

Juliana Massote Caldeira Brant

**Apoptose na resposta inflamatória e nas lesões epiteliais no
líquen plano bucal dos tipos reticular e erosivo**

**Belo Horizonte
Faculdade de Medicina
Universidade Federal de Minas Gerais
2008**

Juliana Massote Caldeira Brant

**Apoptose na resposta inflamatória e nas lesões epiteliais no
líquen plano bucal dos tipos reticular e erosivo**

Dissertação apresentada ao curso de Pós-Graduação em Patologia, da Faculdade de Medicina da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Mestre.

Orientador: Prof. Anilton César Vasconcelos

Co-orientadora: Prof^a. Helenice A. M. Grandinetti

**Belo Horizonte
Faculdade de Medicina
Universidade Federal de Minas Gerais
2008**

Dedico este trabalho aos meus pais, Oly e Maria de Fátima, pelo amor e incentivo, ao meu marido Roberto, pelo apoio incondicional, ao meu filho Lucas, razão da minha vida, aos meus irmãos Henrique e Fernanda pela credibilidade e aos meus familiares e amigos por toda força.

AGRADECIMENTOS

-A Deus, pela vida e pelas oportunidades a mim concedidas.

-Ao Prof. Dr. Anilton César Vasconcelos, pela oportunidade, pelo aprendizado, pela amizade, pela orientação e por ser esta pessoa humana, aberta e acessível, obrigada.

-À Prof^ª. Dra. Helenice de Andrade Marigo Grandinetti, pela prestimosa ajuda na elaboração do projeto, seleção do material e pela boa vontade e cooperação na execução do trabalho.

-À Prof^ª. Franca Arenare Jeunon, pela orientação dada no momento em que precisei.

-Ao Prof. Dr. Pedro Alves Campos, pelo interesse e disposição em ajudar.

-A todos os integrantes do Laboratório de Patologia Bucal da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais, em especial à Reni e à Goretti, pela disponibilidade e ajuda na obtenção das amostras necessárias para este estudo.

-Ao técnico de laboratório Rubinho, pela dedicação com que realizou os cortes do material a ser utilizado ao longo de toda a pesquisa.

-À técnica de laboratório Soraia Silva, pela ajuda e pelos inúmeros “papos cabeça”.

-A toda a equipe do laboratório de Apoptose, pelo apoio; à Janaína, Helen, Karina pela cooperação em vários momentos; à Paulinha por se mostrar tão prestativa e amiga; e em especial à Lu pela amizade e companheirismo nessa e em outras longas caminhadas juntas.

-À minha mãe e ao meu pai, pela força, pelo apoio e pelo amor incondicional.

-Aos meus irmãos por sempre ficarem felizes com as minhas conquistas.

-Ao meu marido Beto pelo amor, companheirismo, amizade e compreensão nos momentos mais difíceis. TE AMO.

-Ao meu filho Lucas por fazer parte da minha vida!

-A todos os meus familiares e amigos pelo interesse e torcida, em especial à minha amiga Rose por sempre me incentivar e por depositar tanta credibilidade em mim.

-A todos os professores do curso de pós-graduação em Patologia Geral, pela contribuição na minha formação acadêmica.

-Ao CNPq - Conselho Nacional de Desenvolvimento Científico e Tecnológico, pela concessão da bolsa de estudos, essencial para o desenvolvimento deste trabalho.

**“Ainda que eu falasse a língua dos
homens e dos anjos, sem amor eu nada
seria. Ainda que eu conhecesse todos
os mistérios da ciência, sem amor eu
nada seria”.**

(Adaptado: Coríntios - I, 1)

RESUMO

O Líquen Plano Bucal (LPB) é uma doença inflamatória crônica cujas formas clínicas mais comuns são os tipos reticular e erosivo. Acredita-se que os mecanismos imunológicos sejam fundamentais para a iniciação e perpetuação da inflamação no LPB e que a apoptose participe na desestruturação das células da camada basal com a destruição de ceratinócitos. O objetivo deste estudo foi avaliar a participação da apoptose nas alterações epiteliais e subepiteliais encontradas nos tipos reticular e erosivo de LPB. Quinze amostras de LPB de cada tipo, reticular e erosivo, além de 10 amostras de mucosa saudável foram coletadas e processadas histologicamente. Quantificou-se morfometricamente a apoptose no epitélio e no infiltrado inflamatório, avaliou-se a espessura média do epitélio, a porcentagem de ceratinócitos “livres” e o número de células presentes no infiltrado inflamatório. A reação de TUNEL e imunohistoquímica com *M30 CytoDEATH* foram usadas para validação dos critérios morfológicos. A apoptose no epitélio nas lesões de LPB erosivo foi significativamente maior que no tipo reticular e ambas as formas de LPB apresentaram mais apoptose que o controle. A espessura epitelial foi maior no controle em relação ao tipo reticular e maior nesse em relação ao tipo erosivo, demonstrando assim, que a apoptose participa no adelgaçamento do epitélio nas lesões de LPB. A apoptose no infiltrado inflamatório foi menor no tipo erosivo que no reticular. Já o percentual de ceratinócitos “livres” e a celularidade no infiltrado inflamatório se mostraram maiores no tipo erosivo comparado ao tipo reticular. A maior ocorrência de apoptose no infiltrado inflamatório subepitelial parece associar-se com menor celularidade no infiltrado inflamatório subepitelial e com menor quantidade de ceratinócitos livres e menor apoptose no epitélio.

Palavras-Chave: Líquen Plano Bucal, Linfócitos T, Apoptose, Infiltrado Inflamatório

ABSTRACT

Oral Lichen Planus (OLP) is a chronic inflammatory disease with different clinical types. Reticular and erosive forms are the most common. Although several aspects are still not completely clear, it is believed that the immunological mechanisms are basic for the initiation and perpetuation of the inflammation in the OLP and that apoptosis may participate in disrapture of the basal layer with the appearance of free keratinocytes. The objective of this study was to approach the role of apoptosis in epithelia and subepithelial infiltrates, in reticular and erosive forms of OLP. Fifteen samples of OLP of each type, reticular and erosive, beyond 10 samples of healthful mucosa were collected and processed. Epithelial thickness and apoptosis in epithelia and in the subepithelial infiltrate was quantified morphometrically, as well as free keratinocytes and the cellularity of the inflammatory infiltrates. TUNEL and M30 CytoDEATH were used for validation of the morphological criteria. Epithelial apoptosis in the erosive OLP was significantly more intense than in the reticular type and both forms of OLP presented more apoptosis than the healthy oral mucosa. By the other hand, epithelia was thicker in the control than in OLP, and thicker in the reticular form than in the erosive type. Thus, apoptosis seems to participate in the narrowing of the epithelia in reticular and erosive OLP. Apoptosis in the subepithelial infiltrate, opposed to epithelial apoptosis, was more intense in the reticular than in erosive type. Free keratinocytes and inflammatory cellularity infiltrated were more frequent and intense in the erosive than in the reticular type. The more apoptosis in subepithelial infiltrates, the less inflammatory cellularity, the less epithelial apoptosis and the less free keratinocytes.

Keywords: Oral Lichen Planus, T Lymphocytes, Apoptosis, Inflammatory Infiltrate

LISTA DE FIGURAS

	Página
FIGURA 1 Desenho esquemático ilustrando a mensuração para o cálculo da espessura média do epitélio.....	23
FIGURA 2 Fotomicrografias de LPB do tipo erosivo corado em <i>Shorr</i> (Barra = 10 µm). A) Observa-se a desestruturação da camada basal do epitélio com células em apoptose e corpos apoptóticos contornados por halo hialino (corpos de <i>Civatte</i>) e a presença de intenso infiltrado inflamatório subepitelial. B) Detalhes em maior aumento.....	31
FIGURA 3 Fotomicrografias de LPB do tipo erosivo mostrando reação de TUNEL (Barra = 10 µm). A) Observar marcação positiva para fragmentação do genoma (TUNEL +) nos ceratinócitos basais e parabasais. B) Detalhes em maior aumento).....	32
FIGURA 4 Fotomicrografias de LPB do tipo reticular mostrando reação positiva do <i>M30 CytoDEATH</i> . A) Observar marcação positiva no citoplasma dos ceratinócitos basais e parabasais. B) Detalhes em maior aumento.....	32
FIGURA 5 Fotomicrografias em regiões diferentes de mucosa oral normal mostrando reação negativa do <i>M30 CytoDEATH</i> . Observar ausência de marcação nos ceratinócitos basais e parabasais. A) e B).....	33
FIGURA 6 Fotomicrografias de LPB mostrando reação de TUNEL. A) LPB do tipo erosivo com ceratinócitos “livres” em meio às células do infiltrado inflamatório; e B). LPB do tipo reticular com maior número de células inflamatórias em apoptose.....	34

LISTA DE GRÁFICOS

	Página
GRÁFICO 1	Determinação do número mínimo representativo de campos microscópicos para obtenção do índice apoptótico (IA) no epitélio. 24
GRÁFICO 2	Determinação do número mínimo representativo de campos microscópicos para obtenção do índice apoptótico (IA) no infiltrado inflamatório subepitelial. 24
GRÁFICO 3	Distribuição do índice apoptótico (IA) do epitélio obtido nos grupos controle, reticular e erosivo ($p < 0,0001$). 33
GRÁFICO 4	Avaliação da espessura média do epitélio nos grupos controle, reticular e erosivo ($p < 0,0001$). 34
GRÁFICO 5	Distribuição do índice apoptótico (IA) do infiltrado inflamatório subepitelial nos grupos reticular e erosivo ($p < 0,0001$). 35
GRÁFICO 6	Distribuição da celularidade no infiltrado inflamatório nos grupos reticular e erosivo ($p < 0,0001$). 35
GRÁFICO 7	Distribuição do percentual de ceratinócitos “livres” no infiltrado inflamatório nos grupos reticular e erosivo ($p < 0,0001$). 36
GRÁFICO 8	A).: Correlação negativa entre IA do Epitélio e Espessura Epitelial ($r = -0,6454$; $p = 0,0003$).: e B) Correlação negativa entre os IAs do Epitélio e do Infiltrado Inflamatório ($r = -0,6344$; $p < 0,0001$). 37
GRÁFICO 9	A).: Correlação negativa entre IA e Celularidade do Infiltrado Inflamatório ($r = -0,1833$; $p = 0,0138$) e B).: Correlação positiva entre IA do Epitélio e Celularidade do Infiltrado Inflamatório ($r = 0,2167$; $p = 0,0035$). 37
GRÁFICO 10	Correlação negativa entre IA do Infiltrado Inflamatório e Ceratinócitos livres ($r = -0,5510$; $p < 0,0001$). 37

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

BSA	Do inglês <i>Bovine Serum Albumine</i> – Albumina Sérica Bovina
CASPASE	Do inglês <i>Cysteine ASPartate Cleaving Enzyme</i> - Proteases cisteínicas de ácido aspártico
CV	Coeficiente de Variação
DAB	Diaminobenzidina
DNA	Do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i> - Ácido desoxirribonucleico
H ₂ O ₂	Peróxido de hidrogênio
IA	Índice Apoptótico
ICB/UFMG	Instituto de Ciências Biológicas da Universidade Federal de Minas Gerais
LPB	Líquen Plano Bucal
LPC	Líquen Plano Cutâneo
MMP-9	Matrix de Metaloproteinase-9
PBS	Do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i> - Tampão de salina fosfatada
PUC/MG	Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais
TdT	Do inglês <i>Terminal deoxynucleotidyl Transferase</i> - Transferase terminal de deoxinucleotídeo
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral- α
TUNEL	Do inglês <i>Terminal deoxynucleotidyl Transferase Uridine Nick End Labeling</i> - Marcação <i>in situ</i> da fragmentação do genoma com transferase terminal de deoxinucleotídeo

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	11
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	12
2.1. Líquen Plano Bucal.....	12
<i>2.1.1 Aspectos Clínicos.....</i>	<i>12</i>
<i>2.1.2. Aspectos Histopatológicos.....</i>	<i>14</i>
<i>2.1.3. Patogênese.....</i>	<i>16</i>
2.2. Apoptose.....	17
3. OBJETIVOS.....	21
3.1. Objetivos Gerais.....	21
3.2. Objetivos Específicos.....	21
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	22
4.1. Obtenção das Amostras e Processamento do Material.....	22
4.2. Mensuração da Espessura Média do Epitélio.....	23
4.3. Parâmetros e Estratégia Morfométrica.....	23
4.4. Quantificação do Índice Apoptótico no Epitélio.....	25
4.5. Quantificação do Índice Apoptótico no Infiltrado Inflamatório Subepitelial....	25
4.6. Quantificação do Percentual de Ceratinócitos “Livres” no Infiltrado Inflamatório.....	26
4.7. Quantificação da Celularidade no Infiltrado Inflamatório.....	26
4.8. Validação dos Critérios Morfológicos utilizados para o IA.....	27
<i>4.8.1. Reação de TUNEL.....</i>	<i>27</i>
<i>4.8.2. Imunohistoquímica para o M30 CytoDEATH.....</i>	<i>28</i>
4.9. Análise Estatística.....	30
5. RESULTADOS.....	31
6. DISCUSSÃO.....	38
6. CONCLUSÕES.....	44
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	45

1. INTRODUÇÃO

O Líquen Plano Bucal (LPB) é uma doença de etiologia ainda desconhecida (NEPPELBERG *et al.*, 2007) que tem sido incessantemente investigada, na tentativa de se esclarecer sua patogênese e se estabelecer protocolos menos empíricos de abordagens dos pacientes portadores dessas alterações.

