorpos primários	43
Quadro 7 - Escores (Nakagawa et al., 1994)	44
Tabela 1 - Classificação das displasias epiteliais (OMS e Sistema binário de classificação).....	47
Tabela 2 - Expressão de p53, MDM2 e SUMO-1 em diferentes graus de carcinoma de células escamosas	54
Tabela 3 - Expressão de p53, MDM2 e SUMO-1 em diferentes graus de carcinoma de células escamosas	55

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCE	= carcinoma de células escamosas
CEPh	= Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos
DE	= displasia epitelial
DL	= displasia liquenóide
FOSJC	= Faculdade de Odontologia de São José dos Campos
FOUSP	= Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo
HFI	= hiperplasia fibrosa inflamatória
IL-4	= interleucinas 4
IL-6	= interleucinas 6
IL-10	= interleucinas 10
INF-gama	= Interferon gama
LP	= líquen plano
MDM2	= <i>murine double minute-2</i>
MEC	= matriz extracelular
MIF	= fator inibidor de macrófagos
MMP	= metaloproteinases de matriz
MN	= mucosa com aspecto clínico de normalidade
OMS	= Organização Mundial de Saúde
SUMO-1	= pequena proteína modificadora semelhante à ubiquitina -1
ou SUMO	proteínas-1
Th1	= linfócitos auxiliares 1
Th2	= linfócitos auxiliares 2
TNF	= fator de necrose tumoral
TNF-alfa	= fator de necrose tumoral alfa
UNESP	= Universidade Estadual Paulista

Alves MGO. Avaliação da expressão das proteínas p53, MDM2, e SUMO-1 em líquen plano bucal, displasia epitelial bucal e carcinoma de células escamosas bucal [dissertação]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, UNESP – Univ Estadual Paulista; 2011.

RESUMO

O líquen plano (LP) é caracterizado como uma doença crônica de cunho autoimune que apresenta prevalência estimada de 2% na população em geral. Há grande controvérsia quanto à classificação da Organização Mundial de Saúde de que este seria uma desordem potencialmente maligna. O presente trabalho tem como proposição avaliar a expressão das proteínas p53, MDM2 e SUMO-1 em lesões de LP bucal e comparar a expressão destas proteínas com a observada em displasia epitelial (DE) bucal e carcinoma de células escamosas (CCE) bucal. A amostra por interesse foi constituída por cinco grupos de lesões em mucosa jugal. O primeiro grupo foi constituído por amostras de mucosa com aspecto clínico de normalidade (MN), o segundo por hiperplasia fibrosa inflamatória (HFI), o terceiro por LP, o quarto por DE e o quinto grupo por CCE. Estas amostras teciduais foram submetidas a exame histoquímico pela técnica da hematoxilina-eosina e exame imunoistoquímico para anticorpo anti-p53, anti-MDM2 e anti-SUMO-1. Os dados foram tabulados e tratados pelos testes de Kolmogorov-Smirnov e exato de Fisher. Os resultados do presente estudo mostraram que não houve diferença estatisticamente significativa da expressão de p53 quando comparado LP com DE ($p=0.2042$) e com CCE ($p=0.0656$), esta diferença estava presente quando o LP foi comparado a HFI ($p=0.00001$) e a MN ($p=0.0007$). A diferença na expressão da MDM2 não foi estatisticamente significativa quando comparado LP com DE ($p=1.0$) e com CCE ($p=0.9972$), mas não estava presente quando o LP foi comparado a HFI ($p=0.0005$) e a MN ($p=0.0052$). Em relação à proteína SUMO-1, houve diferença estatisticamente significativa quando comparado LP com DE ($p=0.0492$) e com CCE ($p=0.0001$), na comparação de LP com HFI ($p=1.0$) e com MN ($p=0.8302$) não houve diferença estatisticamente significativa. Conclui-se pela necessidade de estudos para esclarecer o papel da inflamação como possível agente relacionado aos casos de LP que sofreram transformação maligna.

Palavras-chave: Líquen plano. Carcinoma de células escamosas. Imunoistoquímica. Proteína Supressora de Tumor p53. Proteínas Proto-Oncogênicas c-mdm2. Proteína SUMO-1.

Alves MGO. Evaluation of the immunohistochemical expression of p53, MDM2, and SUMO-1 in oral lichen planus, oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma [dissertation]. São José dos Campos: School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP - Univ Estadual Paulista; 2011.

ABSTRACT

Lichen planus (LP) is a chronic autoimmune disease with an estimated prevalence of 2% in the general population. Controversy exists regarding the World Health Organization classification of LP as a potentially malignant disease. The objective of this study was to investigate the expression of proteins p53, MDM2 and SUMO-1 in oral LP lesions and to compare the expression of these proteins between LP and oral epithelial dysplasia (OED) and oral squamous cell carcinoma (OSCC). The sample consisted of the following five groups of cheek mucosa lesions was studied: normal oral mucosa (NM), inflammatory fibrous hyperplasia (IFH), LP, OED, and OSCC. The tissue samples were stained with hematoxylin-eosin for histochemical analysis and submitted to immunohistochemistry using anti-p53, anti-MDM2 and anti-SUMO-1 antibodies. The results were analyzed by the Kolmogorov-Smirnov test and Fisher's exact test. No significant difference in the expression of p53 was observed between LP and OED ($p=0.2042$) or OSCC ($p=0.0656$). However, there was a significant difference when LP lesions were compared to IFH ($p=0.00001$) and NM ($p=0.0007$). Expression of MDM2 differed significantly between LP and IFH ($p=0.0005$) and NM ($p=0.0052$), but not between LP and OED ($p=1.0$) or OSCC ($p=0.9972$). A significant difference in the expression of SUMO-1 was observed between LP lesions and OED ($p=0.0492$) and OSCC ($p=0.0001$), but not between LP and IFH ($p=1.0$) or NM ($p=0.8302$). Further studies are needed to determine the role of inflammation as a possible malignant transformation in cases of LP.

Keywords: Lichen Planus. Carcinoma, Squamous Cell. Immunohistochemical. Tumor Suppressor Protein p53. Proto-Oncogene Proteins c-mdm2. SUMO-1 Protein.

1 INTRODUÇÃO

O líquen plano (LP) é caracterizado como uma doença crônica de cunho auto-imune (Gorsky et al., 1996; Xue et al., 2005; Anuradha et al., 2008), na qual o quarto tipo de hipersensibilidade manifesta resposta celular dirigida às variações antigênicas que ocorrem no revestimento mucoso e na pele (Mollaoglu 2000; Anuradha et al., 2008). Apresenta prevalência estimada de 2% na população em geral (Anuradha et al., 2008). Além disso, 50% dos pacientes que apresentam lesões de pele manifestam simultaneamente lesões em mucosa bucal, sendo que 25% dos pacientes acometidos pelo LP apresentam lesões apenas em boca (Scully, el-Kom, 1985). Há predileção pelo sexo feminino (Gorsky et al., 1996; Xue et al., 2005; Anuradha et al., 2008), sendo a maior parte dos pacientes adultos e de meia idade, entre a 5ª e 6ª década de vida (Oliveira Alves et al., 2010; Fernández-González et al., 2010).

Em 2005, a Organização Mundial de Saúde (OMS), classificou o LP bucal como uma desordem potencialmente maligna (Barnes et al., 2005). Entretanto, tal classificação ainda é bastante contestada (Eisenberg, 2000; Van Der Meij et al., 2003; Lodi et al., 2005; Ismail et al., 2007).

Nos últimos vinte anos, vários estudos epidemiológicos, retrospectivos e prospectivos, têm sido realizados em diversas partes do mundo, os quais sugerem que há a probabilidade de aproximadamente 0,65 a 1,9% de uma lesão inicialmente diagnosticada como LP bucal evoluir para carcinoma de células escamosas (CCE) bucal (Gorsky et al., 1996; Eisen, 2002; Xue et al., 2005; Ingafo et al., 2006). No entanto, alguns autores referem-se à grande dificuldade diagnóstica do LP bucal (Eisenberg, 2000; Van Der Meij et al., 2003; Lodi et al., 2005). Outros

autores relatam a não existência de um padrão universal e específico para o diagnóstico desta doença, a qual muitas vezes pode ser confundida com lesões com atipias nas células epiteliais que se expressem com aparência liquenóide (Eisenberg, 2000; Ismail et al., 2007).

Numa tentativa de desfazer tal controvérsia, técnicas como imunistoquímica e biologia molecular têm sido aplicadas. Não obstante às diferentes metodologias utilizadas, estas técnicas têm como alvo a avaliação da expressão de proteínas relacionadas à regulação do ciclo celular, já que, na carcinogênese, alterações dos mecanismos de proliferação celular e apoptose são essenciais e, conseqüentemente, a função alterada destas proteínas pode ser um forte indicativo do potencial de transformação maligna de uma determinada lesão (Sousa et al., 2009a).

Entre as inúmeras proteínas envolvidas nos processos de proliferação celular e apoptose, destacamos a proteína p53 que tem a função de controle do ciclo celular e promoção de apoptose (Kim; Baek, 2006). Em diversas neoplasias humanas são detectadas alterações na expressão desta proteína, inclusive no CCE e em lesões bucais com potencial de malignização (de Freitas et al., 2008). Em lesões de LP bucal também foi detectado aumento da expressão da proteína p53 quando comparado a tecidos não alterados (Hirota et al., 2002).

A proteína p53 pode ser regulada através de mecanismos pós-transcricionais, como, por exemplo, sua interação com a proteína *murine double minute-2* (MDM2), que desempenha papel regulador negativo sobre p53 (Daujat et al., 2001), suprimindo os níveis normais (Meek, Knippschild, 2003). A superexpressão de MDM2 tem sido demonstrada em neoplasias humanas (Momand et al., 2000), inclusive em CCE (Katayama et al., 2007).

A função de MDM2 é modulada fisiologicamente por um modificador pós-transcricional chamado pequena proteína modificadora

semelhante à ubiquitina-1 ou SUMO proteínas-1 (SUMO-1), processo chamado de SUMOilação (Meek, Knippschild, 2003).

Em LP bucal há um aumento da expressão das proteínas p53 e MDM2 quando comparado a tecidos normais (Tanda et al., 2000). Não foram encontrados relatos de avaliações da expressão da proteína SUMO-1 em lesões de LP bucal na literatura.

2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Líquen plano

O líquen plano (LP) é caracterizado por ser uma doença crônica auto-imune (Gorsky et al., 1996; Xue et al., 2005; Anuradha et al., 2008), em que há o desenvolvimento de reação de hipersensibilidade do tipo IV, através de resposta celular dirigida às variações antigênicas que ocorrem na mucosa e na pele (Mollaoglu, 2000; Anuradha et al., 2008).

A etiologia do LP ainda não foi desvendada, porém, uma desregulação da imunidade mediada por células tem sido proposta, implicando auto-imunidade mediada por células T, em particular aos linfócitos T CD₈ autocitotóxicos, relacionados com apoptose de células do tecido epitelial. Contudo, a natureza do antígeno desencadeante do processo permanece incerta (Ismail et al., 2007; Anuradha et al., 2008).

A exemplo de outras doenças auto-imunes, estudos demonstram que quadros de LP são notados em pacientes sob períodos de estresse e ansiedade, sugerindo psicossomatização quanto à iniciação e à expressão clínica da doença (Hampf et al., 1987; Manolache et al., 2008). Além disso, o LP tem sido associado à doença crônica do fígado causada pelo vírus da hepatite C (Carrozzo, 2008).

Acredita-se que as células de Langerhans e macrófagos fornecem informações do antígeno, o que vai induzir a secreção e/ou expressão de moléculas que facilitam a ativação, adesão, proliferação e/ou migração de linfócitos. Estes atraídos e ativados produzem interleucina 2, que leva a produção de mais células T. Os linfócito T CD₈

desencadeiam a apoptose de queratócitos basais e parabasais, causando, assim, sua liquefação degenerativa (Anuradha et al., 2008).

Bascones-Ilundain et al. (2008) confirmaram a existência de apoptose na patogênese do LP pela observação de grande expressão de proteína Bax e caspase-3, proteínas pró-apoptóticas, na região basal de diferentes formas da doença. Karatsaidis et al. (2007) sugerem que fatores anti-apoptóticos podem estar implicados na modulação da morte celular epitelial em fases de quiescência no LP.

Gunduz et al. (2006) pontuaram que, além de alterações na camada de células basais, também há dano na membrana basal subjacente, sendo esta causada por metaloproteinases da matriz extracelular (MMP) produzidas por células T.

O LP afeta principalmente adultos de meia idade (entre a 5ª e 6ª década de vida), sendo raro em crianças (Oliveira Alves et al., 2010; Fernández-González al., 2010). Sua prevalência é de 2% na população em geral (Anuradha et al., 2008), em que as lesões exclusivamente bucais representam 25% dos casos (Scully C, el-Kom M, 1985); existindo maior incidência no sexo feminino (Hietanen et al., 1999; Oliveira Alves et al., 2010; Fernández-González al., 2010).

Há uma grande variedade de apresentações clínicas no LP bucal. Muitas vezes a detecção da lesão é feita durante um exame clínico de rotina, outras vezes o paciente se apresenta no consultório queixando-se de sensibilidade, representada por dor e/ou sensação de queimação em mucosa bucal durante a mastigação ou em repouso (Ismail et al., 2007).

