

**MARIA DAS GRAÇAS RODRIGUES PINHEIRO**

**IMUNOLOCALIZAÇÃO DA ENZIMA DE REPARO DE DNA  
hMSH2 NO LIQUEN PLANO BUCAL**

**Belo Horizonte**

**2003**

**Maria das Graças Rodrigues Pinheiro**

**IMUNOLocalização DA ENZIMA DE REPARO DE DNA hMSH2  
NO LIQUEN PLANO BUCAL**

Dissertação apresentada ao Curso de Pós-graduação em Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como parte dos requisitos necessários para obtenção do Título de Mestre. Mestrado Interinstitucional da Universidade Federal de Minas Gerais/ Universidade Federal do Pará/ Centro Universitário do Pará.

Área de concentração: Estomatologia.

Orientador: Prof. Dr. Ricardo Santiago Gomez.

**Belo Horizonte**

**2003**

P654i  
2003  
T

Pinheiro, Maria das Graças Rodrigues  
Imunolocalização da enzima de reparo de DNA hMSH2 no  
liquen plano bucal / Maria das Graças Rodrigues Pinheiro, 2003.  
79fls.  
Orientador: Ricardo Santiago Gomez  
Dissertação ( Mestrado ) – Universidade Federal de Minas  
Gerais, Faculdade de Odontologia.

1. Liquen plano bucal. 2. DNA ligases. I. Gomez, Ricardo  
Santiago. II. Universidade Federal de Minas Gerais. Faculdade  
de Odontologia. III. Título.

BLACK - 047

## DEDICATÓRIA

Especialmente ao **João**, pelo seu carinho e companheirismo em todos os momentos.  
Meu grande incentivador e maior responsável pela minha vida acadêmica.

Aos meus filhos, **Lucas e Maria Clara**, pela compreensão e carinho.

Ao meus pais, **Abadio e Delfina**, que me ensinaram que caráter, honestidade, respeito e perseverança são elementos fundamentais para que possamos alcançar nossos objetivos.  
Dedico especialmente minha mãe, que por mais uma vez me mostrou que quando queremos algo temos que acreditar e lutar para conseguirmos.

Aos meus sogros, **Maués e Consuelo**, que sempre me incentivaram e apoiaram incondicionalmente.

Aos meus **irmãos, cunhados e sobrinhos** que sempre estiveram ao meu lado com uma palavra de carinho e conforto.

## AGRADECIMENTOS

Especialmente ao professor **Ricardo Santiago Gomez** pelo seu empenho para que o nosso mestrado se tornasse realidade, pela sua dedicação, orientação objetiva, apoio e amizade.

Aos professores **Ricardo Mesquita, Dorinha, Cássia, Wagner, Marcelo e Isabela** pela contribuição científica, dedicação e amizade.

Ao **Flávio Pimenta** pela sua incansável ajuda e por sua amizade.

Aos amigos de mestrado **Tânia Rodrigues, Hiam Ghassan, Sérgio Alves, Helder Pontes, Flávia Pontes, Simone Mattos e Armando Ferreira**, pelo companheirismo em todas as horas.

As técnicas do laboratório **Maria e Inês** pelo apoio e amizade.

Aos amigos do laboratório de Patologia **Aline, Linaena, Dora, João, André, Tânia, Joyce, Leonardo, Vanessa e Soraya** que tornaram minha estada em Belo Horizonte muito mais produtiva e agradável.

A professora **Regina Feio** pela sua amizade, luta e dedicação para que este mestrado realmente fosse realizado.

Ao professor **Oscar Faciola**, coordenador do curso de Odontologia do Cesupa, por sua amizade e um dos grandes responsáveis pela minha vida acadêmica.

Aos professores da disciplina de Diagnóstico Integrado da faculdade de Odontologia do Cesupa, **Antônio Athayde, Manoel Fernando Costa e Fabrício Tuji**, que exemplarmente conduziram essa disciplina, durante minha ausência e possibilitando a realização desta pós-graduação que ora concluo.

Aos meus **amigos** que mais uma vez me mostraram que não existe tesouro maior na vida que uma amizade.

## SUMÁRIO

	<b>p.</b>
LISTA DE FIGURAS	7
LISTA DE TABELAS	8
LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS	9
RESUMO	12
2-REVISÃO DA LITERATURA	15
2.1- Líquen plano	16
2.1.1- Epidemiologia	16
2.1.2- Patogenia	18
2.1.3- Características Clínicas	25
2.1.4- Características Histopatológicas	27
2.2- Líquen plano e Câncer	28
2.3- Enzimas de reparo de DNA	40
3- OBJETIVO	47
4- MATERIAL e MÉTODOS	49
4.1- Material	50
4.1.1- Amostra de tecido	50
4.1.2- Cortes	51
4.2- Método	51
4.2.1- Técnica imuno-histoquímica	51
4.2.2- Quantificação das células e Análise estatística	53
5- RESULTADOS	54
6- DISCUSSÃO	59
7- CONCLUSÕES	66
ABSTRACT	68
8- REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	69

## LISTA DE FIGURAS

- 1- Corte histológico demonstrando aspectos histopatológicos característicos de líquen plano (H & E aumento de 100X).....50
- 2- Corte histológico demonstrando presença de células epiteliais positivas para o hMSH2 na mucosa normal (Complexo streptandina-biotina-peroxidase, aumento de 100X).....55
- 3- Corte histológico demonstrando presença de células epiteliais positivas para o hMSH2 no líquen plano erosivo (Complexo streptandina-biotina-peroxidase, aumento de 400X).....56
- 4- Corte histológico demonstrando presença de células epiteliais positivas para o hMSH2 no líquen plano reticular (Complexo streptandina-biotina-peroxidase, aumento de 400X).....56

## LISTA DE TABELAS

- 1- Média e mediana da percentagem de células epiteliais positivas para o hMSH2 no líquen plano comparado com a mucosa bucal normal.....57
- 2- Média e mediana da percentagem de células epiteliais positivas para o hMSH2 no líquen plano erosivo com a mucosa bucal normal.....57
- 3- Média e mediana da percentagem de células epiteliais positivas para o hMSH2 no líquen plano reticular com a mucosa bucal normal.....58
- 4- Média e mediana da percentagem de células epiteliais positivas para o hMSH2 no líquen plano reticular comparado com o líquen plano erosivo.....58

## LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

°C- graus Celsius

µm- micrômetro

CD- receptores presentes nas células T

DNA- do inglês “deoxyribonucleic acid”, traduzido como ácido desoxirribonucléico

ELAM-1- do inglês endothelial leukocyte adhesion molecule-1, traduzido como molécula de adesão dos leucócitos ao endotélio

HCL- ácido clorídrico

HE- Hematoxilina e Eosina

hMMR- sistema de reparo de DNA humano

hMLH1- gene do sistema de reparo de DNA humano

hMSH2- gene do sistema de reparo de DNA humano

H<sub>2</sub>O- molécula de água

H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>- peróxido de hidrogênio

ICAM-1- do inglês intercellular adhesion molecule-1, traduzido como molécula de adesão intercelular

IFN- $\gamma$ - interferon- $\gamma$

IL- interleucina

LFA-1- do inglês lymphocyte functional-associated antigen-1, traduzido como antígeno associado à função linfocitária

MHC II- do inglês major histocompatibility complex class II, traduzido como complexo de histocompatibilidade maior classe II

mRNA- do inglês “Messenger ribonucleic acid”, traduzido como ácido ribonucléico mensageiro

p- braço curto de um cromossomo

p53- refere-se à proteína ou ao gene p53

P.A- pró-análise

PCR- do inglês polymerase chain reaction, traduzido como reação em cadeia da polimerase.

P.H- cologarítimo da concentração hidrogeniônica de uma solução (potencial hidrogeniônico)

P-selectina- refere-se à molécula de adesão selectina-p

S- refere-se à fase do ciclo celular na qual ocorre a síntese de DNA

TCR- receptor de antígenos de células T

TGF- $\beta$ - do inglês transforming growth factor-beta, traduzido como fator de crescimento transformante-beta

Th- *T-helper*- linfócito T auxiliar

TNF- $\alpha$ - do inglês tumoral necrosis factor-alfa, traduzido como fator de necrose tumoral-alfa

TRIS- Tris-hidroxi-metil-aminometano.

VCAM-1- do inglês vascular adhesion molecule-1, traduzido como molécula de adesão vascular-1

WHO- do inglês World Health Organization, traduzido como Organização Mundial de Saúde

$\mu$ m-micrometro

## RESUMO

O líquen plano é uma doença mucocutânea de natureza inflamatória crônica de etiologia desconhecida e caracterizada por uma resposta imunológica mediada por células às alterações induzidas nos antígenos na pele e/ou mucosa. A questão de transformação maligna do líquen plano permanece controversa e tem sido amplamente discutida e avaliada na literatura. Considerando a importância das proteínas hMSH2 para o reparo de DNA e a sua possível alteração no carcinoma de células escamosas de boca, além das evidências que mostram associação do líquen plano com câncer bucal, o propósito do presente trabalho é comparar a imunolocalização do hMSH2 no epitélio de líquen plano bucal e mucosa normal. Foram analisados 26 casos de líquen plano diagnosticado histologicamente. Do total, 12 eram clinicamente do subtipo reticular e 14 eram atrófico/erosivo. Dez amostras de mucosa normal foram incluídas no grupo controle. Os resultados mostraram que em todas as amostras teciduais de líquen plano estudadas ocorreram a diminuição na imunolocalização de hMSH2 em relação ao epitélio de mucosa bucal. Novos estudos são necessários para definir a importância deste resultado na patogênese dos casos de transformação maligna do líquen plano bucal.

# **1 INTRODUÇÃO**

Líquen plano bucal é uma doença mucocutânea de natureza inflamatória crônica que freqüentemente envolve a mucosa bucal. É a principal doença dermatológica que acomete a cavidade bucal.

Esta lesão é uma desordem relativamente comum de etiologia desconhecida. De acordo com o conhecimento atual, pode representar uma resposta imunológica mediada por células às alterações induzidas nos antígenos na pele e mucosa. Comparada a lesões da pele, as afecções das mucosas são muito mais crônicas por natureza, e, freqüentemente, persistem por muitos anos.

Quanto à localização o líquen plano bucal ocorre mais comumente na mucosa jugal, língua e gengiva, sendo raro no palato. Na cavidade bucal, o líquen plano bucal, clinicamente, pode ser dividido em seis tipos: reticular, papular, em placa, atrófico, erosivo e bolhoso. As lesões são caracterizadas clinicamente pelo desenvolvimento de linhas ou placas multiformes elevadas, bem como áreas de erosão, ulceração e, mais raramente, formação de vesícula. As formas mais comuns de líquen plano bucal são o reticular e o erosivo e a menos comum é a forma bolhosa.

O líquen plano, histologicamente, apresenta epitélio hiperortoqueratinizado ou hiperparaqueratinizado, com presença de degeneração ou liquefação de camada basal do epitélio, papilas epiteliais apresentando o aspecto clássico de “dentes em serra”. Subepitelialmente, encontramos um denso infiltrado mononuclear disposto em banda, contendo macrófagos e linfócitos.

Diversos trabalhos dão suporte à teoria de transformação maligna do líquen plano. Entretanto, outros estudos rejeitam esta associação e não concordam que o líquen plano seja considerado uma lesão cancerizável ou pré-maligna.

O sistema de reparo de DNA humano (hMMR) tem um papel importante na redução de mutações e na manutenção da estabilidade genômica. O sistema hMMR de células humanas é composto de pelo menos 6 genes ( hMSH2, hMLH1, hMSH3, hPMS1, hPMS2 e GTB/hMSH6). Em particular, o gene hMSH2 é expresso em células humanas que estão sofrendo rápida renovação.

Considerando a importância das proteínas hMSH2 para o reparo de DNA e a sua possível alteração no carcinoma de células escamosas de boca, além das evidências que mostram associação do líquen plano com câncer bucal, o objetivo do presente trabalho é comparar a imunolocalização do hMSH2 no epitélio de líquen plano bucal e na mucosa normal.

## **2 REVISÃO DE LITERATURA**

## **2.1 Líquen Plano**

O líquen plano é uma desordem mucocutânea de natureza inflamatória crônica e etiologia desconhecida (Eversole, 1994; Sugerma & Savage,2002). Foi descrito, clinicamente, pela primeira vez, em 1869, por Erasmus Wilson, mas somente foi descrita histologicamente em 1906 por Dubreuilh (Walsh *et al.*, 1990).

Também tem sido definido como uma doença crônica autoimune, de etiologia desconhecida que afeta a pele e mucosa, incluindo a mucosa bucal. A doença é caracterizada por uma rede de linhas brancas finas ou com fundo violáceo na mucosa bucal, usualmente na mucosa jugal. A doença também é caracterizada por uma inflamação crônica e está freqüentemente associada com várias sensações de ardência e dor na boca (Agarwal & Saraswat,2002).

### **2.1.1 Epidemiologia**

O líquen plano bucal é uma doença comum que afeta a pele e a mucosa bucal (Bouquot & Gorlin,1986), atingindo entre 0,5 e 1% da população mundial. Segundo Dusek & Frick (1982), a taxa de ocorrência de líquen plano na população tem sido relatada em 0,9 a 1,2%. Já Karatsaidis et al (2003) relatam que a doença afeta aproximadamente 2% da população. Aproximadamente 50% dos pacientes com lesões na pele apresentam lesões bucais

(Andreasen, 1968; Jungell,1991). Cerca de 10 a 20% dos pacientes com líquen plano bucal também apresentam manifestações na pele ( Rinaggio *et al* ,1999).

O líquen plano é a principal doença dermatológica que acomete a cavidade bucal, afetando, em sua maioria, pacientes entre 40 e 70 anos de idade ( Silverman & Griffith, 1974; Kövesi & Banoczy, 1973; Thorn *et al*,1988; Jungell,1991; Burkhart *et al*, 1996;Scully *et al*, 1998). Shklar (1972) relatou que a maioria dos casos ocorriam em pacientes entre as idades de 20 a 45 anos e incomum em idades acima de 60 anos. Segundo Rinaggio *et al* (1999) a doença geralmente surge na sexta década de vida, embora até 11% dos pacientes tenham menos de 14 anos de idade. Andreasen (1968) dividiu os grupos etários por sexo e constatou que a doença geralmente acontece em homens, de 40 a 49 anos e em mulheres de 50 a 59 anos (Dusek & Frick,1982). Líquen plano é uma alteração rara em crianças ( Shklar,1972; Scully *et al.*, 1998; Alan & Hamburger, 2001).