Embora a causa do LPB permaneça no campo especulativo, muitos achados sugerem tratar-se de um distúrbio imunológico (KIM *et al.*, 2006) persistente, mediado por linfócitos, onde os ceratinócitos basais parecem ser os alvos dos linfócitos T. Acredita-se que o fenômeno de apoptose seja um importante mecanismo na destruição das células da camada basal (DEKKER *et al.*, 1997).

Muito pouco se sabe sobre a presença de intensa e persistente infiltração inflamatória subepitelial como a que ocorre no LPB. Numerosos processos podem induzir a persistência do infiltrado de células inflamatórias abaixo da camada epitelial. Alguns autores têm proposto o permanente recrutamento dos linfócitos T no foco da lesão, outros têm relatado mecanismos que inibem a apoptose nos linfócitos T (BASCONES *et al.*, 2006).

Considerando a incidência do LPB na população e sabendo-se que vários aspectos da doença ainda não estão bem esclarecidos, o propósito desse trabalho é avaliar a participação da apoptose nas lesões epiteliais e subepiteliais, procurando identificar uma eventual associação entre as mesmas nos tipos reticular e erosivo de LPB.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Líquen Plano Bucal

2.1.1. Aspectos Clínicos

O Líquen Plano Bucal (LPB) é uma doença inflamatória crônica, de etiologia desconhecida, sendo não contagiosa, recorrente e caracterizada por períodos de exacerbação e remissão. Acomete a pele, a cavidade bucal ou ambos. Os sintomas são passageiros, mas a manifestação clínica da doença bucal pode ser persistente (REGEZI & SCIUBA, 1989; NEVILLE *et al.*, 2004).

O LPB é uma das doenças mais comuns da mucosa bucal em pacientes adultos encontradas nas clínicas de patologia oral (SUGERMAN *et al.*, 2000) podendo afetar qualquer parte da mucosa bucal sendo mais freqüentemente encontrado na mucosa jugal, língua e gengiva (SUGERMAN *et al.*, 2002; EISEN *et al.*, 2005; KARTSAIDES *et al.*, 2007).

A verdadeira prevalência é desconhecida e vários estudos sugerem uma incidência de 1 a 2 % da população geral (FAYYAZI *et al.*, 1999; KARATSAIDES *et al.*, 2004; EISEN *et al.*, 2005). Segundo MONCARZ *et al.* (1993), o LPB representa 9% de todas as lesões brancas da cavidade oral.

O LPB é uma doença da idade adulta e se desenvolve mais comumente entre a quinta e sexta década de vida, é duas vezes mais freqüente em mulheres do que em homens (LODI & AALTOMAA, 1994; EISEN *et al.*, 2005; MAZZARELLA *et al.*, 2006). O LPB em pacientes melanodermas é raríssimo, sendo mais freqüente o Líquen Plano Cutâneo (LPC) (GANDOLFO *et al.*, 2004).

O LPB aparece em diferentes formas clínicas compreendendo as formas popular, reticular (como as estrias de *Wickham*), em placa, erosiva, ulcerativa e bolhosa (LODI & AALTOMAA, 1994; EISEN *et al.*, 2005; MAZZARELLA *et al.*, 2006). As formas clínicas são baseadas na aparência da lesão. Pessoas afetadas freqüentemente desenvolvem lesões de LPB durante um longo período de tempo, podendo durar de meses a anos (HIROTA *et*

al., 2002) e o aparecimento das lesões pode ocorrer de forma isolada ou combinada (KARATSAIDES *et al.*, 2003).

De acordo com VINCENT (1991), esse pleomorfismo clínico do LPB representaria, ou sinais clínicos de uma doença com vários níveis de atividade identificados simultaneamente em diferentes regiões da boca, ou representariam fases evolutivas do processo.

Apesar da variedade clínica com que o LPB se apresenta NEVILLE *et al.* (2004) afirmam que existem essencialmente apenas duas formas clínicas, o tipo reticular e o erosivo.

A lesão reticular é a forma de LPB mais encontrada e aparece sob a forma de uma rede de conexões e linhas brancas sobrepostas, pápulas ou placas. Frequentemente os pacientes desconhecem sua presença (EISEN *et al.*, 2005), pois podem apresentar um arranjo impreciso e difuso de lesões reticulares muito difundidas, sendo que raramente são acompanhadas de sintomas (KARATSAIDES *et al.*, 2007).

As formas erosiva/ulcerativa constituem as formas mais destrutivas da doença e causam grande desconforto bucal (KARATSAIDES *et al.*, 2004 e 2007), enquanto a forma reticular está associada a poucos sintomas e reflete uma fase mais amena da doença. Lesões erosivas/ulcerativas, depois de tratadas, frequentemente recidivam na forma reticular (KARATSAIDES *et al.*, 2003).

Na pele, o líquen plano é caracterizado pela presença de pequenas pápulas purpúreas apresentando estrias brancas (estrias de *Wickham*) em sua superfície, são pruriginosas, simétricas e com predileção pelas superfícies flexoras de extremidades, região sacral e genitália (REGEZI & SCIUBA, 1989). Segundo BOYD *et al.* (1991) o LPC apresenta um curso bem definido, enquanto as lesões bucais são crônicas e recorrentes.

Para GANDOLFO *et al.* (2004) 90 % das lesões são acompanhadas de comprometimento bucal e muitas vezes as lesões bucais precedem as de pele, constituindo assim um importante sinal para o diagnóstico precoce. Segundo REGEZI & SCIUBA (2000) as lesões cutâneas são observadas em aproximadamente 20 a 60 % dos pacientes com líquen plano bucal. O LPB é mais frequente que o LPC numa proporção de 8:1, podendo ocorrer sem a manifestação cutânea.

Existe uma considerável controvérsia sobre a possibilidade das lesões de LPB serem uma lesão pré-maligna com evolução para o carcinoma epidermóide. Essa neoplasia representa em torno de 98% de todas as lesões malignas da boca, estando associada a fatores de risco exógenos, tais como, o tabaco e o álcool (KILPI *et al.*, 1996). Apesar de alguns trabalhos sugerirem uma alta incidência de carcinoma epidermóide bucal em pacientes com LPB, implicando o líquen plano como lesão pré-maligna (EISEN *et al.*, 2002; LARSSON & WALFVINGE, 2003; BASCONES *et al.*, 2007), alguns autores ainda consideram circunstanciais as evidências de transformação maligna no LPB (DUARTE & GOMES, 2003).

Segundo GANDOLFO *et al* (2004) o aumentado risco do aparecimento de câncer bucal associado ao LPB parece ser independente do tipo clínico e da terapia administrada. Devido à incerteza da natureza pré-maligna do LPB e ao fato de que a detecção precoce do câncer bucal pode resultar em aumento da sobrevida do paciente, é prudente monitorar todos os pacientes com LPB durante um longo período de tempo (EISEN *et al.*, 2005).

O LPB quando é assintomático não necessita de tratamento devendo ser acompanhados a cada seis meses (NEVILLE *et al.*, 2004; EISEN *et al.*, 2005). Nos casos sintomáticos, o paciente deve receber tratamento adequado e ser avaliado a cada três meses (NEVILLE *et al.*, 2004).

Indiscutivelmente o agente mais usado e mais eficaz no tratamento do LPB são os corticosteróides, tanto via tópica, quanto sistêmica. Os corticosteróides agem restringindo parcialmente a atividade do infiltrado linfocitário logo abaixo da camada basal do epitélio (VICENT, 1991).

Não existe cura para o LPB, o que se faz é o tratamento dos sintomas. Alguns autores acreditam que a terapia utilizada no tratamento do LPB não influencia no curso natural da doença (BOYD *et al.*, 1991).

2.1.2. Aspéctos Histopatológicos

O LPB é caracterizado histologicamente por um denso infiltrado linfocitário subepitelial (MURAKI & YOSHIKA, 1997; FAYYAZI *et al.*, 1999) disposto em banda e pela destruição da camada de células basais do epitélio (MURAKI & YOSHIKA, 1997;

TANDA *et al.*, 2000; KIM *et al.*, 2006; MAZARELLA *et al.*, 2006; KARATSAIDES *et al.*, 2007). A degeneração dos ceratinócitos basais forma corpos colóides ou de “Civatte” (SUGERMAN *et al.*, 2002; KASTELAN *et al.*, 2004), os quais aparecem como glóbulos homogêneos eosinofílicos. A ultra-estrutura dos corpos de “Civatte” sugere que eles sejam ceratinócitos apoptóticos. Mudanças na camada basal do epitélio são comuns no LPB sendo descritas fraturas, interrupções e duplicações (ZHOU & SUGERMAN, 2001). Em adição, a camada basal do epitélio e os ceratinócitos basais ancoram elementos como os hemidesmosomos e filamentos que são alterados resultando em fissuras microscópicas entre o epitélio e o tecido conjuntivo (SUGERMAN *et al.*, 2000).

O infiltrado de linfócitos T é composto por células CD4⁺ e células CD8⁺, com distribuição variável desses dois subgrupos. As células CD8⁺ encontram-se aumentadas nas regiões intraepitelial e superficial da lâmina própria, sendo sua atividade citotóxica encontrada adjacente às células da camada basal (EVERSOLE, 1994; NEPPELBERG *et al.*, 2001). Nos estágios precoces do LPB, o infiltrado é constituído de macrófagos e linfócitos CD4⁺ (PELISSIER & MISIPO, 1990;), com a progressão da doença pode ocorrer um aumento gradual de células CD8⁺ (PORTER *et al.*, 1997; NEPPELBERG *et al.*, 2001), e estudos demonstram uma grande afinidade dos linfócitos CD8⁺ pelos ceratinócitos quando comparado com as células CD4⁺ (EVERSOLE, 1994).

De acordo com PELISSIER & MISIPO (1990) todos esses achados histológicos são relativamente constantes em todos os tipos de LPB, mas segundo o tempo de evolução da lesão e a forma clínica, encontram-se certas variações. O infiltrado inflamatório destrói progressivamente as camadas inferiores do epitélio. Assim, em um LPB recente, observam-se prolongamentos epiteliais afilados apresentando o aspecto de “dentes de serra”. Com a evolução da lesão, os prolongamentos papilares desaparecem, sendo substituídos pelo infiltrado inflamatório que ataca as camadas inferiores do epitélio. Nos LPB antigos, a junção epitélio-conjuntivo encontra-se completamente retilínea, pois desaparecem totalmente as papilas e os prolongamentos inter-papilares epiteliais, ficando um epitélio atrófico. Por fim, o epitélio torna-se totalmente destruído pelo infiltrado inflamatório caracterizando a forma erosiva do LPB.

Outras células acessórias contribuem em menor número, como monócitos e macrófagos, células de *Langerhans* e mastócitos (PELLISSIER & MISIPO, 1990; VICENT, 1991).

2.1.3. Patogênese

O papel da auto-imunidade na patogênese da doença é sustentado por muitas características auto-imunes do LPB (SLAVOUNOU *et al.*, 2004), incluindo início em adultos, predileção pelo sexo feminino, associação com outras doenças auto-imunes, atividade supressora imune deprimida e a presença de células T citotóxicas auto-reativas nas lesões de LPB (SUGERMAN *et al.*, 2000; LODI *et al.*, 2005).

Evidências atuais sugerem que a patogênese do LPB esteja relacionada a um processo mediado por células T, onde a destruição da camada basal pode ser resultado do efeito citotóxico dos linfócitos T presentes no infiltrado inflamatório subepitelial (DEKKER *et al.*, 1997; FAYYAZI *et al.*, 1999; SUGERMAN *et al.*, 2000 e 2002; BASCONES *et al.*, 2007). Parece que a presença de um intenso infiltrado inflamatório de linfócitos T ativados leva à liberação local aumentada de citocinas que são consideradas mediadoras no recrutamento e retenção dos linfócitos, bem como na morte dos ceratinócitos basais (DEKKER *et al.*, 1997; SLAVOUNOU *et al.*, 2000; KARATSAIDES *et al.*, 2003).

O infiltrado linfocitário no LPB é composto quase exclusivamente por células T. Infiltrando o epitélio, adjacentes aos ceratinócitos basais danificados, também se encontram linfócitos T CD8+. Células T citotóxicas podem desencadear apoptose dos ceratinócitos no LPB (TANDA *et al.*, 2000; SUGERMAN *et al.*, 2002; PRIME *et al.*, 2004).

