

**UNIVERSIDADE FEDERAL DE UBERLÂNDIA**

**Instituto de Ciências Biomédicas**

**Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas**

**ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO DA EXPRESSÃO DE METALOTIONEÍNA E  
PROTEÍNA P16 EM LÍQUEN PLANO E REAÇÕES LIQUENÓIDES ORAIS**

**Gabriela Geraldo Mendes**

**Uberlândia**

**Abril/2015**

**Gabriela Geraldo Mendes**

**ESTUDO IMUNO-HISTOQUÍMICO DA EXPRESSÃO DE METALOTIONEÍNA E  
PROTEÍNA P16 EM LÍQUEN PLANO E REAÇÕES LIQUENÓIDES ORAIS**

Dissertação apresentada ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas da Universidade Federal de Uberlândia como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Dr. Sérgio Vitorino Cardoso

**Uberlândia**

**Abril/2015**

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)  
Sistema de Bibliotecas da UFU, MG, Brasil.

---

M538e      Mendes, Gabriela Geraldo, 1988-  
2015      Estudo imuno-histoquímico da expressão de metalotioneína e

proteína p16 em líquen plano e reações liquenóides orais / Gabriela  
Geraldo Mendes. - 2015.

49 p. : il.

Orientador: Sérgio Vitorino Cardoso.

Dissertação (mestrado) - Universidade Federal de Uberlândia,  
Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas.  
Inclui bibliografia.

1. Citologia - Teses. 2. Líquen plano bucal - Teses. 3.  
Metalotioneína - Teses. 4. Imunohistoquímica - Teses. I. Cardoso, Sérgio  
Vitorino. II. Universidade Federal de Uberlândia. Programa de Pós-  
Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas. III. Título.

Dedico este trabalho aos meus pais, Américo e Solange,  
pelo incentivo e amor incondicionais.  
Sem vocês, essa caminhada tornar-se-ia impossível.

## **AGRADECIMENTOS**

A Universidade Federal de Uberlândia, ao Instituto de Ciências Biomédicas, ao Programa de Pós-Graduação em Biologia Celular e Estrutural Aplicadas e a FAPEMIG, por possibilitarem a realização deste trabalho.

Ao Prof. Dr. Sérgio Vitorino Cardoso, por todo conhecimento compartilhado desde a minha graduação. Obrigada por abrir as portas do Laboratório de Patologia durante minha iniciação científica e me incentivar a continuar na carreira acadêmica, sendo exemplo de dedicação e docência. Agradeço também pelo grande exemplo de ética, profissionalismo e respeito. Obrigada por acreditar em mim e na minha capacidade de realizar este trabalho, por aceitar me orientar desde o início. Minha eterna admiração e gratidão.

Aos Profs. Drs. Adriano Mota Loyola e Paulo Rogério de Faria, pelos ensinamentos acadêmicos, pela ajuda oferecida e incentivo.

A Profa. Dra. Carla Silva Siqueira, pelas contribuições desde o meu TCC até o final do mestrado. Obrigada por sempre se prontificar a me ajudar nos momentos em que precisei e pela amizade que construímos.

Aos técnicos do Laboratório de Patologia Ângela Pereira, Lúbia Fonseca e Adalci dos Anjos, pela grande colaboração durante esses anos, por sempre se prontificarem a ajudar, pelo incentivo, carinho e, principalmente, pela amizade.

Aos amigos do Laboratório de Patologia Roberta Rosa, Tamiris Rodrigues, Luiz Fernando Barbosa, Thayane Simões, Silas Juvêncio, Marilia Andrade, Leana Crispim e Vinícius Juliate, por terem tornado essa caminhada muito mais prazerosa. Agradeço não só pelos inúmeros momentos de descontração e alegria, mas também pelos momentos de desabafo e angústias. Muito obrigada por tudo.

Ao João Paulo Servato, por ter sido um excelente amigo e orientador desde a minha iniciação científica. Muito obrigada por compartilhar comigo toda a sua experiência acadêmica, por me ensinar muito sobre pesquisa científica e por se prontificar a me ajudar em qualquer situação. Este trabalho não seria realizado sem a sua colaboração. Serei eternamente grata a você.

Aos amigos da 3<sup>a</sup> turma de Biomedicina, Tafarel, Ana Flávia, Mateus, Edigar, Larissa, Raquel, Nathane, Grasielle, Aline, Heber, Tamires e Laís, por serem grandes companheiros durante todo esse trajeto. Agradeço por estarem sempre presentes, me incentivando e apoiando em todos os momentos. Obrigada por serem mais do que amigos, por se tornarem a família que escolhi durante esses anos.

A Flávia, por sempre me ajudar dentro e fora do laboratório, por ter se tornado uma grande amiga nesse tempo. Obrigada por tornar esse mestrado muito mais fácil com a sua companhia. Não me esquecerei das nossas longas conversas e caronas diárias.

Aos amigos Fabiana e Daniel, por estarem sempre presentes, me apoiando e incentivando.

As minhas melhores amigas da vida, Luciana e Fernanda, por se fazerem sempre presentes mesmo distantes fisicamente. Agradeço pela paciência nos momentos em que estive ausente e por tornarem os momentos difíceis mais leves.

Aos meus tios e primos, pelo incentivo e carinho. Obrigada por sempre torcerem pelas minhas conquistas.

A minha irmã, Mariana, por ser minha eterna amiga e companheira de vida. Obrigada por ser tão presente, por cuidar tão bem de mim e por tornar a vida melhor com você ao meu lado. Eu não conseguia chegar até aqui sem o seu apoio e incentivo.

Ao Guilherme, por ter se tornado um irmão mais velho que me incentiva com seu exemplo a continuar crescendo. Obrigada por todo carinho e apoio.

Ao meu noivo Augusto, pela infinita paciência durante o mestrado. Obrigada por entender que não pude estar presente em alguns momentos devido à vida acadêmica e por acreditar muito mais na minha capacidade do que eu mesma consigo. Obrigada, principalmente, por todo apoio, incentivo e amor, essenciais para que eu pudesse chegar até aqui e ir além.

Aos meus pais, Américo e Solange, pelo grande apoio desde o início deste trabalho. Obrigada por estarem presentes em todos os momentos da minha vida, me incentivando a sempre ir em frente e crescer. Obrigada pela paciência e compreensão em todos os momentos em que estive ausente devido ao mestrado e experimentos no laboratório. Obrigada por compartilharem os meus sonhos e planos, deixando as suas próprias vontades de lado para que eu me sentisse feliz e realizada. Serei eternamente grata por tanto amor.

## **RESUMO**

O líquen plano é uma doença inflamatória crônica, mediada por células T e de causa desconhecida. Pele, unhas e mucosas podem ser afetadas, e a doença é mais comum em adultos de meia-idade, especialmente em mulheres. Histologicamente, é caracterizada por denso infiltrado linfocitário subepitelial em banda, apoptose de queratinócitos, liquefação da camada basal, hiperplasia e hiperqueratose epitelial. O líquen plano oral (LPO) se manifesta clinicamente como lesões reticulares (brancas) e atróficas/erosivas (vermelhas), que são eventualmente dolorosas. Reações liquenóides orais (RLO) distinguem-se do LPO pela presença de fatores precipitantes, lesões unilaterais e infiltrado inflamatório difuso. A metalotioneína é uma proteína envolvida em resposta antioxidant e vias anti-apoptóticas. Ki-67 é um marcador de proliferação celular e é expresso somente em células que estão em divisão celular (fases G1, S, G2 e M do ciclo celular). O gene supressor de tumor p16 está envolvido na via de sinalização pRb e atua na regulação do ciclo celular, reparando possíveis danos ao DNA. O objetivo deste estudo foi avaliar possíveis diferenças moleculares, relacionadas ao estresse oxidativo e proliferação celular entre LPO e RLO, bem como as duas formas clínicas principais de LPO, a fim de melhor compreender a patogênese dessas lesões e facilitar o diagnóstico diferencial entre elas. Imuno-histoquímica para detecção de metalotioneína, Ki-67 e p16 foi realizada em 42 e 23 casos de LPO e RLO, respectivamente. Reatividade para metalotioneína foi mais frequente em casos de LPO do que em casos de RLO ( $p = 0,01$ ; Mann-Whitney U). Foram observadas diferenças significativas entre as lesões reticulares e atróficas/erosivas de LPO para a proteína p16 ( $p = 0,04$ ; Mann-Whitney U). Não houve diferença significativa entre as lesões em relação ao antígeno Ki-67. Os resultados deste estudo sugerem que a proteína metalotioneína pode ser um marcador útil do diagnóstico diferencial entre LPO e RLO, e que a proteína p16 pode ser um marcador diferencial das lesões reticulares e atróficas/erosivas de LPO.

**Palavras-chave:** Líquen Plano Oral. Imuno-histoquímica. Metalotioneína.

## ABSTRACT

Lichen planus is a chronic inflammatory disease mediated by T cells of unknown cause. Skin, nails and mucous membranes can be affected, and the disease is more common in middle-aged adults, especially in women. Oral lichen planus (OLP) manifests as reticular (white) and erosive (red) lesions that are eventually painful. Histologically, it is characterized by dense lymphocytic infiltrate beneath the epithelium, apoptosis of keratinocytes, liquefaction of the basal layer, epithelial hyperplasia and hyperkeratosis. Oral lichenoid reactions (OLR) are distinguished from OLP by the presence of precipitating factors, unilateral lesions and diffuse inflammatory infiltrate. Metallothionein is a protein involved in anti-oxidative response and anti-apoptotic pathways. Ki-67 is a cellular proliferation marker and is expressed only in cells that are in cell division (phases G1, S, G2 and M of the cell cycle). The tumor suppressor gene p16 is involved in the pRb pathway and participates in the regulation of the cell cycle, repairing possible damage to DNA. The aim of this study was to evaluate possible molecular differences, related to oxidative stress and cell proliferation between OLP and OLR, and the two major forms of OLP in order to better understand the pathogenesis of these lesions and facilitate the differential diagnosis between them. Immunohistochemistry for metallothionein, Ki-67 and p16 detection was performed in 42 and 23 cases of OLP and OLR, respectively. Reactivity for metallothionein was more frequently observed in OLP cases than in OLR cases ( $p = 0,01$ ; Mann-Whitney  $U$  test). Significant difference was found between the reticular and atrophic lesions of OLP for p16 protein ( $p = 0,04$ ; Mann-Whitney  $U$  test). There was no significant difference between the lesions in relation to Ki-67 antigen. The results of this study suggest that metallothionein protein may be a useful marker of differential diagnosis between OLP and OLR, and that p16 protein may be a differential marker of reticular and atrophic/erosive lesions of OLP.

**Keywords:** Oral Lichen Planus. Immunohistochemistry. Metallothionein.

## SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO.....	9
2 REVISÃO DE LITERATURA .....	11
2.1 LÍQUEN PLANO ORAL .....	11
2.2 REAÇÕES LIQUENÓIDES ORAIS .....	14
2.3 ESTRESSE OXIDATIVO.....	15
2.4 PROLIFERAÇÃO CELULAR.....	18
2.5 METALOTIONEÍNA .....	19
2.6 PROTEÍNA p16 .....	20
3 OBJETIVOS .....	22
3.1 OBJETIVO GERAL.....	22
3.2 OBJETIVO ESPECÍFICO.....	22
4 MATERIAL E MÉTODOS .....	23
4.1 CASUÍSTICA.....	23
4.2 IMUNO-HISTOQUÍMICA .....	23
4.3 ANÁLISE DA IMUNOMARCAÇÃO.....	25
4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA.....	26
5 RESULTADOS .....	27
6 DISCUSSÃO .....	36
7 CONCLUSÃO .....	40
REFERÊNCIAS .....	41

## 1 INTRODUÇÃO

O líquen plano é uma doença inflamatória crônica, mediada por linfócitos T, que acomete pele e mucosas. Aproximadamente metade dos pacientes com líquen plano em pele apresentam também lesões na mucosa oral, enquanto apenas uma pequena proporção dos pacientes com líquen plano oral apresenta manifestação cutânea (CARBONE et al., 2009; GONÇALVES; CRUZ; BEZERRA JÚNIOR, 2009; LORENZINI et al., 2013; SOUSA; ROSA, 2008). A etiologia do líquen plano oral ainda não foi esclarecida, ainda que diversos fatores tenham sido propostos como associados à doença, tais como herança genética, materiais odontológicos, drogas, alergias alimentares, agentes infecciosos (como vírus e bactérias), autoimunidade, estresse, trauma, imunodeficiência, hábitos, diabetes e hipertensão, doença intestinal e neoplasias malignas (ROOPASHREE et al., 2010).

A apresentação clínica da doença pode variar entre reticular, erosiva, papular, em placa, atrófica, bolhosa, linear e anular. As formas reticular e erosiva são as mais comuns, sendo a primeira a mais frequente. Enquanto as lesões reticulares são geralmente assintomáticas e por isso na maioria das vezes descobertas apenas incidentalmente durante um exame odontológico, as formas erosivas resultam, frequentemente, em dor e ardência, causando desconforto significativo aos pacientes (EISEN, 2002; RUBACI et al., 2012).

Histologicamente, no líquen plano oral ocorre acúmulo de linfócitos abaixo do epitélio da mucosa oral, agredindo-o, e, com a progressão da doença, são notados aumento da taxa de proliferação epitelial, diferenciação (queratinização) e apoptose de queratinócitos, resultando em hiperqueratose, atrofia ou ambos (BERMEJO-FENOLL et al., 2010; ERGUN et al., 2011; PICCINI et al., 2013).

São também comuns na mucosa oral as “reações liquenóides orais”, muito semelhantes ao líquen plano oral quanto ao aspecto clínico e histopatológico. Quatro formas de reações liquenóides orais tem sido consideradas, as quais são segregadas quanto à identificação de fatores desencadeantes: 1. reações liquenóides de contato, em que as lesões são topograficamente associadas ao agente incitante (principalmente restaurações de amálgama); 2. reações liquenóides relacionadas a drogas, em que as lesões orais e, ou, cutâneas aparecem em associação temporal com o uso de certos medicamentos; 3. reações liquenóides na doença do enxerto contra hospedeiro crônica (DECHc); e, 4. reações de aspecto liquenóide que não apresentam um ou mais dos aspectos clínicos característicos do líquen plano, como, por exemplo, gengivite descamativa isolada ou lesões unilaterais (VAN DER WALL, 2009).

