

**FERNANDO AUGUSTO CERVANTES GARCIA DE SOUSA**

**ESTUDO DO POTENCIAL DE TRANSFORMAÇÃO MALIGNA  
DO LÍQUEN PLANO BUCAL: análise histológica,  
histoquímica e imunoistoquímica**



**2009**

**FERNANDO AUGUSTO CERVANTES GARCIA DE SOUSA**

**ESTUDO DO POTENCIAL DE TRANSFORMAÇÃO MALIGNA DO  
LÍQUEN PLANO BUCAL: análise histológica, histoquímica e  
imunoistoquímica**

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia Campus de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, como parte dos requisitos para obtenção do título de DOUTOR, pelo programa de Pós-Graduação em BIOPATOLOGIA BUCAL, Área de Patologia.

Orientador: Prof. Adj. Luiz Eduardo Blumer Rosa  
Co-orientadora: Profa. Tit. Yasmin Rodarte Carvalho

São José dos Campos  
2009

Apresentação gráfica e normatização 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; 2008.

S85e Sousa, Fernando Augusto Cervantes Garcia de  
Estudo do potencial de transformação maligna do líquen plano bucal: análise histológica, histoquímica e imunoistoquímica / Fernando Augusto Cervantes Garcia de Sousa. \_\_\_\_ São José dos Campos: [s.n.]; 2009.  
79.f.: il.

Tese (Doutorado em Biopatologia Bucal) – Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista, 2009.  
Orientador: Prof. Adj, Luiz Eduardo Blumer Rosa  
Co-orientador: Profa. Tit. Yasmin Rodarte Carvalho

1. Líquen Plano Bucal. 2. Carcinoma Epidermóide. 3. Mucosa Bucal. 4. Imunoistoquímica. I. Rosa, Luiz Eduardo Blumer. II. Universidade Estadual Paulista. Faculdade de Odontologia de São José dos Campos. III. Título.

Black D791

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, 25 de Março de 2009.

Assinatura:

Email: facgs@uol.com.br

## **BANCA EXAMINADORA**

Profa. Titular Yasmin Rodarte Carvalho (Co-orientadora)  
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos  
Universidade Estadual Paulista – UNESP

Profa. Doutora Adriana Aigotti Haberbeck Brandão  
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos  
Universidade Estadual Paulista – UNESP

Prof. Associado Fábio Daumas Nunes  
Faculdade de Odontologia de São Paulo  
Universidade de São Paulo – USP

Prof. Doutor Carlos Eduardo Dias Colombo  
Faculdade de Ciências da Saúde  
Universidade do Vale do Paraíba – UNIVAP

Prof. Titular Horácio Faig Leite  
Faculdade de Odontologia de São José dos Campos  
Universidade Estadual Paulista – UNESP

São José dos Campos, 25 de Março de 2009.

## *DEDICATÓRIA*

*Ao meu avô, Bolívar Pereira Garcia (in memorian),  
pelo carinho e exemplo de vida.*

*Foi uma honra alguém como você ter passado pela  
minha vida.*

*À minha noiva, Thaís Cachuté Paradella, pelo  
carinho, paciência e dedicação.*

*Você me deu uma razão para seguir em frente  
mesmo nos momentos mais difíceis.*

*Ao meu grande amigo, Marco Aurélio Leite da Silva,  
pelo carinho e apoio incondicional.*

*Sem o seu apoio não teria nem como eu ter seguido  
em frente.*

*Aos meus pais, Regina Paula Cervantes Garcia de  
Sousa e Valdir Aparecido de Sousa (in memorian), pelo carinho e  
dedicação.*

*Não há palavras suficientes para agradecer-lhes por  
tudo de bom que ambos fizeram e ainda fazem por mim.*

## *AGRADECIMENTOS ESPECIAIS*

*Ao meu orientador e amigo, Prof. Adj. Luiz Eduardo Blumer Rosa, pelo incentivo e apoio nestes anos de convivência.*

*À minha co-orientadora, Profa. Tit. Yasmin Rodarte Carvalho, pelo carinho e empenho com o qual me acolheu.*

*À minha avó, Maria Del Pilar Cervantes Garcia, pelo carinho e dedicação em todos os momentos da minha vida.*

*Aos meus irmãos, Marcelo (in memoriam), Clara, Bruna, Marcela, Marco, Paulo, Lucas e Victória, pelo carinho e alegria mesmo nos momentos mais difíceis.*

*Aos pais da minha noiva, Waldir Renato Paradella e Marlene Cachuté Paradella, pelo carinho e incentivo constantes.*

## *AGRADECIMENTOS*

*À Universidade Estadual Paulista “Júlio de Mesquita Filho”, na figura do diretor da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Prof. Adj. José Roberto Rodrigues.*

*Ao Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal, na pessoa da Profa. Adj. Cristiane Yumi Koga Ito.*

*À Coordenação e Aperfeiçoamento em Ensino Superior (CAPES) e Fundação de Amparo à Pesquisa do Estado de São Paulo (FAPESP).*

*Aos Professores e Funcionários do Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal.*

*Aos Mestrandos e Doutorandos do Programa de Pós-Graduação em Biopatologia Bucal.*

*“A bola pune.”*

*Muricy Ramalho*



## SUMÁRIO

<b>RESUMO</b> .....	9
<b>1 INTRODUÇÃO</b> .....	10
<b>2 REVISÃO DA LITERATURA</b> .....	14
<b>2.1 Líquen plano bucal</b> .....	14
<b>2.2 Potencial de malignização</b> .....	17
<b>2.3 Proliferação celular</b> .....	24
<b>2.4 Apoptose</b> .....	28
<b>3 PROPOSIÇÃO</b> .....	37
<b>4 MATERIAL E MÉTODO</b> .....	38
<b>4.1 Seleção dos casos</b> .....	38
<b>4.2 Processamento do material</b> .....	40
4.2.1 Histoquímica .....	40
4.2.2 Imunoistoquímica .....	42
<b>4.3 Análise dos resultados</b> .....	44
4.3.1 Análise quantitativa das NORs .....	44
4.3.2 Análise quantitativa da expressão das proteínas p53, PCNA, bax e bcl-2 .....	45
4.3.3 Análise estatística .....	46
<b>5 RESULTADOS</b> .....	47
<b>6 DISCUSSÃO</b> .....	58
<b>7 CONCLUSÃO</b> .....	64

<b>8 REFERÊNCIAS</b> .....	65
<b>ANEXO</b> .....	78
<b><i>ABSTRACT</i></b> .....	79

Sousa FAGG. Estudo do potencial de transformação maligna do líquen plano bucal: análise histológica, histoquímica e imunoistoquímica [tese]. São José dos Campos: Faculdade de Odontologia de São José dos Campos, Universidade Estadual Paulista; 2009.

## RESUMO

O objetivo deste trabalho foi analisar possíveis alterações dos mecanismos de proliferação celular e apoptose no líquen plano bucal, comparando-as com as observadas na displasia epitelial e no carcinoma epidermóide, visando avaliar o seu potencial de transformação maligna. Foram selecionados 24 casos de cada lesão e a partir deles, novos cortes histológicos foram obtidos, sendo parte submetidos à técnica de AgNOR e parte à técnica imunoistoquímica da estreptoavidina-biotina-peroxidase para análise da expressão das proteínas PCNA, p53, bax e bcl-2. A média de NORs/núcleo no líquen plano bucal, na displasia epitelial e no carcinoma epidermóide bucal foram, respectivamente,  $1,74 \pm 0,32$ ,  $2,42 \pm 0,62$  e  $2,41 \pm 0,61$ . A análise de variância revelou haver diferença estatisticamente significativa entre o líquen plano bucal e as demais lesões ( $p < 0,05$ ). Quanto à PCNA, p53, bax e bcl-2, o teste de qui-quadrado não revelou haver diferença significativa entre a expressão da p53 e da bcl-2. Contudo, a expressão da PCNA foi significativamente menor no líquen plano bucal do que nas demais lesões. Não houve diferença estaticamente significativa entre a expressão da PCNA e da bax na displasia epitelial e no carcinoma epidermóide bucal. Conclui-se que alterações na expressão destas proteínas podem ser observadas tanto no líquen plano bucal quanto na displasia epitelial e no carcinoma epidermóide bucal, sugerindo o potencial de transformação maligna desta lesão e enfatizando a importância do acompanhamento em longo prazo dos pacientes. Neste contexto, a análise das NORs se mostrou ferramenta útil em avaliar os casos de líquen plano bucal que apresentem maior risco de transformação maligna.

Palavras-chave: Líquen Plano Bucal. Carcinoma Epidermóide. Mucosa Bucal. Imunoistoquímica.

## 1 INTRODUÇÃO

Desde 2005, a Organização Mundial de Saúde (OMS), classifica o líquen plano bucal como uma desordem potencialmente maligna, embora este apresente um menor risco de transformação maligna do que o observado na leucoplasia e na eritroplasia (Van Der Waal, 2008). Todavia, tal classificação ainda não é totalmente aceita, sendo alvo de inúmeros debates.

Apesar de diversos estudos epidemiológicos retrospectivos e prospectivos realizados nos últimos vinte anos em diversos países sugerirem haver uma probabilidade de aproximadamente 1,6% de uma lesão inicialmente diagnosticada como líquen plano evoluir para o carcinoma epidermóide bucal (Holmstrup et al., 1988; Salem, 1989; Silverman Jr et al., 1991; Sigurgeirsson; Lindelöf, 1991; Voûte et al., 1992; Barnard et al., 1993; Moncarz et al., 1993; Gorsky et al., 1996; Markopoulos et al., 1997; Silverman; Bahl, 1997; Lo Muzio et al., 1998; Rajentheran et al., 1999; Mignogna et al., 2001; Chainani-Wu et al., 2001; Eisen, 2002; Lanfranchi-Tizeira et al., 2003; Van Der Meij et al., 2003; Rödström et al., 2004; Xue et al., 2005; Laeijendecker et al., 2005; Bornstein et al., 2006; Ingafou et al., 2006; Hsue et al., 2007; Zhang; Zhou, 2007), alguns autores acreditam que a maioria dos casos de transformação maligna descritos na literatura não foram suficientemente documentados para assim serem considerados (Krutchkoff et al., 1978; Van Der Meij et al., 1999; Eisenberg, 2000; Lodi et al., 2005).

Em 1999, Van Der Meij et al., após fazer uma revisão dos casos de transformação malignas publicados entre 1977 e 1999, concluíram que dois terços dos casos, além de apresentarem dados insuficientes, não possuíam critérios claros em relação ao diagnóstico

clínico e histopatológico da doença. Um ano mais tarde, Eisenberg (2000) também salientou a falta de critérios para o diagnóstico do líquen plano bucal.

Van Der Meij e Van Der Waal (2003) evidenciaram a dificuldade do diagnóstico clínico e histopatológico do líquen plano bucal. Estes autores verificaram que em 42% dos casos, nos quais houve plena concordância a respeito do diagnóstico clínico da doença, não existiu consenso em relação ao diagnóstico histopatológico. Por outro lado, em 50% dos casos nos quais houve tal consenso, faltou concordância clínica.

No entanto, técnicas recentes como, por exemplo, a imunohistoquímica e a biologia molecular, vêm contribuindo para por fim a esta polêmica. Apesar de diferentes metodologias, estas técnicas têm como principal objetivo avaliar a expressão de proteínas relacionadas à regulação do ciclo celular. Hoje se sabe que alterações dos mecanismos de proliferação celular e apoptose são essenciais à carcinogênese. Assim, alterações na expressão e, conseqüentemente, na função de tais proteínas podem ser um forte indicativo do potencial de transformação maligna de uma determinada lesão.

Entre as inúmeras proteínas envolvidas nos processos de proliferação celular e apoptose, as proteínas PCNA, p53, bcl-2 e bax merecem maior destaque, seja pelo seu papel chave nestes processos, seja pela sua conhecida participação na carcinogênese humana, especialmente na carcinogênese bucal. Stoll et al. (2000), por exemplo, observaram a presença de mutações da p53 em mais da metade dos casos de câncer bucal estudados.

Outro exemplo é a proteína a bcl-2, cuja hiperexpressão, além de ser essencial à carcinogênese bucal (Jordan et al., 1996; Singh et al., 1998; Kannan et al., 1998; Sulkowska et al., 2001; Loro et al., 2002; Teni et al., 2002), influencia a progressão da doença pois aumenta a sobrevivência das células neoplásicas, permitindo o surgimento de novas

mutações genéticas e conferindo a elas maior resistência à quimioterapia e radioterapia (Saikrishana et al., 2002).

Ainda mais acessível do que imunoistoquímica, outra técnica capaz de trazer informações bastante relevantes a cerca do potencial de transformação maligna do líquen plano bucal é a técnica de AgNOR. Esta técnica marca as proteínas associadas às regiões organizadoras nucleolares (NORs) (Derenzini, 2000), que são alças de DNA em torno das quais, no fim da telófase, o nucléolo é reestruturado após seu desaparecimento durante a fase mitótica da célula (Howell, 1977). As NORs são sítios de ligação de um grupo peculiar de proteínas acídicas não-histônicas (RNA polimerase I, C23 ou nucleolina e B23), que estão envolvidas na organização funcional e estrutural dos nucléolos e sempre associadas com a cromatina nucleolar (Derenzini et al., 1990).

Segundo Derenzini e Trerè (1994), quanto maior o número de NORs, menor é a duração do ciclo celular e maior é a velocidade de proliferação celular. Tal relação torna a análise quantitativa das NORs um excelente marcador da atividade proliferativa das células e uma ferramenta diagnóstica auxiliar bastante valiosa, pois possibilita diferenciar as células benignas das malignas e até mesmo prever o prognóstico de diversos tipos de câncer (Trerè et al., 1991).

Contudo, apesar de suas vantagens, tais técnicas ainda são pouco utilizadas no líquen plano bucal, contribuindo com a grande polêmica em relação ao seu potencial de transformação maligna. Fica evidente, portanto, a importância de se estudar possíveis alterações dos mecanismos de proliferação celular e apoptose no líquen plano bucal e suas correlações com aquelas observadas na displasia epitelial e no carcinoma epidermóide, pois somente à medida que se entender profundamente tais alterações é que se poderá conhecer a verdadeira natureza desta doença.

Considerando-se a elevada prevalência do líquen plano bucal e os riscos inerentes ao seu possível potencial de transformação

maligna, torna-se fundamental compreender os mecanismos envolvidos em tal fenômeno, uma vez que esta compreensão é essencial para se prever com exatidão seu comportamento, possibilitando assim a adoção de medidas preventivas que favoreçam os indivíduos com a doença. Além disso, ao passo que se consiga definir o líquen plano bucal como uma desordem potencialmente maligna ou não, serão obtidas novas informações acerca das fases iniciais do processo de carcinogênese, favorecendo tanto a detecção precoce do câncer quanto o seu tratamento.

## 2 REVISÃO DA LITERATURA

### 2.1 Líquen plano bucal

O líquen plano é uma doença mucocutânea bastante comum, que afeta principalmente mulheres entre a quinta e sexta décadas de vida (Edwards; Kelsch, 2002; Eisen, 2002; Neville et al., 2004; Sousa; Rosa, 2005; Xue et al., 2005). Contudo, de acordo com Laeijendecker et al. (2005), a doença também pode acometer indivíduos com menos de 18 anos, preservando as mesmas características clínicas com as quais se manifesta nos adultos, porém com prognóstico mais favorável.

Clinicamente o líquen plano bucal possui características distintas e fáceis de serem identificadas (Eisen et al., 2005), podendo apresentar-se sob duas formas principais: reticular e erosiva, embora outras formas de apresentação da doença não sejam raras (Edwards; Kelsch, 2002). De fato, segundo Mollaoglu (2000), originalmente outras quatro formas foram descritas: papular, “em placa”, bolhosa e atrófica.

A forma reticular ocorre com maior frequência e se caracteriza por linhas brancas entrelaçadas, conhecidas como estrias de *Wickham*, em geral cercadas por uma discreta borda eritematosa. Tais características, no entanto, podem não ser evidentes em alguns locais, como o dorso da língua, onde as lesões se apresentam como placas queratóticas. A forma reticular normalmente não causa sintomas e envolve a mucosa jugal posterior bilateralmente. Outras localizações, porém, podem estar envolvidas ao mesmo tempo, como o dorso e a parte



lateral da língua, as gengivas e o palato (Mollaoglu, 2000; Edwards; Kelsch, 2002; Neville et al., 2004).

