

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
FACULDADE DE ODONTOLOGIA

**Papel da Apoptose no Infiltrado
Inflamatório do Líquen Plano Bucal**

Belo Horizonte

2012

Juliana Massote Caldeira Brant

**Papel da Apoptose no Infiltrado
Inflamatório do Líquen Plano Bucal**

Tese apresentada ao curso de Pós-Graduação em Odontologia da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial à obtenção do título de Doutora.

Orientador: Prof. Dr. Anílton César Vasconcelos

Co-orientadora: Prof^a. Dra. Maria Cássia Ferreira Aguiar

Belo Horizonte

2012

Dedico este trabalho aos meus pais, pelo amor e incentivo, ao meu marido, pelo apoio incondicional, ao meu filho, razão da minha vida, aos meus irmãos 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, a quem serei sempre grata! Obrigada.
- À Prof^a. Dra. Maria Cássia Ferreira Aguiar, pela oportunidade, pela ajuda, pela boa vontade e cooperação na execução do trabalho durante todo esse tempo.
- A todos os integrantes do laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, pela disponibilidade, em especial à Inês pela colaboração na obtenção das amostras necessárias para este estudo.
- A toda a equipe do laboratório de Apoptose, pelo apoio sempre; em especial à Paula Peixoto por se mostrar tão prestativa e amiga; à Luciana Villela pela amizade e companheirismo e à Núbia Braga por todo o auxílio.
- 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 pelo amor, companheirismo, amizade e compreensão nos momentos mais difíceis.
- Ao meu filho por fazer parte da minha vida!
- A todos os meus familiares e amigos pelo interesse e torcida.
- A todos os professores do curso de pós-graduação em Patologia Geral e Patologia Bucal, pela contribuição na minha formação acadêmica.
- À CAPES - 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 auto-imune, cujas formas clínicas mais comuns são os tipos reticular e erosivo. A persistência do infiltrado inflamatório é importante para a patogênese do LPB, mas os mecanismos envolvidos neste processo ainda precisam ser mais investigados. A deficiência de apoptose pode contribuir para essa persistência do infiltrado subepitelial, que é composto predominantemente por linfócitos T CD4+ e CD8+. É sabido que o alvo das células CD8+ (LT citotóxicos) são os ceratinócitos no LPB. O objetivo deste estudo foi avaliar se há bloqueio da apoptose nos linfócitos subepiteliais, elucidar as vias apoptóticas envolvidas, bem como quantificar os linfócitos T CD8+ e sua distribuição nas lesões de LPB dos tipos reticular e erosivo. Foram selecionadas 15 amostras de LPB de cada tipo, reticular e erosivo e 15 de mucosa com hiperplasia fibrosa inflamatória, para o grupo controle. As proteínas Bax, Bcl2, Caspase-3 e -8 e CD8 foram quantificadas por meio de reações imunoistoquímicas. Verificou-se intensa marcação de CD8 (37.03%, erosivo e 32.02%, reticular), e Bcl2 (53.61%, erosivo e 32.05%, reticular) nas amostras de LPB e menor marcação no controle (27.37% e 17.74%, respectivamente). Nos tipos reticular e erosivo não houve diferença na marcação de CD8 ($p > 0.05$). Houve maior marcação do Bcl2, no tipo erosivo em relação ao tipo reticular ($p < 0,05$). Por outro lado, praticamente não houve marcação de Caspase-8 (0.41%, erosivo e 0.44%, reticular) e de Caspase-3 (0.87%, erosivo e 0.89%, reticular) nos grupos de LPB e houve intensa marcação desses anticorpos (31.65%, caspase-8 e 34.95%, caspase-3) no grupo controle. Já o Bax não

apresentou marcação em nenhum dos grupos. A baixa expressão de Caspase-8 e Caspase-3 nos infiltrados inflamatórios de LPB indicam que a via extrínseca não está ativa nessas lesões. Já a baixa expressão de Bax e Caspase-3 e a alta expressão de Bcl2 indicam que a via intrínseca está ativa, mas pode estar sendo bloqueada pela expressão de proteínas anti-apoptóticas. Além disso, a maior expressão de Bcl2 no tipo erosivo em relação ao reticular demonstra uma maior tendência à evasão da apoptose e persistência da inflamação no tipo erosivo.

Palavras-Chave: Líquen Plano Bucal, apoptose, linfócitos T CD8+, Bcl2, Bax, Caspase-3 e Caspase-8

ABSTRACT

The Oral Lichen Planus (OLP) is a chronic inflammatory autoimmune disease whose most common clinical forms are the reticular and erosive types. The persistence of the subepithelial inflammatory infiltrate is important in the pathogenesis of OLP, but the mechanisms involved in this process still have to be investigated. The deficiency of apoptosis may contribute to persistence of the infiltrate, which is comprised predominantly of subepithelial CD4+ and CD8+ T lymphocytes. The target of CD8+ T lymphocytes are the keratinocytes in OLP. The objective of this study was to evaluate the blockage of apoptosis in subepithelial lymphocytes, the involved pathway and quantify CD8+ T lymphocytes in reticular and erosive types of OLP. Fifteen samples of each reticular and erosive types of OLP and 15 samples of mucosa with inflammatory fibrous hyperplasia (control group) were selected. Proteins Bax, Bcl2, Caspase-3 and -8 and CD8 were quantified by Immunohistochemistry. Intense labeling to CD8 (37.03%, erosive and 32.02%, reticular), and to Bcl2 (53.61%, erosive and 32.05%, reticular) occurred in samples of OLP while in the control group labeling were scarce (27.37% and 17.74%, respectively). There was no difference in immunoexpression of CD8 between the reticular and erosive types of OLP ($p>0.05$). Bcl2 labeling was more intense in erosive type than in reticular type ($p<0.05$). On the other hand, immunoexpression of Caspase-8 (0.44%, erosive and 0.41%, reticular) and Caspase-3 (0.87%, erosive and 0.89%, reticular) were poor in inflammatory infiltrates of OLP and were intense in the control group (31.65%, Caspase-8 and 34.95%, Caspase-3). Bax antibody did not result any labeling in OLP and in the

control groups. Low expression of Caspase-8 and Caspase-3 in inflammatory infiltrates of OLP indicate that the extrinsic pathway of apoptosis is not active in those lesions. The low expression of Bax and Caspase-3 and the high expression of Bcl2 in inflammatory infiltrates of OLP indicate that the intrinsic pathway is active, but may be blocked by anti-apoptotic proteins. In addition, the more intense expression of Bcl2 in inflammatory infiltrates in erosive than in reticular types demonstrates a greater tendency to evasion of apoptosis and persistence of inflammation in erosive type.

Keywords: Oral Lichen Planus, apoptosis, T lymphocytes, CD8, Bcl2, Bax, Caspase-3 and Caspase-8

LISTA DE FIGURAS E TABELAS

Página

FIGURA 1	Representação esquemática da via intrínseca da apoptose.....	24
FIGURA 2	Representação esquemática da via extrínseca da apoptose.....	25
TABELA 1	Anticorpo primário: fabricante, recuperação antigênica, diluição e incubação.....	30
FIGURA 3	Fotomicrografias mostrando reação positiva para o anticorpo anti-CD8 nos grupo controle, erosivo e reticular.....	37
FIGURA 4	Fotomicrografias mostrando reação positiva para o anticorpo anti-Bcl2 nos grupos controle, reticular e erosivo.....	40
FIGURA 5	Fotomicrografias mostrando reação positiva para os anticorpos anti-Caspase-8 e anti-Caspase-3 nos grupos controle, reticular e erosivo.....	43

LISTA DE GRÁFICOS

Página

GRÁFICO 1	Determinação do número mínimo representativo de campos microscópicos para o anticorpo anti-CD8.....	32
GRÁFICO 2	Determinação do número mínimo representativo de campos microscópicos para o anticorpo anti-Bcl2.....	33
GRÁFICO 3	Determinação do número mínimo representativo de campos microscópicos para o anticorpo anti-Caspase-8.....	33
GRÁFICO 4	Determinação do número mínimo representativo de campos microscópicos para o anticorpo anti-Caspase-3.....	34
GRÁFICO 5	Distribuição do % de linfócitos CD8+ imunomarcados nos grupos controle, reticular e erosivo.....	38
GRÁFICO 6	Distribuição do % de linfócitos CD8+ imunomarcados entre os grupos reticular e erosivo de LPB.....	38
GRÁFICO 7	Distribuição do % de células imunomarcadas para o anticorpo anti-Bcl2 nos grupos controle, reticular e erosivo.....	41
GRÁFICO 8	Distribuição do % de células imunomarcadas para o anticorpo anti-Bcl2 entre os grupos reticular e erosivo de LPB.....	41
GRÁFICO 9	Distribuição do % de células imunomarcadas para o anticorpo anti-Caspase-8 nos grupos controle, reticular e erosivo.....	44
GRÁFICO 10	Distribuição do % de células imunomarcadas para o anticorpo anti-Caspase-8 entre os grupos reticular e erosivo de LPB.....	44
GRÁFICO 11	Distribuição do % de células imunomarcadas para o anticorpo anti-Caspase-3 nos grupos controle, reticular e erosivo.....	45
GRÁFICO 12	Distribuição do % de células imunomarcadas para o anticorpo anti-Caspase-3 entre os grupos reticular e erosivo de LPB.....	45

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

Bax	Proteína citosólica pró-apoptótica da família Bax
Bcl2	Proteína citosólica anti-apoptótica da família Bax
Bclx	Proteína citosólica anti-apoptótica da família Bax
Bid	Proteína citosólica pró-apoptótica da família Bax
AIF	Do inglês <i>Apoptosis Inducing Factor</i> – Fator Indutor de Apoptose
CV	Coeficiente de Variação
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
CSN	Conselho Nacional de Saúde
DAB	Diaminobenzidina
DD	Do inglês <i>Death Domain</i> – Domínio de Morte
DED	Do inglês <i>Death Effector Domain</i> – Domínio Efetor de Morte
DNA	Do inglês <i>Deoxyribonucleic Acid</i> - Ácido desoxirribonucléico
FO-UFMG	Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais
IAP	Do inglês <i>Inhibitor of Apoptosis Protein</i> – Proteína Inibidora de Apoptose
LPB	Líquen Plano Bucal
LPC	Líquen Plano Cutâneo
LT	Linfócito T
PBS	Do inglês <i>Phosphate Buffered Saline</i> - Tampão de salina fosfatada
Smac	Do inglês <i>Second Mitochondrial Activator of Caspases</i> – Segundo Ativar Mitochondrial de Caspases
TNF-R1	Receptor R1 do Fator de Necrose Tumoral
TNF- α	Fator de Necrose Tumoral- α

SUMÁRIO

	Página
1. INTRODUÇÃO.....	14
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	16
2.1. Líquen Plano Bucal.....	16
2.1.1. Aspectos Clínicos.....	16
2.1.2. Aspectos Histopatológicos.....	18
2.1.3. Patogênese.....	20
2.2. Apoptose.....	21
2.2.1. Vias Apoptóticas.....	22
3. OBJETIVOS.....	26
3.1. Objetivos Gerais.....	26
3.2. Objetivos Específicos.....	26
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	27
4.1. Obtenção das Amostras.....	27
4.2. Processamento Histológico.....	27
4.3. Reações Imunoistoquímicas.....	28
4.4. Análises das Imunomarcações.....	31
4.5. Parâmetros e Estratégia Morfométrica.....	31
4.6. Quantificação das Imunomarcações.....	34
4.7. Análise Estatística.....	34
5. RESULTADOS.....	36
6. DISCUSSÃO.....	46
7. CONCLUSÕES.....	51
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS.....	52
9. ANEXO A (parecer do COEP).....	59
10. ANEXO B (artigo submetido ao JOPM).....	61
11. ANEXO C (artigo submetido à BDJ).....	80

1. INTRODUÇÃO

O Líquen Plano Bucal (LPB) é uma doença auto-imune ^{1,2,3} que afeta cerca de 1 a 2% da população ⁴. Sua patogênese ainda é obscura, apesar de incessantes investigações ⁵.