Histologicamente, os vários tipos de lesões liquenóides orais podem ser idênticos ao líquen plano oral, ou diferir por detalhes discretos tais como infiltrado perivasicular profundo, ou infiltrado subepitelial misto (KAMATH; SETLUR; YERLAGGUDA, 2015).

No sistema imunológico as espécies reativas de oxigênio têm um papel fisiológico na sinalização que se estende a todos os tipos de células envolvidas na imunidade (NATHAN; CUNNINGHAM-BUSSEL, 2013). Estudos demonstraram que a produção das espécies reativas de oxigênio é funcionalmente importante nos linfócitos, pode ser aumentada com a ativação da resposta imune e a ativação das células T depende indiretamente dessas moléculas (MARRI; RICHNER, 2015; NATHAN; CUNNINGHAM-BUSSEL, 2013). Muitas das funções dos linfócitos, entre elas produção de anticorpos e adaptação da resposta imune, são fortemente influenciadas pelo estado oxidante/antioxidante do microambiente. As células imunes são bastante conhecidas como fontes de compostos oxidantes e pró-inflamatórios necessários na manutenção de suas funções (BOLIN et al., 2012). Processos comuns relacionados aos linfócitos T e B, tais como ativação, proliferação, sinalização, produção de anticorpos e apoptose, são significativamente dependentes da produção das espécies reativas de oxigênio (VALKO et al., 2007). Ao mesmo tempo, a superprodução dessas moléculas também funciona como imunossupressora das células imunes e foram as primeiras descritas como supressoras de células T (NATHAN; CUNNINGHAM-BUSSEL, 2013). Dessa forma, as células do sistema imunológico têm que lidar de forma adequada com o equilíbrio entre os efeitos benéficos e prejudiciais das espécies reativas de oxigênio (DROGE, 2002).

Considerando-se a importância do estresse oxidativo na função efetora do sistema imunológico, torna-se relevante estudar esse fenômeno em doenças auto-imunes, como o líquen plano oral e as reações liquenóides orais, não apenas para melhor compreender sua origem e evolução, inclusive na determinação de suas variadas expressões clínicas, mas também para aperfeiçoar o processo de diagnóstico diferencial entre essas doenças.

## 2 REVISÃO DE LITERATURA

### 2.1 LÍQUEN PLANO ORAL

Líquen plano é uma doença inflamatória crônica que pode afetar a pele, unhas, mucosa genital e mucosa oral (ARORA et al., 2014; BERGER, 2015; CASPARIS et al., 2014). O líquen plano oral (LPO) é aproximadamente duas vezes mais comum em mulheres do que em homens, manifestando-se especialmente entre a quinta e a sexta décadas de vida (BUDIMIR et al., 2014; CÓRDOVA; RUBIO; ECHEVARRÍA, 2014; LOPEZ-JORNET; MARTINEZ-CANOVAS; PONS-FUSTER, 2014; RUBACI et al., 2012). A prevalência estimada do LPO varia entre 0,5 a 2% da população (GREANEY et al., 2014; RUBACI et al., 2012; SIAR et al., 2013).

Clinicamente, o LPO se apresenta em duas formas básicas: lesões brancas e vermelhas. As primeiras são mais comuns, tendem a ser assintomáticas e incluem as formas reticular, em placa e papular. A forma reticular é o tipo mais frequente e se caracteriza pela presença de estriações brancas entrecruzadas, conhecidas como estrias de Wickham (DE ROSSI; CIARROCA, 2014; LÓPEZ-LÓPEZ; OMAÑA-CEPEDA; JANÉ-SALAS, 2015; PAYERAS et al., 2013). O segundo grupo inclui as formas erosiva, atrófica e bolhosa, caracterizadas por maior desconforto e dor (SHEN et al., 2012). Dentre elas, a mais frequente é a forma erosiva, que apresenta uma mistura de mucosa intensamente eritematosa e áreas de fraca ulceração (DE ROSSI; CIARROCA, 2014).

Recomenda-se que o diagnóstico de LPO ocorra mediante avaliação clínica e histopatológica (VAN DER MEIJ; SCHEPMAN; VAN DER WAAL, 2003), ainda que se advoque a possibilidade de diagnóstico essencialmente clínico (NEVILLE et al., 2009). Clinicamente, as lesões típicas de LPO manifestam-se bilateralmente, de forma relativamente simétrica. Na maioria dos casos, verifica-se a presença de uma rede de estrias de Wickham, a qual é mais discreta, mas ainda sim presente mesmo nas lesões predominantemente vermelhas. Em todas as outras apresentações semelhantes ao LPO, mas que não satisfaçam estes critérios, deve ser utilizado o termo “lesão clinicamente compatível com líquen plano” (VAN DER MEIJ; SCHEPMAN; VAN DER WAAL, 2003).

O exame histopatológico é importante para diferenciar o LPO de outras doenças, tais como reações liquenóides orais, lúpus eritematoso, penfigóide benigno de mucosa, pênfigo vulgar, e estomatite ulcerativa crônica (BUDIMIR et al., 2014; CARBONE et al., 2009;

GONÇALVES; CRUZ; BEZERRA JÚNIOR, 2009; RAD et al., 2009; SOUSA; ROSA, 2008; ISMAIL; KUMAR; ZAIN, 2007; SCULLY; CARROZZO, 2008). Microscopicamente, o LPO caracteriza-se por denso infiltrado linfocitário de distribuição subepitelial, com predomínio de linfócitos T, que ataca os queratinócitos basais provocando degeneração e morte (BUDIMIR et al., 2014; KAMATH; SETLUR; YERLAGGUDA, 2015; SHEN et al., 2012). Há também aumento da proliferação epitelial e hiperqueratose, levando ao aparecimento das lesões brancas (GREANEY et al., 2014). A apoptose de queratinócitos basais forma corpos coloides (corpos eosinofílicos sólidos com perda de material nuclear), globulares e homogeneamente eosinofílicos conhecidos como corpos de Civatte (BASCONES-ILUNDAIN et al., 2007; BURGDORF; PLEWIG, 2014; ROOPASHREE et al., 2010). Esses corpos coloides, também denominados hialinos, foram descritos primeiramente por Raymond Sabourad e, posteriormente, Achille Civatte publicou em seu trabalho que esses corpos eram uma maneira útil de diagnosticar o líquen plano (BURGDORF; PLEWIG, 2014). Outras características histológicas que não estão sempre presentes incluem paraqueratose, acantose e formação de projeções em formato de “dentes-de-serra” (ROOPASHREE et al., 2010; SUGERMAN et al., 2002). A imunofluorescência direta pode ser útil para confirmar o diagnóstico de líquen plano oral mediante o achado de reatividade para fibrinogênio e IgM (CÓRDOVA; RUBIO; ECHEVARRÍA, 2014; LÓPEZ-LÓPEZ; OMAÑA-CEPEDA; JANÉ-SALAS, 2015; RAD et al., 2009).

Embora a etiologia e a patogênese da LPO não estejam completamente compreendidas, diversas hipóteses têm sido levantadas sobre os fatores desencadeadores da doença (PAYERAS et al., 2013; ROOPASHREE et al., 2010). Alguns agentes extrínsecos são citados como desencadeadores das lesões, tais como restauração dentária e medicamentos, tais como anti-inflamatórios não esteroidais e hipoglicemiantes (PAYERAS et al., 2013). Outros fatores etiológicos propostos para o LPO são herança genética, agentes infecciosos, como vírus e bactérias, imunodeficiência, estresse, trauma, autoimunidade, diabetes e hipertensão (ROOPASHREE et al., 2010). Mecanismos independentes e dependentes da apresentação de抗ígenos têm sido postulados para a patogênese do LPO (ROOPASHREE et al., 2010; SRINIVAS et al., 2011).

Mecanismos de defesa não específicos envolvem a degranulação de mastócitos e a ativação de metaloproteinases (MMPs) nas lesões (CÓRDOVA; RUBIO; ECHEVARRÍA, 2014; RADWAN-OCZKO, 2013; SUGERMAN et al., 2002; SRINIVAS et al., 2011). As MMPs, secretadas por linfócitos, macrófagos, eosinófilos e neutrófilos, e especificamente a MMP-9, podem desencadear a apoptose de queratinócitos em decorrência da degradação da

membrana basal, além de facilitar a exocitose de linfócitos T CD<sub>8</sub><sup>+</sup> (SUGERMAN et al., 2002; SUGERMAN et al., 2000; ZHOU et al., 2001). A avaliação da expressão de diferentes tipos de metaloproteinases mostrou correlação com as diferentes manifestações clínicas de LPO, sendo que os níveis de expressão dessas moléculas foram maiores nas formas erosivas do que nas reticulares, principalmente as MMP-1 e 3 (MAZZARELLA et al., 2006). Foi demonstrado aumento da expressão das MMP-1 e 3 nas células epiteliais, e que MMP-9 está associada com o infiltrado inflamatório (SUGERMAN et al., 2000; ZHOU et al., 2001). A degranulação de mastócitos libera diversos mediadores pró-inflamatórios, tais como TNF- $\alpha$ , quimase e triptase (SUGERMAN et al., 2002). O TNF- $\alpha$  regula positivamente a expressão de moléculas de adesão de célula endotelial que são necessárias para a adesão de linfócitos às superfícies luminais dos vasos sanguíneos e subsequente extravasamento, além de estimular a secreção de RANTES, quimiocina que regula expressão e secreção por linfócitos T e que participa do recrutamento de linfócitos e mastócitos em LPO (LAVANYA et al., 2011; SUGERMAN et al., 2002). A quimase, por sua vez, é uma protease de mastócito que ativa MMP-9, contribuindo com a ruptura da membrana basal em LPO (FANG et al., 1997; SUGERMAN et al., 2002; ZHOU et al., 2001). Foram identificados aglomerados de mastócitos e linfócitos T CD<sub>8</sub><sup>+</sup> intraepiteliais nos locais de ruptura da membrana, sugerindo que os mastócitos desempenham algum papel no processo de rompimento da membrana basal, favorecendo a migração de células T CD<sub>8</sub><sup>+</sup> em direção ao tecido epitelial (SUGERMAN et al., 2002; ZHOU et al., 2002).

Para os mecanismos antígeno-específicos, as células envolvidas na patogênese do LPO incluem queratinócitos, linfócitos T CD<sub>4</sub><sup>+</sup> e CD<sub>8</sub><sup>+</sup>, células dendríticas, mastócitos e macrófagos. Nesse caso, a exposição de queratinócitos a antígenos ainda desconhecidos provocaria a secreção de quimiocinas. As células dendríticas presentes na camada basal do epitélio, principalmente as células de Langerhans, seriam responsáveis pela apresentação dos antígenos aos linfócitos T por meio de moléculas de classe II do Complexo Principal de Histocompatibilidade. Linfócitos T CD<sub>4</sub><sup>+</sup> ativados, por sua vez, ativariam linfócitos T citotóxicos (CD<sub>8</sub><sup>+</sup>), responsáveis pela apoptose de queratinócitos (PAYERAS et al., 2013). Este processo imunológico resulta em degeneração vacuolar, lise e, por fim, liquefação de células basais (CRINCOLI et al., 2011). A apoptose de queratinócitos basais pode também ser desencadeada pela interação entre receptores Fas (CD95) na superfície dos queratinócitos com ligantes Fas-L (CD95L) na membrana plasmática de linfócitos T (BASCONES-ILUNDAIN et al., 2007; PAYERAS et al., 2013).

Uma terceira hipótese a respeito da patogênese do LPO é a resposta auto-imune, que é sustentada por algumas características da doença tais como cronicidade, início na idade adulta, predileção feminina, associação com outras doenças auto-imunes, falta de expressão do TGF-β1, superexpressão de proteínas de choque térmico, apoptose de queratinócitos e maturação das células de Langerhans (CÓRDOVA; RUBIO; ECHEVARRÍA, 2014).

O tratamento do LPO consiste em tentar controlar os sintomas da doença com a utilização de medicamentos, principalmente corticosteroides que podem ser aplicados nas formas tópica ou sistêmica (CÓRDOVA; RUBIO; ECHEVARRÍA, 2014). O uso prolongado desse tipo de droga, entretanto, pode trazer algumas complicações associadas. A remissão espontânea da doença acontece em 40% dos casos de pacientes afetados com LPO (KRUPAA et al., 2015).

## **2.2 REAÇÕES LIQUENÓIDES ORAIS**

Reação liquenóide oral (RLO) é um termo utilizado para descrever lesões semelhantes a LPO quanto a seu aspecto clínico e características histopatológicas, porém dele diferenciado pela existência de fator etiológico identificável (ARREAZA; RIVERA; CORRENTI, 2014). De fato, a identificação e eliminação do fator incitante é suficiente para regressão da RLO, ao contrário do LPO (KAMATH; SETLUR; YERLAGGUDA, 2015). As reações liquenóides podem ser subdivididas em lesões liquenóides orais, reações liquenóides de contato, reações liquenóides associadas à drogas e reações liquenóides na doença do enxerto contra hospedeiro crônica (AL-HASHIMI, et al.; 2007; LÓPEZ-LÓPEZ; OMAÑA-CEPEDA; JANÉ-SALAS, 2015; SARUHANOĞLU, et al., 2014).

A RLO usualmente apresenta aspectos clínicos variáveis, porém muito similares aos vistos para o LPO. Todas as formas de apresentação do LPO também são vistas nas RLO, em especial placas brancas associadas a estrias de Wickham. Entretanto, algumas peculiaridades favorecem o diagnóstico de RLO: lesões unilaterais, associação topográfica com material de restaurações dentárias, drogas ou medicamentos, além de raramente acometer locais como língua e palato (KAMATH; SETLUR; YERLAGGUDA, 2015).

Histologicamente, quando comparada ao LPO, a RLO é caracterizada por infiltrado inflamatório mais difuso e profundo, composto principalmente por linfócitos, porém com numerosos eosinófilos, plasmócitos e corpos citóides (CARROZZO; THORPE, 2009; FARHI; DUPIN, 2010; KAMATH; SETLUR; YERLAGGUDA, 2015; SCULLY;

CARROZZO, 2008). As células inflamatórias tendem a se concentrar nas regiões perivasculares, como ocorre em algumas reações alérgicas. Algumas alterações histológicas incomuns em LPO são frequentes nas lesões de RLO, tais como paraqueratose focal e presença de corpos de Civatte nas camadas granulosa e queratinizada (KAMATH; SETLUR; YERLAGGUDA, 2015).