A forma erosiva, embora não seja tão comum quanto a reticular, é mais significativa para o paciente, pois as lesões comumente são sintomáticas, variando desde simples desconforto até episódios de dor intensa capaz de interferir com a função mastigatória. Clinicamente, o líquen plano erosivo se manifesta por áreas atróficas e eritematosas frequentemente cercadas por finas estrias radiantes. Todavia, em alguns casos, se o componente erosivo for muito grave, poderá ocorrer separação do epitélio, resultando numa forma relativamente rara da doença, conhecida como líquen plano bolhoso (Edwards; Kelsch, 2002; Neville et al., 2004).

Algumas vezes, a atrofia e ulceração estão confinadas à mucosa gengival, produzindo um padrão de reação chamado gengivite descamativa. Em tais casos, amostras de biópsia devem ser obtidas para os exames de imunofluorescência e microscopia óptica do tecido perilesional, já que o penfigóide benigno de mucosa e o pênfigo vulgar podem se apresentar de forma semelhante (Neville et al., 2004).

Pacientes com a doença frequentemente apresentam uma ou mais lesões extrabuciais. Eisen (2002), por exemplo, menciona que aproximadamente 25% das mulheres com líquen plano bucal apresentam também envolvimento concomitante das mucosas vulvar e vaginal, e que cerca de 15% de todos os pacientes com a doença exibem lesões cutâneas. Segundo Neville et al. (2004), as lesões em pele têm sido classificadas como pápulas poligonais pruríticas e purpúreas. Elas normalmente afetam as regiões flexoras, como punho, cotovelo, joelho, entre outras. O exame cuidadoso da superfície das pápulas de pele revela uma fina rede em forma de laço de linhas brancas (estrias de *Wickham*). Outros locais de envolvimento extrabucal incluem as unhas, couro cabeludo, glânde peniana e mucosa esofágica.

As lesões cutâneas facilitam consideravelmente o diagnóstico da doença. No entanto, com exceção da forma reticular que possui características patognomônicas, a maioria dos casos é diagnosticada por meio do exame histopatológico. De fato, o líquen plano erosivo faz diagnóstico diferencial com carcinoma epidermóide, lúpus eritematoso discóide, candidíase crônica, penfigóide benigno de mucosa, *morsicatio buccarum*, reação liquenóide ao amálgama ou a drogas, doença do enxerto *versus* hospedeiro e eritema multiforme. O próprio líquen plano reticular faz, em alguns casos, diagnóstico diferencial com a leucoplasia (Edwards; Kelsch, 2002).

Os aspectos clínicos característicos do líquen plano bucal são, na maioria das vezes, suficientes para o diagnóstico correto da doença. Ainda assim, o estudo histopatológico é recomendado para confirmar o diagnóstico clínico e, principalmente, para excluir a presença de atipias epiteliais (Eisen et al., 2005).

Os achados histopatológicos clássicos do líquen plano bucal incluem: liquefação da camada basal acompanhada por um intenso infiltrado linfocitário disposto em faixa, imediatamente subjacente ao epitélio; presença de numerosos corpúsculos colóides eosinofílicos na interface epitélio-tecido conjuntivo (corpos de *Civatte*); cones epiteliais ausentes, hiperplásicos ou, mais freqüentemente, em forma de “dente de serra”; variações da espessura da camada espinhosa e graus variáveis de orto ou paraqueratose (Eisenberg, 2000; Regezi; Sciubba, 2000; Edwards; Kelsch, 2002; Neville et al., 2004).

Outras condições, no entanto, podem apresentar características histopatológicas semelhantes às encontradas no líquen plano bucal, incluindo reações liquenóides, lúpus eritematoso, leucoplasia, eritroleucoplasia e leucoplasia verrucosa proliferativa. Esta última possui na sua fase inicial achados clínicos e histopatológicos que podem ser facilmente confundidos com aqueles exibidos pelo líquen plano, todavia

ela revela freqüentemente graus variados de atipia epitelial e altas taxas de transformação maligna (Lodi et al., 2005).

Desta forma, o diagnóstico histopatológico do líquen plano bucal exige atenção redobrada. Van Der Meij e Van Der Waal (2003), por exemplo, verificaram que em 42% dos casos, nos quais houve plena concordância a respeito do diagnóstico clínico da doença, não existiu consenso em relação ao diagnóstico histopatológico. Por outro lado, em 50% dos casos, nos quais houve tal consenso, faltou concordância clínica.

Uma vez confirmado o diagnóstico, o tratamento da doença tem como objetivo o alívio dos sintomas, pois a cura nem sempre é possível. Segundo Regezi e Sciubba (2000), os corticoesteróides são os medicamentos de escolha no tratamento do líquen plano, o que se deve à sua capacidade de modular a resposta inflamatória e imunológica. A aplicação tópica, bem como a injeção local de esteróides, tem sido usada com sucesso no controle da doença. Todavia, nos casos em que os sintomas são graves, pode-se optar pelo uso sistêmico.

Ainda assim, outros medicamentos têm sido utilizados com excelentes resultados no tratamento do líquen plano, entre os quais, destacam-se os agentes imunossupressores, como a ciclosporina (Demitsu et al., 2000) e o tacrolimus (Morrison et al., 2002; Shichinohe et al., 2006), embora teoricamente tais medicamentos possam aumentar a possibilidade de transformação maligna (Lodi et al., 2005).

## **2.2 Potencial de malignização**

Durante as últimas décadas, numerosos estudos têm indicado um aumento no risco de desenvolvimento de câncer em pacientes com líquen plano bucal (Eisen, 2002; Lanfranchi-Tizieira et al., 2003; Gandolfo et al., 2004; Xue et al., 2005), fazendo com que a OMS

classificasse esta doença como uma desordem potencialmente maligna (Van Der Waal, 2008). Contudo, a associação entre o líquen plano bucal e o carcinoma epidermóide ainda é bastante polêmica, uma vez que muitos autores acreditam não haver dados suficientes que comprovem tal associação (Krutchkoff et al., 1978; Van Der Meij et al., 1999; Eisenberg, 2000; Lodi et al., 2005). Para estes autores, em sua grande maioria, os casos de transformação maligna não poderiam ser assim considerados, por apresentarem falhas no diagnóstico inicial. Ainda assim, não são poucos os estudos que destacam o potencial de malignização do líquen plano, especialmente na mucosa bucal (Eisen, 2002; Lanfranchi-Tizieira et al., 2003; Gandolfo et al., 2004; Xue et al., 2005).

Eisen (2002) estudou o potencial de transformação maligna do líquen plano bucal, além de suas características clínicas e possíveis relações com alterações sistêmicas. Após acompanhamento de 723 pacientes com a doença, num período de seis meses a oito anos, foi constatado o desenvolvimento do carcinoma epidermóide em locais previamente diagnosticados como líquen plano em 0,8% dos pacientes avaliados. Frente a isto, o autor afirmou ser fundamental o acompanhamento periódico dos pacientes com líquen plano bucal, devido ao aumento do risco de desenvolvimento do carcinoma epidermóide em locais acometidos pela doença.

Gandolfo et al. (2004), num estudo semelhante, avaliaram 402 pacientes com líquen plano bucal, diagnosticados entre janeiro de 1988 e julho de 1999, e acompanhados periodicamente até fevereiro de 2001. Neste período dois homens (1,3%) e sete mulheres (2,8%) desenvolveram carcinoma epidermóide, mostrando um risco de transformação maligna maior entre as mulheres do que entre os homens. Além disso, foi observado que pacientes infectados pelo vírus da hepatite C tinham uma chance três vezes superior de desenvolver câncer bucal do que os não infectados. Estes resultados não só reforçam as suspeitas quanto ao potencial de transformação maligna do líquen plano como

também chamam a atenção para a participação do vírus da hepatite C neste processo.

Xue et al. (2005) estudaram as características clínicas do líquen plano bucal em 674 pacientes atendidos pelo Setor de Estomatologia da Universidade de Wuhan, China, entre 1963 e 2003. Dos 674 pacientes avaliados, aproximadamente 0,65% desenvolveram carcinoma epidermóide em locais previamente diagnosticados como líquen plano erosivo ou atrófico, sugerindo que ambas as formas de apresentação da doença possuem maior risco de transformação maligna que a reticular. Além disso, os autores chamaram a atenção para a necessidade de se acompanhar os pacientes com líquen plano por muitos anos, uma vez que em um dos casos, a transformação maligna ocorreu 21 anos após o diagnóstico inicial da doença.

De fato, tais resultados confirmaram os obtidos por Lanfranchi-Tizeira et al. (2003). Estes autores, após avaliarem 719 casos de líquen plano bucal diagnosticados pelo Serviço de Patologia e Clínica Bucodental II da Faculdade de Odontologia da Universidade de Buenos Aires, Argentina, no período de 1991 a 1997, verificaram que todos os 32 (6,5%) casos de transformação maligna observados ocorreram a partir de formas atípicas da doença, que incluem o líquen plano em placa, erosivo e atrófico.

Contudo, ainda não se sabe com certeza o porquê de tal transformação. Para Mignogna et al. (2004), atualmente existem indícios suficientes sugerindo que processos inflamatórios crônicos, como é o caso do líquen plano bucal, criariam um micro-ambiente baseado em citocinas capaz de influenciar a sobrevivência das células, além do seu crescimento, proliferação e diferenciação, contribuindo conseqüentemente com a iniciação, promoção e progressão do câncer.

Alguns autores, por outro lado, acreditam que tal transformação seja favorecida por alterações na expressão de proteínas que regulam os mecanismos de proliferação celular e apoptose (Tanda et

al., 2000; Da Silva Fonseca; Do Carmo, 2001; Valente et al., 2001; Bascones et al., 2005; Lee et al., 2005; Gonzáles-Moles et al., 2006). Realmente, segundo Tanda et al. (2000), não há diferença significativa entre a expressão destas proteínas no líquen plano e nas leucoplasias, lesões com comprovado potencial de malignização.

Da Silva Fonseca e Do Carmo (2001) avaliaram a expressão da PCNA, da citoqueratina-16 e das NORs em 20 casos de líquen plano bucal, 20 de hiperqueratose e 20 de mucosa normal, visando aferir a taxa de proliferação das células epiteliais nestes tecidos. A expressão da PCNA e das NORs foi maior nos casos de líquen plano do que nos de hiperqueratose e nos de mucosa normal em todas as camadas do epitélio, exceto na camada suprabasal. A expressão da citoqueratina-16, contudo, foi semelhante nos três grupos estudados. Estes resultados sugerem que a taxa de proliferação celular é mais alta no líquen plano do que na hiperqueratose e na mucosa normal, o que pode torná-lo mais susceptível à ação de carcinógenos.

Valente et al. (2001) analisaram a superexpressão da proteína p53 em biópsias de 28 pacientes com líquen plano bucal feitas periodicamente durante 96 meses. Em 15 destes pacientes nenhuma alteração displásica ocorreu no período de tempo em questão (grupo 1). Em outros sete, houve sincronismo entre o diagnóstico da doença e o desenvolvimento do carcinoma epidermóide (grupo 2), enquanto que no restante dos pacientes, tal desenvolvimento só foi observado meses ou anos depois (grupo 3). A porcentagem de células epiteliais p53 positivas foi consideravelmente mais alta nos grupos 2 e 3 do que no grupo 1. Em contraste, a taxa de proliferação celular, determinada através da avaliação da expressão imunohistoquímica da proteína Ki-67, não mostrou diferença estatística entre os três grupos. Embora não se possa chegar a nenhuma conclusão a respeito das rotas moleculares que levam o líquen plano bucal a sofrer transformação maligna, os resultados indicam que a avaliação imunohistoquímica da expressão da p53 pode ser uma

ferramenta bastante útil na seleção dos casos em que há maior potencial de malignização.

Bascones et al. (2005) estudaram a influência dos mecanismos de interrupção do ciclo celular e de apoptose no processo de transformação maligna do líquen plano bucal. Após avaliarem o índice de apoptose pelo método TUNEL (do inglês, *terminal deoxyribonucleotidyl transferase mediated dUTP nick end labelling*) e a expressão imunohistoquímica das proteínas bax, caspase-3 e p21 em amostras da mucosa bucal de 32 pacientes com a doença, os autores concluíram que a baixa resposta das células epiteliais aos mecanismos de interrupção do ciclo celular e de apoptose pode favorecer tal transformação.

Lee et al. (2005) investigaram a expressão das proteínas p53 e PCNA no líquen plano bucal e sua relação com o comportamento clínico da doença e com os hábitos dos pacientes. Para tanto, os autores avaliaram imunohistoquimicamente a expressão destas proteínas em 56 pacientes, comparando-a com a observada em amostras de mucosa bucal normal, hiperqueratótica, displásica e carcinoma epidermóide. A expressão da p53 e da PCNA no líquen plano bucal foi similar à mucosa hiperqueratótica, mas superior à normal e inferior a displásica e ao carcinoma epidermóide. Todavia, não foi observada correlação significativa entre a expressão destas duas proteínas e qualquer característica clínica da doença. A expressão da p53, porém, foi mais alta nos pacientes que tinham o hábito de mascar uma mistura de noz de areca com tabaco e cal apagada, enquanto que a expressão da PCNA foi maior nas formas atróficas da doença do que nas hipertróficas. Nos pacientes que apresentavam as formas atróficas da doença e possuíam tal hábito, a expressão destas proteínas foi consideravelmente mais elevada, se aproximando da encontrada na mucosa displásica e no carcinoma epidermóide. Segundo os autores, tais resultados confirmam a natureza pré-maligna do líquen plano bucal e sugerem que as formas

atróficas da doença possuem um maior potencial de malignização, especialmente quando associadas a determinado hábito.

González-Moles et al. (2006), após avaliarem a expressão imunohistoquímica das proteínas p53, p21, Ki-67, bcl-2 e caspase-3 em 51 casos de líquen plano bucal, concluíram que, embora as células epiteliais no líquen plano não apresentem uma maior susceptibilidade a apoptose, em comparação com a mucosa normal, interrupções do ciclo celular e o aumento na taxa de proliferação celular podem criar um substrato favorável à transformação maligna.

No entanto, embora existam inúmeros estudos que sugeriram o potencial de transformação maligna do líquen plano bucal (Tanda et al., 2000; Da Silva Fonseca; Do Carmo, 2001; Valente et al., 2001; Eisen, 2002; Mattsson et al., 2002; Lanfranchi-Tizieira et al., 2003; Gandolfo et al., 2004; Mignogna et al., 2004; Bascones et al., 2005; Lee et al., 2005; Xue et al., 2005; González-Moles et al., 2006), outros tantos afirmam o contrário (Krutchkoff et al., 1978; Van Der Meij et al., 1999; Eisenberg, 2000; Kim et al., 2001; Epstein et al., 2003; Van Der Meij et al., 2003; Lodi et al., 2005). Sousa et al. (2005), por exemplo, não encontraram nenhuma ligação entre o líquen plano bucal e o carcinoma epidermóide em relação a aspectos como sexo, raça, idade e localização de maior prevalência da doença, indicando que o perfil dos pacientes acometidos pelo líquen plano difere consideravelmente daquele observado nos pacientes com carcinoma epidermóide.

Vários autores acreditam que grande parte dos casos de transformação maligna descrita na literatura não deveria ser assim considerada, pois exibiram graus variados de atipia epitelial no momento do diagnóstico inicial, o que definiria uma condição com características histopatológicas distintas, denominada displasia liquenóide (Krutchkoff et al., 1978; Van Der Meij et al., 1999; Eisenberg, 2000; Lodi et al., 2005). Segundo Lodi et al. (2005), o próprio processo inflamatório presente no líquen plano bucal é capaz de levar ao aparecimento de alterações



celulares semelhantes às vistas na atipia epitelial, tornando ainda mais difícil diferenciá-lo da displasia liquenóide.

Estudos recentes reforçam a idéia de que o líquen plano e a displasia liquenóide devem ser considerados como duas entidades distintas (Eisenberg, 2000; Kim et al., 2001; Van Der Meij et al., 2003; Lodi et al., 2005). Além disso, há muito se sabe que a presença de atipias epiteliais é um forte indicio de malignidade, portanto a displasia liquenóide, e não o líquen plano, deveria ser classificada como uma desordem potencialmente maligna. De fato, a possibilidade de transformação maligna reflete uma série de alterações moleculares intrínsecas às células, alterações estas observadas na displasia liquenóide (Epstein et al., 2003).