Muitos autores sugerem tratar-se de um distúrbio imunológico persistente, mediado por linfócitos, sendo os ceratinócitos basais os alvos dos linfócitos T ^{6,7,8}.

O infiltrado de linfócitos T (LT) é composto por células CD4+ e CD8+, com distribuição variável. Os LTs CD8+ mostram uma grande afinidade pelos ceratinócitos quando comparado com os CD4+ ⁹. As células citotóxicas CD8+ podem desencadear a apoptose dos ceratinócitos no LPB ^{10,11,12}.

A apoptose é um mecanismo importante na destruição das células da camada basal ^{13,14,15,16}, mas a sua ocorrência no infiltrado linfocitário tem sido pouco estudada. Os mecanismos de persistência destas células no foco da lesão, se por um permanente recrutamento ou por inibição da apoptose dos linfócitos T ^{17,18}, ainda precisam ser investigados. Acreditamos que os dois mecanismos possam estar agindo simultaneamente, mas diferentemente quando se compara os tipos clínicos, reticular e erosivo de LPB.

Considerando a incidência do LPB na população e o fato de que muitos aspectos da doença ainda não são conhecidos, o propósito desse trabalho é avaliar se há bloqueio da apoptose contribuindo para a persistência do infiltrado linfocitário nas lesões de LPB, elucidar as vias apoptóticas envolvidas e quantificar os linfócitos T CD8+ na inflamação. Adicionalmente procurar-se-á comparar

diferenças nas vias apoptóticas bloqueadas e/ou envolvidas e na quantificação dos linfócitos T CD8+ nos tipos reticular e erosivo de LPB, procurando assim esclarecer as diferentes manifestações clínicas encontradas nestas duas formas da doença.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1. Líquen Plano Bucal

2.1.1. Aspectos Clínicos

O Líquen Plano Bucal (LPB) é uma doença inflamatória crônica não contagiosa e recorrente, 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 ^{19,20}.

O LPB é uma das doenças mais comuns encontradas nas clínicas de patologia oral ²¹ sendo mais freqüentemente encontrado na mucosa jugal, língua e gengiva ^{11,22,23}.

A verdadeira prevalência é desconhecida e vários estudos sugerem uma incidência de 1 a 2 % da população geral ^{4,22,24}. Segundo MONCARZ *et al.* (1993) ²⁵, o LPB representa 9% de todas as lesões brancas da cavidade bucal.

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 ^{22,26,27}. O LPB é raríssimo em pacientes melanodermas, sendo mais freqüente o Líquen Plano Cutâneo (LPC) ²⁸.

O LPB aparece em diferentes formas clínicas: papular, reticular (como as estrias de *Wickham*), em placa, erosiva, ulcerativa e bolhosa, baseadas na

aparência da lesão ^{22,26,27}. As lesões do LPB podem durar de meses a anos ²⁹ e o seu aparecimento pode ocorrer de forma isolada ou combinada ³⁰.

De acordo com VINCENT (1991) ³¹, o pleomorfismo clínico do LPB representaria sinais clínicos com vários níveis de atividade identificados simultaneamente em diferentes regiões da boca, ou diversas fases evolutivas do processo.

Alguns autores afirmam que existem essencialmente apenas duas formas clínicas, a reticular e erosiva ^{20,32,33}.

A forma reticular é a mais encontrada e se apresenta como uma rede de conexões e linhas brancas sobrepostas, pápulas ou placas. Frequentemente os pacientes desconhecem sua presença ²², pois raramente são acompanhadas de sintomas ²³.

As formas erosiva/ulcerativa são mais destrutivas e causam grande desconforto bucal ^{4,23}, enquanto a forma reticular reflete uma fase mais amena da doença. Lesões erosivas/ulcerativas, depois de tratadas, frequentemente recidivam na forma reticular ³⁰.

Na pele, o líquen plano é caracterizado por pequenas pápulas purpúreas com estrias brancas (estrias de *Wickham*), pruriginosas, simétricas e com predileção pelas superfícies flexoras de extremidades, região sacral e genitália ¹⁹. Segundo BOYD *et al.* (1991) ³⁴ o LPC apresenta um curso bem definido, enquanto as lesões bucais são crônicas e recorrentes.

Para GANDOLFO *et al.* (2004) ²⁸ 90 % das lesões são acompanhadas de comprometimento bucal que muitas vezes precedem as de pele, sendo um sinal importante para o diagnóstico precoce. As lesões cutâneas são observadas em 20

a 60 % dos pacientes com LPB e é mais freqüente que o LPC numa proporção de 8:1. O LPB pode ocorrer sem a manifestação cutânea ¹⁹.

Existe controvérsia sobre a possibilidade do LPB ser 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, como o tabaco e o álcool ³⁵. Apesar de trabalhos sugerirem uma alta incidência de carcinoma epidermóide bucal nesses pacientes ^{36,37,38}, alguns autores ainda consideram circunstanciais as evidências de transformação maligna ³⁹.

Segundo GANDOLFO *et al* (2004) ²⁸ o risco do aparecimento de câncer bucal associado ao LPB independe do tipo clínico e da terapia administrada.

Devido à incerteza da natureza pré-maligna do LPB e pelo fato da detecção precoce do câncer bucal resultar em maior sobrevida do paciente, é prudente monitorar todos os pacientes com LPB durante um longo período ²².

Os pacientes com LPB assintomático não necessitam de tratamento devendo ser acompanhados a cada seis meses ^{20,22}. Nos casos sintomáticos, estes devem receber tratamento adequado e serem avaliados a cada três meses ²⁰.

Indiscutivelmente o agente mais usado e eficaz no tratamento do LPB são os corticosteróides, por via tópica ou sistêmica. Os corticosteróides restringem parcialmente a atividade do infiltrado linfocitário subepitelial ³¹.

Não existe cura para o LPB, o que se faz é o tratamento dos sintomas. Acredita-se que a terapia utilizada não influencia no curso natural da doença ³⁴.

2.1.2. Aspectos Histopatológicos

O LPB é caracterizado histologicamente por um denso infiltrado linfocitário subepitelial ^{24,40} disposto em banda e pela desestruturação da camada basa do epitélio ^{6,10,23,27,40}. Os ceratinócitos basais formam corpos colóides ou de “Civatte” ^{11,41}, que aparecem como glóbulos homogêneos eosinofílicos. A ultra-estrutura dos corpos de “Civatte” sugere que eles sejam ceratinócitos apoptóticos. As mudanças na camada basal do epitélio envolvem fraturas, interrupções e duplicações ⁴². Em adição, os ceratinócitos basais ancoram em hemidesmossomos e filamentos alterados resultando em fissuras microscópicas entre o epitélio e o tecido conjuntivo ²¹.

As células CD8+ estão aumentadas nas regiões intraepitelial e superficial da lâmina própria e sua atividade citotóxica é encontrada adjacente à camada basal ^{9,17}. Nos estágios precoces do LPB, o infiltrado é constituído de macrófagos e linfócitos CD4+ ⁴³. Com a progressão da doença pode ocorrer um aumento gradual de células CD8+ ^{17,44}, com grande afinidade pelos ceratinócitos quando comparado com as células CD4+ ⁹.

De acordo com PELISSIER & MISIPO (1990) ⁴³ os achados histológicos são relativamente constantes nos tipos de LPB, mas certas variações podem ocorrer com o tempo de evolução da lesão e a forma clínica. 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 ^{31,43}.

2.1.3. Patogênese

O papel da auto-imunidade na patogênese do LPB é sustentado por muitas características ⁴⁵, incluindo início em adultos, predileção pelo sexo feminino, associação com outras doenças auto-imunes, atividade supressora deprimida e a presença de células T citotóxicas auto-reativas ^{21,46}.

A destruição da camada basal é resultado do efeito citotóxico dos linfócitos T no infiltrado inflamatório subepitelial ^{11,13,21,24,38}. Os linfócitos T ativados liberam citocinas mediadoras do recrutamento e persistência dos linfócitos, bem como da morte dos ceratinócitos basais ^{13,30,45}.

Os mecanismos usados pelas células T CD8+ para desencadear a apoptose não são claros, e incluem ^{10,47,48}:

1. Células T CD8+ secreta TNF- α que se liga ao receptor TNF-R1 na superfície dos ceratinócitos.

2. Fas L na superfície do LT CD8+ se liga ao Fas R na superfície dos ceratinócitos.

3. Células T CD8+ secreta granzima B, que age via perforinas, induzindo poros na membrana dos ceratinócitos.

A granzima B cliva e ativa a Caspase-3, que leva as células epiteliais à morte por apoptose ¹⁵.

2.2. Apoptose

A apoptose foi descrita pela primeira vez por KERR *et al.* em 1972 e representa um tipo especial de morte celular onde a própria célula individualmente aciona mecanismos que resultam em sua autodestruição ^{49,50,51}. Trata-se de uma morte programada e ativa, que requer energia, síntese e degradação protéica ^{50,51}. Através dela, os organismos vivos eliminam as células potencialmente prejudiciais para a manutenção da homeostase ^{52,53}. É um mecanismo fisiológico de controle celular, que regula o tamanho dos tecidos exercendo um papel oposto ao da mitose ⁵⁴.

A apoptose é induzida por processos fisiológicos e patológicos. Pode ser ativada em resposta a diversos estímulos: fatores hormonais, ação de citocinas, ação do sistema imune, infecções virais, homeostasia em tecido adulto, radiações, hipertermia, toxinas e outros fatores físicos ⁵⁵.

