

LEONARDO NOGUEIRA RODRIGUES

**Investigação de perda de heterozigosidade e expressão
da proteína Ki-67 em lesão liquenóide oral associada
ao amálgama**

Faculdade de Odontologia

Universidade Federal de Minas Gerais

Belo Horizonte

2016

LEONARDO NOGUEIRA RODRIGUES

Investigação de perda de heterozigosidade e expressão da proteína Ki-67 em lesão liquenóide oral associada ao amálgama

Dissertação apresentada ao Colegiado do Programa de Pós-Graduação da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, como requisito parcial para obtenção do grau de Mestre em Odontologia – área de concentração em Estomatologia.

Orientadora: Prof.^a Dr.^a Vanessa de Fátima Bernardes

Coorientadora: Prof.^a Dr.^a Silvia Ferreira de Sousa

Faculdade de Odontologia – UFMG

Belo Horizonte

2016

FOLHA DE APROVAÇÃO



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA



FOLHA DE APROVAÇÃO

Investigação de perda de heterozigosidade e expressão da proteína ki-67 em lesão liquenóide oral associada ao amálgama

LEONARDO NOGUEIRA RODRIGUES

Dissertação submetida à Banca Examinadora designada pelo Colegiado do Programa de Pós-Graduação em Odontologia, como requisito para obtenção do grau de Mestre em Odontologia, área de concentração Estomatologia.

Aprovada em 21 de julho de 2016, pela banca constituída pelos membros:

Prof(a). Vanessa de Fatima Bernardes - Orientador
UFMG

Prof(a). Silvia Ferreira de Sousa
ICB/UFMG - Depto. Patologia Geral

Prof(a). João Artur Ricieri Brito
EEAD

Prof(a). Carolina Cavalieri Gomes
UFMG

Belo Horizonte, 21 de julho de 2016.

ATA DA DEFESA



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

PROGRAMA DE PÓS-GRADUAÇÃO EM ODONTOLOGIA



ATA DA DEFESA DE DISSERTAÇÃO DO ALUNO LEONARDO NOGUEIRA RODRIGUES

Aos 21 dias de julho de 2016, às 14:00 horas, na sala 3403 da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais, reuniu-se a Comissão Examinadora composta pelos professores: Vanessa de Fatima Bernardes (Orientadora) – FO/UFMG, Sílvia Ferreira de Sousa – ICB/UFMG - Depto. Patologia Geral, João Artur Ricieri Brito – FEAD e Carolina Cavalieri Gomes – ICB/UFMG, para julgamento da dissertação intitulada: **Investigação de perda de heterozigosidade e expressão da proteína KI-67 em lesão liquenóide oral associada ao amálgama.** A Presidente, Profa. Vanessa de Fatima Bernardes, abriu os trabalhos e apresentou a Comissão Examinadora. Após a exposição oral do trabalho pelo aluno e arguição pelos membros da Comissão Examinadora, o candidato foi considerado:

Aprovado

Reprovado

Finalizados os trabalhos, lavrou-se a presente ata que, lida e aprovada, vai assinada por mim e pelos demais membros da Comissão. Belo Horizonte, 21 de julho de 2016.


Prof(a). Vanessa de Fatima Bernardes


Prof(a). Sílvia Ferreira de Sousa


Prof(a). João Artur Ricieri Brito


Prof(a). Carolina Cavalieri Gomes

*Dedico este trabalho aos meus pais Maria da Graça
Noqueira Rodrigues e Aroldo Rodrigues Pereira.*

AGRADECIMENTOS

Agradeço primeiramente a **Deus**, por ter me concedido sabedoria, tranquilidade, perseverança e a oportunidade de concretizar mais essa etapa da minha vida.

Aos meus Pais **Maria** e **Aroldo** por estarem presentes em todos os momentos da minha vida, me ajudando, me apoiando. Sem vocês nada disso estaria acontecendo.

A minha orientadora, **Vanessa de Fátima Bernardes**, pela simplicidade ao orientar, por confiar e acreditar em mim. Minha gratidão por todo apoio e ensinamentos.

A minha coorientadora, **Silvia Ferreira de Sousa**, pelo companheirismo, pela atenção e pela disposição em sempre me ajudar.

A **Professora Carolina Cavalieri Gomes**, pela oportunidade, confiança que me foi dada a fazer parte da equipe do laboratório de Biologia Molecular e pela contribuição em meu crescimento profissional e pessoal.

Ao **Professor Ricardo Santiago Gomez**, pela oportunidade, pelas sugestões e por contribuir com meu aprendizado.

A **Natalia Cristina Ruy Carneiro**, minha namorada, pelo apoio, amor e paciência.

Aos professores **Ricardo Alves Mesquita** e **Fábio Ramoa Pires** pela generosa cooperação.

Ao professor **Mauro Henrique Nogueira Guimarães de Abreu** pela importante colaboração.

Aos **funcionários do Laboratório de Patologia Bucal da FO-UFMG**, pelo auxílio.

A todos os **colegas do laboratório de Biologia Molecular** pela convivência e parceria.

A todos os **colegas do mestrado** pela amizade, companheirismo e paciência.

E a todas as pessoas que diretamente ou indiretamente contribuíram para essa conquista tão importante em minha vida.

*"Descobrir consiste em olhar para o que todo mundo
está vendo e pensar uma coisa diferente".*

Roger Von Oech

Resumo

A Lesão liquenóide oral associada ao amálgama (LLOAA) é uma lesão incomum de patogênese ainda incerta. A lesão apresenta características clínicas e histopatológicas semelhantes ao líquen plano bucal (LPB), que é considerada uma lesão com potencial de transformação maligna. Pesquisas moleculares a fim de aprimorar os conhecimentos sobre a patogênese e o comportamento clínico de LLOAA ainda são escassas. O objetivo do estudo foi investigar a perda de heterozigosidade (*loss of heterozygosity – LOH*) em amostras de LLOAA, LPB e mucosa bucal normal (MBN) em regiões cromossômicas 9p22, 11q13.4 e 17p13.1 e avaliar o índice de proliferação celular das mesmas amostras, buscando uma associação entre o índice de proliferação celular e LOH. Foram selecionadas 9 amostras de LLOAA, 10 de LPB e 8 de MBN, pareadas por sexo e idade. A LOH nas regiões cromossômicas 9p22, 11q13.4 e 17p13.1 foi avaliada por meio dos marcadores microsatélites polimórficos D9S157, D9S162, D9S171, D11S1369, TP53, AFM238WF2. O índice de proliferação celular foi avaliado pela expressão imuno-histoquímica da proteína Ki-67 (MIB-1) em 8 amostras de LLOAA, 10 de LPB e 8 de MBN. Amostras de LLOAA exibiram LOH em 3 dos 6 marcadores (AFM238WF2, D9S157 e D11S1369), de LPB exibiram LOH em 2 destes marcadores (AFM238WF2, D9S157) enquanto que amostras de MBN não apresentaram LOH. A perda alélica foi mais frequente para os marcadores AFM238WF2 (17p13.1, 21%) e D9S157 (9p22, 17,64%) e a média da frequência de perda alélica na amostras de LLOAA foi de 26,6% enquanto que nas amostras de LPB foi

de 7,5%. A imuno-histoquímica apresentou positividade nuclear nas células variando entre 0,29% a 28% e não houve associação entre o índice de proliferação celular e LOH em LLOAA e LPB ($p>0,05$). Este estudo demonstrou que LLOAA, semelhante ao LPB, apresentou LOH nas regiões cromossômicas 9p22, 11q13.4 e 17p13.1, independentemente da taxa de proliferação celular. Apesar de não ter sido encontrada tal associação, LOH ocorre em LLOAA e pode estar envolvida na patogênese desta lesão.

Palavras Chaves: Lesão liquenóide oral associada ao amálgama, líquen plano bucal, perda de heterozigosidade, índice de proliferação celular.

Abstract

The Amalgam-associated oral lichenoid lesion (AAOLL) is an infrequent disease of uncertain pathogenesis. The lesion shows clinical and histopathological features similar to oral lichen planus (OLP), which is considered a lesion with malignant transformation potential. Molecular researches in order to improve knowledge of the pathogenesis and clinical behavior of AAOLL are still scarce. The purpose of the current study was to evaluate the loss of heterozygosity - LOH in AAOLL, in OLP, and in normal oral mucosa (NOM) using polymorphic microsatellite markers at chromosome regions 9p22, 11q13.4 and 17p13.1, located around important tumor suppressor genes and to evaluate the immunohistochemical expression of Ki-67 protein in the same samples. The sample comprised 09 AAOLLs, 10 OLPs and 8 NOMs matched by patients' gender and age. The LOH at chromosome regions 9p22, 11q13.4 and 17p13.1 was evaluated by microsatellite polymorphic markers D9S157, D9S162, D9S171, D11S1369, TP53, AFM238WF2. Cell proliferation was assessed by immunohistochemical expression of Ki-67 (MIB-1) in eight AAOLL, ten OLP and eight NOM. AAOLL exhibited LOH at 3 of 6 LOH markers (AFM238WF2, D9S157 AND D11S1369), while OLP demonstrated LOH at two of these markers (AFM238WF2, D9S157) while NOM showed no LOH. The allelic loss were most frequently in marker AFM238WF2 (17p13.1, 21%) and D9S157 (9p22, 17,64%). The mean fractional allelic loss of AAOLL was 26,6% whereas mean fractional allelic loss of OLP was 7,5%. Immunohistochemistry revealed nuclear positivity ranging from 0,29% to 28% of the cells and there was no association between cell

proliferation and LOH in LLOAA e LPB ($p>0,05$). Our study shows that AAOLL, similar to OLP, exhibits LOH, irrespective of cell proliferation index. Despite the lack of association between LOH and cell proliferation we can assume that LOH occurs in AAOLL and it should be considered in the pathogenesis of this lesion.

Keywords: Amalgam-associated oral lichenoid lesion, oral lichen planus, loss of heterozygosity, cell proliferation index.

LISTA DE TABELAS

Tabela 1:	Características clinicopatológicas.....	36
Tabela 2:	Marcadores de regiões microssatélites para regiões 9p, 11q e 17p.....	38
Tabela 3:	Condições térmicas da PCR.....	39
Tabela 4:	Dados de LOH e FAL.....	48
Tabela 5:	Índice de proliferação celular das amostras de LLOAA, LPB e MBN.....	49
Tabela 6:	Índice de proliferação celular dos três grupos de amostras pareados em gênero e idade.....	50
Tabela 7:	Índice de proliferação celular e LOH do grupo de amostras de LLOAA.....	51
Tabela 8:	Índice de proliferação celular e LOH do grupo de amostras de LPB.....	52

LISTA DE FIGURAS

Figura 1:	Aspecto clínico da lesão liquenóide oral associada ao amálgama. A) Lesões em placa esbranquiçadas na mucosa jugal esquerda associadas a restaurações em amálgama Classe V em corrosão. B) Lesão branca em placa na mucosa jugal esquerda em contato direto com o amálgama presente na restauração classe I no dente 17.....	23
Figura 2:	Aspecto clínico do Líquen plano bucal. Presença de linhas entrelaçadas conhecidas como estrias de Wickham, caracterizando a forma reticular da lesão.....	25
Figura 3:	Regiões cromossômicas 9p, 11q e 17p incluindo marcadores microssatélites e os genes supressores de tumor.....	38
Figura 4:	Eletoferograma para análise de LOH. A altura do alelo longo do epitélio apresentou uma redução em mais de 50% em comparação com a altura do alelo longo do conjuntivo, sendo interpretado como LOH. Amostra #5 para o marcador AFM238WF2. Alelo curto(1) e alelo longo (2).....	41
Figura 5:	Eletoferograma da amostra #4 para o marcador D9S162 apresentando retenção dos alelos no tecido epitelial (Lesão).....	41
Figura 6:	Eletoferograma capilar ilustrando a homozigose da amostra #9 para o marcador AFM238WF2. Ao lado a fórmula para calcular o Fator de Correção (FC).....	42
Figura 7:	Eletoferograma capilar ilustrando a correção de <i>stutter</i> da amostra #5 para o marcador AFM238WF2. Ao lado, um esquema representando a correção do <i>stutter</i> e o cálculo para análise de LOH.....	43
Figura 8:	Fotomicrografia da expressão da proteína Ki-67. A) Amostra de LLOAA (#8). B) Amostra de LPB (#8). C) Amostra de mucosa bucal normal (#7) (100x).....	50