A etiologia das RLOs, embora ainda não completamente compreendida, parece decorrer de irritação crônica ou de hipersensibilidade retardada (KAMATH; SETLUR; YERLAGGUDA, 2015). As restaurações dentárias de amálgama têm sido relatadas como as principais indutoras de RLO, uma vez que a degradação da liga de amálgama leva à liberação de mercúrio, que é absorvido pelos tecidos moles bucais causando efeitos tóxicos ou alérgicos nos indivíduos (KAMATH; SETLUR; YERLAGGUDA, 2015). Diversas drogas e medicamentos também são associados às RLOs, mais comumente anti-inflamatórios não esteroidais, inibidores da enzima conversora de angiotensina, anti-hipertensivos, antimaláricos, diuréticos, penicilamina, e agentes hipoglicêmicos (FARHI; DUPIN, 2010; KAMATH; SETLUR; YERLAGGUDA, 2015; SRINIVAS et al., 2011).

Devido às semelhanças clínicas e histopatológicas entre RLO e LPO, diferentes critérios têm sido propostos para diferenciar as duas lesões. Dessa forma, um estudo retrospectivo envolvendo 232 pacientes com RLO e LPO concluiu que a presença de infiltrado inflamatório profundo no tecido conjuntivo, hiperparaqueratose e acometimento do lábio são critérios confiáveis para diferenciar as reações liquenóides (AMINZADEH; JAHANSHAHI; AHMADI, 2013). Outro estudo também mostrou que a presença de infiltrado inflamatório profundo é uma característica histológica que possibilita a distinção de LPO e RLO, além de outros fatores que incluem infiltrado perivascular e presença de neutrófilos e plasmócitos no tecido conjuntivo (THORNHILL et al., 2006). Outros fatores que possibilitam a diferenciação entre LPO e RLO incluem a presença de lesões unilaterais, associação topográfica com material de restauração dentária ou associação causal com drogas ou medicamentos (KAMATH; SETLUR; YERLAGGUDA, 2015).

### **2.3 ESTRESSE OXIDATIVO**

O estresse oxidativo é definido pela insuficiência das defesas antioxidantes frente ao acúmulo de radicais livres no organismo (IANNITTI; ROTTIGNI; PALMIERI, 2012). Radicais livres são moléculas assim denominadas por conterem pelo menos um elétron não

pareado, fato que provoca aumento da reatividade dessas espécies na tentativa de doar ou receber outro elétron a fim de alcançarem estabilidade (IANNITTI; ROTTIGNI; PALMIERI, 2012; KOHEN; NYSKA, 2002; LUGRIN et al., 2014).

Reações químicas que envolvam oxigênio ou nitrogênio podem levar à produção de espécies reativas de oxigênio (ERO) ou nitrogênio (ERN) (LUGRIN et al., 2014; YE et al., 2014). Grande variedade de fatores endógenos, tais como fosforilação oxidativa, metabolismo do citocromo P450, peroxissomos e ativação de células inflamatórias (neutrófilos, eosinófilos e macrófagos), regula a geração de EROs e ERNs e acaba influenciando processos fisiológicos da célula, tais como proliferação, diferenciação, apoptose, autofagia e senescência (AVEZOV; REZNICK; AIZENBUD, 2015; IANNITTI; ROTTIGNI; PALMIERI, 2012; KLAUNIG; KAMENDULIS, 2004; YE et al., 2014).

O excesso de EROs pode causar danos importantes a lipídeos, proteínas e DNA, inibindo suas funções normais. Por causa disso, o estresse oxidativo tem sido relacionado à patogênese de doenças crônicas inflamatórias, doenças neurodegenerativas, envelhecimento e câncer, entre outras (ERGUN et al., 2011; IANNITTI; ROTTIGNI; PALMIERI, 2012; LOPEZ-JORNET; MARTINEZ-CANOVAS; PONS-FUSTER, 2014; PARKER; ESHLEMAN, 2003; SHIRZAD et al., 2014). Nesse sentido, a indução de mutações carcinogênicas por estresse oxidativo é uma das maiores ameaças para grande parte dos organismos vivos (IANNITTI; ROTTIGNI; PALMIERI, 2012). O processo de carcinogênese diante do estresse oxidativo envolve três estágios: formação de células pré-neoplásicas que sofreram mutação a partir de um evento genotóxico, expansão clonal seletiva das células alteradas por meio de crescimento celular (tanto por aumento na proliferação celular quanto por redução da apoptose) e, por fim, mudanças celulares e moleculares que ocorrem do estado pré-neoplásico para o estado neoplásico. Este estágio envolve instabilidade genética, alterações da ploidia nuclear e ruptura da integridade cromossômica (KLAUNIG; KAMENDULIS, 2004). Espécies reativas de oxigênio podem levar à formação de bases oxidadas, sítio apurínicos ou apirimidínicos (AP) e quebras no DNA. As duas principais bases pré-mutagênicas são 7,8-dihidro-8-oxoguanina (8-oxoG) e 2-dihidroxadenina (2-OH-A) e suas características altamente mutagênicas são consequência da sua capacidade de criar emparelhamentos incomuns. Especificamente, 8-oxoG pode emparelhar com citosina e adenina causando as transversões GC → TA e A → CG, enquanto 2-OH-A leva somente à transversão GC → TA (IANNITTI; ROTTIGNI; PALMIERI, 2012; MAGA et al., 2008; VALKO et al., 2004). No LPO, a carência de enzimas de reparo do DNA frente ao dano oxidativo poderia contribuir para a transformação maligna, considerando-se que elevadas

taxas de mutação em tecidos cronicamente inflamados aumentam o risco de carcinogênese (PIMENTA; PINHEIRO; GOMEZ, 2004; VLKOVÁ et al., 2012).

A cavidade oral é um local crítico para a ocorrência do estresse oxidativo, pois danos teciduais frequentemente ocorrem devido a estímulos químicos, térmicos e microbiológicos (ERGUN et al., 2011). As fontes de estresse oxidativo na cavidade oral incluem: comida, com uma variedade de texturas, substâncias e temperaturas; consumo de álcool; inflamações nos tecidos da cavidade oral; fumaça de cigarro, e restaurações dentárias com metais pesados como cádmio e zinco, porcelana e resinas (AVEZOV; REZNICK; AIZENBUD, 2015; JIANG; ZHANG; DUSTING, 2011). Além disso, a saliva é rica em substâncias antioxidantes e constitui a primeira linha de defesa do organismo contra o estresse oxidativo (BUCZKO; ZALEWSKA A; SZARMACH, 2015).

Diversos estudos apontam que o estresse oxidativo pode ser fundamental em doenças que afetam a mucosa oral, tais como líquen plano, por exemplo, pelo aumento de malondialdeído, o principal produto da peroxidação lipídica e importante biomarcador de estresse oxidativo, no soro e na saliva de pacientes afetados (ABDOLSAMADI et al., 2014; ERGUN et al., 2011; IANNITTI; ROTTIGNI; PALMIERI, 2012; SHIRZAD et al., 2014; UPADHYAY et al., 2010).

Shirzad et al. (2014) avaliaram os produtos da peroxidação lipídica e a capacidade antioxidante total (TAC) da saliva de pacientes com a forma erosiva de LPO. Quando comparados com pacientes saudáveis (grupo controle), a quantidade de malondialdeído (MDA) foi notavelmente maior nos pacientes com LPO. Segundo os autores, esses resultados sugerem que o aumento do estresse oxidativo e a redução na defesa antioxidante na saliva dos pacientes acometidos por LPO podem estar envolvidos na patogênese da doença (SHIRZAD et al., 2014). Anteriormente, Ergun et al. (2011) avaliaram o perfil antioxidante de pacientes com LPO e utilizaram como marcadores óxido nítrico (NO), malondialdeído (MDA) e superóxido dismutase (SOD), que foram significativamente mais elevados nos pacientes com LPO em comparação com indivíduos saudáveis (ERGUN, et al., 2011). Outro estudo recente, envolvendo 36 pacientes com LPO, encontrou diferenças significativas entre os níveis salivares reduzidos de vitaminas antioxidantes e da capacidade antioxidante total (TAC) e o aumento da peroxidação lipídica (malondialdeído), quando comparado com o grupo controle. Os resultados obtidos sugerem que os radicais livres e os danos oxidativos resultantes devem ter um papel importante na patogênese do LPO (ABDOLSAMADI, et al., 2014).

## 2.4 PROLIFERAÇÃO CELULAR

A proliferação celular em tumores tem sido muito estudada nos últimos anos por ser um importante mecanismo biológico envolvido na oncogênese, caracterizando o câncer como um processo de proliferação celular descontrolada (KANNAN et al., 1996). O aumento da taxa de proliferação poderia ser a fase inicial da carcinogênese, portanto o aumento da capacidade de proliferação pode ser um dos primeiros indicadores de transformação maligna (DE SOUSA et al., 2009). Além desse fator, na histopatologia a avaliação da proliferação possibilita a sua correlação com o comportamento tumoral, ou seja, com o potencial de metástase, a probabilidade de recorrência e a sobrevida (VAN DIEST; BRUGAL; BAAK, 1998; ZARGARAN et al., 2013).

Técnicas histológicas de identificação de proliferação e morte celular tem se tornado mais significantes por permitirem identificar indivíduos que apresentam risco maior de desenvolver carcinomas, além de carregarem importante valor prognóstico (VISWANATHAN et al., 2015). A taxa de proliferação celular pode ser avaliada por meio de ensaio imuno-histoquímico de抗ígenos relacionados a proliferação, sendo o Ki-67 um dos principais marcadores utilizados para esse propósito (BOLOGNA-MOLINA et al., 2013; RANGANATHAN; KAVITHA, 2011; WATANABE et al., 2010).

Ki-67 é uma proteína de aproximadamente 395 kDa, codificada por um gene localizado no cromossomo 10 (VAN DIEST; BRUGAL; BAAK, 1998). Esse antígeno pode ser detectado nas fases G1, S, G2 (intérfase) e M do ciclo celular, porém não é observado durante a fase G0, quando as células estão em repouso (BOLOGNA-MOLINA et al., 2013; RANGANATHAN; KAVITHA, 2011; RIVERA; VENEGAS, 2014; YERUSHALMI et al., 2010; WATANABE et al., 2010). É encontrado especificamente nos núcleos das células em divisão, sendo um marcador confiável de proliferação celular, além de ser considerado ótimo preditor de sobrevida e recorrência (ACAY et al., 2006; VAN DIEST; BRUGAL; BAAK, 1998; WANG et al., 2009; WANGSA et al., 2008). Diversos estudos analisando possíveis marcadores mostraram que o Ki-67 é relevante na determinação do prognóstico de câncer de mama, tumores estromais gastrointestinais, sarcoma de tecidos moles, linfomas não-Hodgkin e displasia de colo de útero (VAN DIEST; BRUGAL; BAAK, 1998; YERUSHALMI et al., 2010).

Estudos sobre marcadores de proliferação em lesões de mucosa oral demonstraram que a expressão de Ki-67 está associada à gravidade das mesmas, uma vez que a expressão do

antígeno em carcinomas é, aproximadamente, quatro vezes maior do que em mucosa normal (KANNAN et al, 1996). A expressão de Ki-67 em lesões orais pré-malignas e malignas aumenta de acordo com o grau de displasia ou de diferenciação das mesmas, e a proliferação celular aumentada pode ter potencial para desencadear a transformação maligna na lesão (DE SOUSA et al., 2009; DRAGOMIR et al., 2012; MONTEBUGNOLI et al., 2011; RANGANATHAN; KAVITHA, 2011).

Já foi demonstrado que as lesões de LPO apresentam maior atividade proliferativa quando comparadas com epitélio de mucosa oral normal, o que pode ser um mecanismo para preservar a arquitetura epitelial (DA SILVA FONSECA; DO CARMO, 2001; GONZÁLEZ-MOLES et al., 2006; HIROTA et al., 2002; KARATSAIDIS et al., 2003; LEE et al., 2005; POOMSAWAT et al., 2011; TANIGUCHI et al., 2002). Em relação às lesões displásicas epiteliais e ao carcinoma epidermoide oral, a taxa de proliferação celular em casos de LPO é menor, reduzindo as chances de as células sofrerem mutações genéticas durante a divisão celular e pode, assim, explicar o menor grau de transformação maligna dessas lesões (LEE et al., 2005; DE SOUSA et al., 2009).

## 2.5 METALOTIONEÍNA

Sob condições fisiológicas, o acúmulo de EROs nas células é controlado por diversos sistemas de defesa antioxidante endógenos, enzimáticos e não-enzimáticos, que podem prevenir ou eliminar as EROs. Antioxidantes enzimáticos incluem a superóxido dismutase (SOD), catalase, glutationa-S-transferase, glutationa peroxidase e peroxirredoxina (CHEN et al., 2012; LUGRIN et al., 2014; YE el al., 2014). O selênio é outro elemento com importante papel na defesa antioxidante e prevenção de câncer. Entre os antioxidantes não-enzimáticos, estão as vitaminas A, C e E, os carotenoides, os flavonoides, e ainda as metalotioneínas (BABULA et al., 2012; YE et al., 2014).

Metalotioneínas (MTs) são proteínas intracelulares com baixo peso molecular e ricas em cisteína (30%). Distribuem-se por quatro subfamílias, designadas como MT-1 até MT-4. Apresentam alta afinidade de ligação por metais pesados. São expressas em diversos tipos de tecido incluindo rins, fígado, pele e mucosa oral. São fundamentais no armazenamento intracelular, transporte e metabolismo de íons metálicos como cobre, zinco e cádmio. As MTs também estão envolvidas no controle do metabolismo normal das células e no processo de

adaptação celular a vários tipos de estresse, incluindo o estresse oxidativo (BELL; VALLEE, 2009; GUMULEC et al., 2014; MATSUURA; TSUKIFUJI; SHINKAI, 1998).

Na proteção contra o estresse oxidativo, as MTs atuam como eliminadoras de radicais livres, embora esse mecanismo de proteção ainda não esteja bem estabelecido. MTs geralmente estão associadas ao zinco e, sob a condição de estresse oxidativo, seus resíduos de cisteína podem ser oxidados ou reduzidos, permitindo a liberação do zinco para que a MT possa interagir com antioxidantes e agentes redutores (BELL; VALLEE, 2009). Sua atividade redox pode inclusive afetar a transcrição celular e a função imune (CHERIAN; JAYASURYA; BAY, 2003; GUMULEC et al., 2014). Ao mesmo tempo, espécies reativas de oxigênio e estresse oxidativo tem a capacidade de induzir e aumentar a expressão de MT por meio do Fator de transcrição do elemento de resposta a metais 1 (MTF-1), que coordena a regulação transcricional de MT e outras proteínas antioxidantes (HAQ; MAHONEY; KOROPATNICK, 2003; HE; MA, 2009).