Vários aspectos morfológicos são usados para caracterizar uma célula apoptótica. À microscopia óptica, apresentam-se retraídas, circundadas por um halo claro e possuem citoplasma acidófilo. Seus núcleos sofrem marginação, condensação e fragmentação da cromatina, seguido de fragmentação da própria célula em corpos apoptóticos ⁵¹. Estes podem ser fragmentos citoplasmáticos,

nucleares ou ambos, que são reconhecidos e fagocitados por histiócitos e/ou células parenquimatosas adjacentes, sem induzir inflamação^{56,57}.

De acordo com SEARLE *et al.* (1982)⁵⁸ a apoptose apresenta duas fases: condensação nuclear e fragmentação citoplasmática formando os corpos apoptóticos, e fagocitose e digestão desses fragmentos pelas células adjacentes.

A ausência ou a exacerbação do fenômeno de apoptose pode resultar em conseqüências desastrosas para os tecidos⁵⁹. Sua inibição está relacionada com o desenvolvimento de tumores e auto-imunidade, enquanto sua indução excessiva pode acarretar doenças regressivas e imunossupressão^{50,51,60}.

A apoptose é de grande importância na manutenção do sistema imune saudável. Durante o curso da resposta imune, células de defesa são recrutadas e atuam contra os antígenos. Quando estes são eliminados, a população celular no infiltrado diminui por dois mecanismos: remoção por apoptose e pela redução no recrutamento de novas células com a resolução da inflamação^{61,62}.

A desregulação da apoptose pode desencadear um mecanismo de evasão, com bloqueio da mesma, resultando na sobrevivência prolongada das células inflamatórias e na persistência da inflamação no tecido⁶³.

2.2.1. Vias Apoptóticas

A ativação das caspases é responsável pela maioria das mudanças morfológicas observadas neste tipo de morte celular⁶⁴. As caspases são enzimas que possuem cisteína no sítio ativo e clivam proteínas nos resíduos de ácido aspártico⁶⁵. São produzidas como enzimas inativas (pró-caspases), sendo

ativadas pelo deslocamento da molécula inibidora ou por clivagem proteolítica. Atualmente são conhecidas 12 caspases, porém nem todas estão envolvidas na apoptose. As caspases diretamente envolvidas podem ser classificadas em ativadoras (8, 9 e 10) e efetadoras (3, 6 e 7). As ativadoras fazem proteólise das efetadoras que ativam outras proteases e degradam diferentes substratos das células ^{64,65}.

Existem duas vias clássicas para a apoptose: extrínseca - mediada pelo receptor de morte e intrínseca – mediada por sinais internos mitocondriais ^{66,67,68}.

A via intrínseca ou mitocondrial é ativada em resposta a alterações intracelulares, incluindo a retirada de fatores de crescimento, diferenciação terminal, danos no DNA, estresse no retículo endoplasmático, dentre outros. Estes estímulos ativam um ou mais membros pró-apoptóticos da família Bcl (ex. Bax) que inibem a ação das proteínas anti-apoptóticas e alteram a permeabilidade da membrana mitocondrial. Há a liberação do citocromo C que combinado com a proteína Smac (de *Second mitochondrial activator of caspases*) forma o AIF (de *Apoptosis Inducing Factor*), e ativa a caspase 9 ou as efetadoras diretamente ⁶⁹. As caspases 3, 6 e 7 ativam endonucleases e outras proteases, que clivam o DNA, e degradam diferentes substratos celulares, resultando na morte da célula ⁶⁹ (Figura 1).

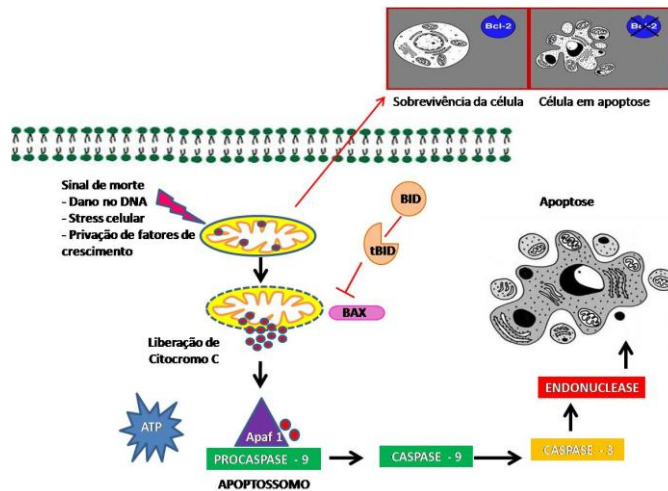


Figura 1: Representação esquemática da via intrínseca da apoptose. Diversos estímulos alteram a permeabilidade da membrana mitocondrial, levando à liberação de citocromo C para o citosol e a formação do apoptossomo. A caspase-9 ativa as caspases efetoras.

A via extrínseca é acionada pelo acoplamento de ligantes aos receptores de morte ^{59,68,70}, que se localizam na membrana celular. São eles: Fas, receptor TNF α , DR4 e DR5. Estes receptores ativados sofrem dimerização e autofosforilam o domínio da morte (DD de *Death Domain*) ⁶⁸. Uma proteína de adaptação se liga a uma efetadora do domínio da morte (DED de *Death Effector Domain*) que cliva as pró-caspases 8 e 10 em caspases ativas, acionando as efetadoras ^{59,69} (Figura 2). Além disto, a caspase 8 cliva o Bid, proteína citosólica pró-apoptótica da família Bax, originando um fragmento que se liga à proteína Bcl2 inibindo-a. Isso altera a permeabilidade mitocondrial, liberando o citocromo C, proteína SMAC e AIF, que ativam a caspase 9 ou as efetadoras ^{59,69,71}.

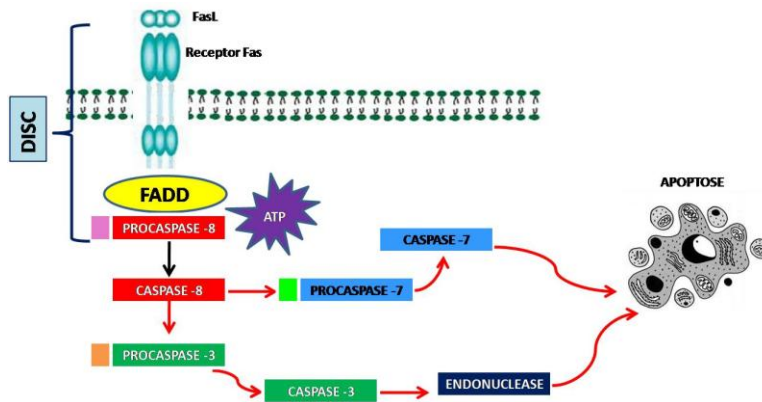


Figura 2: Representação esquemática da via extrínseca da apoptose com a participação das principais proteínas.

As proteínas citosólicas regulam a apoptose por inibirem as caspases ou por regularem a permeabilidade das mitocôndrias ^{66,69}. Os IAPs (*Inhibitor of Apoptosis Proteins*) formam uma família de proteínas inibidoras que inibem as caspases efetadoras 3 e 7 e a caspase ativadora 9 ^{66,67,69}.

A família Bcl consiste de membros anti e pró-apoptóticos que determinam sobrevivência ou morte para a célula ⁷². As anti-apoptóticas, como Bcl2 e Bclx, localizam-se na membrana mitocondrial e regulam proteínas formadoras de poros controlando a permeabilidade da mitocôndria. As pró-apoptóticas, como Bax formam homo e heterodímeros. A dimerização de Bax resulta em sua translocação ⁷³ e inserção na membrana mitocondrial, inibindo as proteínas anti-apoptóticas, com disfunção e permeabilização mitocondrial, e liberação de citocromo C ⁷⁴. O apoptossomo formado induz a cascata proteolítica das caspases, ativando endonucleases, condensando a cromatina, e fragmentando o DNA, ocasionando a morte celular ^{64,75,76}.

3. OBJETIVOS

3.1. OBJETIVOS GERAIS

Avaliar se há bloqueio da apoptose nos linfócitos subepiteliais, elucidar as vias apoptóticas envolvidas, bem como quantificar os linfócitos T CD8+ e sua distribuição, nas lesões de LPB dos tipos reticular e erosivo, através da imunistoquímica de proteínas chaves na regulação da apoptose.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

- Quantificar os linfócitos CD8 no infiltrado linfocitário subepitelial, nas lesões de LPB dos tipos reticular e erosivo.
- Avaliar a expressão da proteína Bcl-2, no infiltrado inflamatório subepitelial, nos tipos reticular e erosivo de LPB.
- Identificar a expressão da proteína Bax, no infiltrado inflamatório subepitelial, nos tipos reticular e erosivo de LPB.
- Identificar a expressão de caspases desencadeante (Caspase-8) e efetora (Caspase-3), no infiltrado inflamatório subepitelial, nos tipos reticular e erosivo de LPB.
- Verificar se essas moléculas se expressam diferentemente nos tipos reticular e erosivo de LPB.

4. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1. Obtenção das Amostras

Para este estudo retrospectivo, lesões e respectivas fichas de pacientes diagnosticados clínica e histologicamente como líquen plano bucal dos tipos reticular e erosivo, além de hiperplasia fibrosa inflamatória (controle) foram selecionadas dos arquivos do laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais (FO-UFMG)..

Quinze amostras de cada lesão - LPB reticular, LPB erosivo e hiperplasia fibrosa inflamatória foram selecionadas, seguindo-se os critérios clínicos adotados por ANDREASEN (1968) ⁷⁷ e processadas rotineiramente para histologia.

O presente estudo foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (parecer nº ETIC 333/09), conforme as resoluções CNS nº196/96 e 304/00 do Conselho Nacional de Saúde, sobre Diretrizes e Normas Regulamentadoras de Pesquisas Envolvendo Seres Humanos.

4.2. Processamento Histológico

Dos blocos selecionados obtiveram-se secções de 4 µm de espessura, em lâminas gelatinizadas, que foram submetidas às reações imunoistoquímicas e examinadas em microscopia de luz e sistema de morfometria para quantificação das proteínas marcadas e das células totais.

Para a gelatinização das lâminas foi utilizado 30g de gelatina (Vetec), 3g de sulfato de cromo e potássio (Vetec) e 3 litros de água destilada. As lâminas foram lavadas em água corrente por 2 horas e passadas em 5 banhos de água destilada. A água destilada foi fervida (30 minutos, microondas, potencia 9), levada ao agitador e com o magneto acionado em alta velocidade a gelatina foi adicionada. Após a completa dissolução da gelatina o sulfato de cromo e potássio foi acrescentado. A solução foi despejada sobre as lâminas que ficaram em repouso por 4 horas. As lâminas foram retiradas da solução e dispostas sobre papel filtro, por 12 horas.