As lesões cutâneas podem acometer os pacientes principalmente em regiões flexoras de pernas e braços, especialmente nos punhos; nas unhas pode manifestar-se pelo aumento da expressão dos sulcos longitudinais até malformações mais expressivas. Ainda, devem ser consideradas as afecções de mucosa genital, esôfago, laringe,

couro cabeludo e da conjuntiva (Edwards, Kelsch, 2002; Ismail et al., 2007).

O LP bucal apresenta-se comumente de forma bilateral, simétrica, assintomática e multifocal (Bermejo-Fenoll et al., 2010), sendo a mucosa jugal a área mais afetada, podendo acometer também borda lateral de língua, gengiva e lábios; menos frequentemente acomete palato e soalho de boca (Edwards, Kelsch, 2002; Ismail et al., 2007).

Seis formas clínicas são descritas: reticular, papular, em placa, atrófico, erosivo e bolhoso (Andreasen, 1968), as quais normalmente coexistem entre si (Edwards, Kelsch, 2002).

A forma reticular é a mais comum (Oliveira Alves et al., 2010; Fernández-González al., 2010), apresentando um padrão de estrias ou linhas queratóticas que se entrelaçam, chamadas de estrias de Wickham à semelhança das descritas em pele, que podem ser circundadas por uma borda eritematosa (Mollaoglu, 2000; Edwards, Kelsch, 2002).

As lesões papulares apresentam-se como pápulas brancas e elevadas, com estriações em sua periferia (Mollaoglu, 2000; Ismail et al., 2007).

As lesões em placa aparecem como placas homogêneas semelhantes à leucoplasia. Afetam mais o dorso da língua e mucosa jugal, sendo muitas vezes multifocais, levemente elevadas e irregulares. Essa forma é mais comum em fumantes (Mollaoglu, 2000; Edwards, Kelsch, 2002).

A forma atrófica apresenta-se como lesões difusas e vermelhas com estriações periféricas e podem manifestar úlceras rasas centrais com superfície amarelada (exudato sero-fibrinoso), circundadas por regiões eritematosas (Mollaoglu, 2000; Edwards, Kelsch, 2002). Esta condição quase sempre causa sensação de queimação (Mollaoglu, 2000).

As formas erosivas desenvolvem-se como úlceras irregulares cobertas por pseudomembrana sero-fibrinosa, com estrias

queratóticas periféricas. É o segundo tipo mais comumente encontrado, caracterizado por desconforto e sensação dolorosa, sendo a mucosa jugal a área mais acometida (Mollaoglu, 2000; Edwards, Kelsch, 2002).

O subtipo bolhoso é o mais raro, podendo apresentar poucos milímetros a vários centímetros de diâmetro. Manifestando-se como bolhas que se rompem formando superfícies ulceradas e doloridas, existindo normalmente na periferia o padrão de estrias queratóticas. Manifestam-se mais comumente na mucosa jugal, particularmente em região póstero-inferior adjacente à área de segundo e terceiro molares (Mollaoglu, 2000; Edwards, Kelsch, 2002).

O LP tende a ter curso crônico com episódios de exacerbações agudas, com áreas eritematosas ou erodidas que se desenvolvem paralelamente com sensibilidade ou dor, quase sempre associadas a períodos de estresse psicológico, ansiedade, trauma mecânico (fenômeno de Koebner) e de irritantes, como o cigarro e a placa dentária (Ismail et al., 2007).

O diagnóstico clínico de LP bucal torna-se mais fácil quando há a presença de lesões de pele. O clínico deve considerar o caráter bilateral e acometimento multi-regional (Mollaoglu, 2000).

Quanto aos achados histopatológicos do LP bucal, existem três clássicos: revestimento queratinizado (orto ou paraqueratinização), denso infiltrado linfocitário em banda na lâmina própria e liquefação degenerativa de camada de célula basais, levando à formação dos corpos de Civatte, com a aparência de corpos eosinofílicos homogêneos ou hialinos, demonstrando apoptose celular. Outro fenômeno inerente ao histológico do LP é a presença de acantose, o qual redundando na configuração de estrias de Wickham (Eisenberg, 2000), que também podem apresentar hiperqueratinização do epitélio (Ismail et al., 2007).

Caso a superfície esteja ulcerada, os achados histopatológicos serão de processo inflamatório crônico não-específico.

Assim sendo, o clínico deve ter cuidado na escolha de região expressiva e não ulcerada na coleta de material (Edwards, Kelsch, 2002).

Sem tratamento específico, a abordagem terapêutica do LP bucal foca-se apenas ao alívio dos sintomas, já que não existe uma conduta de manejo padronizada totalmente satisfatória e definitiva (Edwards, Kelsch, 2002; Ismail et al., 2007; Lodi et al., 2007). A remoção de placa e cálculos dentários faz-se necessária, já que a má higiene bucal é relacionada com episódios de agudização; outros irritantes locais também devem ser removidos (Edwards, Kelsch, 2002).

Grande parte dos pacientes que possuem lesões de LP bucal não apresenta queixa de sintomatologia, sendo necessário apenas acompanhamento para reavaliação das lesões (Edwards, Kelsch, 2002; Ismail et al., 2007). Entretanto, as formas erosivas e atróficas mostram-se quase sempre sintomáticas, sendo necessário maior acompanhamento profissional e empenho do mesmo no alívio dos sintomas (Edwards, Kelsch, 2002; Ismail et al., 2007).

Os corticosteróides são os fármacos mais usados no manejo de lesões de LP com sintomatologia, isto por sua efetiva ação de supressão sobre imunidade mediada por células; sendo os corticosteróides tópicos a primeira escolha no tratamento (Edwards, Kelsch, 2002; Ismail et al., 2007; Anuradha et al., 2008). Outros tratamentos são recomendados a pacientes que não respondem ao manejo com corticosteróides tópicos, sendo estes o uso de corticosteróides intralesionais ou de corticosteróides sistêmicos (Mollaoglu 2000; Edwards, Kelsch, 2002).

Muitas outras formas de tratamento têm sido descritas e avaliadas em estudos, porém ainda sem demonstrar maior eficácia em relação às formas de tratamento citadas acima, entre elas o uso de medicamentos tópicos imunossupressores, agentes sistêmicos, fototerapia (McCreary, McCartan, 1999) e terapia a laser (Cafaro et al., 2010).

O tratamento cirúrgico não tem sido recomendado, principalmente em lesões erodidas ou atróficas, já que o trauma cirúrgico pode induzir a formação de novas lesões na área (Mollaoglu, 2000).

2.1.1 Potencial de transformação maligna

Existe controvérsia sobre a possibilidade do LP bucal ser precursor do CCE de boca. Esta possibilidade tem sido estudada por vários autores nos últimos anos, porém, sem conclusões efetivas de que as lesões tenham algum potencial de transformação maligna. O grande problema em estudos que avaliam o potencial de transformação maligna do LP é a não existência de um padrão de critério para o diagnóstico do mesmo (Eisenbegr, Krutchkoff, 1992).

Além disso, tem sido relatado o diagnóstico incorreto de lesões epiteliais com atipias (displasias) e com aparência liquenóide mimetizando lesões de LP, o que coaduna ao grande número de casos considerados como transformação maligna de LP (Ismail et al., 2007). Van der Meij et al. (2003) discute se o desenvolvimento de carcinoma seja parte da evolução natural da doença, ou seja, atribuído a fatores extrínsecos ainda desconhecidos, que não o álcool e o tabaco.

Gorsky et al. (1996) realizaram acompanhamento de 157 pacientes com a doença e relacionaram o LP bucal com transformação maligna em dois casos, ambos sem história de uso de tabaco e álcool pelos pacientes.

Hietanen et al. (1999) observaram transformações malignas de lesões de LP bucal, sendo as formas atróficas e erosivas as mais associadas a estas transformações. Além disso, pontuaram que, nos locais de transformação maligna, havia infecção fúngica concomitante.

Rajentheran et al. (1999) declararam que o risco de transformação maligna do LP bucal era baixo, ressaltando o uso de tabaco e álcool pelos pacientes acometidos, e também registraram uma maior prevalência de pacientes do sexo masculino, entre os que tiveram transformação maligna, e que a língua foi o sítio mais acometido.

Eisen (2002) realizou acompanhamento de 723 pacientes com a doença, num período de seis meses a oito anos, e também relacionou o LP bucal com transformação maligna, enfatizando o uso de tabaco e álcool pelos pacientes acometidos e a presença de infecção por *Candida albicans* nestas lesões. O autor afirmou ser fundamental o acompanhamento periódico dos pacientes acometidos por esta doença, já que em seus achados houve o desenvolvimento do CCE bucal em 0,8% dos locais previamente diagnosticados como LP bucal.

Gandolfo et al. (2004), através de acompanhamento de 402 pacientes do norte da Itália com diagnóstico de LP bucal no período de 1988 a 1999, encontraram que dois homens e sete mulheres desenvolveram CCE bucal, demonstrando risco maior entre as mulheres. Os autores ainda indicam que os pacientes com lesões de LP bucal devem ter cuidadoso acompanhamento para permitir a detecção precoce de transformação maligna.

Ingafou et al. (2006), através de acompanhamento de 690 pacientes com diagnóstico de LP bucal, depararam-se com transformação maligna em dez casos, três dos quais eram do tipo lesões em placa.

Xue et al. (2005) avaliaram 674 pacientes, entre 1963 e 2003, dos quais aproximadamente 0,65% apresentaram desenvolvimento de CCE bucal em locais previamente diagnosticados como LP bucal. Além disso, nenhuma lesão maligna se desenvolveu a partir de lesão reticular típica. Os autores ainda indicam o acompanhamento dos pacientes com LP em longo prazo.

Porém, em todos estes estudos citados não foi elucidada a razão da transformação maligna. Para Mignogna et al. (2004) há sinais

suficientes de que processos inflamatórios crônicos, como o LP bucal, criem um micro-ambiente favorável, influenciando, de forma crucial, na iniciação e promoção da doença maligna epitelial. Estes autores ainda sugerem este microambiente pode levar a maior sensibilidade a agentes cancerígenos ambiental convencionais, como o tabaco e o álcool.

González-Moles et al. (2006) acreditam que a transformação maligna seja favorecida por alterações na expressão de proteínas com função de regulação de mecanismos de proliferação celular e apoptose. No LP bucal, as células da camada basal são danificadas e a ausência de apoptose aparece como um mecanismo para a preservação do epitélio, já que a morte por apoptose inviabilizaria as células basais responsáveis pela regeneração epitelial. Os autores concluem que a transformação maligna poderia ser favorecida por falha do sistema de p53. Assim, as células atacadas pelos linfócitos T, que não sofreram apoptose e não foram controladas por proteína p53, poderiam acumular eventos moleculares oncogênicos suficientes para o desenvolvimento de um fenótipo maligno.

Por outro lado, alguns autores, com base em estudos retrospectivos subsidiados na literatura, não encontram evidências de efetivo potencial de transformação maligna do LP bucal.

Eisenberg e Krutchkoff (1992) afirmaram que diagnósticos iniciais equivocados ou mal documentados são os principais argumentos contra o possível potencial de transformação maligna do LP. Cortés-Ramirez et al. (2009) concluíram que é necessário estabelecer diretrizes claras de diagnóstico e terapêutica para ter um prognóstico confiável.

Ismail et al. (2007), mesmo não levando em consideração o possível potencial de transformação maligna do LP bucal, recomendam o acompanhamento dos casos e a realização de biópsia em caso de mudanças no aspecto clínico das lesões e/ou manifestação de sintomas. O autor ressalta que, mesmo que o LP bucal não seja uma doença com

potencial de transformação maligna, o paciente pode desenvolver outra doença concomitante, que poderia ser maligna.

Eisenberg (2000) discute que grande parte dos casos de transformação maligna descritos na literatura não deveriam ser assim considerados, pois no momento do diagnóstico inicial exibiram graus variados de atipia epitelial, devendo ser diagnosticados como uma entidade histopatológica distinta, a displasia liquenóide (DL). Contudo, deve ser considerada a observação de Lodi et al. (2005) de que o próprio processo inflamatório presente no LP bucal é capaz de levar ao aparecimento de alterações celulares semelhantes às encontradas na atipia epitelial, levando a grande dificuldade em diferenciá-lo da DL. Krutchkoff e Eisenberg (1985) concluíram que a presença de atipias epiteliais é um forte indício de potencial de transformação maligna, desta forma, a DL, e não o LP, deveria ser classificada como uma desordem potencialmente maligna.

Entretanto, Van der Meij e Van der Waal (2003) pontuam que as lesões liquenóides que apresentam atipias epiteliais devem ser tratadas como qualquer outra displasia epitelial (DE) e consideraram o diagnóstico de DL equivocado. No mesmo estudo, os autores propõem que, para o diagnóstico de LP bucal, sejam incluídos critérios clínicos e histopatológicos, salientando que o diagnóstico de lesão liquenóide bucal deve ser restrito aos casos em que:

- a) as lesões sejam clinicamente típicas, mas histologicamente compatíveis com LP;
- b) as lesões sejam clinicamente compatíveis e histologicamente típicas com LP ou;
- c) as lesões sejam clínica e histopatologicamente compatíveis com LP.