Os mecanismos usados pelas células T para desencadear a apoptose no LPB não são claros, mas possíveis mecanismos incluem:

1. Células T secretando TNF- α que se liga ao receptor TNF-R1 na superfície dos ceratinócitos.
2. Células T secretando granzima B que age sobre os ceratinócitos via perforinas, induzindo poros na membrana.

Esses mecanismos podem ativar a cascata das caspases resultando em apoptose dos ceratinócitos (LORO *et al.*, 2005).

SLAVOUNOU *et al.* (2004) relataram elevados níveis séricos de TNF α em pacientes portadores de LPB quando comparados com controles, sugerindo um papel desta citocina na iniciação e progressão da doença.

SUGERMAN *et al.* (2000) identificaram o papel do TNF α e da MMP-9 (matriz de metaloproteinase-9) na patogênese do LPB. O TNF α pode desencadear a apoptose dos ceratinócitos, enquanto a MMP-9 pode perturbar a membrana basal nas lesões de LPB.

Estudos “*in vitro*” têm mostrado a capacidade da granzima B em clivar e ativar a caspase-3, a qual inicia eventos e levam as células epiteliais ao caminho irreversível de morte por apoptose (TOBON-RROYAVE *et al.*, 2004). TANDA *et al.* (2000) através de estudos imunohistoquímicos, sugeriram que os linfócitos T intraepiteliais secretam granzima B ao redor dos ceratinócitos, desta forma induzindo os ceratinócitos à apoptose.

2.2. Apoptose

A morte celular que ocorre de forma programada e está presente em processos fisiológicos e patológicos é conhecida como apoptose ou morte celular programada. Esse processo foi descrito pela primeira vez por KERR *et al.* em 1972.

Apoptose é uma forma de morte programada utilizada na eliminação das células durante o desenvolvimento embrionário e na vida adulta (LIPPONEM & AALTOMAA, 1994).

KERR *et al.* (1972) propuseram o termo *apoptosis* para esse processo, enfatizando seu papel regulador na população celular e considerando o seu mecanismo oposto ao da mitose. A palavra apoptose é um termo de origem grega que significa “queda, separação”, que foi sugerida em analogia à queda das pétalas das flores ou das folhas das árvores durante o outono (CUMMINGS *et al.*, 1997).

A apoptose pode ser induzida tanto em processos fisiológicos quanto em processos patológicos. A apoptose pode ser ativada em resposta a diversos estímulos, como fatores hormonais, ação de citocina, ação do sistema imune, infecções virais, homeostasia em

tecido adulto e danos letais às células por ação de radiações, hipertermia, toxinas ou outros fatores físicos (RASKIM, 1997).

À microscopia óptica, as células apoptóticas são retraídas (tipicamente circundadas por um halo claro) e possuem citoplasma acidófilo. Os núcleos dessas células sofrem alterações tais como marginação da cromatina, condensação e fragmentação, seguidas pela fragmentação da célula em corpos apoptóticos (WYLLIE, 1991). A morte celular por apoptose não altera as células circunjacentes, diferentemente da célula necrótica que induz inflamação. Assim, a célula em apoptose se fragmenta silenciosamente, empacotando seus constituintes, os quais são fagocitados pelas células adjacentes (BORISENKO *et al.*, 2003).

A apoptose é um processo assincrônico, com fase inicial de duração muito variável. Em estudos de videomicroscopia, as transformações morfológicas no microscópio óptico ocorrem em menos de 2 horas. Existe um ponto de não retorno, que ocorre várias horas antes do aparecimento das características morfológicas típicas da apoptose (KERR *et al.*, 1972).

De acordo com SEARLE *et al.* (1982) a apoptose apresenta duas fases distintas: a primeira seria a condensação nuclear e fragmentação citoplasmática, formando os corpos apoptóticos, e a segunda fase consiste na fagocitose e digestão desses fragmentos pelas células adjacentes.

No início do processo ocorre perda de contato da célula com as células vizinhas, o núcleo apresenta condensação da cromatina em massas densas adjacentes à membrana nuclear, condensação do citoplasma e, usualmente, o aparecimento de protuberâncias na superfície celular. As organelas citoplasmáticas tornam-se compactas, permanecendo estruturalmente intactas. Ocorrem a fragmentação nuclear e a formação de corpos apoptóticos que são formados quando as protuberâncias se desprendem da membrana plasmática. Alguns corpos apoptóticos contêm mais de um fragmento nuclear, enquanto outros apresentam apenas elementos citoplasmáticos (SEARLE *et al.*, 1982). Os corpos apoptóticos são fagocitados tanto pelas células vizinhas, como também pelos macrófagos ou monócitos, células epiteliais, endotélio vascular ou células tumorais. Este processo ocorre na ausência de processo inflamatório e sem dano às células vizinhas (BOSMAN *et al.*, 1996).

A apoptose é um processo ativo que necessita de energia (BOSMAN *et al.*, 1996), sendo caracterizada por uma cascata de eventos bioquímicos (FESUS *et al.*, 1992; BOSMAN *et al.*, 1996), onde há a necessidade de gasto de energia e síntese de proteínas (WYLLIE, 1991). Esses eventos podem ocorrer através de dois caminhos: um extrínseco e um intrínseco (HAJRA & LIU, 2004).

No caminho extrínseco há uma sinalização entre o meio extra e intracelular através de receptores da superfície celular, como o Fas que recebe a ligação de moléculas ligantes (Fas L) produzidos por células do sistema imune. Ocorre também pela ativação da super família dos receptores do fator de necrose tumoral (TNF R1, TNF R2) e dos receptores do ligante indutor da apoptose relacionado ao TNF (TRAIL R1, TRAIL R2) por seus ligantes (TNF α , TRAIL). Após a ligação esses receptores trimerizam e a sua porção citoplasmática se ligam a uma proteína adaptada chamada TRADD (*TNF receptor apoptotic death domine*) para o TNF α ou FADD (*Fas-associated death domain*) para o Fas (LORO *et al.*, 2005). Após esta sinalização ocorre a ativação de enzimas intracelulares, como as caspases desencadeantes (caspase 8 e 10), que encontravam-se inativas. Estas enzimas irão ativar as caspases executoras (caspase 3, 6 e 7) que irão destruir estruturas celulares culminando com a morte da célula. Todos os eventos bioquímicos ocorrem de forma dinâmica e simultânea (HAJRA & LIU, 2004).

No caminho intrínseco da apoptose, uma organela de grande importância, é a mitocôndria, que após recebidos os sinais de morte, aumenta a permeabilidade ao citocromo c por mecanismos ainda desconhecidos (SARASTE & PULKKI, 2000). Este fator localiza-se no espaço entre a membrana interna e externa da mitocôndria, é liberado para o citoplasma e liga-se ao Apaf-1 que ativa as caspases desencadeantes (caspase 9) (GREN & REED, 1998). Um outro mecanismo via mitocôndria se dá através da ativação do fator indutor de apoptose (AIF) (JOZA, 2001). Este fator localiza-se no espaço entre a membrana interna e externa da mitocôndria, sendo liberado dessa organela após estímulo de morte celular. Ele age independente das caspases, pois se desloca a partir da mitocôndria, passa pelo citoplasma e alcança o núcleo, onde interage com o DNA, causando a condensação e a fragmentação deste a partir da ativação das endonucleases (GESKE & GERSCHENSON, 2001).

Há outras enzimas importantes que participam da apoptose. A endonuclease endógena é ativada na presença dos íons cálcio e magnésio e está presente no núcleo. Essa enzima atua de forma a promover a fragmentação internucleossômica do DNA formando fragmentos de 180 a 200 pares de bases (ARENDS *et al.*, 1991). A transglutaminase também é uma enzima importante na apoptose. Promove a ligação cruzada entre proteínas citoplasmáticas e membrana celular, tendo a finalidade principal de manter a integridade celular durante a formação dos corpos apoptóticos, impedindo a liberação dos constituintes celulares para o meio extracelular (ARENDS *et al.*, 1991). A enzima flipase fornece energia e faz com que a fosfatidilserina, que é um fosfolípido da membrana celular, passe da porção interna da membrana celular para a porção externa, facilitando o reconhecimento dos corpos apoptóticos pelos fagócitos. As caspases também têm sido implicadas na externalização da fosfatidilserina (FADOK, 1992; MARTIN, 1996; SARASTE & PULKI, 2000).

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVOS GERAIS

Elucidar a participação da apoptose nas lesões epiteliais e subepiteliais encontradas nos tipos reticular e erosivo do líquen plano bucal.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

3.2.1. Quantificar a apoptose no epitélio, nas camadas basal e parabasal, utilizando os critérios morfológicos validados através de reação de TUNEL e de imunohistoquímica (*M30 CytoDEATH*) nas lesões de LPB dos tipos reticular e erosivo.

3.2.2. Mensurar via morfometria e comparar a espessura média epitelial nas lesões de líquen plano bucal dos tipos reticular e erosivo;

3.2.3. Quantificar e comparar a apoptose, o percentual de ceratinócitos “livres” e a celularidade no infiltrado inflamatório subepitelial utilizando a reação de TUNEL nas lesões de líquen plano bucal dos tipos reticular e erosivo.

3.2.4. Avaliar uma possível associação entre a apoptose no epitélio e no infiltrado inflamatório subepitelial nas lesões de LPB dos tipos reticular e erosivo.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Obtenção das Amostras e Processamento do Material

Nesse estudo retrospectivo foram selecionadas lesões de pacientes diagnosticados clínica e histologicamente como líquen plano bucal dos tipos reticular e erosivo, que foram atendidos e submetidos à biópsia com finalidade de diagnóstico nas Clínicas de Estomatologia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC/MG). As amostras foram fixadas em formol a 10%, processadas rotineiramente e incluídas em blocos de parafina. Para seleção dos campos microscópicos analisados neste estudo utilizou-se como critério de inclusão, áreas mais inflamadas do epitélio ainda íntegro (sem ulceração) das camadas basal e parabasal nas lesões de LPB dos tipos reticular e erosivo.

Para o grupo controle, foram utilizados 10 fragmentos de mucosa clinicamente normal, comprovadas histologicamente estarem sem inflamação, selecionadas na clínica de cirurgia oral e de implantodontia da Pontifícia Universidade Católica de Minas Gerais (PUC-MG) obtidas a partir de acerto de tecido mole em procedimentos cirúrgicos para colocação de implantes. Esse estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa com a permissão de todos os participantes.

A amostragem constou de 15 lesões de LPB reticular, 15 lesões de LPB erosivo e 10 fragmentos de mucosa considerada clinicamente normal, como grupo controle.

Foram realizados cortes em secções de 4µm de espessura de todos os casos de LPB e de mucosa normal. As secções de 4µm obtidas foram coradas pelo método de Tricrômico de *Shorr* sendo submetidas a estudo morfológico em microscopia de luz para identificação e contagem das células e corpos apoptóticos. O Tricrômico de Gomori foi utilizado para mensurar morfometricamente a espessura média epitelial. Reações de TUNEL e imunohistoquímica com *M30 CytoDEATH* foram realizadas para validar critérios morfológicos empregados para identificação e quantificação da apoptose no epitélio e infiltrado inflamatório subepitelial.

4.2. Mensuração da Espessura Média do Epitélio

Para a morfometria da espessura média do epitélio, imagens obtidas com objetiva de 4x permitiram a visualização da secção no seu comprimento como um todo, com camada basal, espinhosa, granulosa e córnea. A média da espessura epitelial em μm foi estimada através da mensuração da área em μm^2 sobre do infiltrado inflamatório A (Figura 1) e dividindo esta pela dimensão horizontal B em μm (KARATSAIDES *et al.*, 2003).

$\text{Espessura epitelial média} = \text{área A em } \mu\text{m}^2 / \text{distância horizontal B em } \mu\text{m}$
--

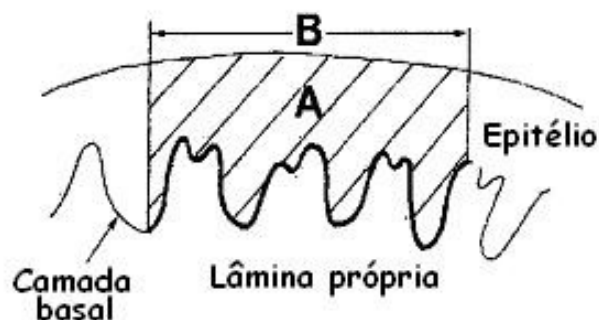


Figura 1. Desenho esquemático ilustrando a mensuração para o cálculo da espessura média do epitélio (adaptado de KARATSAIDIS *et al.*, 2003).