4.3. Reações Imunoistoquímicas

Para as reações com os anticorpos anti-caspases 3 e 8, anti-Bcl2 e anti-CD8 seguiu-se o mesmo protocolo: as lâminas foram incubadas em xilol I *overnight* à temperatura ambiente, xilol II por 15 minutos, etanol absoluto I por 5 minutos, etanol absoluto II por 5 minutos, etanol 95% por 5 minutos, etanol 80% por 5 minutos, solução de hidróxido de amônio 10% em etanol 95% por 10 minutos e lavadas em 5 banhos de água destilada. Para a recuperação antigênica as lâminas foram imersas em soluções específicas conforme padronizado para cada anticorpo (tabela 1) e colocadas na panela de pressão por 20 minutos. Aguardou-se 20 minutos para a abertura da panela de pressão. Após resfriamento, as lâminas foram lavadas em 5 banhos de água destilada. Para o bloqueio da peroxidase endógena as lâminas foram incubadas em peróxido de hidrogênio 10 volumes em 2 banhos de 15 minutos cada. As lâminas foram

lavadas com 5 banhos de água destilada. A seguir foram incubadas em tampão TRIS-HCL 20mM pH 7.4 (2.42g TRIS, 8.5g NaCl em 1000 ml de água destilada) em 3 banhos de 5 minutos cada. Foi feita a incubação do anticorpo primário de acordo com a diluição correspondente a cada anticorpo (tabela 1) em tampão BSA (1.25 ml de solução de albumina - 20ml de água destilada, 1g de albumina -, 2.5 ml de solução de azida - 20ml de água destilada, 1g de azida sódica) *overnight* à 4° C. As lâminas foram lavadas em 3 banhos de 5 minutos cada em tampão TRIS-HCL 20mM. O anticorpo secundário (kit DakoCytomation LSAB2 System-HRP) foi incubado por 30 minutos em temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas em 3 banhos de 5 minutos cada em tampão TRIS-HCL 20mM. A solução streptavidina-biotina (kit Dako) foi aplicada sobre os cortes permanecendo por 30 minutos em temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas em 3 banhos de 5 minutos cada em tampão TRIS-HCL 20mM. Como solução reveladora foi utilizado um kit Dako de DAB (diaminobenzidina) líquida (1ml do tampão do kit, 1 gota de DAB) que foi aplicada sobre os cortes por 5 minutos. As lâminas passaram por um banho de tampão TRIS-HCL 20mM e em 5 banhos de água destilada. Para contra coloração as lâminas foram imersas em hematoxilina de Mayer's por 60 segundos e então lavadas em 5 banhos de água destilada. As lâminas foram incubadas em etanol 70% por 5 minutos, etanol 90% por 5 minutos, etanol absoluto I por 5 minutos, etanol absoluto II por 10 minutos, etanol absoluto III por 10 minutos, xilol I por 5 minutos, xilol II por 10 minutos e montadas com lamínulas de vidro e Permout (Fisher Scientific, Fair Lawn, USA, código SP15-500).

Tabela 1 – Anticorpo primário: fabricante, recuperação antigênica, diluição e incubação

<i>Anticorpo Monoclonal</i>	<i>Clone do fabricante</i>	<i>Recuperação Antigênica</i>	<i>Diluição</i>	<i>Incubação</i>
Anti-Caspase 3	<i>Mouse Monoclonal Novocastra NCL-CPP32 clone JHM62</i>	TRIS-EDTA PH=9,0	1:200	18h
Anti-Caspase 8	<i>Mouse Monoclonal Novocastra NCL-CASP-8 clone 11B6</i>	Ác. Cítrico PH=6,0	1:200	18h
Anti-Bcl2	<i>Mouse Monoclonal DakoCytomation Clone 124,</i>	Ác. Cítrico PH=6,0	1:150	18h
Anti-Bax	<i>Mouse Monoclonal Invitrogen clone 2D2</i>	Ác. Cítrico PH=6,0	1:200	18h
Anti-CD8	<i>Mouse Monoclonal Novocastra NCL-L-CD8-295</i>	TRIS-EDTA PH=9,0	1:100	18h

Para a reação com o anticorpo anti-Bax seguiu-se o mesmo protocolo, com as seguintes diferenças: as lâminas foram incubadas em xilol I por 20 minutos, xilol II por 20 minutos, lavadas em etanol absoluto I e II, 90%, 80% e 70 %, 10 mergulhos em cada. As lâminas foram então lavadas por uma vez em PBS. A recuperação antigênica foi similar às reações já descritas. Para o bloqueio da peroxidase endógena foi utilizado Peroxidase block (Reagente do kit ARK Dako – K 3954 - pronto para uso/ Frasco 1). Pingou-se o reagente sobre os cortes e incubou por 15 minutos, em temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas em

5 banhos de água destilada, e lavadas por uma vez em PBS por 5 minutos. A incubação do anticorpo primário foi similar às reações já descritas. As lâminas foram lavadas em 2 banhos de 5 minutos cada em PBS. Foi aplicado o Streptoavidin-Peroxidase (Reagente do kit ARK Dako – K 3954 - pronto para uso/ Frasco 4) em quantidade suficiente para cobrir os cortes em câmara úmida por 15 minutos em temperatura ambiente. As lâminas foram lavadas em 2 banhos de 5 minutos cada em PBS. A revelação, contracoloração e montagem das lâminas foram similares às reações já descritas.

4.4. Análises das Imunomarcações

Para as Caspases-3 e -8, proteínas Bcl2, Bax e CD8, foram digitalizadas imagens dos campos histológicos utilizando microscópio óptico (Carl Zeiss – Axiostar 1122-100) com objetiva de 100X e transferidas ao analisador de imagens (Kontron Electronics, Carl Zeiss - KS300 versão 2.0).

4.5. Parâmetros e Estratégia Morfométrica

Os números mínimos representativos de campos a serem analisados foram calculados em cada secção, em áreas representativas da lesão, a partir da contagem inicial de 50 a 100 campos tomados aleatoriamente de uma lâmina ⁷⁸. Desses, formou-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 resultar em redução considerável no valor do CV considera-se que o tamanho daquela amostra como mínimo representativo ⁷⁹.

A variação do número de células imunomarcadas dos grupos estudados no infiltrado inflamatório subepitelial estabilizou-se a partir de 15 campos em todos os anticorpos analisados (anti-CD8, anti-Bcl2, anti-Caspases-3 e -8) conforme demonstrado nos gráficos a seguir:

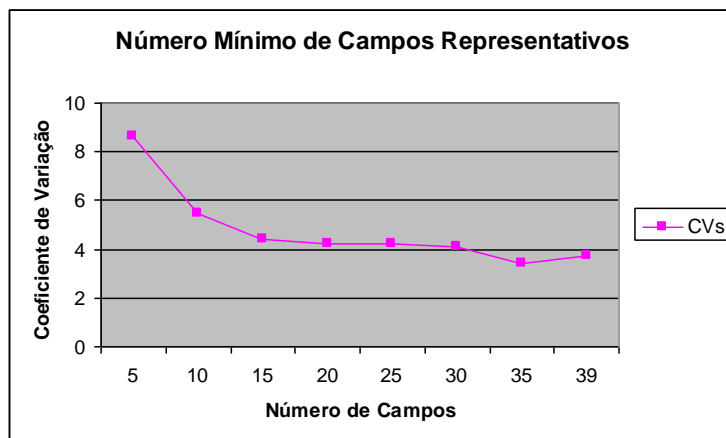


Gráfico 1: Determinação do número mínimo representativo de campos microscópicos para quantificação do % de imunomarcção para o anticorpo anti-CD8.

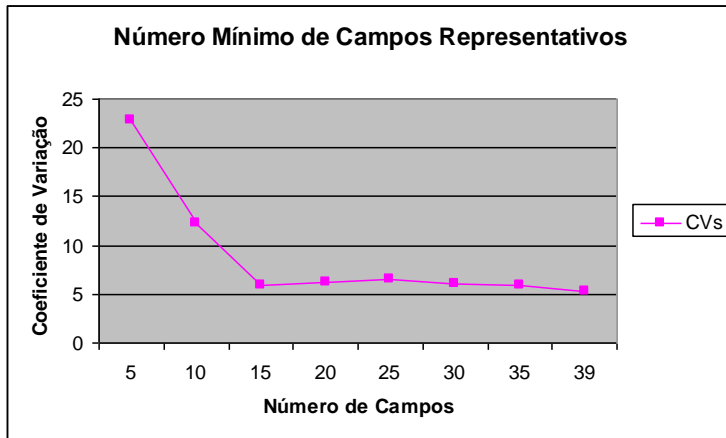


Gráfico 2: Determinação do número mínimo representativo de campos microscópicos para quantificação do % de imunomarcacão para o anticorpo anti-Bcl2.

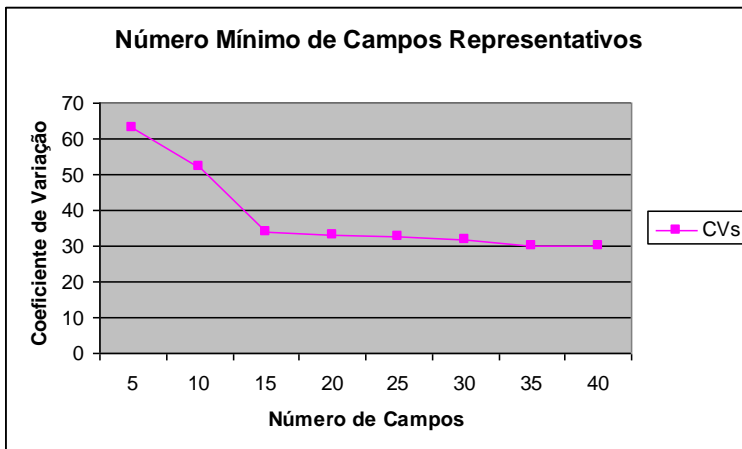


Gráfico 3: Determinação do número mínimo representativo de campos microscópicos para quantificação do % de imunomarcacão para o anticorpo anti-Caspase-8.

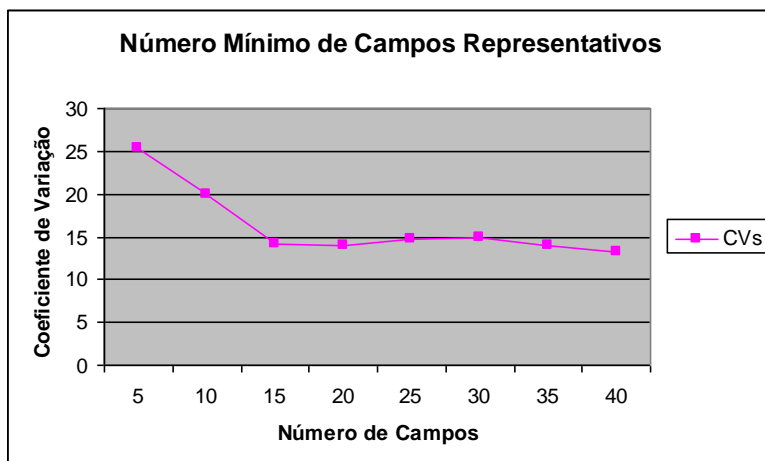


Gráfico 4: Determinação do número mínimo representativo de campos microscópicos para quantificação do % de imunomarcagem para o anticorpo anti-Caspase-3.