LISTA DE SÍMBOLOS, SIGLAS E ABREVIATURAS

μg	Micrograma
μl	Microlitro
μM	Micromolar
μm	Micrometros
11q	Braço longo do cromossomo 11
17p	Braço curto do cromossomo 17
3p	Braço curto do cromossomo 3
9p	Braço curto do cromossomo 9
bp	Pares de base
CA	Citosina e Adenina
CAAE	Certificado de Apresentação para Apreciação Ética
COEP	Comitê de Ética em Pesquisa
Di	Dinucleotídeo
DNA	Ácido desoxirribonucléico
DNTPs	Deoxinucleotídeos fosfato
G₀	Gap 0
G₁	Gap 1
G₂	Gap 2
GATA	Guanina, adenosina, timina, adenosina
GST	Genes supressores de tumor
LOH	<i>Loss of Heterozygosity</i>
FAL	<i>Fraction of Allelic Loss</i>
H&E	Hematoxilina-eosina
IHQ	Imuno-histoquímica
LLO	Lesão liquenoide oral

LLOAA	Lesão liquenóide oral associada ao amálgama
LPB	Líquen plano bucal
MBN	Mucosa bucal normal
CCEB	Carcinoma de células escamosas de boca
OMS	Organização Mundial da Saúde
PCR	<i>Polimerase Chain Reaction</i> (reação em cadeia da polimerase)
S	Síntese
Seg	Segundos
Tetra	Tetranucleotídeo

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO.....	18
2. REVISÃO DE LITERATURA.....	20
2.1 Lesão líquenóide oral associada ao amálgama.....	20
2.2 Líquen plano bucal.....	24
2.3 Genes supressores de tumor.....	27
2.3 Perda de heterozigosidade (<i>loss of Heterozigosity – LOH</i>).....	29
2.4 Proteína Ki-67.....	31
3. OBJETIVO.....	33
3.1 Objetivo Geral.....	33
3.2 Objetivos Específicos.....	33
4. MATERIAIS E MÉTODOS.....	35
4.1 Seleção de casos e obtenção da amostra.....	35
4.2 Microdissecção das amostras incluídas em parafina.....	36
4.3 Extração do DNA.....	37
4.4 Sequencia para análise de LOH.....	37
4.5 Imuno-histoquímica (IHQ).....	44
4.6 Análise estatística.....	46
5. RESULTADOS.....	47
5.1 Análise de LOH.....	47
5.2 Análise imuno-histoquímica.....	49
5.3 Análise dos dados estatísticos.....	50
6. DISCUSSÃO.....	53

7. CONCLUSÃO	58
8. REFERÊNCIAS	59
9. ANEXO	65
9.1 Anexo I: Folha de aprovação do COEP.....	65
10. APÊNDICE	66
10.1 Apêndice A: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.....	66

1. INTRODUÇÃO

Lesões bucais associadas ao amálgama utilizado em restaurações dentárias podem se apresentar com coloração esbranquiçada, semelhantes à leucoplasia ou ao líquen plano bucal, sendo necessário um diagnóstico preciso, a fim de serem diferenciadas e, conseqüentemente, submetidas a um tratamento ideal (SCULLY, 2014). A diferenciação entre lesões brancas, dentre elas, a leucoplasia bucal, o líquen plano bucal (LPB) e a lesão liquenóide oral associada ao amálgama (LLOAA), baseia-se em critérios clínicos e morfológicos, associados à análise histopatológica (THORNHILL *et al.*, 2003; MCPARLAND e WARNAKULASURIYA, 2012). Lesões específicas de natureza imunológica ou reações tóxicas crônicas não específicas na mucosa bucal podem estar relacionadas a produtos liberados por agentes restauradores (HOLMSTRUP, 1992). A reação imunológica mais provavelmente envolvida nas lesões bucais associadas ao amálgama é a reação de hipersensibilidade tardia (tipo IV) (HOLMSTRUP, 1992).

Diversos fatores podem estar envolvidos no desenvolvimento de alterações da cavidade bucal, tais como genes e vias de sinalização que controlam o ciclo celular, apoptose, instabilidade genômica, angiogênese, entre outros (PITIYAGE *et al.*, 2009). Dentre estes, a perda de heterozigosidade (LOH) relacionada a genes supressores de tumor tem sido identificada em lesões bucais de origens distintas, inclusive em lesões liquenóides orais (PITIYAGE *et al.*, 2009; ZHANG *et al.*, 2000; ROSIN *et al.*, 2000). A análise de LOH permite identificar alterações no equilíbrio alélico decorrentes de deleção, recombinação, duplicação e perda cromossômica,

que podem desencadear modificações na função celular, culminando no desenvolvimento de neoplasias (PITIYAGE et al., 2009; SMITH et al., 2009).

Existem estudos que tentaram identificar a possível condição de transformação maligna de leucoplasia oral, líquen plano bucal e lesão liquenoide oral a partir de métodos moleculares, como a análise de LOH (ZHANG et al., 1997; ZHANG et al., 2000; ACCURSO et al., 2011; FONSECA-SILVA et al., 2016)

Distúrbios no controle do ciclo celular levam a um aumento da proliferação celular e essa proliferação pode ser identificada e quantificada pela análise imuno-histoquímica da proteína Ki-67 (BARBOSA et al, 2003; GUERDES et al., 1991; RABENHORST, 1994). A análise desse antígeno nuclear, expresso nas fases ativas do ciclo celular (G_1 , S, G_2 e mitose) tem sido utilizada em vários estudos pela sua importância ao determinar, junto a outros métodos moleculares, o diagnóstico e prognóstico de diversas neoplasias e lesões consideradas neoplásicas (GUERDES et al., 1991; ARISAWA et al., 1999; TABOR et al., 2003).

Apesar dos numerosos estudos envolvendo meios de diagnóstico e tratamento, a patogênese da lesão liquenóide oral associada ao amálgama ainda não foi completamente elucidada. O aprimoramento dos métodos diagnósticos utilizando técnicas moleculares desperta o interesse para um melhor entendimento sobre a patogênese e comportamento desta lesão, podendo este trabalho contribuir para a investigação da mesma.

2. REVISÃO DE LITERATURA

2.1 Lesão liquenóide oral associada ao amálgama (LLOAA)

A LLOAA é uma lesão incomum e faz parte de um grupo de doenças inflamatórias crônicas heterogêneas (LATITEGUI-SEBASTIÁN et al., 2012). Pode manifestar-se como uma reação de hipersensibilidade tardia do tipo IV ou uma reação tóxica crônica não específica. A reação de hipersensibilidade do tipo IV é uma resposta imunológica comum na mucosa bucal que, de acordo com Holmstrup (1992) e Lartitegui-Sebastián e colaboradores (2012), ocorre pela liberação de produtos de restaurações de amálgama em corrosão, principalmente o mercúrio isoladamente ou em conjunto com o cobre, zinco e estanho. A fisiopatologia da hipersensibilidade do tipo IV é complexa. A reação inicia-se pelo reconhecimento dos antígenos (elementos metálicos) apresentados às células T CD8+ e CD4+ auxiliares por macrófagos, que secretam interleucinas. As células T ativadas liberam citocinas que vão mediar a resposta imune (HOLMSTRUP,1992; MCPARLAND e WARNAKULASURIYA,2012).

A reação tóxica crônica não específica ocorre pelo contato direto da mucosa bucal com agentes tóxicos provenientes do material restaurador amálgama em baixa concentração e por um longo período (HOLMSTRUP, 1992; MCPARLAND e WARNAKULASURIYA, 2012). Pouco se sabe sobre a reação tóxica crônica e seu envolvimento com o amálgama, mas Kaga e colaboradores (1988) afirmam que a reação pode ser mais citotóxica e

ocorrer com maior incidência quando em contato com restaurações de amálgama que apresentam em sua composição maior concentração de zinco (KAGA et al., 1988). As características clínicas das lesões provocadas pela reação tóxica crônica são semelhantes às características clínicas das lesões provocadas pela reação de hipersensibilidade, obtendo o diagnóstico por exclusão a partir do teste de contato (*Patch test*) negativo (HOLMSTRUP, 1992; MCPARLAND e WARNAKULASURIYA, 2012).

O teste de contato (*Patch test*) é utilizado para identificar a possibilidade de o paciente ser alérgico aos componentes do amálgama, podendo justificar o aparecimento da LLOAA, causada por uma reação de hipersensibilidade (LATITEGUI-SEBASTIÁN et al., 2012; ISSA et al., 2005; ISMAIL et al., 2007; TORGERSON et al., 2007). O teste é realizado por dermatologistas que colocam fitas adesivas hipoalergênicas, contendo componentes do amálgama (cloreto de cobalto, sulfato de níquel, mercúrio amoniacal, nitrato de prata) sobre a pele das costas ou antebraço por 48 a 72 horas (WONG et al., 2003; ISMAIL et al., 2007; MCPARLAND e WARNAKULASURIYA, 2012). O teste é realizado na pele por proporcionar maior especificidade e sensibilidade em relação a testes realizados na mucosa bucal (HOLMSTRUP, 1991). O resultado é positivo quando o paciente apresenta na pele reações eritematosas, vesículas edematosas ou bolhas ulceradas (ISMAIL et al., 2007; DITRICHOVA et al., 2007). Para Holmstrup (1992), pacientes a serem submetidos ao teste devem apresentar lesões bucais assimétricas e que estejam em íntima relação com o material restaurador. O teste de contato não é um exame totalmente confiável, podendo apresentar resultados falsos positivos e/ou resultados

negativos oriundos da metodologia do teste e pela concentração dos componentes de amálgama utilizados (MCPARLAND e WARNAKULASURIYA, 2012; ISSA et al., 2005).

Os critérios de diagnóstico de LLOAA são estabelecidos a partir de uma história detalhada do paciente juntamente com os achados clínicos, incluindo as características da lesão e sua relação direta com as restaurações e análise histopatológica (MCPARLAND e WARNAKULASURIYA, 2012; LATITEGUI-SEBASTIÁN et al., 2012; THORNHILL et al., 2003; OSTMAN et al., 1996). A LLOAA acomete adultos da quinta a sétima década de vida, com média de 57,3 anos de idade e com predileção pelo gênero feminino (ISSA et al., 2005; WONG et al., 2003). A lesão apresenta um amplo espectro clínico, podendo se apresentar na forma estriada, reticular, semelhante à placa, eritematosa, erosiva, vesiculosa e ulcerativa, sendo o aspecto clínico similar a outras lesões orais como leucoplasia, lesão líquenóide associada a medicamentos, doença do enxerto *versus* hospedeiro, lúpus eritematoso sistêmico e líquen plano bucal (MCPARLAND e WARNAKULASURIYA, 2012; HOLMSTRUP, 1992; OSTMAN et al., 1996). Quando as LLOAAs são sintomáticas, os pacientes geralmente apresentam resultado positivo no teste de contato e relatam ardência, desconforto, prurido, dor ou gosto metálico (ISSA et al., 2005; WONG et al., 2003). A LLOAA acomete principalmente mucosa jugal, língua e gengiva em contato íntimo com restaurações em amálgama adjacentes apresentando distribuição assimétrica e unilateral (Figura 1) (MCPARLAND E WARNAKULASURIYA, 2012; MONTEBUGNOLI et al., 2012; THORNHILL et al., 2003).

Histopatologicamente, apresenta um quadro semelhante ao líquen plano bucal (LPB), exibindo epitélio de revestimento hiperortoqueratinizado, com áreas de degeneração (ou liquefação) da camada basal, além de moderado a intenso infiltrado inflamatório mononuclear subepitelial (OSTMAN et al., 1996).

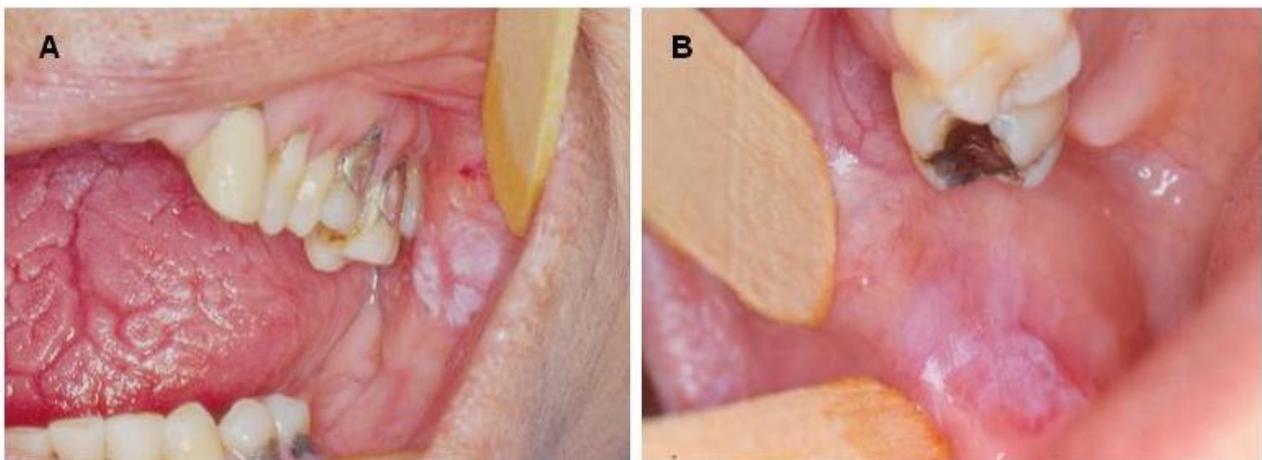


Figura 1: Aspecto clínico da lesão líquenóide oral associada ao amálgama. **A)** Lesões em placa esbranquiçadas na mucosa jugal esquerda associadas a restaurações em amálgama Classe V em corrosão. **B)** Lesão branca em placa na mucosa jugal esquerda em contato direto com o amálgama presente na restauração classe I no dente 17. Fonte: BERNARDES et al., 2007

O tratamento para LLOAA baseia-se na substituição completa da restauração de amálgama, independentemente de o *Patch test* ser positivo ou negativo, em estado de corrosão por outro material restaurador (resina composta, ionômero de vidro, coroas em porcelana) com a melhora total do quadro clínico e sintomas em aproximadamente 3 meses (WONG et al., 2003; ISSA et al., 2005).