4.3. Parâmetros e Estratégia Morfométrica

O número mínimo representativo de campos microscópicos para a análise morfométrica foi determinado a partir da contagem inicial do número máximo de campos tomados de uma lâmina, coradas com Tricrômico de Shorr, escolhida aleatoriamente. Desses, formaram-se 10 subamostras com número crescente de campos (5, 10, 15... até 50) retirados aleatoriamente com reposição. De cada grupo, calculou-se a média aritmética e respectivo Coeficiente de Variação (CV) para cada tamanho amostral. À medida que o tamanho da amostra aumenta, os CVs tendem a diminuir até se estabilizar. Assim, quando o incremento do número de campos não resultou em redução considerável no valor do

coeficiente de variação considerou-se que o tamanho daquela amostra como mínimo representativo (SAMPAIO, 1998; MORO *et al.*, 2004). A variação do número de células dos grupos estudados tanto para o epitélio quanto para o infiltrado inflamatório estabilizou-se a partir de 20 campos. As imagens foram digitalizadas em microcâmara (JVC TK-1270/JGB) e transferidas para o analisador de imagens (*Kontron Electronics, Carl Zeiss* - KS300 versão 2.0) (CALIARI, 1997).

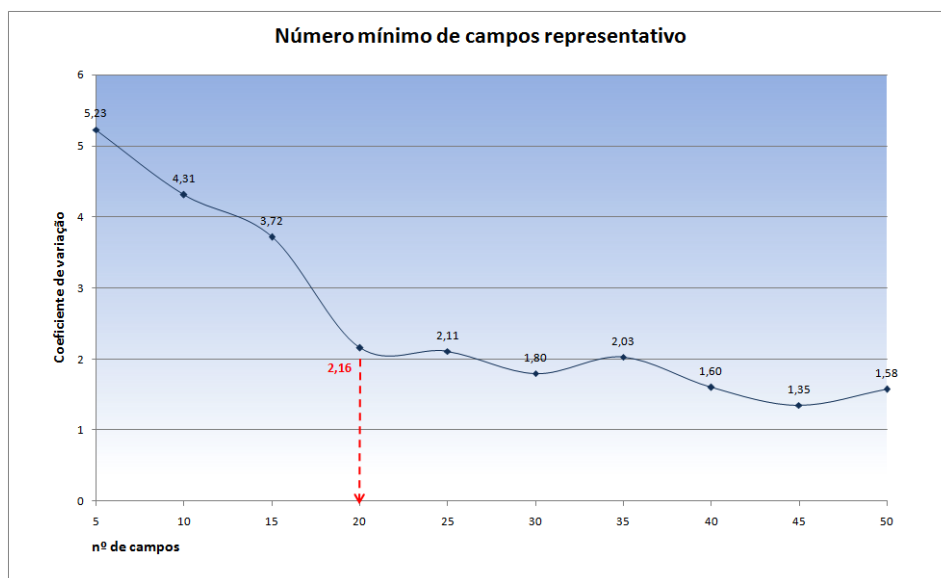


Gráfico 1: Determinação do número mínimo representativo de campos microscópicos para obtenção do índice apoptótico (IA) no epitélio.

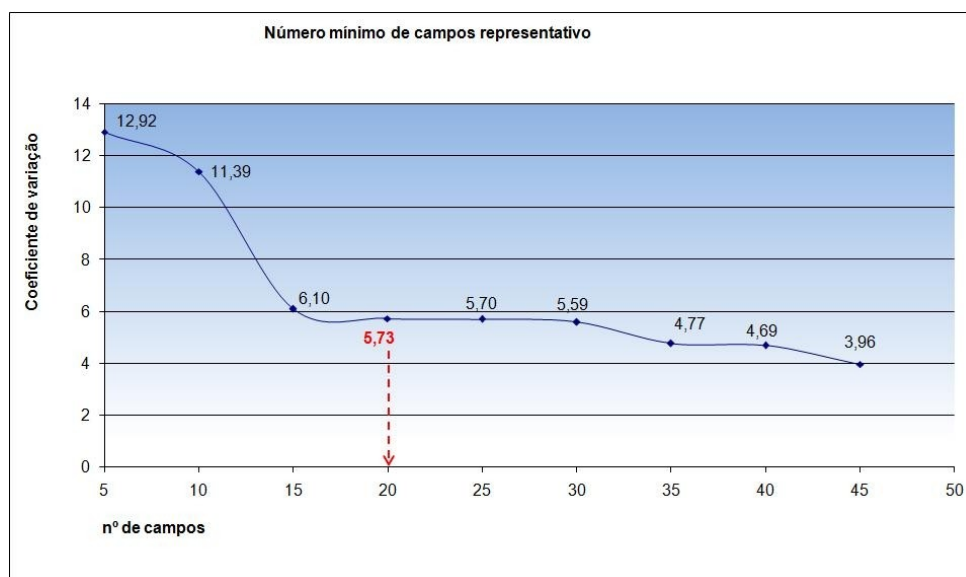


Gráfico 2: Determinação do número mínimo representativo de campos microscópicos para obtenção do índice apoptótico (IA) no infiltrado inflamatório subepitelial.

4.4. Quantificação do Índice Apoptótico no Epitélio

Para a quantificação de células apoptóticas, foram consideradas as características morfológicas peculiares do processo segundo VASCONCELOS (2001).

Para a quantificação, na camada basal e parabasal, das células epiteliais em apoptose e de células epiteliais totais foram utilizadas as lâminas coradas em Tricrômico de *Shorr*. A contagem foi feita com objetiva de imersão (100X) perfazendo 20 campos (obtidos como o número mínimo representativo de campos aleatórios) de cada lâmina e em cada grupo (reticular, erosivo e controle). A proporção entre as células em apoptose e as células normais corresponde ao índice apoptótico. As células foram contadas duas vezes pelo mesmo observador, em dias diferentes, em campos escolhidos ao acaso e foram contadas em áreas com presença de intenso infiltrado inflamatório subepitelial, excluindo-se as áreas de ulceração. Quando houve dúvida na caracterização morfológica da célula como em apoptose, a mesma não foi contada.

$$IA = \sum n^{\circ} \text{ de células em apoptose} / \sum n^{\circ} \text{ de células totais} \times 100$$

4.5. Quantificação do Índice Apoptótico no Infiltrado Inflamatório

Para a quantificação das células inflamatórias em apoptose e das células inflamatórias totais foram utilizadas as lâminas dos grupos reticular e erosivo submetidas a reação de TUNEL. A quantificação foi feita com imagens digitalizadas obtidas com a objetiva de imersão (100X) perfazendo 20 campos (obtidos como o número mínimo representativo de campos aleatórios) de cada lâmina e em cada grupo. A proporção entre as células em apoptose e as células normais corresponde ao índice apoptótico. As células foram contadas três vezes pelo mesmo observador, em dias diferentes, em campos escolhidos ao acaso e foram contadas em áreas com presença de intenso infiltrado inflamatório

subepitelial, excluindo-se as áreas ulceradas. Quando houve dúvida na caracterização morfológica da célula em apoptose, a mesma não foi contada.

$$IA = \sum \text{nº de células em apoptose} / \sum \text{nº de células totais} \times 100$$

4.6. Obtenção do Percentual de Ceratinócitos “livres” no Infiltrado Inflamatório

Para a quantificação dos ceratinócitos “livres” presentes no Infiltrado Inflamatório e das células inflamatórias totais foram utilizadas as lâminas dos grupos reticular e erosivo submetidas à reação de TUNEL. A quantificação foi feita com imagens digitalizadas obtidas com objetiva de imersão de 100X perfazendo 20 campos (obtidos como o número mínimo representativo de campos aleatórios) de cada lâmina e em cada grupo. A proporção entre os ceratinócitos “livres” no Infiltrado Inflamatório e as células totais corresponde ao percentual de ceratinócitos. As células foram contadas três vezes pelo mesmo observador, em dias diferentes, em campos escolhidos ao acaso e foram contadas em áreas com presença de intenso infiltrado inflamatório subepitelial, excluindo-se as áreas de ulceração. Quando houve dúvida na caracterização de uma célula como sendo ceratinócito, esta não foi considerada. O percentual de ceratinócitos “livres” foi definido pelo número de ceratinócitos “livres” no infiltrado inflamatório dividido pelo número de células totais multiplicado pelo fator 100.

$$\% \text{ Ceratinócitos} = \sum \text{nº ceratinocitos no II} / \sum \text{nº células totais no II} \times 100$$

4.7. Quantificação da Celularidade no Infiltrado Inflamatório Subepitelial

Para a quantificação da celularidade no Infiltrado Inflamatório, foram utilizadas as lâminas dos grupos reticular e erosivo submetidas à reação de TUNEL. A quantificação foi feita com imagens digitalizadas obtidas com objetiva de imersão de 100X perfazendo 20

campos (obtidos como o número mínimo representativo de campos aleatórios) de cada lâmina e em cada grupo. A diferença entre o número de células totais subtraído do número de ceratinócitos “livres” no Infiltrado Inflamatório subepitelial corresponde à celularidade. As células foram contadas três vezes pelo mesmo observador, em dias diferentes, em campos escolhidos ao acaso e foram contadas em áreas com presença de intenso infiltrado inflamatório subepitelial, excluindo-se as áreas de ulceração. Quando houve dúvida para caracterização morfológica de uma célula como sendo uma célula do infiltrado inflamatório ou um ceratinócito, a mesma não foi considerada.

$$\text{Celularidade} = \sum \text{nº de células totais} - \sum \text{nº de ceratinócitos “livres”}$$

4.8. Validação dos Critérios Morfológicos utilizados para o IA no Epitélio

4.8.1. Reação de TUNEL

Para a validação dos critérios morfológicos da quantificação do índice apoptótico foram executadas as técnicas do TUNEL (*TdT-FragEL™ DNA Fragmentation Detection Kit, Cat QIA33, Calbiochem*) e a imunohistoquímica com o *M30 CytoDEATH (M30 CytoDEATH, Mouse monoclonal Ab, Clone M30, Cat 2 140 322, Roche)*.

Para a técnica do TUNEL, as laminas silanizadas contendo os cortes passaram por 2 banhos de xilol por 5 minutos cada banho. A seguir, os cortes foram hidratados em banhos decrescentes de etanol, sendo dois banhos de álcool absoluto por 5 minutos cada, e banhos de 3 minutos em álcool 95%, álcool 90%, álcool 80% e álcool 70%. Os cortes, então, foram lavados em TBS.

Para permitir maior penetração do tampão contendo TdT e nucleotídeos marcados, foi feita a imersão em Tampão Citrato pré aquecido por 5 minutos e posteriormente aplicada a Proteinase K (2mg/ml) diluída em Tris 10mM na proporção 1:100 durante 20 minutos, sendo em seguida, lavado 1X com TBS.

Para o bloqueio da peroxidase endógena, utilizou-se o peróxido de hidrogênio a 30 vol diluído em metanol na proporção de 1:10 durante 5 minutos, sendo em seguida, lavado 1X com TBS. O excesso da solução ao redor do corte foi removido e as lâminas foram cobertas com tampão de equilíbrio por 10 minutos.

Foi aplicado 60µl de enzima TdT diluída (57µl de *Labeling Reaction Mix* adicionada a 3µl de enzima TdT) em cada corte, sendo posteriormente cobertos com protetores plásticos (quadrados de Parafilme) e incubados em câmara úmida a 37°C, durante 24 horas. Após este tempo, o protetor plástico foi removido, os cortes foram lavados em 1X com TBS e posteriormente cobertos com 100µl de tampão de parada por 5 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, os cortes foram novamente lavados em 1X com TBS e cobertos com 100 µl de tampão de bloqueio durante 10 minutos à temperatura ambiente.

Foi feita a diluição do conjugado em tampão de bloqueio na proporção de 1:50. Os cortes foram cobertos com 100µl da diluição e incubados por 45 minutos, em câmara úmida, à temperatura ambiente, sendo em seguida lavados em 1X com TBS.

Para revelar a reação, os cortes foram cobertos com 100µl da solução de DAB, por 15 minutos, à temperatura ambiente, sendo em seguida lavados em água destilada. Os cortes foram submetidos à contra-coloração com verde de metila, durante 20 minutos, à temperatura ambiente. Posteriormente os cortes foram desidratados em 2 banhos (4X) em álcool absoluto, e 1 banho (4X) em xilol, e seguido da montagem das lâminas.

4.8.2. Imunohistoquímica para o M30 CytoDEATH

Para o *M30 CytoDEATH*, foi utilizado um anticorpo (clone M30) monoclonal de camundongo. A imuno-reatividade do anticorpo *M30* é confirmada no citoplasma das células apoptóticas. Ele é indicado para aplicação em secções de tecidos epiteliais embebidos em parafina. As citoceratinas, em particular a citoceratina 18, são afetadas em estágios precoces da apoptose. O anticorpo *M30 CytoDEATH* reconhece o sítio de clivagem da caspase específica da citoceratina 18. Conseqüentemente o *M30 CytoDEATH* é uma

ferramenta eficaz para detectar fácil e realmente a apoptose em estágios precoces em secções de tecidos (ROCHE, 2002).