Kim et al. (2001), após avaliarem o potencial de malignização do líquen plano bucal, comparando o grau de instabilidade genética entre casos da doença curados clinicamente e casos que sofreram transformação maligna, concluíram que a displasia liquenóide deve ser encarada como uma lesão pré-maligna de alto risco e que a monossomia do cromossomo 9 pode ter importante papel no processo de transformação maligna desta lesão.

Van Der Meij et al. (2003) realizaram um estudo prospectivo no qual acompanharam 62 pacientes com líquen plano bucal e 111 com displasia liquenóide durante um período de 6,6 a 72 meses. Dos 173 pacientes avaliados, três (1,7%), desenvolveram carcinoma epidermóide, sendo que todos os casos de transformação maligna ocorreram em pacientes com displasia liquenóide. Contudo, os autores sugerem que novos estudos prospectivos, envolvendo um número bem maior de pacientes, deveriam ser realizados antes de se chegar a um parecer final a respeito do potencial de malignização do líquen plano bucal e da displasia liquenóide. Eles também salientaram que, independentemente do líquen plano ser considerado, ou não, como

desordem potencialmente maligna, a simples suspeita já justifica a preservação dos pacientes por um longo período.

Para Mattsson et al. (2002), no entanto, apesar de existirem indícios suficientes comprovando o potencial de malignização do líquen plano, a baixa incidência de transformação maligna da doença torna o acompanhamento periódico dos pacientes inviável financeiramente, em particular quando realizado por especialistas. Ainda assim, é importante que todos os profissionais de saúde conheçam os sinais precoces do câncer bucal, assegurando sua detecção durante o atendimento de rotina. Além disso, os pacientes precisam ser instruídos a informar qualquer mudança em sua condição, colaborando com o profissional para um diagnóstico mais rápido e preciso.

### **2.3 Proliferação celular**

Nos organismos multicelulares, a taxa de proliferação de cada tipo celular é controlada com precisão por um sistema altamente integrado que permite a replicação apenas dentro dos estreitos limites que mantêm a população normal em níveis homeostáticos. Em condições normais, a proliferação celular é uma atividade complexa e depende da atuação coordenada dos produtos de vários genes, os quais controlam o processo em resposta a estímulos internos e externos. A célula neoplásica, todavia, sofre alteração intrínseca nos seus mecanismos regulatórios da multiplicação, adquire autonomia de crescimento e se torna independente dos controles externos. Assim, a proliferação celular descontrolada é uma das principais características das neoplasias (Brasileiro Filho, 1998).

A avaliação da taxa de proliferação celular traz importantes informações a respeito do diagnóstico e do prognóstico das

mais variadas neoplasias. Além disso, o aumento da capacidade proliferativa pode ser um dos primeiros indícios de transformação maligna, pois constitui um evento chave para o desenvolvimento do câncer. Entre as diversas técnicas utilizadas para tal avaliação, a análise imunohistoquímica de proteínas expressas durante o ciclo celular como, por exemplo, a PCNA e a análise quantitativa das NORs, através da técnica histoquímica de AgNOR, merecem grande destaque devido sua facilidade de execução, baixo custo e alta confiabilidade.

Descrita inicialmente por Myachi et al. (1978), a partir do soro de pacientes com lúpus eritematoso sistêmico, a PCNA (do inglês, *proliferating cell nuclear antigen*) é uma proteína nuclear ácida de 36 KDa, que funciona como proteína auxiliar da polimerase delta, associada tanto a duplicação do DNA como ao reparo do mesmo (Bravo et al., 1978; McCormick; Hall, 1992; Arisawa et al., 1999). A concentração da PCNA é variável durante as etapas do ciclo celular, sendo maior na fase G1 tardia, com pico na fase G1/S, estando praticamente ausente nas fases G2 e M (Kurki et al., 1986; Hall et al., 1990; Tsuji et al., 1992, Arisawa et al., 1999).

A avaliação do índice de proliferação celular usando-se PCNA é comparável ao obtido pelos métodos tradicionais e por vezes até mesmo superior a métodos como timidina tritiada, citometria de fluxo e incorporação da bromodeoxiuridina. Inúmeros trabalhos relatam a aplicação de anticorpos monoclonais dirigidos contra a PCNA, por esta ser um ótimo indicador do comportamento biológico de algumas neoplasias (Arisawa et al., 1999).

Shin et al. (1993) analisaram a expressão da PCNA no epitélio adjacente à lesão em 33 casos de carcinoma epidermóide localizados na região de cabeça e pescoço. Os autores constataram uma expressão da PCNA quatro vezes maior na camada basal e seis vezes maior na suprabasal no epitélio adjacente à lesão em comparação ao epitélio normal. A expressão da PCNA aumentou com a progressão do epitélio normal para o hiperplásico, do hiperplásico para o displásico e

deste para o carcinoma. Os autores concluíram que a PCNA pode ser usada como um biomarcador para as diversas etapas da carcinogênese em cabeça e pescoço.

Huang et al. (1994) avaliaram a expressão da PCNA em 28 carcinomas *in situ*, 82 displasias epiteliais, 38 hiperplasias e 21 amostras de epitélio normal, buscando determinar se a expressão suprabasal desta proteína pode ser correlacionada com o potencial de transformação maligna de cada lesão. Os autores encontraram uma significativa predileção por um padrão de marcação basal/suprabasal em lesões com potencial de transformação maligna, quando comparado com um padrão estritamente basal visto no epitélio normal e nas hiperplasias. Frente a isto, os autores sugerem que o padrão de marcação basal/suprabasal é um forte indicador do potencial de transformação maligna de uma determinada lesão, especialmente na mucosa bucal.

De Rosa et al. (1999) estudaram 30 casos de carcinoma epidermóide, sete de queilite actínica, três de leucoplasia e quatro de metástase em linfonodo de carcinoma epidermóide de lábio inferior, por meio da análise quantitativa e qualitativa das NORs e da análise imunistoquímica da expressão das proteínas PCNA, p53 e c-myc. Frente aos resultados obtidos, os autores concluíram que o tamanho e número das NORs e a porcentagem de células PCNA positivas são parâmetros sensíveis para a discriminação entre lesões potencialmente malignas e o carcinoma epidermóide e que lesões p53 positivas podem ser consideradas de alto risco de progressão para o carcinoma epidermóide.

A técnica de AgNOR marca as proteínas associadas às regiões organizadoras nucleolares (NORs) que foram descritas primeiramente na década de 30 (Derenzini, 2000; Filippin et al., 2006), como sendo alças de DNA em torno das quais, no fim da telófase, o nucléolo é reformado após seu desaparecimento durante a fase mitótica da célula (Howell, 1977; Filippin et al., 2006). As NORs são sítios de ligação de um grupo peculiar de proteínas acídicas não-histônicas (RNA

polimerase I, C23 ou nucleolina e B23), que estão envolvidas na organização funcional e estrutural dos nucléolos e sempre associadas com a cromatina nucleolar (Derenzini et al., 1990).

As NORs podem ser facilmente identificadas em microscópio convencional mediante a impregnação por prata coloidal, apresentando-se como pontos acastanhados a negros bem-definidos, que nas células em intérfase estão localizadas exclusivamente dentro do núcleo (Derenzini et al., 1990, Derenzini, 2000; Filippin et al., 2006). Dois métodos podem ser utilizados para a análise das NORs: o quantitativo e o qualitativo. O primeiro consiste na contagem de cada ponto no núcleo das células, marcados pela prata, em microscopia de luz, com uso de objetiva de 100x em imersão. No segundo, a análise é feita através da mensuração automática ou semi-automática da área, perímetro, forma do contorno e grau de distribuição das NORs, coradas pela prata, através de um programa de análise de imagem (Derenzini, 2000).

Em 1988, Walker observou que tanto a análise quantitativa quanto a análise qualitativa das NORs poderiam ser utilizadas como um indicador do comportamento biológico de diversas neoplasias, já que estas trariam informações superiores àquelas fornecidas pela técnica da hematoxilina-eosina. A partir de então, vários autores vêm tentando relacionar o número e a configuração das NORs com o nível de atividade celular. Este parâmetro, portanto, poderia ser utilizado como critério de malignidade, uma vez que prevê o comportamento neoplásico com relativa precisão (Crocker, 1990; Ofner et al., 1990; Derenzini et al., 1990; Yang et al., 1990).

Howat et al. (1989) detectaram que as células benignas tendem a possuir um nucléolo regular, com NORs fortemente agrupadas, enquanto as células malignas, frequentemente exibem NORs dispersas pelo núcleo e múltiplos nucléolos. Alguns autores demonstraram que as NORs além de mais numerosas em neoplasias malignas, acham-se

também diminuídas em tamanho (Derenzini et al., 1990; Yang et al., 1990).

Nunes (1991), após estudar 54 casos de leucoplasias bucais com graus variados de displasia epitelial, concluiu que a análise quantitativa das NORs poderia ser útil na avaliação do potencial de transformação maligna destas lesões. No mesmo ano, Sano et al. (1991), observaram que os carcinomas epidermóides bucais, nos quais o número médio de NORs por núcleo é mais elevado, apresentam um curso clínico mais agressivo e, conseqüentemente, um prognóstico mais sombrio.

Cabrini et al. (1992) realizaram um estudo morfométrico das NORs, analisando sua distribuição, volume, número e formato, no papiloma, no carcinoma epidermóide e em amostras de mucosa bucal normal. Com base nos resultados encontrados, os autores concluíram que o aumento do número das NORs, maior irregularidade no seu formato e diminuição do seu tamanho podem ser correlacionados tanto com alterações dos mecanismos de diferenciação e proliferação, quanto com a síntese de novas proteínas oncogênicas presentes no carcinoma epidermóide.

## **2.4 Apoptose**

Apoptose, também conhecida como morte celular programada, é um fenômeno em que a célula é estimulada a acionar mecanismos que culminam com sua morte (Brasileiro Filho, 1998). A apoptose ocorre nas mais diversas situações, como por exemplo, na organogênese e hematopoiese normal e patológica, na reposição fisiológica de certos tecidos maduros, na atrofia dos órgãos, na resposta inflamatória e na eliminação de células após dano celular por agentes genotóxicos (Ranganath et al., 2001; Grivicich et al., 2007).

Apesar da enorme variabilidade do câncer, evidências demonstram que a resistência à apoptose é uma das características mais marcantes da maioria das neoplasias malignas (Okada et al., 2004; Grivicich et al., 2007). De fato, a análise do processo de carcinogênese revela que a capacidade de resistir à morte pode ser adquirida por diferentes mecanismos e acontecer em vários momentos do desenvolvimento neoplásico (Grivicich et al., 2007).

Acredita-se, portanto, que alterações na expressão das proteínas responsáveis pela regulação da apoptose podem ser um indício precoce de transformação maligna. Entre as inúmeras proteínas que exercem tal função, a p53, a bax e a bcl-2 são as mais importantes e, conseqüentemente, as mais estudadas.

A p53 é uma fosfoproteína nuclear de peso 53 KDa codificada por um gene de mesmo nome localizado no braço curto do cromossomo 17 (Cotran et al., 1998). A p53 participa da regulação do ponto de checagem de G1, que tem fundamental importância na manutenção da integridade do genoma, pois permite a ação de mecanismos de reparo do DNA ou a remoção de células danificadas através do processo de apoptose (Grivicich et al., 2007).

Quando as células são agredidas por agentes mutagênicos, a p53 sofre modificações que a tornam mais estável, acumula-se no núcleo, liga-se ao DNA e induz a síntese da proteína p21, inibidora do complexo ciclina-cdk. A inibição da cdk impede a fosforilação da pRb, que continua ativa e não permite a liberação dos fatores de transcrição, bloqueando as células na fase G1 do ciclo celular. Esta interrupção possibilita que os sistemas de reparo do DNA corrijam o defeito provocado, impedindo sua propagação nas gerações celulares seguintes (Brasileiro Filho, 1998). Depois de realizado o reparo, a p53 aumenta a transcrição da proteína mdm-2 que age como inibidora da p53. A proteína mdm-2 se associa à p53, revertendo o bloqueio do ciclo celular e promovendo o avanço para a fase S (Sherr, 2000; Grivicich et al., 2007).

Caso tais defeitos no DNA não possam ser corrigidos, a p53 age no sentido de induzir a célula a entrar em apoptose, provavelmente através da estimulação do gene bax, de novo prevenindo que a mutação seja transmitida às novas células (Brasileiro Filho, 1998).

O gene bax, localizado no braço longo do cromossomo 19, codifica uma proteína de peso 21 KDa que forma homodímeros ou heterodímeros com a proteína bcl-2. A apoptose depende da relação entre estas duas proteínas, uma vez que ela é promovida pela bax e inibida pelo heterodímeros bax-bcl-2. Além disso, a relação entre a bax e a bcl-2 é provavelmente modificada pela p53 (Crowson et al., 1996; De Vicente et al., 2006).

Localizada inicialmente no citosol, a bax é transportada para a mitocôndria em resposta a um estímulo apoptótico, onde promove a morte celular por induzir a formação de canais iônicos que levam ao aumento da permeabilidade da membrana mitocondrial externa (Ionov et al., 2000). Isto permite a saída do citocromo C e de um fator indutor de apoptose (AIF, do inglês *apoptosis inducing factor*) para o citosol, onde ativam, respectivamente, as caspases e as endonucleases, levando à quebra do DNA nuclear (Brasileiro Filho, 1998). Após o estímulo, a bcl-2 inibe a permeabilização da membrana externa da mitocôndria, pelo seqüestro da bax ou por competir por sítios que seriam ocupados pela bax na membrana externa mitocondrial (Murphy et al., 2000; Grivicich et al., 2007).

Codificada por um gene localizado no braço longo do cromossomo 18, a bcl-2 é uma proteína de peso 26 KDa encontrada na membrana nuclear, na membrana mitocondrial interna e no retículo endoplasmático (Akao et al., 1994). Esta proteína é capaz de estabilizar o potencial de membrana da mitocôndria, inibindo a apoptose em sua fase inicial. Além disso, a bcl-2 é capaz de inibir a geração de espécies reativas do oxigênio e a acidificação intracelular (Van Der Heiden; Thompson, 1999). A expressão da bcl-2 é restrita às células em áreas de



proliferação celular, às células com tempo de vida longo e às células em fases finais de diferenciação (Hockenbery et al., 1991).

Alterações na expressão das proteínas p53, bax e bcl-2 podem ser observadas na maioria das neoplasias humanas, inclusive no carcinoma epidermóide bucal. Portanto, diversos estudos têm sido realizados nos últimos anos com o objetivo de compreender o papel destas proteínas no seu desenvolvimento.

Jordan et al. (1996) estudaram a expressão das proteínas bcl-2 e bax em seções consecutivas adjacentes de 30 carcinomas epidermóides bucais, correlacionando a expressão destas proteínas com o grau de diferenciação dos carcinomas. De modo geral, a imunomarcagem da bcl-2 foi identificada em 18/30 (60%) carcinomas e a da bax em 19/30 (63%). A imunorreatividade para bcl-2 foi mais freqüente nos carcinomas pouco diferenciados, onde 6/7 (83%) foram fortemente marcados. Em contraste, a imunorreatividade para bax foi mais intensa nos carcinomas bem diferenciados, com 8/11 (72%) exibindo forte marcação. A hiperexpressão da proteína bcl-2 foi identificada também no epitélio displásico adjacente à neoplasia, acompanhada, em muitos casos, por uma redução da imunomarcagem da bax. Estes resultados sugerem que alterações de bcl-2 e bax possam desempenhar um papel no desenvolvimento de carcinoma epidermóide. Além disso, perturbações da expressão destas proteínas no epitélio displásico sugerem um papel nas fases iniciais da carcinogênese.

Birchall et al. (1997) investigaram a possível perda do equilíbrio entre proliferação celular e apoptose na carcinogênese. Para tanto, os autores, avaliaram o índice mitótico e de apoptose, além da imunorreatividade para PCNA e bcl-2 em 32 biópsias da mucosa bucal (10 amostras de tecido epitelial normal, cinco displasias, cinco hiperplasias e 12 carcinomas epidermóides, sendo que nestes três últimos coletaram-se amostras de tecidos normais à distância). Concluíram que alterações dos mecanismos de proliferação e morte

celular estão presentes na displasia epitelial e que a redução da expressão da bcl-2 pode ser observada tanto no carcinoma epidermóide quanto no epitélio normal relacionado a este.