A presença de MTs no LPO foi motivo de um único estudo até o presente momento, o qual evidenciou maior expressão nas formas hiperqueratóticas (brancas) do que nas atróficas e erosivas (vermelhas), fato interpretado como decorrente de resposta antiapoptótica mais pronunciada no LPO reticular (ALLON et al., 2014). Nenhum estudo comparando a presença de MT entre LPO e RLO foi identificado.

## 2.6 PROTEÍNA p16

A proteína p16 funciona como um regulador negativo do ciclo celular (MONTEBUGNOLI et al., 2011; SALEHINEJAD et al., 2014). A desregulação dos mecanismos de controle do ciclo celular tem sido observada em diversos tipos de câncer, incluindo o carcinoma epidermóide oral (FELIX et al., 2015; HANAHAN; WEINBERG, 2011; POOMSAWAT et al., 2011). Os pontos de verificação (*checkpoints*) do ciclo celular controlam o tempo de transição para garantir a replicação adequada do DNA. A passagem através de G1 é influenciada pela proteína do retinoblastoma (pRb), que por sua vez é regulada pela atividade de ciclinas, quinases dependentes de ciclina (CDKs) e inibidores de quinases dependentes de ciclinas (CDKI). Os inibidores de CDK, tais como p16, p21 e p27, interagem com complexos de ciclina-CDK para inibir a fosforilação de pRb, inibir a progressão de G1 para a fase S e restringir o crescimento celular (FELIX et al., 2015). Especificamente, a proteína p16 inativa o complexo ciclina D-CDK4/6 e, consequentemente,

bloqueia pRb (MONTEBUGNOLI et al., 2011; SALEHINEJAD et al., 2014). As alterações resultando na superexpressão de proteínas estimulantes do ciclo celular (cyclinas ou CDKs) ou na inativação de fatores de inibição (inibidores de CDK ou pRb) tem o potencial de interromper o ciclo celular e iniciar a proliferação celular descontrolada (FELIX et al., 2015). Dessa forma, a desregulação da via pRb contribui para a iniciação de câncer (POOMSAWAT et al., 2011).

Frente ao estresse oxidativo, torna-se essencial que a via pRb ative os pontos de verificação para que o DNA não sofra danos. Espécies reativas de oxigênio podem interagir e até mesmo induzir a expressão de p16 (KIM; SHARPLESS, 2006). O acúmulo dessa proteína é maior em células senescentes, que são induzidas e mantidas no estado irreversível de senescência pelas espécies reativas de oxigênio. Essa relação entre p16 e estresse oxidativo funciona como uma barreira à tumorigênese. Por outro lado, a perda de p16 permite a proliferação celular e que as células tumorais aumentem a produção das espécies reativas de oxigênio alterando o estado redox das células que sofreram transformação. O mecanismo pelo qual as espécies reativas de oxigênio controlam p16 não está bem definido, mas sugere-se que a reentrada no ciclo celular após o estado de quiescência é regulado pelo complexo ciclina/CDK dependente de p16. De fato, todas as vias de sinalização dependentes do estado redox e que modulam a reentrada no ciclo celular convergem para os reguladores da fase G1 (BURHANS; HEINTZ, 2009). A função de supressão tumoral de p16 pode, dessa forma, se estender à regulação do estresse oxidativo e a interação entre esse gene supressor de tumor e o estresse oxidativo poderia refletir no estado de senescência das células (VURUSANER; POLI; BASAGA, 2012).

Em relação ao LPO, verificou-se superexpressão de p16 nas células epiteliais, fato interpretado como decorrente do estado hiperproliferativo dessas células ou mesmo da parada do ciclo celular frente a genotoxicidade (POOMSAWAT et al., 2011).

### **3 OBJETIVOS**

#### **3.1 OBJETIVO GERAL**

Avaliar possíveis diferenças moleculares, relacionadas ao estresse oxidativo e à proliferação celular, entre LPO e RLO, bem como entre diferentes formas clínicas de LPO.

#### **3.2 OBJETIVOS ESPECÍFICOS**

1. Comparar casos de LPO e RLO quanto à reatividade imuno-histoquímica para MT, Ki-67 e proteína p-16;
2. Analisar a expressão dos抗ígenos de interesse entre casos de LPO e RLO.

## 4 MATERIAL E MÉTODOS

Este trabalho foi previamente submetido e aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com Seres Humanos da Universidade Federal de Uberlândia (parecer 305/2007).

### 4.1 CASUÍSTICA

Neste estudo, foram selecionados como casos de interesse os pacientes com diagnóstico clinicopatológico de LPO e RLO, identificados mediante rastreamento no banco de dados do Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia, durante o período de 1978 a 2014, o qual conta com 15.093 exames nesse período.

Para os casos de LPO, foram utilizados os critérios clínicos e histológicos de diagnóstico apresentados no trabalho de van der Meij et al. (2003), os quais foram elaborados sobre as definições apresentadas pela Organização Mundial de Saúde (OMS), em 1978. Quanto aos aspectos clínicos, foram incluídos os casos que apresentavam lesões bilaterais, simétricas, formadas por rede de estrias branco-acinzentadas ligeiramente elevadas, caracterizando a forma “branca” (reticular) das lesões; lesões “vermelhas” foram consideradas na presença de atrofia, erosão ou ulceração da mucosa, desde que fossem associadas a áreas reticulares e fossem também bilaterais e simétricas. Necessariamente, os seguintes critérios histopatológicos também foram observados em todos os casos de LPO: presença de infiltrado inflamatório disposto em banda bem definida na parte superficial do tecido conjuntivo e composta essencialmente por linfócitos, liquefação de queratinócitos basais, e ausência de displasia epitelial evidente.

Casos de RLOs foram selecionados como lesões com características clínicas e histológicas similares às descritas anteriormente, mas que ocorreram em sítios bem definidos e unilaterais, associadas a restaurações metálicas (KAMATH; SETLUR; YERLAGGUDA, 2015; VAN DER WAAL, 2009).

### 4.2 IMUNO-HISTOQUÍMICA

Foi utilizada a técnica de estreptavidina-biotina-peroxidase, considerando-se a metodologia descrita a seguir. Inicialmente, os cortes obtidos das amostras de interesse foram montados em lâminas de vidro previamente tratadas com organosilano (3-

aminopropyltriethoxy-silano, Sigma Chemical Co., St. Louis, MO, USA). Seguiu-se uma etapa de desparafinação, mediante duas passagens em soluções de xanol, realizadas à temperatura ambiente por 18 horas e 15 minutos, respectivamente. Os cortes histológicos foram então hidratados em cadeia descendente de etanol (100%, 90%, 80% e 70%) e submetidos à solução de hidróxido de amônia a 10% em etanol, durante 10 minutos, para remoção do pigmento formólico, sendo em seguida rapidamente imersos em banhos de água destilada para lavagem. Em seguida, os cortes foram submetidos a ensaios imuno-histoquímicos para detecção individual dos anticorpos descritos na Tabela 1, sendo consideradas as recomendações dos fabricantes dos anticorpos utilizados acrescidas das modificações necessárias, segundo resultados obtidos na padronização laboratorial.

Então, procedeu-se a recuperação antigênica com solução de ácido etilenodiaminotetracético (EDTA, 1mM) tamponado com hidróxido de sódio (pH 8,0), durante um ciclo de 15 minutos a 110°C utilizando o Decloaking Chamber<sup>TM</sup> NxGen (Biocare Medical, Concord, CA, USA). Após resfriamento da solução de recuperação antigênica, alcançando o equilíbrio térmico com o ambiente, os cortes foram lavados em água destilada e submetidos ao bloqueio de biotina endógena utilizando-se, para isso, clara de ovo diluída em água destilada (duas claras para 200 mL de água), durante 10 minutos. Os cortes foram novamente lavados em água destilada para posterior bloqueio de avidina endógena utilizando leite desnatado diluído em água destilada (30 g de leite para 180 mL de água), durante 15 minutos (MILLER, et al., 1999). As lâminas foram lavadas em água destilada para remoção completa do leite e submetidas ao bloqueio de peroxidase endógena pela imersão dos cortes em solução de peróxido de hidrogênio a dez volumes (3%), em três banhos de 10 minutos cada. Na etapa seguinte, os cortes foram submetidos a três banhos de cinco minutos cada em solução tampão TRIS-HCl (pH 7,4) e então incubados com Background Snipper (Starr Trek, Biocare Medical, Concord, CA, USA) por 15 minutos. Após isso, os casos foram incubados com os anticorpos primários diluídos em TRIS-HCl, na titulação anteriormente especificada, em câmara úmida, à temperatura ambiente por duas horas. Em seguida, a reação foi amplificada com a utilização do sistema estreptavidina-biotina-peroxidase (Starr Trek, Biocare Medical, Concord, CA, USA), incubando-se primeiramente o anticorpo secundário biotinilado por 20 minutos, e depois o complexo de estreptavidina-peroxidase por dez minutos, ambos em câmara úmida. Entre essas etapas, os cortes foram lavados em solução de TRIS-HCl em dois banhos de dois minutos cada. Após a última lavagem com TRIS-HCl, a reação foi revelada com a utilização de solução cromógena contendo 3,3'tetrahidrocloreto de

diaminobenzidina e peróxido de hidrogênio por cinco minutos, seguido de banho em água corrente por outros cinco minutos para lavagem.

Finalmente, os cortes foram contracorados por hematoxilina de Harris, desidratados em cadeia ascendente de etanol (70%, 80%, 90% e duas vezes a 100%), diafanizados em dois banhos de xanol, sendo as lâminas montadas ao final do procedimento com lamínulas de vidro e Permount (Fischer Scientific, Fair Lawn, NJ, USA). Em todos os ensaios foram utilizados como controles positivos cortes histológicos de cólon para metalotioneína, de câncer de cólon para Ki-67 e de carcinoma epidermoide oral para p16, e como controles negativos foram omitidos os anticorpos primários.

Tabela 1 – Especificações dos anticorpos primários utilizados e seus respectivos clone, diluição e fabricante.

<b>Anticorpo</b>	<b>Clone</b>	<b>Diluição</b>	<b>Fabricante</b>
<b>anti-MT</b>	E9	1:400	Dako, Carpinteria, CA
<b>anti-p16</b>	JC8	1:200	Santa Cruz Biotechnology, Dallas, TX
<b>anti-Ki-67</b>	Policlonal	1:1000	Rhea Biotech, Campinas, SP

Fonte: A autora.

#### **4.3 ANÁLISE DA IMUNOMARCAÇÃO**

A investigação da reatividade para cada um dos抗ígenos de interesse foi realizada inicialmente de forma qualitativa, quanto à presença ou não de marcação, comportamento celular de marcação predominante (membrana, citoplasma e/ou núcleo) e, por fim, marcação nas diferentes camadas de células epiteliais (camada basal, camada parabasal, camada espinhosa e células inflamatórias) (PIMENTA; PINHEIRO; GOMEZ, 2004).

Em seguida, para a investigação de MT e p16, cada caso foi avaliado quanto à intensidade de marcação e à proporção de células positivas nas camadas basal e parabasal, conforme apresentado na Tabela 2; o produto da multiplicação dos valores obtidos nesses dois parâmetros resultou em um índice de reatividade, denominado Quickscore (DETRE; SACLANIJOTTI; DOWSETT, 1995), que foi utilizado posteriormente para análises estatísticas. Para estudo do Ki-67, realizou-se contagem do número de células basais e

parabasais reativas, registradas como porcentagem, sendo avaliadas, na área de *hot-spot*, 200 células por camada epitelial para cada caso utilizando ampliação de 400x (ZARGARAN et al., 2013).

Tabela 2 – Análise da imunomarcação dos抗ígenos MT e p16 de acordo com os parâmetros intensidade de marcação e proporção de células positivas (DETRE; SACLANIJOTTI; DOWSETT, 1995).

<b>Índice</b>	<b>Intensidade</b>	<b>Proporção de células positivas</b>
		Ausência de marcação
<b>0</b>	Ausência de marcação	Ausência de marcação
<b>1</b>	Fraca	0 a 4%
<b>2</b>	Moderada	5 a 19%
<b>3</b>	Forte	20 a 39%
<b>4</b>	-	40 a 59%
<b>5</b>	-	60 a 79%
<b>6</b>	-	80 a 100%

Fonte: A autora.