Para a execução da técnica as amostras foram incubadas a 37°C durante a noite. Foram imersas em 2 banhos de xilol por 15 minutos cada banho. A seguir, os cortes foram hidratados em banhos decrescentes de etanol, sendo dois banhos de álcool 96%, seguido de 70%, com 30 mergulhos cada banho. Em seguida, os cortes foram imersos em metanol/H₂O₂ (3%) por 10 minutos à temperatura ambiente. Os cortes então foram lavados 2X em água destilada.

Após a seqüência de preparação das amostras, foi feito um pré-aquecimento do tampão citrato em microondas a 750W até ebulição. A seguir, as amostras foram imersas na solução de ácido cítrico pré-aquecida e retornadas para o microondas até atingirem o ponto de ebulição. Nesse momento, o microondas foi ajustado para 100W, mantendo-se nesta temperatura por 15 minutos. A seguir, as amostras foram esfriadas à temperatura ambiente por 5 minutos e enxaguadas em 3 banhos de PBS e incubadas por 2 minutos em outro recipiente contendo PBS.

As secções foram bloqueadas com tampão de incubação (PBS contendo 1% de BSA e 0,1% de *Tween* 20) por 10 minutos à temperatura ambiente. Em seguida, as amostras foram removidas do tampão de incubação e adicionadas a 100 µl do anticorpo por 1 hora à temperatura ambiente, em câmara úmida. A seguir, as amostras foram lavadas em tampão de lavagem (PBS contendo 0,1% de *Tween* 20), utilizando-se 3 jarros separados e mergulhando 30X em cada jarro. Na seqüência, as amostras foram cobertas com 100 µl do anticorpo secundário (1 µl/ml) e incubadas à 37°C, em câmara úmida, por 30 minutos. Posteriormente as secções foram lavadas em tampão de lavagem, utilizando 3 jarros separados e mergulhadas 30X em cada jarro. Em seguida, foram cobertas com 100 µl de *Streptavidin-POD* (0,5 U/ml) e incubadas à temperatura ambiente, em câmara úmida, por 30 minutos. Os cortes foram novamente lavadas em tampão de lavagem, utilizando 3 jarros separados e mergulhadas 30X em cada jarro.

Para revelação da reação, os cortes foram cobertos com 100µl da solução de DAB, por 40 minutos, à temperatura ambiente, seguidos de lavagem em 2X de água destilada. Os

cortes foram contra-corados com hematoxilina, em 2 banhos rápidos, desidratados, seguido da montagem das lâminas.

4.4. Análise Estatística

Os resultados foram apresentados como média $\pm$ erro padrão ou mediana, conforme tenham tido uma distribuição normal ou não, como verificado pelo teste de *Kolmogorov-Smirnov*. Resultados com distribuição normal foram comparados pelo teste t de *Student* para avaliar eventuais diferenças entre as amostras. Resultados com distribuição não normal foram comparados pelo teste de *Mann Whitney*. Os valores de $p < 0,05$ foram considerados significativos. Para avaliar a existência de eventuais correlações entre a apoptose e a espessura média do epitélio, entre a apoptose no infiltrado inflamatório e a apoptose no epitélio, entre a celularidade do infiltrado inflamatório e a apoptose do infiltrado inflamatório e entre a celularidade e a apoptose do epitélio, os resultados foram analisados pelo teste de Correlação de Pearson. Para testar a associação entre a apoptose no infiltrado inflamatório e a ocorrência de ceratinócitos livres, utilizou-se Correlação de Spearman (dados não paramétricos). Nestas análises foi usado o programa *GraphPad Prism 3.0*

5. RESULTADOS

Em todas as lâminas de LPB coradas em Tricrômico de *Shorr* foram observados na região da camada basal e parabasal, em número variável, corpos esféricos com halo claro ao redor, eosinofílicos, apresentando condensação nuclear. Essas estruturas recebem o nome de corpos de “*Civatte*” ou colóides e correspondem aos corpos apoptóticos resultantes da destruição dos ceratinócitos basais pelo fenômeno de apoptose. Abaixo da camada basal do epitélio, observou-se a presença de intenso infiltrado inflamatório mononuclear, predominantemente linfocitário, disposto em banda (Figura 2).

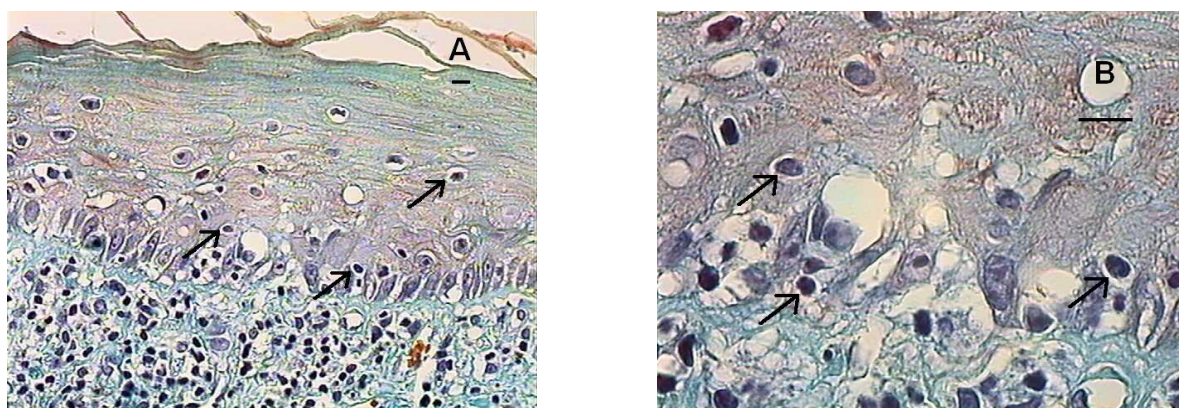


Figura 2: Fotomicrografias de LPB do tipo erosivo corado em tricrômico de *Shorr* (Barra = 10 μ m). A) Observa-se a desestruturação da camada basal do epitélio com células em apoptose e corpos apoptóticos com halo claro ao redor (corpos de *Civatte* - setas) e a presença de intenso infiltrado inflamatório subepitelial. B) Detalhes em maior aumento.

As secções processadas pelo método de marcação *in situ* (TUNEL) confirmaram os achados em *Shorr*, apresentando marcação positiva dos fragmentos nos ceratinócitos basais e suprabasais. Os núcleos com marcação positiva apresentaram intensa coloração marrom (Figura 3).

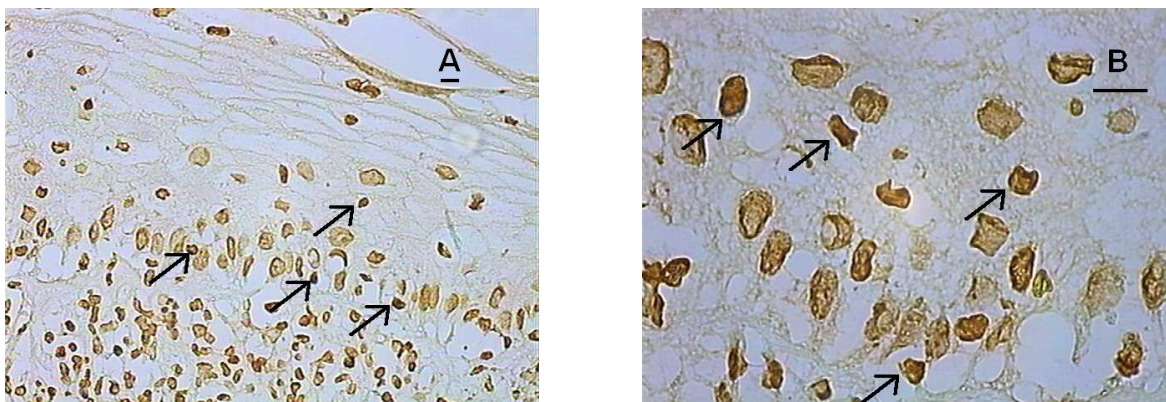


Figura 3: Fotomicrografias de LPB do tipo erosivo mostrando reação de TUNEL (Barra = 10 μ m). A) Observar marcação positiva para fragmentação do genoma (TUNEL +) nos ceratinócitos basais e parabasais (setas). B) Detalhes em maior aumento.

As secções processadas pelo método *M30 CytoDEATH* confirmaram novamente os achados em Tricrômico de *Shorr*, apresentando marcação positiva dos fragmentos nos ceratinócitos basais e suprabasais nas lesões de LPB. Os citoplasmas com marcação positiva mostraram intensa coloração marrom-avermelhada (Figura 4).

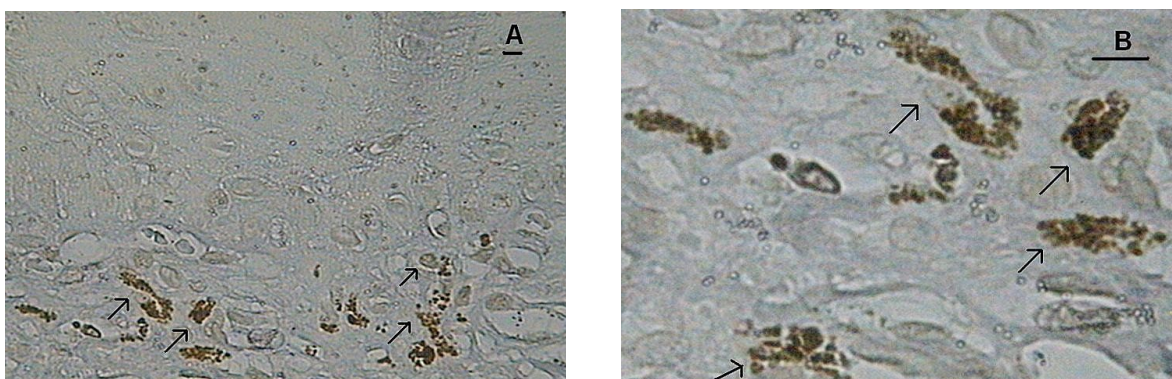


Figura 4: Fotomicrografias de LPB do tipo reticular mostrando reação positiva do *M30 CytoDEATH* contra-coradas com hematoxilina (Barra = 10 μ m). A) Observar marcação positiva no citoplasma dos ceratinócitos basais e parabasais (setas). B) Detalhes em maior aumento.

As secções processadas pelo método *M30 CytoDEATH* para o grupo controle apresentando marcação negativa dos fragmentos nos ceratinócitos basais e parabasais (Figura 5).

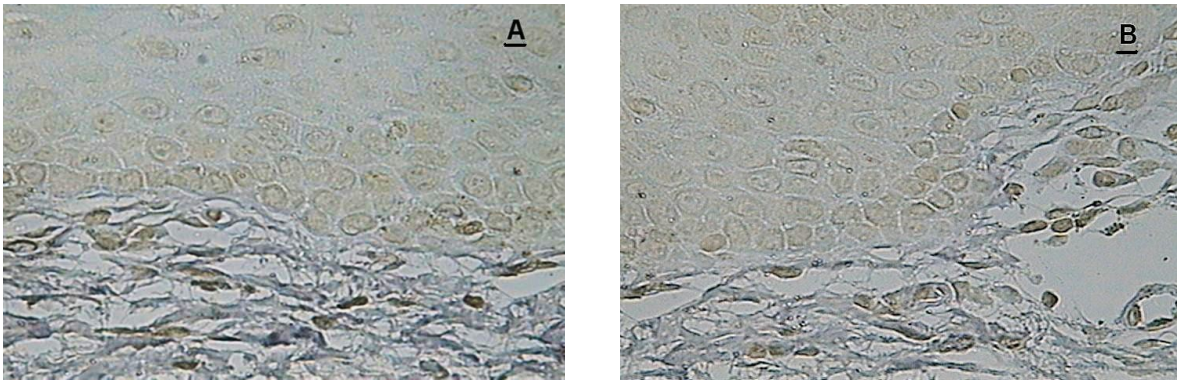


Figura 5: Fotomicrografias em regiões diferentes de mucosa bucal normal mostrando reação negativa do *M30 CytoDEATH* (Barra = 10 µm). Observar escassa marcação nos ceratinócitos basais e parabasais. A) e B)

Os resultados obtidos do Índice Apoptótico (IA) e da Espessura Média do Epitélio, passaram pelo teste de normalidade (*Kolmogorov Smirnov*) e foram analisados pelo teste *t* de *Student*. O IA do epitélio no grupo controle foi menor ($4,87 \pm 0,17$) que o grupo reticular ($26,85 \pm 0,72$) e este menor que o erosivo ($57,27 \pm 0,92$), com $p < 0,0001$. Já a Espessura Média do Epitélio foi maior no grupo controle ($248,70 \pm 25,24$) que no grupo reticular ($171,30 \pm 11,21$) e esta maior que o erosivo ($117,90 \pm 7,13$), com $p < 0,0001$ (Gráfico 3 e 4).