Kannan et al. (1998) avaliaram a expressão da bcl-2 em 39 carcinomas epidermóides bucais. Vinte e três por cento destas neoplasias mostraram forte marcação nuclear da bcl-2, sendo que os localizados em mucosa jugal ou língua responderam juntos por 77%. Quando a expressão da bcl-2 foi comparada com a da p53, elas foram identificadas sem que houvesse sobreposição. Estes resultados sugerem que hiperexpressão de qualquer destas proteínas pode substituir uma a outra no desenvolvimento de carcinomas bucais.

Ravi et al. (1998) avaliaram a importância da angiogênese e da expressão de algumas proteínas reguladoras dos mecanismos de proliferação e morte celular em lesões malignas da cavidade bucal. Os resultados obtidos neste estudo sugerem que a angiogênese aumenta proporcionalmente às alterações histológicas, o mesmo ocorrendo com as modificações da expressão das proteínas p53, bax e bcl-2. Isto, juntamente com a correlação vista entre a expressão da CD34 e da ciclina D1 e as células marcadas pelo método TUNEL, indica que o aumento da angiogênese e a desregulação dos mecanismos de proliferação e morte celular ocorrem simultaneamente durante a progressão da doença.

Singh et al. (1998) investigaram a expressão da bcl-2 durante a progressão da displasia epitelial para o carcinoma epidermóide bucal. A análise imunoistoquímica com anticorpos monoclonais para bcl-2 em seções de tecido com displasia epitelial grave revelou uma porcentagem mais alta de células bcl-2 positivas do que a observada no carcinoma. Além disso, células da camada basal não-displásicas contíguas à lesão também expressaram a bcl-2. Estes resultados indicam o papel desta nas fases relativamente precoces da progressão do carcinoma epidermóide.

Loro et al. (1999) estudaram amostras de epitélio bucal normal e de carcinomas epidermóides por imunistoquímica e pelo método TUNEL. Em comparação ao epitélio normal, foi observada nos carcinomas uma redução da expressão da bcl-2, bem como um aumento do número de células em apoptose independente do seu grau de diferenciação. O mesmo não ocorreu em relação à expressão da bax que foi mais evidente nos carcinomas bem diferenciados do que nos pouco diferenciados. Tais achados indicam haver uma redução da expressão da bcl-2 e conseqüentemente um aumento do índice de células em apoptose no carcinoma epidermóide em comparação ao epitélio normal e que a expressão da bax está relacionada ao seu grau de diferenciação.

Schoelch et al. (1999) questionaram a hipótese de que alterações na expressão de proteínas relacionadas à apoptose estariam presentes no desenvolvimento do câncer de boca. Para tanto, os autores avaliaram a expressão das proteínas bcl-2, bcl-x, bax, bak, p53 e mdm-2 em 90 amostras retiradas de 25 pacientes com o diagnóstico inicial variando desde hiperqueratose focal até carcinoma epidermóide moderadamente diferenciado, passando pela displasia epitelial leve, moderada e grave. Trinta amostras marcaram positivamente para p53, sendo a intensidade desta marcação proporcional à progressão da doença. O mesmo foi observado em relação à bak. No entanto, esta foi expressa em 57 amostras. Por outro lado, a bcl-x estava presente em 73 amostras, especialmente naquelas relacionadas a lesões mais precoces. Já as proteínas mdm-2, bcl-2 e bax tiveram uma expressão bem menos significativa que as demais, estando presentes em 11, 10 e duas amostras respectivamente. Estes resultados sugerem que a expressão de proteínas relacionadas à apoptose pode ser observada em lesões epiteliais malignas e pré-malignas.

Stoll et al. (2000) estudaram a importância da apoptose e da proliferação celular em 156 amostras obtidas de 107 pacientes com carcinomas epidermóides bucal ou orofaríngeo. A proteína p53 foi

detectada em 50,5% das amostras e associada à diminuição da apoptose, ao passo que em 31,8% observou-se um aumento da expressão da proteína bcl-2 inversamente proporcional ao número de células apoptóticas. Apesar disso, nem a expressão da p53 ou da bcl-2, nem a taxa de proliferação celular foi capaz de prever a sobrevida global ou livre da doença. Estes resultados sugerem que a função da p53 esteja perdida em pelo menos metade dos carcinomas epidermóides bucais e orofaríngeos, enquanto que a função fisiológica de bcl-2 como potente inibidor da apoptose é amplamente preservada.

Sulkowska et al. (2001) questionaram a correlação entre a expressão das proteínas p53 e bcl-2 e o grau de displasia epitelial bucal associada ou não ao carcinoma epidermóide. Os resultados revelaram uma relação direta entre o aumento na expressão de ambas as proteínas e o grau de displasia epitelial. Além disso, as lesões associadas ao carcinoma epidermóide mostraram uma expressão mais alta da p53 e da bcl-2 comparada com as não-associadas, sendo que nestas observou-se também uma correlação com a sua localização. Tais achados sugerem a participação destas proteínas na transformação do epitélio normal em displásico ou mesmo no processo de carcinogênese.

Kuropkat et al. (2002) estudaram como alterações dos genes que regulam a proliferação e morte celular podem afetar o prognóstico do carcinoma epidermóide de cabeça e pescoço. Com este intuito, os autores investigaram o índice de proliferação celular e a presença das proteínas ciclina D1, c-erbB-2, bcl-2, p21, p27 e p53 em 35 pacientes com a doença. A hiperexpressão ou a expressão muito baixa da ciclina D1 foi associada a um prognóstico menos favorável e períodos de recorrência mais curtos, enquanto que o aumento da expressão da c-erbB-2 foi relacionada a uma menor sobrevida e era simultâneo à redução da expressão da p27. Além disso, a não detecção da bcl-2, aliada aos altos índices de proliferação ou de mutações da p53, mostrou relação com um decréscimo do tempo livre da doença e da sobrevida. Porém,

esta não foi significativa. Frente a isto, os autores concluíram que alterações de várias proteínas que regulam os mecanismos de proliferação e morte celular estão envolvidas na evolução da doença.

Loro et al. (2002), com o intuito de avaliar a expressão das proteínas bcl-2 e bax na displasia epitelial bucal e sua relação com proliferação e morte celular, estudaram sete amostras de epitélio normal, nove hiperplasias, nove displasias epiteliais leves, oito moderadas e 18 severas, através da análise imunoistoquímica, do método TUNEL e da hibridização *in situ*. A diminuição do mRNA da bcl-2 e da proteína, principalmente na camada basal da displasia epitelial moderada e severa comparada ao epitélio normal, foi correlacionada com um aumento de três a quatro vezes do número de células em apoptose ou em proliferação. Contudo, nenhuma alteração significativa da bax foi encontrada. Por fim, foi observada uma relação inversa entre a razão bcl-2/bax e apoptose. Estes resultados indicam que a supressão da bcl-2 pode ter um importante papel na carcinogênese bucal.

Piattelli et al. (2002) avaliaram a expressão das proteínas p53, bcl-2 e Ki-67 e a possível relação entre elas no epitélio bucal normal, no leucoplásico, no displásico e no carcinoma epidermóide, além do índice de apoptose. Após a análise imunoistoquímica das amostras, os autores encontraram uma forte correlação entre a hiperexpressão da p53, a proliferação celular e o índice de apoptose. Além disso, eles observaram uma relação inversa entre a expressão da bcl-2, Ki-67 e o número de células apoptóticas, o mesmo ocorrendo entre a expressão da bcl-2 e da p53. Tais achados salientam a importância da apoptose na carcinogênese bucal.

Saikrishana et al. (2002) discutiram a possível participação da bcl-2 na patogênese do carcinoma epidermóide bucal. Os autores, após verificarem sua expressão em 12 dos 67 casos estudados da doença, concluíram que a bcl-2 prolonga a sobrevivência das células

neoplásicas, possibilitando que estímulos externos interajam com outros genes e contribuam para a progressão da lesão.

Teni et al. (2002) investigaram o envolvimento de proteínas reguladoras da apoptose com o desenvolvimento e a progressão do câncer bucal associado principalmente ao hábito de mascar tabaco. Após analisarem a expressão das proteínas p53, bax e bcl-2 em 63 carcinomas epidermóides bucais e 31 lesões pré-malignas, os autores concluíram que a expressão destas proteínas em ambos os casos indica a sua participação nas fases iniciais da carcinogênese bucal, ou seja, a perda da função da p53, acompanhada da hiperexpressão da bcl-2, favorece o aparecimento de novas alterações genéticas, permitindo a progressão da doença.

Percebe-se, portanto que a perda da capacidade das células de sofrerem apoptose, juntamente com o aumento da sua capacidade proliferativa, é essencial para o desenvolvimento do câncer bucal, especialmente nas suas fases iniciais. Assim, identificar as alterações na expressão das proteínas p53, bax e bcl-2, bem como variações da taxa de proliferação celular, é fundamental para se avaliar o potencial de transformação do líquen plano bucal.

### **3 PROPOSIÇÃO**

O presente trabalho teve como objetivos:

- a) analisar a expressão das NORs e das proteínas PCNA, p53, bax e bcl-2 nas células epiteliais no líquen plano bucal;
- b) comparar a expressão das NORs, bem como destas proteínas com aquela observada na displasia epitelial e no carcinoma epidermóide bucal.

## **4 MATERIAL E MÉTODO**

Todos os procedimentos descritos a seguir foram aprovados pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, sob o protocolo nº 081/2006-PH/CEP em 12 de dezembro de 2006 (Anexo A).

### **4.1 Seleção dos casos**

Após levantamento dos casos de líquen plano, displasia epitelial e carcinoma epidermóide localizados na mucosa bucal e diagnosticados pelo Serviço de Patologia Cirúrgica da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP, no período de 1993 a 2008, foram selecionados aleatoriamente vinte e quatro casos de cada lesão. Estes casos foram reavaliados por dois examinadores previamente calibrados, visando confirmar o diagnóstico histopatológico inicial. Havendo dúvida, o caso em questão era imediatamente substituído.

Vale ressaltar que nos casos de líquen plano foram adotados os critérios histológicos definidos por Eisenberg (2000) como essenciais para o seu diagnóstico, conforme descrito no quadro 1, enquanto que os casos de displasia epitelial foram avaliados de acordo com os critérios propostos pela OMS e, portanto, classificados em displasia epitelial discreta (presença de até 2 atipias epiteliais), moderada (de 3 a 4) e grave (5 ou mais) (WHO, 2005). As atipias epiteliais estão listadas no quadro 2.



Quadro 1 - Critérios histológicos para o diagnóstico do líquen plano bucal (Eisenberg, 2000)

Achados essenciais
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Liquefação da camada basal</li> <li>• Infiltrado linfocitário intenso disposto em faixa subjacente ao epitélio com apagamento da camada basal</li> <li>• Padrão normal de maturação das células epiteliais</li> </ul>
Outros achados (não essenciais)
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Cristas interpapilares em forma de “dentes-de-serra”</li> <li>• Hiperparaqueratose</li> <li>• Corpos de <i>Civatte</i></li> <li>• Separação do epitélio da lâmina própria</li> </ul>
Critérios de exclusão
<ul style="list-style-type: none"> <li>• Células com núcleo aumentado e/ou hiper cromático</li> <li>• Prevalência de disqueratose</li> <li>• Aumento do número de mitoses ou mitoses atípicas</li> <li>• Projeção dos cones epiteliais em “gota”</li> <li>• Ausência de liquefação da camada basal</li> <li>• Perda da estratificação do epitélio</li> <li>• Infiltrado inflamatório heterogêneo</li> <li>• Extensão do infiltrado para a profundidade</li> <li>• Infiltrado perivascular</li> </ul>

Quadro 2 - Critérios histológicos para o diagnóstico da displasia epitelial (WHO, 2005)

Atipias epiteliais
<ul style="list-style-type: none"><li>• Pleomorfismo celular e nuclear</li><li>• Perda de estratificação epitelial</li><li>• Hiperchromatismo nuclear</li><li>• Aumento do tamanho do núcleo</li><li>• Nucléolos aumentados</li><li>• Duplicação da camada basal</li><li>• Queratinização individual ou de grupos de células na camada espinhosa ou em camadas mais profundas</li><li>• Projeção dos cones epiteliais em “gota”</li><li>• Figuras mitóticas na porção mediana do epitélio</li><li>• Mitoses atípicas</li><li>• Aumento de figuras de mitose</li><li>• Perda de coesão celular</li><li>• Perda de polaridade das células basais</li></ul>

## 4.2 Processamento do material

### 4.2.1 Histoquímica

Os blocos de parafina contendo o material biopsiado referente aos casos selecionados foram então separados. A partir deles foram obtidos novos cortes com 3 µm de espessura, os quais foram estendidos em lâminas de vidro previamente limpas, sendo que parte do material foi submetido à marcação pela hematoxilina e eosina (HE) e parte pela técnica de AgNOR, seguindo a metodologia proposta por Ploton et al. (1986), descrita a seguir:

- a) imersão em xilol em estufa a 57 °C por 30 minutos e, em seguida à temperatura ambiente por 20 minutos;
- b) imersão em etanol absoluto por 20 minutos;
- c) imersão em solução de ácido acético e etanol absoluto na proporção de 1:3 por 5 minutos;
- d) lavagem em etanol absoluto (3 vezes);
- e) imersão em celuidina a 1% em solução de etanol absoluto e éter na proporção de 1:1 por 1 minuto;
- f) retirada do excesso de celuidina e secagem da lâmina por 1 hora;
- g) imersão em etanol 70° por 5 minutos;
- h) lavagem em água destilada (3 vezes);
- i) incubação com solução aquosa de nitrato de prata a 50%, misturada à solução de gelatina em ácido fórmico aquoso a 1% na proporção de 2:1 em estufa a 40 °C, em câmara úmida, por 35 minutos;
- j) lavagem em água destilada a 40 °C (3 vezes);
- k) imersão em concentrações crescentes de etanol (70°, 80°, 90° e absoluto) por 1 minuto cada.

As lâminas foram mantidas imersas em xilol até a montagem, que foi realizada colocando-se uma gota de Permout® (Fisher Scientific, Fair Lawn, USA) sobre a lâmina e posicionando-se delicadamente sobre essa uma lamínula de vidro. O excesso foi removido utilizando-se xilol.

#### 4.2.2 Imunoistoquímica

Foram também realizados cortes com espessura de 3  $\mu\text{m}$ , os quais foram estendidos sobre lâminas de vidro tratadas com organossilano (3-aminopropiltriethoxi-silano - Sigma Chemical CO., St. Louis, USA). Os cortes histológicos foram então desparafinizados, reidratados e passaram pelas seguintes etapas:

- a) eliminação de pigmentos formólicos pelo tratamento com hidróxido de amônia a 10% diluído em etanol 95° por 10 minutos;
- b) lavagem em água corrente por 10 minutos e água destilada (2 vezes);
- c) colocação das lâminas em cubas de vidro contendo ácido cítrico a 10 mM (pH 6.0), sendo que essas cubas foram levadas ao forno de microondas (750 W) por 15 minutos, divididos em três ciclos de 5 minutos cada e, a seguir, deixadas à temperatura ambiente até atingirem o equilíbrio térmico com o meio;
- d) lavagem em água corrente por 10 minutos e água destilada (2 vezes);
- e) imersão em solução de peróxido de hidrogênio a 6% e metanol na proporção de 1:1 por 5 minutos (2 vezes);
- f) lavagem em água corrente por e água destilada e imersão em tampão Tris (pH 7,4) por 5 minutos (2 vezes);
- g) incubação com o anticorpo primário (Quadro 3) diluído em tampão Tris acrescido de

- soroalbumina bovina (Sigma Chemical CO., St Louis, USA) a 1%, à 4 °C;
- h) imersão em tampão Tris por 5 minutos (2 vezes);
  - i) incubação com o anticorpo secundário biotilnado (LSAB Peroxidase – Dako CO., Glostrup, Denmark) na diluição de 1:300 por 30 minutos, à temperatura ambiente, em cuba umidificadora;
  - j) imersão em tampão Tris por 5 minutos (2 vezes);
  - k) exposição ao complexo streptoavidina-biotina-peroxidase (LSAB Peroxidase – Dako CO., Glostrup, Denmark) na diluição de 1:300 por 30 minutos, à temperatura ambiente, em cuba umidificadora;
  - l) imersão em tampão Tris por 5 minutos (2 vezes);
  - m) visualização da atividade da peroxidase pela imersão em solução de 25 mg de diaminobenzidina (3,3-diaminobenzidina – Sigma Chemical CO., St Louis, USA) dissolvida em 100 ml de tampão Tris acrescido de 600 µl de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> por 3 minutos em cuba umidificadora em câmara escura;
  - n) imersão em tampão Tris por 5 minutos (2 vezes);
  - o) lavagem em água corrente por 10 minutos e água destilada (2 vezes).