2.2 Líquen plano bucal

O líquen plano bucal é uma doença inflamatória mucocutânea crônica, de etiologia ainda desconhecida que parece estar relacionada a um tipo de resposta imune mediada por células T CD8+ (ACAY et al., 2006; SUGERMAN et al., 2002; ISMAIL et al., 2007; THORNHILL, 2001). A ativação das células T CD8+, por fatores endógenos ou exógenos, se dá pela interação com outras células inflamatórias (células de Langerhans e macrófagos) e resulta na apoptose de queratinócitos da camada basal reconhecidos como antígenos (THORNHILL, 2001; THORNHILL et al., 2003; SCIUBBA, 2011; SURGERMAN et al., 2002). O LPB é uma doença de causa multifatorial, podendo ser desencadeada pelo uso de diversos medicamentos, estresse psicológico, tabagismo, infecções virais e bacterianas, materiais restauradores ou ainda apresentar origem idiopática (SCULLY et al., 1998; SCIUBBA, 2011; SURGERMAN et al., 2002; MOHAMMAD et al., 2016).

O líquen plano bucal ocorre em aproximadamente 1% a 2% da população em geral, com predileção para pacientes de meia idade e do gênero feminino (THORNHILL et al., 2003; SURGERMAN et al., 2002; AL-HASHIMI et al., 2007). As lesões bucais usualmente apresentam morfologia clínica distinta e distribuição característica, mas podem apresentar padrões e formas complexas, causando uma dificuldade no diagnóstico (SCULLY et al., 1998). A dificuldade no diagnóstico leva à necessidade de uma criteriosa avaliação clínica e histopatológica.

Clinicamente as lesões são usualmente bilaterais e simétricas, o que as diferenciam de lesões liquenóides orais (LLOs). O LPB pode se apresentar na forma reticular, sendo esta a forma mais comum, caracterizada por linhas entrelaçadas conhecidas como estrias de Wickham (Figura 2). Outras apresentações clínicas incluem a forma de placa esbranquiçada, erosiva/atrófica, sendo estas últimas frequentemente sintomáticas (MOHAMMAD et al., 2016; SCIUBBA, 2011; ACCURSO et al., 2011). As formas bolhosas e papulares, também descritas na literatura, são consideradas incomuns (ISMAIL et al., 2007; PARASHAR, 2011). Os sítios bucais mais comuns das lesões são a mucosa jugal, borda de língua, gengiva e vermelhão de lábio (SCIUBBA, 2011; MOHAMMAD et al., 2016; ISMAIL et al., 2007).



Figura 2: Aspecto clínico do Líquen plano bucal. Presença de linhas entrelaçadas conhecidas como estrias de Wickham, caracterizando a forma reticular da lesão. Cortesia: Professor Ricardo Santiago Gomez

Os achados histopatológicos do LPB demonstram liquefação da camada basal associada a um intenso infiltrado inflamatório linfocitário, com disposição em banda, na junção do epitélio com a lâmina própria. É possível também observar a presença de numerosos corpúsculos colóides eosinofílicos na interface epitélio-conjuntivo, denominados corpos de Civatte (EISENBERG, 2000; SCULLY et al., 1998; SCIUBBA, 2011).

Não existe um tratamento específico para o LPB. O tratamento baseia-se no uso de corticoides tópicos, em bochechos ou pomadas, ou o uso de corticóides sistêmicos, considerando-se a extensão, forma e sintomatologia da lesão (CARROZZO e GANDOLFO, 1999). O acompanhamento periódico e por longo prazo do paciente é importante, mesmo que o tratamento tenha apresentado resultado satisfatório (SCIUBBA, 2011)

O potencial de transformação maligna de LPB é assunto ainda controverso e investigado por diversos estudos (BARNES et al., 2005; GANDOLFO et al., 2004; VAN DER MEIJ et al., 2007; VAN DER WAAL et al., 2009; FITZPATRICK et al., 2014).

A Organização Mundial da Saúde (OMS) considera o líquen plano bucal uma desordem potencialmente maligna sendo necessário o acompanhamento periódico dos pacientes com essa lesão devido à possibilidade de o risco de desenvolvimento de câncer bucal ser maior que na população em geral (VAN DER WAAL, 2009). Contudo, muitos autores acreditam que não haja dados suficientes que determinem uma associação entre líquen plano e câncer bucal (FITZPATRICK et al., 2014; ZHANG et al., 1997). A maioria dos casos que sofreram transformação maligna é decorrente de falhas no diagnóstico inicial da lesão (EISENBERG, 2000).

Por outro lado, atualmente existem indícios sugerindo que processos crônicos, como observado no líquen plano bucal, propiciaram um microambiente contendo citocinas capazes de influenciar a sobrevivência das células, além do seu crescimento, proliferação celular e diferenciação, contribuindo conseqüentemente com a iniciação, promoção e progressão do câncer (MIGNOGNA et al., 2004). Existem alguns autores que acreditam que a malignização das lesões de líquen plano bucal seja favorecida por alterações na expressão de proteínas que regulam os mecanismos de proliferação celular e apoptose (TANDA et al., 2000; DA SILVA et al., 2001; BASCONES et al., 2005; GONZALES-MOLES et al., 2006).

2.3 Genes supressores de tumor

Os genes supressores de tumor (GST) desempenham um papel muito importante durante o ciclo celular por estarem envolvidos na regulação negativa da sinalização e proliferação celular (VELASCO et al., 2008). Na presença de erros durante o ciclo celular, esses genes codificam proteínas que atuam em pontos de checagem, entre as fases G1 → S, na fase S e entre as fases G2 → M no ciclo celular, impedindo a duplicação exacerbada das células alteradas e mantendo a integridade genética (SCHAFER et al., 2007).

A inativação dos genes supressores de tumor segundo Knudson e colaboradores (1971) ocorre em duas etapas. Em uma etapa ocorre uma pequena deleção pontual e em outra etapa ocorre uma ampla deleção de parte do cromossomo envolvido com o gene em particular. É importante

ressaltar que, teoricamente, para a inativação de GSTs, as duas etapas precisam acontecer, independentemente da ordem. A perda funcional desses genes pode promover uma maior susceptibilidade de as células proliferarem e/ou sofrerem mutações, aumentando a possibilidade do surgimento de neoplasias (Li et al., 2012; SCHAFER et al., 1998).

Alguns GSTs como o *p16* (*SLC24A2/P16* e *BDMF/P16*) e *SH3GL2*, presentes no braço curto do cromossomo 9 (9p22), demonstraram envolvimento com o desenvolvimento e progressão em tumores humanos (AAGAARD et al., 1995; SHANG et al., 2010). O gene *p16* age bloqueando a interação entre CDKs (quinases dependentes de ciclina) interrompendo o ciclo celular quando é constatado algum erro durante o ciclo (SCHAFER et al., 1998; AAGAARD et al., 1995). O gene *SH3GL2*, que é um candidato a supressor de tumor, além de promover a endocitose, regula a sinalização intracelular impedindo o crescimento descontrolado das células (SHANG et al., 2010; SCHIMIDT et al., 1999).

O gene *FCHSD2*, presente no braço longo do cromossomo 11 (11q13.4), interage com gene *MAGI-1*, que codifica uma proteína importante. Essa proteína desempenha um papel fundamental na união das células epiteliais e essa união/junção tem íntima relação com a proliferação celular. Alterações nessa união célula-célula pode provocar o desenvolvimento de neoplasias (OHNO et al., 2003).

O gene *TP53*, presente no braço curto do cromossomo 17 (17p13.2), é um potente GST que desempenha um importante papel no ciclo celular. A presença de erros durante o ciclo celular, como estresse celular ou danos no DNA, ativa o gene *TP53*, que pode atuar de duas maneiras:

promovendo a parada do ciclo celular para que o DNA possa ser reparado e, quando o dano é irreparável, atua induzindo a apoptose das células defeituosas impedindo o possível desenvolvimento de tumores (LI et al., 2012; SCHAFER et al., 1998). Danos genéticos (deleção do gene, perda cromossômica, translocação) no *TP53* são comumente encontrados em tumores e em carcinoma de células escamosas de boca (CCEB) (HOLLSTEIN et al., 1994; GREENBLATT et al., 1991).

Eventos moleculares, como a perda de heteroziguidade (LOH), podem estar associados à alteração da expressão gênica ou à inativação desses GST (VELASCO et al., 2008).

2.4 Perda de Heteroziguidade (*Loss of Heterozygosity - LOH*)

A LOH consiste na perda de um alelo em um *locus* heterozigoto constitucional específico (VELASCO et al., 2008; BEROUKHIM et al., 2006). A LOH representa uma mudança do estado de um *locus* heterozigoto normal para o estado homozigoto (VELASCO et al., 2008) Esse evento permite avaliar alterações no balanço alélico de lesões diversas (tumores benignos, malignos e lesões potencialmente malignas), através de uma análise pareada entre o DNA de tecido normal e o DNA de um tecido com a alteração patológica de um mesmo paciente (VAN HOUTEN et al., 2000)

A LOH ocorre a partir de variações genéticas como deleções, conversão gênica, translocação, duplicação e perda cromossômica que culminam em alterações na função normal das células (VELASCO et al., 2008; VAN

HOUTEN et al., 2000). Algumas destas alterações podem ser identificadas através da análise de marcadores de regiões microssatélites, próximos a genes supressores de tumor. Esses marcadores, localizados em regiões não codificantes do DNA, são pequenos segmentos de DNA, organizados em repetições em *tandem* (sequenciais), altamente polimórficos, o que os torna susceptíveis a erros durante a replicação de DNA, e são formadas por dinucleotídeos ou trinucleotídeos (VELASCO et al., 2008; HEARN et al., 1992; DILLON et al., 1997; MIGALDI et al., 2008). Esses segmentos de DNA repetitivos têm sido reconhecidos pelas suas importantes ações na organização da cromatina, recombinação, deleção de DNA e pela regulação da atividade dos genes (LI et al., 2002; LI et al., 2004).

A análise de LOH nos marcadores microssatélites próximos a GSTs pode ser um meio de identificar alterações genéticas, como a perda de um alelo desses genes. Essas alterações são capazes de inativar os **GNTs** que têm um importante papel no controle da proliferação durante o ciclo celular (VELASCO et al., 2008; VAN HOUTEN et al., 2000; ABOU-ELHAMD et al., 2008). A LOH tem sido relacionada a diversas lesões malignas e benignas, como ameloblastoma, carcinoma endometrial, tumor de células granulares orais, tumores odontogênicos mistos e carcinoma de células escamosas de lábio (MIGALDI et al., 2008; VELASCO et al., 2008; FONSECA-SILVA et al., 2013; GALVÃO et al., 2012; CORREA et al., 2015). Além dessas lesões, LOH também tem sido relacionada a lesões consideradas potencialmente malignas, como a leucoplasia, e lesões com variados graus de displasia (FONSECA-SILVA et al., 2016; ZHANG et al., 1997; ZHANG et al., 2000; ACCURSO et al., 2011; ROZ et al., 1996).

A identificação precoce de alterações como a LOH pode ser útil no planejamento e possível predição de comportamento de lesões potencialmente malignas da cavidade bucal (ABOU-ELHAMD et al., 2008; ACCURSO et al., 2011; ROZ et al., 1996). Estudos prévios demonstraram LOH nas regiões 3p, 9p e 17p ao serem investigadas lesões bucais como líquen plano bucal e lesões com variados graus de displasia (ABOU-ELHAMD et al., 2008; ACCURSO et al., 2011; ROZ et al., 1996; MAO et al., 1996). Zhang e colaboradores (2000) identificaram maior frequência de LOH, utilizando marcadores nas regiões 3p, 9p e 17p, para amostras de lesões liquenóides displásicas em relação a amostras de líquen plano bucal.