Aguirre (2008) propôs uma nova classificação em que vários processos seriam genericamente denominados como doença

liquenóide bucal, com cinco subdivisões: LP muco-cutâneo, LP mucoso, LP bucal, lesão reativa liquenóide bucal e lesão liquenóide bucal idiopática. Para o diagnóstico de LP muco-cutâneo deveria haver presença de múltiplas pápulas brancas reticulares, bilaterais e simétricas em mucosa bucal associadas a pápulas brancas em outras mucosas e pápulas pruriginosas em pele. No LP mucoso haveria a presença de múltiplas pápulas brancas reticulares, bilaterais e simétricas apenas em mucosa bucal e outras mucosas. O LP bucal se caracterizaria por lesões semelhantes, mas com o acometimento apenas bucal. A lesão reativa liquenóide bucal apresentaria pápulas brancas reticulares unilaterais em mucosa bucal com causa identificável. Finalmente, a lesão liquenóide bucal idiopática se caracterizaria por lesões semelhantes, porém sem causa identificável.

2.2 Mecanismo de constituição das neoplasias malignas

Em condições normais, há controle preciso sobre a taxa de proliferação de cada tipo celular. Os genes que codificam proteínas ativas neste processo podem ser subdivididos em: protooncogenes, genes supressores de tumor e genes reguladores de apoptose. Em células neoplásicas há a perda deste controle, passando estas a se proliferar de forma independente (Omelyanchuk, 2004).

A apoptose, morte celular programada, é causada pela ativação das caspases, da família das cisteinilproteases (Schimmer 2004). Este mecanismo tem como alvo o controle da renovação celular ou a destruição de células alteradas irreversivelmente.

Tanda et al. (2000) sugerem que as alterações genéticas de proteínas que estão envolvidas na regulação deste processo, pró-apoptóticas ou anti-apoptóticas, antecederem os principais eventos

morfológicos na neoplasia epitelial. Além disso, pode haver alteração nos mecanismos de regulação em nível transcricional, translacional e pós-translacional, corrompendo a manutenção da homeostase celular (Kim, Baek, 2006).

2.3 Proteínas p53, MDM2 e SUMO-1 – Definições e funções básicas

2.3.1 Proteína p53

O gene p53 se localiza no braço curto do cromossomo humano 17p13.1 e codifica uma fosfoproteína nuclear, a p53, que apresenta 393 aminoácidos e três principais domínios funcionais: um domínio de ativação transcricional, um de ligação às sequências específicas de DNA e um de regulação (May, May, 1999).

Durante o desenvolvimento normal da célula, a proteína p53 não é necessária, apresentando baixos níveis celulares, devido sua curta meia-vida. Entretanto, em situações de estresse celular sua produção é estimulada com o objetivo de manutenção da integridade do genoma, controle do ciclo celular e promoção de apoptose. As várias isoformas de p53 são reguladas através de mecanismos pós-transcricional, o que acontece pela interação de p53 com outras proteínas (Kim, Baek, 2006).

A forma selvagem da proteína p53 é descrita como tendo efeito negativo sobre a proliferação celular e de bloqueio do ciclo celular na fronteira entre as fases G1 e S. Este padrão de regulação muda se p53 sofre mutação, possivelmente resultando em aumento da atividade proliferativa. No caso da carcinogênese bucal, a superexpressão desse gene está associada com a rápida proliferação das células neoplásicas,

apesar de não ser a única causa do aumento da proliferação (Girod et al., 1998).

Stoll et al. (2000), após avaliação imunoistoquímica de 107 casos de CCE de orofaringe, concluíram que a função do tipo selvagem da proteína p53 estava alterada em metade dos casos de CCE no estudo. Sousa et al. (2009b) sugeriram que no CCE bucal há significativa alteração da expressão do gene p53, podendo ser encontrado em mutação, o que pode gerar alterações conformacionais e/ou estruturais levando a desativação da proteína, aumentando sua meia-vida, levando-a a ser mais identificada em estudos de imunoistoquímica.

2.3.2 Proteína MDM2

O gene *mdm2* é um protooncogene localizado no cromossomo humano 12q13-14, o qual codifica a proteína MDM2 (*murine double minute-2*) que é uma fosfoproteína nuclear, e se comporta como uma ubiquitina-ligase (Katayama et al., 2007). Sua superexpressão é observada em muitas neoplasias malignas em humanos, o que pode apontar seu envolvimento na carcinogênese (Momand et al., 2000).

A principal função de MDM2 é ubiquitinar, levando a degradação da proteína supressora de neoplasias p53, podendo se ligar tanto à forma selvagem quanto a mutante. Além dessa função, essa proteína bloqueia a interação de p53 com instrumentos pós-transcricionais, está envolvida na translocação de p53 para o citoplasma, removendo-o de seu local de ação, e tornando-o disponível para a ubiquitinação. Assim, a proteína MDM2 suprime a capacidade de p53 de ativar genes responsáveis pela reparação ou apoptose, mas também promove degradação de p53 por ubiquitinação reprimindo a resposta

celular ao estresse (Meek, Knippschild, 2003). Além disso, há controle por *feedback*, enquanto p53 ativa o gene mdm2, altas concentrações da proteína MDM2 inibem o gene da p53 (Dong et al., 2003).

Esta proteína ainda apresenta funções independentes de p53 (Daujat et al., 2001), além de poder sofrer auto-ubiquitinação e degradação (Katayama et al., 2007).

A regulação das quantias celulares e a estabilidade da proteína MDM2 ocorrem em diferentes níveis, desde a expressão do gene mdm2, interações entre proteínas e localização intracelular de moléculas. Além destas formas de regulação, diversas modificações pós-transcricionais podem influenciar diretamente na regulação de MDM2 (Meek, Knippschild, 2003).

O balanço entre a autoubiquitinação e a ubiquitinação de substratos, realizado por MDM2, é modulado fisiologicamente por um modificador pós-transcricional chamado pequena proteína modificadora semelhante à ubiquitina-1 ou SUMO proteínas-1 (SUMO-1) (Meek, Knippschild, 2003), havendo um predomínio da isoforma sumoilada de MDM2 (Buschmann et al., 2000).

2.3.3 SUMO proteína - 1

As proteínas SUMO são uma família de pequenas proteínas que estão associadas covalentemente ou destacadas de outras proteínas nas células, alterando a sua função (Meek, Knippschild, 2003). Sua ação é dirigida por uma cascata enzimática análoga a envolvida na ubiquitinação, mas em contraste com a ubiquitina, as SUMO proteínas não são utilizadas para degradação (Daujat et al., 2001), na verdade remetendo a proteína alvo à novas propriedades biológicas por fornecer

uma nova interface para a interação entre esta e outras proteínas (Kim, Baek, 2006).

Sua associação às proteínas alvo é um processo dinâmico chamado de SUMOilação, sendo uma modificação pós-transcricional reversível em resposta a estímulos, envolvida em diversos processos celulares, o qual pode afetar a localização subcelular de seus substratos, estabilidade de ligações ao DNA, interações com outras proteínas ou sua ativação. Assim sendo, as SUMO proteínas estão ligadas à regulação do ciclo celular, a manutenção da transcrição e da integridade do genoma (Kim, Baek, 2006).

Mais de vinte proteínas foram identificadas como alvo de SUMOilação, podendo pertencer a várias categorias, desde fatores de transcrição, transdutores de sinal, reguladores gênicos até enzimas e proteínas virais. Normalmente, apenas uma pequena fração dessas proteínas é SUMOilada, sendo a modificação revertida pela ação de enzimas de deSUMOilação (Kim, Baek, 2006).

Três isoformas principais de SUMO proteínas nos seres humanos são descritas na literatura, estas são nomeadas de SUMO-1, SUMO-2 e SUMO-3 (Saitoh, Hinchey, 2000). Apesar de sequências protéicas diferentes, elas utilizam os mesmos sistemas enzimáticos para sua ligação às proteínas alvo, além de seguirem os mesmos passos durante essas ligações (Kim, Baek, 2006).

A SUMOilação é um importante componente do aparelho de controle da expressão gênica (Meek, Knippschild, 2003), estando seu fluxo alterado no câncer humano, sendo apontada como importante no curso da carcinogênese (Katayama et al., 2007).

Como já mencionado anteriormente, a proteína MDM2 também é alvo de SUMOilação (Meek, Knippschild, 2003; Kim, Baek, 2006). Assim, a remoção de SUMO-1 da proteína MDM2 SUMOilada conduz a autoubiquitinação de MDM2, o que resulta em estabilização de p53, deixando-o livre para desempenhar sua função na supressão

neoplásica (Daujat et al., 2001). Assim, a diminuição da sumoilação de MDM2 esta relacionada a altos níveis de p53 (Buschmann et al., 2000). Além disso, segundo Kim e Beak (2006), pode ocorrer a interação direta entre p53 e SUMO-1 resultando em estabilização de p53.

2.4 Proteínas p53, MDM2 e SUMO-1 – Expressão em neoplasias e no líquen plano bucal

Algumas alterações genéticas têm sido reconhecidas como importantes neste processo de carcinogênese (Katayama et al., 2007). Girod et al. (1998) propõem que a análise imunoistoquímica da proteína p53 é um método fácil para detectar a sua superexpressão, apesar de existir dificuldade na comparação de dados devido à falta de padronização nestas análises. Eles destacam que a intensidade de coloração pode depender, em grande parte, das técnicas de processamento do tecido, que antecedem a técnica de imunoistoquímica propriamente dita. Entretanto, concluem que há alterações na expressão de p53 em lesões malignas e ressaltam que o estudo de sua expressão pode ser especialmente útil para lesões pequenas que tenham potencial de transformação maligna.

Em lesões que tenham comprovadamente potencial de transformação maligna há a superexpressão de p53, sendo estas também avaliadas através de estudos de imunoistoquímica, assim como no CCE (de Freitas et al., 2008).

Há um aumento da expressão da proteína p53 em lesões de LP bucal quando comparada a tecidos normais (Hirota et al., 2002). Como o LP bucal é uma doença inflamatória, é sabido que há dano no DNA, modificando o nível das isoformas de p53 comparável ao que

acontece em danos por exposição à luz ultravioleta (Ebrahimi et al., 2008).

Valente et al. (2001) demonstraram que pacientes afetados pelo LP bucal com posterior desenvolvimento de CCE mostram alterações na expressão de p53. Os autores ainda concluem que um estudo prospectivo poderia determinar se a utilização da técnica de imunoistoquímica apresenta valor preditivo nestes casos.

Todavia, a taxa de transformação maligna de LP bucal é baixa, podendo ser explicada pela ativação do sistema de p53. Esse exerce uma ação de promoção na reparação de danos de DNA, sendo os casos de transformação maligna correspondentes às situações específicas em que p53 se encontra inativada (Gonzalez-Moles et al., 2008).

Ögmundsdóttir et al. (2009) analisaram 55 casos de CCE bucal, 47 de lesões bucais hiperqueratóricas e 48 casos de LP bucal, concluindo que lesões iniciais de LP bucal podem apresentar mutações do gene p53, sem que ocorra a transformação maligna por muitos anos. Nos casos de CCE, os autores não encontraram nenhuma relação entre a expressão dessa proteína mutada e a recorrência ou morte por CCE. Apesar disso, os autores associam a expressão da proteína p53 mutada com uma menor sobrevida em pacientes expostos a fatores de risco.

Como já mencionado, a proteína p53 pode ser regulada através de sua interação com a proteína MDM2, que desempenha papel regulador negativo sobre p53 (Daujat et al., 2001). A função de MDM2, por sua vez, é modulada fisiologicamente pela proteína SUMO-1 (Meek, Knippschild, 2003).

Tanda et al. (2000) avaliaram imunoistoquimicamente a expressão de proteínas p53 e MDM2 em 13 casos de leucoplasia de mucosa bucal e em 10 casos de LP bucal. Os casos de leucoplasia foram positivas para p53 e MDM2, sendo a pigmentação distribuída nas camadas epiteliais basais e parabasais. LP bucal também foi positivo para

p53 e MDM2, sendo distribuída predominantemente no estrato basal da mucosa, o que pode ser justificado pelo fato do LP ser caracterizado pela degeneração da camada basal em banda devido a indução da apoptose dos queratinócitos pelos linfócitos. Os autores destacam que a leucoplasia apresenta maior potencial de transformação maligna que o LP bucal e ainda enfatizam que os resultados poderiam indicar a potencial capacidade de transformação maligna dessas lesões, apesar de não demonstrarem dados adicionais a respeito da progressão tumoral e metastática.

Yanamoto et al. (2002) avaliaram 69 casos de CCE bucal e concluíram que a superexpressão de MDM2 está associada a proliferação da neoplasia, sugerindo que a inativação do tipo selvagem da proteína p53 por proteína MDM2 é sinérgica a esta. Os autores ainda apontam que a superexpressão destas proteínas demonstra correlação com prognóstico desfavorável para a doença.

De Freitas et al. (2008) avaliaram a expressão de p53 e MDM2 em queilite actínica e observaram que havia superexpressão de ambas, sendo a expressão de p53 mais intensa. Os autores concluíram que a superexpressão de MDM2 está associada ao aumento de transformação maligna.

