

EDUARDO AUGUSTO ROSA

**IMUNOEXPRESSÃO DE P16, BUB3, SOX4 E KI67 EM LÍQUEN PLANO ORAL,
COMPARAÇÃO COM LÍQUEN PLANO CUTÂNEO, DISPLASIA ORAL E
HIPERPLASIA ORAL.**

BRASÍLIA

2015

EDUARDO AUGUSTO ROSA

**IMUNOEXPRESSÃO DE P16, BUB3, SOX4 E KI67 EM LÍQUEN PLANO ORAL,
COMPARAÇÃO COM LÍQUEN PLANO CUTÂNEO, DISPLASIA ORAL E
HIPERPLASIA ORAL.**

Tese de Doutorado apresentado ao Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Faculdade de Medicina da Universidade de Brasília, como requisito parcial para a obtenção do título de Doutor em Ciências Médicas.

Orientador: Rivadávio Fernandes Batista Amorim

BRASÍLIA

2015

Rosa, Eduardo Augusto

IMUNOEXPRESSÃO DE P16, BUB3, SOX4 E KI67 EM LÍQUEN PLANO ORAL, COMPARAÇÃO COM LÍQUEN PLANO CUTÂNEO, DISPLASIA ORAL E HIPERPLASIA ORAL.– Brasília, 2015.

Nº de páginas: 114

Área de concentração: Ciências Médicas, Odontologia, Patologia Bucal.

Orientador: Prof. Dr. Rivadávio Fernandes Batista Amorim.

Tese de DOUTORADO – Faculdade de Medicina, Programa de Pós-Graduação em Ciências Médicas da Universidade de Brasília - UnB-Brasília-D. F.

1. Líquen Plano; 2. P16; 3. BUB3; 4. SOX4; 5. Ki67

A Deus, quem sempre me guiou, mesmo quando desgarrado cruzei o vale da sombra da morte. Nele confio e com este trabalho a Ele glorifico.

Aos meus pais, que com muita dificuldade lutaram pela minha educação e mesmo nos tempos mais difíceis acreditaram em mim.

E à minha amada filha, Helena, para que um dia, mais velha, possa se orgulhar do pai, que por muitas vezes se ausentou com tanto "dever de casa".

AGRADECIMENTOS

Aos Funcionários do laboratório de Patologia, em especial à querida Tércia Lousa.

À Professora Dra. Denise Pinheiro Falcão, pela inestimável ajuda, pelo incentivo, pela paciência e pela presteza inesgotáveis. Sem ela eu não teria chegado até aqui.

Aos colegas patologistas, Dr. Luiz Eduardo de Almeida Prado Franceschi, Dr. Alesso Cervantes Sartorelli e Prof. Dr. Florêncio Figueiredo Cavalcanti Neto, pelo apoio fundamental.

Às amigas Anna Alice e Maria Rejane, pela ajuda na organização e preparação do material para análise.

À Professora Dra. Fabiana Pirani Carneiro, por sua ajuda no laboratório de imunoistoquímica, onde tudo aconteceu.

À Professora Dra. Erica Negrini, pelo incentivo carinhoso e pela ajuda mágica nos momentos mais difíceis.

Ao Professor e amigo Rivadávio Fernandes Batista Amorim, pela orientação deste trabalho.

Aos meus colegas de pós-graduação, que transformaram um longo período de árdua dedicação em algo prazeroso, em especial à querida Mikaela Kogawa, pelo apoio e incentivo de sempre.

À Morena, que nos últimos e mais dramáticos instantes trouxe a tranquilidade preciosa, a força imprescindível, o apoio incondicional e a alegria necessárias para terminar essa pequena obra.