Características clínicas e histológicas, apesar de representarem aspectos importantes, isoladamente não predizem com acurácia se lesões potencialmente malignas da cavidade bucal permanecerão estáveis, regredirão ou progredirão para uma condição maligna (PITIYAGE et al., 2009; VAN HOUTEN et al., 2000). Neste sentido, a identificação de marcadores moleculares que possam sinalizar o comportamento e a possibilidade de transformação maligna é assunto de alta relevância.

2.5 Proteína Ki-67

Desequilíbrios no controle da proliferação celular durante o ciclo celular, causados por fatores genéticos e/ou ambientais, permitem que células normais e até mesmo células neoplásicas proliferem desordenadamente.

Sendo assim, a detecção e quantificação da proliferação das células, através da análise imuno-histoquímica da proteína Ki-67, podem ser importantes para identificação e prognóstico de diversas neoplasias e lesões consideradas potencialmente malignas (BARBOSA et al, 2003; GUERDES et al., 1991; SAKAI et al., 2002, DWIVEDI et al., 2013).

Ki-67 é uma proteína não histona, cujo gene se localiza no cromossomo 10 (10q26.2) com peso molecular de 345 a 349 Kd. A Ki-67 é considerada um antígeno nuclear presente nas fases ativas do ciclo celular (G_1 , S, G_2 e mitose) e ausente na fase G_0 , com aumento de sua expressão na segunda metade da fase S, alcançando sua maior expressão na fase G_2 e mitose (RABENHORST, 1994; BARBOSA et al, 2003; QUERZOLI et al., 1996).

A análise da proteína Ki-67 é um estudo molecular importante, confiável e de grande utilidade por fornecer informações importantes sobre o prognóstico de diferentes neoplasias humanas como linfomas de Hodgkin, adenocarcinomas, carcinomas de próstata e de mama e melanomas (WAKAMATSU et al., 1995; GUERDES et al., 1991). É importante ressaltar que outras técnicas moleculares, capazes de avaliar alterações genéticas como a LOH devem ser utilizadas em conjunto com a análise de Ki-67 com o intuito de se obter maior precisão possível no diagnóstico e prognóstico das neoplasias (ARISAWA et al., 1999; TABOR et al., 2003).

2. OBJETIVOS

3.1. Objetivo Geral

Investigar a perda de heterozigosidade em regiões microssatélites próximas a genes supressores de tumor em amostras de lesão liquenóide oral associada ao amálgama.

3.2Objetivos Específicos

1. Investigar a perda de heterozigosidade em regiões microssatélites localizadas nas regiões cromossômicas 9p, 11q e 17p em amostras de lesão liquenóide oral associada ao amálgama;
2. Investigar a perda de heterozigosidade nas regiões supracitadas em amostras de líquen plano bucal e fragmentos de mucosa bucal normal;
3. Comparar as análises de perda de heterozigosidade nas regiões microssatélites estudadas entre as amostras de lesão liquenóide oral associada ao amálgama com as amostras de líquen plano bucal e mucosa bucal normal e avaliar se alterações genéticas ocorrem na mesma frequência entre as amostras;

4. Avaliar a expressão imuno-histoquímica da proteína Ki-67 nas amostras de lesão liquenóide oral associada ao amálgama, líquen plano bucal e fragmento de mucosa bucal normal;
5. Investigar a associação entre o índice de proliferação celular e LOH para as amostras de lesão liquenóide oral associada ao amálgama, líquen plano bucal e fragmento de mucosa bucal normal.

3. MATERIAIS E MÉTODOS

4.1 Seleção de casos e obtenção de amostras

O projeto foi aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa (COEP) da Universidade Federal de Minas Gerais (UFMG) sob o parecer CAAE-28755714.8.0000.5149 (anexo 1).

Foram selecionadas 08 amostras de tecidos fixados em formol e incluídos em parafina provenientes do arquivo do Laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da Universidade Federal de Minas Gerais que tenham sido diagnosticadas como lesão liquenóide oral associada ao amálgama. Foram cedidas 02 amostras de lesão liquenóide oral associada ao amálgama pelo professor adjunto de Patologia Bucal Fábio Ramoa Pires da Faculdade de Odontologia da Universidade Estadual do Rio de Janeiro para acrescentar às amostras. Porém, uma das amostras não apresentava tecido suficiente para análise.

Amostras de mucosa bucal normal, obtidas através de biópsias, que tenham sido diagnosticadas como mucocele ou fragmento de mucosa bucal e amostras de líquen plano bucal, selecionados pelos critérios histopatológicos da OMS (WHO, 1978), fixados em formol e incluídos em parafina foram também selecionadas do mesmo arquivo para comparação. Foram selecionadas 08 amostras de mucosa bucal normal e 10 amostras de líquen plano bucal. Todas as amostras selecionadas foram pareadas quanto ao gênero e idade, havendo um intervalo de idade entre uma amostra e outra de

no máximo cinco anos. As características clínicas das amostras selecionadas estão incluídas na tabela 1.

Tabela 1: Características clinicopatológicas.

LLOAA			LPB			MUCOSA NORMAL		
Amostras #	Gênero	Idade (anos)	Amostras #	Gênero	Idade (anos)	Amostras #	Gênero	Idade (anos)
#1	F	34	#1	F	37	#1	F	33
#2	F	50	#2	F	51	#2	F	52
#3	F	55	#3	F	54	#3	F	57
#4	F	34	#4	F	31	#4	F	30
-	-	-	#5	F	67	#5	F	62
#5	F	49	#6	F	51	#6	F	48
#6	M	52	#7	M	50	#7	M	52
#7	M	50	#8	M	49	#8	M	50
#8	F	40	#9	F	42	x	x	x
#9	F	77	#10	F	80	x	x	x

F: feminino; M: masculino; x Ausência de amostras; - amostra insuficiente

4.2 Microdissecção das amostras incluídas em parafina

As lâminas coradas em hematoxilina e eosina (H&E) das amostras selecionadas foram reavaliadas por uma patologista (VFB) no microscópio óptico (100x) e, com uma caneta permanente, foram delimitados o tecido conjuntivo (normal) e o tecido epitelial (lesão). Posteriormente as lâminas demarcadas (tecido conjuntivo x tecido epitelial) foram sobrepostas aos respectivos blocos de parafina para demarcação dos componentes teciduais

nos blocos, utilizando uma lâmina de bisturi número 15. Esses blocos foram então microdissecados pelo micrótomo rotativo manual com uma variação de 05 a 10 cortes de 10 µm de espessura dependendo da quantidade e qualidade dos espécimes. Os cortes foram armazenados em tubos separados, sendo um tubo para cada tecido, e foram em seguida devidamente identificados por códigos.

4.3 Extração DNA

Os tecidos foram desparafinizados inicialmente com três banhos de xilol (Sigma Aldrich, St Louis, MO, USA) e aquecidos em banho seco a 65° por 10 min. Em seguida os tecidos foram reidratados em banhos decrescentes de etanol (Merck KGaA, Darmstadt, Germany) a 100%, 95% e 70% e digeridos utilizando-se proteinase K (Qiagen, Hilden, Germany). O DNA foi extraído com o kit *QIAamp DNA FFPE Tissue Kit*, de acordo com as recomendações do fabricante (Qiagen, Hilden, NRW, Germany). Para mensurar a concentração e a pureza do DNA de cada tecido, foi utilizado o equipamento NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific, Wilmington, EUA).

4.4 Sequência para análise de LOH

Foi selecionado um painel de seis marcadores de regiões microssatélites próximas a genes supressores de tumor, localizadas nas regiões cromossômicas 9p, 11q e 17p (Tabela 2 e Figura 3).

Tabela 2: Marcadores de regiões microssatélites nas regiões 9p, 11q e 17p

Marcador	Locus	Sequência de primers	Tipo de repetição	Tamanho do produto de PCR	Gene envolvido
D9S157	9p22	F: AGCAAGGCAAGCCACATTTTC R:TGGGGATGCCAGATAACTATATC	Di (CA)	133-149 bp	<i>SH3GL2</i>
D9S162	9p22-p13	F: GCAATGACCAGTTAAGGTTC R: AATCCCACAACAAATCTCC	Di (CA)	172-196 bp	<i>SLC24A2/P16</i>
D9S171	9p22-p21	F:AGCTAAGTGAACCTCATCTCTGTCT R:ACCCTAGCACTGATGGTATAGTCT	Di (CA)	158-177 bp	<i>BDMF/ P16</i>
D11S1369	11q13.4	F: CCACAGCACTGATACATGGA R:TCAGTCTCAAGTCAAAAGTAATCG	Tetra (GATA)	180 bp	<i>FCHSD2</i>
AFM238WF2	17p13.1	F: AACAGCCTGTGCAACATAGT R: AGCTCGAAGCAACAACACTT	Di (CA)	160 bp	<i>CHRNB1</i>
TP53	17p13.2	F: TACAGGGATAGGTAGCCCGAG R: GGATTTGGGCTCTTTTGTA	Di (CA)	149 bp	<i>TP53</i>

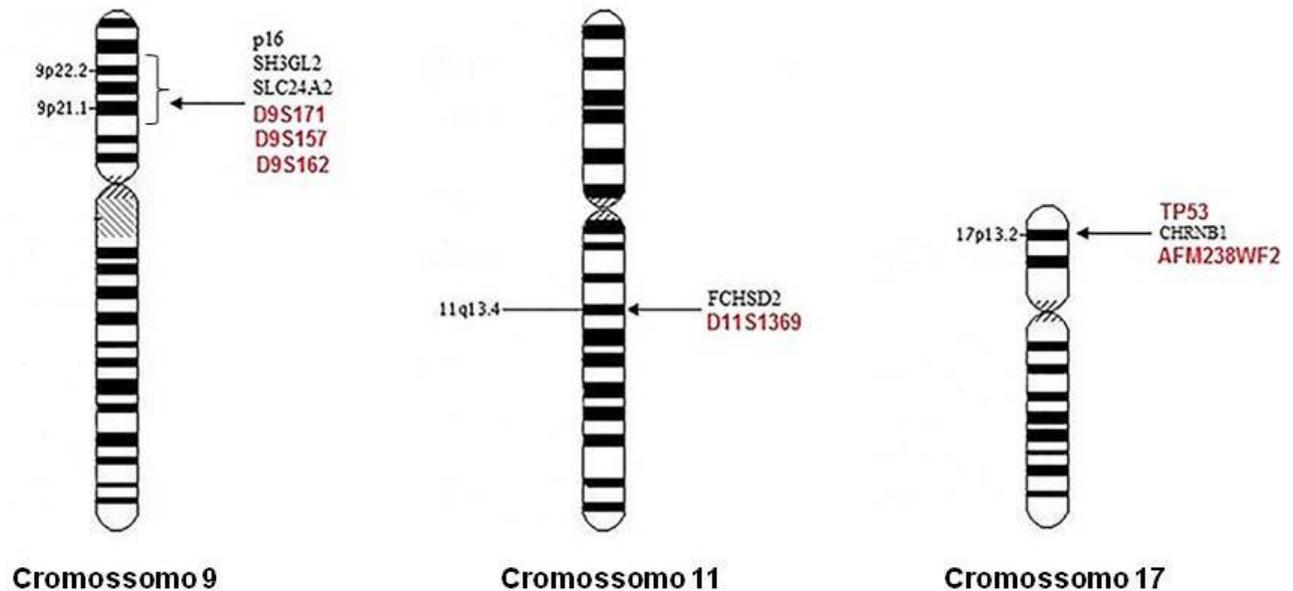


Figura 3: Regiões cromossômicas 9p, 11q e 17p incluindo marcadores microssatélites e os genes supressores de tumor.

A amplificação do DNA do tecido conjuntivo e epitelial foi realizada através da Reação em Cadeia da Polimerase (*Polimerase Chain Reaction - PCR*). Para a PCR dos marcadores microssatélites foi realizado um mix contendo 100ng de DNA (conjuntivo – epitélio), 3,75µL de desoxirribonucleotídeo trifosfato (DNTP), 1,5µL de tampão comercial de PCR, 0,75µL de cloreto de magnésio, 20µM de cada primer (forward e reverse) e 0,6 unidade de *Taq Platinum* (Invitrogen Life Technologies, Carlsbad, CA, EUA), obtendo-se um volume final de 15µL. As condições da PCR foram as mesmas para o tecido conjuntivo e epitelial, como descrito na tabela 3.

Tabela 3: Condições térmicas da PCR.