4.6. Quantificação das Imunomarcações:

As quantificações foram realizadas por um único observador, sendo consideradas imunopositivas as células com citoplasma acastanhado, independentemente da intensidade de coloração. Para cada lâmina foi estabelecido a porcentagem de células imunopositivas, multiplicando o número de células imunopositivas por 100 e dividindo o resultado pelo número total de células contadas.

4.7. Análise Estatística

Os resultados foram apresentados como média \pm erro padrão ou mediana conforme tenha tido uma distribuição normal ou não, como verificado pelos testes

de *Kolmogorov-Smirnov* e *Shapiro-Wilk*. 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 estas análises foi utilizando o programa estatístico Bioestat versão 4.0.

5. RESULTADOS

Secções histológicas, tratadas com anticorpo anti-CD8 exibiram grumos castanhos amarronzados nas células presentes no infiltrado inflamatório subepitelial, evidenciando marcações positivas para Linfócitos CD8+ (Figura 3). Em todas as lâminas analisadas foi encontrado um grande número de linfócitos CD8+, tanto nas amostras de Líquen Plano Bucal dos tipos reticular (32.02%) quanto erosivo (37.03%), entretanto, sem apresentar diferença significativa entre as formas clínicas ($p > 0,05$) (Gráfico 6). As amostras do grupo controle apresentaram menor quantidade de células CD8+ (27.37%) que os casos de líquen plano ($p < 0,05$) (Gráfico 5).

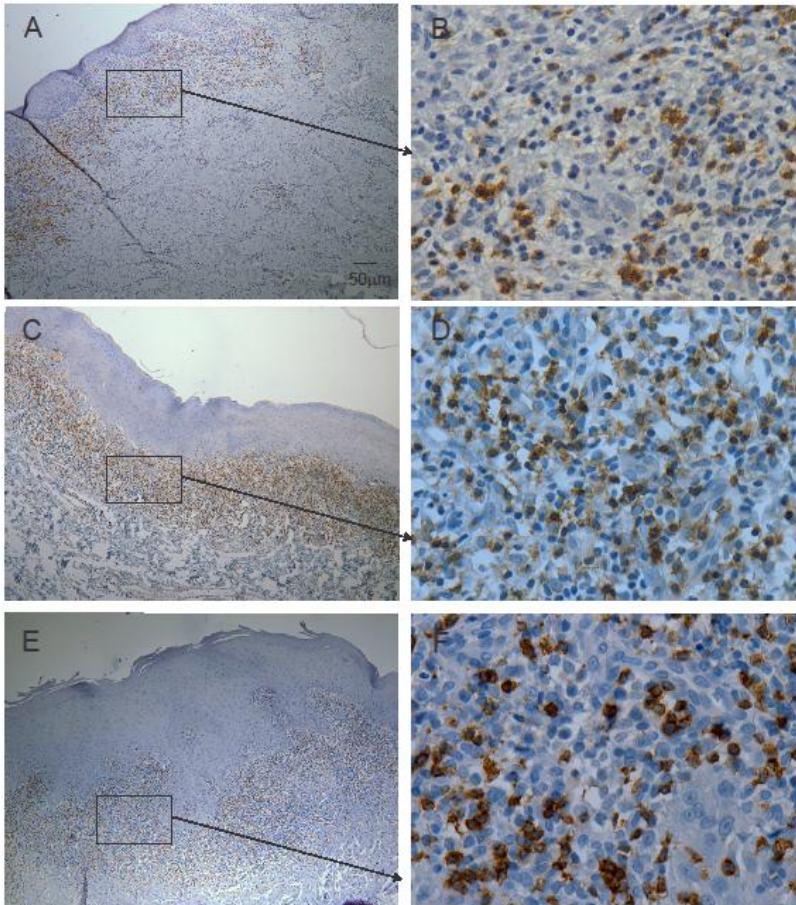


Figura 3: Fotomicrografias mostrando reação positiva para o anticorpo anti-CD8. A e B) Controle. C e D) LPB Erosivo. E e F) LPB Reticular. Observar presença de grupos acastanhados evidenciando marcação positiva das células presentes no infiltrado inflamatório subepitelial.

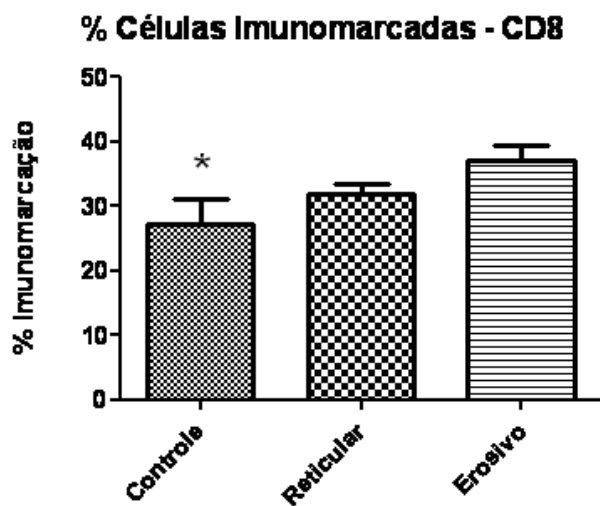


Gráfico 5: Distribuição do % de linfócitos CD8+ imunomarcados nos grupos controle, reticular e erosivo. Houve menor % de imunomarcagem no grupo controle em relação aos grupos reticular e erosivo de LPB ($p < 0,05$).

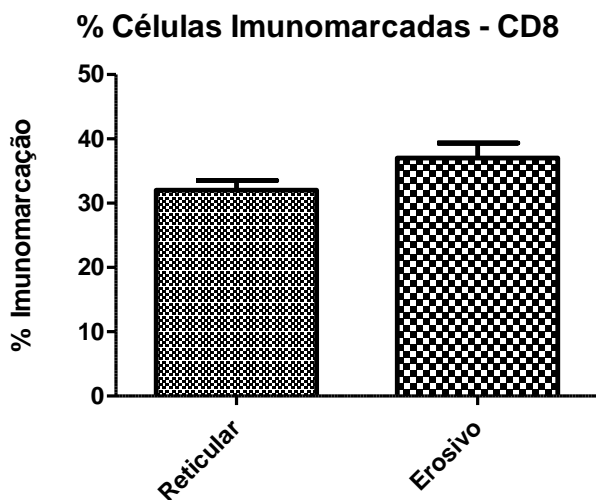


Gráfico 6: Distribuição do % de linfócitos CD8+ imunomarcados entre os grupos reticular e erosivo de LPB. Não houve diferença estatística no % de imunomarcagem no grupo erosivo em relação aos grupos reticular ($p > 0,05$).

Secções histológicas, tratadas com anticorpo anti-Bcl2 exibiram grumos castanhos amarronzados nas células presentes no infiltrado inflamatório subepitelial, evidenciando marcações positivas para esse anticorpo (Figura 4). Houve extensa marcação nas amostras de Líquen Plano Bucal dos tipos reticular (32.05%) e erosivo (53.61%) e menor marcação nas amostras do grupo controle (17.74%). O número de células imunopositivas para Bcl-2 no tipo erosivo foi maior em relação ao tipo reticular de LPB, e nestas em relação ao grupo controle (Gráficos 7 e 8), sendo estes resultados significativos ($p < 0,05$).

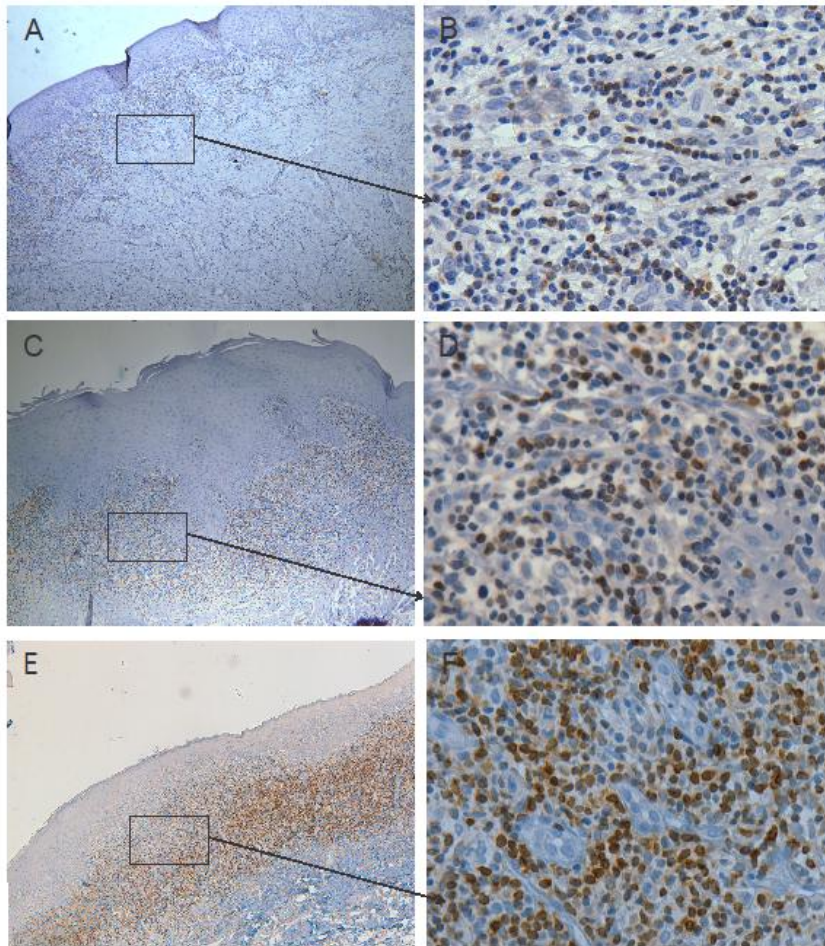


Figura 4: Fotomicrografias mostrando reação positiva para o anticorpo anti-Bcl2. A e B) Grupo controle: observar menor marcação no infiltrado inflamatório subepitelial. C e D) LPB Reticular: observar moderada marcação no infiltrado inflamatório subepitelial. E e F) LPB Erosivo: observar intensa marcação no infiltrado inflamatório subepitelial.