A maioria dos casos de líquen plano ocorrem no sexo feminino (Thorn *et al*, 1988; Jungell, 1991; Scully *et al*,1998; Rinaggio *et al*, 1999;). A relação entre mulheres e homens é de 3:2 (Scully & El-Kom,1985; Mollaoglu,2000), embora alguns trabalhos relatem que homens e mulheres são igualmente envolvidos ( Shklar, 1972; Dusek & Frick, 1982; Burkhart *et al*,1996).

Embora a grande maioria das pessoas afetadas por líquen plano sejam da raça branca, não existem dados consistentes que comprovem a sua relação com etnia (Shklar,1972; Thorn *et al*,1988; Burkhart *et al*,1996).

### 2.1.2- Patogenia

Embora a sua etiologia não seja completamente conhecida, existem dados que demonstram a ocorrência de uma degeneração da camada basal do epitélio da mucosa bucal mediada por mecanismos imunológicos. Outros fatores, como uso de drogas, agentes irritantes, materiais dentários e microorganismos bucais, têm sido implicados, embora essas alterações sejam, mais propriamente, denominadas reações liquenóides (Holmstrup *et al.*,1990; Hatchel *et al.*,1990; Van Dis & Parks,1995; Burkhart *et al.*,1996 e 1997).

Shklar (1972) e Dusek & Frick (1982) relataram que, apesar da etiologia não ser bem entendida, um conjunto crescente de evidências clínicas parece implicar estresse emocional. Líquen plano pode ser uma doença psicossomática, mas evidências definitivas para essa concepção ainda não estão disponíveis. Burkhart *et al.*(1996 e 1997) também observaram que, apesar do stress ser comumente considerado um fator no desenvolvimento e progressão de líquen plano bucal, muito pouca documentação foi apresentada para substanciar essa suposição.

Dusek & Frick (1982) também pensaram em uma origem viral, acreditando que a degeneração da camada de células basais fosse secundária à infecção viral. Porém estudos com microscopia eletrônica e de isolamento viral falharam em provar a existência de um vírus. Outra hipótese que os autores levantaram estava relacionada com o contato com certas drogas, metais pesados e fotoquímicos. Por último, os mesmos autores acreditam que uma base imunológica poderia ser considerada.

Em lesões de líquen plano o infiltrado linfocitário compreende principalmente células T CD3+, incluindo linfócito T CD4+ e CD8+, embora a proporção exata desses dois grupos celulares seja variável de acordo com a fase da doença (Walsh *et al.*,1990). Os linfócitos CD4+ estariam presentes numa fase inicial e os CD8+ seriam recrutados numa fase mais tardia. No epitélio, a maioria dos linfócitos é CD8+, sendo que a maior proporção dessas células se encontra na camada superficial da lâmina própria, o que dá suporte ao conceito de que esses linfócitos participam ativamente do dano à camada basal (Jungell, 1990). Evidência atual sustenta que tanto líquen plano cutâneo como líquen plano bucal podem representar uma resposta imunológica celular mediada a uma alteração antigênica induzida na pele ou mucosa. Isto é sustentado pela semelhança das lesões com a doença do enxerto versus hospedeiro, onde linfócitos derivados do doador destroem os tecidos do receptor (Jungell, 1991).

Segundo Walton *et al.* (1990) os queratinócitos do líquen plano também têm participação na resposta imunológica pela apresentação de antígenos e produção de citocinas. Em 1994, os mesmos autores observaram que as células inflamatórias e queratinócitos liberam citocinas que podem alterar a expressão de moléculas de adesão, evento importante no início da migração linfocitária. Estudos comparativos realizados por Regezzi *et al.* (1996) e Walton *et al.* (1998), mostraram que a expressão aumentada de moléculas de adesão como ELAM-1, ICAM-1, VCAM-1, P-selectina é importante para a manutenção e persistência do líquen plano.

Em seus estudos, Sugerma *et al.* (1992) observaram que uma deficiência na supressão mediada por linfócitos e uma possível redução da auto-tolerância poderiam estar envolvidos na patogênese do líquen plano. Em 1994, os mesmos autores demonstraram que a proporção

entre populações de linfócitos CD4+ e CD8+ pode determinar a função supressora ou auxiliar dessas células. Esses resultados embasaram o conceito, segundo os autores, de que o balanço entre a atividade dos linfócitos pode determinar o comportamento clínico das lesões.

Vários estudos mostraram que as populações de linfócitos no líquen plano bucal expressam antígenos específicos de memória como CD45RO, CD29, o receptor de antígeno de células T (TCR)  $\alpha\beta$  e antígeno associado à função linfocitária-1 (LFA-1) (Walsh et al., 1990; Porter, 1997).

Estudos imuno-histoquímicos indicam que as células epiteliais basais são o alvo principal no líquen plano. O mecanismo de dano a essas células parece estar relacionado à imunidade celular, envolvendo linfócitos T e B, células de Langerhans, macrófagos e mastócitos (Eversole, 1994; Porter, 1997; Mollaoglu, 2000). Desta forma, pode-se observar, em amostras teciduais de líquen plano, grande quantidade de linfócitos ativados, aumento local da expressão de citocinas e expressão alterada das moléculas de adesão (Eversole, 1994).

Walton *et al.* (1998), em seus estudos, concluíram que existe um recrutamento seletivo de linfócitos T no líquen plano bucal, o que poderia predizer a importância dessas células na patogênese da doença.

De acordo com Scully *et al.* (1998) a etiopatogênese parece ser complexa, com interações entre fatores genéticos, de ambiente e de estilo de vida, mas muita coisa ainda não foi esclarecida a respeito dos mecanismos envolvidos.

Bloor *et al.* (1999), examinando a frequência de apoptose no líquen plano bucal, detectaram um número aumentado de corpos apoptóticos nas lesões, quando comparado às

amostras de mucosa normal, especialmente associado a áreas de maior infiltrado inflamatório.

Alan & Hamburger (2001) relataram que a etiologia de líquen plano permanece obscura, mas que parece ser complexa e multifatorial. Os autores observaram relatos de que líquen plano ocorrendo associado à outras doenças auto-imunes. Segundo os mesmos autores, evidências indicam que linfócitos T estão envolvidos na imunopatogênese do líquen plano, onde os queratinócitos basais modificados atuam no gatilho para uma resposta imune e o recrutamento de linfócitos T, sendo que as suas atividades subseqüentes são favorecidas por uma expressão exagerada de moléculas de adesão na superfície celular. Além disso, os autores também observaram que uma produção local de citocinas pelos linfócitos T pode contribuir para alterações inflamatórias características desta condição. Os autores também relataram que etiologia viral tem sido sugerida, bem como fatores genéticos também tendo potencialmente um papel etiológico significativo. Não obstante, o líquen plano em muitos pacientes é considerado como idiopático.

Thornhill (2001) relatou que há um consenso que líquen plano bucal é uma doença crônica, imune, mediada por células contra queratinócitos basais antígenicamente alterados. Em muitos casos, entretanto, a identificação de um alvo antigênico permanece desconhecida. É provável que citocinas liberadas pelos queratinócitos afetados, e associando-se ao infiltrado inflamatório, podem ter um papel chave no recrutamento seletivo de infiltrado dominado por células T que caracteriza o líquen plano bucal, através de sua capacidade de induzir a expressão de moléculas de adesão bem como promover liberação de citocina e quimiocina. Em indivíduos suscetíveis, apresentação crônica de

antígenos pelos queratinócitos basais pode perpetuar a condição e, diretamente, danificar os queratinócitos.

Em 2002, Surgerman *et al.*, sugeriram que mecanismos antígeno-específico e não-específico podem estar envolvidos na patogênese do líquen plano bucal. Mecanismos antígeno-específicos em líquen plano bucal incluem apresentação antigênica pelos queratinócitos basais e queratinócitos antígeno-específico destruídos pelas células-T citotóxicas CD8 (+). Mecanismos não-específicos incluem degranulação de mastócitos e ativação de metaloproteinases de matriz, em lesões de líquen plano bucal. Estes mecanismos podem levar ao acúmulo de células-T na lâmina própria superficial, rompimento da membrana basal, migração de células-T intra-epitelial e apoptose de queratinócitos.

Segundo Agarwal & Saraswat (2002) a etiopatogenia do líquen plano é complexa, com o envolvimento de linfócitos T, mastócitos, molécula de adesão intercelular-1 (ICAM-1) e antígenos de classe II do complexo de histocompatibilidade maior (MHC II). O processo imunológico resulta em degeneração vacuolar, lise de células basais, culminando com a liquefação das células basais. Os fatores desencadeantes de líquen plano bucal podem ser stress, alimentos em particular, placa dental, doença sistêmica e higiene oral pobre.

Yamamoto *et al.* (1994) compararam os queratinócitos de amostras teciduais com queratinócitos de líquen plano e observaram que esses produzem maior quantidade de fator de necrose tumoral- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ), fator estimulante de colônia granulócito-macrófago e quimiocinas para monócitos. Em 1995, Yamamoto *et al.* concluíram que, sob certas condições estimulatórias, os queratinócitos também produzem IL-1, IL-4 e IL-6, confirmando o que Walsh *et al.* (1990) haviam afirmado sobre a importância dos

queratinócitos na ativação e perpetuação da resposta inflamatória no líquen plano. Dessa forma, Yang *et al.* (1996) observaram que as citocinas produzidas pelas células epiteliais e pelos linfócitos poderiam influenciar o curso clínico das lesões. Esses autores acreditam que, se a resposta dominante no infiltrado for TH1, pode ocorrer um dano pronunciado ao epitélio, mas, se houver um balanço entre TH1/TH2, ocorrerá hiperqueratinização do epitélio. Os mesmos autores, usando a técnica de reação em cadeia da polimerase (PCR), foram capazes de detectar a presença de fator de necrose tumoral nas células epiteliais.

Walsh *et al.* (1995) observaram que mastócitos estavam significativamente aumentados no líquen plano bucal, com disposição perivascular e na membrana basal do epitélio. Zhao *et al.* (1998) relataram que os mastócitos são recrutados por meio de associações com a laminina. O TNF, especialmente o  $\alpha$ , derivado dos mastócitos, tem participação importante nos processos inflamatórios em geral e, especialmente, no líquen plano (Walsh *et al.*, 1995; Surgeman *et al.*, 1996).

Simon Jr. & Gruschwitz (1997) detectaram a presença aumentada de receptores para TNF- $\alpha$  em amostras teciduais de líquen plano cutâneo. Os receptores foram encontrados principalmente nos linfócitos e queratinócitos próximos à camada basal, indicando que o TNF- $\alpha$  desempenharia papel importante na patogênese e perpetuação da doença. O TNF- $\alpha$  é capaz, também, de induzir apoptose em determinadas células, participando, assim, de forma indireta da morte das células epiteliais basais no líquen plano (Dekker *et al.*, 1997).

Simark-Mattsson *et al.*, (1999) relataram que as técnicas de biologia molecular têm demonstrado a presença de RNA mensageiro para interleucina-2 (IL-2), interleucina-4 (IL-4), interleucina-10 (IL-10), TNF- $\alpha$  e fator de crescimento transformante-1 (TGF- $\beta$ -1), no infiltrado inflamatório do líquen plano bucal. Esses achados demonstraram, segundo os

autores, que não há uma compartimentalização da resposta em TH1 ou TH2. Os autores supracitados observaram que nas reações imunes, nas quais não há resolução devido a antígenos persistentes, a produção de citocinas dos tipos TH1 (IFN- $\gamma$  e IL-2) e TH2 (IL-4 e IL-10) poderia dar continuidade à resposta inflamatória, resultando em cronicidade como a que é vista em líquen plano. Porém, nesse estudo, não foi demonstrada a presença de citocinas no epitélio das lesões estudadas, mas, segundo os próprios autores, isso poderia ser devido à técnica utilizada.

Em trabalhos realizados em 2001, Sugerman *et al.*, indicaram um papel para o TNF- $\alpha$  secretado por células T e metaloproteinase-9 de matriz na patogênese do líquen plano bucal. TNF- $\alpha$  pode provocar apoptose em queratinócitos, enquanto a metaloproteinase-9 de matriz pode romper a membrana basal epitelial em lesões de líquen plano bucal.

Khan et al (2003) observaram que a resposta imune celular em líquen plano bucal pode ser regulada pelas citocinas e seus receptores. Isto sugere que o desenvolvimento desta resposta imune T auxiliar-1 (Th-1) pode promover ativação de células T citotóxicas CD8+ na lesão.

Um aumento do número ou do estado de ativação das células de Langerhans, tanto no epitélio, quanto no tecido conjuntivo, pode ser encontrado no líquen plano bucal (Ishii *et al.*, 1990). Porém, Farthing *et al.*, (1990) observaram quantidades semelhantes de células de Langerhans em mucosa normal e em amostras de líquen plano. Os autores, contudo, demonstraram que essas células estavam imunologicamente mais ativadas no líquen plano, estando com a expressão aumentada do complexo de histocompatibilidade maior do tipo II e concluíram que as células de Langerhans poderiam iniciar e potenciar a reação imune local. Walton et al. (1998) demonstraram que as células de Langerhans possuem fenótipos

modificados e são recrutados, seletivamente, no líquen plano bucal, estando presentes em áreas com maior expressão de ICAM-1 pelos queratinócitos.

### **2.1.3- Características clínicas**

A aparência clínica das lesões de líquen plano em pele, é bem distinta, e um diagnóstico clínico é feito sem dificuldade. A lesão primária é uma pápula poligonal pequena, achatada, de cor variando de rosa para violeta a marrom à medida que a doença progride. Locais comuns de envolvimento são superfícies flexoras das extremidades, a região sacral e as genitais. As lesões da pele são freqüentemente acompanhadas de prurido e, à medida que as lesões regredem, deixam pigmentação melânica no local (Shklar, 1972; Dusek *et al.*, 1982; Rinaggio *et al.*, 1999; Surgeman *et al.*, 2001).