Marcador	Desnaturação inicial	45x			Extensão final	Hold
		Desnaturação	Anelamento	Extensão		
P53 D9S162	10 min 95°C	10 seg 96°C	30 seg 58°C	1 min 70°C	30 min 70°C	4°C
D9S171	10 min 95°C	10 seg 96°C	30 seg 57°C	2 min 70°C	30 min 70°C	4°C
AFM238WF2 D9S157 D11S1369	10 min 95°C	10 seg 96°C	30 seg 60°C	1 min 70°C	30 min 72°C	4°C

Os produtos de PCR amplificados, que variaram de 116 a 211 pares de base (pb), foram revelados em gel de poliacrilamida e visualizados com coloração de prata. A intensidade da coloração e espessura das bandas selecionadas de acordo com o tamanho do amplicon de cada marcador microssatélite, determinou a diluição de alguns produtos de PCR em água Milli-Q, na proporção de 1:5 a 1:20 (produto PCR:água Milli-Q) e determinou também a falta de necessidade de diluição de alguns produtos, variando de 3:0

a 1:0 (apenas produto PCR). Em seguida, 1µL dos produtos foi homogeneizado com 12µL de formamida e 0,5µL de padrão (GeneScan (500) LIZ Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA). Nove microlitros da solução homogeneizada foram inseridos na placa (Microplate PCR-96-AB-C, Union City, CA, EUA) e em seguida desnaturados por 5 minutos a 95° no termociclador para análise por eletroforese capilar pelo equipamento ABI PRISM 3130 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA).

Os resultados foram analisados pelo software GeneScan, versão 3.0 (Applied Biosystems, Foster City, CA, EUA) e a LOH foi calculada como a razão entre a altura do alelo curto do tecido conjuntivo dividido por seu alelo longo e a altura do alelo curto do tecido epitelial dividido pela altura de seu alelo longo (VAN HOUTEN et al., 2000), de acordo com a fórmula:

$$LOH = \frac{\left[\frac{\text{Altura do alelo curto}}{\text{Altura do alelo longo}} \right]_{\text{Conjuntivo}}}{\left[\frac{\text{Altura do alelo curto}}{\text{Altura do alelo longo}} \right]_{\text{Epitélio}}}$$

Foi considerada LOH quando um dos alelos (pico) do tecido epitelial estivesse ausente ou menor em mais de 50% da sua altura, comparada com os alelos do tecido conjuntivo (score <0,5 ou >2,0) (VAN HOUTEN et al., 2000) (Figura 4). As amostras que apresentaram valores de score entre 0,5 e 2,0 foram consideradas casos de retenção alélica (Figura 5). As amostras em que o tecido conjuntivo apresentou apenas um alelo (pico) foram consideradas como homozigóticas. Amostras que foram submetidas a PCRs e eletroforese

capilar por duas vezes e não apresentaram resultados claros foram consideradas como não-informativas. Quando o DNA não foi suficiente para realizar a PCR, as amostras foram consideradas como não realizadas.

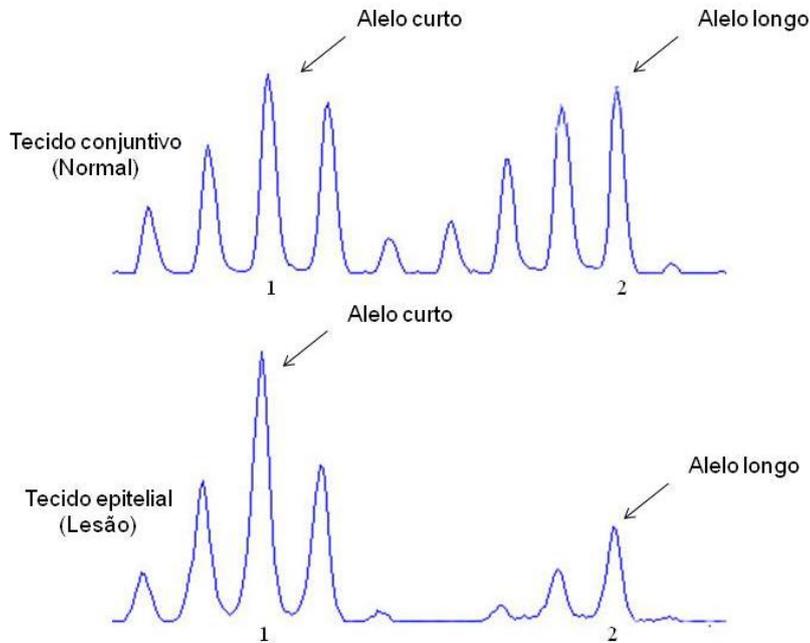


Figura 4: Eleetroferograma para análise de LOH. A altura do alelo longo do epitélio apresentou uma redução em mais de 50% em comparação com a altura do alelo longo do conjuntivo, sendo interpretado como LOH. Amostra #5 para o marcador AFM238WF2. Alelo curto(1) e alelo longo (2).

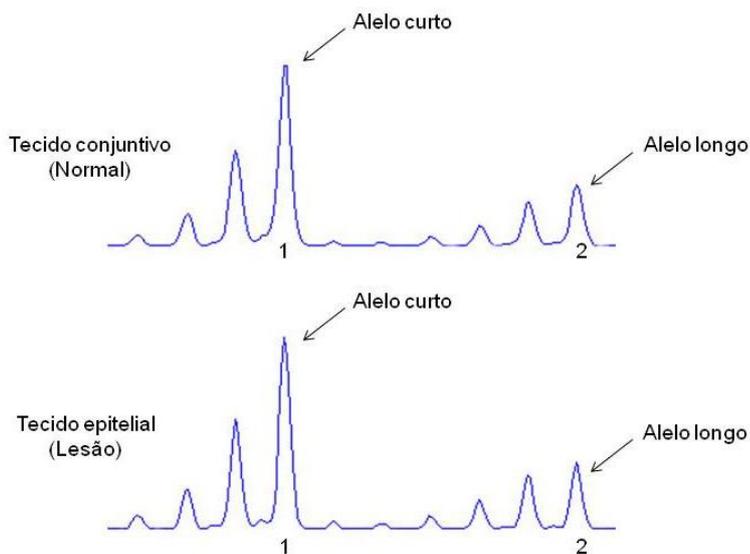


Figura 5: Eleetroferograma da amostra #4 para o marcador D9S162 apresentando retenção dos alelos no tecido epitelial (Lesão).

Em alguns resultados foi necessária a correção de *Stutter*. Os *stutters* são fragmentos menores que surgem antes do alelo (pico) principal e podem influenciar negativamente na análise da LOH. Um dos fatores para o aparecimento do *stutter* é o deslizamento (*slippage*) da enzima polimerase no momento da PCR, principalmente quando são utilizados marcadores microsatélites mono, di ou trinucleotídeos. Outro fator pode ser decorrente por falhas na adição do nucleotídeo adenina (A) na extensão final da PCR (VAN HOUTEN et al., 2000).

Quando os resultados da eletroforese capilar apresentam dois alelos muito próximos um do outro, o *stutter* do alelo longo pode somar a altura do alelo curto, alterando sua real altura e fornecendo um resultado falso positivo para LOH (os valores dos alelos e do *stutter* é fornecido pelo software Genescan, version 3.0 - Applied Biosystem, Foster City, CA, USA). Por isso é importante realizar a correção de *stutter* antes de se realizar o cálculo de LOH. A correção de *stutter* foi realizada inicialmente dividindo-se a altura do *stutter* pela altura do alelo de uma amostra homocigota, para obter um valor médio da altura do *stutter* relacionado ao alelo. Esse valor médio é denominado Fator de Correção (FC) (Figura 6).

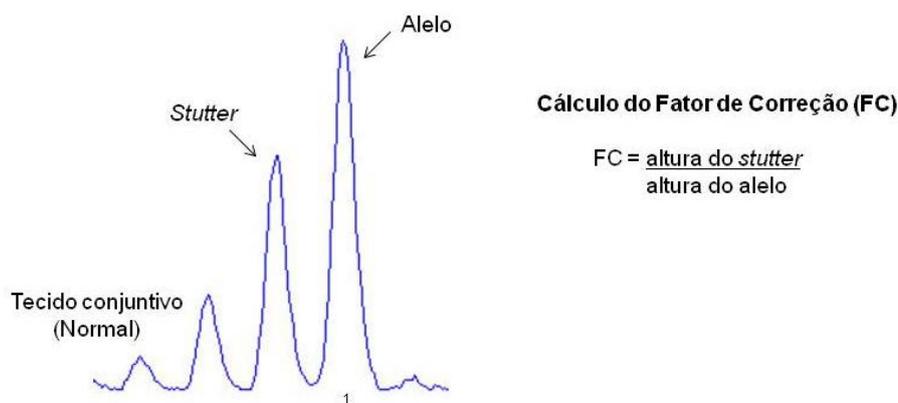


Figura 6: Eletroferograma capilar ilustrando a homocigose da amostra #9 para o marcador AFM238WF2. Ao lado, a fórmula para calcular o Fator de Correção (FC).

Em seguida, para obter a altura real do alelo curto (A1 real) é necessário subtrair a altura do alelo curto (A1) pelo valor do produto do fator de correção (FC) e altura do alelo longo (A2). Após a correção, foi possível, com a altura do alelo curto real, realizar o cálculo do verdadeiro valor de LOH (Figura 7).

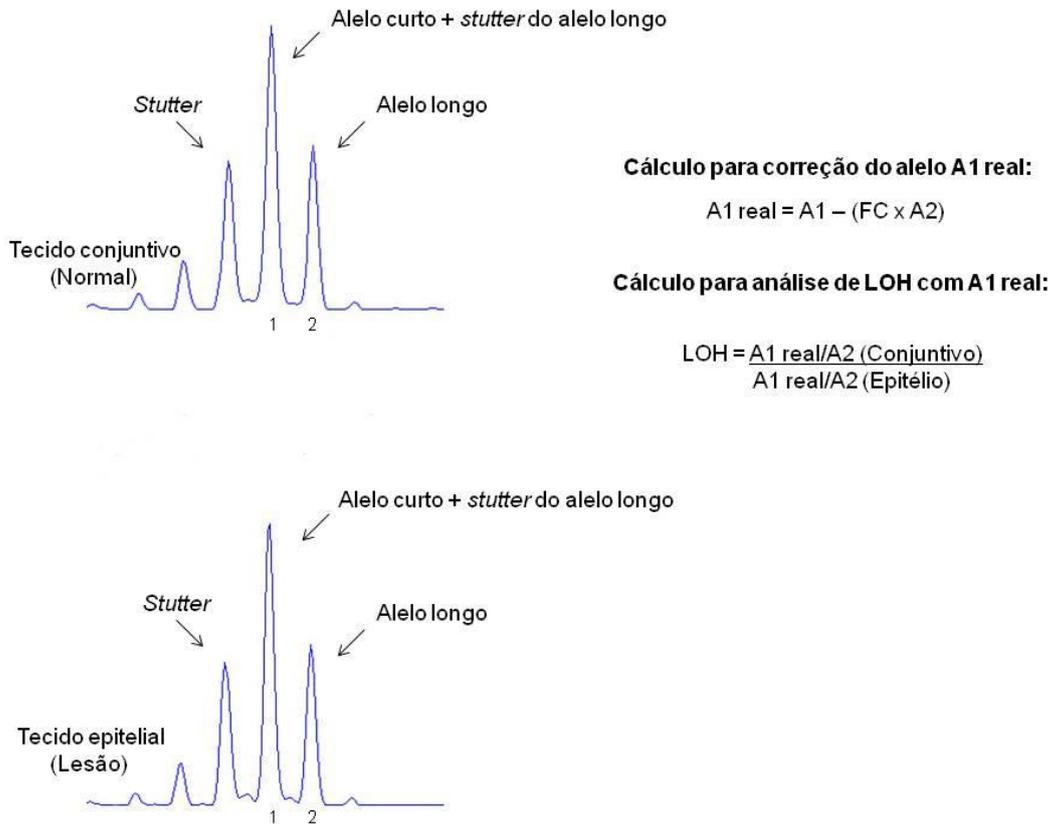


Figura 7: Eletroferograma capilar ilustrando a correção de *stutter* da amostra #5 para o marcador AFM238WF2. Ao lado, um esquema representando a correção do *stutter* e o cálculo para análise de LOH.

A frequência de perda alélica (*Frequency of allelic loss - FAL*) foi calculada para cada amostra e para cada marcador. O cálculo foi realizado pela razão entre o número de *loci* que apresentaram LOH e o número de *loci* que foram informativos (FOWLER et al., 2006)

4.5 Imuno-histoquímica (IHQ)

Para realização da técnica da imuno-histoquímica para detecção da proteína Ki-67, foram confeccionados cortes histológicos de 4 µm de espessura em 8 amostras de LLOAA, 10 amostras de LPB e 8 amostras de mucosa bucal normal, montados em lâminas de vidro silanizadas (StarFrost, Braunschweig, Germany).