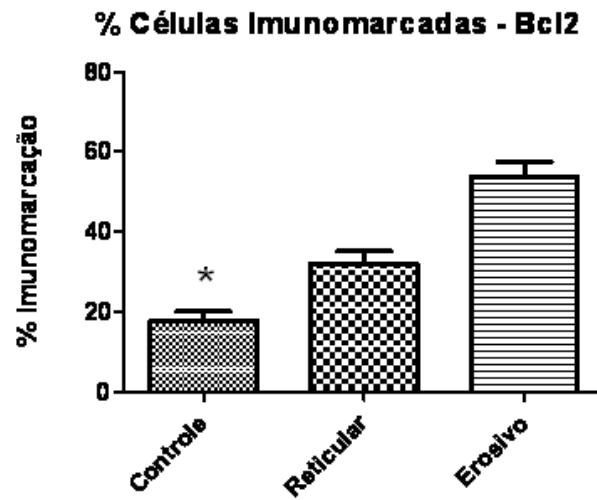


Gráfico 7: Distribuição do % de células imunomarcadas com o anticorpo anti-Bcl2 nos grupos controle, reticular e erosivo. Houve menor % de imunomarcagem no grupo controle em relação aos grupos reticular e erosivo de LPB ($p < 0,05$).

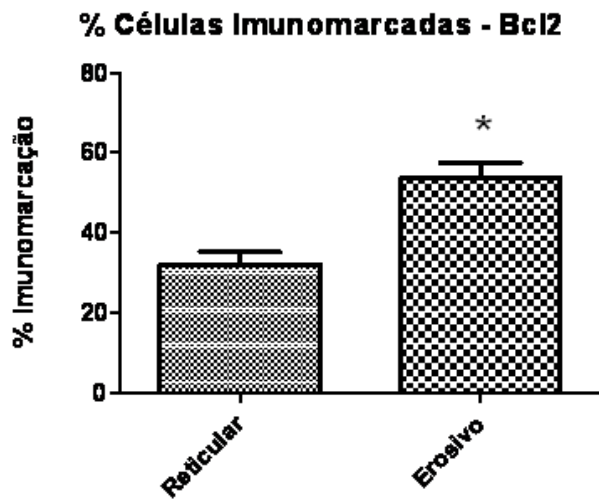


Gráfico 8: Distribuição do % de células imunomarcadas com o anticorpo anti-Bcl2 entre os grupos reticular e erosivo de LPB. Houve maior % de imunomarcagem no grupo erosivo em relação aos grupos reticular ($p < 0,05$).

Houve ampla marcação imunoistoquímica para Caspase-8 (31.65%) e Caspase-3 (34.95%) nas amostras do grupo controle e escassa marcação nas amostras de LPB dos tipos reticular (0.44% e 0.89%, respectivamente) e erosivo (0.41% e 0.87%, respectivamente) (Figura 5), sendo estes resultados significativos ($p < 0,05$) (Gráficos 9 e 11). Com relação aos tipos reticular e erosivo de LPB praticamente não houve diferença no % de imunomarcção desses anticorpos ($p > 0,05$) (Gráficos 10 e 12). Secções histológicas, tratadas com anticorpos anti-Caspase-8 e anti-Caspase-3 exibiram grumos castanhos amarronzados nas células presentes no infiltrado inflamatório subepitelial nas amostras do grupo controle, evidenciando marcações positivas para esses anticorpos (Figuras 5A e 5D). Já nas amostras de LPB, praticamente não houve imunomarcção para esses anticorpos quando presentes na banda de infiltrado inflamatório subepitelial (Figuras 5B, 5C, 5E e 5F), mas ao analisar as camadas mais profundas da submucosa, observou-se presença de algumas células imunomarcadas (Figuras 5B, 5C, 5E e 5F). Com relação ao anticorpo anti-Bax, não houve marcação nos infiltrados do grupo controle e das lesões do tipo reticular e erosivo de LPB.

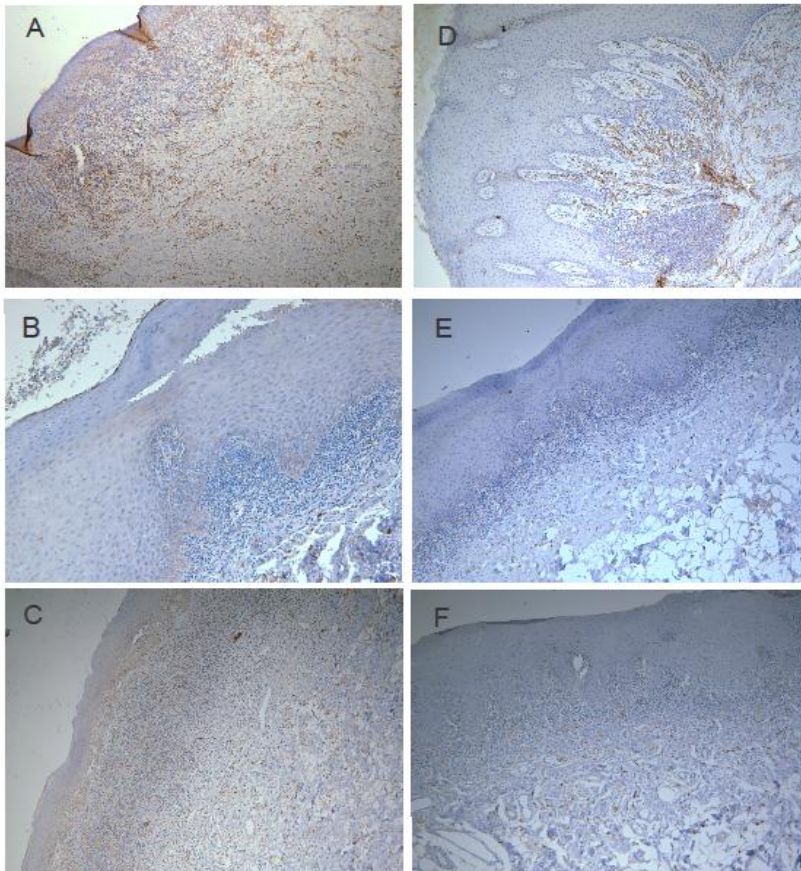


Figura 5: Fotomicrografias mostrando reação positiva para Caspase-8 e Caspase-3. A) Caspase-8 no grupo Controle; B e C) Caspase-8 no LPB Reticular e Erosivo respectivamente: observar ausência de marcação no infiltrado inflamatório subepitelial e marcação positiva em algumas células abaixo da banda subepitelial. D) Caspase-3 no grupo Controle: observar intensa marcação no infiltrado inflamatório subepitelial. E e F) Caspase-3 no LPB Reticular e Erosivo respectivamente: observar ausência de marcação no infiltrado inflamatório subepitelial e marcação positiva em algumas células abaixo da banda subepitelial.

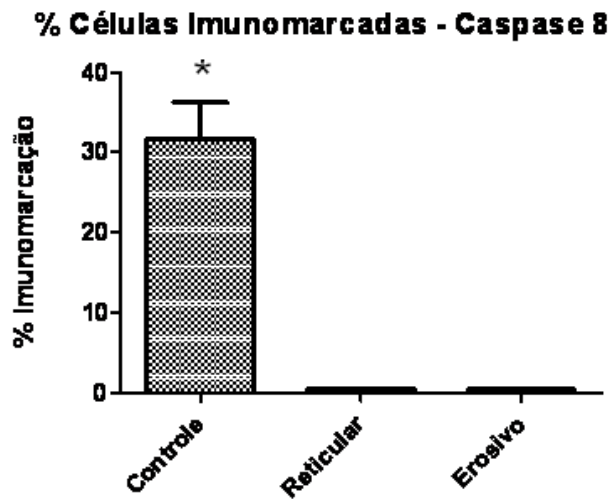


Gráfico 9: Distribuição do % de células imunomarcadas para Caspase-8 nos grupos controle, reticular e erosivo. Houve maior % de imunomarcagem no grupo controle em relação aos grupos reticular e erosivo de LPB ($p < 0,05$).

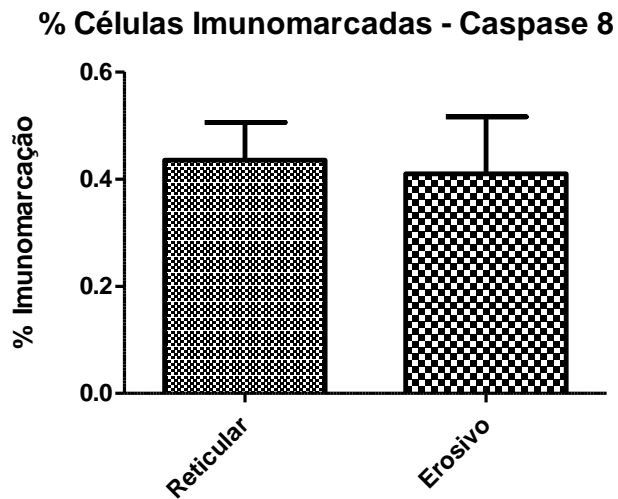


Gráfico 10: Distribuição do % de células imunomarcadas para Caspase 8 entre os grupos reticular e erosivo de LPB. Praticamente não houve diferença no % de imunomarcagem nos grupos reticular e erosivo ($p > 0,05$).

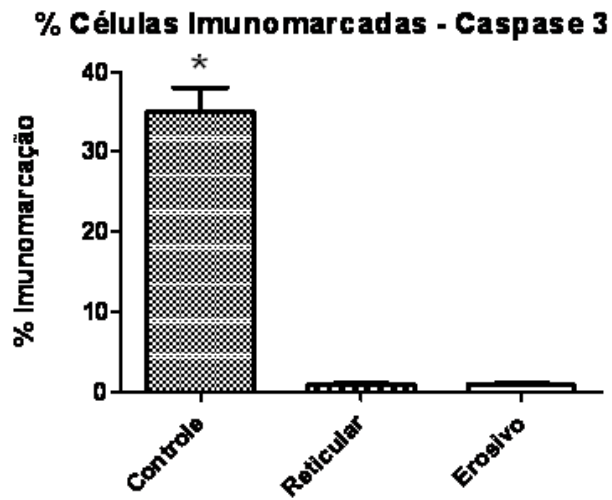


Gráfico 11: Distribuição do % de células imunomarcadas para Caspase 3 nos grupos controle, reticular e erosivo. Houve maior % de imunomarcagem no grupo controle em relação aos grupos reticular e erosivo de LPB ($p < 0,05$).