Vicent *et al.* (1990) observaram que somente 16 pacientes relataram a presença de lesões de pele que acometiam, mais freqüentemente, as extremidades, quando reviram 100 casos de líquen plano bucal.

A aparência clínica da lesão bucal é extremamente variada. Dusek *et al.* (1982) relataram que, em aproximadamente 40 a 50% dos casos de líquen plano, as lesões bucais aparecem concomitantemente com as lesões da pele, porém, em alguns casos, existem manifestações bucais isoladas. Jungell *et al.* (1984) também observaram que em 50% dos pacientes com lesões de pele são encontradas lesões bucais, enquanto que quase 25% de todos os pacientes exibem somente lesões bucais.

As lesões bucais podem preceder as lesões cutâneas ou serem a única manifestação da doença (Hornstein *et al.*, 1980 citado por Petrou-Amerikanou *et al.*, 1998).

As lesões bucais de líquen plano geralmente têm uma morfologia clínica distinta e uma distribuição característica, mas também podem apresentar um arranjo confuso de padrões e formas. Outras desordens podem também simular clinicamente o líquen plano bucal (Scully *et al.*, 1998).

O líquen plano bucal ocorre mais comumente na mucosa jugal, língua e gengiva, sendo raras as lesões no palato (Jungell, 1991; Zegarelli, 1993; Rinaggio *et al.*, 1999; Sugerman *et al.*, 2001).

As lesões bucais de líquen plano, normalmente, se manifestam de forma bilateralmente, são simétricas e, comparadas às lesões de pele, possuem uma cronicidade mais acentuada, persistindo por anos (Thorn *et al.*, 1988; Junguelli, 1991). Clinicamente o líquen plano bucal se apresenta sob várias formas (seis tipos): reticular, papular, em placa, atrófico, erosivo e bolhoso (Andreasen, 1968, Karatsaidis *et al.*; 2003). Segundo Alan & Hamburger (2001) a apresentação clínica do líquen plano é diversa, variando de lesões reticulares encontradas caracteristicamente na mucosa bucal a lesões ulcerativas debilitantes ou difusas. As formas mais comuns de líquen plano são o reticular e o erosivo e a menos comum é a forma bolhosa (Marder & Deesen, 1982; Scully & El-Kom, 1985). O tipo reticular se manifesta como estrias queratóticas brancas, finas e radiantes. Estas linhas são conhecidas como estrias de Wickham (Batsakis *et al.*, 1994 ) e envolvem a mucosa bucal bilateralmente na maioria dos casos. O tipo papular caracteriza-se por pequenas pápulas puntiformes, com aproximadamente 0,5 mm de tamanho. O líquen plano do tipo placa lembra clinicamente as leucoplasias, apresentando-se como placas brancas homogêneas que ocorrem

freqüentemente no dorso da língua e mucosa jugal. O tipo atrófico caracteriza-se por uma lesão eritematosa, difusa, podendo apresentar estrias em torno da mesma e ocorrendo, mais freqüentemente na gengiva. O líquen plano erosivo é representado por lesões irregulares, erosivas, cobertas por placa de fibrina ou pseudomembrana, tendo na periferia estrias queratóticas. O tipo bolhoso é representado por vesículas ou bolhas que variam de poucos milímetros a vários centímetros de diâmetro, que tendem a se romper facilmente, dando origem a úlceras (Andreasen, 1968; Mollaoglu, 2000).

#### **2.1.4- Características histopatológicas**

As primeiras características histológicas de líquen plano bucal foram descritas por Dubreuil em 1906, sendo similares às de líquen plano cutâneo e não sendo possível distingui-las das reações liquenóides bucais (Jungell, 1991, Karatsidis *et al*, 2003).

O líquen plano, histologicamente, apresenta superfície epitelial ortoqueratinizada ou paraqueratinizada, com graus variáveis de espessura do estrato granuloso e espinhoso, degeneração ou liquefação da camada basal do epitélio. As papilas epiteliais podem estar ausentes ou hiperplasiadas, apresentando aspecto clássico de “dentes em serra” (serrilhadas). Subepitelialmente encontramos um denso infiltrado mononuclear, disposto em banda, contendo macrófagos e linfócitos (Andreasen, 1968; Dusek *et al.*, 1982; Jungell *et al.*, 1984; Scully & El-Kom, 1985; Greer *et al.*, 1999, Karatsidis *et al*, 2003).

Corpos colóides, também chamados citóides, hialinos ou corpos de Civatte, podem às vezes ser encontrados na camada inferior do epitélio, ou no interior das camadas superiores

do tecido conjuntivo (Jungell,1991). Segundo Sugerman *et al.* (2001) os corpos colóides são queratinócitos basais degenerados que aparecem como glóbulos eosinófilos homogêneos.

Rinaggio *et al.* (1999) observaram que a separação entre a interface dos tecidos conjuntivo-epitelial é característica na forma de líquen plano erosivo.

Segundo Hirot *et al.* (2002) um dos achados histológicos característicos destas lesões é a destruição da camada de células basais, sendo que alterações na proliferação, reparo e morte celular, ocorrem no epitélio da mucosa agredida.

## **2.2- Líquen plano e Câncer**

Alguns estudos têm sido realizados na tentativa de elucidar uma possível natureza pré-maligna do líquen plano bucal, sendo que alguns estudos sugerem que o líquen plano aumenta o risco do paciente desenvolver carcinoma de células escamosas (Murti *et al.*, 1986; Lo Muzio *et al.*, 1998; Lanfranchi-Tizeira *et al.*,2003), enquanto outros não acreditam em tal potencial de transformação maligna (Krutchkoff *et al.*, 1978; Van Der Meij *et al.*, 1999; Rode & Kogoj-Rode, 2002).

Alguns estudos sugerem que a frequência de transformação maligna do líquen plano varia entre 0,4% a 12,3% (Tyldesley ,1982). Por meio de levantamentos epidemiológicos, Losada-Nur *et al.* (1997) encontraram maior prevalência (1,28%) de carcinomas epidermóides de boca em pacientes com líquen plano oral. Larsson & Warfvinge (2003),

em seus estudos, observaram que, principalmente por razões econômicas, os autores ajudam sugerir que a taxa de transformação maligna (0,5 a 2% na maioria dos estudos) é baixa para justificar o amplo e caro programa de controle dos casos de líquen plano bucal. Os autores observaram também um dilema no diagnóstico de líquen plano bucal, onde reações liquenóides por contato podem ter sido incluídas em alguns estudos prévios. Isto pode ter distorcido a prevalência verdadeira de transformação maligna dessa lesão.

Silverman & Griffith (1974) examinaram e acompanharam, por períodos variáveis de tempo, 200 pacientes com líquen plano bucal. Os autores observaram carcinomas de células escamosas na mucosa bucal em 5 destes pacientes.

Jolly (1976) acredita que o líquen plano é uma condição pré-maligna, pois observou que três pacientes desenvolveram carcinoma em áreas onde existia previamente líquen plano. O autor observou, também, atipias epiteliais nas biópsias de líquen plano erosivo, persistentes por longos períodos de tempo.

Krutchkoff *et al.* (1978) fizeram uma revisão dos casos relatados na literatura de transformação maligna do líquen plano. Os autores encontraram um total de 223 casos, dos quais apenas 16 satisfizeram o critério de malignização em áreas onde previamente ocorreram lesões de líquen plano. Os outros 207 casos não foram aceitos devido a um dos seguintes fatores: dados insuficientes para confirmar o diagnóstico de líquen plano; ocorrência de carcinoma bucal em local incomum de aparecimento de líquen plano; dados inadequados quanto à exposição a fatores carcinogênicos. Em alguns casos, por exemplo, o diagnóstico inicial histológico de líquen plano poderia ser modificado para displasia epitelial com aparência liquenóide. Os autores concluíram que dados populacionais e de prevalência do líquen plano sugerem que o mesmo exibe curso benigno, sendo necessário

estudos com significativo número de pacientes e com adequada documentação, antes que qualquer conclusão sobre a transformação maligna do líquen plano fosse feita.

Marder & Deesen (1982) relataram um caso de transformação maligna de líquen plano em carcinoma de células escamosas e carcinoma verrucoso, em um período de 35 anos entre eles. Para estes autores, o fato dos carcinomas ocorrerem em locais onde suas incidências são baixas, como por exemplo, na superfície dorsal da língua e mucosa jugal, seria um indicador positivo da relação entre o líquen plano e o câncer bucal.

Kaugars & Svirsky (1982), avaliaram 71 biópsias de líquen plano bucal em que ocorreram alterações epiteliais malignas. Os autores argumentaram que o diagnóstico de líquen plano nem sempre é fácil de ser estabelecido, uma vez que podem ocorrer duas situações: líquen plano com atipia epitelial ou displasia epitelial com reações liquenóides. Os autores defenderam a idéia de que dados sobre transformação maligna a partir de líquen plano eram baseados em diagnósticos incorretos dessa lesão.

Pogrel & Weldon (1983) relataram um caso de carcinoma de células escamosas que ocorreu na parte média do dorso de língua, local em que, anteriormente, havia sido diagnosticado um líquen plano erosivo. Os autores sugeriram também que a transformação maligna, principalmente no líquen plano do tipo erosivo e atrófico, esteja relacionada à natureza atrófica da mucosa no local da doença e não propriamente ao líquen plano em si.

Silverman *et al.* (1985) examinaram 570 pacientes com líquen plano bucal, num período médio de acompanhamento de 5,6 anos. O líquen plano erosivo foi o tipo de maior ocorrência. Os autores observaram transformação maligna em 1,2% dos pacientes em um tempo médio de 3,4 anos. Esses pacientes não tinham nenhuma relação com outros fatores que os predispussem ao desenvolvimento do câncer. Segundo os autores, esses achados

confirmam a idéia de que pacientes com líquen plano têm um maior risco em ter carcinomas, embora não concordem que o líquen plano seja classificado como uma lesão pré-maligna.

Lind *et al.* (1985) relataram um caso de uma paciente que apresentou transformação maligna de líquen plano bucal. A paciente consumia bebida alcoólica ocasionalmente e havia parado de fumar 27 anos antes de desenvolver o câncer. Os autores concordam que há uma relação entre as duas entidades, mas ressaltam que a paciente usava alguns medicamentos que poderiam ter influenciado no desenvolvimento do carcinoma bucal.

Murti *et al.* (1986) analisaram um material recolhido de três estudos com um total de 722 pacientes com líquen plano bucal. As lesões de líquen plano foram diagnosticadas clinicamente, tomando por base a presença de estrias de Wickham. A biópsia foi realizada em alguns casos e, quando se suspeitava de malignização, a mesma era repetida. Dos 722 pacientes, 702 foram acompanhados e, desses, 3 pacientes (0.4%) desenvolveram carcinoma de células escamosas, sendo que todos estes eram fumantes.

Holmstrup *et al.* (1988) investigaram transformação maligna do líquen plano em 611 pacientes, num período de observação de 1 a 26 anos (média 7,5). Desses pacientes, 9 (1,4% ) desenvolveram carcinoma de células escamosas em áreas onde existiam previamente lesões de líquen plano. De acordo com esses autores, o líquen plano deveria ser considerado como uma condição pré-maligna (estado associado com um significativo aumento no risco em desenvolver câncer). Os autores concluíram que, quando se comparam os pacientes com líquen plano e os da população geral, os primeiros apresentam um risco significativamente maior em desenvolver câncer que os segundos.

Katz *et al.* (1990) reportaram um caso em que a paciente apresentava líquen plano erosivo em mucosa bucal e dorso de língua. Dez anos após o diagnóstico de líquen plano, foi notada uma lesão no dorso de língua, estendendo-se para linha média onde foi feita uma biópsia e diagnosticou-se carcinoma de células escamosas. Os autores ainda relataram que a paciente estava exposta a dois fatores carcinogênicos: cigarro e compostos arsênicos para tratamento de malária, o que tornou difícil determinar se o câncer ocorreu devido a estes fatores, ou se estava relacionado à presença do líquen plano. Para os autores o “turnover” aumentado das células da camada basal nas lesões de líquen plano poderia predispor a transformação maligna.

Voûte *et al.*, (1992) avaliaram 113 pacientes com líquen plano bucal, dos quais 3 (2,6%) apresentaram transformação maligna num período de observação de sete anos. Segundo os autores, estes dados não eram ainda suficientes para concluir que o líquen plano é uma lesão pré-maligna. Os pacientes, entretanto, deveriam ser informados sobre a possível capacidade de transformação maligna do mesmo.

Holmstrup (1992) concluiu que pacientes nos quais líquen plano bucal é diagnosticado com base nas manifestações clínicas e histológicas, bem como pacientes com líquen plano cutâneo, têm um risco aumentado de desenvolverem câncer bucal. A magnitude deste risco está entre 0,5% e 2,5%.

Barnard *et al.* (1993) examinaram 241 pacientes com líquen plano bucal, confirmado histologicamente, e observaram desenvolvimento de carcinoma de células escamosas ou carcinoma *in situ*, na área do líquen plano erosivo ou atrófico, em 9 desses pacientes. Os autores ressaltaram a importância de se observar os pacientes que apresentam lesões

atróficas e/ou erosivas do líquen plano, principalmente quando ocorrem na língua, pois são os casos mais comuns de transformação maligna.

Moncarz *et al.*, (1993) avaliaram 280 pacientes com líquen plano bucal. Carcinomas de células escamosas ou carcinoma verrucoso foram encontrados em 8 destes casos. Em 5 pacientes o diagnóstico de líquen plano e carcinoma ocorreu simultaneamente (lesões clinicamente liquenóides na periferia de carcinomas de células escamosas bucais). Dois pacientes apresentaram mais de um sítio de transformação maligna. Os autores ressaltaram que a incidência de carcinoma, em seus estudos, em pacientes fumantes portadores de líquen plano, foi maior do que em pacientes fumantes sem líquen plano.