Katayama et al. (2007) analisaram a expressão de MDM2 e SUMO-1 em amostras de CCE bucal comparando com tecidos normais; observaram superexpressão do gene SUMO-1 em CCE bucal em relação ao tecido normal. Os autores concluíram que a interação de MDM2 e SUMO-1 tem grande associação com a proliferação celular, pois a MDM2 alterada é menos degradada, o que aumenta a sua atividade sobre p53. Ainda, demonstraram que os pacientes com CCE bucal que desenvolveram recorrências locais após tratamento tenderam a ter uma maior expressão de MDM2 do que os pacientes sem recidiva local, enquanto os pacientes com aumento de ambas as proteínas apresentaram pior prognóstico.

Não foram encontrados na literatura relatos de avaliação da expressão da proteína SUMO-1 em lesões de LP bucal.

3 PROPOSIÇÃO

A proposição da pesquisa foi analisar a expressão das proteínas p53, MDM2 e SUMO-1 nas células epiteliais em LP bucal e comparar a expressão das mesmas com aquela observada em DE bucal e no CCE bucal.

4 MATERIAL E MÉTODO

Este trabalho foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa em Seres Humanos (CEPh) da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos (FOSJC) da Universidade Estadual Paulista (UNESP), sob o protocolo n° 045/2009-PH/CEP, e da da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP), sob o protocolo n° 44/10 (Anexos A e B).

4.1 Casuística

Blocos de parafina com quantidade de material representativo das lesões foram selecionados dos arquivos do Laboratório de Patologia Bucal da FOSJC - UNESP e do Laboratório de Patologia Bucal da FOUSP, os quais foram compostos por:

- a) 5 casos de mucosa jugal com aspecto clínico de normalidade (MN), obtidas da periferia de lesões de hiperplasia fibrosa inflamatória bucal (HFI);
- b) 25 casos de HFI focal em mucosa jugal;
- c) 65 casos de LP de mucosa jugal (lesões reticulares bilaterais e simétricas seguindo os critérios de Van der Meij e Van der Waal em 2003; e diagnosticadas segundo os critérios histopatológicos de Eisenberg em 2000);

- d) 16 casos de DE de mucosa jugal;
- e) 19 de CCE de mucosa jugal.

Os casos de MN e HFI foram incluídos para que houvesse parâmetro de comparação com o tecido normal e com tecido apresentando inflamação crônica, respectivamente.

4.2 Critérios Diagnósticos

Os cortes das lesões foram corados pela técnica da hematoxilina-eosina e submetidos a estudo histopatológico em microscopia de luz, que foi realizado por três patologistas experientes, após calibração, utilizando-se índice Kappa de Cohen para avaliar a variabilidade interobservador. O diagnóstico histopatológico do LP bucal foi realizado de acordo com os critérios de Eisenberg (2000) (Quadro 1) e a DE segundo os critérios da OMS (Barnes et al., 2005) (Quadros 2 e 3).

Quadro 1 - Critérios histológicos para o diagnóstico do líquen plano bucal

Achados Essenciais
• Liquefação da camada basal • Infiltrado linfocitário intenso disposto em faixa subjacente ao epitélio com apagamento da camada basal • Padrão normal de maturação das células epiteliais
Outros Achados
• Cristas interpapilares em forma de “dentes-de-serra” • Hiperparaqueratose • Corpos de Civatte • Separação do epitélio da lâmina própria
Critérios de exclusão
• Células com núcleo aumentado e/ou hipercromático • Prevalência de disqueratose • Aumento do número de mitoses ou mitoses atípicas • Projeção dos cones epiteliais em “gota” • Ausência de liquefação da camada basal • Perda da estratificação do epitélio • Infiltrado inflamatório heterogêneo • Extensão do infiltrado para a profundidade • Infiltrado perivascular

Fonte: Eisenberg, 2000.

Quadro 2 - Critérios histológicos para o diagnóstico da displasia epitelial

Achados na arquitetura	Achados na citologia
• Estratificação epitelial irregular • Perda da polaridade das células basais • Hiperplasia das células basais • Projeções epiteliais em forma de gota • Aumento do número de figuras mitóticas • Mitoses em camadas superficiais • Ceratinização individual	• Variação anormal do tamanho nuclear • Pleomorfismo nuclear • Variação anormal do tamanho celular • Pleomorfismo celular • Perda da relação núcleo-citoplasma • Aumento do tamanho nuclear • Figuras de mitose atípicas • Aumento do tamanho e número de nucléolos • Hiperchromatismo

Fonte: Barnes et al., 2005.

Quadro 3 - Critérios histológicos para o diagnóstico da displasia epitelial

Displasia Epitelial		
Leve	Moderada	Severa
Atipias celulares e anormalidades estruturais restritas ao terço inferior do epitélio	Atipias celulares e anormalidades estruturais presentes em dois terços do epitélio	Atipias celulares e anormalidades estruturais em mais de dois terços do epitélio

Fonte: Barnes et al., 2005.

Salienta-se que, segundo a OMS, o grau de atipia citológica deve ser levado em consideração. Assim, na presença de grande atipia celular em uma lesão, esta deve ser classificada como displasia severa, mesmo se não houver nenhuma extensão destas atipias para o terço superior do epitélio (Barnes et al., 2005).

Além de enquadrados nos critérios da OMS, as amostras de DE bucal foram classificadas de acordo com o sistema binário de Kujan et al. (2006) que propõem um método baseado nos mesmos critérios morfológicos de alterações em arquitetura e citologia utilizados pela classificação da OMS 2005, contudo, divide as lesões de acordo com o potencial de transformação maligna, classificando-as em lesões de alto risco e de baixo risco (Quadro 4).

Quadro 4 - Critérios histológicos para o diagnóstico da displasia epitelial

Alto risco	Baixo risco
≥ 4 achados na arquitetura ≥ 5 achados na citologia	< 4 achados na arquitetura < 5 achados na citologia

Fonte: Kujan et al., 2006

O grau de diferenciação celular das lesões de CE foram classificadas como bem diferenciado, moderadamente diferenciado e pouco diferenciado, de acordo com a classificação recomendada pela OMS (Barnes et al., 2005) (Quadro 5).

Quadro 5 - Critérios histológicos para o diagnóstico do carcinoma de células escamosas

Parâmetros	Características
Pouco diferenciados	Predomínio de células imaturas
	Numerosas mitoses típicas e atípicas
	Mínima ceratinização
Moderadamente diferenciados	Certo grau de pleomorfismo nuclear e atividade mitótica
	Pouca ceratinização
Bem diferenciados	Arquitetura tecidual semelhante ao normal do epitélio escamoso

Fonte: Barnes et al., 2005.

4.3 Técnica Imunoistoquímica

O material tecidual foi obtido a partir de fragmentos de lesões previamente fixados em formol a 10% e emblocados em parafina. Os blocos selecionados foram submetidos a cortes de 3 µm de espessura e fixados em lâminas antecipadamente tratadas com organosilano (DAKO Corporation, Glostrup, Denmark), necessário para maior aderência dos cortes à lâmina. Posteriormente, foram desparafinados em dois banhos de xilol, em que o primeiro foi realizado por 30 minutos a uma temperatura de 60° C e o segundo por 20 minutos a temperatura ambiente.

A seguir os cortes foram reidratados em uma série de banhos descendentes de etanol, sendo as concentrações de 95%, 85% e 80%, durante 5 minutos cada banho. Os cortes foram imersos por 10 minutos em solução de hidróxido de amônia a 10% em etanol a 95% para

a remoção do pigmento formólico. Após esse procedimento, foi realizada a lavagem com água deionizada (02 banhos).

Para recuperação antigênica da proteína p53 e SUMO-1 foi utilizada a solução de EDTA (1mM-pH 8.0) (Fisher Scientific, Suwanee, USA) em banho-maria a 95°C, durante 30 minutos.

Para recuperação antigênica das proteínas MDM2 foi utilizado ácido cítrico monoidratado (10mM-pH6.0) (Merck, Darmstadt, Germany), deixando-se em banho-maria 95°C, durante 30 minutos.

Após este procedimento as lâminas foram lavadas em água deionizada por 10 minutos. O próximo passo foi o bloqueio da peroxidase endógena, em que foi dado 2 banhos de 5 minutos, em solução de peróxido de hidrogênio 20 volumes (6%) e metanol (1:1). Em seguida, as lâminas foram lavadas por 10 minutos em água destilada, seguidos por 2 banhos em água deionizada.

Posteriormente, o material foi submetido a 3 banhos de 5 minutos em solução tampão de TRIS (tri-hidroxi-metil-aminometano) (DAKO Corporation, Glostrup, Denmark) com pH de 7.6 e, em seguida, foi realizada a incubação com albumina bovina por uma hora, com conseguinte secagem das lâminas e incubação com anticorpos primários.

Os anticorpos primários utilizados e suas concentrações estão dispostos no quadro 5. Os tempos de incubação foram de uma hora para p53 e de 18 horas para MDM2 e SUMO – 1.

Quadro 6 - Anticorpos primários

Anticorpos	Tipo	Concentração	Procedência	Clones
p53	Monoclonal	1:50	Dako	DO-7
MDM2	Monoclonal	1:100	Santa Cruz Biotechnology	SMP14
SUMO-1	Monoclonal	1:100	Santa Cruz Biotechnology	D-11

Em seguida, foram dados 2 banhos em TRIS-pH 7.6, por 5 minutos cada lavagem.

A incubação com os anticorpos secundário e terciário foi realizada com kit LSAB (DAKO Corporation, Glostrup, Denmark) por 30 minutos. Após isso, foram dados 2 banhos em TRIS-pH 7.6, por 5 minutos cada lavagem.

Para a reação de revelação foi utilizada solução de cromógeno Diaminobenzidina (DAB) (DAKO Corporation, Glostrup, Denmark) em concentração de 0,02% por 10 minutos. O passo seguinte foi a lavagem em água destilada e aplicação do contra-corante hematoxilina de Mayer (Dinâmica Química Contemporânea, São Paulo, Brasil) por 10 minutos. Posteriormente, os cortes foram lavados novamente em água deionizada.

Após esta etapa, os cortes foram desidratados em cadeia ascendente de etanóis (70º, 80º, 90º e absoluto), e diafanizadas em 3 banhos de xilol e montadas em *Tissue-Tek Mounting Medium* (Sakura, Torrance, USA) para exame ao microscópio de luz.

Para controle positivo foram utilizados os próprios cortes de CCE da amostra (Katayama et al., 2007) para a expressão de p53, cortes de osteossarcoma para expressão de MDM2 (Dong et al., 2003) e cortes de seminoma para expressão de SUMO-1 (Berglund et al., 2008).

Para realização do controle negativo, os cortes supracitados foram processados normalmente, porém, sem a incubação com o anticorpo primário.

4.4 Análise das lâminas tratadas pela técnica imunoistoquímica

A avaliação das lâminas foi realizada por um único examinador, utilizando-se microscopia de luz, tendo como critério a marcação, ou não, observada através da coloração acastanhada das células. As colorações para p53 e MDM2 foram consideradas positivas quando houve marcação nuclear e foram consideradas positivas para SUMO-1 quando houve coloração citoplasmática e/ou nuclear.

O percentual de células positivas foi contado segundo o método de Nakagawa et al. (1994), com contagem de 1.000 células em um aumento de 400x. O quadro 6 demonstra a gradação de escores.

Quadro 7 – Escores

Escores
0 – menos de 5% das células positivas
1 – de 6% a 25% das células positivas
2 – de 26% a 50% das células positivas
3 – mais de 50% das células positivas

Fonte: Nakagawa et al., 1994.

A contagem foi realizada de forma manual dos *hot spots* em campo de 1000 células em cada caso estudado. As imagens dos campos foram obtidas em microscópio de luz Carl Zeiss Axio Imager A1 com aumento de 400x e câmera AxioCam HRc acoplados a um sistema

computadorizado utilizado o software Axion Vision Release 4.6.3 SP1, 2007, que permitiu a contagem manual das células positivas dentro dos parâmetros previamente estabelecidos através do software Image J.

4.5 Análise estatística

Os dados foram analisados pelo teste de Kolmogorov-Smirnov, bem como pela aplicação do teste exato de Fisher para identificação de associação entre as variáveis analisadas, sendo que o nível de significância adotado para todos os testes estatísticos foi de 5%.

5 RESULTADOS

5.1 Avaliação da técnica de Histoquímica

Todas as amostras tiveram cortes corados pelo método de hematoxilina e eosina, sendo, posteriormente, submetidos a estudo histopatológico em microscopia de luz.

Todos os casos de LP bucal revelaram achados essenciais para diagnóstico considerando os critérios de Eisenberg (2000).

A lista de critérios analisados para a DE bucal, assim como os resultados em cada caso estão descritos na tabela 1. A amostra constou de 16 casos de DE em mucosa jugal; 10 representavam displasia discreta, seis representavam displasia moderada e nenhum caso representou displasia intensa. Na avaliação pelo sistema binário de graduação, proposto por Kujan et al. (2006), todos os casos representaram baixo risco.

Tabela 1 – Classificação das displasias epiteliais (OMS e Sistema binário de classificação). Alteração presente (+); Alteração ausente (-); Discreta (D); Moderada (M); Intensa (I); Baixo grau (B); Alto grau (A).