EPÍGRAFE

*Antes de mais nada o amor,
Amor divertido, amor sem sentido,
Amor sério, amor responsável
Amor de pai e mãe, amor de irmão.
Amor por alguém distante, amor juntinho,
Amor construído, amor filho da paixão,
Amor discreto, amor despudorado,
Amor por amor, por amar, para amar.*

*Amar alguém,
Alguém de quem não se pode sentir outro sentimento
Alguém dono do seu coração
Com ou sem razão.
Pelo direito de ser amado, haja o que houver.
Amor inesgotável em um dia.
Amor insuperável em 100 anos.
Amor que merece uma flor
Amor que recebe outro amor.*

*Dizem que amar é sofrer.
Pode até ser que se sofra por amor,
por tanto amor,
Mas toda dor encontra-se no não amor.
Não no amor.
Na falta dele, mas nunca dentro dele.
Quando o amor encontra o amor não há como se opor.
Não há espaço para dor.
Encontro mágico, encontro ímpar,
Sentimentos irmãos em sintonia máxima,
Une amigos, parentes, amantes.
Amor une, soma, multiplica*

*Se tens amor cuida
Se não, busca,
Se queres amor, dê amor.
Ame a si mesmo, ame o nascer do sol, o por do sol, a chuva
Ame sem parar tudo aquilo que conseguir olhar com paz
Ame os ouros, ame amar,
Apenas ame e se deixe amar.*

Pequeno tratado amoroso sobre o amor
Emanuel Preto

RESUMO

Introdução: O câncer de boca está entre os dez tipos de câncer mais comuns em todo o mundo. Lesões precursoras como leucoplasia e líquen plano em geral precedem o surgimento do tumor invasivo. Nesse contexto, a busca por marcadores biológicos para o diagnóstico e prognóstico dessas lesões é extremamente relevante. **Objetivo:** Avaliar a expressão das proteínas P16, BUB3, SOX4 e Ki67 no líquen plano oral (LPO) e comparar os resultados com a expressão dos mesmos anticorpos no líquen plano cutâneo (LPC), na displasia oral (DO) e na hiperplasia fibrosa oral (HFO). **Materiais e Métodos:** Conduziu-se um estudo retrospectivo, que incluiu 120 blocos de tecido parafinados, distribuídos igualmente em LPO, DO, HFO e LPC. A partir desses blocos foi realizada reação imunoistoquímica com os anticorpos citados em cada um dos grupos. A expressão dos anticorpos foi avaliada por um índice de positividade (IP) determinado após a contagem de 500 células de cada amostra. **Resultados:** Verificou-se que o IP (mediana) de P16 em LPC foi o mais elevado (86,59), seguido pelo LPO (20,65), HFO (11,8) e DO (7,85) ($p < 0,001$). A comparação de pares *post-hoc* mostrou diferença estatisticamente significativa entre LPO / LPC, LPO / DO. O IP para BUB3 também foi maior no LPC (83,2), seguido por LPO (80), HFO (77) e DO (71,4) ($p = 0,04$). O maior IP para SOX4 foi encontrado em LPC (86,8) seguido por HFO (82,3), DO (72,4) e LPO (66,1) ($p < 0,001$). Foi verificada diferença estatisticamente significativa entre LPO / LPC. O Ki67 apresentou expressão maior em DO (14,4) seguido de LPO (11,6), LPC (8,24) e HFO (5,5) ($P < 0,001$). O teste *post hoc* mostrou diferença significativa entre LPO / HFO, LPC / DO e DO / HFO. **Conclusão:** Os resultados aqui apresentados sugerem que o LPO tem um potencial intermediário de transformação maligna. O P16 não se comportou como um marcador confiável de transformação maligna das lesões orais. A expressão de BUB3 e SOX4 devem ser melhor esclarecidas, mas talvez possam atuar como fatores de proteção. Mais estudos devem ser realizados envolvendo esses marcadores.

Descritores: Líquen plano; Displasia oral; Hiperplasia oral; P16; BUB3; SOX4; Ki67.

ABSTRACT

P16, BUB3, Ki67 and SOX4 immunohistochemical expression in oral lichen planus, cutaneous lichen planus, oral dysplasia and oral fibrous hyperplasia.