#### 4.4 ANÁLISE ESTATÍSTICA

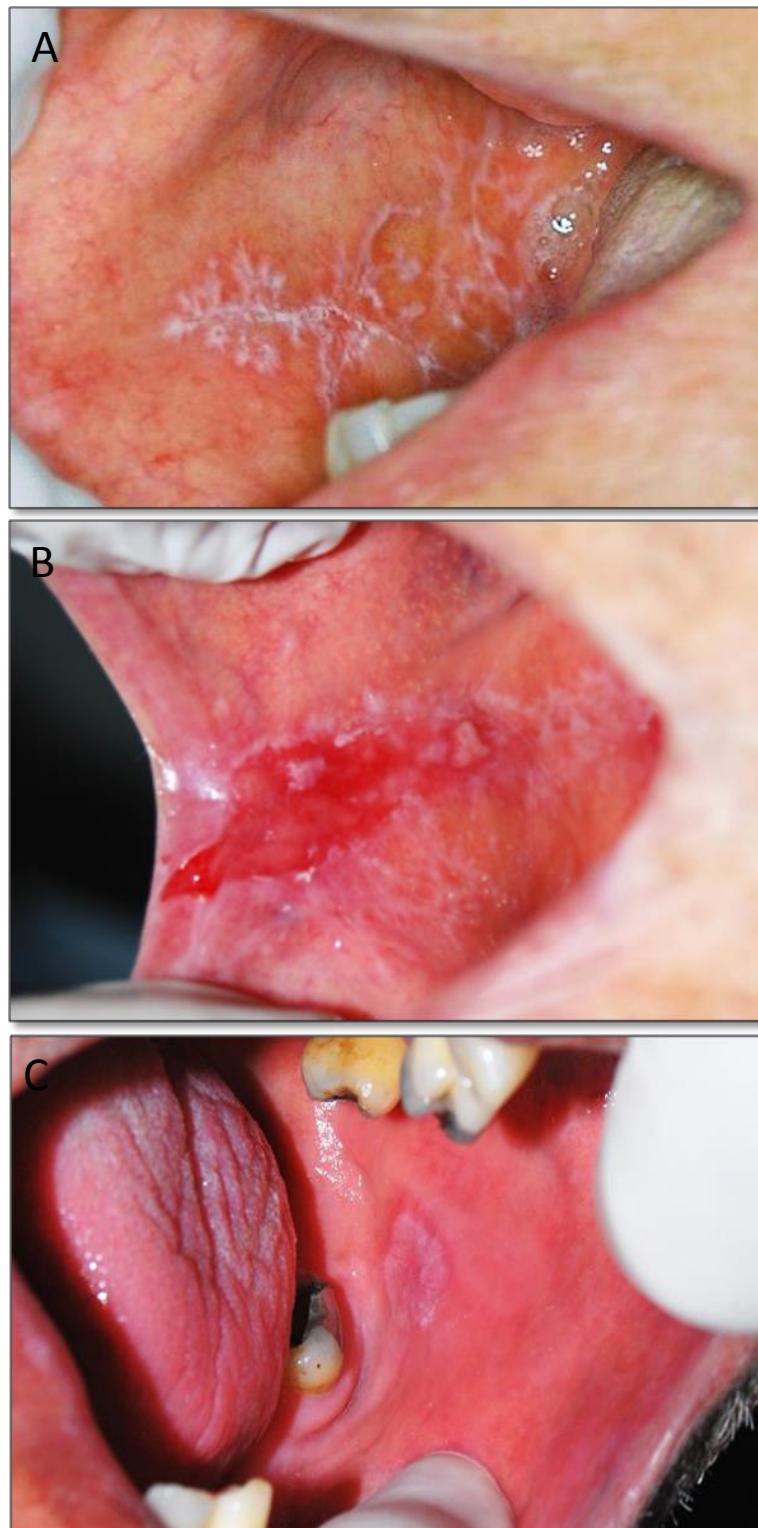
Para investigação de possíveis diferenças de reatividade para os抗ígenos estudados, entre as duas formas de LPO (reticular *versus* atrófico/erosivo), ou entre LPO e RLO, foi utilizado o teste *U* de Mann-Whitney, mediante o software GraphPad Prism 5. O nível de significância estatística foi definido em 5%.

## 5 RESULTADOS

A partir do registro inicial de 183 exames com definição diagnóstica de LPO ou RLO, foram selecionados 24 casos típicos de LPO reticular, 18 casos também típicos da forma atrófica/erosiva da doença, e 23 casos de típicos de RLO.

O grupo de casos com LPO reticular apresentou média de idade de 44,5 anos e relação entre homens e mulheres de 1:3. Os casos de LPO atrófico/erosivo mostraram proporção entre os gêneros masculino e feminino de 1:2, com a média de idade de 48,1 anos. Os casos de RLO apresentaram uma média de idade de 52,6 anos e a relação entre homens e mulheres acometidos pelas lesões foi de 1:1,3.

Figura 1 – Apresentação clínica de líquen plano oral, em sua forma reticular (A) e atrófica/erosiva (B), e de reação liquenóide oral (C).

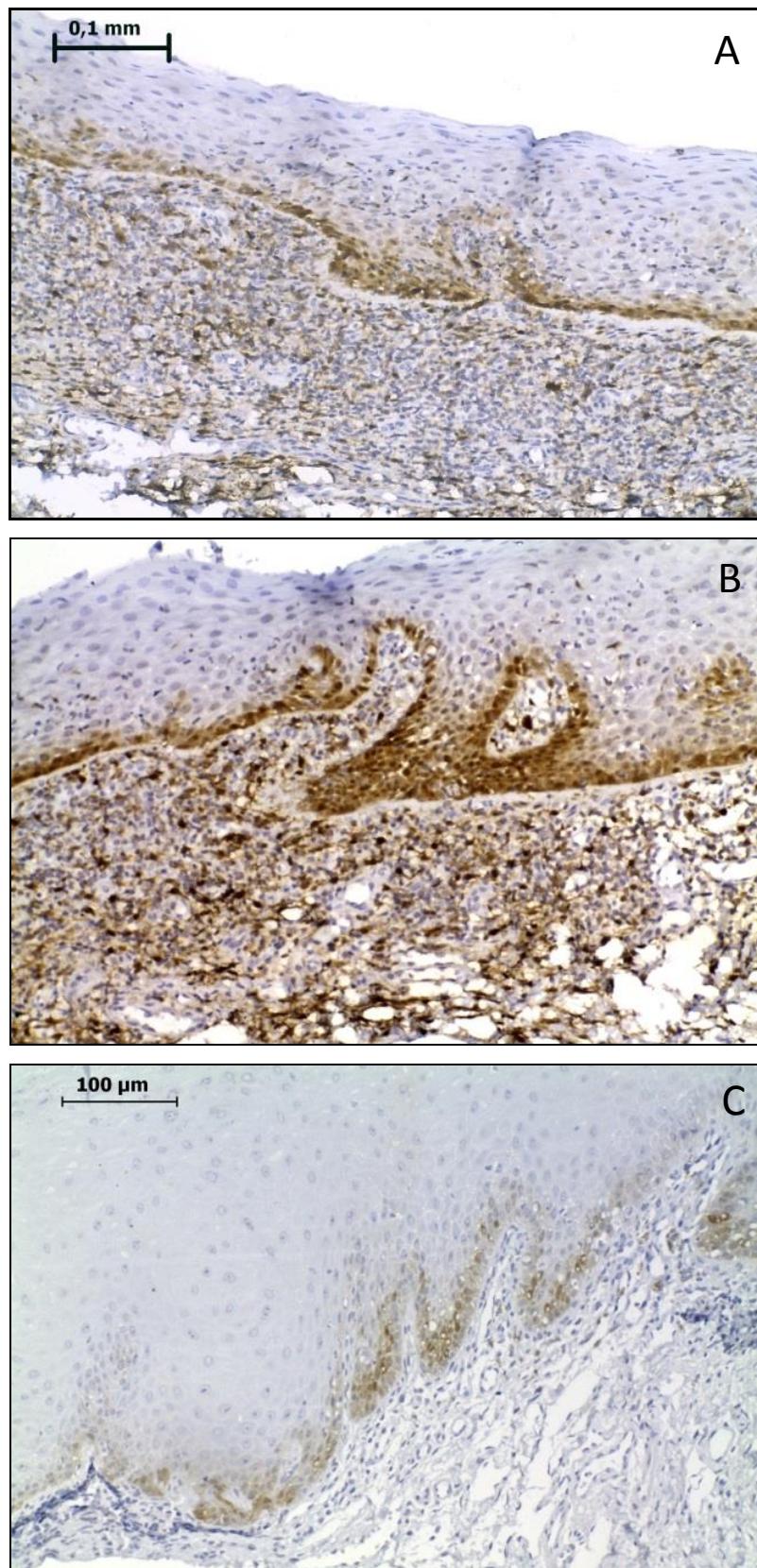


Fonte: Acervo da Área de Diagnóstico Estomatológico da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Uberlândia.

Todos os casos de LPO reticular eram assintomáticos, enquanto desconforto ou ardência foi relatada em todos os casos de LPO erosivo/atrófico e de RLO.

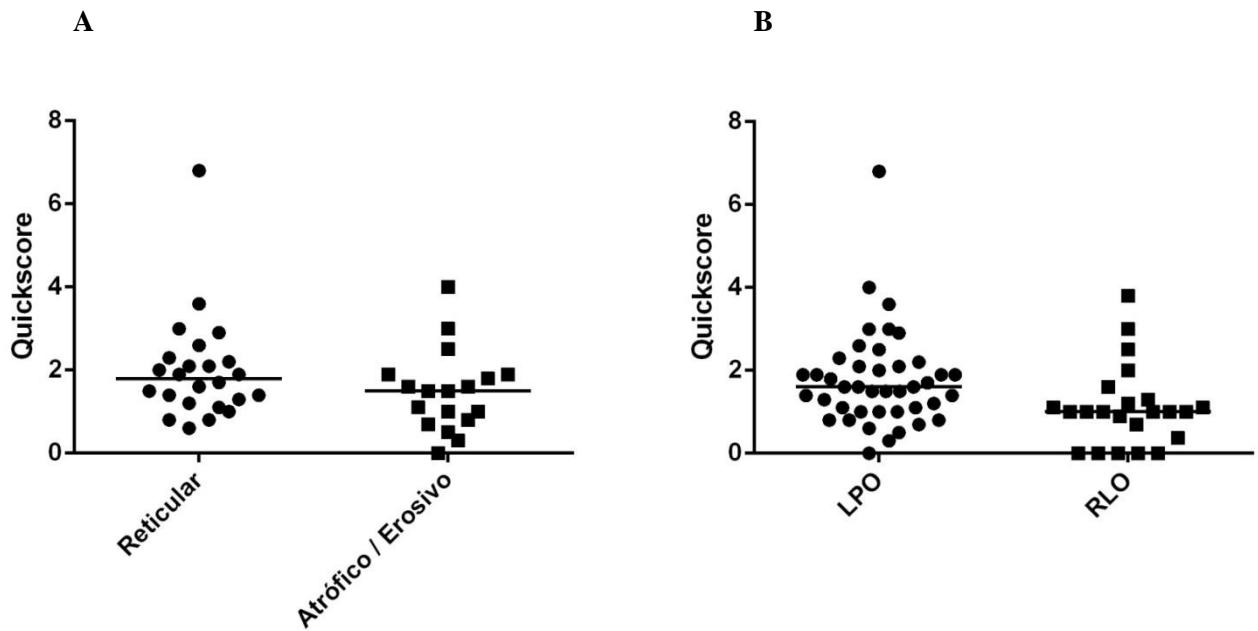
Reatividade imuno-histoquímica para MT foi observada tanto em LPO quanto em RLO, especialmente nas camadas basal e parabasal, mais pronunciada na primeira, e ocorrendo tanto em núcleo quanto em citoplasma, conforme mostrado na Figura 4. Não houve diferença significativa de reatividade entre as lesões reticulares e atróficas / erosivas, mas sim entre os grupos de LPO e de RLO, com maior reatividade no primeiro conforme apresentado no Gráfico 1.

Figura 4 – Imagens representativas da reatividade imuno-histoquímica para metalotioneína em amostras de líquen plano oral reticular (A), líquen plano atrófico/erosivo (B), e reação liquenóide oral (C). Técnica de estreptavidina-biotina-peroxidase, ampliação original de 400×.



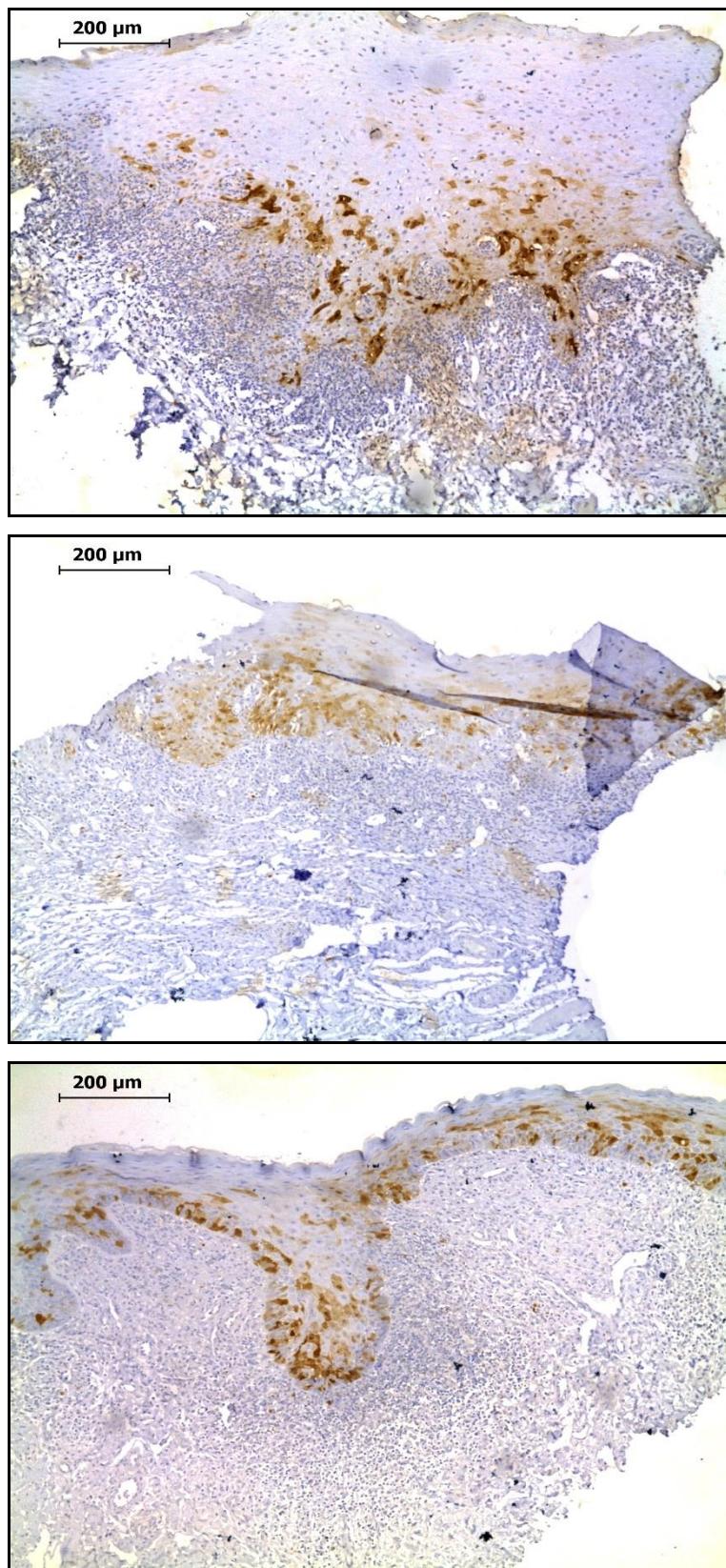
Fonte: A autora.

Gráfico 1 – Reatividade imuno-histoquímica para metalotioneína, avaliada pelo índice Quickscore, entre: A - LPO reticular e atrófico / erosivo ( $p = 0,13$ , teste  $U$  de Mann-Whitney) e B - LPO e RLO ( $p = 0,01$ , teste  $U$  de Mann-Whitney). A barra horizontal corresponde à mediana de cada grupo de lesões.