Casos	Achados na arquitetura								Achados na citologia									Classificação OMS	Classificação segundo Kujan et al. 2007	
	Estratificação epitelial irregular	Perda da polaridade das células basais	Hiperplasia das células basais	Projeções epiteliais em forma de gota	Aumento do número de figuras mitóticas	Mitoses em camadas superficiais	Ceratinização individual	Total	Varição anormal do tamanho nuclear	Pleomorfismo nuclear	Varição anormal do tamanho celular	Pleomorfismo celular	Perda da relação núcleo-citoplasma	Aumento do tamanho nuclear	Figuras de mitose atípicas	Aumento do tamanho e número de nucléolos	Hipercromatismo			Total
1	-	-	+	+	+	-	+	4	-	-	-	-	-	-	-	+	+	2	D	B
2	-	+	+	+	+	-	+	5	-	-	-	-	+	+	-	+	+	4	M	B
3	-	-	+	+	+	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	-	+	2	D	B
4	-	-	+	-	+	-	-	2	-	-	-	-	-	-	-	+	+	2	D	B
5	-	-	+	+	+	-	-	3	-	+	-	-	-	-	-	-	+	2	D	B
6	-	-	+	+	+	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	-	+	1	D	B
7	-	+	+	+	+	-	+	5	-	-	-	-	+	+	-	+	+	4	M	B
8	-	-	-	-	+	-	-	1	-	-	-	-	-	-	-	+	+	2	D	B
9	+	+	+	+	+	-	-	3	+	+	-	-	+	-	-	+	+	5	M	B
10	-	+	+	+	+	-	-	4	-	-	-	-	-	-	-	+	+	2	D	B
11	-	+	+	+	+	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	+	+	2	D	B
12	-	+	+	+	-	-	-	3	-	-	-	-	-	-	-	+	+	2	M	B
13	-	+	-	+	+	-	+	3	-	-	-	-	-	-	-	+	+	2	D	B
14	-	+	+	+	+	-	-	3	+	-	-	-	+	-	-	-	-	2	M	B
15	+	+	+	+	+	-	-	4	-	+	-	-	-	-	-	+	+	3	M	B
16	+	+	+	+	+	-	+	6	-	-	-	-	-	+	-	+	+	3	M	B

A amostra de CCE constou de 19 casos em mucosa jugal, exibindo, no interior da lâmina própria, neoplasia epitelial arranjada em cordões ou ilhotas, por vezes em continuidade com o epitélio de revestimento. Seis casos eram bem diferenciados, nove casos moderadamente diferenciados e quatro casos pouco diferenciados.

5.2 Avaliação da técnica de Imunoistoquímica

5.2. 1 Expressão Imunoistoquímica da proteína p53

Os resultados da análise imunoistoquímica para o anticorpo anti-p53 obtidas nos espécimes estão demonstrados na Figura 1 e podem ser visualizados na Figura 2.

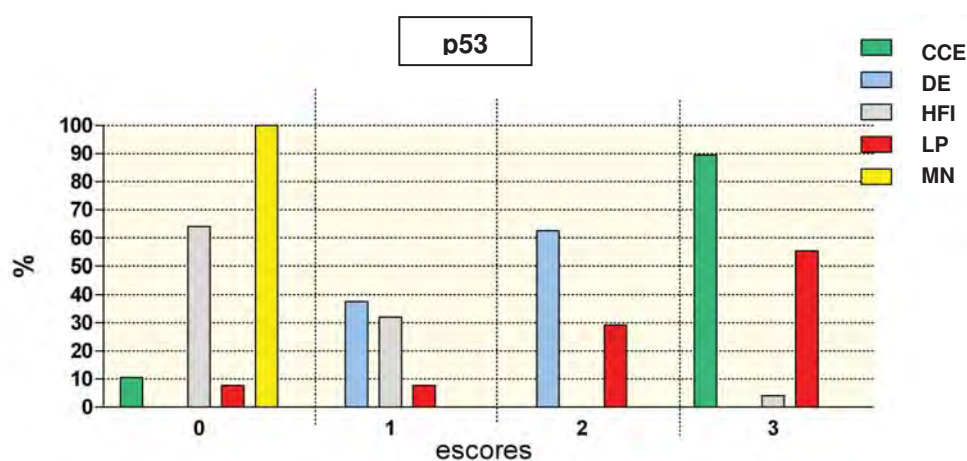


Figura 1 - Expressão da p53 nas amostras estudadas por escores (0 - menos de 5% das células positivas; 1 - de 5 a 25% das células positivas; 2 - de 25% a 50% das células positivas; 3 - mais de 50% das células positivas).

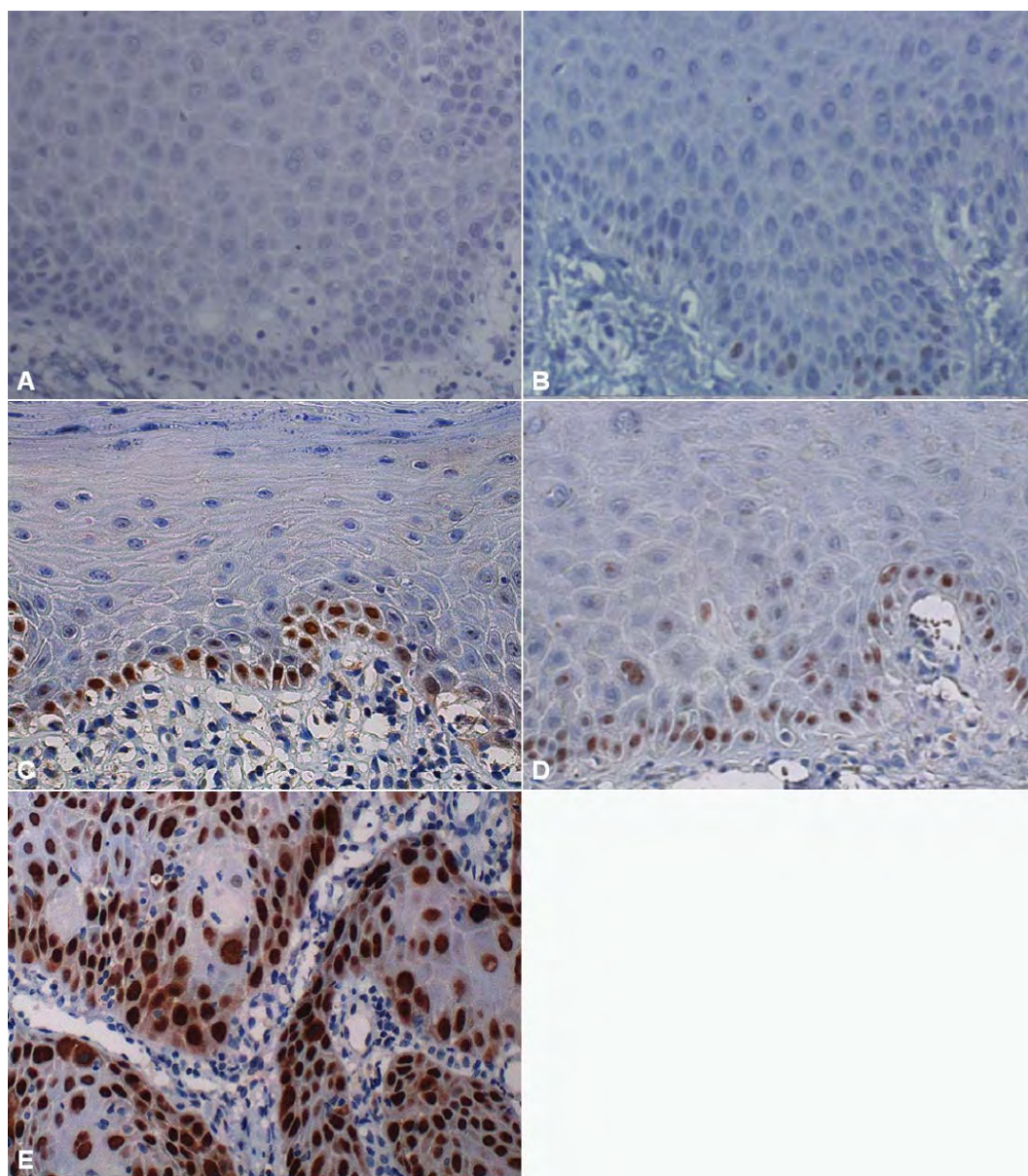


Figura 2 - Padrão de marcação do anticorpo anti-p53 (200x). A) Mucosa normal; B) Hiperplasia fibrosa inflamatória; C) Líquen plano; D) Displasia epitelial; E) Carcinoma de células escamosas.

O teste de Kolmogorov-Smirnov não revelou haver diferença estatisticamente significativa entre a expressão da p53, quando comparado o LP com a DE ($p=0.2042$) e o LP com o CCE ($p=0.0656$). Contudo, esta difere quando o LP é comparado a HFI ($p=0.00001$) e a MN ($p=0.0007$).

5.2. 2 Expressão Imunoistoquímica da proteína MDM2

Os resultados da análise imunoistoquímica para o anticorpo anti-MDM2 obtidas nos espécimes estão demonstrados na Figura 3 e podem ser visualizados na Figura 4.

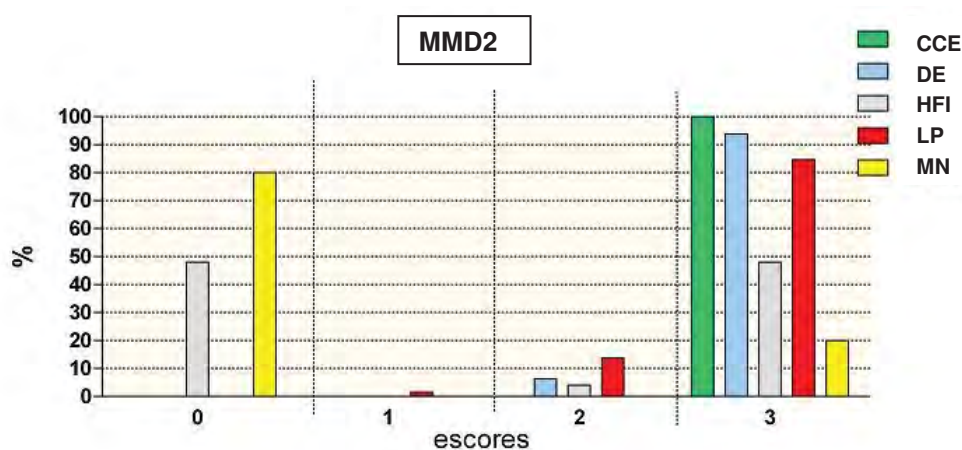


Figura 3 - Expressão da MDM2 nas amostras estudadas por escores (0 - menos de 5% das células positivas; 1 - de 5 a 25% das células positivas; 2 - de 25% a 50% das células positivas; 3 - mais de 50% das células positivas).

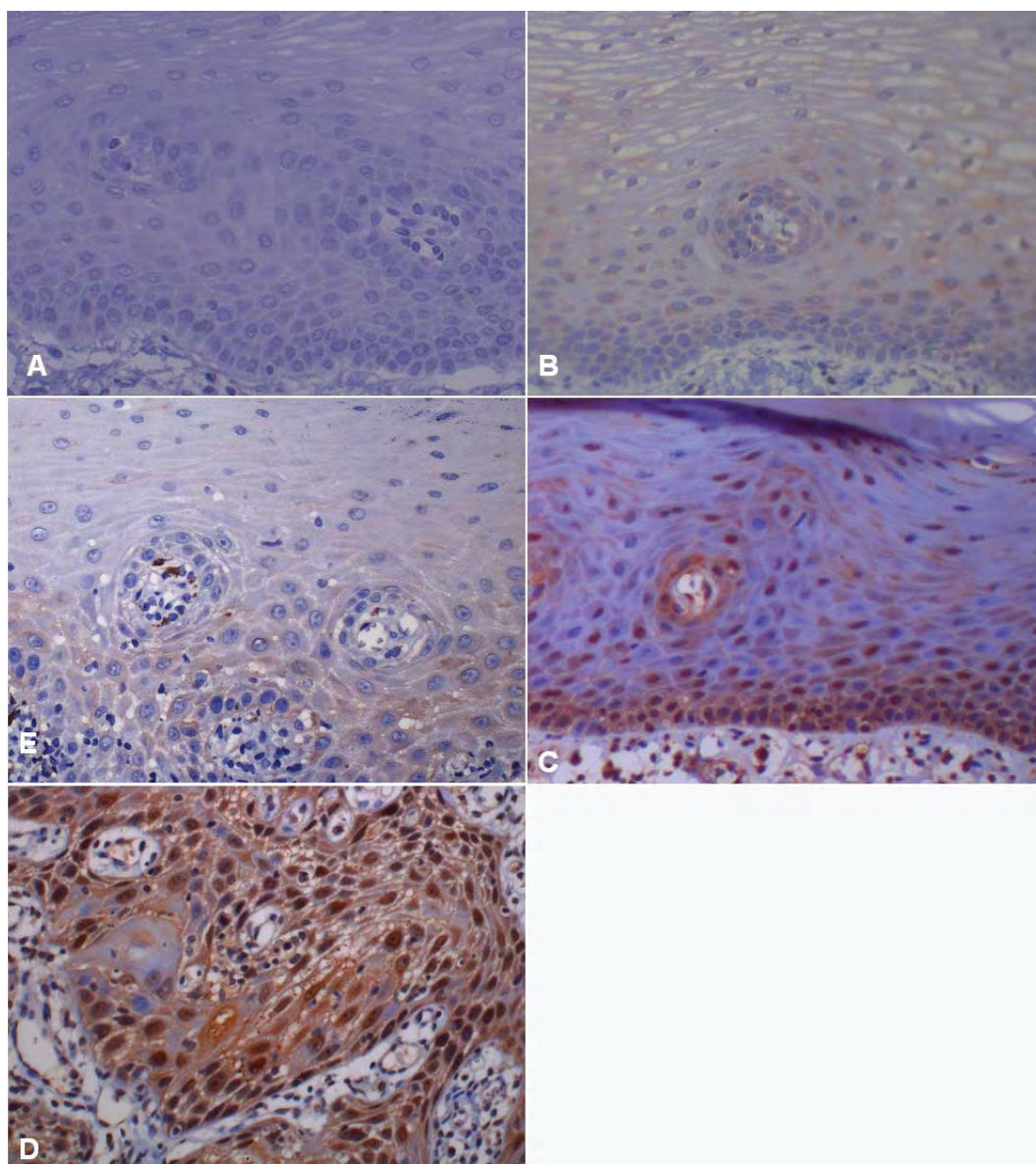


Figura 4 - Padrão de marcação do anticorpo anti-MDM2 (200x). A) Mucosa normal; B) Hiperplasia Fibrosa inflamatória; C) Líquen plano; D) Displasia epitelial; E) Carcinoma de células escamosas.