Duffey *et al* (1996) correlacionaram o aparecimento do carcinoma epidermóide de boca, em lesões de líquen plano bucal, à ação de agentes virais como HPV (vírus do Papiloma Humano). Segundo os autores, epitélios com atrofia ou erosão estariam mais susceptíveis à ação desses agentes virais. E ainda especularam que uma combinação de eventos como: liberação de citocinas, imunossupressão local e exposição aumentada a carcinógenos poderiam induzir anormalidades cromossômicas e desregulação de alguns oncogenes, levando à proliferação celular aberrante.

Carrozzo *et al.* (1997) relataram um caso incomum de carcinoma verrucoso em paciente com líquen plano bucal e com infecção pelo vírus da hepatite C. Os autores comentaram o fato de o carcinoma ter ocorrido em local onde previamente havia líquen plano bucal, em uma paciente que não estava exposta a nenhum fator de risco clássico associado ao carcinoma (uso de tabaco, consumo de álcool, higiene oral pobre).

Markopoulos *et al.* (1997) acompanharam 326 pacientes com líquen plano bucal e constataram transformação maligna em 4 desse pacientes (1,3%), que apresentavam as

formas erosivas e papular/atróficas da doença. Esses pacientes não tinham nenhum outro fator que se pudesse associar com tal malignização.

Zhang *et al* (1997) estudaram a perda de heterozigosidade nas regiões 3p, 9p e 17p de cromossomos no líquen plano, nas displasias epiteliais e carcinomas epidermóides de boca. Os autores observaram que a perda de heterozigosidade ocorre, com frequência, em tumores bucais, podendo ter papel importante na progressão tumoral. A perda da heterozigosidade foi encontrada somente em 6% dos casos de líquen plano, mas, ocorreu em 81% dos casos de displasias epiteliais severas e em 91% dos casos de carcinoma epidermóide. Segundo os autores, embora esses achados não embasassem a teoria de que o líquen plano bucal seja uma lesão com potencial para malignização, essa hipótese não deveria ser descartada, pois a transformação maligna do líquen plano poderia acontecer por caminhos genéticos diferentes daqueles da transformação maligna da displasia epitelial.

Lo Muzio *et al.* (1998) examinaram 263 pacientes, dos quais, 10 (3,8%) desenvolveram carcinoma de células escamosas em áreas onde preexistiam lesões de líquen plano, três (1,14%) em outros sítios e 1 caso (0,38%) em que se observou líquen plano e carcinoma, simultaneamente.

Para Allen (1998) o líquen plano bucal pode não ser uma lesão pré-cancerosa. O autor acredita que o que acontece, na maioria das vezes, é que o diagnóstico de líquen plano é feito equivocadamente em lesões que apresentam características de malignidade como as displasias epiteliais. Allen (1998) acrescenta também que o termo displasia liquenóide deveria ser abolido, por ter significado clínico confuso. O mesmo autor levantou alguns pontos contrários à transformação maligna do líquen plano, citando que, em alguns casos, a conclusão de malignização era baseada apenas no diagnóstico clínico ou a biópsia obtida

que confirmava a lesão de líquen plano não correspondia ao sítio de malignização, o que levou a conclusões falsas. Em alguns estudos são incluídas lesões de líquen plano que não apresentam critérios definidos dessa lesão, contribuindo para a confusão a respeito de sua malignização. O autor ainda lembrou que o líquen plano pode ser confundido com outras doenças, como por exemplo, a leucoplasia com atipia epitelial, que pode induzir no paciente resposta imune intensa que simula o líquen plano bucal. Ainda para Allen (1999), a estomatite ulcerativa crônica, condição recentemente descrita e semelhante clinicamente e histologicamente ao líquen plano, poderia ser a lesão inicial de alguns casos supostos de transformação maligna de líquen plano.

Rinaggio *et al* (1999) relataram que existe uma quantidade considerável de dados na literatura que indicam que líquen plano bucal, particularmente o do subtipo erosivo, tem potencial de malignidade. Por isso, o acompanhamento periódico de todos os casos de líquen plano é indicado. Os autores observaram que, em estudos retrospectivos, 1,5% a 2,3% dos pacientes que se apresentam com líquen plano desenvolvem carcinoma de células escamosas.

Hietanen *et al.* (1999) fizeram uma comparação entre dois grupos com características semelhantes quanto à idade, sexo, extensão do líquen plano, doenças em geral e sítios da doença. O grupo controle era composto pelos pacientes que não apresentaram transformação maligna e o outro grupo pelos pacientes que tinham líquen plano bucal que sofreram malignização. Neste último grupo, dos oito pacientes que tiveram transformação de líquen plano em carcinoma, quatro exibiam a forma atrófica / erosiva, dois o tipo em placa e em dois foi encontrada a forma reticular. Os autores salientaram a necessidade de acompanhamento periódico dos pacientes acometidos com líquen plano bucal,

principalmente quando se observa mudança no tamanho da lesão e presença de ulcerações, sendo aconselhável até repetição da biópsia.

Rajentheran *et al.* (1999) reviram o registro de 832 pacientes com diagnóstico de líquen plano bucal, confirmado histologicamente, dos quais, 7 (0,8%) desenvolveram carcinoma de células escamosas intra-bucalmente, incluindo 3 casos de carcinoma in situ. Os autores observaram associação do líquen plano bucal com o carcinoma de células escamosas, principalmente nas mulheres relativamente jovens que tinham baixo consumo de álcool e tabaco. Os autores concluíram que o risco de transformação maligna em líquen plano bucal é real, porém baixa.

Greer *et al.* (1999) observaram transformação maligna em 11 pacientes com líquen plano bucal (2,01%), dos 548 incluídos no estudo. Os autores observaram que, em 3 pacientes, houve transição de líquen plano para displasia liquenóide e, desta, para carcinoma de células escamosas. As demais lesões evoluíram diretamente de líquen plano para carcinoma. Apenas um paciente fumava e um consumia bebida alcoólica.

Van Der Meij *et al.* (1999) fizeram uma revisão de literatura sobre os casos de transformação maligna do líquen plano, no período de 1977 a 1999. Dos 98 casos encontrados, apenas 33 (34%) apresentavam documentação adequada sobre a transformação maligna do líquen plano bucal. Dos outros 65 casos (66%), 20 apresentavam documentação inadequada, 1 não tinha documentação das mudanças clínicas e histológicas da lesão, 23 não tinham nenhum documento dos achados clínicos ou histológicos, 04 foram rejeitados devido ao acompanhamento menor que 02 anos e 01 porque fazia uso de cigarro. Os autores concluíram que eram necessários estudos com um protocolo bem definido e um longo tempo de observação, pois a natureza pré-maligna do líquen plano ainda era incerta.

Vescovi *et al* (2000) fizeram uma revisão de literatura entre 1910 e 1999 para avaliar a transformação neoplásica de líquen plano. Os autores verificaram que a transformação maligna de líquen plano bucal apresentava índices variados, de acordo com os autores, de 0,4 a 3,7%.

Para Silverman (2000), os pacientes portadores de líquen plano bucal devem ser monitorados devido ao seu potencial de malignização. Isto seria importante para o diagnóstico precoce e tratamento do carcinoma de células escamosas.

Lozada-Nur (2000) relatou a observação, em sua clínica, de poucos casos de carcinoma de células escamosas bucal, em pacientes com história de líquen plano bucal. O autor ressalta que não acredita que exista evidência epidemiológica necessária para determinar se o líquen plano bucal é ou não uma condição pré-maligna bucal.

Mignogna *et al.*, (2001) investigaram transformação maligna do líquen plano em 502 pacientes e, destes, o resultado foi positivo em 24 casos. Os autores concluíram que, devido a essa tendência de transformação maligna do líquen plano, é de suma importância o acompanhamento dos pacientes portadores dessa doença, especialmente das formas em que se observa hiperqueratose. No mesmo ano, Mignogna *et al* (2001) avaliaram 4 casos de carcinoma de células escamosas microinvasivos que haviam ocorrido em pacientes com líquen plano bucal. Todos os 4 tumores estavam no estágio I e todos desenvolveram metástase linfodonal. Para os autores estes dados sugerem que líquen plano bucal associado a carcinoma bucal pode ter um pior prognóstico devido ao potencial metastático aumentado. Os autores acreditam que futuras investigações são requeridas, mas estas evidências preliminares enfatizam que tratamento extremamente cuidadoso de pacientes com líquen plano bucal é mandatário, e, em casos de carcinoma de células escamosas

surgindo de líquen plano bucal, um tratamento mais radical é provavelmente requerido. Já em 2002, os autores reviram cuidadosamente 21 pacientes que sofreram transformação maligna a partir de líquen plano. Os autores observaram que, no tempo médio de 2,6 anos do diagnóstico do líquen plano bucal, esses pacientes desenvolveram carcinoma de células escamosas bucal. Os autores ressaltam a importância de um acompanhamento cuidadoso em pacientes com líquen plano bucal.

Valente *et al* (2001) investigaram imuno-histoquimicamente 28 casos de líquen plano utilizando a proteína p53. Os autores verificaram que, embora nenhuma conclusão tenha sido obtida sobre o caminho molecular que leva à transformação maligna de líquen plano bucal, ou sobre o papel do p53, os resultados indicaram que avaliação imunohistoquímica da expressão do p53 pode ser uma ferramenta prática para selecionar casos de líquen plano bucal com alto risco de transformação neoplásica.

Drangsholt *et al* (2001), em um levantamento bibliográfico de 1950 à 2001, investigaram a possibilidade de risco de câncer bucal em líquen plano bucal. As evidências apresentadas indicaram que o risco para um paciente com líquen plano bucal desenvolver câncer bucal parece ser 10 vezes maior do que visto na população geral. Para os autores, o líquen plano bucal é uma lesão comum que parece ter risco de transformação, embora com baixo índice.

Yaacob *et al* (2002), estudando um grupo com 77 casos de pacientes malasianos com diagnóstico de líquen plano bucal, observaram que somente 19 retornaram para acompanhamento futuro. Somente uma mulher adulta, indiana, com seis anos de história de reação liquenóide, mostrou presença de alterações de malignidade.

Eisen (2002) investigou 723 pacientes com diagnóstico confirmado de líquen plano bucal com acompanhamento entre 6 meses a 8 anos. Destes pacientes, 6 (0,8%) desenvolveram carcinoma de células escamosas, em locais previamente diagnosticados pelo exame clínico como líquen plano erosivo ou eritematoso. Os autores concluíram que pacientes com líquen plano bucal podem ter um risco aumentado para o desenvolvimento de carcinoma de células escamosas, sendo que o acompanhamento periódico é mandatório para detectar transformação maligna.

Mattsson *et al* (2002), revendo a literatura, observaram que para vários autores o líquen plano bucal é uma condição pré-maligna sendo recomendado o monitoramento dessas lesões 2 a 4 vezes ao ano. Estes autores destacaram, entretanto, a reconsideração deste protocolo, pois o controle de todos os pacientes com líquen plano bucal iria requerer um substancial recurso econômico. Os autores acreditam ainda que o potencial de malignização de líquen plano bucal seja muito baixo.

Rode & Kogoj-Rode (2002) fizeram análise retrospectiva, baseada em observações clínicas e histopatológicas, em 55 pacientes com líquen plano bucal do tipo reticular. Os pacientes foram re-examinados uma vez a cada 6 meses durante um período de 25 anos. Os autores concluíram que nenhum caso de completa remissão e nenhum caso de transformação maligna foram registrados. Para os autores estes achados sugerem que o líquen plano bucal reticular não é uma lesão pré-cancerosa.

Lanfranchi-Tizeira *et al* (2003) avaliaram a prevalência de transformação maligna de líquen plano em 719 pacientes. Deste total, 228 apresentavam formas típicas de líquen plano e 491 exibiam formas atípicas. Do total, 32 (6,51%) desenvolveram alteração maligna. Os autores observaram que os 32 que sofreram alterações malignas foram diagnosticados,

inicialmente, como líquen plano atípico. Os resultados, segundo os autores, sugerem um potencial pré-maligno para líquen plano atípico e os levaram a concluir que o líquen plano bucal é uma condição pré-cancerosa.

Larsson & Warfvinge (2003) acreditam que a taxa de transformação maligna das lesões de líquen plano seja maior do que a relatada na literatura. Os autores reviram vários trabalhos relacionados a esse tema e concluíram que muitas lesões diagnosticadas como líquen plano podem não passar de reações liquenóides.

Duarte & Gomez (2003), em uma revisão da literatura entre líquen plano e câncer, concluíram que as evidências que sugerem potencial de transformação do líquen plano são ainda circunstanciais. Segundo os autores, as evidências apresentadas não permitem classificar o líquen plano entre as lesões ou condições pré-malignas, porém sugerem que os pacientes portadores das lesões devem ser rigorosamente acompanhados.

## **2.3- Enzimas de reparo de DNA**

O reparo de erros de DNA é essencialmente a manutenção da integridade da informação genética durante todo tempo. Em bactéria, o processo de reparo de DNA é efetuado pelas proteínas MutL, MutH e MutS. A proteína MutS inicialmente reconhece e se liga ao DNA desparelhado (Su & Modrich,1986). Seguindo este, MutH, uma endonuclease, e MutL formam um complexo com MutS e acionam o mecanismo de reparo. Quando a bactéria é

deficiente em uma dessas enzimas, um fenótipo mutator surge caracterizado pela instabilidade genética (Cleaver,1994). O importante papel executado pelas enzimas de reparo de DNA é enfatizado pelo fato delas serem altamente preservadas, desde bactérias, leveduras a mamíferos. Em leveduras as proteínas são chamadas homólogo 2 MutS (MSH2), homólogo MutL (MLH1), e PMS1 a qual também é homólogo de MutL (Prolla et al,1994). MSH2 é um gene localizado no cromossomo 2p21-22 e contém 16 exons (Marcus et al,1999) e está envolvida em um reconhecimento inicial dos nucleotídeos desparelhados durante a replicação no processo de reparo de erros (Prolla et al 2,1994). O erro é detectado por dois complexos, o hMSH2-GTBP/hMSH6 e os heterodímeros hMSH2-hMSH3 ( Acharya et al,1996).