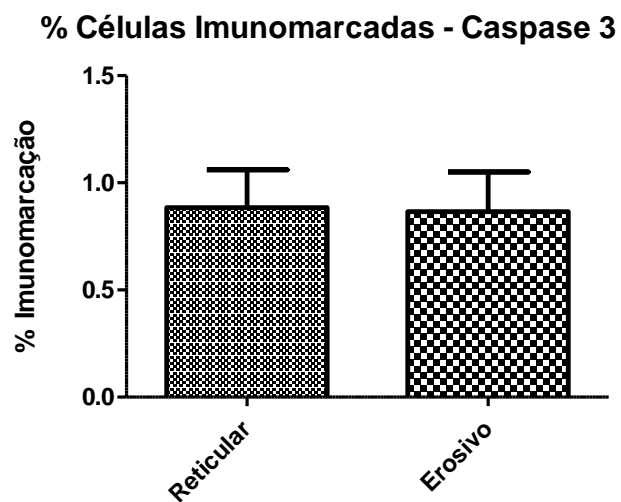


Gráfico 12: Distribuição do % de células imunomarcadas para Caspase 3 entre os grupos reticular e erosivo de LPB. Não houve diferença no % de imunomarcagem entre os grupos reticular e erosivo ($p > 0,05$).

6. DISCUSSÃO

A apoptose tem sido foco de estudo em várias alterações patológicas que ocorrem na cavidade bucal ⁴⁷, inclusive no LPB. Neste, os trabalhos geralmente têm se concentrado no epitélio incluindo os ceratinócitos basais e parabasais ^{17,38}. No entanto, a ocorrência ou o bloqueio da apoptose e a avaliação das vias apoptóticas envolvidas e/ou bloqueadas nos linfócitos presentes no infiltrado inflamatório subepitelial nas lesões de LPB ainda não foram bem descritos e elucidados. Sabe-se que a apoptose é considerada importante na resolução de processos inflamatórios, sendo responsável pela eliminação das células inflamatórias quando o processo diminui a atividade ^{58,80}. Além disso, a maioria dos autores estuda LPB como um único grupo de estudo, sem separar os tipos clínicos. Em trabalhos anteriores, estudamos a apoptose nas alterações epiteliais presente no LPB separando os tipos clínicos reticular e erosivo trabalhando-os como grupos distintos e pode-se observar diferenças significativas entre eles ¹⁶.

Em outro trabalho avaliamos o índice apoptótico no infiltrado inflamatório subepitelial nas lesões de LPB dos tipos reticular e erosivo ⁸¹ e encontramos um baixo índice entre as células presentes no infiltrado inflamatório subepitelial dessas lesões, tanto na forma reticular quanto erosiva do LPB.

Esses resultados estão em concordância com os achados de BASCONES *et al.* (2006) ¹⁸ que também 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 sobrevivência média das células do infiltrado, o que ajuda a explicar a presença intensa dos linfócitos T abaixo da camada basal do epitélio.

Abdel-latif et al. (2009) ⁷ também encontraram pouca apoptose no infiltrado inflamatório subepitelial nas lesões de LPB. Eles acreditam que a baixa ocorrência de apoptose pode estar relacionada com a superexpressão da proteína Bcl2, contribuindo para a persistência do infiltrado inflamatório e aumentando a desordem das células epiteliais. Nossos resultados estão em concordância com esses achados.

Nesse trabalho, diferentemente dos demais, investigou-se a participação da apoptose no infiltrado inflamatório subepitelial nas lesões de LPB dos tipos reticular e erosivo, procurando analisar as vias apoptóticas envolvidas. Para tanto, foram quantificados os linfócitos CD8+ e avaliadas a expressão das proteínas Bcl2 (anti-apoptótica), Bax (pró-apoptótica), Caspase-8 (promotora) e Caspase-3 (efetora), através de reações imunoistoquímicas.

Os linfócitos CD8+ no infiltrado inflamatório subepitelial estiveram em maior número nas lesões de LPB dos tipos reticular e erosivo que no grupo controle, não mostrando diferença entre os tipos erosivo e reticular. Sabe-se que o LPB é caracterizado pela desestruturação dos ceratinócitos basais e que os linfócitos T CD8+ podem desencadear a apoptose desses ceratinócitos. A maior presença dessas células nas lesões de LPB parece confirmar essa afirmativa.

Praticamente não houve marcação imunoistoquímica para Caspase-3 e Caspase-8 nas lesões de LPB dos tipos reticular e erosivo. Tais marcações, quando presentes nestes grupos, se encontravam nas células das camadas mais profundas da submucosa, abaixo da banda de infiltrado inflamatório subepitelial.

Já no grupo controle, houve elevada marcação imunoistoquímica para essas moléculas.

Para haver apoptose é necessária a ativação de caspases ^{75,76}. As caspases diretamente envolvidas na apoptose podem ser separadas em caspases ativadoras e caspases efetadoras. As caspases ativadoras fazem proteólise das efetadoras que, por sua vez, atuam ativando outras proteases que degradam diferentes substratos das células ^{64,65}. A pró-Caspase-3, ativada pelo apoptossomo (Apaf + citocromo C + Caspase 9), é responsável pela degradação e a condensação do DNA ^{65,68,75,76}. Proteínas do citoesqueleto também são clivadas pela Caspase-3, produzindo alterações celulares típicas da apoptose, como a formação de “blebbings” e corpos apoptóticos ^{68,76}. As lesões de LPB praticamente não mostraram expressão de Caspase-3 no infiltrado subepitelial em relação ao grupo controle. A menor expressão dessa caspase no LPB dos tipos reticular e erosivo indica um bloqueio da apoptose nestas lesões. Por conseguinte, a elevada expressão de Caspase-3 no grupo controle demonstra a participação da apoptose nestes processos inflamatórios.

A via extrínseca da apoptose, também conhecida como “via do receptor de morte” é iniciada por sinais externos à célula que vão estimular os receptores da superfície celular ⁶⁹. A ligação do ligante ao receptor de morte ativa a pró-Caspase-8 em Caspase-8, acionando a Caspase-3 (efetora), desencadeando a clivagem do DNA ^{66,67,68}. Praticamente não houve expressão de Caspase-8 em ambos os grupos de LPB. A baixa expressão de caspase-8 indica que a via extrínseca da apoptose não está sendo expressa nessas lesões. Em

contrapartida, a alta expressão de caspase-8 no grupo controle demonstra a participação da via extrínseca nesse grupo.

A via intrínseca da apoptose é ativada em resposta às alterações intracelulares. Os membros da família de proteínas Bcl consistem em fatores anti e pró-apoptóticos que determinam a sobrevivência ou morte da célula ^{72,73,74}. A Bcl2, anti-apoptótica, localiza-se na membrana mitocondrial e inibe proteínas formadoras de poros, controlando a permeabilidade da mitocôndria e impedindo a apoptose ^{73,82,83,84}. A Bax, pró-apoptótica, atua inibindo as proteínas anti-apoptóticas, causando disfunção e permeabilização mitocondrial com liberação do citocromo C e formação do apoptossomo^{74,84}. Este ativa a caspase-3 efetuada ^{69,85,86}, iniciando o processo de clivagem do DNA e resultando na morte da célula ^{85,86}. O balanço entre proteínas pró e anti-apoptóticas determina se haverá morte celular por apoptose ^{73,83,84}.

Neste estudo, as lesões de LPB exibiram elevada marcação para Bcl2. Esses resultados estão em concordância com outros autores ^{7,18,87}. Além disso, houve marcação maior no tipo erosivo que no reticular e mais discreta no grupo controle. Em contrapartida não houve marcação para Bax em ambos os tipos de LPB. Resultados semelhantes também foram relatados por BLOOR *et al.* (1999) ¹⁴, com linfócitos negativos para o Bax em todos os casos de LPB.

A ausência de imunomarcação para Bax em ambos os grupos e intensa marcação de Bcl2 indica que a liberação do citocromo-C está bloqueada ^{74,84}, impedindo o aumento da permeabilidade mitocondrial e a ocorrência de apoptose

Em suma, existem duas principais vias para apoptose: via extrínica – mediada pelo receptor de morte e via intrínica – mediada por sinais internos mitocondriais. A baixa expressão de Caspase-8 e Caspase-3 no LPB indicam que a via extrínica da apoptose não está sendo expressa nessas lesões. Já a baixa expressão de Bax e Caspase-3 e a alta expressão de Bcl2 indicam que a via intrínica está sendo bloqueada pela expressão de proteínas anti-apoptóticas. Além disso, a maior expressão de Bcl2 no tipo erosivo em relação ao reticular demonstra maior tendência à evasão da apoptose no erosivo. Conseqüentemente, a maior evasão da apoptose contribui para a persistência dessas células no infiltrado, resultando em maior agressão ao epitélio, o que pode ser observado clinicamente.

7. CONCLUSÕES:

A imunomarcagem para CD8 foi maior no infiltrado inflamatório subepitelial nas lesões de LPB do que no grupo controle demonstrando um maior predomínio desses linfócitos no LPB.

A imunomarcagem para Bcl2 também foi maior no infiltrado inflamatório subepitelial nas lesões de LPB do que no grupo controle o que traduz em maior expressão de proteínas anti-apoptóticas no LPB. Além disso, o Bcl2 foi mais expresso no tipo erosivo que no reticular demonstrando uma maior evasão da apoptose no LPB erosivo.

Praticamente não houve marcação de Caspase-8 e Caspase-3 no infiltrado inflamatório subepitelial nas lesões de LPB e houve expressiva marcação no grupo controle. A baixa expressão de Caspase-8 e Caspase-3 nos infiltrados inflamatórios de LPB indicam que a via extrínseca da apoptose não está ativa nessas lesões.

Não houve marcação de Bax em nenhum dos grupos de estudo. A baixa expressão de caspase-3 e de Bax associado à alta expressão de Bcl2 nos infiltrados inflamatórios de LPB indica que a via intrínseca está sendo bloqueada pela expressão de proteínas anti-apoptóticas.

A maior expressão de Bcl2 nos infiltrados inflamatórios de LPB do tipo erosivo em relação ao tipo reticular, demonstra evasão da apoptose e persistência da inflamação no tipo erosivo.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. BASCONES-ILUNDAIN C, GONZALES-MOLES MA, CAMPO-TRAPERO J, GIL-MONTOUA JA, ESPARZA-GOMEZ GC, CANO-SANCHEZ J, BASCONES-MARTINEZ A. No differences in caspase-3 and Bax expression in atrophic-erosive vs. reticular lichen planus. *J Eur Acad Dermatol Venereol.* 2008; 22: 204-212.
2. SOUSA FA, PARADELLA TC, CARVALHO YR, ROSA LE. Immunohistochemical expression of PCNA, p53, Bax and Bcl-2 in oral lichen planus and epithelial dysplasia. *J Oral Sci.* 2009; 51: 117-121.
3. 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.
4. 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.
5. SCULLY C, CARROZZO M. Oral mucosal disease: Lichen planus. *Br J Oral Maxillofac Surg.* 2008; 46: 15-21.
6. 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.
7. ABDEL-LATIF AM, ABUEL-ELA HA, EL-SHOUBAGY SH. Increased caspase-3 and altered expression of apoptosis-associated proteins, Bcl-2 and Bax in lichen planus. *Clin Exp Dermatol.* 2009; 34: 390-395.
8. ZHOU G, XIA K, DU GF, CHEN XM, XU XY, LU R, ZHOU HM. Activation of nuclear factor-kappa B correlates with tumor necrosis factor-alpha in oral lichen planus: a clinicopathologic study in atrophic-erosive and reticular form. *J Oral Pathol Med.* 2009; 38: 559-564.
9. 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.
10. 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.