O teste de Kolmogorov-Smirnov não revelou haver diferença estatisticamente significativa entre a expressão da MDM2 quando comparado o LP com a DE ($p=1.0$) e o LP com o CCE ($p=0.9972$). Contudo, esta difere quando o LP é comparado a HFI ($p=0.0005$) e a MN ($p=0.0052$).

5.2. 3 Expressão Imunoistoquímica da proteína SUMO-1

Os resultados da análise imunoistoquímica para o anticorpo anti-SUMO-1 obtidas nos espécimes estão demonstrados na Figura 5 e podem ser visualizados na Figura 6.

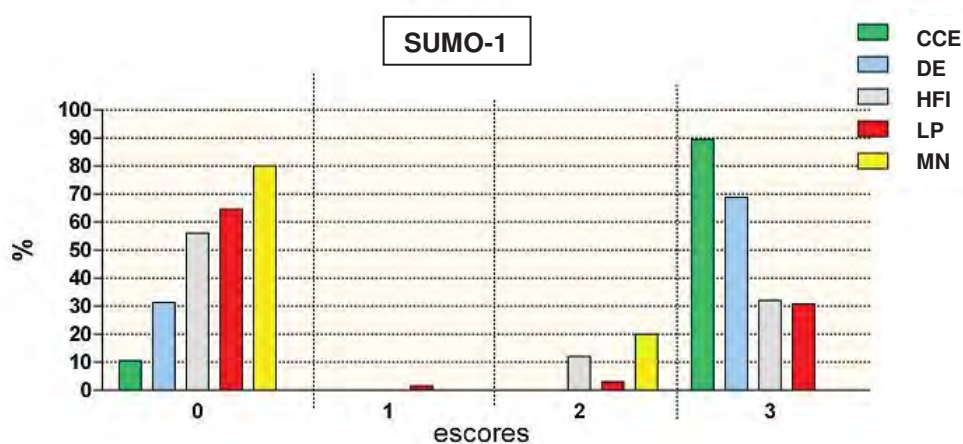


Figura 5 - Expressão da SUMO-1 nas amostras estudadas por escores (0 - menos de 5% das células positivas; 1 - de 5 a 25% das células positivas; 2 - de 25% a 50% das células positivas; 3 - mais de 50% das células positivas).

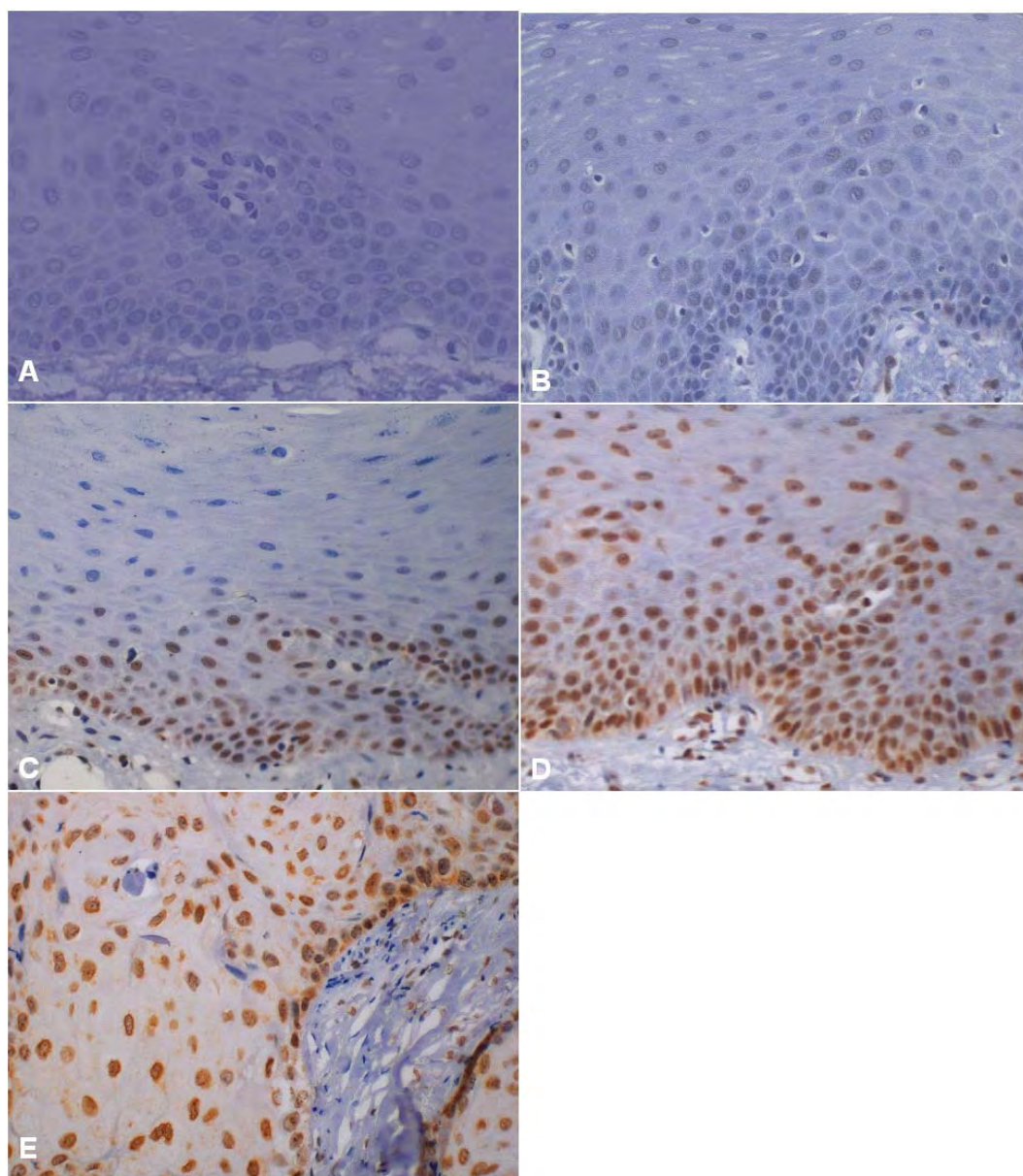


Figura 6 - Padrão de marcação do anticorpo anti-SUMO-1 (200x). A) Mucosa normal; B) Hiperplasia Fibrosa inflamatória; C) Líquen plano; D) Displasia epitelial; E) Carcinoma de células escamosas.

O teste de Kolmogorov-Smirnov revelou haver diferença estatisticamente significativa entre a expressão da SUMO-1 quando comparado o LP com a DE ($p=0.0492$) e o LP com o CCE ($p=0.0001$).

Contudo, esta diferença não foi observada quando o LP é comparado a HFI ($p=1.0$) e a MN ($p=0.8302$).

5.2. 4 Expressão de p-53, MDM2, SUMO-1 versus gradação das displasias epiteliais.

A amostra de casos de DE foi escassa e não foi possível realizar uma correlação entre a gradação da DE e a expressão das proteínas estudadas (tabela 3).

Tabela 2 - Expressão de p53, MDM2 e SUMO-1 em diferentes graus de displasias epiteliais

		Escore			
Graus de diferenciação		0	1	2	3
p53	Discreta	0	0	4	5
	Moderada	0	0	2	5
MDM2	Discreta	0	0	0	9
	Moderada	0	0	1	5
SUMO-1	Discreta	1	0	0	8
	Moderada	4	0	0	3

5.2. 5 Expressão de p-53, MDM2, SUMO-1 versus gradação dos carcinomas epidermóides

A amostra de CCE constou de 19 casos, seis foram classificados como bem diferenciados, nove como moderadamente diferenciados e quatro como pouco diferenciados, como demonstra a tabela 2. O teste exato de Fisher não mostrou correlação entre os CCE bem diferenciados ($p=0,5439$), moderadamente diferenciados ($p=0,2632$) e pouco diferenciados ($p=0,3860$) e os diferentes graus de expressão de p53; entre os CCE bem diferenciados ($p=1,0$), moderadamente diferenciados ($p=1,0$) e pouco diferenciados ($p=1,0$) e os diferentes graus de expressão de MDM2; e entre os CCE bem diferenciados ($p=0,5439$), moderadamente diferenciados ($p=0,7368$) e pouco diferenciados ($p=0,6140$) e os diferentes graus de expressão de SUMO-1 (Tabela 4).

Tabela 3 - Expressão de p53, MDM2 e SUMO-1 em diferentes graus de carcinoma de células escamosas

		Escore			
Graus de diferenciação		0	1	2	3
p53	Bem diferenciado	1	0	0	5
	Moderadamente diferenciado	0	0	0	9
	Pouco diferenciado	1	0	0	3
MDM2	Bem diferenciado	0	0	0	6
	Moderadamente diferenciado	0	0	0	9
	Pouco diferenciado	0	0	0	4
SUMO-1	Bem diferenciado	1	0	0	5
	Moderadamente diferenciado	1	0	0	8
	Pouco diferenciado	0	0	0	4

6 DISCUSSÃO

Alterações na expressão de proteínas relacionadas à regulação do mecanismo de apoptose podem ser utilizadas como marcadores de potencial de transformação maligna em lesões epiteliais como LP bucal e DE bucal.

O LP é uma doença crônica mucocutânea inflamatória de etiologia desconhecida, em que linfócitos CD8+ ativados desencadeiam a apoptose de queratinócitos basais (Gorsky et al., 1996; Xue et al., 2005; Anuradha et al., 2008). Embora a OMS classifique o LP como uma doença com potencial de transformação maligna, há uma considerável discussão sobre o assunto na literatura científica (Gorsky et al., 1996; Rajenthiran et al., 1999; Eisen, 2002; Xue et al., 2005) e os estudos não têm padronizado os critérios para o diagnóstico clínico e histopatológico (Eisenberg, 2000; Ismail et al., 2007). No presente estudo, foram utilizados critérios para o diagnóstico clínico estabelecidos por Van der Meij e Van der Waal (2003) [21] e histopatológico por Eisenberg (2000) [9], sendo as amostras de lesões reticulares bilaterais e simétricas buscando padronização para minimizar erros de diagnóstico. Importante considerar que as lesões reticulares de LP não necessitam de tratamento, por não apresentarem sintomas. Tendo em vista a hipótese da relação inflamação com a transformação maligna, tal condição também deve ser observada quando são realizados estudos imunoistoquímicos, pois o tratamento com corticosteróides pode alterar o padrão histológico.

A hipótese de que a inflamação crônica local esteja relacionada ao desenvolvimento de neoplasias malignas tem sido discutida na literatura, já que grande variedade de lesões malignas demonstra algum grau de células e mediadores inflamatórios (Cossens,

Werb, 2002; Mantovani et al., 2008; Qian, Pallard, 2010). Desta forma, gatilhos de inflamação crônica poderiam aumentar o risco de desenvolver câncer, incluindo nestes, infecções microbianas, doenças auto-imunes e outras doenças inflamatórias (Mantovani et al., 2008).

Assim, o câncer e a inflamação poderiam estar ligados por duas vias: via intrínseca e via extrínseca. A via intrínseca seria ativada por eventos genéticos que causariam a neoplasia maligna, como a ativação de oncogene e a inativação de genes supressores de tumores, o que levaria as células alteradas a produzirem mediadores inflamatórios. Por outro lado, na via extrínseca, doenças inflamatórias ou infecciosas poderiam aumentar o risco de desenvolver câncer, pela presença prévia do microambiente inflamatório, facilitando e promovendo a instabilidade genômica e a angiogênese (Mantovani et al., 2008).