A reação de IHQ foi realizada utilizando-se um protocolo padrão de dois dias de experimento. No primeiro dia, para a recuperação antigênica, as lâminas foram acondicionadas em ácido cítrico pH 6.0 em panela a vapor a 90°C (Cuisinart Convection Steamer, New Jersey, EUA), por 20 minutos e em seguida banhadas em água destilada para lavagem. Após a recuperação antigênica, foi realizado o bloqueio da peroxidase endógena com solução de metanol e peróxido de hidrogênio 20 volumes, na proporção de 1:1 e em seguida, os cortes foram lavados em água destilada e tampão Tris-HCL pH 7.4. As lâminas foram incubadas com o anticorpo primário monoclonal anti-Ki-67 (clone MIB-1, Dako, Glostrup, Denmark) diluído na proporção de 1:50 em câmara úmida por 16 a 18 horas em temperatura de 4°C.

No segundo dia da reação, os cortes foram lavados com detergente Triton X + tampão Tris-HCl na proporção de 1:1000. Para detecção da ligação (antígeno-anticorpo) foi utilizado o polímero Envision – dual link system HPR (Dako, Carpinteria, CA, EUA) incubado por 90 minutos a 4°C. A reação foi revelada com solução cromógena de 3,3 diaminobenzidina (DAB) (Dako, Carpinteria, CA, EUA) e contra coradas por imersão em hematoxilina de

Mayer, seguida de lavagem em hidróxido de amônio a 10%. Por fim, as lâminas foram montadas com Entellan (Merck KGaA, Darmstadt, Germany).

Fragmentos de carcinoma de células escamosas de boca sabidamente positivos para o anticorpo foram incluídos como controle positivo. Como controle negativo, foi realizada a omissão do anticorpo primário em lâminas com amostras de carcinoma de células escamosas de boca, sabidamente reativas para o anticorpo. Os controles positivos e negativos foram incluídos em todas as reações realizadas.

As lâminas foram analisadas em um microscópio óptico de luz e consideradas positivas as células com núcleo acastanhado, independentemente da intensidade da coloração. A contagem das células positivas de Ki-67 foi realizada primeiramente em cinco lâminas, escolhidas aleatoriamente, por dois observadores diferentes em microscópio óptico Zeiss[®] (Carl Zeiss Microscopy, Jena, Alemanha) com retículo acoplado de 100 pontos compostos por 10 linhas horizontais e 10 linhas verticais, para calibragem. Após a calibragem, a contagem foi realizada por dois observadores independentes e em momentos diferentes. Foram avaliados 8 campos em aumento de 400x restritos às camadas epiteliais. Os resultados foram calculados como porcentagem de células positivas dos oito campos em relação ao número total de células contadas nos oito campos.

A porcentagem da expressão da proteína Ki-67 foi analisada pela contagem de células positivas e negativas presentes no epitélio e calculada de acordo com a fórmula:

$$\text{ki-67 (\%)} = \frac{\text{Total de células positivas (+)}}{\text{Total de células contadas (+) e (-)}}$$

4.6 Análise estatística

Todos os dados necessários para análise estatística foram inicialmente incluídos no programa SPSS versão 21.0 (*Statistical Package for the Social Sciences*, Chicago, EUA). Foram utilizados o teste de Friedman e o teste de Mann-Whitney.

O teste de Friedman é um teste não-paramétrico utilizado para calcular variáveis quantitativas em amostras dependentes, utilizando três grupos de amostras ou mais ao mesmo tempo. O teste foi utilizado para avaliar se havia diferença significativa do índice de proliferação celular da proteína Ki-67 entre três grupos de amostras (LLOAA, LPB e mucosa bucal normal). O teste de Mann-Whitney é um teste não-paramétrico realizado utilizando amostras independentes. O teste teve a finalidade de determinar se havia ou não associação entre o índice de proliferação celular e LOH. O nível de significância adotado foi de 5% (intervalo de confiança de 95%)

4. RESULTADOS

5.1 Análise de LOH

Os resultados de LOH e *FAL* para os três grupos de amostras são apresentados na tabela 4. Dentre as 9 amostras de LLOAA, 5 apresentaram LOH enquanto apenas 2 amostras de LPB, dentre as 10 amostras, apresentaram LOH. Quanto aos marcadores, o grupo de LLOAA apresentou LOH em 3 dos 6 marcadores selecionados (D9S157, D11S1369 e AFM238WF2), enquanto o grupo de LPB apresentou LOH em 2 dos 6 marcadores (D9S157 e AFM238WF2). O grupo de amostras de MBN não apresentou LOH.

A média da frequência de perda alélica de todas as amostras foi de 11,66%, variando de 0% a 100%. O grupo de amostras de LLOAA obteve uma média de *FAL* de 26,6% e o grupo de amostras de LPB obteve uma média de *FAL* de 7,5%.

A *FAL* para os marcadores AFM238WF2, D9S157 e D11S1369 foram 21%, 17,64% e 6,66% respectivamente.

Tabela 4: Dados de LOH e FAL.

Amostras	Marcadores Microsatélites						FAL %
	D9S162	D9S157	D9S171	D11S1369	AFM238WF2	P53	
LLOAA							
#1	○	○	○	○	△	△	0
#2	□	○	○	○	●	△	50
#3	□	△	△	□	□	□	0
#4	□	●	□	□	△	□	20
#5	□	△	△	●	●	□	50
#6	○	○	○	○	○	○	0
#7	○	□	□	□	●	□	20
#8	□	△	□	□	△	△	0
#9	○	●	○	○	△	△	100
LPB							
#1	□	□	□	△	●	○	25
#2	□	□	□	□	□	□	0
#3	△	□	□	□	□	□	0
#4	□	□	□	○	□	□	0
#5	□	□	□	□	□	□	0
#6	△	●	○	□	○	○	50
#7	□	□	□	△	□	△	0
#8	□	△	□	□	□	□	0
#9	○	○	△	△	□	○	0
#10	□	□	□	△	□	□	0
MBN							
#1	□	□	□	△	□	□	0
#2	△	□	□	□	△	□	0
#3	□	△	□	□	□	□	0
#4	○	□	□	△	□	□	0
#5	△	□	○	□	□	□	0
#6	□	□	△	○	△	○	0
#7	△	□	○	□	□	□	0
#8	□	△	□	□	□	□	0
FAL %	0	17,64	0	6,66	21,0	0	

● LOH; □ Retenção alélica; △ Homozigoto; ○ Não informativo; FAL (Frequência de perda alélica)

5.2 Análise imuno-histoquímica

Os resultados da imuno-histoquímica estão apresentados na tabela 5 e Figura 8. O percentual do índice de proliferação celular da proteína Ki-67, nos 26 casos analisados, variou de 0,29% a 28%. A média da porcentagem da proteína Ki-67 no grupo de amostras de LLOAA foi de 6,63%, seguido de 12,6% no grupo de LPB e 17,67% no grupo de MBN. Não foi possível realizar a imuno-histoquímica da amostra #5 do grupo de LLOAA.

Tabela 5: Índice de proliferação celular das amostras de LLOAA, LPB e MBN.

Amostras	Idade (em anos)	Gênero	IHQ Ki-67 (%)
LLOAA			
#1	34	F	4.0
#2	50	F	5.0
#3	55	F	2.0
#4	34	F	6.0
#6	52	M	23.0
#7	50	M	8.0
#8	40	F	5.0
#9	77	F	4.0
LPB			
#1	37	F	2.0
#2	51	F	11.0
#3	54	F	17.0
#4	31	F	5.0
#5	67	F	2.0
#6	51	F	25.0
#7	50	M	2.0
#8	49	M	22.0
#9	42	F	12.0
#10	80	F	28.0
MBN			
#1	33	F	17.0
#2	53	F	27.0
#3	57	F	28.0
#4	30	F	0.29
#5	62	F	21.0
#6	48	F	2.0
#7	52	M	22.0
#8	50	M	24.0



Figura 8: Fotomicrografia da expressão da proteína Ki-67. **A)** Amostra de LLOAA (#8). **B)** Amostra de LPB (#8). **C)** Amostra de mucosa bucal normal (#7) (100x).

5.3 Análise dos dados estatísticos

O teste de Friedman foi utilizado para avaliar se havia diferença significativa no índice de proliferação celular da proteína Ki-67 entre três grupos de amostras (LLOAA, LPB e MBN) pareadas em gênero e idade e calculadas ao mesmo tempo (tabela 6). O resultado do teste apresentou valor de $p=0,311$, mostrando ausência de diferença estatisticamente significativa entre os três grupos mencionados.

Tabela 6: Índice de proliferação celular dos três grupos de amostras pareados em gênero e idade.

LLOAA				LPB				MUCOSA BUCAL NORMAL			
Amostras	Gênero	Idade	IHQ Ki-67 (%)	Amostras	Gênero	Idade	IHQ Ki-67 (%)	Amostras	Gênero	Idade	IHQ Ki-67 (%)
#1	F	34	4%	#1	F	37	2%	#1	F	33	17%
#2	F	50	5%	#2	F	51	11%	#2	F	52	27%
#3	F	55	2%	#3	F	54	17%	#3	F	57	28%
#4	F	34	6%	#4	F	31	5%	#4	F	30	0,29%
#6	M	52	23%	#7	M	50	2%	#7	M	52	22%
#7	M	50	8%	#8	M	49	22%	#8	M	50	24%

$p=0,311$

O teste de Mann-Whitney foi utilizado para investigar a associação entre o índice de proliferação celular da proteína Ki-67 e LOH para as amostras de LLOAA e LPB pareados em gênero e idade, independentemente dos marcadores (Tabela 7 e 8). O resultado do teste para o grupo de LLOAA apresentou valor de $p=0,513$ e para o grupo de LPB apresentou valor de $p=0,235$. Foi também utilizado o teste de Mann-Whitney para as amostras de LLOAA e LPB, sem pareamento em gênero e idade, obtendo o resultado no valor de $p=0,559$ e $p=1,000$, respectivamente. Diante destes resultados, concluiu-se que não houve associação estatisticamente significativa entre índice de proliferação celular e LOH.

Tabela 7: Índice de proliferação celular e LOH do grupo de amostras de LLOAA.

LLOAA				
Amostras	Gênero	Idade	IHQ Ki-67(%)	LOH
#1	F	34	4%	×
#2	F	50	5%	●
#3	F	55	2%	×
#4	F	34	6%	●
#6	M	52	23%	×
#7	M	50	8%	●

$p=0,513$ ● LOH; × sem LOH

Tabela 8: Índice de proliferação celular e LOH do grupo de amostras de LPB.

LPB				
Amostras	Gênero	Idade	IHQ Ki-67(%)	LOH
#1	F	37	2%	●
#2	F	51	11%	x
#3	F	54	17%	x
#4	F	31	5%	x
#7	M	50	2%	x
#8	M	49	22%	x

p=0,235 ● LOH; x sem LOH

6. DISCUSSÃO

A LLOAA e o LPB são lesões clinicamente e histologicamente semelhantes, além de ambas apresentarem etiologia ainda incerta (ISMAIL et al., 2007). Estudos genéticos e moleculares ainda não foram descritos em LLOAA, mas já foram realizados envolvendo o LPB por ser uma lesão considerada por alguns autores como uma desordem com potencial de transformação maligna (VAN DER WAAL, 2009; TANDA et al, 2000; DA SILVA et al., 2001; BASCONES et al., 2005; GONZALES-MOLES et al., 2006).

Além de estudos epidemiológicos acerca da condição de transformação maligna do LPB (SILVERMAN et al., 1985; SILVERMAN et al., 1991; BORNSTEIN et al., 2006; GANDOLPHO et al., 2004) VAN DER MEIJ et al., 2003; VAN DER MEIJ et al., 2007) e de lesões liquenóides orais (VAN DER MEIJ et al., 2003; VAN DER MEIJ et al., 2007), estudos genéticos, como a avaliação de LOH em regiões próximas a genes supressores de tumor, podem ser um meio importante de investigação sobre a verdadeira natureza e o comportamento biológico dessas lesões.

A análise de LOH tem sido um importante método para a caracterização genética de lesões neoplásicas e não neoplásicas. Alterações genéticas em regiões cromossômicas 3p, 9p, 11q e 17p são mais comuns em neoplasias de cabeça e pescoço (GRAVELAND et al., 2011; ABOU-ELHAMDA et al., 2008) incluindo tumores benignos e lesões orais com potencial de transformação maligna (GOMES et al., 2013; MAO, 1996; FONSECA-SILVA et al., 2016).