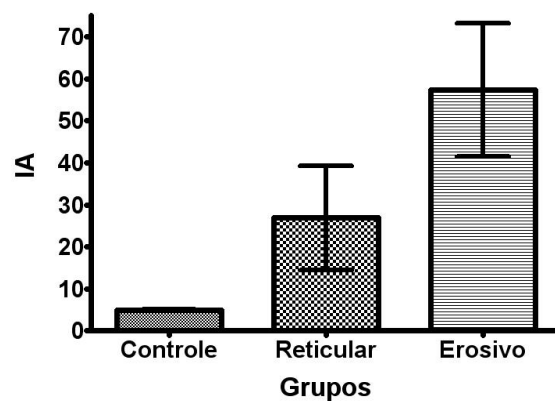


Gráfico 3: Distribuição do índice apoptótico (IA) do epitélio obtido nos grupos controle, reticular e erosivo ($p < 0,0001$).

Os resultados obtidos do índice apoptótico (IA) e da celularidade do infiltrado inflamatório subepitelial passaram pelo teste de normalidade (*Kolmogorov Smirnov*) e foram analisados pelo teste t de *Student*. O IA do infiltrado inflamatório no grupo reticular foi maior ($18,88 \pm 0,81$) que o do grupo erosivo ($6,58 \pm 0,39$), com $p < 0,0001$ (Gráfico 5). A celularidade no grupo erosivo foi maior ($73,24 \pm 2,83$) que no grupo reticular ($53,96 \pm 1,68$), com $p < 0,0001$ (Gráfico 6).

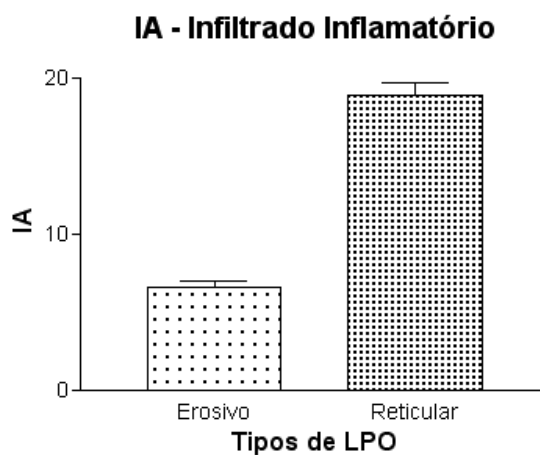


Gráfico 5: Distribuição do índice apoptótico (IA) do infiltrado inflamatório subepitelial nos grupos reticular e erosivo ($p < 0,0001$).

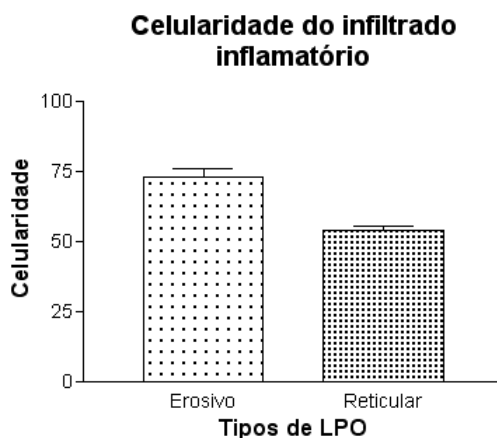


Gráfico 6: Distribuição do total de células no infiltrado inflamatório nos grupos reticular e erosivo ($p < 0,0001$).

Os resultados obtidos do percentual de ceratinócitos “livres” no infiltrado inflamatório não passaram pelo teste de normalidade (*Kolmogorov Smirnov*, $p=0,0412$) e foram analisados pelo teste de *Mann Whitney* (não paramétrico). A percentagem de ceratinócitos “livres” no infiltrado inflamatório no grupo reticular foi menor (Mediana: 3,98; Amplitude: 0,0 a 22,45) que no grupo erosivo (Mediana: 16,23; Amplitude: 3,42,, a 40,38), com $p<0,0001$ (Gráfico 7).

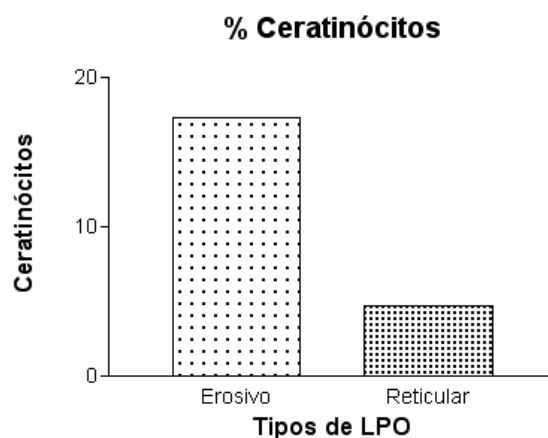
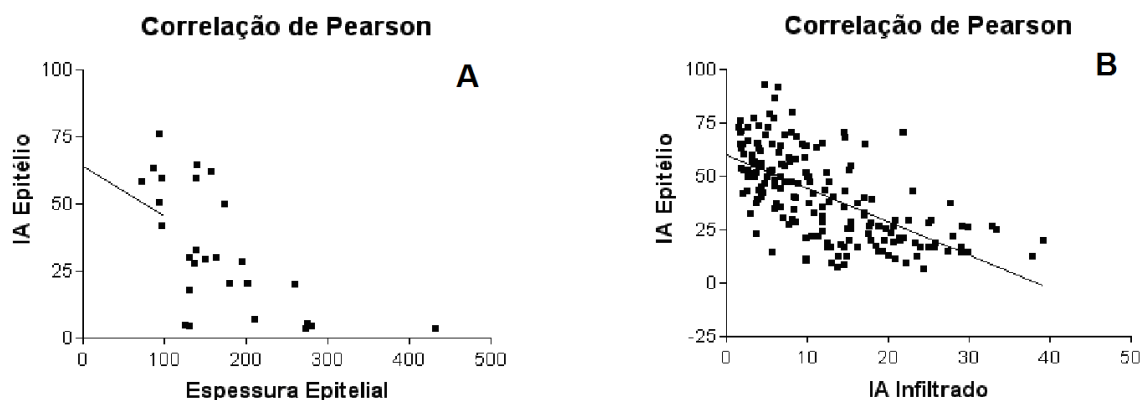
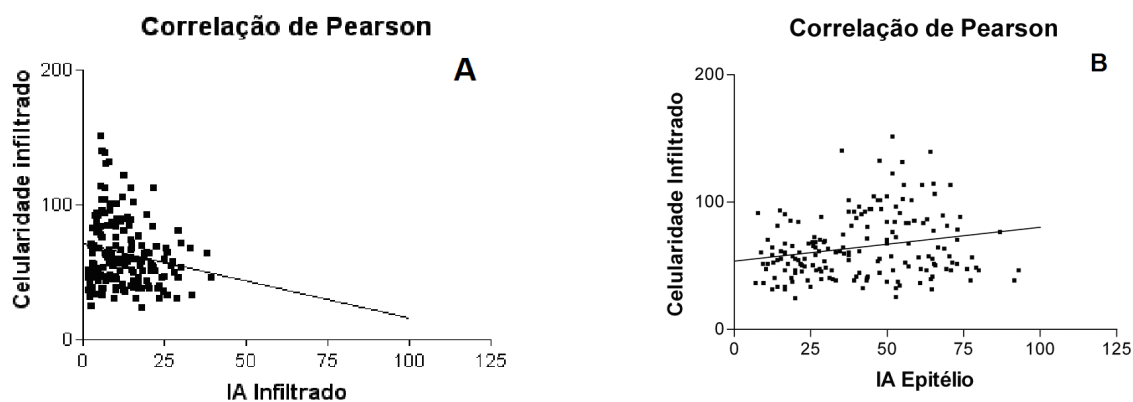


Gráfico 7: Distribuição do percentual de ceratinócitos “livres” no infiltrado inflamatório nos grupos reticular e erosivo ($p<0,0001$).

Os resultados obtidos para as correlações entre a apoptose e a espessura média do epitélio ($r=-0,6454$; $p=0,0003$), entre a apoptose no infiltrado inflamatório e a apoptose no epitélio ($r=-0,6344$; $p<0,0001$) (Gráficos 8A e B), entre a celularidade e a apoptose do infiltrado inflamatório ($r=-0,1833$; $p=0,0138$) (Gráfico 9A) e entre a apoptose do infiltrado inflamatório e ceratinócitos “livres” ($r=-0,5510$; $p<0,0001$) (Gráfico 10), apresentaram correlação negativa. Já os resultados obtidos entre a celularidade do infiltrado inflamatório e a apoptose do epitélio ($r=0,2167$; $p=0,0035$) (Gráfico 9B) apresentaram correlação positiva, sendo todos os resultados estatisticamente significativos.



Gráficos 8 A).: Correlação negativa entre IA do Epitélio e Espessura Epitelial ($r = -0,6454$; $p = 0,0003$) e B).: Correlação negativa entre os IAs do Epitélio e do Infiltrado Inflamatório ($r = -0,6344$; $p < 0,0001$).



Gráficos 9 A).: Correlação negativa entre IA e Celularidade do Infiltrado Inflamatório ($r = -0,1833$; $p = 0,0138$) e B).: Correlação positiva entre IA do Epitélio e Celularidade do Infiltrado Inflamatório ($r = 0,2167$; $p = 0,0035$).

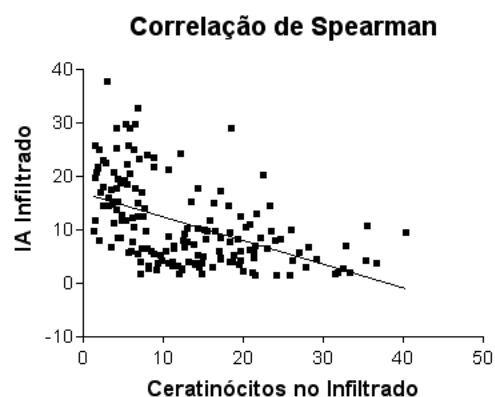


Gráfico 10: Correlação negativa entre IA do Infiltrado Inflamatório e Ceratinócitos livres ($r = -0,5510$; $p < 0,0001$).

6. DISCUSSÃO

A apoptose desempenha um papel fundamental em várias alterações patológicas que ocorrem na cavidade bucal. LORO *et al.* (2005), em uma revisão de literatura, citaram os vários trabalhos existentes demonstrando a ocorrência e o papel da apoptose nas várias doenças que acometem a boca, tais como úlceras aftosas, doenças vesículo-bolhosas, infecções virais, doenças periodontais, cistos e tumores da cavidade bucal, além do LPB.

Investigou-se nesse trabalho o índice apoptótico (IA) nas camadas basal e parabasal do epitélio, a espessura epitelial, o IA, o percentual de ceratinócitos “livres” e a celularidade no infiltrado inflamatório subepitelial, nas lesões de LPB dos tipos reticular e erosivo e avaliou-se se havia correlação entre esses achados.

A escolha destas duas formas clínicas de LPB deveu-se a dois fatores: o tipo reticular é a forma mais comum de ocorrência do LPB e o tipo erosivo, além de causar grande desconforto bucal, reflete uma fase mais destrutiva da doença (FANTASIA, 1997).

As principais características no LPB incluem lesões à camada epitelial basal formando corpos colóides ou de “Civatte”, os quais foram ultra-estruturalmente definidos como ceratinócitos em apoptose (SHIMIZU *et al.*, 1997). Parece que o infiltrado inflamatório tem um papel importante na lesão sofrida pelo epitélio.

DEKKER *et al.* (1997) e BLOOR *et al.* (1999) estudando a apoptose no epitélio nas lesões de LPB, demonstraram a fragmentação do genoma dessas células.

Nesse estudo, o IA foi maior nas lesões de LPB quando comparado à mucosa bucal normal, sendo que o tipo erosivo apresentou um IA mais alto em relação ao tipo reticular. Isto está em concordância com NEPPELBERG *et al.* (2001) que relataram um aumento do número de células apoptóticas no epitélio no LPB, quando comparadas com a mucosa bucal normal.

Entretanto, KARATSAIDES *et al.* (2004) encontraram um número aumentado de células marcadas pela reação de TUNEL na camada basal e em parte da camada espinhosa no epitélio das lesões de LPB, quando comparada à mucosa bucal normal. Muitas destas células mostraram também dupla marcação para a imunohistoquímica sendo interpretadas como sendo linfócitos CD4+ ou macrófagos CD68+ em apoptose. Nesse estudo, o número

de ceratinócitos apoptóticos presentes na camada basal e em parte da espinhosa foram similares entre as lesões de LPB e a mucosa bucal normal.