Background: Oral cancer is one of the ten most common types of cancer worldwide. In this context, the search for diagnosis and prognosis biological markers is extremely relevant. **Objective:** To evaluate the expression of the antibodies P16, BUB3, SOX4 and Ki67 in oral lichen planus (OLP) and compare its results with their expression among cutaneous lichen planus (CLP), oral dysplasia (OD) and oral fibrous hyperplasia (OFH). **Materials and methods:** This is a retrospective study design, which included 120 formalin fixed paraffin embedded tissue blocks of OLP, OD, OFH and CLP, equally distributed. **Results:** It was verified that positive index (median) of P16 in CLP was the highest one (86.59), followed by OLP (20.65), OFH (11.8) and OD (7.85) ($p < 0.001$). Post-hoc pairwise comparisons showed significant statistical differences between OLP/CLP, OLP/OD, CLP/OD and CLP/OFH. Positive index for BUB3 was also higher in CLP (83.2) followed by OLP (80), OFH (77) and OD (71.4) ($p = 0.04$). The highest SOX4 index was found in CLP (86.8) followed by OFH (82.3), OD (72.4) and OLP (66.1) ($p < 0.001$). Significant statistical difference was verified between LPO/LPC and LPC/OD. Ki67 was higher in OD (14.4) followed by OLP (11.6), CLP (8.24) and OFH (5.5) ($P < 0.001$). Post hoc test showed significant difference between OLP/OFH, CLP/OD and OD/OFH. **Conclusion:** The results presented here suggest that OLP has an intermediate malignant potential. P16 can not be considered a reliable marker for malignant transformation in oral lesions. The expression of BUB3 and SOX4 should be further clarified, but they may act as protect factors. More studies should be performed involving these markers.

Key words: Lichen planus, Oral dysplasia, Oral fibrous hyperplasia, P16, BUB3, SOX4, Ki67.

LISTA DE ABREVIATURAS E SIGLAS

CCEO	Carcinoma de células escamosas oral
CPCM	Complexo de proteínas do <i>checkpoint</i> mitótico
DO	Displasia oral
DO-L	Displasia oral de grau leve
DO-M	Displasia oral de grau moderado
DO-S	Displasia oral de grau severo
ERO	Líquen plano erosivo
ERT	Líquen plano eritematoso
HFO	Hiperplasia fibrosa oral
HPV	Vírus do papiloma humano
LPC	Líquen plano cutâneo
LPO	Líquen plano oral
OMS	Organização Mundial de Saúde
PCR	Reação de cadeia de polimerase
Rb	Retinoblastoma
RET	Líquen plano reticular
TNF	Fator de necrose tumoral

SUMÁRIO

1. INTRODUÇÃO E REVISÃO DA LITERATURA	11
1.1 – INTRODUÇÃO	12
1.2 – REVISÃO DE LITERATURA	14
1.2.1 – LÍQUEN PLANO	14
1.2.2 – P16	18
1.2.3 – BUB3	24
1.2.4 – SOX4	26
1.2.5 – KI67	29
2. JUSTIFICATIVA	33
3. OBJETIVOS	35
3.1 – OBJETIVO GERAL	36
3.2 – OBJETIVOS SECUNDÁRIOS	36
4. MATERIAIS E MÉTODOS	37
4.1 – AMOSTRA	38
4.2 – IMUNOISTOQUÍMICA	40
4.3 - AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE P16, BUB3, SOX4 E KI67	41
4.4 – ANÁLISE ESTATÍSTICA	43
5. RESULTADOS	44
6. DISCUSSÃO	56
7. CONCLUSÃO	65
8. REFERÊNCIAS BIBLIOGRÁFICAS	67
9. APÊNDICES	76
9.1 – DADOS RELATIVOS AO GRUPO DE LPO	77
9.2 – DADOS RELATIVOS AO GRUPO DE LPC	78
9.3 – DADOS RELATIVOS AO GRUPO DE DO	79
9.4 – DADOS RELATIVOS AO GRUPO DE HFO	80