As ações pró-neoplasia de células inflamatórias incluem a liberação de fatores de crescimento e sobrevivência, promoção da angiogênese e linfangiogênese, estímulo a danos no DNA e remodelação da matriz extracelular (MEC) para facilitar a invasão. No entanto, o recrutamento de células inflamatórias também pode diminuir o desenvolvimento da neoplasia, podendo representar uma tentativa do hospedeiro de suprimir o crescimento neoplásico (Coussens, Werb, 2002).

O LP é caracterizado histopatologicamente pela presença de infiltrado inflamatório em banda subepitelial, microambiente onde há a ativação de células inflamatórias e de uma rede de citocinas que podem agir para promover a transformação maligna. A produção de fator de necrose tumoral (TNF), fator inibidor de macrófagos (MIF), MMP, quinase e interleucinas 4 e 6 (IL-4, IL-6) por macrófagos, mastócitos, fibroblastos e linfócitos T, podem levar à degradação, angiogênese e remodelação da MEC, o que poderia influenciar no crescimento das células epiteliais bucais, sobrevivência, apoptose e, por fim, promover a iniciação neoplásica (Mignogna et al., 2004).

Seguindo esta linha de pensamento, Liu et al. (2010) propõem a hipótese de que mediadores inflamatórios induzem alterações em proteínas de células epiteliais bucais, levando à progressão do LP para CCE. Uma série de estímulos moleculares originários do infiltrado inflamatório, poderiam determinar maior sensibilidade dos queratinócitos bucais aos agentes mutagênicos exógenos, ou mesmo que as próprias proteínas e pequenas moléculas geradas por células inflamatórias poderiam se comportar como estes agentes (Gonzalez-Moles et al., 2006). Esta idéia pode ser corroborada pela demonstração de que no LP há aumento acentuado na taxa de proliferação de células basais epiteliais, com finalidade de manter a estrutura epitelial, fenômeno que seria induzido por estímulos do infiltrado inflamatório e seria um evento importante no desenvolvimento do CCE (Liu et al., 2010).

Entretanto, essa atividade pró-neoplasia maligna da inflamação crônica não é verdadeira para todas as neoplasias, já que em certas lesões a presença de células inflamatórias está associada ao melhor prognóstico, havendo evidências de que células inflamatórias, como macrófagos e linfócitos *natural killers* podem destruir células neoplásicas (Mantovani et al., 1992).

Observa-se que durante o desenvolvimento de neoplasias malignas há um predomínio de interleucinas 6 (IL-6) e interleucinas 10 (IL-10) produzidas por linfócitos CD4⁺ (perfil Th2 - linfócitos auxiliares 2) e uma supressão do fator de necrose tumoral alfa (TNF-alfa) e interferon gama (INF-gama) (perfil Th1 - linfócitos auxiliares 1) (Mosmann et al., 2001). Em trabalho realizado por Simark-Mattsson et al., 1999, os dois perfis estavam presentes no LP.

Neste contexto, alguns achados observados neste estudo precisam ser considerados. Através da análise dos dados obtidos e após a execução do teste estatístico, notou-se que a expressão da proteína p53 não mostrou diferença estatisticamente significativa entre as amostras de LP e DE, bem como entre as amostras de LP e CCE. Entretanto, a

avaliação microscópica demonstrou que a marcação em LP estava restrita à camada basal e, em algumas poucas regiões isoladas, à camada parabasal. Ebrahimi et al. (2008) e Mignogna et al. (2004) discutem o fato de o infiltrado inflamatório e suas secreções poderem ocasionar dano ao DNA, o que levaria a maior expressão da proteína p53 em estudos de imunoistoquímica (Stoll et al., 2000). Gonzalez-Moles et al. (2008) concluíram que o sistema de promoção da reparação de danos de DNA age sobre o dano ocasionado pelo infiltrado inflamatório e suas secreções, sendo os casos de transformação maligna correspondentes às poucas situações específicas em que este sistema se encontra inativado.

As amostras do estudo diferiram estatisticamente quando comparado o LP e a HFI e o LP e a MN. Nas amostras de HFI a expressão da p53 foi nula ou muito pequena em quase todos os casos, neste tipo de lesão há presença de infiltrado crônico difuso, que pode ocasionar alguma alteração nas células da camada basal por exposição a situações estressantes, como o dano oxidativo, que levaria ao acúmulo de p53. Em contraste, as células das camadas mais superficiais não demonstraram marcação, já que estas perderam a capacidade de sofrer mitose (Safadi et al., 2010).

Adicionalmente, não houve a expressão da proteína p53 nos casos de MN, demonstrando que em tecidos saudáveis não há expressão da proteína (Hirota et al., 2002), já que o tipo selvagem da mesma é dificilmente detectado nos tecidos normais devido a sua meia-vida curta. (Nylander et al., 2000).

A expressão da proteína MDM2 não mostrou diferença estatisticamente significativa entre as amostras de LP e DE, nem entre as amostras de LP e CCE. Na avaliação dos casos em microscópio de luz ficou demonstrado que quando a expressão foi positiva, sua marcação era mais expressiva em camada basal e parabasal, com exceção do CCE, em que foi observada forte marcação distribuída por toda lesão. Além disso, as lesões positivas para MDM2 demonstraram forte

positividade. A proteína MDM2 promove a degradação da proteína p53, tanto a forma selvagem quanto a mutante (Meek, Knippschild, 2003). Desta forma, com a maior expressão de p53 espera-se maior expressão de MDM2, já que, por conta do controle por feedback, altas concentrações da proteína p53 ativariam o gene MDM2, aumentando a quantidade da MDM2 no tecido (Dong et al., 2003). Além disso, danos no DNA podem causar modificações em MDM2, que pode perder a capacidade de ser ubiquitinada, favorecendo a uma maior expressão imunoistoquímica. Entretanto, esta mutação a torna mais eficiente em ligar-se a p53 (Melchior, Hengst, 2000).

Em relação à expressão de MDM2, as amostras do estudo diferiram estatisticamente quando comparado o LP e a HFI e o LP e a MN. Os resultados obtidos se aproximam aos encontrados por Souza et al. (2000) que observaram grande imunorreatividade de MDM2 em lesões centrais e periféricas de células gigantes, concluindo que a expressão imunoistoquímica desta proteína não é específica e pode estar relacionada a lesões de natureza benigna.

Apenas uma amostra de MN mostrou expressão da proteína MDM2, o que pode ser explicado pelo fato das amostras de MN serem provenientes da periferia de lesões de HFI, considerando a impossibilidade de coleta de mucosa sem alterações clínicas frente às questões éticas envolvidas. Desta forma, há a possibilidade da presença de alguma substância inflamatória, que pode ter levado a expressão da proteína MDM2 nesta amostra, já que o mesmo bloco sofre cortes seriados e a amostra tratada para esta proteína pode ser de um sítio mais próximo da lesão da HFI. Tanta et al. (2000) e Katayama et al. (2007) demonstraram que esta proteína foi dificilmente detectada em tecidos epiteliais com aspecto de normalidade.

A expressão de SUMO-1 revelou diferença estatisticamente significativa entre as amostras de LP e DE e entre as amostra de LP e CCE. Katayama et al. (2007) também observaram

grande expressão de SUMO-1 em CCE e DE. A proteína MDM2 pode ser encontrada alterada em CCE e DE e, como já comentado, esta perde a capacidade de ser ubiquitinada e sumoilada (Melchior, Hengst, 2000). Desta forma, pode-se observar uma maior expressão de SUMO-1 nestas lesões, já que estas não estão ligadas a MDM2.

Todavia, quanto à expressão de SUMO-1, as amostras do estudo não diferiram estatisticamente comparando-se LP e HFI, LP e MN. Muitas lesões de LP e HFI apresentaram escore zero, o que pode indicar que a proteína SUMO-1 esteja causando sumoilação da proteína MDM2, que não se encontra mutada, sendo menos detectada na imunoistoquímica. Considerando que, até então, não foram encontrados estudos da expressão desta proteína em lesões de LP e HFI, os resultados indicam ser necessária a realização de outras pesquisas para esclarecer o papel da SUMO-1.

Apenas uma amostra de MN mostrou expressão da proteína SUMO-1. Isso pode ser explicado, assim como no caso positivo para MDM2 em MN, pela presença de infiltrado inflamatório remanescente nas amostras, que foram coletadas da periferia de lesões de HFI. Katayama et al. (2007) demonstraram que esta proteína foi dificilmente detectada em tecidos epiteliais com aspecto de normalidade.

Na tentativa de correlacionar a expressão de p53, MDM2, SUMO-1 e a gradação das DE, foi realizada a avaliação histológica das amostras quanto aos critérios propostos pela OMS (Barnes et al., 2005) e por Kujan et al., (2006). Entretanto, não foi produtiva, tendo em vista que a amostra de casos de DE foi escassa, o que impossibilitou correlacionar a gradação com a expressão das proteínas estudadas. Para padronização, todas as amostras selecionadas foram do mesmo sítio, mucosa jugal, localização incomum para DE. Além disso, as amostras de displasias contaram apenas com espécimes classificadas como discretas e moderadas, e de baixo risco pela classificação de Kujan et al., (2006), como podemos observar na tabela 1. Todavia, a padronização do uso de

lesões localizadas apenas em mucosa jugal foi importante já que as estruturas de revestimento da mucosa bucal apresentam diferentes características histológicas. Ainda, as lesões reticulares de LP em mucosa jugal não são tratadas com corticoterapia, o que poderia levar a alteração de padrão histológico.

Da mesma forma, a fim de correlacionar a expressão de p53, MDM2, SUMO-1 com a gradação dos CCE, foi realizada a avaliação histológica destes quanto aos critérios propostos pela OMS (Barnes et al., 2005). Todavia, não houve correlação entre os graus de diferenciação dos CCEs e os diferentes graus de expressão das proteínas estudadas, já que, em relação ao CCE, observou-se grande expressão destas proteínas, predominando escore 3, achados que concordam com trabalhos anteriores (Katayama et al., 2007; Ögmundsdóttir et al., 2009; Yanamoto et al., 2002).

Qian e Pollard (2010) discutiram que a inflamação crônica persistente cria um microambiente no estroma subepitelial com capacidade de potencializar a aquisição de mutações oncogênicas e de promoção do crescimento nas células epiteliais subjacentes. Sendo o LP uma doença epitelial crônica de cunho autoimune caracterizada histopatologicamente pela presença de infiltrado inflamatório em banda subepitelial (Gorsky et al., 1996; Xue et al., 2005; Anuradha et al., 2008), a literatura propõe a hipótese de que esta inflamação induza alterações epiteliais que culminariam com transformação maligna. (Gonzalez-Moles et al., 2006). Não obstante estas informações e de todas comentadas até aqui, ainda não é possível medir ou quantificar o valor específico destes fatores. Assim, os casos de LP devidamente diagnosticados, a despeito da literatura, devem ser acompanhados, com intervalos definidos pelo clínico de acordo com a avaliação individual dos pacientes, considerando localização das lesões, aspecto clínico e fatores relacionados à carcinogênese que possam estar associados.

7 CONCLUSÃO

Os resultados do presente estudo mostraram que houve correlação positiva para a expressão de importantes proteínas relacionadas à regulação do mecanismo de apoptose, p53 e MDM2, quando da avaliação de LP bucal com relação à DE e ao CCE bucal, entretanto em menor grau. Todavia, em relação à proteína SUMO-1, esta correlação não foi demonstrada, e o LP demonstrou expressão semelhante à observada em MN e HFI. Conclui-se pela necessidade de estudos para esclarecer o papel da inflamação como possível agente relacionado aos casos de LP que sofreram transformação maligna.

8 REFERÊNCIAS*

Aguirre UJM. Letter to the editor: oral lichenoid disease. A new classification proposal. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2008;13:E224.

Andreasen JO. Oral lichen planus. 1. A clinical evaluation of 115 cases. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1968;25(1):31-42.

Anuradha CH, Reddy BV, Nandan SR, Kumar SR. Oral lichen planus. A review. *N Y State Dent J*. 2008 Jun-Jul;74(4):66-8.

Barnes L, Eveson JW, Reichart P, Sidransky D. World Health Organization Classification of Tumours. Pathology & Genetics of Head and Neck Tumours. Lyon: IARC Press; 2005.

Bascones-Ilundain GM, Campo-Trapero J, Gil-Montoya JA, Esparza-Gomez GC, Cano-Sanchez J, Bascones-Martinez A. No differences in caspase-3 and Bax expression in atrophic-erosive vs. reticular oral lichen planus. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2008 Feb;22(2):204-12.

Berglund L, Björling E, Oksvold P, Fagerberg L, Asplund A, Al-Khalili Szigyarto C, et al. A gene-centric human protein atlas for expression profiles based on antibodies. *Mol Cell Proteomics*. 2008; (10):2019-27.

Bermejo-Fenoll A, Sánchez-Siles M, López-Jornet P, Camacho-Alonso F, Salazar-Sánchez N. A retrospective clinicopathological study of 550 patients with oral lichen planus in south-eastern Spain. *J Oral Pathol Med*. 2010 Jul;39(6):491-6.