Evidências mostram o aumento de mutações múltiplas em muitos tumores humanos. Os genomas de células cancerosas são instáveis, e esta instabilidade resulta em uma cascata de mutações que possibilitam células cancerosas ignorar o processo regulatório principal. Existem múltiplos genes que requerem transferência precisa das informações genéticas de uma célula para suas linhagens, durante cada divisão celular. Mutações em algum desses genes com estabilidade genética podem ser eventos precoces na tumorigênese, e geradores de múltiplas mutações observadas em neoplasias. Alterações na estabilidade genômica poderiam ser iniciadas por defeitos nos genes envolvidos na replicação do DNA, reparo do DNA ou segregação cromossômica (Loeb, 1994).

Ishwad *et al* (1995) observaram que instabilidade genômica resulta da perda somática da capacidade de reparo de erro do DNA. Mutações germinativas no locus de reparo de erro do DNA leva a uma susceptibilidade a vários tipos de tumores. Os autores analisaram 91 tumores bucais, dos quais 6 (7%) mostraram instabilidade microsatélite. Esses dados

sugerem que a instabilidade genômica somática tem um papel na patogênese de alguns tumores bucais.

Boyer *et al* (1995) avaliaram a instabilidade microsatélite, deficiências de reparo de erros e defeitos genéticos em células tumorais humanas, em vários tipos de tecidos. Os autores observaram neste estudo uma forte correlação entre instabilidade microsatélite e deficiência no reparo de erros. Os autores acreditam que a diminuição da atividade de reparo de erros é um passo para carcinogênese comum a vários tipos de câncer.

Leach *et al* (1996) desenvolveram anticorpos monoclonais para a proteína do gene de reparo de DNA humano hMSH2. Os autores observaram imuno-histoquimicamente que a proteína hMSH2 localizava-se exclusivamente nuclear. Células neoplásicas, provenientes de erros de reparo em tumores benignos e malignos, expressaram a proteína, mas nenhuma imunoreatividade de hMSH2 foi observada em tumores de coloretal de pacientes com mutação germinativa do hMSH2. Os autores concluíram que esses resultados têm implicações no mecanismo de tumorigênese dessas lesões.

Fink *et al* (1997) estudaram a expressão das proteínas de reparo de erros de DNA hMLH1 e hPMS2 em tecidos humanos bucais. Os resultados demonstraram que estas proteínas são amplamente expressas e com localização exclusivamente nuclear, assim como hMSH2 já descrito em outros estudos (1995 e 1996). Para os autores a imuno-histoquímica pode ser um método útil no prognóstico de tumores com defeitos na expressão dos genes de reparo de erros de DNA.

Meyers *et al* (1997) observaram que os níveis de mRNA e proteína hMSH2 não alteram apreciavelmente em todas as fases do ciclo celular. Embora os níveis de mRNA hMLH1

permaneçam constantes, há um modesto aumento nos níveis ( $\pm 50\%$ ) destas proteínas durante a fase G1 e fase S. Os níveis de mRNA hPMS2 flutuam (decrece 50% na fase G1 e aumenta 50% na fase S), enquanto os níveis de proteína hPMS2 aumentam 50% na fase G1 e fase S. Esses dados indicam que, pelo menos em células normais, o mecanismo responsável pela detecção e reparo das bases de DNA desemparelhadas estão presentes em todos os momentos do ciclo celular.

Marcus *et al* (1999) compararam a imunolocalização do hMSH2 em 38 neoplasias com alta frequência de instabilidade microsatélite, incluindo 16 casos de pacientes com carcinoma de cabeça e pescoço, com 34 neoplasias que não mostravam instabilidade microsatélite. Os autores concluíram que a imuno-histoquímica poderia discriminar os tumores com estabilidade microsatélite daqueles com alta frequência de instabilidade microsatélite.

Messerini *et al* (1999) avaliaram 50 pacientes com câncer coloretal, considerando as características patológicas, a instabilidade microsatélite e a evolução. Em análise univariável, a instabilidade microsatélite teve relação com o prognóstico do tumor, enquanto na análise multivariável esta relação não ocorreu.

Segundo Noffsinger *et al* (1999) polimorfismos no gene de reparo de erros do DNA hMSH2 poderia ter relação com defeitos de reparo, resultando em instabilidade microsatélite. Os genes hMSH2 e hMLH1 atuam como genes supressores de tumor. A perda de ambas as cópias destes genes resulta em anormalidades no reparo de erros do DNA, o que pode levar a altas taxas de mutações somáticas.

Lo Muzio *et al* (1999) estudaram imuno-histoquimicamente a imunolocalização das proteínas hMSH2 e hMLH1 em carcinoma bucal de células escamosas. Os resultados sugeriram que a ausência de marcação nuclear para ambos, hMSH2 e hMLH1, pode ser uma característica de mutação fenotípica neste tipo de neoplasia. Em 2000, Lo Muzio *et al*, avaliaram também imuno-histoquimicamente a expressão de hMSH2 e hMLH1 em melanoma bucal. Os autores observaram expressão das proteínas hMSH2 e hMLH1 em 9 tumores. Os resultados mostraram que 5 (55%) tumores não mostraram nenhuma marcação nas células tumorais para hMSH2 e 4 (44%) não foram positivas para hMLH1. Os autores concluíram que os genes de reparo de erros de DNA podem ser um novo instrumento de diagnóstico molecular para detecção de pacientes com alto risco de desenvolver melanoma bucal, além de outras neoplasias, presença de metástases e recorrências.

Castrilli *et al* (2001) destacaram que o sistema de reparo de erros de DNA desempenha um papel na manutenção da estabilidade genética. Este sistema em células humanas é composto por pelo menos seis genes, particularmente os genes MSH2 e MLH1, que são expressos em células sofrendo rápida renovação. Os autores destacaram que a sua expressão reduzida tem sido relatada em tumores agressivos. Estes autores, avaliando a expressão destas proteínas em 25 ameloblastomas, observaram expressão das mesmas na camada externa das células epiteliais. Estes resultados indicaram que a progressão destes tumores não dependia de um defeito no sistema de reparo de DNA por estas proteínas. Em 2002, os mesmos autores, examinaram expressão de MSH2 e MLH1 por imuno-histoquímica em 43 pacientes com tumores primários de glândulas salivares. Os autores também não encontraram alterações na expressão destas proteínas nestes tumores.

Chung *et al* (2001) investigaram a incidência de instabilidade microsatélite e sua relação com as características clinicopatológicas, em 100 casos de carcinoma cervical. Os autores detectaram instabilidade microsatélite em 25% dos carcinomas cervicais observados. Os resultados, segundo os autores, sugerem que instabilidade microsatélite esta presente em alguns carcinomas cervicais e pode ser um fator prognóstico independente.

Stone *et al* (2001) compararam 23 cânceres de coloretal com instabilidade microsatélite, incluindo 4 casos com mutações germinativas, com 23 cânceres com estabilidade microsatélite. Os autores utilizaram a técnica de imuno-histoquímica para as proteínas hMSH2 e hMLH1. Os resultados mostraram que todos os tumores com estabilidade microsatélite marcaram, para ambos, 22 dos casos de instabilidade microsatélite mostraram ausência de marcação. Os autores concluíram que a alta sensibilidade e valor prognóstico da imuno-histoquímica na detecção da deficiência do sistema de reparo de DNA pode ser usado como método de diferenciação entre cânceres com instabilidade e estabilidade microsatélite causados pela disfunção de hMSH2 e hMLH1.

Liang *et al* (2001) examinaram imuno-histoquimicamente a proteína hMSH2 em 125 carcinomas de células escamosas e em 106 lesões de peles pré-cancerosas. Os autores observaram diminuição da imunomarcação para hMSH2 nos casos de carcinomas.

Liu *et al* (2002) estudaram a expressão da proteína hMLH1 e a região promotora do gene hMLH1 em 62 casos de carcinoma de células escamosas de cabeça e pescoço. Dezesesseis (26%) dos 62 casos de carcinoma de células escamosas mostraram perda quase completa da expressão de hMLH1. Doze (92%), dos 13 casos que foram negativos para hMLH1, exibiram hipermetilação da região promotora do gene, enquanto 17 (77%) dos 22 casos, positivos para hMLH1 estavam livres desta hipermetilação. Os autores concluíram

que hipermetilação da região promotora poderia ser um importante mecanismo para inativação do gene hMLH1, na instalação de carcinomas na região de cabeça e pescoço.

Nunn *et al* (2003) investigaram o envolvimento de desequilíbrio alélico em seis locus do gene de reparo de erros DNA em 35 casos de carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço. Os autores demonstraram que 36 e 17% dos carcinomas exibiram desequilíbrio alélico no locus genético de hMLH1 e hMSH3, respectivamente. Instabilidade alélica encontrada nestes 2 locus estava relacionado, com o estado de instabilidade microsatélite dos tumores. Os autores também observaram que não era comum encontrar instabilidade alélica em outros locus dos genes de reparo analisados. Uma mutação foi encontrada em hMSH2 e nove em hMLH1 nesta série de tumores. Vinte e três, dos 24 (96%) tumores examinados, mostraram expressão reduzida dos genes hMSH2 ou hMLH1. Os autores concluíram que instabilidade alélica nos genes hMLH1 e hMSH3 poderia estar envolvida na etiologia dos carcinomas de cabeça e pescoço.

### **3 OBJETIVO**

Considerando a importância das proteínas hMSH2 para o reparo de DNA e a sua possível alteração no carcinoma de células escamosas de boca, além das evidências que mostram associação do líquen plano com câncer bucal, o objetivo do presente trabalho é comparar a imunolocalização do hMSH2 no epitélio de líquen plano bucal e mucosa normal.

## **4 MATERIAL E MÉTODOS**

## 4.1 Material

### 4.1.1 Amostra de tecido

As amostras incluídas neste estudo, e emblocados em parafina, foram obtidas do arquivo do Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais. No total foram selecionados 26 casos de líquen plano diagnosticados histologicamente, segundo critérios Neville et al. (1995) (Fig. 1), e que apresentavam informações referentes ao tipo clínico da lesão. Do total, 12 eram clinicamente do subtipo reticular e 14 eram atrófico/erosivo. Dez amostras de mucosa normal foram incluídas no grupo controle.

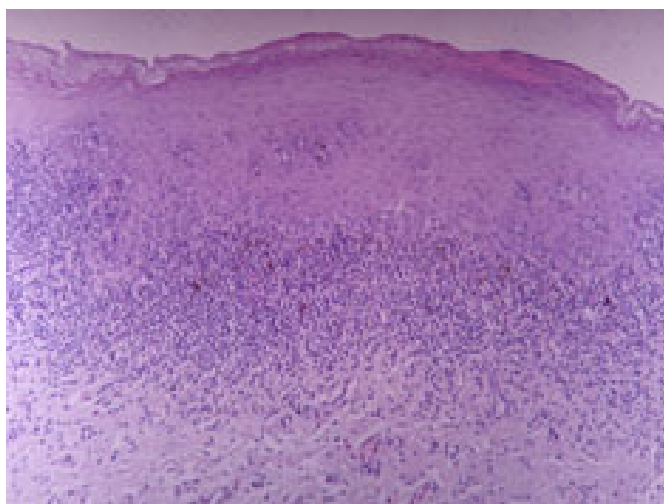


Figura 1- Corte histológico demonstrando aspectos histopatológicos característicos de líquen plano (H & E, aumento de 100X).

### **4.1.2 Cortes**

Foram realizados cortes seriados em blocos de parafina com três micrometros ( $\mu\text{m}$ ) de espessura.

## **4.2 Método**

### **4.2.1 Técnica imuno-histoquímica**

A identificação imuno-histoquímica da proteína hMSH2 foi realizada através do Kit LSAB (DAKO, Carpinteria, USA).

Os cortes foram inicialmente colhidos em lâminas tratadas com organossilano (3-aminopropil-triethosilano, Sigma Chemical Co. St. Louis, MO EUA).

Os seguintes passos foram realizados:

- a) Desparafinização em xilol e rehidratação em série com concentração descendente de etanol;
- b) Incubação com hidróxido de amônio a 10% em etanol 95° durante 10 minutos para remoção do pigmento formólico;
- c) Bloqueio da peroxidase endógena através da incubação dos cortes com água oxigenada (H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> 6% [v/v] /metanol);

- d) Recuperação antigênica com ácido cítrico pH 6.0, em panela elétrica a vapor, a 96°C por 30 minutos;
- e) Incubação com o anticorpo primário anti-hMSH2 (Clone G219-1129, Pharmingen, San Diego, USA) com diluição de 1:100 em tampão Tris-HCL (ph 7.4) por 18 horas à 4°C;
- f) Três banhos de 5' cada com tampão Tris-HCL (7,4);
- g) Incubação do anticorpo secundário biotilado anti-cabra, rato e coelho, por 30' em temperatura ambiente;
- h) Três banhos de 5' cada com tampão Tris-HCL(7,4);
- i) Incubação por 30' em temperatura ambiente com conjugado streptavidina-biotina-peroxidase pré-diluído;
- j) Três banhos de 5' cada com o tampão Tris-HCL (PH 7,4);
- k) Revelação da reação, através da incubação com com tetrahydrocloreto diaminobenzidina à 0,01% e H2O2 à 0,03%;
- l) Lavagem em H2O corrente (5');
- m) Contra-coloração com hematoxilina de Mayer ( 5');
- n) Lavagem em H2O corrente, seguida de passagem rápida em peróxido de amônia a 10%;
- o) Lavagem em H2O corrente (5');
- p) Desidratação e diafanização;
- q) Montagem das lâminas em Permout™ (Fisher Scientific, Fair Law, NJ, USA).

Os controles negativos consistiam da omissão do anticorpo primário, ou do anticorpo secundário, ou incubação primária na presença de soro de coelho não imunizado em vez do anticorpo primário. Imunoreações foram analisadas pelo investigador, sem conhecimento dos dados clínicos.