Formatado: Inglês (EUA)

11. SUGERMAN PB, SAVAGE NW, WALSH LJ, ZHAO ZZ, ZHOU XJ, KHAN A, SEYMOUR GJ, BIGBY M. The pathogenesis of oral lichen planus. *Crit Rev Oral Biol Med.* 2002; 13: 350-365.
12. PRIME SS, PRING M, DAVIES M, PATERSON IC. TGF- β signal transduction in oro-facial health and non-malignant disease (Parte I). *Crit Rev Oral Biol Med.* 2004; 15: 324-336.
13. 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.
14. 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.
15. 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.
16. BRANT JMC, VASCONCELOS AC, RODRIGUES LV. Role of Apoptosis in Erosive and Reticular Oral Lichen Planus Exhibiting Variable Epithelial Thickness. *Braz Dent J.* 2008; 19: 179-185.
17. NEPPELBERG E, JOHANNESSEN AC, JONSSON R. Apoptosis in oral lichen planus. *Eur J Oral Sci.* 2001; 109: 361-364.
18. 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.
19. REGEZI JA & SCIUBA JJ. *Oral Pathology: Clinical – Pathologic correlations.* Philadelphia. Saunders, 1989.
20. NEVILLE BW, DAMM DD, ALLEN CM, BOUQUOT JE. *Oral & Maxillofacial Pathology.* Philadelphia. Saunders, 2004.
21. SUGERMAN PB, SAVAGE NW, ZHOU X, WALSH LJ, BIGBY M. Oral lichen planus. *Clin Dermatol.* 2000; 18: 533-539.
22. EISEN D, CARROZZO M, BAGAN SEBASTIAN JV, THONGPRASOM K. Number V Oral lichen planus: clinical features and management. *Oral Dis.* 2005; 11: 338-349.

23. 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.
24. 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.
25. MONCARZ V, ULMANSKY M, LUSTMANN J. Lichen Planus: Exploring its malignant potential. *J Am Dent Assoc.* 1993; 124: 102-108.
26. LIPPONEN PK & AALTOMAA S. Apoptosis in bladder cancer as related to standard prognostic factors and prognosis. *J Pathol.* 1994; 173: 333-339.
27. 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.
28. 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.
29. 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.
30. 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.
31. VINCENT SD. Diagnosing and Managing Oral Lichen Planus. *J Am Dent Assoc.* 1991; 122: 93-96.
32. NICO M, FERNANDES JD, LOURENÇO SV. Oral Lichen Planus. *An Brás Dermatol.* 2011; 86: 633-643.
33. SEOANE J, ROMERO MA, VARELA-CENTELLES P, DIZ-DIOS P, GARCIA-POLA MJ. Oral Lichen Planus: A clinical and morphometric study of oral lesions in relation to clinical presentation. *Bras Dent J.* 2004; 15: 9-12.
34. BOYD AS, NELDNER KH. Lichen Planus. *J Am Acad Dermatol.* 1991; 25: 593-619.

35. 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.
36. 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.
37. LARSSON A, WARFVINGE G. Malignant transformation of oral lichen planus. *Oral Oncol*. 2003; 39: 630-631.
38. 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.
39. DUARTE ECB, GOMES RS. Líquen Plano e Câncer Bucal. *Rev Min Estomatol*. 2003; 1: 8-13.
40. MURAKI Y, YOSHIOKA C. Immunohistochemical detection of Fas antigen in oral epithelia. *J Oral Pathol Med*. 1997; 26: 57-62.
41. 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.
42. ZHOU XJ, SUGERMAN PB. Matrix metalloproteinases and their inhibitors in oral lichen planus. *J Cutan Pathol*. 2001; 28: 72-82.
43. PELISSIER A & MISIPO E. Manifestations buccales du lichen plan. 2e. Partie: Aspect histologique, immunologique et thérapeutique. *Chir Dent Fr*. 1990; 60: 21-26.
44. 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.
45. 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.
46. 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.

47. LORO LL, VINTERMYR OK, JOHANNESSEN C. Apoptosis in normal and disease oral tissues. *Oral Dis*. 2005; 11: 274-287.
48. ROOPASHREE MR, GONDHALEKAR RV, SHASHIKANTH MC, GEORGE J, THIPPESWAMY SH, SHUKLA A. Pathogenesis of oral lichen planus – a review. *J Oral Pathol Med*. 2010; 39: 729-734.
49. COHEN J J. Apoptosis. *Immunol Today* 1993; 14: 126-130. 48
50. 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.
51. WYLLIE AH, KERR JFR, CURRIE AR. Cell death: the significance of apoptosis. *Intern Rev Cytol*. 1980; 68:251-305.
52. HENGARTNER MO. The biochemistry of apoptosis. *Nature*. 2000; 407:770-776.
53. AMARANTE-MENDES GP, GREEN DR. The regulation of apoptotic cell death. *Braz J Med Biol Res*. 1999; 32:1053-1061.
54. VASCONCELOS AC, VASCONCELOS MMA. Apoptose ou morte celular programada – Um novo conceito em Patologia? *Rev Med Minas Gerais*. 1996; 5:103-108.
55. RASKIN AC. Apoptosis and cutaneous biology. *J Amer Ac Derm*. 1997; 36: 885-898.
56. HACKER G. The morphology of apoptosis. *Cell Tissue Res*. 2000; 301:5-17.
57. ARENDS MJ & WYLLIE AH. Apoptosis: mechanisms and roles in pathology. *Internat Rev Exp Pathol*. 1991; 32: 223-254.
58. SEARLE J, KERR JFR, BISHOP CJ. Necrosis and Apoptosis: distinct modes of cell death with fundamentally different significance. *Pathol Annu*. 1982; 17: 229-259.
59. MILLER LJ, MARX J. Apoptosis. *Science*. 1998; 281:1305-1309.
60. BARINAGA M. Is apoptosis key in Alzheimer's Disease? *Science*. 1998; 281:1301-1304.
61. SAVILL J & HAASLETT C. Granulocyte clearance by apoptosis in the resolution of inflammation. *Semin Cell Biol*. 1995; 6: 385-393.

62. MANIATI E, POTTER P, ROGERS NJ, MORLEY BJ. Control of apoptosis in autoimmunity. *J Pathol.* 2008; 214: 190-198.
63. BIANCHI SM, DOCKRELL DH, RENSHAW SA, SABROE I, WHYTE MK. Granulocyte apoptosis in the pathogenesis and resolution of lung disease. *Clin Sci (London).* 2006; 110:293-304.
64. ADAMS JM. Ways of dying: multiple pathways to apoptosis. *Genes Dev.* 2003; 17: 2481-95.
65. LI J, YUAN J. Caspases in apoptosis and beyond. *Oncogene.* 2008; 27: 6194–6206.
66. DONOVAN M, COTTER TG. Control of mitochondrial integrity by Bcl-2 family members and caspase-independent cell death. *Biochim Biophys Acta .* 2004; 1644:133-47.
67. SCHULER M, BOSSY-WETZEL E. p53 induces apoptosis by caspase activation through mitochondrial cytochrome c release. *J Biol Chem.* 2000; 275:7337-42.
68. KUMAR S. Caspase function in programmed cell death. *Nature.* 2007; 14:32–43.
69. MIGNOTTE B, VAYSSIERE JL. Mitochondria and apoptosis. *Eur J Biochem.* 1998; 252: 1-15.
70. MATILLA R, SYRJÄNEN S. Oral and Maxillofacial Pathology. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2010; 110: 618-623.
71. 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.
72. TSUJIMOTO Y, SHIMIZU S. Bcl-2 family: life-or-death switch. *FEBS Lett.* 2000; 466 :6-10.
73. GROSS A, JOCKEL J. Enforced dimerization of BAX results in its translocation, mitochondrial dysfunction and apoptosis. *EMBO J.* 1998; 17: 3878-85.
74. SUZUKI M, YOULE RJ. Structure of Bax: coregulation of dimer formation and intracellular localization. *Cell.* 2000; 103:645-54.
75. WANG X. The expanding role of mitochondria in apoptosis. *Genes Dev.* 2001; 15(22): 2922-2933.

76. CORY AH, EDWARDS CC. Inhibitors of diverse metabolic steps cause increased apoptosis in deoxyadenosine-resistant mouse leukemia L1210 cells that lack p53 expression: convergence at caspase-3 activation. *Adv Enzyme Regul*. 2003; 43:29-45.
77. ANDREASEN JO. Oral Lichen Planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1968; 25: 31-42.
78. 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.
79. SAMPAIO IBM. *Estatística Aplicada à Experimentação Animal*. 1 ed. Belo Horizonte: Fundação de Ensino e Pesquisa em Medicina Veterinária e Zootecnia, 1998.
80. WILLYE AH. Apoptosis and the regulation of cell numbers in normal and neoplastic tissues: an overview. *Cancer and Metast Rev*. 1991; 11: 95-103.
81. BRANT JMC, AGUIAR MCF, GRANDINETTI HAM, RODRIGUES LV, VASCONCELOS AC. A comparative study of apoptosis in reticular and erosive oral lichen planus. *Braz Dent J*. (submitted).
82. MANON S, CHAUDHURI B, GUERIN M. Release of cytochrome c and decrease of cytochrome c oxidase in Bax-expressing yeast cells, and prevention of these effects by coexpression of Bcl-xL. *FEBS Lett*. 1997; 415: 29-32.
83. OLTVAI ZN, MILLIMAN CL AND KORSMEYER SJ. Bcl-2 heterodimerizes *in vivo* with a conserved homolog, Bax, that accelerates programmed cell death. *Cell*. 1993; 74: 609-619.
84. GARCIA-SAEZ AJ, FUERTES G, SUCKATE J, SALGADO J. Permeabilization of the outer mitochondrial membrane by Bcl2 proteins. *Adv Exp Med Biol*. 2010; 677: 91-105.
85. KARBOWSKI M. Mitochondria on guard: role of mitochondrial fusion and fission in the regulation of apoptosis. *Adv Exp Med Biol*. 2010; 687: 131-142.
86. CASTANIER C, ARNOUIT P. Mitochondrial dynamics during apoptosis. *Med Sci*. 2010; 26: 830-835.
87. GONZALES-MOLES MA, BASCONES-ILUNDAIN C, GIL-MONTOYA JA, RUIZ-AVILA I, DELGADO-RODRIGUEZ M, BASCONES-MARTINEZ A. Cell cycle regulating mechanisms in oral lichen planus: molecular bases in

epithelium predisposed to malignant transformation. *Arch Oral Biol.* 2006; 51: 1093-1103.