Quadro 3 – Anticorpos primários utilizados

Especificidade	Clone	Diluição	Tempo de incubação	Fabricante
p53	DO-7	1:200	18 h	Dako CO. (Glostrup, Denmark)
PCNA	PC-10	1:200	18 h	Dako CO. (Glostrup, Denmark)
bax	P-19	1:100	18 h	Dako CO. (Glostrup, Denmark)
bcl-2	N-19	1:40	18 h	Dako CO. (Glostrup, Denmark)

Posteriormente, foi realizada a contra-coloração das lâminas com hematoxilina de Mayer, seguida da desidratação em concentrações crescentes de etanol (70°, 80°, 90° e absoluto), diafanização em xilol e montagem com Permount® (Fisher Scientific, Fair Lawn, USA). Para a PCNA e a p53, foram usados como controle positivo os próprios casos de carcinoma epidermóide bucal, enquanto que, para a bax e a bcl-2, foram usados tonsilas biopsiadas. Controles negativos foram feitos omitindo-se o anticorpo primário.

### 4.3 Análise dos resultados

#### 4.3.1 Análise quantitativa das NORs

A contagem das NORs foi realizada com o auxílio de um microscópico de luz com aumento final de 630 vezes em imersão, sob um foco fixo com clareza de campo, por dois examinadores previamente calibrados. Para determinação dos campos microscópicos, foi utilizado um

retículo graduado, medindo 0,8 x 0,8 mm, dividido em 16 quadrados de 0,2 x 0,2 mm.

O número de NORs presentes em cada núcleo foi assinalado em papel quadriculado, representando cada quadriculado um núcleo. Este procedimento foi feito até se obter a contagem de 100 núcleos, sendo desconsiderados aqueles que não apresentaram NORs. Quando as NORs apresentaram sobreposição, ou quando contornos nucleares foram imprecisos, estas estruturas não foram analisadas. Nos casos onde as NORs exibiram proximidade muito acentuada, dificultando sua individualização, foram consideradas como uma estrutura única.

#### 4.3.2 Análise quantitativa da expressão das proteínas PCNA, p53, bax e bcl-2

A análise quantitativa da expressão das proteínas PCNA, p53, bax, bcl-2 foi realizada por escores, baseado em Nakagawa et al. (1994), os quais foram obtidos por meio da contagem manual aleatória de 1.000 células, utilizando-se um retículo graduado (0,8 x 0,8 mm, dividido em 16 quadrados de 0,2 x 0,2 mm) anotando-se, paralelamente, o número de células positivas à reação, sob microscopia de luz (400x). Foram consideradas positivas para a p53 e PCNA somente as células que apresentaram marcação de coloração acastanhada no núcleo, para a bax no citoplasma e para a bcl-2 no núcleo e citoplasma.

Os escores estão descritos no Quadro 4:

Quadro 4 – Escores (Nakagawa et al.,1994)

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

#### 4.3.3 Análise estatística

Os dados obtidos pela análise quantitativa das NORs e da expressão das proteínas PCNA, p53, bax e bcl-2 foram tabulados e a seguir receberam tratamento estatístico pelo programa *Biostat 4.0* (Ayres, Belém, Brasil), através da análise de variância, seguida quando necessário pelo teste de *Tukey*, do teste de qui-quadrado, e do teste de correlação de *Pearson*. Em todos os testes realizados foi estabelecido o nível de significância em 5%.



## 5 RESULTADOS

A média de NORs/núcleo no líquen plano bucal, na displasia epitelial (6 discretas, 10 moderadas e 8 graves) e no carcinoma epidermóide bucal foram, respectivamente,  $1,74 \pm 0,32$ ,  $2,42 \pm 0,62$  e  $2,41 \pm 0,61$  (Figura 1). A análise de variância (ANOVA) revelou haver diferença estatisticamente significativa entre o líquen plano bucal e as demais lesões estudadas ( $p < 0,05$ ). Contudo, não houve diferença estatisticamente significativa entre a displasia epitelial e o carcinoma epidermóide ( $p > 0,05$ ). O mesmo ocorrendo, quando os diferentes graus de displasia epitelial (discreta, moderada e grave) foram comparados entre si.

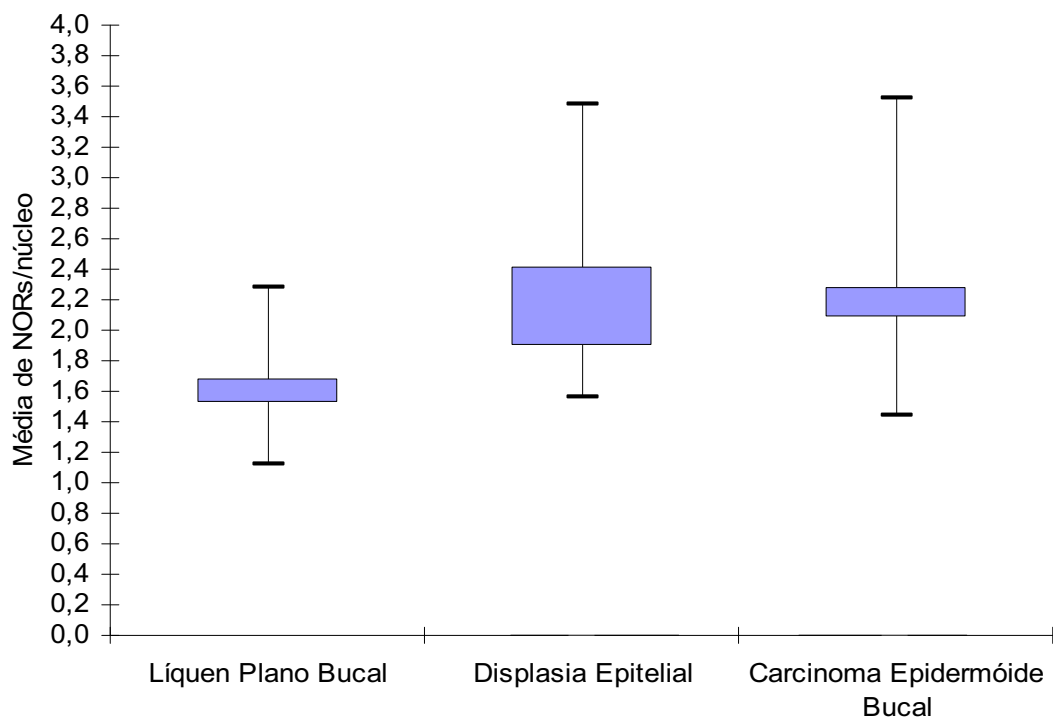


Figura 1 - Média de NORs/núcleo nas três lesões estudadas.

No líquen plano bucal e na displasia epitelial as NORs apresentavam-se, em geral, arredondadas e com contornos regulares. Contudo, no líquen plano bucal elas exibiam menor variação de tamanho e maior volume do que na displasia epitelial. Por outro lado, no carcinoma epidermóide bucal as NORs apresentavam formato e contornos irregulares, além de grande variação de tamanho (Figuras 2, 3 e 4).

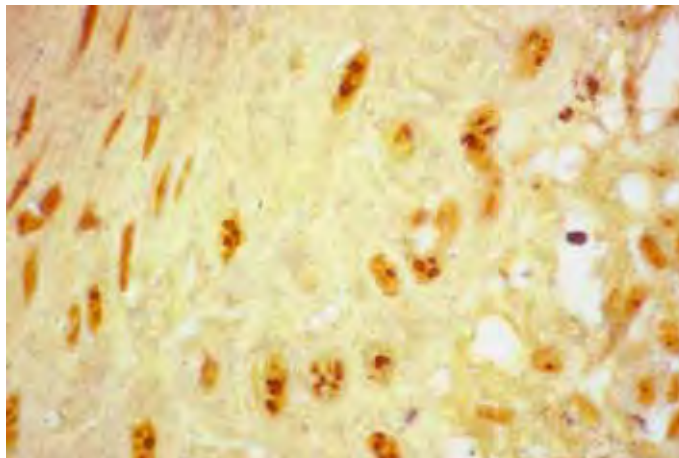


Figura 2 - Características morfológicas das NORs no líquen plano bucal (AgNOR, 1000x).



Figura 3 - Características morfológicas das NORs na displasia epitelial (AgNOR, 1000x).

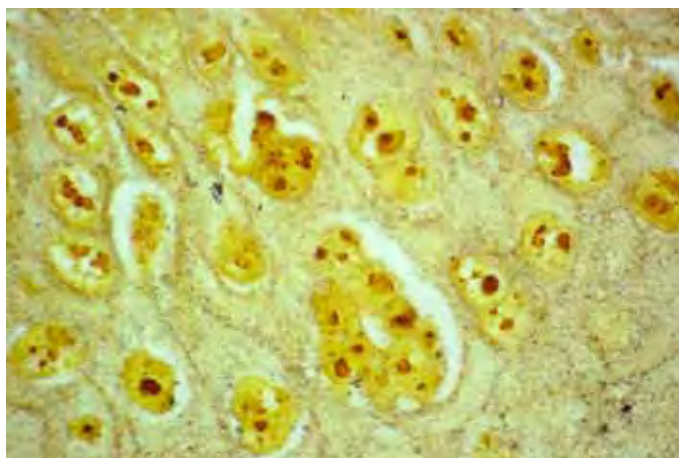


Figura 4 - Características morfológicas das NORs no carcinoma epidermóide bucal (AgNOR, 1000x).

As figuras 5, 6, 7 e 8 mostram os resultados obtidos quanto à expressão das proteínas PCNA, p53, bax e bcl-2 nas três lesões estudadas.

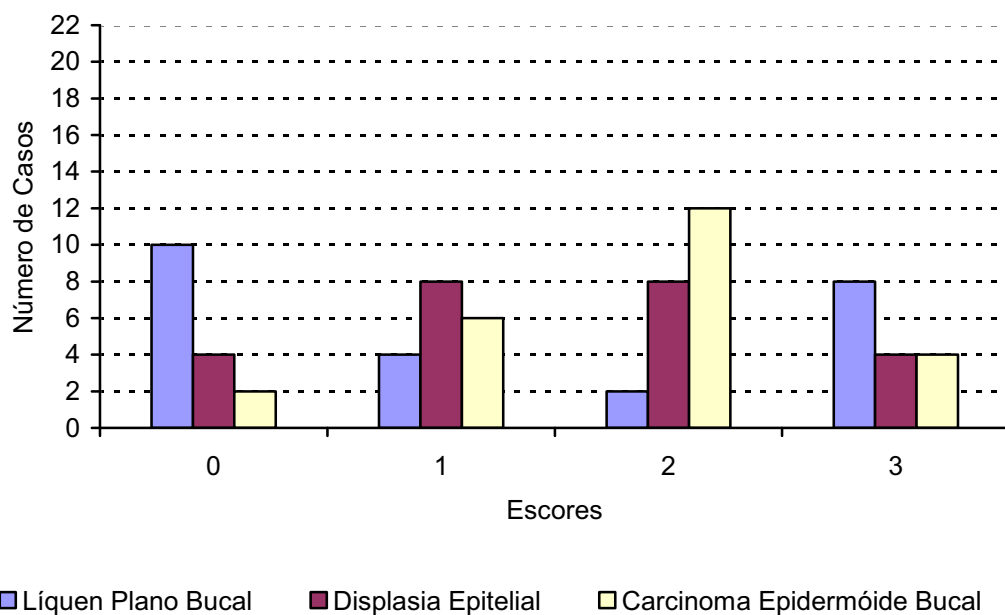


Figura 5 - Expressão da PCNA nas três lesões estudadas por escores (0 - menos de 5% das células positivas; 1 - de 5 a 25% das células positivas; 2 - de 25% a 50% das células positivas; 3 - mais de 50% das células positivas).

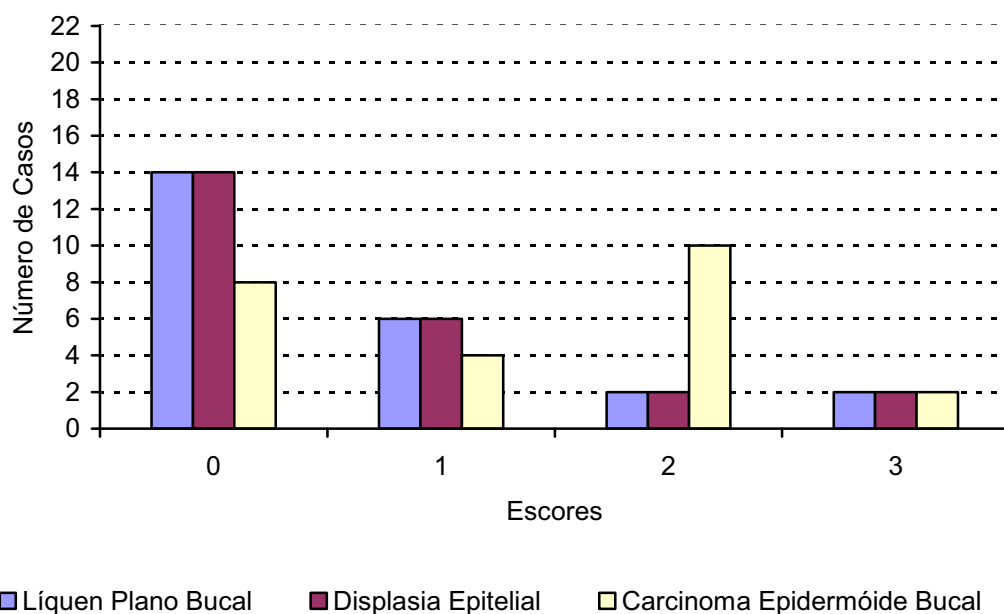


Figura 6 - Expressão da p53 nas três lesões estudadas por escores (0 - menos de 5% das células positivas; 1 - de 5 a 25% das células positivas; 2 - de 25% a 50% das células positivas; 3 - mais de 50% das células positivas).

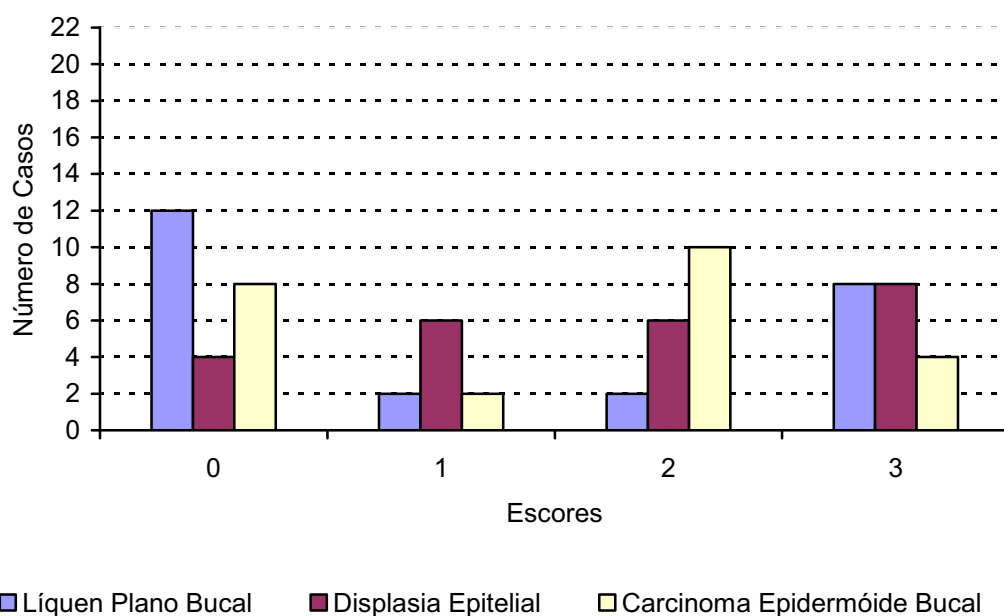


Figura 7 - Expressão da bax nas três lesões estudadas por escores (0 - menos de 5% das células positivas; 1 - de 5 a 25% das células positivas; 2 - de 25% a 50% das células positivas; 3 - mais de 50% das células positivas).