Em contrapartida, outros autores avaliaram a expressão da caspase 3 no LPB (TOBON-ARROYAVE *et al.*, 2004; BASCONES *et al.*, 2005). A caspase 3 é um marcador altamente específico da apoptose. Os resultados mostraram que a proporção de células marcadas com caspase 3 foi significativamente mais alta em todas as formas de LPB comparadas à mucosa bucal normal (TOBON-ARROYAVE *et al.*, 2004) indicando que as células basais são o alvo do ataque dos linfócitos (BASCONES *et al.*, 2005).

A apoptose parece estar envolvida no mecanismo de morte celular no LPB, conforme evidenciado nas fotomicrografias obtidas nesse trabalho, onde pôde-se observar a desestruturação da camada basal do epitélio e a presença dos corpos de “Civatte” (Figura 2). Existem algumas controvérsias neste tema. Karatsaides *et al.* (2004) consideram que a apoptose não é tão importante na patogenia do processo, e acreditam que as imagens de apoptose epitelial seriam melhores interpretadas como linfócitos intra-epiteliais. De qualquer maneira, parece lógico que ocorra morte e reabsorção celular para que a diminuição da espessura do epitélio venha a ocorrer, como acontece nos tipos mais agressivos de LPB.

Para validação dos critérios morfológicos utilizados para o IA no epitélio, foi utilizada a reação de TUNEL e também uma imunohistoquímica (*M30 CytoDEATH*). Muitas das células que mostraram morfologia para apoptose no Tricrômico de *Shorr* também mostraram marcação positiva nas técnicas de TUNEL e *M30 CytoDEATH* (Figuras 3 e 4).

Nesse trabalho encontrou-se maior quantidade de células apoptóticas que em outros estudos relativos a apoptose no epitélio nas lesões de LPB (KARATSAIDES *et al.*, 2004 e 2007). Uma eventual explicação para resultados pouco expressivos em termos de apoptose em outros estudos enfocando o LPB seria a utilização de lesões já graves e intensas, com ulcerações que, no caso, já não se prestariam para identificar adequadamente o processo de morte celular programada. Uma outra explicação é a de que quando se trabalha com LPB em fase inicial, pouca lesão epitelial se faz presente em virtude de um escasso infiltrado inflamatório subepitelial. Para qualquer estudo visando esclarecer esta questão, devem ser considerados a janela de tempo, um sólido critério de inclusão e exclusão e uma

classificação dos diferentes tipos clínicos de LPB, de maneira a se permitir inferir sobre os diversos momentos e etapas evolutivas da doença.

Nesse trabalho utilizaram-se como critério de inclusão as áreas mais inflamadas do epitélio ainda íntegro (sem ulceração), sendo que a quantificação foi feita considerando somente a camada basal e parabasal, por serem as que mais sofrem agressão pelo infiltrado inflamatório linfocitário subjacente. Além disso, a apoptose nas camadas espinhosa e córnea da mucosa poderia mascarar os resultados por serem camadas onde a apoptose ocorre fisiologicamente já que essa é uma região de diferenciação terminal dos ceratinócitos. Como critério de inclusão para o grupo controle, amostras de mucosa bucal sadia foram obtidas nas clínicas de implantodontia, tendo sido incluídas somente as mucosas que se apresentavam histologicamente sem inflamação, papilas ou acantose.

Outro ponto a ser considerado quando se estuda apoptose no LPO é com relação ao grupo controle. Na maioria dos estudos o grupo controle é obtido a partir de acerto de tecido mole após exodontia de terceiros molares. Nesse trabalho, considerou-se que esse não é um bom modelo para se utilizar uma vez, que nestes casos, normalmente a mucosa bucal apresenta-se ligeiramente inflamada, o que poderia influenciar nos resultados. Nesse estudo, foram utilizadas amostras de mucosas clinicamente sadias, obtidas nas clínicas de implantodontia onde, num segundo momento cirúrgico, quando são retirados os provisórios, é feito um acerto da mucosa ao redor dos implantes para posterior colocação das próteses definitivas. Trata-se nesse caso de uma mucosa muito mais íntegra e sadia, sendo considerada como um grupo controle mais adequado.

No presente estudo, encontrou-se uma espessura epitelial média menor no LPB erosivo em comparação ao reticular e também menor nesse em relação à mucosa bucal normal. Isso está em concordância com os achados de KARATSAIDES *et al.* (2003) que relataram resultados similares em relação à espessura média do epitélio nas lesões reticular e erosiva de LPB.

A redução na espessura epitelial é uma característica comum no LPB, mas nesse estudo observou-se que a espessura epitelial varia com a forma clínica e pode estar relacionada com o IA. Alguns pacientes com a forma clínica reticular de LPB apresentaram uma espessura epitelial média dentro da faixa de normalidade, mas todos os pacientes com a forma erosiva de LPB mostraram valores reduzidos. É possível que as diferenças clínicas

entre as formas reticular e erosiva são reflexos das variações biológicas encontradas nestes dois tipos de LPB.

Nesse trabalho observou-se uma correlação negativa entre a espessura epitelial e a intensidade de apoptose. No epitélio mais fino observou-se maior ocorrência de apoptose. Encontrou-se um alto IA com uma reduzida espessura epitelial no tipo erosivo de LPB. Por outro lado, no grupo controle encontrou-se um baixo IA com valores maiores de espessura epitelial. Já no tipo reticular os valores de IA e espessura média do epitélio variou entre o tipo erosivo e o grupo controle. O resultado da Correlação de Pearson indica que o aumento da apoptose se associa com a diminuição da espessura epitelial no LPB. Trata-se da primeira abordagem a esta questão e o resultado parece lógico, apesar de inédito, se se considera que a apoptose é o mecanismo de reabsorção das células dos epitélios de revestimento (KARATSAIDES *et al.*, 2003; LORO *et al.*, 2005).

Os estudos considerando a apoptose no LPB têm concentrado especialmente sobre o epitélio incluindo os ceratinócitos basais e parabasais. A apoptose no infiltrado inflamatório do LPB tem sido pouco estudada (NEPPELBERG *et al.*, 2001). A apoptose é considerada importante na resolução de processos inflamatórios, sendo responsável pela eliminação das células inflamatórias quando o processo diminui a atividade (WYLLIE, 1991; SEARLE *et al.*, 1982). No entanto, no que se refere ao LPB, não tem sido dada a devida importância quanto a avaliação da apoptose no infiltrado inflamatório subepitelial. São poucos os trabalhos que abordam esta questão, sendo que a maioria dos autores não diferencia os tipos de LPB (NEPPELBERG *et al.*, 2001; BASCONES *et al.*, 2006). BASCONES *et al.* (2006) observaram que no LPB ocorre pouca apoptose no infiltrado inflamatório subepitelial. É possível que na inflamação, enquanto ativa, ocorra maior recrutamento de novas células que apoptose das mais antigas, aumentando a sobrevida média das células do infiltrado, o que ajuda a explicar a presença intensa dos linfócitos T abaixo da camada basal do epitélio. Os resultados deste trabalho indicam e sustentam esta hipótese.

Já NEPPELBERG *et al.* (2001) demonstraram uma alta expressão do complexo FasR/FasL tanto no epitélio quanto no infiltrado subepitelial no LPB em geral. Segundo os mesmos autores, a apoptose era mais freqüente nas células epiteliais da camada basal que nos linfócitos subepiteliais, explicando a diminuição da espessura epitelial no LPB. É possível que o sinal produzido pela ligação FasR/FasL para a morte celular via apoptose

esteja sendo bloqueado pela atividade das células inflamatórias, causando escape da apoptose no infiltrado pela expressão de alguma molécula antiapoptótica como o Bcl-2, por exemplo. Esta assertiva abre um amplo campo para pesquisa e deve ser considerada em estudos futuros.

Por qual dos mecanismos as células inflamatórias permanecem no foco da lesão, se por um permanente recrutamento dessas células ou por mecanismos de evasão da apoptose, ainda existe a necessidade de novos estudos. Acredita-se que os dois fatores possam estar agindo simultaneamente, mas diferentemente quando se comparam os tipos reticular e erosivo de LPB. Entretanto, a presença de um intenso infiltrado inflamatório subepitelial nas lesões de LPB é algo inquestionável.

Nesse trabalho, diferentemente dos demais, investigou-se o IA, o percentual de ceratinócitos “livres” e a celularidade do infiltrado inflamatório subepitelial nas lesões de LPB dos tipos reticular e erosivo e observou-se algumas variações significativas. O IA do infiltrado inflamatório subepitelial nas lesões de LPB foi maior no tipo reticular quando comparado ao tipo erosivo (Gráfico 5). Já a celularidade foi o inverso: menor no tipo reticular e maior no tipo erosivo (Gráfico 6).

Estudos anteriores sugerem que as alterações sofridas pelas células da camada basal e parabasal do epitélio nas lesões de LPB são iniciadas pelas células inflamatórias presentes abaixo da camada basal do epitélio, que produzem diferentes citocinas capazes de ativar a apoptose dos ceratinócitos basais (SUGERMAN *et al.*, 2000; KARATSAIDES *et al.*, 2003). Os mecanismos envolvidos entre as células do infiltrado inflamatório subepitelial e a lise da camada basal do epitélio ainda não estão bem claros, mas acredita-se que exista uma real correlação entre esses dois fatores.

Nesse estudo, observou-se uma relação inversa entre a apoptose no infiltrado inflamatório e a apoptose no epitélio (Gráfico 8B) e uma correlação positiva entre a apoptose no epitélio e a celularidade do infiltrado inflamatório subepitelial (Gráfico 9B). Os resultados mostraram um menor IA no infiltrado inflamatório subepitelial e um maior IA no epitélio, no tipo erosivo de LPB, e no tipo reticular o inverso (Gráfico 3 e 5). Nesse contexto, pode-se, com este trabalho, inferir que a menor apoptose das células do infiltrado inflamatório subepitelial pode estar interferindo nas respostas celulares, aumentando a intensidade das lesões no LPB e vice versa.

Uma questão intrigante no LPB é o que vem primeiro: a apoptose dos ceratinócitos ou a destruição/ruptura da membrana basal epitelial. Ambos os mecanismos podem estar envolvidos na patogênese do LPB. A ruptura da membrana basal pode ativar a apoptose nos ceratinócitos e a esta pode resultar em dificuldades em reparar a membrana basal rompida (SUGERMAN *et al.*, 2000; MAZARELLA *et al.*, 2006). Experimentos com glândula mamária (PULLAN *et al.*, 1996) de ratos indicam que os ceratinócitos requerem um sinal de sobrevivência da membrana basal para prevenir a apoptose. Assim, a ruptura da membrana basal parece ativar a apoptose dos ceratinócitos no LPB. Os ceratinócitos contribuem para a estrutura da membrana basal por secretarem colágeno tipo IV e laminina V dentro da zona de membrana basal. Presumivelmente, essa função dos ceratinócitos não persiste por longo tempo. Assim, a apoptose do epitélio parece resultar da ruptura da membrana basal epitelial no LPB (SUGERMAN *et al.*, 2000).

No presente estudo quantificou-se o percentual de ceratinócitos “livres” em meio ao infiltrado inflamatório adjacente. Os ceratinócitos “livres” foram mais frequentes no tipo erosivo de LPB que no tipo reticular (Gráfico 7). A maior intensidade de apoptose no infiltrado inflamatório se associou com menor ocorrência de ceratinócitos livres. Parece lógico que mais apoptose no infiltrado se traduza em menor atividade inflamatória e consequentemente menor agressão à membrana basal e menor formação de ceratinócitos livres. Esses achados demonstram um comportamento diferente em relação à destruição do epitélio nos tipos reticular e erosivo de LPB e este parece ser um dado relevante para esclarecer melhor esta questão.

A maioria dos autores estuda o LPB como um único grupo de estudo sem separar os tipos clínicos. Nesse trabalho, foram estudados os tipos clínico reticular e erosivo como grupos distintos e foi possível observar diferenças significativas entre eles. As diferenças clínicas entre as formas reticular e erosiva parecem ser reflexos das variações histológicas encontradas nesses dois tipos de LPB. Acredita-se que mais estudos se fazem necessários e dependendo da abordagem e do tipo de estudo, é relevante estudar cada forma separadamente.

7. CONCLUSÕES:

O IA do epitélio do LPB erosivo foi maior que no reticular explicando as diferenças entre as alterações epiteliais presentes nestes dois tipos de LPB.

A espessura do epitélio foi inversamente proporcional à ocorrência da apoptose, indicando a participação da apoptose no adelgaçamento do epitélio nas lesões de LPB dos tipos reticular e erosivo.

A maior ocorrência de apoptose no infiltrado inflamatório subepitelial parece associar-se com menor celularidade neste infiltrado inflamatório e com menor apoptose.