LISTA DE ILUSTRAÇÕES

FIGURA 1 - LÍQUEN PLANO RETICULAR, ASPECTO CLÍNICO	16
FIGURA 2 - LÍQUEN PLANO ERITEMATOSO, ASPECTO CLÍNICO	16
FIGURA 3 - LÍQUEN PLANO EROSIVO, ASPECTO CLÍNICO.	16
FIGURA 4 - LÍQUEN PLANO, ASPECTO HISTOLÓGICO.	16
FIGURA 5 - CORTE HISTOLÓGICO ESCANEADO, CASO LPO 22/BUB3.....	42
FIGURA 6 - FOTOGRAFIA DO CAMPO 04, CASO LPO 22/BUB3.....	42
FIGURA 7 - TELA DO PROGRAMA IMAGE J, ÁREA DO CAMPO 4, CASO LPO 22/BUB3.	42
FIGURA 8 - EXPRESSÃO DE P16, BUB3, SOX4 E KI67 EM LPO, CASO 22....	52
FIGURA 9 - EXPRESSÃO DE P16, BUB3, SOX4 E KI67 EM LPC, CASO 12	53
FIGURA 10 - EXPRESSÃO DE P16, BUB3, SOX4 E KI67 EM DO, CASO 29.....	54
FIGURA 11 - EXPRESSÃO DE P16, BUB3, SOX4 E KI67 EM OH, CASO 23.	55

LISTA DE GRÁFICOS E TABELAS

GRÁFICO 1 - LOCALIZAÇÃO DAS BIÓPSIAS DA MUCOSA OARAL SEGUNDO A LESÃO.....	46
GRÁFICO 2 - IMUNOEXPRESSÃO DE P16	47
GRÁFICO 3 - IMUNOEXPRESSÃO DE BUB3	48
GRÁFICO 4 - IMUNOEXPRESSÃO DE SOX4	48
GRÁFICO 5 - IMUNOEXPRESSÃO DE KI67	49
TABELA 1 - ANTICORPOS PRIMÁRIOS.....	41
TABELA 2 - DADOS CLÍNICOS	45
TABELA 3 - EXPRESSÃO DE P16, BUB3, SOX4 E KI67 NO LÍQUEN PLANO ORAL (LPO), LÍQUEN PLANO CUTÂNEO (LPC), DISPLASIA ORAL (DO) E HIPERPLASIA FIBROSA ORAL (HFO).....	50

1 1- INTRODUÇÃO E REVISÃO DE LITERATURA

1.1- INTRODUÇÃO

O câncer de boca está entre os dez tipos de câncer mais comuns em todo o mundo. Estima-se que o número de novos casos de câncer de boca e mortes relacionadas por ano em nosso planeta seja, respectivamente, 263.000 e 127.000 [1]. O carcinoma de células escamosas oral (CCEO) é o tumor mais frequente nesta região anatômica. Na maioria dos casos, tem-se verificado que o CCEO é antecedido pelas chamadas lesões precursoras epiteliais, tais como a leucoplasia e a eritroplasia, ou pelas condições pré-cancerosas, tais como o tabagismo e o líquen plano [2-4]. Portanto, o diagnóstico precoce dessas lesões combinado com uma estimativa adequada do prognóstico pode prevenir o aparecimento de CCEO. Além disso, pode evitar as sequelas causadas pelo tumor e/ou seu tratamento, reduzindo os custos decorrentes para a sociedade [5]. Nesse contexto, a pesquisa de marcadores biológicos para diagnóstico e prognóstico dessas lesões é fundamental.