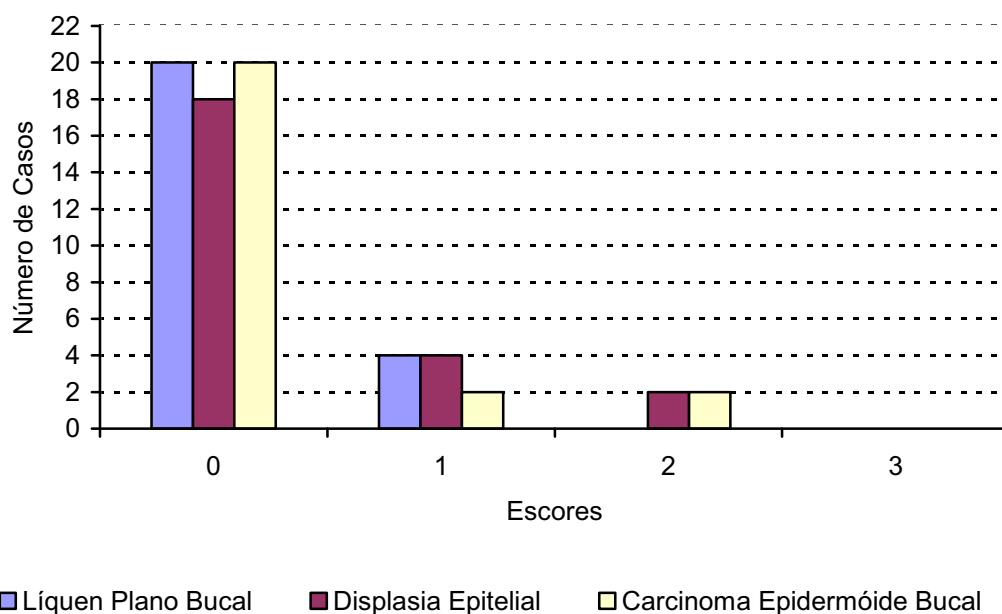


Figura 8 - Expressão da bcl-2 nas três lesões estudadas por escores (0 - menos de 5% das células positivas; 1 - de 5 a 25% das células positivas; 2 - de 25% a 50% das células positivas; 3 - mais de 50% das células positivas).

Dos 24 casos de líquen plano bucal, 14 (58,33%) foram positivos (escores 1, 2 e 3) para a PCNA, 10 (41,67%) para a p53, 12 (50%) para bax e 4 (16,67%) para a bcl-2, enquanto que dos 24 casos de displasia epitelial, 20 (83,33%) foram positivos para a PCNA, 10 (41,67%) para a p53, 20 (83,33%) positivos para a bax e 6 (25%) para a bcl-2. No carcinoma epidermóide bucal, 22 casos (91,67%) foram positivos para a PCNA, 16 (66,67%) para a p53, 16 (66,67%) para a bax e 4 (16,67%) para bcl-2.

O teste de qui-quadrado não revelou haver diferença estatisticamente significativa entre a expressão da p53 e da bcl-2 no líquen plano bucal, na displasia epitelial e no carcinoma epidermóide bucal ( $p > 0,05$ ). Contudo, a expressão da PCNA foi significativamente menor no líquen plano bucal do que nas demais lesões estudadas ( $p < 0,05$ ). Não houve diferença estatisticamente significativa entre a expressão da PCNA e da bax na displasia epitelial e no carcinoma

epidermóide bucal ( $p>0,05$ ). Além disso, nenhuma diferença estatisticamente significativa foi observada em relação à expressão da PCNA, p53, bax e bcl-2 entre a displasia epitelial discreta, moderada e grave ( $p>0,05$ ) e nem entre elas e as demais lesões estudadas ( $p>0,05$ ).

O teste de correlação de *Pearson* mostrou haver uma forte correlação entre a expressão da PCNA e da bax ( $r^2=0,94$ ) e entre a expressão da p53 e da bcl-2 ( $r^2=0,98$ ) no líquen plano bucal. Esta forte correlação entre a expressão da p53 e da bcl-2 ( $r^2=0,96$ ) também pode ser observada na displasia epitelial. Nenhuma correlação foi observada entre a expressão das proteínas analisadas no carcinoma epidermóide bucal.

As figuras de 9 a 20 apresentam uma visão geral do padrão de marcação da PCNA, p53, bax e bcl-2 nas três lesões estudadas.

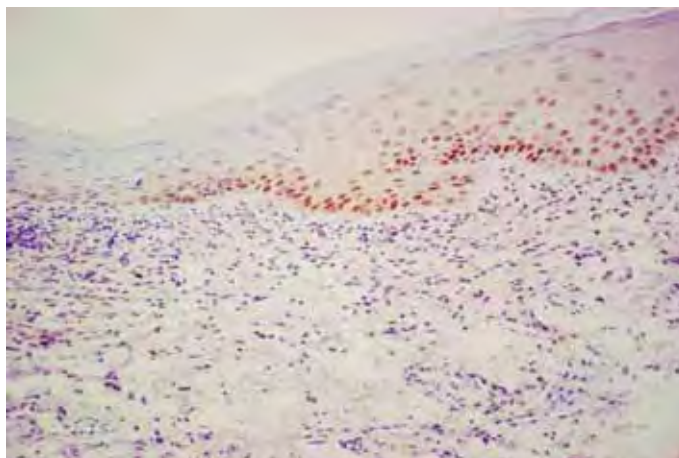


Figura 9 - Padrão de marcação da PCNA no líquen plano bucal (200x).

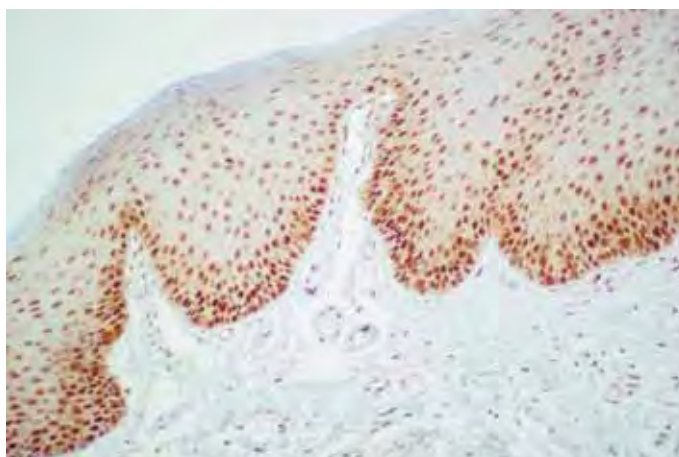


Figura 10 - Padrão de marcação da PCNA na displasia epitelial (200x).

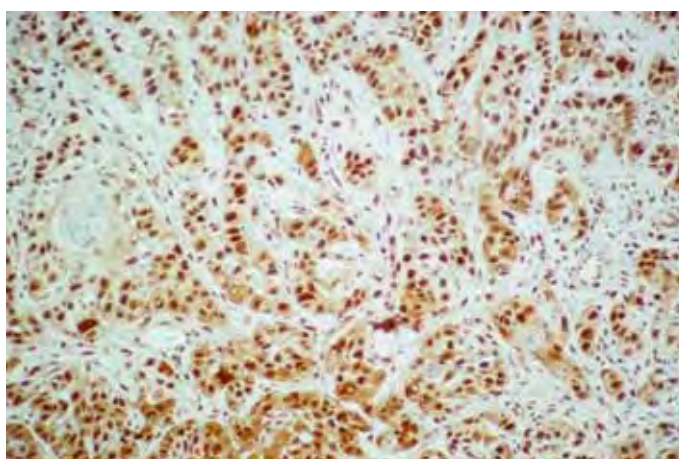


Figura 11 - Padrão de marcação da PCNA no carcinoma epidermóide bucal (200x).



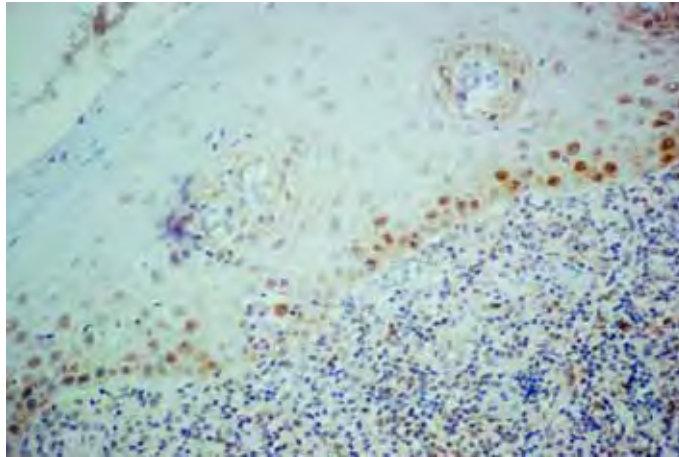


Figura 12 - Padrão de marcação da p53 no líquen plano bucal (200x).

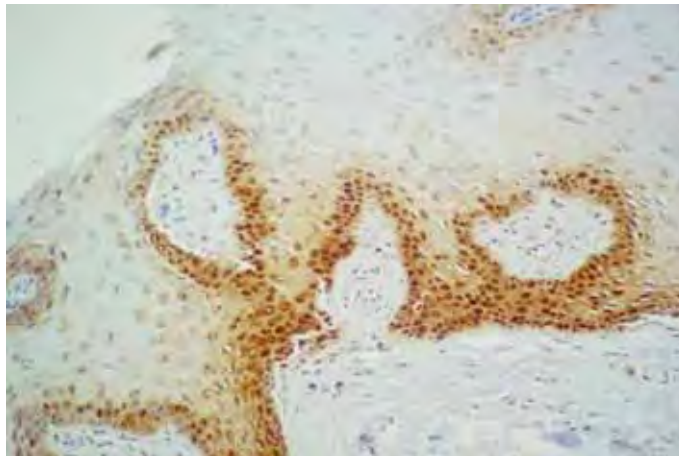


Figura 13 - Padrão de marcação da p53 na displasia epitelial (200x).

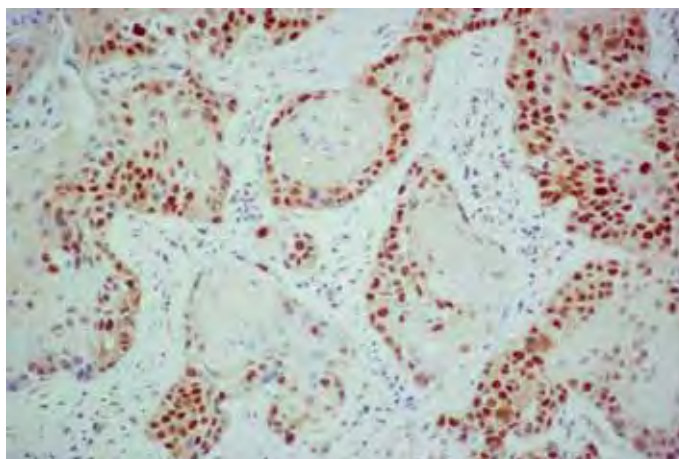


Figura 14 - Padrão de marcação da p53 no carcinoma epidermóide bucal (200x).

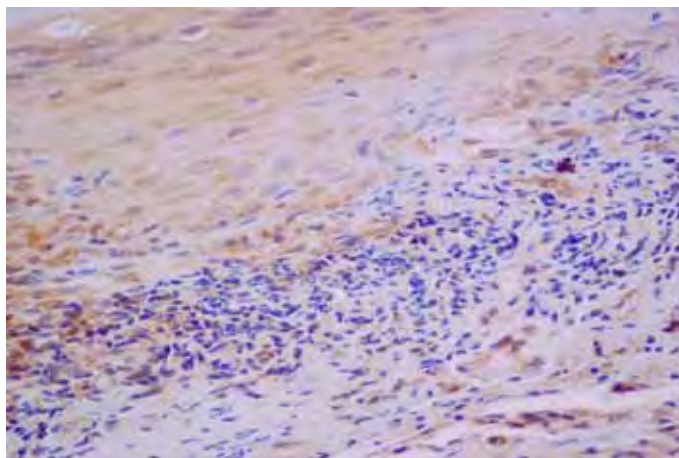


Figura 15 - Padrão de marcação da bax no líquen plano bucal (400x).

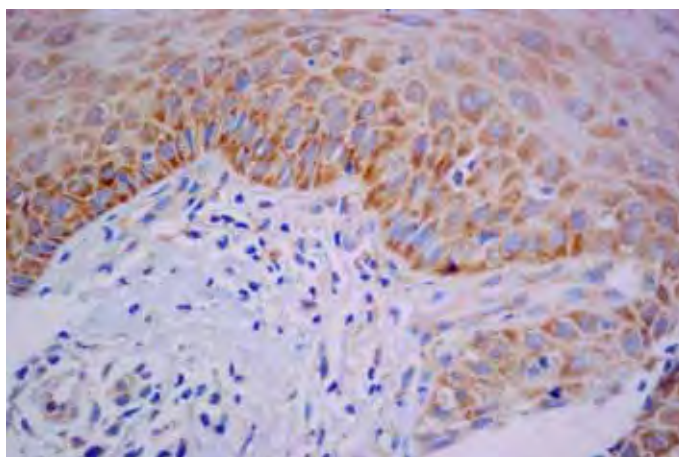


Figura 16 - Padrão de marcação da bax na displasia epitelial (400x).

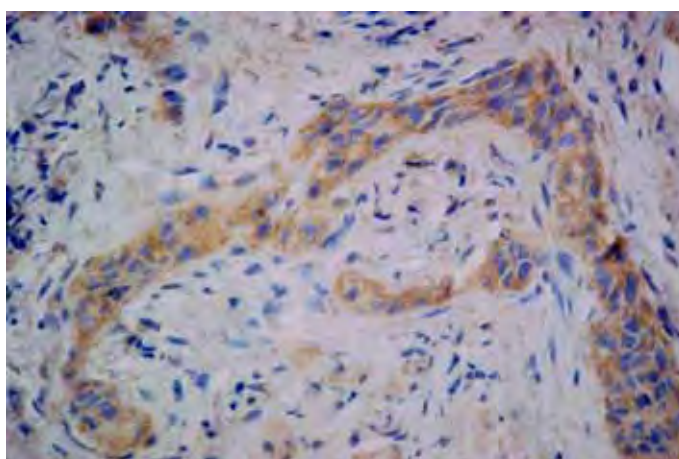


Figura 17 - Padrão de marcação da bax no carcinoma epidermóide bucal (400x).

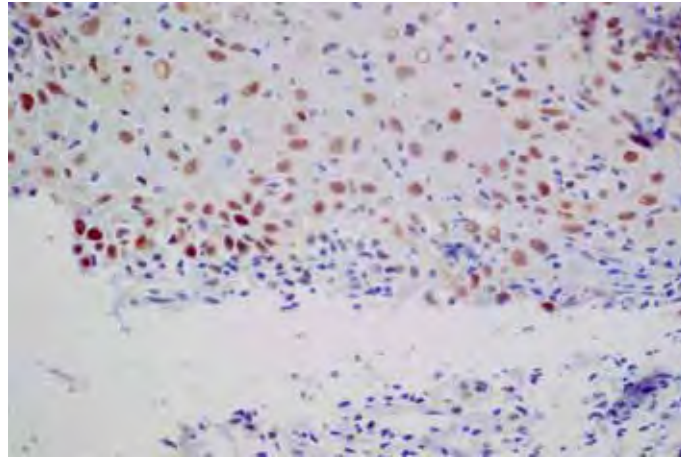


Figura 18 - Padrão de marcação da bcl-2 no líquen plano bucal (400x).

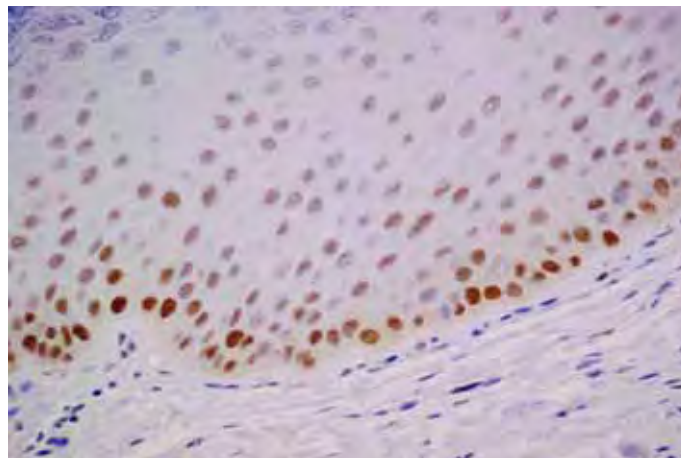


Figura 19 - Padrão de marcação da bcl-2 na displasia epitelial (400x).