Zhang e colaboradores (1997) e Accurso e colaboradores (2011) em seus estudos concluíram que LOH, nas regiões cromossômicas 3p, 9p e 17p, foi mais frequente em lesões com displasia epitelial e CCEB do que em LPB, podendo esta então ser considerada como uma lesão com características mais próximas de uma lesão epitelial benigna. Em outro estudo desenvolvido por Zhang e colaboradores (2000), foi observada maior frequência de LOH nas regiões cromossômicas 3p, 9p e 17p, em lesões liquenóides orais com displasia comparados com a frequência de LPB encontrado em um estudo anterior (ZHANG et al., 1997). Os resultados sugeriram que lesões liquenóides devam ser cuidadosamente examinadas, pois essas alterações displásicas muitas vezes podem conter alterações genéticas que podem provocar o aumento do risco de transformação maligna. Os autores afirmaram que nenhuma das lesões liquenóides avaliadas no estudo foram associadas ao amálgama (ZHANG et al., 1997; ZHANG et al., 2000; ACCURSO et al., 2011)

O presente estudo evidenciou LOH em 3 dos 6 marcadores microssatélites selecionados, localizados próximos aos genes supressores de tumor nas regiões cromossômicas 9p, 11q e 17p. No grupo de 9 amostras de LLOAA, sem evidência de displasia epitelial, 6 amostras apresentaram LOH para três marcadores (D9S157, AFM238WF2, e D11S1369), sendo a LOH apresentada em todas as regiões cromossômicas avaliadas. No grupo de 10 amostras de LPB, também sem evidência de displasia epitelial, apenas 2 amostras apresentaram LOH para dois marcadores (D9S157, AFM238WF2).

Mattson e colaboradores (2002) e Larsson e Warfvringe (2013) não acreditam haver dados científicos suficientes para associar reações de contato liquenóides com transformação maligna. É importante evidenciar que o

desenho deste estudo não permite determinar o controverso debate sobre considerar o LPB e LLOAA como desordens com potencial de transformação maligna. Entretanto, este estudo é o primeiro na literatura que usa alterações genéticas, como a LOH, para a caracterização de LLOAA em comparação com o LPB, sabendo que ambas apresentam características clínicas e histopatológicas semelhantes.

A inativação de genes supressores de tumor geralmente ocorre pela deleção de material genético e essa alteração pode ser identificada pela LOH, utilizando-se marcadores microssatélites localizados próximos a esses genes. (VELASCO et al., 2008). Esses marcadores moleculares são muito importantes, pois podem identificar algumas alterações moleculares que resultam no desenvolvimento de lesões malignas, independente de suas características morfológicas (ACAY et al., 2006).

Foi possível observar que a frequência de perda alélica foi mais expressiva no marcador microssatélite AFM238WF2 (21%), seguido do marcador D9S157 (17,64%). O marcador AFM238WF2 está próximo ao gene supressor de tumor *CHRNA1*, que se encontra próximo à região do gene *TP53*. O *TP53* tem um papel muito importante no reparo de células durante o ciclo celular e na apoptose das células que não sofreram reparação. A inativação ou defeito nesse gene tem sido comumente associado a neoplasias malignas, incluindo o CCEB (LI et al., 2012; SCHAFFER et al., 1998; ACAY et al., 2006). O marcador D9S157 está próximo ao gene supressor de tumor *SH3GL2*. O *SH3GL2*, considerado candidato a gene supressor de tumor, tem um importante papel na regulação do crescimento e da proliferação desenfreada das células (SHANG et al., 2010). Ambos os marcadores apresentaram *FAL*

significativa em um estudo que utilizou amostras de leucoplasia bucal (AFM238WF2 - 30,7%; D9S157 - 52,9%) e em um estudo que utilizou amostras de tumores odontogênicos mistos (AFM238WF2 – 55%; D9S157 – 25%) (FONSECA-SILVA, 2013; GALVÃO et al., 2012).

A análise imuno-histoquímica da proteína Ki-67 é um método simples, com relativo baixo custo e muitas vezes utilizado na tentativa de identificar a possibilidade do desenvolvimento do câncer em lesões consideradas potencialmente malignas (GISSI et al., 2015; ACAY et al., 2006).

Acay e colaboradores (2006) realizaram a análise imuno-histoquímica para P53 e Ki-67 em líquen plano bucal e lesão líquenóide oral a fim de avaliar o potencial proliferativo das lesões. Os resultados apresentaram em ambos os grupos a expressão de Ki-67 elevada em mais de 50% das células, o que poderia representar uma proliferação celular aumentada nessas lesões bucais imuno-mediadas. O presente estudo registrou que não havia diferença estatisticamente significativa no índice de proliferação celular entre três grupos de amostras, sabendo que os níveis de atividade proliferativa em LLOAA e LPB foram baixos em contraste com a mucosa bucal normal.

Foi levantada a hipótese de que a perda nas regiões cromossômicas que contêm genes supressores de tumor e a expressão da proteína Ki-67 poderiam refletir no estado funcional destes genes. Porém, este estudo não apresentou associação estatisticamente significativa entre o índice de proliferação celular e LOH nos grupos de LLOAA e LPB. Talvez essa falta de associação seja decorrente dos marcadores microssatélites selecionados, pois, mesmo que apresentem LOH, não necessariamente haverá inativação dos

genes supressores de tumor, ou ainda, pelo baixo índice de proliferação celular nos grupos de LLOAA e LPB não ser capaz de induzir necessariamente a LOH. Outros estudos envolvendo tumores de células granulares orais e leucoplasias orais, que analisaram os mesmos marcadores microssatélites de LOH, também não registraram associação entre a imuno positividade de Ki-67 com os marcadores de LOH (GOMES et al., 2013; FONSECA-SILVA, 2003).

7. CONCLUSÕES

- Os resultados evidenciaram LOH nas regiões 9p e 17p para LLOAA e LPB;
- Apenas uma amostra do grupo de LLORA evidenciou LOH na região 11q;
- Os marcadores localizados no braço curto do cromossomo 9 (D9S157) e do cromossomo 17 (AFM238WF2) apresentaram maior frequência de perda alélica em LLOAA e LPB;
- Não houve diferença estatisticamente significativa no índice de proliferação celular entre os três grupos de amostras;
- Foram identificados baixos índices de atividade proliferativa em LLOAA e LPB em contraste com a mucosa bucal normal;
- Os resultados demonstram que, além de similaridades clínicas e histopatológicas da LLOAA e do LPB, ambos compartilham LOH nos *loci* 9p, 11q e 17p, independentemente da taxa de proliferação celular.

8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS

1. Aagaard L, Lukas J, Bartkova J, Kjerulff AA, Strauss M, Bartek J. Aberrations of p16Inka and retinoblastoma tumour-supressor genes occur in distinct sub-sets of human cancer cell lines. *Int J Cancer*. 1995;29;61(1):115-20.
2. Abou-Elhamd KE, Halib TN, Moussa AE, Badawy BS. The role of genetic susceptibility in head and neck squamous cell carcinoma. *Eur Arch Otorhinolaryngol*. 2008;265(2):217-22.
3. Accurso BT, Warner BM, Knobloch TJ et al. Weghorst CM, Shumway BS, Allen CM, Kalmar JR. Allelic imbalance in oral lichen planus and assessment of its classification as a premalignant condition. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol endod*. 2011; 112(3):359-66.
4. Al-Hashimi I, Schifter M, Lockhart PB et al. Oral lichen planus and lichenoid lesions: diagnostic and therapeutic considerations. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2007;103Suppl:S25.e1-12.
5. Barbosa TV, Rosa MP, Costa AC, Rapoport A. Valor prognóstico do Ki-67 no carcinoma indiferenciado de grandes células de glândula salivar maior: estudo de 11 casos. *Rev Bras Otorrinolaringol*. 2003;69(5):629-34.
6. Barnes, L., Eveson, J. W., Reichart, P. & Sidransky, D. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. WHO Classification of Tumour 163–208 (2005).
7. Bascones C, Gonzales-Moles MA, Esparza G, Bravo M, Acevedo A, Gil-Montoya JA, et al. Apoptosis and cell cycle arrest in oral lichen planus Hypothesis on their possible influence on its malignant transformation. *Arch Oral Biol*.2005;50(10):873-81.
8. Bernardes VF, Garcia BG, Souto GR, Novaes-Junior JB, Aguiar MCF, Mesquita RA. Lesão liquenóide oral relacionada ao amálgama. *An Bras Dermatol*. 2007;82(6):549-52.
9. Bornstein MM, Kalas L, Lemp S, Altermatt HJ, Rees TD, Buser D. Oral lichen planus and malignant transformation: a retrospective follow-up study of clinical and histopathologic data. *Quintessence Int*. 2006;37(4):261-71.

10. Carrozzo M, Gandolfo S. The management of oral lichen planus. *Oral Dis.* 1999;5(3):196-205.
11. Correa GT, Bernardes VF, de Sousa SF, Diniz MG, Salles JM, Souza RP, De-Paula AM, Gomez RS, Gomes CC. Lip câncer and pré-cancerous lesions harbor TP53 mutations, exhibit allelic loss at 9p, 9q and 17p, but no BRAFV600E mutations. *Tumour Biol.* 2015;36(11):9059-66.
12. Da Silva LMF, Do Carmo MAV. Identification of the AgNORs, PCNA and ck16 proteins in oral lichen planus lesions. *Oral Dis.* 2001;7(6):344-8.
13. Ditrichova D, Kapralova S, Tichy M et al. Oral lichenoid lesions and allergy to dental materials. *Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub.* 2007;151(2):333-9.
14. Eisenberg E. Oral lichen planus: a benign lesion. *J Oral Maxillofac Surg.* 2000;58(11):1278-85.
15. Fitzpatrick SG, Hirsch SA, Gordon SC. The malignant transformation of oral planus and lichenoid lesions: a systematic review. *J Am Dent Assoc.* 2014;145(1):45-56.
16. Fonseca-Silva T, Diniz MG, de Sousa SF, Gomez RS, Gomes CC. Association between histopathological features of dysplasia in oral leukoplakia and loss of heterozygosity. *Histopathology.* 2016;68(3):456-60.
17. FONSECA-SILVA, T. Estudo da perda de heterozigosida em regiões de genes supressores de tumor e sua associação com alterações morfológicas e grau de displasia epitelial em leucoplasias bucais. 2013. 83 f. Tese (Doutorado em Medicina Molecular) – Faculdade de Odontologia, Universidade Federal de Minas Gerais, Belo Horizonte. 2013.
18. Galvão CF, Gomes CC, Diniz MG et al. Loss of heterozygosity (LOH) in tumour suppressor genes in benign and malignant mixed odontogenic tumors. *J Oral Pathol Med.* 2012;41(5):389-93.
19. Gandolfo S, Richiardi L, Carrozzo M et al. Risk of oral squamous cell carcinoma in 402 patients with oral lichen planus: a follow-up study in an Italian population. *Oral Oncol.* 2004;40(1):77-83.
20. Gissi DB, Gabusi A, Servidio D et al. Predictive Role of p53 protein as a single marker or associated with li67 antigen in oral leukoplakia: A retrospective longitudinal study. *Open Dent J.* 2015;30(9):41-5.
21. Gomes CC, Fonseca-Silva T, Gomez RS. Evidence for loss of

heterozygosity (LOH) at chromosomes 9p and 17p in oral granular cell tumors: a pilot study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol* 2013;115:249-53.

22. González-Moles MA, Bascones-Iludain C, GIL-Montoya JA, Ruiz-Avila I, Delgado-Rodriguez M, Bascones-Martinez A. Cell cycle regulating mechanisms in oral lichen planus: molecular basis in epithelium predisposed to malignant transformation. *Arch Oral Biol*. 2006;51(12):1093-103.
23. Greenblatt MS, Bennet WP, Hollstein M, Harris CC. Mutations in the p53 tumor suppressor gene: clues to cancer etiology and molecular pathogenesis. *Cancer Res* 1994;54:4855-78.
24. Hearn CM, Ghosh S, Todd JA. Microsatellites for linkage analysis of genetic traits. *Trends Genet* 1992;8:288-94.
25. Hollsten M, Sidransky D, Vogelstein B, Harris CC. p53 mutations in human cancers. *Science*. 1991;253:49-53.
26. Holmstrup P. Reactions of the oral mucosa related to silver amalgam: a review. *J Oral Pathol Med*. 1991;20(1):1-7.
27. Holmstrup, P. Oral mucosa and skin reactions related to amalgam. *Adv Dent Res*. 1992;6:120-4.
28. Issa Y, Duxbury AJ, Macfarlane TV, Brunton PA. Oral lichenoid lesions related to dental restorative materials. *Br Dent J*. 2005; 26;198(6):361-6.
29. Kaga M, Seale NS, Hanawa T, Ferracane JL, Okabe T. Cytotoxicity of amalgams. *J Dent Res*. 1988;7(6):902-6.
30. Knudson AG Jr. Mutation and cancer: statistical study of retinoblastoma. *Proc Natl Acad Sci USA*. 1971;68(4):820-3.
31. Larsson A, Warfvinge G. Malignant transformation of oral lichen planus. *Oral Oncol*. 2003;39:630-1.
32. Lartitegui-Sebastián MJ, Martínez-Revilla B, Saiz-Garcia C, Eguizabal-Saracho S, Aguirre-Urizar JM. Oral lichenoid lesions associated with amalgam restorations: a prospective pilot study addressing the adult population of the Basque Country. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2012;17(4):545-9.
33. Mao, L. et al. Frequent microsatellite alterations at chromosomes 9p21 and 3p14 in oral premalignant lesions and their value in cancer risk assessment. *Nat Med*. 1996;2(6):682-5
34. Mattsson U, Jontell M, Holmstrup P. In reply to the short

communication "Malignant transformation of oral lichen planus" by A. Larsson and G. Warfvinge in *Oral Oncology* 39 (2003) 630-1. *Oral Oncol.* 2004;40(6):649-50.