A Organização Mundial de Saúde (OMS) incluiu o líquen plano oral (LPO) como uma condição pré-cancerosa, em 1978. Essa classificação foi mantida até o último relatório de 2005 [3]. O LPO é uma forma de líquen plano (LP), que, por sua vez, é uma das doenças mucocutâneas mais comuns, cujas lesões podem ser encontradas na pele, mucosa, ou em ambos. Sua incidência varia de 0,5 a 2% na população em geral. Os adultos, especialmente as mulheres (a proporção pode ser tão elevada como 3:1), são os mais acometidos. [6-8]

O tratamento do LPO é paliativo e indicado apenas nos pacientes sintomáticos. Podem ser utilizados corticóides tópicos ou sistêmicos, ciclosporina tópica, retinóides tópicos ou tacrolimus tópico. Após o tratamento o paciente geralmente passa por um período de remissão dos sintomas, embora as lesões não desapareçam. [8]

A associação entre o LPO e o câncer bucal, embora ainda possa ser considerada um assunto controverso, vem sendo relatada e extensivamente estudada [9-16]. Por outro

lado, a possibilidade de transformação maligna das lesões de líquen plano cutâneo (LPC) é considerada insignificante e raramente relatada. No entanto, os pacientes com LPC podem apresentar um risco aumentado de desenvolvimento de câncer oral [17, 18].

O estabelecimento de biomarcadores que possam prever ou que indiquem a transformação maligna seria muito útil no diagnóstico e no manejo de pacientes com LP, especialmente quando o LPO é detectado. O Ki67 é um marcador bem estabelecido de proliferação celular que tem sido largamente utilizado para avaliar tanto a agressividade de CCEO como das lesões orais precursoras em alguns estudos [19, 5, 20, 21]. No entanto, apenas quatro pesquisas relataram a expressão Ki67 em LPO, até o presente momento [22-25].

A proteína P16 é um marcador biológico consagrado para a avaliação do risco de desenvolvimento e do prognóstico no câncer de colo uterino [26, 27]. Entretanto, apenas três estudos avaliaram a expressão de P16 em LPO, até o momento. Existem diferenças importantes na metodologia desses trabalhos e os resultados são controversos. Um desses estudos aponta que a expressão aumentada de P16 pode se dar devido à presença de inflamação [28-30].

Outros genes e proteínas, como o BUB3 e o SOX4, estão sendo estudados em diferentes tipos de câncer, com o objetivo de estabelecer novos marcadores biológicos. No entanto, pouco se sabe sobre o papel dessas proteínas em lesões ou condições precursoras de CCEO, especialmente no LPO [31, 32].

1.2 - REVISÃO DE LITERATURA

1.2.1 - Líquen Plano

As lesões de LP podem estar presentes em pele, mucosas ou em ambos. O líquen plano oral (LPO) isolado é a forma mais comumente encontrada, enquanto o líquen plano cutâneo (LPC) isolado é a menos frequente [7].

A etiologia dessa doença permanece desconhecida [33, 34]. Contudo, em função de seu perfil e curso clínico, sugere-se que a mesma represente um distúrbio da imunidade celular. Essa alteração imune parece ser mediada principalmente por linfócitos TCD8+ citotóxicos, que provocam a apoptose das células epiteliais basais. Isso pode ser precipitado por alguns fatores como trauma local, estresse e infecção pelo vírus da hepatite C. Polimorfismos genéticos que aumentam a produção de citocinas parecem ter um papel importante no surgimento do LP [34].

Em boca, o líquen plano possui uma rica diversidade clínica. A manifestação mais clássica ocorre na forma de estrias esbranquiçadas entrelaçadas com aspecto rendilhado. No entanto, existem alguns outros aspectos do LPO que incluem: placas ou pápulas esbranquiçadas, áreas atróficas avermelhadas, vesículas e ulcerações. As lesões em geral são múltiplas, bilaterais e simétricas. Elas surgem com maior frequência em mucosa jugal, dorso da língua, gengiva e lábio, podendo envolver qualquer área da boca [10, 34, 35].