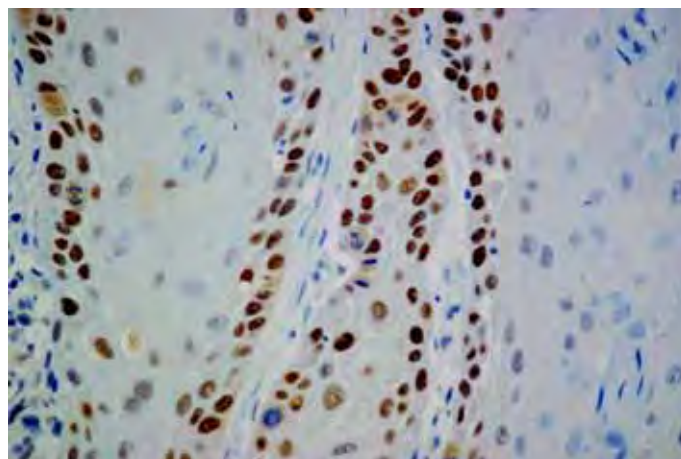


Figura 20 - Padrão de marcação da bcl-2 no carcinoma epidermóide bucal (400x).

## 6 DISCUSSÃO

Desde o início do século XX, diversos estudos chamam a atenção para o potencial de transformação maligna do líquen plano bucal. Mesmo recentemente, estudos epidemiológicos prospectivos e retrospectivos realizados em diversos países sugerem que os pacientes com líquen plano bucal possuem um risco maior de desenvolver o carcinoma epidermóide bucal do que a população em geral (Holmstrup et al. 1988; Salem, 1989; Silverman Jr et al.; 1991; Sigurgeirsson; Lindelöf, 1991; Voûte et al., 1992; Barnard et al., 1993; Moncarz et al., 1993; Gorsky et al., 1996; Markopoulos et al., 1997; Silverman; Bahl, 1997, Lo Muzio et al., 1998; Rajentheran et al., 1999; Mignogna et al., 2001; Chainani-Wu et al., 2001; Eisen, 2002; Lanfranchi-Tizeira et al. 2003; Van Der Meij et al., 2003; Gandolfo et al., 2004; Rödström et al., 2004; Xue et al., 2005, Laeijendecker et al., 2005; Bornstein et al., 2006; Ingafou et al., 2006; Hsue et al., 2007; Zhang; Zhou, 2007; Sousa; Rosa, 2008).

Contudo, estes estudos são bastante criticados devido à falta de critérios clínicos e histopatológicos claros para o diagnóstico da doença. Krutchkoff et al. (1978) afirmam haver uma escassez de dados que dêem suporte para os casos de transformação maligna descritos na literatura. Tal afirmação é corroborada mais tarde por Van Der Meij et al. (1999) ao sugerir que dois terços dos casos de transformação maligna não são suficientemente documentados para serem assim considerados. Para estes autores, a maioria dos casos descritos é resultado de falhas no diagnóstico inicial da doença.

De fato, o diagnóstico do líquen plano bucal exige certa experiência tanto dos clínicos quanto dos patologistas. Van Der Meij e Van Der Waal (2003), por exemplo, verificaram que 42% dos casos, nos

quais houve plena concordância a respeito do diagnóstico clínico da doença, não existiu consenso em relação ao diagnóstico histopatológico. Por outro lado, em 50% dos casos, em que se chegou a tal consenso, faltou concordância clínica.

Apesar de toda a controvérsia e das inúmeras críticas a respeito dos critérios de inclusão adotados pela maioria dos estudos realizados nos últimos vinte anos, é impossível negar o potencial de transformação maligna do líquen plano bucal, tanto que a OMS, desde 2005, o classifica como uma desordem potencialmente maligna (Van Der Waal, 2008).

A transformação do epitélio normal em neoplásico é resultado de uma série de mutações genéticas, levando a perda progressiva dos mecanismos de controle da proliferação celular e apoptose e, conseqüentemente, a alterações na diferenciação celular. Isto porque o aumento da atividade mitótica aliada à maior sobrevivência das células favorece o acúmulo de novas mutações genéticas, resultando em modificações cada vez maiores no padrão de maturação das células epiteliais (Kannan et al., 1998; Stoll et al., 2000; Sulkowska et al., 2002; Teni et al., 2002). Pode-se deduzir, portanto, que alterações na expressão das proteínas envolvidas nestes dois mecanismos são essenciais às fases iniciais da carcinogênese e podem ser um forte indício do potencial de transformação maligna do líquen plano bucal.

Neste contexto, alguns achados observados neste estudo merecem certas considerações. O primeiro deles é a maior expressão da PCNA na displasia epitelial e no carcinoma epidermóide. Segundo Lee et al. (2000), a taxa de proliferação celular no líquen plano bucal é superior à da mucosa normal, mas inferior à da displasia epitelial e do carcinoma epidermóide. Isto pode explicar o porquê da OMS afirmar que o risco de transformação maligna do líquen plano bucal é inferior ao da displasia epitelial, uma vez que quanto menor a taxa de proliferação celular, menor a chance das células sofrerem novas mutações.

Além disso, neste estudo pode-se observar no líquen plano bucal uma forte correlação entre a expressão da PCNA e da bax, ou seja, nos casos em que houve aumento da expressão da PCNA houve também aumento da expressão da bax, sugerindo um mecanismo compensatório, visto que a bax possui uma potente ação proapoptótica.

O aumento da expressão da bax, além de compensar o aumento da taxa de proliferação celular, permitiria a eliminação das células com danos genéticos irreversíveis, o que poderia reduzir a ação dos carcinógenos sobre o epitélio. Contudo, para Da Silva e Do Carmo (2001), a maior taxa de renovação celular observada no líquen plano o torna menos resistente a vários carcinógenos, justificando, portanto, o maior risco de transformação maligna desta lesão em relação ao epitélio normal.

Outro importante achado é a positividade para a p53 observada em quase 60% dos casos de líquen plano bucal analisados neste estudo. Como só as formas mutantes da p53 podem ser marcadas imunoistoquimicamente, devido à meia-vida bastante curta da forma nativa, conclui-se que nos casos em que a p53 foi detectada sua função estaria alterada, sendo, portanto, um indício do potencial de transformação maligna do líquen plano bucal, visto que mutações da p53 são observadas na maioria dos cânceres encontrados em seres humanos.

Para Grivicich et al. (2007), a p53 tem importância fundamental na manutenção da integridade do genoma, pois permite a ação de mecanismos de reparo do DNA ou a remoção de células danificadas através do processo de apoptose. De fato, diversos estudos sugerem que mutações da p53 são essenciais às etapas iniciais da carcinogênese bucal (Kannan et al., 1998; Stoll et al., 2000; Sulkowska et al., 2002; Teni et al., 2002). De acordo com Valente et al. (2001), a análise imunoistoquímica da expressão da p53 pode ser uma ferramenta útil na seleção dos casos de líquen plano bucal com maior risco de transformação maligna.

Contudo, de todos os resultados observados neste estudo, foi a forte correlação positiva entre a p53 e a bcl-2 o que merece maior destaque, pois sugere uma importante alteração dos mecanismos de controle da apoptose em alguns casos. A hiperexpressão da bcl-2 dificulta a remoção de células modificadas geneticamente, favorecendo o acúmulo de novas mutações, o que pode resultar no aparecimento de células com fenótipo maligno, pois a bcl-2 tem a capacidade de interromper o processo de apoptose tanto nas suas fases iniciais quanto finais. Isto porque esta proteína, além de estabilizar o potencial de membrana da mitocôndria ao formar heterodímeros com a bax, inibe a formação de espécies reativas de oxigênio e a acidificação intracelular (Van Der Heiden; Thompson, 1999).

Portanto, esta correlação entre a expressão da p53 e da bcl-2 em alguns casos de líquen plano bucal poder ser um importante indício do potencial de transformação maligna desta lesão. Sulkowska et al. (2001), por exemplo, após observarem uma relação direta entre o aumento na expressão da p53 e da bcl-2 e o grau de displasia epitelial, concluíram haver uma forte participação destas proteínas na transformação do epitélio normal em displásico. Para Teni et al. (2002), a perda da função da p53, acompanhada da hiperexpressão da bcl-2, é essencial às fases iniciais da carcinogênese bucal. Contudo, para Kannan et al. (1998), hiperexpressão de qualquer destas proteínas pode substituir uma a outra no processo de carcinogênese.

Em resumo, os resultados deste estudo indicam o potencial de transformação maligna do líquen plano bucal, especialmente nos casos em que há um aumento conjunto da p53 e da bcl-2, uma vez que, de acordo com González-Moles et al. (2006), as alterações nos processos de proliferação celular e apoptose observadas no líquen plano bucal criam um substrato favorável à transformação maligna.

Vale ressaltar, portanto, que tamanha polêmica deve se restringir apenas ao universo acadêmico, uma vez que na prática o

profissional da saúde deve ter plena convicção da necessidade do acompanhamento em longo prazo dos pacientes com esta doença, frente ao maior risco que estes pacientes apresentam de desenvolverem câncer bucal com o passar dos anos, em particular, se expostos a fatores de riscos como o tabagismo e o etilismo, visto que no líquen plano bucal os mecanismos naturais de proteção celular à ação dos carcinógenos podem estar seriamente comprometidos.

Neste aspecto, tanto a análise quantitativa quanto a qualificativa das NORs se mostraram eficazes para distinguir o líquen plano bucal das demais lesões estudadas. De fato, a média de NORs/núcleo foi consideravelmente menor no líquen plano bucal do que na displasia epitelial e no carcinoma epidermóide. Além disso, a morfologia das NORs no líquen plano bucal e na displasia epitelial foi bastante diferente do que a observada no carcinoma epidermóide bucal, ou seja, houve diferenças morfológicas significativas das NORs nas desordens potencialmente malignas em relação ao carcinoma epidermóide bucal, uma lesão eminentemente maligna.

De acordo com Xie et al. (1997), a análise quantitativa das NORs pode ajudar a distinguir o epitélio normal da displasia epitelial e do carcinoma epidermóide bucal. De fato, para Ray et al. (2003), a análise quantitativa das NORs é uma ferramenta útil no diagnóstico definitivo da displasia epitelial. Contudo, segundo Elangovan et al. (2008), a análise quantitativa das NORs é proporcional à taxa de proliferação celular e não necessariamente indica o potencial de transformação maligna de uma determinada lesão. Para os autores, a análise das características morfológicas da NORs, sim, pode ser um importante auxiliar na tentativa de se diferenciar lesões hiperplásicas, pré-malignas e malignas.

Para Cano Montoya et al. (2002), a técnica AgNOR pode ser utilizada como um complemento do estudo histopatológico rotineiro, especialmente em lesões com potencial de transformação maligna como o líquen plano bucal e a displasia epitelial, pois variações numéricas e



morfológicas das NORs podem indicar alterações celulares importantes, minimizando possíveis erros de diagnóstico. Além disso, a técnica AgNOR é fácil de se realizar e bastante econômica em comparação com as técnicas de imunistoquímica e biologia molecular.

## 7 CONCLUSÃO

Com base nos resultados obtidos, conclui-se que:

- a) não houve diferença estatisticamente significativa entre a expressão da p53 e da bcl-2 no líquen plano bucal, na displasia epitelial e no carcinoma epidermóide bucal. Todavia, a expressão da PCNA foi significativamente menor no líquen plano bucal do que nas demais lesões estudadas;
- b) as alterações na expressão de proteínas relacionadas aos mecanismos de proliferação celular e apoptose observadas em alguns casos de líquen plano bucal, quando comparadas com a displasia epitelial e com o carcinoma epidermóide bucal, embora não comprovem o seu potencial de transformação maligna, são um forte indício deste potencial;
- c) houve diferenças quantitativas e qualificativas das NORs entre o líquen plano bucal, a displasia epitelial e o carcinoma epidermóide bucal.

## 8 REFERÊNCIAS\*

Akao Y, Otsuki Y, Kataoka S, Ito Y, Tsujimoto Y. Multiple subcellular localization of bcl-2: detection in nuclear outer membrane, endoplasmic reticulum membrane, and mitochondrial membranes. *Cancer Res* 1994; 54(9): 2468-71.

Arisawa EAL, Moraes E, Rocha RF, Almeida JD. Marcadores biológicos: PCNA e Ki-67 breve revisão. *Pós-Grad Rev Fac Odontol São José dos Campos* 1999; 2(1): 54-60.

Barnard NA, Scully C, Eveson JW, Cunningham S, Porter SA. Oral cancer development in patients with oral lichen planus. *J Oral Pathol Med* 1993; 22(9): 421-4.

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

Birchall MA, Schock E, Harmon BV, Gobé G. Apoptosis, mitosis, PCNA and bcl-2 in normal, leukoplakic and malignant epithelia of the human oral cavity: prospective, in vivo study. *Oral Oncol* 1997; 33(6): 419-25.

Bornstein MM, Kalas L, Lemp S, Altermatt HJ, Rees TD, Buser D. Oral lichen planus and malignant transformation: a retrospectivem follow-up study of clinical and histopathologic data. *Quintessence Int* 2006; 37(4): 261-71.

---

\* 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 dez; citado em 1 dez.] Disponível em: [http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform\\_requirements.html](http://www.nlm.nih.gov/bsd/uniform_requirements.html)

Bravo R, Frank R, Blundell PA, Macdonald-Bravo H. Cyclin/PCNA is the auxiliary protein of DNA polymerase-delta. *Nature* 1987; 326(6112): 515-7.

Brasileiro Filho G. *Bogliolo Patologia Geral*. 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 1998. 312p.

Cabrini RL, Schwint AE, Mendez A, Femopase F, Lanfranchi H, Itoiz ME. Morphometric study of nucleolar organizer regions in human oral normal mucosa, papilloma and squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 1992; 21(6): 275-9.

Cano Montoya LC, Alvarez Gómez GJ, Valencia Londoño WA, Ramírez España JA, Prada Navas CA. Analysis of the tissue marker AgNOR in leukoplakia and oral squamous cell carcinoma. *Med Oral* 2002; 7(1): 22-5.

Chainani-Wu N, Silverman Jr S, Lozada-Nur F, Mayer P, Watson JJ. Oral lichen planus: patient profile, disease progression and treatment responses. *J Am Dent Assoc* 2001; 132(7): 901-9.

Cotran RS, Robbins SL, Kumar V, Collins T. *Robbins' pathologic basis of disease*. 6. ed. Philadelphia: W. B. Saunders Company, 1998. 1425p.

Crocker J. Nucleolar organizer regions. *Curr Top Pathol* 1990; 82: 91-149.

Crowson AN, Magro CM, Kadin ME, Stranc ME. Differential expression of the bcl-2 oncogene in human basal cell carcinoma. *Hum Pathol* 1996; 27(4): 355-9.

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

Demitsu T, Sato T, Inoue T, Okada O, Kubota T. Corticosteroid-resistant erosive oral lichen planus successfully treated with topical cyclosporine therapy. *Int J Dermatol* 2000; 39(1): 79-80.

Derenzini M. The AgNORs. *Micron* 2000; 31(2): 117-20.

Derenzini M, Pession A, Trerè D. Quantity of nucleolar silver-stained proteins is related to proliferating activity in cancer cells. *Lab Invest* 1990; 63(1): 137-40.

Derenzini M, Trerè D. AgNOR proteins as a parameter of the rapidity of cell proliferation. *Zentralbl Pathol* 1994; 140(1): 7-10.

De Rosa I, Staibano S, Lo Muzio L, Delfino M, Lucariello A, Coppola A, et al. Potentially malignant and malignant lesions of the lip. Role of silver staining nucleolar organizer regions, proliferating cell nuclear antigen, p53, and c-myc in differentiation and prognosis. *J. Oral Pathol. Med* 1999; 28(6): 252-8.

De Vicente JC, Olay S, Lequerica-Fernandez P, Sánchez-Mayoral J, Junquera LM, Fresno MF. Expression of bcl-2 but not bax has a prognostic significance in tongue carcinoma. *J Oral Pathol Med* 2006; 35(3): 140-5.

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

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

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

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

Elangovan T, Mani NJ, Malathi N. Argyrophilic nucleolar organizer regions in inflammatory, premalignant, and malignant oral lesions: a quantitative and qualitative assessment. *Indian J Dent Res* 2008; 19(2): 141-6.

Epstein JB, Wan LS, Gorsky M, Zhang L. Oral lichen planus: progress in understanding its malignant potential and implications for clinical management. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2003; 96(1): 32-7.

Filippin C, Chistofolletti LD, Ribeiro MCM, Vitun CL. Determinação do número de regiões organizadoras de nucléolo (AgNOR) em lesões do epitélio cervical uterino. *RBAC* 2006; 38(3): 133-9.