35. McParland, H, Warnakulasuriya S. Oral lichenoid contact lesions to mercury and dental amalgam--a review. *J Biomed Biotechnol.* 2012;2012:589-569.
36. Mignogna MD, Fedele S, Lo Russo L, Lo Muzio, Bucci E. Immune activation and chronic inflammation as the cause of malignancy in oral lichen planus: is there any evidence? *Oral Oncol.* 2004;40(2):120-30.
37. Montebugnoli L, Venturi M, Gissi DB, Cervellati F. Clinical and histologic healing of lichenoid oral lesions following amalgam removal: a prospective study. *Oral Surg, Oral Med, Oral pathol and Oral Radiol.* 2012;113(6):766-72.
38. Ohno H, Hirabayashi S, Kansaku A et al. Carom: a novel membrane-associated guanylate kinase-interacting protein with two SH3 domains. *Oncogene.* 2003;20;22(52):8422-31.
39. Ostman PO, Anneroth G, Skoglund A. Amalgam-associated oral lichenoid reactions. Clinical and histologic changes after removal of amalgam fillings. *Oral Surg, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 1996;81(4):459-65.
40. Parashar P. Oral lichen planus. *Otolaryngol Clin North Am.* 2011;44(1):89-107
41. Pitiyage, G., Tilakaratne, W. M., Tavassoli, M. & Warnakulasuriya, S. Molecular markers in oral epithelial dysplasia: review. *J Oral Pathol Med.* 2009;38(10):737-52.
42. Querzoli P, Albonico G, Ferretti S et al. MIB-1 proliferative activity in invasive breast cancer measured by image analysis. *J Clin Pathol.* 1996;49(11):926-30.
43. Rabenhorst, SH. Ciclo celular: mecanismos reguladores e marcadores bioquímicos. *Ver Bras Cancerol.* 1994;40(2):141-47
44. Roz L, Wu CL, Porter S et al. Allelic imbalance on chromosome 3p in oral dysplastic lesions: an early event in oral carcinogenesis. *Cancer Res.* 1996;56(6):1228-31.
45. Sasaki K, Murakami T, Kawasaki M, Takahashi M. The cell cycle associated a change of the Ki-67 nuclear antigen expression. *J Cell Physiol.* 1987;133:579-84

46. Schmidt A, Wolde M, Thiele C et al. Endophilin I mediates synaptic vesicle formation by transfer of arachidonate to lysophosphatidic acid. *Nature*. 1999;401(6749):133-41.
47. Sciubba, J. J. Autoimmune oral mucosal diseases: clinical, etiologic, diagnostic, and treatment considerations. *Dent Clin North Am*. 2011;55(1):89-103.
48. Scully C, Beyli M, Ferreiro MC. et al. Update On Oral Lichen Planus: Etiopathogenesis and Management. *Crit Rev Oral Biol Med*. 1998;9(1):86-122.
49. Scully, C. Challenges in predicting which oral mucosal potentially malignant disease will progress to neoplasia. *Oral Dis*. 2014;20(1):1-5.
50. Shang C, Guo Y, Fu S, Fu W, Sun K. SH3GL2 gene participates in MEK-ERK signal pathway partly by regulating EGFR in the laryngeal carcinoma cell line Hep2. *Med Sci Monit*. 2010;16(6):168-73.
51. Silverman S Jr, Gorsky M, Lozada-Nur F, Giannotti K. A prospective study of findings and management in 214 patients with oral lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1991;72(6):665-670.
52. Silverman S Jr, Gorsky M, Lozada-Nur F. A prospective follow-up study of 570 patients with oral lichen planus: persistence, remission and malignant association. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1985;60(1):30-4.
53. Smith J, Rattay, T, McConkey C et al. Biomarkers in dysplasia of the oral cavity: a systematic review. *Oral oncol*. 2009;45(8):647-53.
54. Tanda N, Mori S, Saito K, Sakamoto S. Expression of apoptotic signaling proteins in leukoplakia and oral lichen planus: quantitative and topographical study. *J Oral Pathol Med*. 2000;29(8):385-93.
55. Thornhill MH, Pemberton MN, Simmons RK, Theaker ED. Amalgam-contact hypersensitivity lesions and oral lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003;95(3):291-9.
56. Thornhill MH. Immune mechanisms in oral lichen planus. *Acta Odontol Scand* 2001;59:174-7.
57. Torgerson RR, Davis MD, Bruce AJ et al. Contact allergy in oral disease. *J Am Acad Dermatol*. 2007;57:315-21.

58. van der Meij EH, Mast H, van der Waal I. The possible premalignant character of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: a prospective five-year follow-up study of 192 patients. *Oral oncol.* 2007;43(8):742-8.
59. van der Meij EH, Schepman KP, van der Waal I. The possible premalignant character of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: a prospective study. *Oral Surg, Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod.* 2003;96(2):164-71.
60. van der Waal, I. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; terminology, classification and present concepts of management. *Oral oncol.* 2009;45(4-5):317-23.
61. Van Houten VM, Tabor MP, van den Brekel MW et al. Molecular assays for the diagnosis of minimal residual head-and-neck cancer: methods, reliability, pitfalls, and solutions. *Clin Cancer Res.* 2000 Oct;6(10):3803-16.
62. Velasco A, Pallares J, Santacana M et al. Loss of heterozygosity in endometrial carcinoma. *Int J Gynecol Pathol.* 2008;27(3):305-17.
63. Wakamatsu A, Simões AB, Kanamura CT, et al. Manual de imunohistoquímica com menções à técnica de hibridização molecular. Sociedade Brasileira de Patologia. 1995, 99p.
64. Walker RA. Quantification of immunohistochemistry--issues concerning methods, utility and semiquantitative assessment I. *Histopathology.* 2006;49(4):406-10.
65. Weidner N, Moore DH 2nd, Vartanian R. Correlation of ki-67 antigen expression with mitotic figure index and tumor grade in breast carcinomas using the novel "paraffin"-reactive MIB 1 antibody. *Hum Pathol* 1994;25(4):337-42.
66. WHO Collaborating Centre for Oral Precancerous Lesions. Definition of leukoplakia and related lesions: an aid to studies on oral precancer. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol* 1978;46:518-39.
67. Zhang L, Cheng X, Li Y et al. High frequency of allelic loss in dysplastic lichenoid lesions. *Lab Invest.* 2000;80(2):233-7.
68. Zhang L, Michelsen C, Cheng X, et al. Molecular analysis of oral lichen planus. A premalignant lesion? *Am J Pathol.* 1997;151(2):323-7.

9. ANEXO

9.1 Anexo I: Folha de aprovação do COEP



UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - COEP

Projeto: CAAE – 28755714.8.0000.5149

Interessado(a): Profa. Vanessa de Fátima Bernardes
Departamento de Parasitologia Geral
ICB- UFMG

DECISÃO

O Comitê de Ética em Pesquisa da UFMG – COEP aprovou, no dia 22 de maio de 2014, o projeto de pesquisa intitulado **"Investigação de perda de heterozigidade em lesão liquenóide oral relacionada ao amálgama"** bem como o Termo de Consentimento Livre e Esclarecido.

O relatório final ou parcial deverá ser encaminhado ao COEP um ano após o início do projeto.


Profa. Maria Teresa Marques Amaral
Coordenadora do COEP-UFMG

10. APÊNDICE

10.1 Apêndice A: Termo de Consentimento Livre e Esclarecido

UNIVERSIDADE FEDERAL DE MINAS GERAIS

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO

Eu.....,tendo sido convidado(a) a participar como voluntário(a) da pesquisa “Investigação de perda de heterozigidade em lesão liquenóide oral relacionada ao amálgama”, declaro que recebi as seguintes informações que me fizeram entender sem dificuldades e sem dúvidas os seguintes aspectos:

- ✓ Que a pesquisa se destina a estudar uma característica presente nas células da lesão e que podem ter relação com sua causa e desenvolvimento;
- ✓ Que a importância desta pesquisa é a possibilidade de se identificar um dos mecanismos de desenvolvimento desta lesão;
- ✓ Que o estudo será feito a partir de amostras de lesões coletadas em minha boca através de cirurgia, que foram encaminhadas ao laboratório de Patologia Bucal da Faculdade de Odontologia da UFMG para diagnóstico das mesmas e, por sua vez, encontram-se guardadas no arquivo deste laboratório.
- ✓ Que o material coletado será utilizado para técnicas de Biologia Molecular e serão verificados os dados clínicos nos prontuários, sendo que estes serão mantidos em sigilo;
- ✓ Que o risco da pesquisa baseia-se somente no fato de que o material armazenado poderá ser gasto, podendo inviabilizar a sua utilização no futuro;
- ✓ Que participarei deste estudo permitindo a utilização deste material que se encontra arquivado no laboratório citado;
- ✓ A não participação na pesquisa não me exclui do direito de ser tratado e acompanhado no local encaminhado. Este estudo não é necessário para o diagnóstico ou tratamento, mas é de fundamental importância para a realização desta pesquisa. Esta pesquisa nos ajudará a entender melhor essa doença e isso será muito importante para que, num futuro próximo, possamos tratá-la melhor;
- ✓ Que este trabalho não traz nenhum risco para minha saúde física e mental;
- ✓ Que os benefícios que deverei esperar com a minha participação, mesmo que não diretamente são os seguintes: melhor conhecimento sobre o que origina e como se comporta este tipo de lesão;
- ✓ Que, sempre que desejar, serão fornecidos esclarecimentos sobre cada uma das etapas do estudo, através do contato com a pesquisadora abaixo relacionada;
- ✓ Que, a qualquer momento, eu poderei recusar a continuar participando do estudo e, também, que eu poderei retirar este meu consentimento, sem que isso me traga qualquer penalidade ou prejuízo;
- ✓ Que as informações conseguidas através da minha participação não permitirão a identificação da minha pessoa, exceto aos responsáveis pelo estudo, que garantem a manutenção deste sigilo;
- ✓ Que a divulgação dos resultados deste trabalho só será feita entre os profissionais estudiosos do assunto;
- ✓ Que eu não receberei nenhum pagamento por estar permitindo a utilização deste material.

Finalmente, tendo eu compreendido perfeitamente tudo o que me foi informado sobre a minha participação no mencionado estudo e estando consciente dos meus direitos, das minhas responsabilidades, dos riscos e dos benefícios que a minha participação implicam, concordo em dele participar e para isso eu dou o meu consentimento sem que para isso eu tenha sido forçado ou obrigado.

TERMO DE LIVRE CONSENTIMENTO

Li e entendi as informações fornecidas. Tive a oportunidade de fazer perguntas e todas as minhas dúvidas foram respondidas a contento. Autorizo a utilização dos fragmentos da lesão para este projeto de pesquisa. Permito também a utilização dos dados para divulgação e ensino, respeitando sempre meu direito de não ser identificado.

Este formulário está sendo assinado voluntariamente por mim. Em qualquer momento da pesquisa, posso retirar este consentimento, havendo a continuação normal do tratamento que necessito.

PACIENTE E/OU RESPONSÁVEL:

Nome: _____

Assinatura: _____

TESTEMUNHA:

Nome: _____

Assinatura: _____

DATA: _____

PESQUISADORA RESPONSÁVEL: Leonardo Nogueira Rodrigues. Telefones: (31) 3409-2477 / (31) 3409-3046 / (31) 9721-4035

ASSINATURA DO PESQUISADOR RESPONSÁVEL: _____

As dúvidas sobre a pesquisa serão dirimidas pela pesquisadora coordenadora. Para aspectos éticos, o Comitê de Ética em Pesquisa da Universidade Federal de Minas Gerais (COEP-UFMG) poderá ser consultado.

Av. Antônio Carlos, 6627 Unidade Administrativa II - 2º andar - Sala 2005
Campus Pampulha - Belo Horizonte, MG – Brasil CEP: 31270-901
E-mail: coep@prpq.ufmg.br / Telefone: (31) 3409-4592