#### **4.2.2 Quantificação das células e análise estatística.**

A imunolocalização da proteína hMSH2 foi quantitativamente analisada. Células epiteliais eram consideradas positivas, se houvesse qualquer marcação nuclear, independente da intensidade da marcação. A contagem de células foi realizada em 6 campos em microscopia de luz (aumento 400X, Standard 20, ZEISS) Estes 6 campos compreendiam a maior parte do epitélio alterado na lesão de líquen plano. O percentual de células basais e suprabasais marcadas pelo anticorpo foi obtido para cada amostra. A mesma contagem foi realizada no grupo controle. Como percentagem não apresenta distribuição normal, o teste Mann-Whitney foi usado para análise estatística. Os valores foram considerados significativamente diferentes quando o valor p era menor que 0,05.

## **5 RESULTADOS**

A imunomarcção para hMSH2 foi principalmente detectada nas camadas epiteliais basal e intermediária (Fig. 2, 3 e 4). A percentagem média de células epiteliais positivas no líquen plano e mucosa normal estão nas tabelas 1, 2, 3 e 4.

Pelo que se pode observar nas tabelas, a imunomarcção das células epiteliais no líquen plano, tanto da forma clínica reticular, como atrófica/erosiva, foi estatisticamente inferior ao encontrado na mucosa bucal normal (Tabelas 1, 2 e 3). Não houve diferenças, estatisticamente significantes, entre a imunomarcção no líquen plano do tipo reticular comparado com o erosivo (Tabela 4).

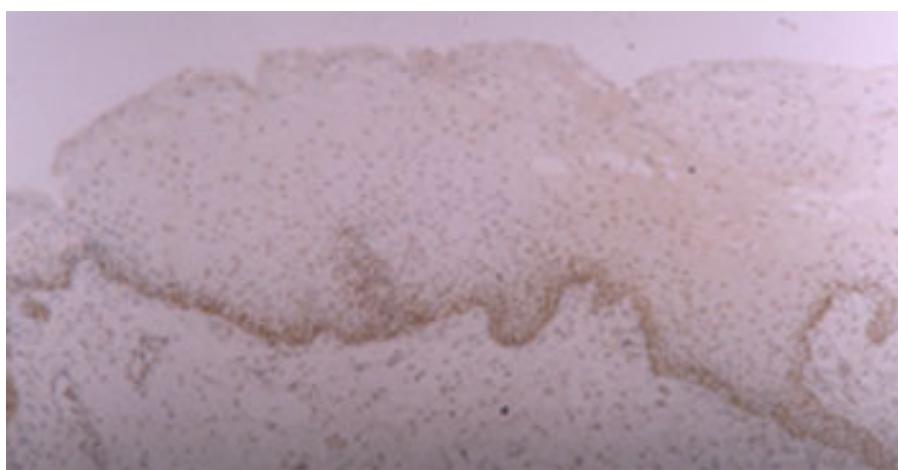


Figura 2- Cortes histológicos demonstrando presença de células epiteliais positivas para o hMSH2 na mucosa normal (Complexo streptavidina-biotina-peroxidase, aumento de 100X).

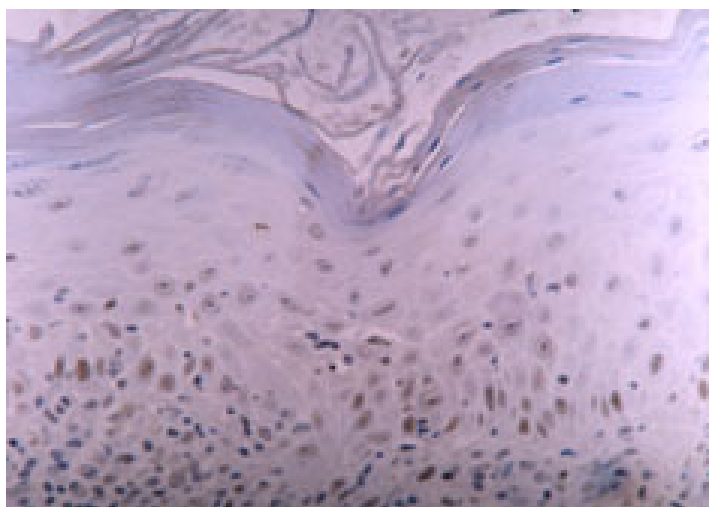


Figura 3- Corte histológico demonstrando presença de células epiteliais positivas para o hMSH2 no líquen plano erosivo (Complexo streptavidina-biotina-peroxidase, aumento de 400X).

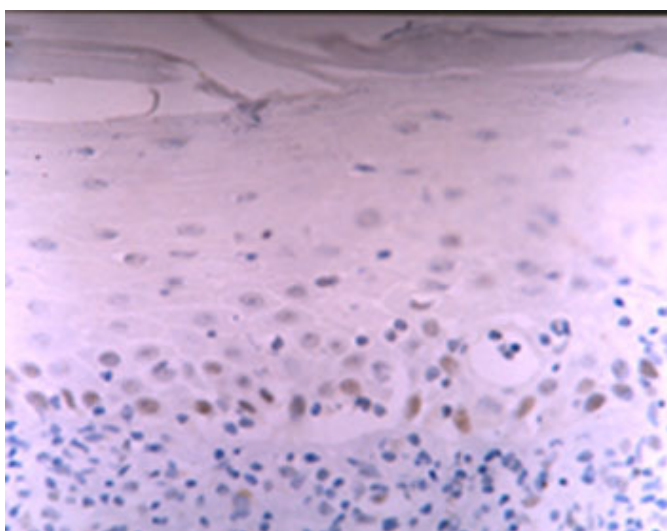


Figura 4- Corte histológico demonstrando presença de células epiteliais positivas para o hMSH2 no líquen plano reticular (Complexo streptavidina-biotina-peroxidase, aumento de 400X).

Tabela 1- Média e mediana da percentagem de células epiteliais positivas para o hMSH2 no líquen plano comparado com a mucosa bucal normal.

	Média	Mediana	Valor P
Líquen plano	46,54	46,34	p= 0,006
mucosa bucal normal	61,69	64,62	

Tabela 2- Média e mediana da percentagem de células epiteliais positivas para o hMSH2 no líquen plano erosivo, comparado com a mucosa bucal normal.

	Média	Mediana	Valor P
Líquen plano erosivo	48,79	49,40	p= 0,028
Mucosa bucal normal	61,29	64,62	

Tabela 3- Média e mediana da percentagem de células epiteliais positivas para o hMSH2 no líquen plano reticular comparado com a mucosa bucal normal.

	Média	Mediana	Valor P
Líquen plano reticular	43,88	42,54	p= 0,008
Mucosa bucal normal	61,29	64,62	

Tabela 4- Média e mediana da percentagem de células epiteliais positivas para o hMSH2 no líquen plano reticular comparado com líquen plano erosivo.

	Média	Mediana	Valor P
Líquen plano reticular	43,88	42,54	p= 0,190
Líquen plano erosivo	48,79	49,40	

## **6 DISCUSSÃO**

O líquen plano é uma doença mucocutânea de etiologia desconhecida. É uma doença muito comum na população em geral (Batsakis *et al.*,1994), por esse motivo, um grande número de pesquisas são realizadas com intuito de elucidar melhor os principais mecanismos que podem desencadear e perpetuar a doença. Porém, muitos aspectos relacionados a sua patogênese ainda permanecem obscuros.

Diferentes formas de apresentação clínica do líquen plano podem se alternar em um mesmo paciente, de acordo com o infiltrado inflamatório subjacente. A relação de linfócitos CD4+/CD8+ varia de acordo com a fase da doença, onde nas fases mais precoces predominam os linfócitos CD4+ e, nas mais fases tardias os linfócitos CD8+ (Walsh *et al.*,1990). O balanço entre as atividades dos linfócitos poderia determinar o comportamento clínico das lesões (Surgeman *et al.*,1994).

A probabilidade de transformação do líquen plano em carcinoma epidermóide tem sido amplamente estudada e avaliada na literatura (Duarte & Gomez, 2003).

Lo Muzio *et al.* (1998), devido às controvérsias existentes a respeito do real potencial de transformação maligna de lesões de líquen plano bucal, sugeriram a existência de três possíveis hipóteses: (1) o carcinoma apareceria coincidentemente em área afetada pelo líquen plano; (2) líquen plano bucal sofreria transformação em carcinoma de células escamosas; (3) o epitélio bucal no paciente com líquen plano bucal sofreria alterações que o tornaria mais susceptível aos fatores carcinogênicos.

Van Der Meij *et al.* (1999) não acreditam na transformação maligna de lesões de líquen plano. Primeiramente, segundo os autores, o que ocorre é que alguns autores erram em alguns pontos, como dados clínicos e histopatológicos insuficientes para comprovar o diagnóstico inicial do líquen plano bucal, como observados nos trabalhos de Pogrel et al

(1983); Silverman *et al.* (1985); Murti *et al.* (1986); Katz *et al.* (1990); Voûte *et al.* (1992) e Markopoulos *et al.* (1997). Em segundo, para os autores, a localização do câncer bucal, em sítios incomuns de ocorrência do líquen plano, como observados nos trabalhos Markopoulos *et al.* (1997), Greer *et al.* (1999) e Mignogna *et al.* (2000). Por último os autores relatam que dados insuficientes com relação à exposição dos pacientes a fatores carcinogênicos dificultam a análise mais detalhada sobre a associação do líquen plano com o câncer bucal, como foram observados em alguns trabalhos como os de Greer *et al.* (1999) e Mignogna *et al.* (2001) que não citam se os pacientes eram fumantes. Os trabalhos de Silverman *et al.* (1985); Murti *et al.* (1986); Voûte *et al.* (1992); Barnard *et al.* (1993); Markopoulos *et al.* (1997); Greer *et al.* (1999); Mignogna *et al.* (2001) não esclarecem se os pacientes eram etilistas.

Silverman & Griffith (1974) acreditam na transformação maligna de lesões de líquen plano e afirmam que a incidência de carcinoma de células escamosas em portadores dessa doença é maior do que na população geral. Existem autores que acreditam que as formas erosivas e atrófica do líquen plano sofrem mudanças malignas devido à natureza atrófica da mucosa nessa doença, tornando-a mais susceptível ao desenvolvimento do câncer (Pogrel *et al.*, 1983; Jolly, 1976; Lind *et al.*, 1985; Mignogna *et al.*, 2001). Para alguns autores, líquen plano bucal parece ter risco de transformação maligna, embora com baixa taxa (Drangsholt *et al.*, 2001; Mattson *et al.*, 2002, Eisen, 2002). Para Lanfranchi-Tizeira *et al.* (2003) os resultados de seus estudos os levaram a concluir que líquen plano bucal é uma condição pré-cancerosa.

Zhang *et al.* (1997) estudaram marcadores microsátélites em diversas lesões da mucosa bucal. Os autores observaram que o percentual de perda de heterozigosidade nas regiões 3p,

9p e 17p no líquen plano bucal (6%) foi bem menor do que o encontrado nas leucoplasias com atipias (40%), e ainda menor daquela observada nas hiperplasias benignas (14%). Em 2000, Zhang *et al.* demonstraram que amostras de líquen plano com atipia epitelial (displasia liquenóide) apresentavam frequência de perda de heterozigidade para os mesmos marcadores microsátélites (54%), semelhante àquela observada nas leucoplasias com atipias epiteliais. Analisando os resultados destes trabalhos, observa-se que quando atipias epiteliais são encontradas no líquen plano, alterações moleculares, semelhantes às encontradas nas leucoplasias epiteliais, estão presentes no líquen plano.

Duarte & Gomez (2003) revisaram a literatura com propósito de avaliar a relação em líquen plano e câncer bucal. Para os autores, as evidências apresentadas ainda não permitem classificar o líquen plano entre as lesões ou condições pré-malignas. Nós concordamos com os autores que sugerem que os pacientes portadores das lesões devam ser rigorosamente acompanhados, o que está de acordo também com o que foi ressaltado por Mignogma *et al* (2002).

A instabilidade microsátélite no carcinoma de cabeça e pescoço sugere que defeitos no sistema de reparo do DNA podem ocorrer no carcinoma de boca. Ishwad *et al* (1995) observaram que 6 (7%) dos 91 tumores bucais examinados apresentavam instabilidade microsátélite. Para os autores esses dados sugerem que a instabilidade genômica somática tem um papel na patogênese de alguns tumores bucais. Segundo Castrilli *et al.* (2001) o sistema de reparo de erros de DNA desempenha um papel na manutenção da estabilidade genética. Nunn *et al.* (2003), investigando 35 casos de carcinomas de células escamosas de cabeça e pescoço, observaram instabilidade alélica nos genes de reparo de DNA e concluíram que esta instabilidade estaria envolvida na etiologia destes tumores. O que está

de acordo com Yamamoto *et al.* (1999), que sugeriram que desequilíbrios alélicos também estariam envolvidos no desenvolvimento do carcinoma bucal.

Stone *et al.* (2001) utilizaram a imunomarcção para hMSH2 como método de identificação da deficiência de reparo de erros de DNA em câncer coloretal. Os autores verificaram que os todos os cânceres com estabilidade microsatélite apresentavam marcação para hMSH2 e a maioria dos cânceres com instabilidade microsatélite não expressava a proteína. Lee *et al.* (2002) também observaram que as células tumorais de carcinoma bucal de células escamosas exibiam instabilidade microsatélite e perda da expressão de hMSH2.

Considerando a importância das proteínas hMSH2 para o reparo de DNA e a sua possível alteração no carcinoma de células escamosas de boca, além das evidências que mostram associação do líquen plano com câncer bucal, o objetivo do presente trabalho foi o de comparar a imunolocalização do hMSH2 no epitélio de líquen plano bucal e mucosa normal.

Nossos resultados demonstraram que as amostras teciduais de líquen plano estudadas, seja do tipo reticular como erosivo/atrófico, apresentaram imunomarcção diminuída para hMSH2, quando comparadas com a mucosa bucal normal. Duas possíveis causas poderiam ser destacadas para explicar a diminuição da imunolocalização da proteína hMSH2 no líquen plano. A primeira seria em função da destruição da camada basal pela resposta imune do paciente. A outra hipótese seria que uma hipermetilação, ou mutação do gene, poderia estar causando uma perda na expressão da proteína.

A inativação do gene de reparo de DNA hMLH1 pela hipermetilação da região promotora deste gene poderia ser um evento precoce na carcinogênese (Guo *et al.*, 2001).