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.

González-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 basis in epithelium predisposed to malignant transformation. *Arch Oral Biol* 2006; 51(12): 1093-103.

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; 82(6): 644-9.

Grivicich I, Regner A, Rocha AB. Morte Celular por Apoptose. *Rev Bras Cancerol* 2007; 53(3): 335-43.

Hall PA, Levison DA, Woods AL, Yu CC, Kellock DB, Watkins JA, et al. Proliferating cell nuclear antigen (PCNA) immunolocalization in paraffin sections: an index of cell proliferation with evidence of deregulated expression in some neoplasms. *J Pathol* 1990; 162(4): 285-94.

Hockenbery DM, Zutter M, Hickey W, Nahm M, Korsmeyer SJ. Bcl-2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death. *Proc Natl Acad Sci USA* 1991; 88(16): 6961-5.

Holmstrup P, Thorn JJ, Rindum J, Pindborg JJ. Malignant development of oral lichen planus-affected oral mucosa. *J Oral Pathol* 1988; 17(5): 219-25.

Howat AJ, Giri DD, Cotton DW, Slater DN. Nucleolar organizer regions in Spitz nevi and malignant melanomas. *Cancer* 1989; 63(3): 474-8.

Howell WM. Visualization of ribosomal gene activity: silver stains proteins with RNA-r transcribed from oocyte chromosomes. *Chromosoma* 1977; 62(4): 361-7.

Hsue SS, Wang WC, Chen CH, Lin CC, Chen YK, Lin LM. Malignant transformation in 1458 patients with potentially malignant oral mucosal disorders: a follow-up study based in a Taiwanese hospital. *J Oral Pathol Med* 2007; 36(1): 25-9.

Huang WY, Coltrera M, Schubert M, Morton T, Truelove E. Histopathologic evaluation of proliferating cell nuclear antigen (PC 10) in oral epithelial hyperplasias and premalignant lesions. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1994; 78(6): 748-54.

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

Ionov Y, Yamamoto H, Krajewski S, Reed JC, Peruchio M. Mutational inactivation of the proapoptotic gene *bax* confers selective advantage during tumor clonal evolution. *Proc Natl Acad Sci USA* 2000; 97(20): 10872-7.

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

Kannan K, Latha PN, Shanmugam G. Expression of *bcl-2* oncoprotein in Indian oral squamous cell carcinomas. *Oral Oncol* 1998; 34(5): 373-6.

Kim J, Yook JI, Lee EH, Ryu MH, Yoon JH, Hong JC, et al. Evaluation of premalignant potential in oral lichen planus using interphase cytogenetics. *J Oral Pathol Med* 2001; 30(2): 65-72.

Krutchkoff DJ, Cutler L, Laskowski S. Oral lichen planus: the evidence regarding potential malignant transformation. *J Oral Pathol* 1978; 7(1): 1-7.

Kuropkat C, Venkatesan TK, Caldarelli DD, Panje WR, Hutchinson J, Preisler HD, et al. Abnormalities of molecular regulators of proliferation and apoptosis in carcinoma of the oral cavity and oropharynx. *Auris Nasus Larynx* 2002; 29(2): 165-74.

Kurki P, Vanderlaan M, Dobie F, Gray J, Tan EM. Expression of proliferating cell nuclear antigen (PCNA)/cyclin during the cell cycle. *Exp Cell Res* 1986; 166(1): 209-19.

Laeijendecker R, Joost van T, Kuizinga MC, Tank B, Neumann HA. Premalignant nature of oral lichen planus. *Acta Derm Venereol* 2005; 85(6): 516-20.

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

Lee JJ, Kuo MJ, Cheng SJ, Chiang CP, Jeng JH, Chang HH, et al. Higher expressions of p53 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in atrophic oral lichen planus and patients with areca quid chewing. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 2005; 99(4): 471-8.

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.

Lo Muzio L, Mignogna MD, Favia G, Procaccini M, Testa NF, Bucci E. The possible association between oral lichen planus and oral squamous cell carcinoma: a clinical evaluation on 14 cases and a review of the literature. *Oral Oncol* 1998; 34(4): 239-46.



Loro LL, Johannessen AC, Vintermyr OK. Decreased expression of bcl-2 in moderate and severe oral epithelia dysplasias. *Oral Oncol* 2002; 38(7): 691-8.

Loro LL, Vintermyr OK, Liavaag PG, Jonsson R, Johannessen AC. Oral squamous cell carcinoma is associated with decreased bcl-2/bax expression ratio and increased apoptosis. *Hum Pathol* 1999; 30(9): 1097-105.

Markopoulos AK, Antoniadis D, Papanayotou P, Trigonidis G. Malignant potential of oral lichen planus: a follow-up study of 326 patients. *Oral Oncol* 1997; 33(4): 263-9.

Mattsson U, Jontell M, Holmstrup P. Oral lichen planus and malignant transformation: is a recall of patients justified? *Crit Rev Oral Biol Med* 2002; 13(5): 390-6.

McCormick D, Hall PA. The complexities of proliferating cell nuclear antigen. *Histopathology* 1992; 21(6): 591-4.

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.

Mignogna MD, Lo Muzio L, Lo Russo L, Fedele S, Ruoppo E, Bucci E. Clinical guidelines in early detection of oral squamous cell carcinoma arising in oral lichen planus: a 5-year experience. *Oral Oncol* 2001; 37(3): 262-7.

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

Moncarz V, Ulmansky M, Lustmann J. Lichen planus: exploring its malignant potential. *J Am Dent Assoc* 1993; 124(3): 102-7.

Morrison L, Kratochvil FJ, Gorman A. An open trial of topical tacrolimus for erosive oral lichen planus. *J Am Acad Dermatol* 2002; 47(4): 617-20.

Murphy KM, Ranganathan V, Farnsworth ML, Kavallaris M, Lock RB. Bcl-2 inhibits bax translocation from cytosol to mitochondria during drug-induced apoptosis of human tumor cells. *Cell Death Differ* 2000; 7(1): 102-11.

Myachi K, Fritzler MJ, Tan EM. Autoantibody to a nuclear antigen in proliferating cells. *J Immunol* 1978; 121(6): 2228-34.

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

Neville BW, Dann DD, Allen CM, Bouquet JE. *Patologia oral & maxilofacial*, 2. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2004. 784p.

Nunes FD. *Leucoplasia bucal: estudo morfológico, imunohistoquímico e histoquímico [tese]*. São Paulo: Faculdade de Odontologia de São Paulo (SP): Universidade de São Paulo - USP; 1991.

Ofner D, Tötsch M, Sandbichler P, Hallbrucker C, Margreiter R, Mikuz G, et al. Silver stained nucleolar organizer regions proteins (Ag-NORs) as a predictor of prognosis in colonic cancer. *J Pathol* 1990; 162(1): 43-9.

Okada H, Mak TW. Pathways of apoptotic and nonapoptotic death in tumour cells. *Nat Rev Cancer* 2004; 4(8): 592-603.

Piattelli A, Rubini C, Fioroni M, Iezzi G, Santinelli A. Prevalence of p53, bcl-2, and Ki-67 immunoreactivity and of apoptosis in normal oral epithelium and in premalignant and malignant lesions of the oral cavity. *J Oral Maxillofac Surg* 2002; 60(5): 532-40.

Ploton D, Menager M, Jeannesson P, Himber G, Pigeon F, Adnet JJ. Improvement in the staining and the visualization of the argyrophilic proteins of nucleolar organizer region at the optical level. *Histochem J* 1986; 18(1): 5-14.

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

Ranganath RM, Nagashree NR. Role of programmed cell death in development. *Int Rev Cytol* 2001; 202: 159-242.

Ravi D, Ramadas K, Mathew BS, Nalinakumari KR, Nair MK, Pillai MR. Angiogenesis during tumor progression in the oral cavity is related to reduced apoptosis and high tumor cell proliferation. *Oral Oncol* 1998; 34(6): 543-8.

Ray JG, Chattopadhyay A, Caplan DJ. Usefulness of AgNOR counts in diagnosing epithelial dysplasia. *J Oral Pathol Med* 2003; 32(2): 71-6.

Regezi JA, Sciubba JJ. *Patologia bucal: correlações clinicopatológicas*. 3. ed. Rio de Janeiro: Guanabara Koogan; 2000. 475p.

Röström PO, Jontell M, Mattsson U, Holmberg E. Cancer and oral lichen planus in a Swedish population. *Oral Oncol* 2004; 40(2): 131-8.

Saikrishana P, Sivapathasundharam B, Rafiuddeen IS, Krishnan B. Expression of bcl-2 oncoprotein in oral squamous cell carcinoma -- an immunohistochemical study. *Indian J Pathol Microbiol* 2002; 45(3): 283-7.

Salem G. Oral lichen planus among 4277 patients from Gizan, Saudi Arabia. *Community Dent Oral Epidemiol* 1989; 17(6): 322-4.

Sano K, Takahashi H, Fujita S, Inokuchi T, Pe MB, Okabe H, et al. Prognostic implication of silver binding nucleolar organizer regions (AgNORs) in oral squamous cell carcinoma. *J Oral Pathol Med* 1991; 20(2): 53-6.

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

Shichinohe R, Shibaki A, Nishie W, Tateishi Y, Shimizu H. Successful treatment of severe recalcitrant erosive oral lichen planus with topical tacrolimus. *J Eur Acad Dermatol Venereol* 2006; 20(1): 66-8.

Sherr CJ. The Pezcoller lecture: cancer cell cycles revisited. *Cancer Res* 2000; 60(5): 3689-95.

Shin DM, Voravud N, Ro JY, Lee JS, Hong WK, Hittelman WN. Sequential increases in proliferating cell nuclear antigen expression in head and neck tumorigenesis: a potential biomarker. *J Natl Cancer Inst* 1993; 85(12): 971-8.

Sigurgeirsson B, Lindelöf B. Lichen planus and malignancy. An epidemiologic study of 2071 patients and a review of the literature. *Arch dermatol* 1991; 127(11): 1684-8.

Silverman Jr S, Bahl S. Oral lichen planus update: clinical characteristics, treatment responses, and malignant transformation. *Am J Dent* 1997; 10(6): 259-63.

Silverman Jr S, Gorsky M, Lozada-Nur F. A prospective study of findings and management in 214 patients with oral lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1991; 72(6): 665-70.

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

Sousa FACG, Fontes PC, Bolanho A, Rosa LEB. Estudo comparativo entre o líquen plano e o carcinoma epidermóide em mucosa bucal. *Cienc Odontol Bras* 2005; 8(1): 55-60.

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

Sousa FACG, Rosa LEB. Perfil epidemiológico dos casos de líquen plano oral pertencentes aos arquivos da Disciplina de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia de São José dos Campos – UNESP. *Cienc Odontol Bras* 2005; 8(4): 96-100.

Stoll C, Baretton G, Ahrens C, Löhns U. Prognostic significance of apoptosis and associated factors in oral squamous cell carcinoma. *Virchows Arch* 2000; 436(2): 102-8.

Sulkowska M, Famulski W, Chyczewski L, Sulkowski S. Evaluation of p53 and bcl-2 oncoprotein expression in precancerous lesions of the oral cavity. *Neoplasma* 2001; 48(2): 94-8.

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; 29(8): 385-93.

Teni T, Pawar S, Sanghvi V, Saranath D. Expression of bcl-2 and bax in chewing tobacco-induced oral cancers and oral lesions from India. *Pathol Oncol Res* 2002; 8(2): 109-14.

Tsuji T, Shrestha P, Yamada K, Takagi H, Shinozaki F, Sasaki K, et al. Proliferating cell nuclear antigen in malignant and pre-malignant lesions of epithelial origin in the oral cavity and the skin: an immunohistochemical study. *Virchows Arch A Pathol Anat Histopathol* 1992; 420(5): 377-83.

Trerè D, Farabegoli F, Cancellieri A, Ceccarelli C, Eusebi V, Derenzini M. AgNOR area in interphase nuclei of human tumours correlates with the proliferative activity evaluated by bromodeoxyuridine labeling and ki-67 immunostaining. *J Pathol* 1991; 165(1): 53-9.

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 Heiden MG, Thompson CB. Bcl-2 proteins: regulators of apoptosis or of mitochondrial homeostasis? *Nat Cell Biol* 1999; 1(8): 209-16.

Van Der Meij EH, Schepman KP, Smeele LE, Van Der Waal JE, Bezemer PD, Van der Waal I. A review of the recent literature regarding malignant transformation of oral lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod* 1999; 88(3): 307-10.

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(9): 507-12.

Van Der Waal I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral Oncol*. In press 2008.

Voûte AB, de Jong WF, Schulten EA, Snow GB, Van der Waal I. The possible premalignant character of oral lichen planus. The Amsterdam experience. *J Oral Pathol Med* 1992; 21(7): 326-9.

Walker RA. The Histopathological evaluation of nucleolar organizer region proteins. *Histopathology* 1988; 12(2): 221-3.

World Health Organization (WHO). Classification of Tumours. Pathology & genetics. Head and neck tumours. Lions: IARC Press; 2005. 430p.

Xie X, Clausen OP, Sudbø J, Boysen M. Diagnostic and prognostic value of nucleolar organizer regions in normal epithelium, dysplasia, and squamous cell carcinoma of the oral cavity. *Cancer* 1997; 79(11): 2200-8.

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; 34(8): 467-72.

Yang P, Huang GS, Zhu XS. Role of nucleolar organizer regions in the differentiating malignant from benign tumours of the colon. *J Clin Pathol* 1990; 43(3): 235-8.

Zhang JH, Zhou ZT. Oral lichen planus: a retrospective study of 724 Chinese patients. *Zhonghua Kou Qiang Yi Xue Za Zhi* 2007; 42(11): 669-71.

**ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa**

UNIVERSIDADE ESTADUAL PAULISTA  
CAMPUS DE SÃO JOSÉ DOS CAMPOS  
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

Av. Eng. Francisco José Longo, 777 – Jd. São Dimas  
CEP 12201-970 – F. (12) 3947-9028  
Fax (12) 3947-9010 / suely@fojoc.unesp.br

**CERTIFICADO**

Comitê de Ética em Pesquisa-Local

**CERTIFICAMOS**, que o protocolo nº **081/2006-PH/CEP**, sobre “**Estudo do potencial de transformação maligna do líquem plano bucal:- Análise histológica, histoquímica e Imunoistoquímica**”, sob a responsabilidade de **FERNANDO AUGUSTO CERVANTES GARCIA DE SOUSA**, está de acordo com os Princípios Éticos, seguindo diretrizes e normas regulamentadoras de pesquisa, envolvendo 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, 12 de dezembro de 2006.

**Profa. Dra. Suely Carvalho Mutti Naressi**  
Coordenadora do Comitê de Ética em Pesquisa-Local



Sousa FACG. Study of the malignant transformation potential of oral lichen planus: histological, histochemical and immunohistochemical analysis [thesis]. São José dos Campos: School of Dentistry of São José dos Campos, UNESP – São Paulo State University; 2009.

## **ABSTRACT**

The purpose of this study was to analyze possible alterations in the mechanisms of cell proliferation and apoptosis in oral lichen planus, comparing them with those observed in epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma, aiming to establish its malignant transformation potential. Twenty-four cases of each lesion were selected and new histological cuts were obtained, being part of the cuts submitted to the AgNOR and part to the immunohistochemical technique of streptoavidine-biotin technique for analysis of the expression of the PCNA, bax and bcl-2 proteins. The NORs/nucleous mean for oral lichen planus, epithelial dysplasia and squamous cell carcinoma was respectively  $1.74 \pm 0.32$ ,  $2.42 \pm 0.62$  and  $2.41 \pm 0.61$ . Analysis of variance showed statistically significant difference between the oral lichen planus and the others lesions ( $p < 0.05$ ). Regarding PCNA, p53, bax and bcl-2, chi-squared test showed no significant differences between the expression of p53 and bcl-2. However, the expression of PCNA was significantly lower in oral lichen planus than in epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma. No significant differences between the expression of PCNA and bax in epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma were observed. It was concluded that alterations in the expression of these proteins can be observed in oral lichen planus, suggesting the potential of malignant transformation of this lesion and emphasizing the importance of follow-up of patients. Within this context, the NORs analysis is a useful tool to evaluate the oral lichen planus cases with high risk of malignant transformation.

**Keywords:** Oral Lichen planus. Squamous Cell Carcinoma. Mouth Mucosa. Immunohistochemistry.