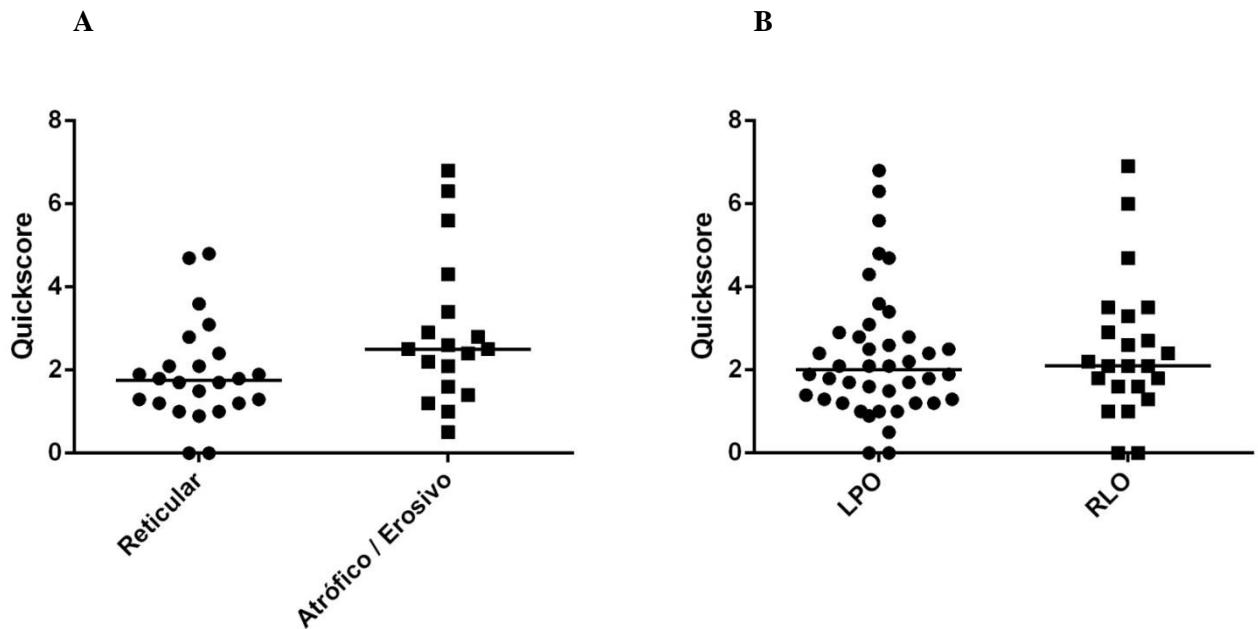
Reatividade para a p16 foi observada focalmente, tanto em núcleo quanto em citoplasma, especialmente nas camadas basal e parabasal mas também sendo evidente em células espinhosas, conforme mostrado na Figura 5. Verificou-se que a reatividade era significativamente mais evidente nos casos de LPO erosivo/atrófico que nos casos reticulares, todavia sem diferença significativa de reatividade entre os grupos de LPO e RLO, conforme mostrado no Gráfico 2.

Figura 5 – Imagens representativas da reatividade imuno-histoquímica para p16 em amostras de líquen plano oral reticular (A), líquen plano atrófico/erosivo (B), e reação liquenóide oral (C). Técnica de estreptavidina-biotina-peroxidase, ampliação original de 200×.



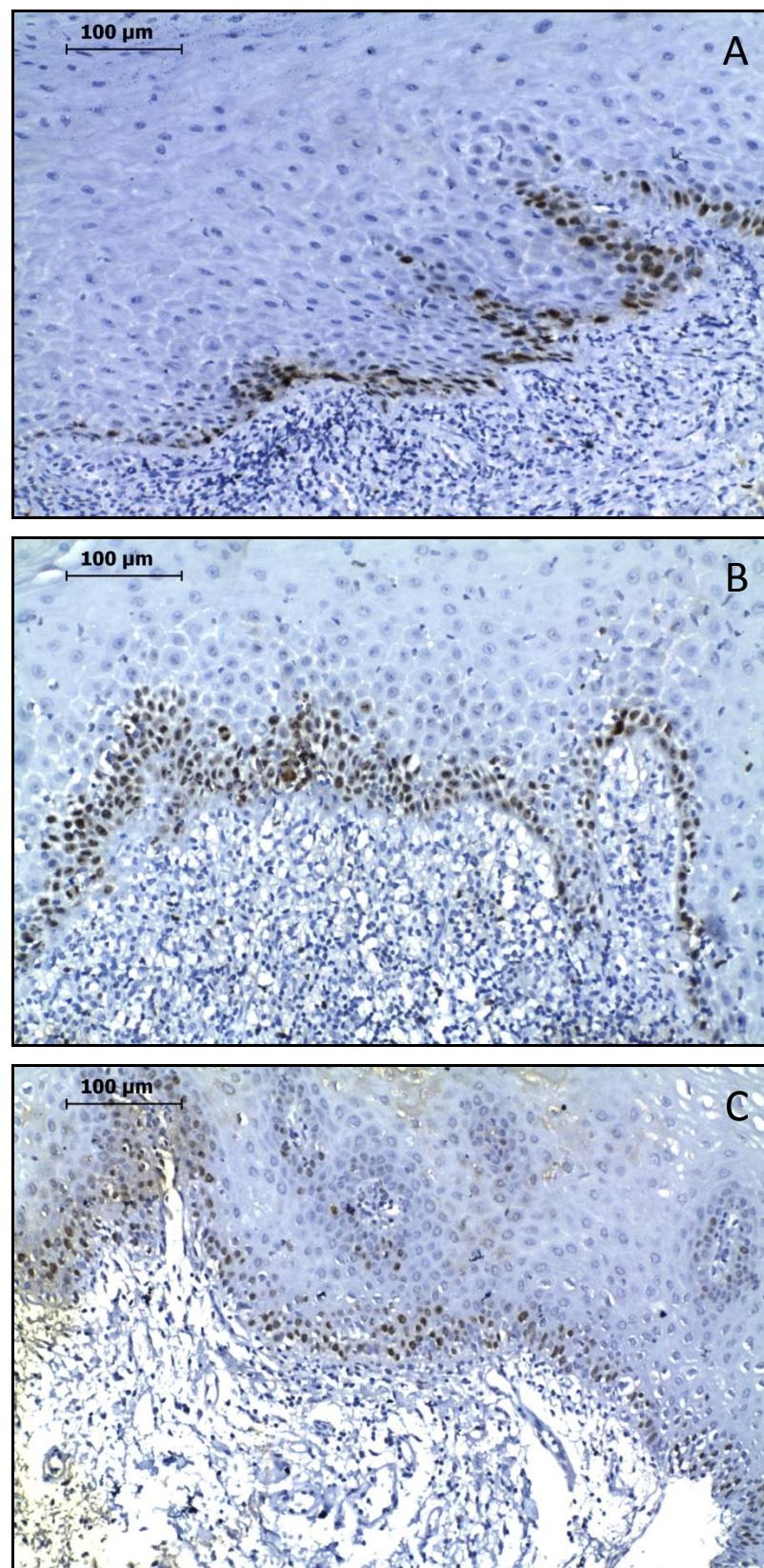
Fonte: A autora.

Gráfico 2 – Reatividade imuno-histoquímica para proteína p16, avaliada pelo índice Quickscore, entre LPO reticular x atrófico/erosivo ( $p = 0,04$ , teste  $U$  de Mann-Whitney), e entre LPO e RLO ( $p = 0,59$ , teste  $U$  de Mann-Whitney). A barra horizontal corresponde à mediana de cada grupo de lesões.



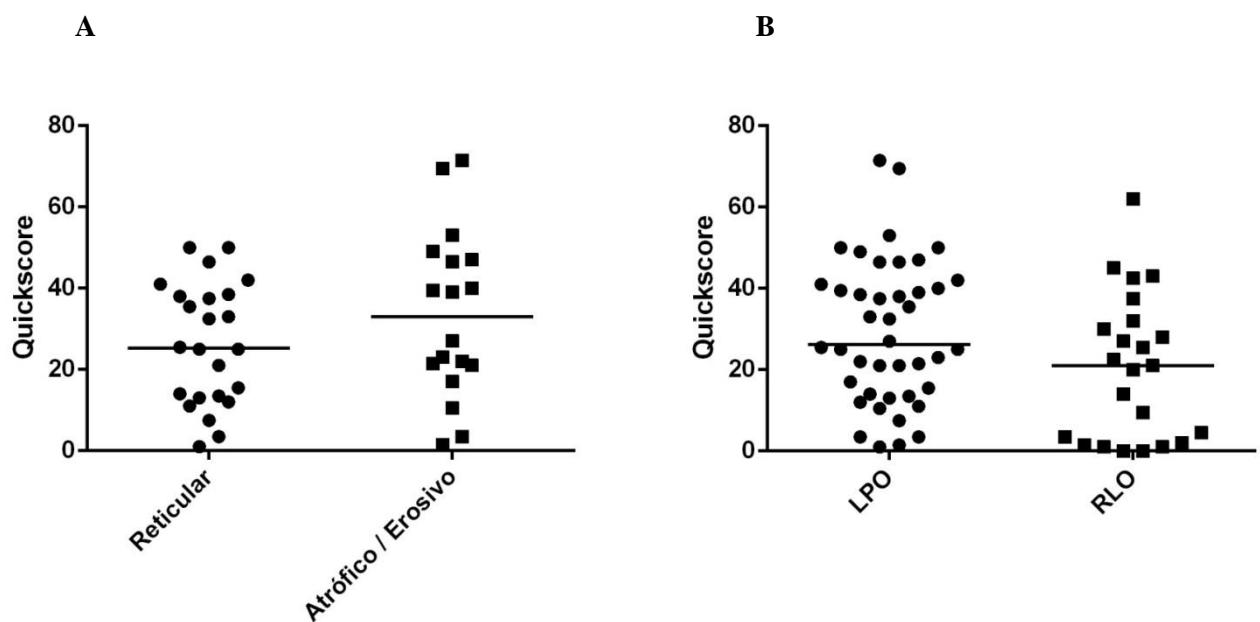
Reatividade para Ki-67 foi encontrada como marcação nuclear, evidente de forma mais comum nas células basais, mas também eventualmente em células parabasais do epitélio, conforme ilustrado na Figura 6. Nenhuma diferença significativa foi verificada entre as duas formas do LPO, ou entre LPO e RLO, como apresentado no Gráfico 3.

Figura 6 – Imagens representativas da reatividade imuno-histoquímica para Ki-67 em amostras de líquen plano oral reticular (A), líquen plano atrófico/erosivo (B), e reação liquenóide oral (C). Técnica de estreptavidina-biotina-peroxidase, ampliação original de 400×.



Fonte: A autora.

Gráfico 5 – Reatividade imuno-histoquímica para Ki-67, avaliada pelo número de células basais e parabasais reativas, entre LPO reticular x atrófico/erosivo ( $p = 0,25$ , teste  $U$  de Mann-Whitney), e entre LPO e RLO ( $p = 0,06$ , teste  $U$  de Mann-Whitney). A barra horizontal corresponde à mediana de cada grupo de lesões.



## 6 DISCUSSÃO

Durante as últimas décadas, a maioria dos estudos envolvendo LPO e RLO buscaram compreender melhor os fatores desencadeadores dessas lesões e os mecanismos envolvidos na patogênese das mesmas, devido à importância e a prevalência delas (CÓRDOVA; RUBIO; ECHEVARRÍA, 2014; PAYERAS et al., 2013; ROOPASHREE et al., 2010; SRINIVAS et al., 2011). Muitos autores também procuraram identificar possíveis diferenças clínicas e histopatológicas que facilitassem o diagnóstico diferencial entre LPO e RLO (VAN DER MEIJ; VAN DER WAAL, 2003; VAN DER WAAL, 2009). O presente estudo teve como objetivo avaliar a expressão imuno-histoquímica de moléculas relacionadas ao estresse oxidativo e à proliferação celular, ou seja, processos envolvidos na patogênese do LPO e das RLOs, a fim de auxiliar clínicos e patologistas no diagnóstico diferencial entre as duas lesões orais, bem como comparar as formas reticular e atrófica/erosiva do LPO de forma a melhor compreender os mecanismos relacionados à progressão da doença. Os resultados mostraram diferenças na expressão de MT entre as lesões de LPO e RLO. As formas reticulares e atróficas/erosivas de LPO apresentaram diferença estatística em relação à proteína p16. Finalmente, não foram encontradas diferenças na imunorreatividade para Ki-67 entre as lesões de LPO e RLO, nem entre as formas reticulares e atróficas. Frente aos resultados aqui apresentados, a MT poderia ser um marcador de diagnóstico diferencial entre LPO e RLO. Ainda, com relação às manifestações clínicas de LPO analisadas neste estudo, a proteína p16 poderia ser um marcador diferencial das lesões reticulares e atróficas/erosivas. O estudo dessas moléculas pode também favorecer a melhor compreensão da patogênese dessas doenças.

A expressão de MT em líquen plano, nos compartimentos citoplasmático e nuclear e principalmente nas camadas basal e parabasal do epitélio, foi agora observada de forma semelhante à descrita por outros autores (ALLON et al., 2014). MT está principalmente relacionada com a proteção antioxidante do organismo, além de estar envolvida no metabolismo de metais pesados e em outros processos celulares descritos anteriormente (BELL; VALLEE, 2009; GUMULEC et al., 2014; MATSUURA; TSUKIFUJI; SHINKAI, 1998). Um estudo mais recente, envolvendo 70 pacientes com diagnóstico de LPO, investigou a presença de MT e caspase-2, marcadores anti e pró-apoptose, que foram expressas no epitélio e no infiltrado inflamatório dessas lesões. A expressão de MT no epitélio foi significativamente maior em pacientes com lesões brancas de LP do que em pacientes com as formas atróficas e erosivas (ALLON et al., 2014). Embora tenha sido observada maior

expressão de MT nas lesões reticulares do que nas lesões vermelhas, não foi encontrada diferença estatística significativa entre as duas formas de LPO analisadas no presente estudo.