Liu *et al.* (2002), estudando a expressão da proteína hMLH1 em 62 casos de carcinomas de cabeça e pescoço, observaram que a hipermetilação da região promotora do gene de reparo poderia ser um mecanismo para inativação desse gene na instalação destes tumores, concordando com o relato de Shin *et al.* (2002) que observaram que a inativação do gene de reparo de DNA (hMLH1) pela sua mutação ou hipermetilação poderia ser o principal mecanismo no câncer bucal com instabilidade microsatélite. Ricciardiello *et al.* (2003) também observaram que a hipermetilação na região promotora dos genes de reparo (hMLH1) conseqüentemente levaria à perda da expressão desses genes.

Segundo Leach *et al.* (1996) as células de tumores benignos e malignos com eficiente reparo de erros expressavam a proteína hMSH2, mas nenhuma imunoreatividade era observada em pacientes com tumores de coloretal com mutação germinativa de hMSH2. A ausência de marcação para o hMSH2 foi observada em somente 5% dos carcinomas bucais de células escamosas analisados por Lo Muzio *et al.* (1999). Para os autores esta ausência de marcação do hMSH2 poderia constituir um forte indicador do potencial de mutação fenotípica para este tipo de neoplasia. Marcus *et al.* (1999) estudando tumores com defeitos nos genes de reparo de erros de DNA, observaram que todos os tumores com estabilidade microsatélite expressavam a proteína hMSH2 e a maioria dos tumores com instabilidade microsatélite não expressavam a mesma.

Como a hipermetilação dos genes de reparo de DNA ainda não foi demonstrada no líquen plano e a destruição da camada basal é bem observada nesta lesão, provavelmente a diminuição da expressão da proteína hMSH2 seja mais em função da destruição das células epiteliais desta camada. Outros estudos são necessários para o melhor entendimento destes dados.

A expressão de enzima de reparo de DNA é mais encontrada em células com maior atividade proliferativa (Fonseca, 2000; Girod,1994). Como erros na duplicação do DNA são mais prováveis de ocorrerem durante a proliferação celular, a expressão das enzimas de reparo de DNA nas camadas germinativas do epitélio teria fundamental importância no sentido de impedir o aparecimento de clones de células geneticamente alteradas. Diferentes trabalhos demonstram que o epitélio nas lesões de líquen plano apresenta maior atividade proliferativa comparado ao epitélio bucal normal (Walsh et al.,1990; Simon Jr.& Gruschwitz,1997; Fonseca,2000). Desta forma, a diminuição na imunolocalização de hMSH2 poderia ter um impacto no aumento da susceptibilidade do epitélio destas lesões para o aparecimento de erros de DNA e, conseqüentemente ao desenvolvimento do carcinoma bucal. Novos estudos são necessários para a confirmação destas hipóteses e para definição do real potencial de transformação maligna do líquen plano bucal.

## **7 CONCLUSÃO**

O epitélio do líquen plano bucal apresenta diminuição na imunolocalização de hMSH2, em relação ao epitélio de mucosa bucal.

## **ABSTRACT**

Lichen planus is a mucocutaneous disease of inflammatory nature and unknown etiology. It is characterized by a cell-mediated immunological response to induced antigenic change in skin and/or mucosa. The matter of malignant transformation of lichen planus remains controversial and has been widely discussed and evaluated in the literature. Taking into consideration the importance of protein hMSH2 to DNA mismatch repair and its possible alteration into oral squamous cell carcinoma in addition to evidence that show association between lichen planus and oral cancer, this paper aims at comparing the immunolocalization of hMSH2 in the epithelium of oral lichen planus to that of normal mucosa. Twenty six cases of histologically diagnosed lichen planus were analyzed. Clinically, 12 of them were categorized into reticular subtype and 14 were atrophic/erosive. Ten samples of normal mucosa were added to the control group. The results showed that, in all samples of lichen planus tissue, there was a reduction of immunolocalization of hMSH2 related to the epithelium of oral mucosa. Further study will be necessary in order to establish the importance of this result to the pathogenesis of the cases of oral lichen planus malignant transformation.

## **8 REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS**

1. ACHARYA, S. et al. HSMH2 forms specific mispair-binding complexes with hSMH3 and hSMH6. **Proc Natl Acad Sci U S A**, v.93, n.24, p.13629-34, Nov.1996.
2. AGARWAL, R.; SARASWAT, A. Oral lichen planus: an update. **Drugs Today (Barc)**, v.38, n.8, p.533-47, Aug.2002.
3. ALAN F.; HAMBURGER, J. Oral mucosal lichen planus in children. **Int. J. Pediatr Dent**, v. 11, p. 209-214, 2001.
4. ALLEN, C.M. Is lichen planus really premalignant? (Editorial). **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.85, n.4, p.347, 1998.
5. ALLEN, C.M. Oral lichen planus: a premalignant disease? Con. **Pathology Case Reviews**, v.4, n.1, p.35-9, Jan./Feb.,1999.
6. ANDREASEN, J.O. Oral lichen planus: a clinical evaluation of 115 cases. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**,v.25, n.1, p.31-42, 1968.
7. BARNARD, N.A. et al. Oral cancer development in patients with oral lichen. **J Oral Pathol Med**, v.22, p.421-4,1993.
8. BATSAKIS, J.G. et al. Pathology consultation: lichen planus and lichenoid lesions of the oral cavity. **Ann Otol Rhinol Laryngol**, v.103, p.495-497, 1994.
9. BLOOR, B.K. et al. Quantitative assessment of apoptosis in oral lichen planus. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**., v.88, n.2, p.187-195, 1999.
10. BOUQUOT, J.E.; GORLIN,R.J. Leukoplakia, lichen planus, and other oral keratoses in 23616 white Americans over the age of 35 years. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.61,p.373-81,1986.
11. BOYER, J.C. et al. Microsatellite instability, mismatch repair deficiency, and genetic defects in human cancer cell lines. **Cancer Res**, v.55, n.24, p.6063-70, Dec.1995.
12. BURKHART, N.W; BURKES, E.J.; BURKER, E.J., Meeting the educational needs of patients with oral lichen planus. **General Dentistry**, v.45, n.2, p.126-132,1997.
13. BURKHART, Nancy W. et al. Assessing the characteristics of patients with oral lichen planus. **JADA**, v.127, n.5, p.648-656, 1996.

14. CARROZO, M. et al. An atypical verrucous carcinoma of the tongue arising in a patient with oral lichen planus associated with hepatitis C virus infection. **Oral Oncol**, v.33, n.3, p.220-5, 1997.
15. CASTRILILI, G. et al. Expression of hMSH2 and hMLH1 proteins of the human DNA mismatch repair system in ameloblastoma. **J Oral Pathol Med**, v. 30, p.305-8, 2001.
16. CASTRILLI, G. et al. Expression of hMSH2 and hMLH1 proteins of the human DNA mismatch repair system in salivary gland tumors. **J Oral Pathol Med**, v. 31, p.234-8, 2002.
17. CHUNG, T.K.H et al. Microstellite instability in cervical carcinoma. **European journal of obstetrics & gynecology and reproductive biology**, v.94, p.121-124, 2001.
18. CLEAVER, J.E. It was a very good year for DNA repair. **Cell**, v.76,p.1-4, 1994.
19. DEKKER, N.P. et al.. Apoptosis-associated markers in oral lichen planus. **J Oral Pathol Med**, v.26, p.170-175, 1997.
20. DRANGSHOLT, Mark et al. A man with a 30-year history of oral lesions. **J Evid Base Dent Pract**, v.1, n.2, p.123-35, October.2001.
21. DUARTE, E.C.B.; GOMEZ, R.S. Lichen Planus e Oral Câncer. **Revista Mineira de Estomatologia**, v.1, n.1, p.08-13, Jul/Dez. 2003
22. DUFFEY, D.C. et al. Oral lichen planus and its association with squamous cell carcinoma: an update on pathogenesis and treatment implications. **Laryngoscope**, v.106, p.357-362, 1996.
23. DUSEK, Joseph J; FRICK, William G. Lichen planus: oral manifestations and suggested treatments. **J Oral Maxillofac Surg**, v.40, n.4, p.240-244, 1982.
24. EISEN, D. The clinical features, malignant potential, and systemic associations of oral lichen planus: a study of 723 patients. **J Am Acad Dermatol**, v.46, p.207-14, 2002.
25. EVERSOLE, L.R. Immunopathology of oral mucosa ulcerative, descamative, and bullous diseases: selective review of the literature. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v.77, p.555-571, 1994.
26. FARTHING, P.M. et al. The activation of Langerhans cells in oral lichen planus. **J. Oral Pathol. Med**, v.19, p.81-85, 1990.
27. FINK, D. et al. Expression of the DNA mismatch repair proteins hMLH1 and hPMS2 in normal human tissues. **British journal of cancer**, v.76, n.7, p.890-893, 1997.

28. FONSECA, L. M. S. Identificação das proteínas AgNOR, PCNA e ck 16 em lesões bucais líquen plano e hiperqueratose, 2000. 89f. Dissertação apresentada ao curso de pós-graduação em Patologia (área de concentração: odontologia) da Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte.
29. GIROD, SC; PAPE, H-D; KRUEGER, G.R.F. p53 and PCNA expression in carcinogenesis of the oropharyngeal mucosal. **Eur J Cancer Oral Oncol**, v.30B, n.6, p.419-423, 1994.
30. GOMEZ, R.S. et al. Effect of Bone Marrow Transplantation on the Immunolocalization of p53, hMSH2, and hMLH1 proteins on oral mucosa. In press, 2003 (?).
31. GREER, R.O. et al. Oral lichen planus: a premalignant disease? **Pathology Case Reviews**, v.4, n.1, p.28-34, Jan./Feb.1999.
32. GUO, R.J. et al. Microsatellite instability of papillary subtype of human gastric adenocarcinoma and hMLH1 promoter hypermethylation in the surrounding mucosa. **Pathol Int.**, v.51, n.4, p.240-7, Apr. 2001.
33. HATCHEL, D.A.; PETERS, E.; LEMMER, J.. Candidal infection in oral lichen planus. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v.70, n.2, p.172-175, 1990.
34. HIETANEN, J. et al. A retrospective study of oral lichen planus patients with concurrent or subsequent development of malignancy. **Oral Oncol**, v.35, p.278-82, 1999.
35. HIROT, M. et al. Cell proliferation activity and the expresión of cell cycle regulatory proteins in oral lichen planus. **J Oral Pathol Med**, v.31, n.4, p.204-12, Apr. 2002.
36. HOLMSTRUP, P. et al. Malignant development of lichen planus-affected oral mucosal. **J Oral Pathol**, v. 17, p.219-25, 1988.
37. HOLMSTRUP, P. The controversy of a premalignant potencial of oral lichen planus is over. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v.73, n.6, p.704-706, Jun.1992.
38. HOLMSTRUP, P; SCHIOTZ, A.M.; WESTERGAARD, J. Effect of dental plaque control on gingival lichen planus. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v.69, p.585-590, 1990.
39. HORNSTEIN, O.P. et al. Kinische feld-studie zur haufigkeit und topgraphischen verteiung des lichen rubber einschliesslich der frage aetukiguscger einflussfakteren. **Z Hautkr**, v.55,p123-126,1980 apud PETROU-AMERIKANOU, C. et al. Prevalence of oral lichen planus in diabetes mellitus according to the type of diabetes. **Oral dis**, v.4, p.37-40,1998.

40. ISHII, T et al. Modulation of Langerhans cell surface antigen expression by recombinant cytokines. **J. Oral Pathol. Med**, v.19, p.355-359, 1990.
41. ISHWAD, C.S. et al. Microsatellite instability in oral cancer. **Int J Cancer**, v.20, n.5, p.332-5, Oct.1995.
42. JOLLY, M. Premalignant lesions of the oral mucosal. **Aust Dent J**, v.21, n.5, p.414-22, Oct. 1976.
43. JUNGELL, P. Immunoelectron microscopic study of basement membrane in oral lichen planus. **J Cutan Pathol**, v. 17, p.72-76, 1990.
44. JUNGELL, P. Oral lichen planus: a review. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v.20, n.3, p.129-135, 1991.
45. JUNGELL, P.; MALMSTRÖM, M.; WARTIOVAARA, J. Light, electron and immunofluorescence microscopic features of lichen planus, lupus erythematosus and leukoplakia. A review. **Proc. Finn Dent Soc.**, v.80, n.3, p.107-114, 1984.
46. KARATSAIDIS, A. et al. Erythematous and reticular forms of oral lichen planus and oral lichenoid reactions differ in pathological features related to disease activity. **J Oral Pathol Med**, v.32, p.275-81, 2003.
47. KATZ, R.W. et al. Oral squamous cell carcinoma arising in a patient with long-standing lichen planus. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v.70, p.282-5, 1990.
48. KAUGARS, G.E; SVIRSKY, J.A. An update on the dysplastic/carcinomatous transformation of oral lichen planus. **J Oral Med**, v.37, n.3, p.75-9, Jul./Sep.,1982.
49. KHAN, A. et al. Th1 cytokines in oral lichen planus. **J Oral Pathol Med**, v.32, p.77-83, 2003.
50. KÖVESI, G.; BANOCZY, J. Follow-up studies in oral lichen planus. **Int J Oral Surg**, v.2, p.13-19, 1973.
51. KRUTCHKOFF, D.J. et al. Oral lichen planus: the evidence regarding potential malignant transformation. **J Oral Pathol**, v.7, p.1-7, 1978.
52. LANFRANCHI-TIZEIRA, H.E. et al Malignant transformation of atypical oral lichen planus: a review of 32 cases. **Med Oral**, v.8, n.1, p.2-9, Jan./Feb., 2003.
53. LARSSON, A. & WARFVINGE, G. Malignant transformation of oral lichen planus. **Oral Oncol**, v.39, n.6, p.630-1, Sep.2003.