* Baseado em:

International Committee of Medical Journal Editors Uniform Requirements for Manuscripts Submitted to Biomedical journals: Sample References [homepage na Internet]. Bethesda: US NLM; c2003 [disponibilidade em 2008 ago; citado em 25 ago.] Disponível em: http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.htm

Buschmann T, Fuchs SY, Lee CG, Pan ZQ, Ronai Z. SUMO-1 modification of Mdm2 prevents its self-ubiquitination and increases Mdm2 ability to ubiquitinate p53. *Cell*. 2000 Jun;101(7):753-62

Cafaro A, Albanese G, Arduino PG, Mario C, Massolini G, Mozzati M, et al. Effect of low-level laser irradiation on unresponsive oral lichen planus: early preliminary results in 13 patients. *Photomed Laser Surg*. 2010 Oct;28 Suppl 2:S99-103.

Carrozzo M. Oral diseases associated with hepatitis C virus infection. Part 2: lichen planus and other diseases. *Oral Dis*. 2008 Apr;14(3):217-28.

Cortés-Ramírez DA, Gainza-Cirauqui ML, Echebarria-Goikouria MA, Aguirre-Urizar JM. Oral lichenoid disease as a premalignant condition: the controversies and the unknown. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2009 Mar;14(3):E118-22.

Coussens LM, Werb Z. Inflammation and cancer. *Nature*. 2002 Dec;420(6917):860-7.

Daujat S, Neel H, Piette J. MDM2: life without p53. *Trends Genet*. 2001 Aug;17(8):459-64.

De Freitas MCA, Ramalho LM, Xavier FC, Moreira AL, Reis SR. p53 and MDM2 protein expression in actinic cheilitis. *J Appl Oral Sci*. 2008 Nov-Dec;16(6):414-9.

Dong YB, Yang HL, Elliott MJ, McMasters KM. Increased mdm-2 expression in a p53-independent manner blocks UV-induced cell cycle arrest and apoptosis in human osteosarcoma cells. *Tumour Biol*. 2003 May-Jun;24(3):130-9.

Ebrahimi M, Boldrup L, Coates PJ, Wahlin YB, Bourdon JC, Nylander K. Expression of novel p53 isoforms in oral lichen planus. *Oral Oncol*. 2008 Feb;44(2):156-61.

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

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

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

Eisenberg E, Krutchkoff DJ. Lichenoid lesions of oral mucosa. Diagnostic criteria and their importance in the alleged relationship to oral cancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1992;73(6):699-704.

Fernández-González F, Vázquez-Álvarez R, Reboiras-López D, Gándara-Vila P, García-García A, Gándara-Rey JM. Histopathological findings in oral lichen planus and their correlation with the clinical manifestations. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal.* 2010;15(1):225-8.

Gandolfo S, Richiardi 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.

Girod SC, Pfeiffer P, Ries J, Pape HD. Proliferative activity and loss of function of tumour suppressor genes as 'biomarkers' in diagnosis and prognosis of benign and preneoplastic oral lesions and oral squamous cell carcinoma. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 1998 Aug;36(4):252-60.

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

Gonzalez-Moles MA, Gil-Montoya JA, Ruiz-Avila I, Esteban F, Bascones-Martinez A. Differences in the expression of p53 protein in oral lichen

planus based on the use of monoclonal antibodies DO7 and pAb 240. *Oral Oncol.* 2008 May;44(5):496-503.

Gorsky M, Raviv M, Moskona D, Laufer M, Bodner L. Clinical characteristics and treatment of patients with oral lichen planus in Israel. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1996 Dec;82(6):644-9.

Gunduz K, Demireli P, Inanir I, Nese N. Expression of matrix metalloproteinases (MMP-2, MMP-3, and MMP-9) and fibronectin in lichen planus. *J Cutan Pathol.* 2006 Aug;33(8):545-50.

Hampf BGC, Malmstrom MJ, Aalberg VA, Hannula JA, Vikkula J. Psychiatric disturbance in patients with oral lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1987;63:429-32.

Hietanen J, Paasonen MR, Kuhlefelt M, Malmström M. A retrospective study of oral lichen planus patients with concurrent or subsequent development of malignancy. *Oral Oncol.* 1999 May;35(3):278-82.

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 Apr;31(4):204-12.

Ingafou M, Leao JC, Porter SR, Scully C. Oral lichen planus: a retrospective study of 690 British patients. *Oral Dis.* 2006 Sep;12(5):463-8.

Ismail SB, Kumar SKS, Zain RB. Oral lichen planus and lichenoid reactions: etiopathogenesis, diagnosis, management and malignant transformation. *J Oral Sci.* 2007;49(2):89-106.

Karatsaidis A, Hayashi K, Schreurs O, Helgeland K, Schenck K. Survival signalling in keratinocytes of erythematous oral lichen planus. *J Oral Pathol Med.* 2007 Apr;36(4):215-22.

Katayama A, Ogino T, Bando N, Takahara M, Kishibe K, Nonaka S, et al. Overexpression of small ubiquitin-related modifier-1 and sumoylated

Mdm2 in oral squamous cell carcinoma: possible involvement in tumor proliferation and prognosis. *Int J Oncol*. 2007 Sep;31(3):517-24.

Kim KI, Baek SH. SUMOylation code in cancer development and metastasis. *Mol Cells*. 2006 Dec;22(3):247-53.

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

Kujan O, Oliver RJ, Khattab A, Roberts SA, Thakker N, Sloan P. Evaluation of a new binary system of grading oral epithelial dysplasia for prediction of malignant transformation. *Oral Oncol*. 2006 Nov;42(10):987-93.

Liu Y, Messadi DV, Wu H, Hu S. Oral lichen planus is a unique disease model for studying chronic inflammation and oral cancer. *Med Hypotheses*. 2010 Dec;75(6):492-4.

Lodi G, Scully C, Carrozzo M, Griffiths M, Sugerman PB, Thongprasom 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.

Lodi G, Tarozzi M, Sardella A, Demarosi F, Canegallo L, Di Benedetto D, et al. Miconazole as adjuvant therapy for oral lichen planus: a double-blind randomized controlled trial. *Br J Dermatol*. 2007 Jun;156(6):1336-41.

Manolache L, Seceleanu-Petrescu D, Benea V. Lichen planus patients and stressful events. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2008 Apr;22(4):437-441.

Mantovani A, Bottazzi B, Colotta F, Sozzani S, Ruco L. The origin and function of tumor-associated macrophages. *Immunol. Today*. 1992; 13: 265-70.

Mantovani A, Allavena P, Sica A, Balkwill F. Cancer-related inflammation. *Nature*. 2008 Jul;454(7203):436-44.

May P, May E. Twenty years of p53 research structural and functional aspects of the p53 protein. *Oncogene*. 1999 Dec;18(53):7621-36.

McCreary CE, McCartan BE. Clinical management of oral lichen planus. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 1999 Oct;37(5):338-43.

Meek DW, Knippschild U. Posttranslational modification of MDM2. *Mol Cancer Res*. 2003 Dec;1(14):1017-26.

Melchior F, Hengst L. Mdm2-SUMO1: is bigger better?. *Nat Cell Biol*. 2000 Sep;2(9):E161-3.

Mignogna MD, Fedele S, Lo Russo L, Lo Muzio L, 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 Aug;38(4):370-7.

Momand J, Wu HH, Dasgupta G. MDM2—master regulator of the p53 tumor suppressor protein. *Gene*. 2000;242:15-29.

Mosmann TR, Coffman RL. TH1 and TH2 cells: different patterns of lymphokine secretion lead to different functional properties. *Annu Rev Immunol*. 2001;7:145-173.

Nakagawa K, Yamamura K, Maeda S, Ichihashi M. Bcl-2 expression in epidermal keratinocytic diseases. *Cancer* 1994;74(6):1720-4.

Nylander K, Dabelsteen E, Hall PA. The p53 molecule and its prognostic role in squamous cell carcinomas of the head and neck. *J Oral Pathol Med*. 2000; 29:413–25.

Ögmundsdóttir HM, Björnsson J, Holbrook WP. Role of TP53 in the progression of pre-malignant and malignant oral mucosal lesions. A follow-up study of 144 patients. *J Oral Pathol Med*. 2009 Aug;38(7):565-71.

Oliveira Alves MG, Almeida JD, Balducci I, Guimarães Cabral LA. Oral lichen planus: A retrospective study of 110 Brazilian patients. *BMC Res Notes*. 2010;3(3):157-60.

Omelyanchuk LV. Key events of cell cycle: organization and regulation. *Rus J Genet*. 2004;40(3):293-310.

Qian BZ, Pollard JW. Macrophage diversity enhances tumor progression and metastasis. *Cell*. 2010 Apr;141(1):39-51.

Rajentheran R, McLean NR, Kelly CG, Reed MF, Nolan A. Malignant transformation of oral lichen planus. *Eur J Surg Oncol*. 1999 Oct;25(5):520-3.

Safadi RA, Al Jaber SZ, Hammad HM, Hamasha AA. Oral lichen planus shows higher expressions of tumor suppressor gene products of p53 and p21 compared to oral mucositis. An immunohistochemical study. *Arch Oral Biol*. 2010 Jun;55(6):454-61.

Saitoh H, Hinchey J. Functional heterogeneity of small ubiquitin-related protein modifiers SUMO-1 versus SUMO-2/3. *J Biol Chem*. 2000 Mar;275(9):6252-8.

Schimmer AD. Inhibitor of apoptosis proteins: translating basic knowledge into clinical practice. *Cancer Res*. 2004;64(20):7183-90.

Scully C, el-Kom M. Lichen planus: review and update on pathogenesis. *J Oral Pathol*. 1985 Jul;14(6):431-58.

Simark-Mattsson C, Bergenholtz G, Jontell M, Eklund C, Seymour GJ, Sugerman PB, et al. Distribution of interleukin-2,-4,-10, tumour necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta mRNAs in oral lichen planus. *Arch Oral Biol*. 1999;44(6):499-507.

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

Sousa FACG, Paradella TC, Carvalho YR, Rosa LEB. Comparative analysis of the expression of proliferating cell nuclear antigen, p53, bax, and bcl-2 in oral lichen planus and oral squamous cell carcinoma. *Ann Diagn Pathol.* 2009b Oct;13(5):308-12.

Souza PE, Mesquita RA, Gomez RS. Evaluation of p53, PCNA, Ki-67, MDM2 and AgNOR in oral peripheral and central giant cell lesions. *Oral Dis.* 2000 Jan;6(1):35-9.

Stoll C, Baretton G, Ahrens C, Löhrs U. Prognostic significance of apoptosis and associated factors in oral squamous cell carcinoma. *Virchows Arch.* 2000;436:102-8.

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

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 Meij EH, Schepman KP, Van der Waal I. The possible premalignant character of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: a prospective study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003;96(2):164–71.

Van der Meij EH, Van der Waal I. Lack of clinicopathologic correlation in the diagnosis of oral lichen planus based on the presently available diagnostic criteria and suggestions for modifications. *J Oral Pathol Med.* 2003;32:507-12.

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

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 Oral Pathol Med*. 2005 Sep;34(8):467-72.

Yanamoto S, Kawasaki G, Yoshitomi I, Mizuno A. p53, mdm2, and p21 expression in oral squamous cell carcinomas: relationship with clinicopathologic factors. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2002;94(5):593-600.

ANEXO A – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa – FOSJC/UNESP

 **UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA**
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
Av. Eng. Francisco José Longo, 777 - Rl. São Domingos
CEP 12201-970 - F: (12) 3947-9028
Fax (12) 3947-9010 / jandco@focj.usp.br



CERTIFICADO
Comitê de Ética em Pesquisa
Com Seres Humanos

CERTIFICAMOS, que o protocolo nº **045/2009-PH/CEP**, sobre **"Avaliação da expressão das proteínas p53, MDM2 e SUMO-1 em líquido plano bucal"**, sob a responsabilidade de **JANETE DIAS ALMEIDA**, tendo como orientada a CD MÔNICA GHISLAINE OLIVEIRA ALVES, está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa, com seres humanos, conforme Resolução nº 196/96 do Conselho Nacional de Saúde e foi aprovado por este Comitê de Ética em Pesquisa.

São José dos Campos, 18 de agosto de 2009.



Profa. Assist.Dra. DENISE NICODEMO
Vice-Coordenadora

ANEXO B – Certificado do Comitê de Ética em Pesquisa – FOU SP

UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

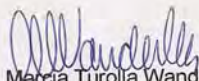
Comitê de Ética em Pesquisa

PARECER DE APROVAÇÃO
FR 328543
Protocolo 44/10

O grupo de trabalho indicado pelo Comitê de Ética em Pesquisa **APROVOU** o de pesquisa **“Avaliação da expressão das proteínas p53, MDM2 e SUMO-1 em líquen plano bucal, displasia epitelial bucal e carcinoma epidermóide bucal”**, de responsabilidade da Pesquisadora Monica Ghislaine Oliveira Alves, sob orientação do Prof. Dr. Fabio Daumas Nunes.

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

São Paulo, 19 de maio de 2010.


Profa. Dra. Mercia Turolia Wanderley
Coordenadora do CEP-FOUSP

Av. Prof. Lineu Prestes, 2227 – Cidade Universitária “Armando de Salles Oliveira” CEP 05008-000
São Paulo – SP – Diretoria Telefax: (011)3091-0062/3091-7817/3091-7860 - Compras: (011) 3091-7825
Impressão: 03/10