A marcação de Ki-67 foi vista somente no núcleo das células basais e parabasais, concordando com outros estudos disponíveis (ACAY et al., 2006; GONZÁLEZ-MOLES et al., 2006; MATTILA; ALANEN; SYRJÄNEN, 2007). Por fim, a proteína p16 apresentou marcações no núcleo e citoplasma das células basais e parabasais, de forma semelhante aos resultados descritos anteriormente (MONTEBUGNOLI et al., 2014; POOMSAWAT et al., 2011; SALEHINEJAD et al., 2014). Ki-67 e p16 são moléculas essencialmente relacionadas à proliferação celular e ao ciclo celular (ACAY et al., 2006; MONTEBUGNOLI et al., 2011; SALEHINEJAD et al., 2014; VAN DIEST; BRUGAL; BAAK, 1998; WANG et al., 2009; WANGSA et al., 2008). Alta expressão de Ki-67 está relacionada com maior gravidade das lesões neoplásicas, ou com maior risco de transformação maligna de lesões cancerizáveis (PIATTELLI et al., 2002). Por outro lado, aumento da expressão de p16 leva à inibição do ciclo celular para que possíveis danos ao DNA sejam reparados reduzindo as chances de ocorrência de carcinogênese (AKÇAY; BASHIROV; TÜZMEN, 2015). Foi encontrada diferença estatística na marcação de p16 entre as lesões reticulares e atróficas/erosivas, sendo que a segunda forma apresentou maior reatividade para a proteína, sugerindo menor risco de transformação maligna em relação a primeira. De acordo com os resultados obtidos neste estudo para o antígeno p16 e dados já publicados (MONTEBUGNOLI et al., 2011), pode-se afirmar que as células epiteliais de lesões atróficas/erosivas de LPO estão em maior atividade proliferativa em relação às células da forma reticular, possivelmente devido a maior agressão ao epitélio pelos linfócitos T citotóxicos, que levam à apoptose de queratinócitos basais e, consequentemente, aumentam a taxa de proliferação epitelial. Além do aumento da taxa de proliferação celular, a forma atrófica/erosiva apresenta espessura do epitélio reduzida quando comparada com a lesão reticular, mostrando que a forma erosiva compreende um estágio ativo da doença (KARATSAIDIS et al., 2003).

De forma similar aos resultados obtidos neste estudo para a expressão do antígeno Ki-67, Acay et al. (2006) avaliaram o potencial de proliferação celular em pacientes com LPO e RLO por meio da expressão imuno-histoquímica de Ki-67. Embora mais da metade das células tenham mostrado marcação positiva para o antígeno, não houve diferença estatística significativa entre os dois grupos. Da mesma forma, González-Moles et al. (2006) avaliaram pacientes com LPO e observaram aumento da taxa de proliferação nas células epiteliais, sendo que a maioria dos casos (95,7%) apresentou imunomarcação positiva para Ki-67 na camada basal. A alta expressão desse marcador, mostrando o aumento da proliferação celular,

em LPO pode ocorrer devido à liberação de citocinas e mediadores inflamatórios por células inflamatórias ou pelos queratinócitos que foram danificados pela infiltração das células mononucleares (ACAY et al., 2006; LIU et al., 2010; MATTILA; AHLFORS; SYRJÄNEN, 2011).

Poomsawat et al. (2011) investigaram a expressão da proteína p16 em 23 casos de LPO e 10 amostras de mucosa normal. Imunomarcação positiva de p16 foi detectada em 65,2% dos casos, sendo显著mente maior do que em mucosa normal, sugerindo que essa superexpressão confirme o potencial maligno do LPO (POOMSAWAT et al., 2011). Salehinejad et al. (2014) investigaram o potencial da proteína p16 na detecção de carcinogênese comparando casos de LPO e carcinoma epidermóide oral, por meio de estudo imuno-histoquímico da expressão de p16. Não houve marcação positiva nos casos de carcinoma e apenas quatro (26,7%) dos 15 casos de LPO apresentaram expressão da molécula. Sugere-se que a imunomarcação positiva da proteína em algumas amostras de LPO pode estar relacionada à inflamação tecidual e, portanto, não se pode predizer o risco de progressão para a carcinogênese nessas lesões (SALEHINEJAD et al., 2014). Da mesma forma, Montebugnoli et al. (2014) avaliaram a possível relação entre a expressão de p16 e a presença do papiloma vírus humano (HPV), também considerado um fator de risco para câncer de boca, em pacientes com LPO. Os resultados obtidos mostraram que não existe correlação entre a expressão de p16 e a presença de HPV no LPO (MONTEBUGNOLI et al., 2014). A baixa expressão de p16 encontrada nos dois grupos avaliados neste estudo estão de acordo com trabalhos publicados anteriormente que concluem que essa molécula não poderia ser usada como um marcador útil na detecção de carcinogênese oral, tampouco na diferenciação entre LPO e RLO já que não foram encontradas diferenças estatísticas significativas (MONTEBUGNOLI et al., 2014; SALEHINEJAD et al., 2014). Os resultados para p16 obtidos neste estudo, embora significativos entre as lesões de LPO, não permitiram afirmar ou negar que essa proteína funcione como um marcador de transformação maligna da doença.

Em relação às limitações do presente estudo, é possível que os critérios de diagnóstico possam ter selecionado algum caso que não deveria ter entrado na seleção se considerarmos que os principais critérios de inclusão dos casos de RLO consistiram nas seguintes características clínica e histológica: lesões unilaterais e infiltrado inflamatório profundo. Sem a confirmação da presença de restaurações metálicas, principalmente de amálgama, ou de outros fatores incitantes, e utilizando somente o critério de lesões únicas não se pode confirmar, de forma absoluta, o diagnóstico de RLO. Porém, como já discutido anteriormente,

a presença de infiltrado inflamatório profundo no tecido conjuntivo é uma característica histológica de RLO e incomum em casos de LPO, o que sugere a seleção adequada dos casos (AMINZADEH; JAHANSHAH; AHMADI, 2013; KAMATH; SETLUR; YERLAGGUDA, 2015; THORNHILL et al., 2006).

O número de casos avaliados no presente estudo, compreendendo 65 pacientes, foi bastante semelhante a outros trabalhos já publicados sobre LPO e RLO (GONZÁLEZ-MOLES et al., 2006; MATTILA; ALANEN; SYRJÄNEN, 2007) e possibilitou a obtenção de resultados significativos entre as lesões e as moléculas de interesse.

O antígeno MT utilizado neste estudo (Clone E9, DAKO, Carpinteria, USA) foi o mesmo usado no único trabalho disponível que também investigou a expressão de MT em LPO (ALLON et al., 2014). Para o antígeno Ki-67, tem sido utilizado o clone MIB-1 de diferentes fabricantes na maioria dos trabalhos avaliados neste estudo (ACAY et al., 2006; GONZÁLEZ-MOLES et al., 2006; HIROTA et al., 2002; KARATSAIDIS et al., 2003; MATTILA; ALANEN; SYRJÄNEN, 2007), portanto nenhum outro trabalho utilizou o mesmo anticorpo deste estudo. O anticorpo anti-p16 avaliado neste estudo foi diferente de outros trabalhos que também avaliaram a expressão dessa proteína em casos de LPO e RLO (MONTEBUGNOLI et al., 2014; POOMSAWAT et al., 2011; SALEHINEJAD et al., 2014).

Em relação a sintomatologia, todos os pacientes acometidos pela forma branca de LPO não descreveram sintomas; por outro lado, todos os pacientes com lesões atróficas/erosivas relataram sintomas como dor e ardência. Com relação aos casos de RLO, a maioria (61%) dos pacientes também declararam sintomas como dor e ardência.

## 7 CONCLUSÃO

Os resultados deste estudo sugerem que a proteína metalotioneína pode ser um marcador útil do diagnóstico diferencial entre LPO e RLO, e que a proteína p16 pode ser um marcador diferencial das lesões reticulares e atróficas/erosivas de LPO.

## REFERÊNCIAS

- ABDOLSAMADI, H. et al. Levels of Salivary Antioxidant Vitamins and Lipid Peroxidation in Patients with Oral Lichen Planus and Healthy Individuals. **Chonnam Medical Journal**, v. 50, p. 58-62, 2014.
- ACAY, R.R. et al. Evaluation of proliferative potential in oral lichen planus and oral lichenoid lesions using immunohistochemical expression of p53 and Ki67. **Oral Oncology**, v. 42, p. 475-480, 2006.
- AGHA-HOSSEINI, F. et al. Oxidative stress status and DNA damage in saliva of human subjects with oral lichen planus and oral squamous cellcarcinoma. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 41, n. 10, p. 736-740, 2012.
- AKÇAY, Nİ.; BASHIROV, R.; TÜZMEN, Ş. Validation of signalling pathways: Case study of the p16-mediated pathway. **Journal of Bioinformatics and Computational Biology**, v. 13, p. 1550007, 2015.
- AL-HASHIMI, I. et al. Oral lichen planus and oral lichenoid lesions: diagnostic and therapeutic considerations. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontontology**, v. 103, p. S25.e1-S25.e12, 2007.
- ALLON, I. et al. Metallothionein, a marker of antiapoptosis, is associated with clinical forms of oral lichen planus. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, v. 43, p. 728-733, 2014.
- AMINZADEH, A.; JAHANSHAHİ, G.; AHMADI, M. A retrospective comparative study on clinico-pathologic features of oral lichen planus and oral lichenoid lesions. **Dental Research Journal**, v. 10, p. 168-172, 2013.
- ARORA, S.K. et al. Lichen Planus: A Clinical and Immuno-Histological Analysis. **Indian Journal of Dermatology**, v. 59, p. 257-261, 2014.
- ARREAZA, A.J.; RIVERA, H.; CORRENTI, M. Expression of COX-2 and bcl-2 in oral lichen planus lesions and lichenoid reactions. **Ecancer Medical Science**, v. 8, p. 411, 2014.
- BABULA, P. et al. Mammalian metallothioneins: properties and functions. **Metalomics**, v. 4, p. 739-750, 2012.
- BELL, S.G.; VALLEE, B.L. The metallothionein/thionein system: an oxidoreductive metabolic zinc link. **ChemBioChem**, v. 10, p. 55–62, 2009.
- BERGER, T.G. Lichen Planus. **JAMA Dermatology**, v. 151, p. 356, 2015.

- BERMEJO-FENOLL, A. et al. A retrospective clinic pathological study of 550 patients with oral lichen planus in southeastern Spain. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 39, p. 491-496, 2010.
- BOLIN, A.P. et al. Changes in lymphocyte oxidant/antioxidant parameters after carbonyl and antioxidant exposure. **International Immunopharmacology**, v. 14, p. 690-697, 2012.
- BOLOGNA-MOLINA, R et al. Comparison of the value of PCNA and Ki-67 as markers of cell proliferation in ameloblastic tumors. **Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 18, p. 174-179, 2013.
- BOMBECCARI, G.P. et al. Oral lichen planus and malignant transformation: a longitudinal cohort study. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontics**, v. 112, p. 328-334, 2011.
- BUDIMIR, V. et al. Oral lichen planus – retrospective study of 563 Croatian patients. **Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal**, 2014. Não paginado. No prelo.
- BURGDORF, W.H.; PLEWIG, G. Who described Civatte bodies? **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 41, p. 340-346, 2014.
- CARBONE, M. et al. Course of oral lichen planus: a retrospective study of 808 northern Italian patients. **Oral diseases**, v. 15, p. 235-243, 2009.
- CARROZZO, M; THROPE, R. Oral lichen planus: a review. **Minerva Stomatol**, v. 58, p. 519-537, 2009.
- CASPARIS, S. et al. Oral lichen planus (OLP), oral lichenoid lesions (OLL), oral dysplasia, and oral cancer: retrospective analysis of clinicopathological data from 2002–2011. **Oral & Maxillofacial Surgery**, 2014. Não paginado. No prelo.
- CHEN, A.F. et al. Free radical biology of the cardiovascular system. **Clinical Science**, v. 123, p. 73-91, 2012.
- CÓRDOVA, P.; RUBIO, A.; ECHEVERRÍA, P. Oral lichen planus: A look from diagnosis to treatment. **Journal of Oral Research**, v. 3, p. 62-67, 2014.
- CRINCOLI, V. et al. Oral lichen planus: update on etiopathogenesis, diagnosis and treatment. **Immunopharmacology and Immunotoxicology**, v. 33, p. 11-20, 2011.
- DA SILVA FONSECA, L.M.; DO CARMO, M.A. Identification of the AgNORs, PCNA and ck16 proteins in oral lichen planus lesions. **Oral Diseases**, v. 7, p. 344-348, 2001.

DE ROSSI, S.S.; CIARROCA, K. Oral Lichen Planus and Lichenoid Mucositis. **Dental Clinics of North America**, v. 58, p. 299-313, 2014.

DE SOUSA, F.A.C. et al. Comparative analysis of cell proliferation ratio in oral lichen planus, epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma. **Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 14, p. e563-567, 2009.

DETRE, S; SACLANIJOTTI, G; DOWSETT, M. A "quickscore" method for immunohistochemical semiquantitation: validation for oestrogen receptor in breast carcinomas. **Journal of Clinical Pathology**, v. 48, p. 876-878, 1995.

DRAGOMIR, L.P. et al. p53, p16 and Ki67 immunoexpression in oral squamous carcinomas. **Romanian Journal of Morphology and Embryology**, v. 53, p. 89-93, 2012.

DROGE, W. Free radicals in the physiological control of cell function. **Physiological Reviews**, v. 82, p. 47-95, 2002.

EISEN, D. The clinical features, malignant potential and systemic associations of oral lichen planus: A study of 723 patients. **Journal of the American Academy of Dermatology**, v. 46, p. 207-214, 2002.

ERGUN, S. et al. Evaluation of oxidative stress and antioxidant profile in patients with oral lichen planus. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 40, p. 286-293, 2011.

FANG, K.C. et al. Dog mast cell alpha-chymase activates progelatinase B by cleaving the Phe88-Gln89 and Phe91-Glu92 bonds of the catalytic domain. **Journal of Biological Chemistry**, v. 272, p 25628-25635, 1997.

FARHI, D.; DUPIN, N. Pathophysiology, etiologic factors, and clinical management of oral lichen planus, part I: facts and controversies. **Clinics in Dermatology**, v. 28, p. 100-108, 2010.

FELIX, A.S. et al. Cell Cycle Protein Expression in a Population Based Study of Ovarian and Endometrial Cancers. **Frontiers in Oncology**, v. 5, 2015. Não paginado. No prelo.

GONÇALVES, L.M.; CRUZ, M. C. F. N.; BEZERRA JÚNIOR, J. R. S. Clinical evaluation of oral lesions associated with dermatologic diseases. **Anais Brasileiros de Dermatologia**, v. 85, p. 150-156, 2010.