54. LEACH, Frederick S. et al. Expression of the human mismatch repair gene hMSH2 in normal e neoplastic tissues. **Cancer research**, v.56, p.235-240. Jan.1996.
55. LEE, G. et al. Characterization of novel cell lines established from three human oral squamous cell carcinomas. **Int J Oncol**, v.20, n.6, p.1151-9, Jun. 2002.
56. LIANG, S.B. et al. Reduced human mismatch repair protein expression in the development of precancerous skin lesions to squamous cell carcinoma. **Virchows Arch**, v.439, n.5, p.622-7, Nov.2001.
57. LIND, P.O. et al. Malignant transformation in oral lichen planus. **Int J Oral Surg**, v.14, p.509-16, 1985.
58. LIU, K. et al. Promoter hypermethylation: an important epigenetic mechanism for hMLH1 gene inactivation in head and neck squamous cell carcinoma. **Otolaryngol Head Neck Surg**, v. 126, p.548-53, May.2002.
59. LO MUZIO, L. et al. Immunocytochemical detection of hMSH2 and hMLH1 expression in oral SCC. **Anticancer Res**, v.12, n.2A, p.933-40, Mar-Apr.1999.
60. LO MUZIO, L. et al. Immunocytochemical detection of hMSH2 and hMLH1 expression in oral melanoma. **Anticancer Res**, v.20, n.2A, p.741-8, Mar-Apr.2000.
61. LO MUZIO, L. et al. The possible association between oral lichen planus and oral squamous cell carcinoma: a clinical evaluation on 14 cases and a review of the literature. **Oral Oncol**, v.34, p.239-46, 1998.
62. LOEB, L. A. Microsatellite Instability: Marker of a Mutator Phenotype in Câncer. **Cancer Research**, v. , p.5059-63, 1994.
63. LOZADA-NUR, F, MIRANDA, C. Oral lichen planus: epidemiology, clinical, characteristics, and associated diseases. **Semin Cutan Med Surg**, v.16, n.4, p.273-277, 1997.
64. LOZADA-NUR, F. Oral lichen planus and oral cancer: is there enough epidemiologic evidence? **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.89, n.3, p.265-266, Mar.2000.
65. MARCUS, V.A. et al. Immunohistochemistry for hMLH1 and hMSH2: a practical test for DNA mismatch repair-deficient tumors. **Am J Surg Pathol**, v.23, n.10, p.1248-55, Oct.1999.
66. MARDER, M.Z.; DEESEN, K.C. Transformation of oral lichen planus to squamous cell carcinoma; a literature review report of case. **J Am Dent Assoc**, v.105, p.55-60, Jul.1982.

67. MARKOPOULOS, A. et al. Malignant potential of oral lichen planus: a follow-up study of 326 patients. **Oral Oncol**, v.33, n.4, p.263-9, 1997.
68. MATTSSON, U. et al. Oral lichen planus and malignant transformation: is a recall of patients justified? **Crit Rev Oral Biol Med**, v.13, n.5, p.390-6, 2002.
69. MESSERINI, Lucas et al. Prognostic significance of microsatellite instability in sporadic mucinous colorectal cancers. **Human pathology**, v.30, n.6. June. 1999.
70. MEYERS, M. et al. Cell cycle regulation of the human DNA mismatch repair genes hMSH2, hMLH1, and hPMS2. **Cancer Res**, v.15, n.2, p.206-8, Jan.1997.
71. MIGNOGNA, M.D. et al. Metastases in small thickness oral squamous-cell carcinoma arising in oral lichen planus. **Med Oncol**, v.18, n.2, p.159-63,2001.
72. MIGNOGNA, M.D. et al. Clinical behaviour of malignant transforming oral lichen planus. **Eur J Surg Oncol**, v.28, n.8, p.838-43, Dec. 2002.
73. MIGNOGNA, M.D. et al. Clinical guidelines in early detection of oral squamous cell carcinoma arising in oral lichen planus: 5-year experience. **Oral Oncol**, v.37, p.262-7, 2001.
74. MOLLAOGLU, N. Oral lichen planus: a review. **BR J Oral Maxillofac. Surg**, v.38, n.40, p.370-377, 2000.
75. MONCARZ, V. et al. Lichen planus: exploring its malignant potential. **J Am Dent Assoc**, v.124, p.102-8, Mar.1993.
76. MURTI, P.R. et al. Malignant potential of lichen planus: observations in 722 patients from India. **J Oral Pathol**, v.15, p.71-7, 1986.
77. NEVILLE, BRAD W. **Oral and maxillofacial pathology**. Philadelphia: W.B. Saunders Company,1995.711p.
78. NOFFSINGER, Amy E. et al. A germline hMSH2 alteration is unrelated to colonic microsatellite instability in patients with ulcerative colitis. **Human pathology**, v.30, n.1, p.08-12. January. 1999.
79. NUNN, J et al. Allelic imbalance at the DNA mismatch repair loci, hMSH2, hMLH1, hPMS1, hPMS2 and hMSH3, in squamous cell carcinoma of the head and neck. **Oral oncol**, v. 39, n.2, p.115-129, 2003.

80. OHKI, K et al. Genetic analysis of DNA microsatellite loci in salivary gland tumours: comparison with immunohistochemical detection of hMSH2 and p53 proteins. **Int J Oral Maxillofac Surg**, v.30, n.6, p.538-44, Dec.2001.
81. POGREL, M.A.; WELDON, L.L. Carcinoma arising in erosive lichen planus in the midline of the dorsum of the tongue. **Oral Surg**, v.55, n.1, p.62-6, Jan.1983.
82. PORTER, S.R. et al. Immunologic aspects of dermal and oral lichen planus. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v.83, p.358-366, 1997.
83. PROLLA, T.A. et al. MLH1, PMS1, and MSH2 interactions during the initiation of DNA mismatch repair in yeast. *Science*, v.265, p.1091-1093, 1994.
84. RAJENTHERAN, R. et al. Malignant transformation of oral lichen planus. **Eur J Surg Oncol**, v.25, n.5, p.520-3, Oct.1999.
85. REGEZZI, J.A. et al. Vascular adhesion molecules in oral lichen planus. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod**, v.81, n.6, p.682-690, 1996.
86. RICCIARDIELLO, L. et. Frequent loss of hMLH1 by promotor hypermethylation leads to microsatellite instability in adenomatous polyps of patients with a single first-degree member affected by colon cancer. **Cancer Res**, v.63, n.4, p.787-92, Feb. 2003.
87. RINAGGIO, J. et al. Using immunofluorescence in the diagnosis of chronic ulcerative lesions of the oral mucosa. **Comp. Contin Educ Dent**, v. 20, n.10, p.943-950, 1999.
88. RODE, M.; KOGOJ-RODE, M. Malignant potential of the reticular form of oral lichen planus over a 25-year observation period in 55 patients from Slovenia. **J Oral Sci**, v.44, n.2, p.109-11, Jun.2002.
89. SCULLY, C. et al. Update on oral lichen planus: etiopathogenesis and management. **Crit Rev Oral Med**, v.9, n.1, p.86-122,1998.
90. SCULLY, C.; EL-KOM, M. Lichen planus: review and update on pathogenesis. **J Oral Pathol**, v.14, p.431-458, 1985.
91. SHIN, K.H. et al. Prevalence of microsatellite instability, inactivation of mismatch repair genes, p53 mutation, and human papillomavirus infection in Korean oral cancer patients. **Int J Oncol**, v.21, n.2, p.297-302, Aug. 2002.

92. SHIN, K.H.;PARK, J.G. Microsatellite instability is associated with genetic alteration not with low levels of expression of the human mismatch repair proteins hMSH2 an HMLH1. **Eur J Cancer**, v.36, n.7, p.925-31, May.2000.
93. SHKLAR, GERALD. Lichen planus as an oral ulcerative disease. **Oral Surg.**, v.33, n.3, p.376-88, 1972.
94. SILVERMAN, J.S. Oral lichen planus: a potentially premalignant lesion. **J Oral Maxillofac Surg**, v.58, p.1286-8, 2000.
95. SILVERMAN, J.S.; GRIFFITH, M. Studies on oral lichen planus: follow-up on 200 patients, clinical characteristics, and associated malignancy. **Oral Surg**, v.37, n.5, p.705-10, May. 1974.
96. SILVERMAN, S.Jr. et al. A prospective follow-up study of 570 patients with oral lichen planus: persistence, remission and malignant association. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v.60, p.30-34, 1985.
97. SIMARK-MATTSSON, C. et al. Distribution of interleuk-2,4,10, tumor necrosis factor- $\alpha$  and transforming growth factor- $\beta$  mRNAs in oral lichen planus. **Arch Oral Biol**, v.44, p.499-507,1999.
98. SIMON Jr., M; GRUSCHWITZ, M.S. In situ expression and serun levels of tumor necrosis factor alpha receptors in patients with lichen planus. **Acta Derm. Venereol. (Stockh)**, v.77, p.191-193, 1997.
99. STONE, J.G; ROBERTSON, D.; HOULSTON, R.S. Immunohistochemistry for MSH2 e MHL1: a method for identifying mismatch repair deficient colorectal cancer. **J Clin Pathol**, v.54, p.484-487,2001.
100. SU, S.S and P.MODRICH. *Escherichia coli* mutS-encoded protein binds to mismatched DNA base pairs. **Proc. Natl. Acad. Sci. USA**, v.83, p.5057-5061, 1986.
101. SUGERMAN, P.B. et al. Is there a role for tumor necrosis factor-alpha (TNF- $\alpha$ ) in oral lichen planus? **J. Oral pathol. Med**, v.25, p.219-224, 1996.
102. SUGERMAN, P.B.; SAVAGE, N.W. Oral lichen planus: causes, diagnosis and management. **Aust Dent J.**, v.47, n.4, p.290-7, Dec. 2002.
103. SUGERMAN, Philip B. et al. Oral lichen planus. **Clinics in dermatology**, v.18, p.533-539, 2001.
104. SURGEMAN, P.B et al. Supressor cell function in oral lichen planus. **J Dent Res**, v.71, n.12, p.1916-1919, 1992.

105. SURGEMAN, P.B. et al. Phenotype and supresor activity of T-lymphocyte clones extracted from lesions oral lichen planus. **Br J Dermatol**, v.131, p.319-324, 1994.
106. SURGEMAN, P.B. et al. The patogenesis of oral lichen planus. **Crit Rev Oral Biol Med**, v.13, n.4, p.350-65, 2002.
107. SURGERMAN, Philip B. et al. Oral lichen planus. **Clinics in dermatology**, v.18, p.533-539, 2000.
108. THORN, J.J. et al. Course of various clinical forms of oral lichen planus. A prospective follow-up study of 611 patients. **J Oral Pathol**, v.17, p.213-218, 1988.
109. THORNHILL, M.H. Immune mechanisms in oral lichen planus. **Acta Odontol Scand**, v.59, n.3, p.174-7, 2001.
110. TYLDESLEY, W.R. Malignant transformation in oral lichen planus. **Br Dent J**, v.153, p.324-8, 1982.
111. VALENTE,G. et al. Sequential immunohistochemical p53 expression in biopsies of oral lichen planus undergoing malignant evolution. **J Oral Pathol Med**, v.30, n.3, p.135-140, Mar.2001.
112. VAN DER MEIJ, E.H. et al. A review of the recent literature regarding malignant transformation of oral lichen planus. **Oral Surg Oral Med oral Pathol**, v. 88, n.3, p.307-10, Sep.1999.
113. VAN DIS, M.; PARKS, E.T. Prevalence of oral lichen planus in patients with diabetes mellitus. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v.79, n.6, p.696-700, 1995.
114. VESCOVI, P. et al. Neoplastic transformation of oral lichen planus. I: review of the literature. **Minerva Stomatol**, v.49, n.5, p.249-55, May.2000.
115. VICENT et al. Oral lichen planus: the clinical, historical, and therapeutic features of 100 cases. **Oral Surg Oral Med Oral Pathol**, v.70, n.8, p.165-171, 1990.
116. VOÛTE, A.B.E et al. Posible premalignant carácter of oral lichen planus: the Ámsterdam experience. **J Oral Pathol Med**, v.21, p.326-9, 1992.
117. WALSH, L.J. et al. Immunopathogenesis of oral lichen planus. **J. Oral Pathol Med**, v.19, p.389-396, 1990.
118. WALSH, L.J. et al. Relationship between mast cell degranulation and inflammation in the oral cavity. **J. Oral Pathol Med.**, v.24, p.266-272, 1995.

119. WALTON, L.J. et al. Intra-epithelial subpopulations of T lymphocytes and langerhans cells in oral lichen planus. **J Oral Pathol Med**, v.27, p.116-123, 1998.
120. WALTON, L.J. et al. VCAM-1 and ICAM-1 are expressed by Langerhans cells, macrophages, in endothelial cells in oral lichen planus. **J. Oral Pathol Med**, v.21, p.65-69, 1994.
121. YAACOB, H.B. et al. Malignancy in oral lichen planus: a review of a group from the Malaysian population. **Oral Sci**, v.44, n.2, p.65-71, Jn.2002.
122. YAMAMOTO, T et al. Cytokine production by keratinocytes and mononuclear infiltrates in oral lichen planus. **J Oral Pathol. Med**, v. 23, p.309-315, 1994.
123. YAMAMOTO, T; OSAKI, T. Characteristic cytokines generated by keratinocytes and mononuclear infiltrates in oral lichen planus. **J. Invest. Dermatol.**, v. 104, n.5, p.784-788, 1995.
124. YAMAMOTO, N. et al. Frequent allelic loss/imbalance on the long arm of chromosome 21 in oral cancer: evidence for three discrete tumor suppressor gene loci. **Oncol Rep**, v.6, n.6, p.1223-7, Nov-Dec.1999.
125. YANG, Y. et al. Interleukin-4 induced proliferation in normal human keratinocitos is associated with c-myc gene expression and inhibited by genistein. **J Invest. Dermatol.**, v.107, p.367-372,1996.
126. ZEGARELLI, D.J. The treatment of oral lichen planus. **Ann Dent**, v.52, n.2, p.3-8, 1993.
127. ZHANG, L. Molecular analysis of oral lichen planus: Is this a premalignant lesion? **Am J Pathol**, v.151, n.2, p.323-7, Feb.1997.
128. ZHAO, Z.Z. et al. Association between mast cells and laminin in oral lichen planus. **J. Oral. Pathol. Med**, v.27, p.163-167, 1998.