A ocorrência de ceratinócitos “livres” em meio ao infiltrado inflamatório foi maior no tipo erosivo em relação ao reticular, sendo menor quando a apoptose no infiltrado inflamatório foi maior.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. ARENDS MJ & WYLLIE AH. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Internat Rev Exp Pathol.* 1991; 32: 223-254.
2. BASCONES C, GONZALEZ-MOLES MA, ESPARZA G, BRAVO M, ACEVEDO A, GIL-MONTOYA JA, BASCONES A. Apoptosis and cell cycle arrest in oral lichen planus Hypothesis on their possible influence on its malignant transformation. *Arch Oral Biol.* 2005; 50: 873-881.
3. BASCONES C, GONZALEZ-MOLES MA, ESPARZA G, GIL-MONTOYA JA, BASCONES A. Significance of liquefaction degeneration in oral lichen planus: a study of its relationship with apoptosis and cell cycle arrest markers. *Clin Exp Dermatol.* 2007; 32: 556-563.
4. BASCONES-ILUNDAIN C, GONZALES-MOLES MA, ESPARZA-GOMEZ G, GIL-MONTOYA JA, BASCONES-MARTINEZ A. Importance of apoptotic mechanisms in inflammatory infiltrate of oral lichen planus lesions. *Anticancer Res.* 2006; 26: 357-362.
5. BLOOR BK, MALIK FK. Quantitative assessment of apoptosis in oral lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1999; 88: 187-195.
6. BORISENKO GG, MATSURA T, LIU SX. Macrophage recognition of externalized phosphatidylserine and phagocytosis of apoptotic jurkat cells-existence of a threshold. *Arch Biochem.* 2003; 413: 41-52.
7. BOSMAN FT, VISSER BC, VAN OEVEREN J. Apoptosis: Pathophysiology of programmed cell death. *Path Res Pract.* 1996; 192: 676-683.
8. BOYD AS, NELDNER KH. Lichen Planus. *J Am Acad Dermatol.* 1991; 25: 593-619.
9. CALIARI MV. Princípios de Morfometria Digital: KS 300 para iniciantes. Belo Horizonte: Editora UFMG, 1997. 46
10. CUMMINGS MC, WINTERFORD CM, WALKER NI. Apoptosis: *Am J Surg Pathol.* 1997; 21: 88-101.

11. DEKKER NP, LOZADA-NUR F, LAGENAUR LA, MACPHAIL LA, BLOOM CY, REGEZI JA. Apoptosis-associated marker in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med.* 1997; 26: 170-175.
12. DUARTE ECB, GOMES RS. Líquen Plano e Câncer Bucal. *Rev Min Estomatol.* 2003; 1: 8-13.
13. EISEN D, CARROZZO M, BAGAN SEBASTIAN JV, THONGPRASOM K. Number V Oral lichen planus: clinical features and management. *Oral Dis.* 2005; 11: 338-349.
14. EISEN D, DINCINNATI E. The clinical features, malignant potential and systemic associations of oral lichen planus: a study of 723 patients. *J Am Acad Derm.* 2002; 46: 207-214.
15. EISEN D. The therapy of oral lichen planus. *Crit. Rev Oral Biol Med.* 1993; 4: 141-158.
16. EVERSOLE LR. Immunopathology of oral mucosal ulcerative, desquamative and bullous diseases. Selective review of the literature. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1994; 77: 555-571.
17. FADOK VA. Exposure of phosphatidilserine on the surface of apoptotic lymphocytes triggers specific recognition and removal by macrophags. *J Immunol.* 1992; 148: 2209-2216.
18. FANTASIA JE. Diagnosis and treatment of common oral lesions found in the elderly. *Dent Clin North Am.* 1997; 41: 877-890.
19. FAYYAZI A, SCHWEYER S, SORURI A, DUONG LQ, RADZUM HJ, PETERS J, PARWARESCH R, BERGER H. T lymphocytes and altered keratinocytes express interferon- γ and interleukin 6 in lichen planus. *Arch Dermatol Res.* 1999; 291: 485-490.
20. FESUS L, DAVIES PJA, PIACENINI M. Apoptosis: molecular mechanisms in programmed cell death. *Eur J Cell Biol.* 1992; 56: 171-177.

21. GANDOLFO S, RICHIARDI L, CARROZZO M. 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: 77-83.
22. GESKE FJ & GERSCHENSON LE. The biology of apoptosis. *Hum Pathol.* 2001; 32: 1029-1038.
23. GREEN DR & REED JC. Mitochondria and apoptosis. *Science.* 1998; 281: 1309-1312.
24. HAJRA KM & LIU JR. Apptosome dysfunction on in human cancer. *Apoptosis.* 2004; 9: 691-704.
25. HIROTA M, ITO T, OKUDELA K, KAWABE R, YAZAWA T, HAYASHI H, NAKATANI Y, FUJITA K, KITAMURA H. Cell proliferation activity and the expression of cell cycle regulatory proteins in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med.* 2002; 31: 204-212.
26. JOZA N. Essential role of the mitochondrial apoptosis-inducing factor in programmed cell death. *Nature.* 2001; 410: 549-554.
27. KARATSAIDES A, HAYASHI K, SCHREUS O, HELGELAND K, SCHENCK K. Survival signaling in keratinocytes of erythematous oral lichen planus. *J Oral Pathol Med.* 2007; 36: 215-222.
28. KARATSAIDES A, SCHREURS O, AXÉLL T, HELGELAND K, SCHENCK K. Identity of TUNEL-positive cells in the oral bucal epithelium of normal mucosa and lichen lesions. *J Oral Pathol Med.* 2004; 33: 264-268.
29. KARATSAIDES A, SCHREURS O, HELGELAND K, AXÉLL T, SCHENCK K. Erythematous and reticular forms of oral lichen planus oral lichenoid reactions differ in pathological features related to disease activity. *J Oral Pathol Med.* 2003; 32: 275-281.
30. KASTELAN M, MASSARI LP, GRUBER F, ZAMOLO G, ZAUHAR G, COKLO M, RUKAVINA D. The role of perforin-mediated apoptosis in lichen planus lesion. *Arch Dermatol Res.* 2004; 296: 226-230.

31. KERR JFR, WYLLIE AH, CURIE AR. Apoptosis: a basic biological phenomena with wide ranging implications in tissue kinetics. *Br J Cancer*. 1972; 26: 239-257.
32. KILPI A, RICH AM, READE PC, KANTTINEN YT. Studies of the inflammatory process and malignant potential of oral mucosal lichen planus. *Aust Dent J*. 1996; 41: 87-90.
33. KIM SG, CHAE CH, CHO BO, KIM HN, KIM HJ, KIM LS, CHOI JY. Apoptosis of oral epithelial cells in oral lichen planus caused by up regulation of BMP-4. *J Oral Pathol Med*. 2006; 35: 37-45.
34. LARSSON A, WARFVINGE G. Malignant transformation of oral lichen planus. *Oral Oncol*. 2003; 39: 630-631.
35. LIPPONEN PK & AALTOMAA S. Apoptosis in bladder cancer as related to standard prognostic factors and prognosis. *J Pathol*. 1994; 173: 333-339.
36. 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 1:Viral infections and ethyopathogenesis. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005; 100: 164-178.
37. LORO LL, VINTERMYR OK, JOHANNESSEN C. Apoptosis in normal and disease oral tissues. *Oral Dis*. 2005; 11: 274-287.
38. LOZADA NF, MIRANDA C. Oral lichen planus: epidemiology, clinical characteristics and associated diseases. *Semin Ctan Med Surg*. 1997; 16: 273-277.
39. MARTIN SJ. Phosphatidylserine externalization during CD95-induced apoptosis of cells and cytoplasts. Requires ICE/CED-3 proteases activity. *The J Biol Chemist*. 1996; 271: 28753-28756.
40. MAZARELLA N, FERMIANO F, GOMBOS F, DE ROSA A, GIULIANO M. Matrix metalloproteinase gene expression in oral lichen planus: erosive vs. Reticular forms. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2006; 20: 953-957.

41. MONCARZ V, ULMANSKY M, LUSTMANN J. Lichen Planus: Exploring its malignant potential. *J Am Dent Assoc.* 1993; 124: 102-108.
42. MORO L, VASCONCELOS AC, SANTOS FGA, ALVES CM, NUNES JES, SAMPAIO IBM. Determination of the minimal representative number of microscopical fields to quantify apoptosis in canine lymph nodes. *Arq Bras Med Vet Zootec.* 2004; 56: 408-410.
43. MURAKI Y, YOSHIOKA C. Immunohistochemical detection of Fas antigen in oral epithelia. *J Oral Pathol Med.* 1997; 26: 57-62.
44. NEPPELBERG E, JOHANNESSEN AC, JONSSON R. Apoptosis in oral lichen planus. *Eur J Oral Sci.* 2001; 109: 361-364.
45. NEPPELBERG E, LORO LL, OIJORDSBAKKEN G, JOHANNESSEN AC. Altered CD40 and E-cadherin expression – putative role in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med.* 2007; 36: 153-160.
46. NEVILLE BW, DAMM DD, ALLEN CM, BOUQUOT JE. Oral & Maxillofacial Pathology. *Philadelphia.* Saunders, 2004.
47. PELISSIER A & MISIPO E. Manifestations buccales du lichen plan. 2e. Partie: Aspect histologique, immunologique et thérapeutique. *Chir Dent Fr.* 1990; 60: 21-26.
48. PORTER SR, KIRBY A, OLSEN I, BARRETT W. Immunologic aspects of dermal and oral lichen planus a review. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol.* 1997; 83: 358-366.
49. PRIME SS, PRING M, DAVIES M, PATERSON IC. TGF- β signal transduction in orofacial health and non-malignant disease (Parte I). *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004; 15: 324-336.
50. PULLAN S, WILSON J, METCALFE A. Requirement of basement membrane for the suppression of programmed cell death in mammary epithelium. *J Cell Sci.* 1996; 109: 631-42.
51. RASKIN AC. Apoptosis and cutaneous biology. *J Amer Ac Derm.* 1997; 36: 885-898.

52. REGEZI JA & SCIUBA JJ. Oral Pathology: Clinical – Pathologic correlations. Philadelphia. Saunders, 1989.
53. ROCHE; versão Abril, 2002. Catálogo: <http://biochem.roche.com/apoptosis/prod11.htm>
54. SAMPAIO IBM. Estatística Aplicada à Experimentação Animal. 1 ed. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998.
55. SARASTE A & PULKKI K. Morphologic and biochemical hallmarks of apoptosis. *Cardiv Res.* 2000; 45: 528-537.
56. SEARLE J, KERR JFR, BISHOP CJ. Necrosis and Apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol Annu.* 1982; 17: 229-259.
57. SHIMIZU M, HIGAKI Y, HIGAKI M, KAWASHIMA M. The role of granzyme B-expressing CD8-positive T cells in apoptosis of keratinocytes in lichen planus. *Arch Dermatol Res.* 1997; 289: 527-532.
58. SKLAVOUNOU A, CHRYSOMALI E, LAKOVOU M, GARINIS GA, KARAMERIS A. Elevated serum levels of the apoptosis related molecules TNF- α , Fas/Apo-I and Bcl-2 in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med.* 2004; 33: 386-390.
59. SKLAVOUNOU A, CHRYSOMALI E, SCORILAS A, KARAMERIS A. TNF- α expression and apoptosis-regulating proteins in oral lichen planus: a comparative immunohistochemical evaluation. *J Oral Pathol Med.* 2000; 29: 370-375.
60. SUGERMAN PB, SAVAGE NW, WALSH LJ, ZHAO ZZ, ZHOU XJ, KHAN A, SEYMOUR RJ, BIGBY M. The pathogenesis of oral lichen planus. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002; 13: 350-365.
61. SUGERMAN PB, SAVAGE NW, ZHOU X, WALSH LJ, BIGBY M. Oral lichen planus. *Clin Dermatol.* 2000; 18: 533-539.
62. 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: 385-393.

63. TOBON-ARROYAVE SI, VILLEGAS-ACOSTA FA, RUIZ-RESTREPO SM, VIECO-DURAN B, RESTREPO-MISAS M. Expression of caspase-3 and structural changes associated with apoptotic cell death of keratinocytes in oral lichen planus. *Oral Dis.* 2004; 10: 173-178.

64. VASCONCELOS AC. Métodos aplicados ao estudo da apoptose, Belo Horizonte: Instituto de Ciências Biológicas da UFMG, 2001, 17p. *print out* do curso PAG 807 – Métodos de Estudo Aplicados à Apoptose.

65. VINCENT SD. Diagnosing and Managing Oral Lichen Planus. *J Am Dent Assoc.* 1991; 122: 93-96.

66. WYLLIE AH. Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. *Cancer and Metast Rev.* 1991; 11: 95-103.

67. WYLLIE AH. Glucocorticoid induced thymocyte apoptosis in associated with endogenous endonuclease activation. *Nature.* 1980; 284: 555-556.

68. ZHOU XJ, SUGERMAN PB. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in oral lichen planus. *J Cutan Pathol.* 2001; 28: 72-82.