GONZÁLES-MOLES, M.A. et al. Cell cycle regulating mechanisms in oral lichen planus: Molecular bases in epithelium predisposed to malignant transformation. **Archives of Oral Biology**, v. 51, p. 1093-1103, 2006.

- GONZÁLEZ-MOLES, M.A.; SCULLY, C.; GIL-MONTOYA, J.A. Oral lichen planus: controversies surrounding malignant transformation. **Oral Diseases**, v. 14, p. 229-243, 2008.
- GREANEY, L. et al. Why should I follow up my patients with oral lichen planus and lichenoid reactions? **British Journal of Oral & Maxillofacial Surgery**, v. 52, p. 291-293, 2014.
- GUMULEC, J. et al. Metallothionein - immunohistochemical cancer biomarker: a meta-analysis. **PLoS One**, v. 9, p. e85346, 2014.
- HANAHAN, D.; WEINBERG, R.A. Hallmarks of cancer: the next generation. **Cell**, v. 144, p. 646-674, 2011.
- HAQ, F.; MAHONEY, M.; KOROPATNICK, J. Signaling events for metallothionein induction. **Mutation Research**, v. 533, p. 211-226, 2003.
- HE, X.; MA, Q. Induction of metallothionein I by arsenic via metal-activated transcription factor 1: critical role of C-terminal cysteine residues in arsenic sensing. **The Journal of Biological Chemistry**, v. 284, p. 12609-12621, 2009.
- HIROTA, M. et al. Cell proliferation activity and the expression of cell cycle regulatory proteins in oral lichen planus. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 31, p. 204-212, 2002.
- IANNITTI, T.; ROTTIGNI, V.; PALMIERI, B. Role of free radicals and antioxidant defences in oral cavity-related pathologies. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 41, p. 649-661, 2012.
- ISMAIL, S.B.; KUMAR, S.K.S.; ZAIN, R.B. Oral lichen planus and lichenoid reactions; etiopathogenesis, diagnosis, management and malignant transformation. **Journal of Oral Science**, v. 49, p. 89-106, 2007.
- JIANG, F.; ZHANG, Y.; DUSTING, G.J. NADPH oxidase-mediated redox signaling: roles in cellular stress response, stress tolerance, and tissue repair. **Pharmacological Reviews**, v. 63, p. 218-242, 2011.
- KAMATH, V.; SETLUR, K.; YERLAGUDDA, K. Oral lichenoid lesions - A review and update. **Indian Journal of Dermatology**, v. 60, p. 102, 2015.
- KANNAN, S. et al. Expression of p53 in leukoplakia and squamous cell carcinoma of the oral mucosa: correlation with expression of Ki67. **Journal of Clinical Pathology: Molecular Pathology**, v.49, p. M170-M175, 1996.

KARATSAIDIS, A. et al. Erythematous and reticular forms of oral lichen planus and oral lichenoid reactions differ in pathological features related to disease activity. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 32, p. 275-281, 2003.

KLAUNIG, J.E.; KAMENDULIS, L.M. The role of oxidative stress in carcinogenesis. **Annual Review of Pharmacology and Toxicology**, v. 44, p. 239-267, 2004.

KOHEN, R.; NYSKA, A. Oxidation of Biological Systems: Oxidative Stress Phenomena, Antioxidants, Redox Reactions, and Methods for Their Quantification. **Toxicologic Pathology**, v. 30, p. 620-650, 2002.

KRUPAA, R.J. et al. Oral lichen planus: An overview. **Journal of Pharmacy & Bioallied Sciences**, v. 7, p. S158-161, 2015.

LAVANYA, N. et al. Oral lichen planus: An update on pathogenesis and treatment. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, v. 15, p. 127-132, 2011.

LEE, J.J. et al. Higher expressions of p53 and proliferating cell nuclear antigen (PCNA) in atrophic oral lichen planus and patients with areca quid chewing. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v. 99, p. 471-478, 2005.

LOPEZ-JORNET, P.; MARTINEZ-CANOVAS, A.; PONS-FUSTER, A. Salivary biomarkers of oxidative stress and quality of life in patients with oral lichen planus. **Geriatrics & Gerontology International**, v. 14, p. 654-659, 2014.

LORENZINI, G. et al. A comparative immunohistochemical and immunophenotypical study on lymphocytes expression in patients affected by oral lichen planus. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 42, p. 642-647, 2013.

LUGRIN, J. et al. The role of oxidative stress during inflammatory processes. **Biological Chemistry**, v. 395, p. 203-230, 2014.

MAGA, G. et al. Replication protein A and proliferating cell nuclear antigen coordinate DNA polymerase selection in 8-oxo-guanine repair. **Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America**, v. 105, p. 20689-20694, 2008.

MARRI, V.; RICHENER, H. Immune response, oxidative stress and dietary antioxidants in great tit nestlings. **Comparative Biochemistry and Physiology**, v. 179, p. 192-196, 2015.

MATSUURA, C.; TSUKIFUJI, R.; SHINKAI, H. Metallothionein and p-Akt proteins in oral dysplasia and in oral squamous cell carcinoma: an immunohistochemical study. **British Journal of Dermatology**, v. 138, p. 1043-1045, 1998.

MATTILA, R.; AHLFORS, E.; SYRJÄNEN, S. CD27 and CD38 lymphocytes are detected in oral lichen planus lesions. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v. 111, p. 211-217, 2011.

MATTILA, R.; ALANEN, K.; SYRJÄNEN, S. Immunohistochemical study on topoisomerase IIalpha, Ki-67 and cytokeratin-19 in oral lichen planus lesions. **Archives of Dermatological Research**, v. 298, p. 381-388, 2007.

MAZZARELLA, N. et al. Matrix metalloproteinase gene expression in oral lichen planus: erosive vs. reticular forms. **Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology**, v. 20, p. 953-957, 2006.

MILLER, R.T. et al. Blocking of endogenous avidin-binding activity in immunohistochemistry: the use of skim milk as an economical and effective substitute for commercial biotin solutions. **Applied Immunohistochemistry & Molecular Morphology**, v. 7, p. 63-65, 1999.

MONTEBUGNOLI, L. et al. Immunohistochemical expression of p16(INK4A) protein in oral lichen planus. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, v. 112, p. 222-227, 2011.

MONTEBUGNOLI, L. et al. p16(INK4) expression is not associated with human papillomavirus in oral lichen planus. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology**, v. 118, p. 694-702, 2014.

NATHAN, C.; CUNNINGHAM-BUSSEL, A. Beyond oxidative stress: an immunologist's guide to reactive oxygen species. **Nature Reviews Immunology**, v. 13, p. 349-361, 2013.

NEVILLE, B.W. et al. Líquen Plano. **Patologia Oral e Maxilofacial**. Rio de Janeiro: Elsevier, 2009. Cap. 16, p. 784-790.

PARKER, A.R.; ESHLEMAN, J.R. Human MutY: gene structure, protein functions and interactions, and role in carcinogenesis. **Cellular and Molecular Life Sciences**, v. 60, p. 2064-2083, 2003.

PIATTELLI, A. et al. Prevalence of p53, bcl-2, and Ki67 immunoreactivity and of apoptosis in normal oral epithelium and in premalignant and malignant lesions of the oral cavity. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 60, p. 532-540.

PICCINI, M.P. et al. Potential pathogenetic role of Th17, Th0, and Th2 cells in erosive and reticular oral lichen planus. **Oral diseases**, 2013. Não paginado.

PIMENTA, F.J.G.S.; PINHEIRO, M.G.R.; GOMEZ, R.S. Expression of hMSH2 protein of the human mismatch repair system in oral lichen planus. **International journal of medical sciences**, v. 1, p. 146-151, 2004.

- POOMSAWAT, S. et al. Overexpression of cdk4 and p16 in oral lichen planus supports the concept of premalignancy. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 40, p. 294-299, 2011.
- RAD, M. et al. Correlation between clinical and histopathologic diagnoses of oral lichen planus based on modified WHO diagnostic criteria. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontics**, v. 107, p. 796-800, 2009.
- RADWAN-OCZKO, M. Topical application of drugs used in treatment of oral lichen planus lesions. **Advances in Clinical and Experimental Medicine**, v. 22, p. 893-898, 2013.
- RANGANATHAN, K.; KAVITHA, R. Proliferation and apoptosis markers in oral submucous fibrosis. **Journal of Oral and Maxillofacial Pathology**, v. 15, p. 148-153, 2011.
- REUTER, S. et al. Oxidative stress, inflammation, and cancer: how are they linked? **Free radical biology & medicine**, v. 49, p. 1603-1616, 2010.
- RIVERA, C.; VENEGAS, B. Histological and molecular aspects of oral squamous cell carcinoma (Review). **Oncoly Letters**, v. 8, p. 7-11, 2014.
- ROOPASHREE, M.R. et al. Pathogenesis of oral lichen planus – a review. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 39, n. 10, p. 729-734, 2010.
- RUBACI, A.H. et al. The roles of matrix metalloproteinases-2, -7, -10 and tissue inhibitor of metalloproteinase-1 in the pathogenesis of oral lichen planus. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 41, n. 9, p. 689-696, 2012.
- SALEHINEJAD, J. et al. Immunohistochemical expression of p16 protein in oral squamous cell carcinoma and lichen planus. **Annals of Diagnostic Pathology**, v. 18, p. 210-213, 2014.
- SARUHANOĞLU, A. et al. Evaluation of micronuclear frequencies in both circulating lymphocytes and buccal epithelial cells of patients with oral lichen planus and oral lichenoid contact reactions. **Oral Diseases**, v. 20, p. 521-527, 2014.
- SCULLY, C.; CARROZZO, M. Oral mucosal disease: Lichen planus. **British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, v. 46, p. 15-21, 2008.
- SHEN, Z.Y. et al. A retrospective clinicopathological study on oral lichen planus and malignant transformation: Analysis of 518 cases. **Medicina Oral, Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 17, p. e943-947, 2012.
- SHIRZAD, A. et al. Salivary Total Antioxidant Capacity and Lipid Peroxidation in Patients with Erosive Oral Lichen Planus. **Journal of Dental Research, Dental Clinics, Dental Prospects**, v. 8, p.35-39, 2014.

SOUSA, F.A.C.G.; ROSA, L.E.B. Líquen Plano Bucal: considerações clínicas e histopatológicas. **Revista Brasileira de Otorrinolaringologia**, v. 74, p. 284-292, 2008.

SRINIVAS, K. et al. Oral lichen planus: review on etiopathogenesis. **National Journal of Maxillofacial Surgery**, v. 2, p. 15-16, 2011.

SUGERMAN, P.B. et al. Oral lichen planus. **Clinics in Dermatology**, v. 18, p. 533-539, 2000.

SUGERMAN, P.B. et al. The pathogenesis of oral lichen planus. **Critical Reviews in Oral Biology and Medicine**, v. 13, p. 350-365, 2002.

THORNHILL, M.H. et al. The role of histopathological characteristics in distinguishing amalgam-associated oral lichenoid reactions and oral lichen planus. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 35, p. 233-240, 2006.

UPADHYAY, R.B. et al. Oxidative stress and antioxidant defense in oral lichen planus and oral lichenoid reaction. **Scandinavian Journal of Clinical & Laboratorial Investigation**, v.70, p. 225-228, 2010.

VALKO, M. et al. Role of oxygen radicals in DNA damage and cancer incidence. **Molecular and Cellular Biochemistry**, v. 266, p. 37-56, 2004.

VALKO, M. et al. Free radicals and antioxidants in normal physiological functions and human disease. **International Journal of Biochemistry & Cell Biology**, v. 39, p. 44-84, 2007.

VAN DER MEIJ, E.H.; SCHEPMAN, K.P.; VAN DER WAAL, I. The possible premalignant character of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: A prospective study. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology Oral Radiology Endodontology**, v. 96, p. 164-171, 2003.

VAN DER MEIJ, E.H.; 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. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 32, p. 507-512, 2003.

VAN DER WAAL, I. Oral lichen planus and oral lichenoid lesions; a critical appraisal with emphasis on the diagnostic aspects. **Medicina Oral Patología Oral y Cirugía Bucal**, v. 14, p. E310-E314, 2009.

VAN DIEST, P.J.; BRUGAL, G.; BAAK, J.P.A. Proliferation markers in tumors: interpretation and clinical value. **Journal of Clinical Pathology**, v. 51, p. 716-724, 1998.

VLKOVÁ, B. et al. Salivary markers of oxidative stress in patients with oral premalignant lesions. **Archives of Oral Biology**, v. 57, p. 1651-1656, 2012.

VISWANATHAN, V. et al. Apoptotic index and proliferative index in premalignant and malignant squamous cell lesions of the oral cavity. **Journal of International Oral Health**, v. 7, p. 40-43, 2015.

WANG, Z. et al. RACK1, an excellent predictor for poor clinical outcome in oral squamous carcinoma, similar to Ki67. **European Journal of Cancer**, v. 45, p. 490-496, 2009.

WANGSA, D. et al. Ki67 expression predicts locoregional recurrence in stage I oral tongue carcinoma. **British Journal of Cancer**, v. 99, p. 1121-1128, 2008.

WATANABE, S. et al. Analysis of cell proliferation and pattern of invasion in oral squamous cell carcinoma. **J Oral Sci**, v. 52, p. 417-424, 2010.

WHO Collaborating Centre for Oral Precancerous Lesions. Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. **Oral Surgery Oral Medicine Oral Pathology**, v. 46, p. 518-539, 1978.

YE, Z.W. et al. Oxidative stress, redox regulation and diseases of cellular differentiation. **Biochimica et Biophysica Acta**, 2014. Não paginado. No prelo.

YERUSHALMI, R. et al. Ki67 in breast cancer: prognostic and predictive potential. **The Lancet Oncology**, v. 11, p. 174-183, 2010.

ZARGARAN, M. et al. Suitability/Unsuitability of Cell Proliferation as an Indicator of Malignant Potential in Oral Lichen Planus: an Immunohistochemical Study. **Asian Pacific Journal of Cancer Prevention**, v. 14, p. 6979-6983, 2013.

ZHOU, X.J. et al. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in oral lichen planus. **Journal of Cutaneous Pathology**, v. 28, p. 72-82, 2001.

ZHOU, X.J. et al. Intra-epithelial CD8+ T cells and basement membrane disruption in oral lichen planus. **Journal of Oral Pathology & Medicine**, v. 31, p. 23-27, 2002.