Três tipos morfológicos (ou formas) de LPO podem ser distinguidos: o reticular, o eritematoso e o erosivo. A forma reticular é bem mais comum, caracterizando-se apenas por estrias ou placas brancas (Figura 1), e geralmente é assintomática [35, 13]. Na forma eritematosa podem ser observadas áreas atróficas avermelhadas em meio às lesões esbranquiçadas (Figura 2), enquanto que na forma erosiva áreas ulceradas são também encontradas (Figura 3). O LPO eritematoso e, especialmente, o erosivo causam dor ou

ardência na maioria dos pacientes, além de apresentarem maior probabilidade de transformação maligna [16, 10, 13]. Faz-se necessário ressaltar que o aspecto morfológico predominante (forma de LPO) pode mudar com o tempo [8].

Detalhes dos aspectos clínicos são importantes, uma vez que quando se observam lesões isoladas, unilaterais e associadas a fatores locais (como restaurações dentárias metálicas, especialmente em amálgama) essas podem configurar a reação liquenóide que desaparece com a remoção do fator local. As reações liquenóides também podem ser de origem sistêmica, em geral associadas ao uso de alguns medicamentos. De forma semelhante, a interrupção dos remédios faz com que as lesões desapareçam [8].

O diagnóstico de LPO é baseado em manifestações clínicas e histológicas que incluem: hiperqueratose, acantose irregular, degeneração da camada basal do epitélio, corpos hialinos, cristas epiteliais em forma de dentes de serra e a presença de um infiltrado inflamatório em banda composto quase exclusivamente de linfócitos maduros [33]. Dentre as características histológicas, são critérios essenciais para o diagnóstico a liquefação basal e o infiltrado em banda (Figura 4) [28, 29, 36].



Figura 1 – Líquen Plano Reticular, aspecto clínico. Estrias esbranquiçadas entrelaçadas na mucosa jugal direita – Foto do arquivo pessoal do autor com o consentimento prévio do paciente.



Figura 2 – Líquen Plano Eritematoso, aspecto clínico. Áreas atróficas e eritematosas nas gengivas – Foto do arquivo pessoal do autor com o consentimento prévio do paciente.



Figura 3 – Líquen Plano Erosivo, aspecto clínico. Úlcera em meio a estrias esbranquiçadas na mucosa jugal direita - Foto do arquivo pessoal do autor com o consentimento prévio do paciente.

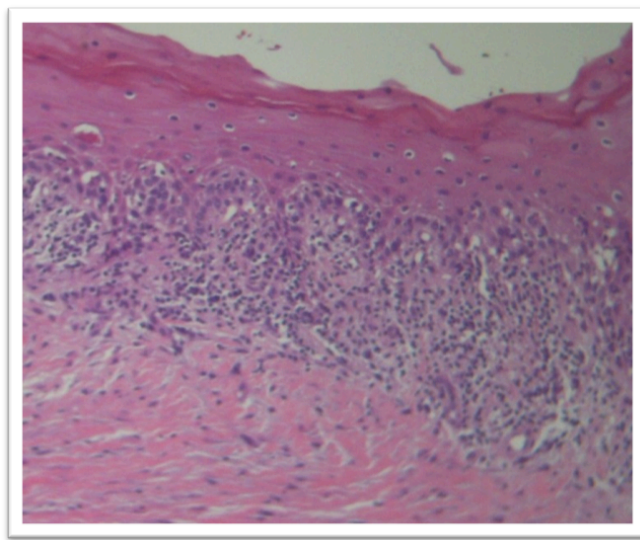


Figura 4 – Líquen Plano, aspecto histológico. Hiperqueratose, cristas epiteliais em dentes de serra, liquefação basal e infiltrado inflamatório em banda.

Verificou-se que de 11 a 15% dos pacientes com LPO já manifestavam ou manifestariam mais tarde lesões cutâneas [37, 13]. O LPC comumente envolve as faces flexoras dos antebraços e caracteriza-se por pápulas achatadas eritematosas a violáceas, exibindo discretas linhas brancas entrelaçadas [6]. Os joelhos, o couro cabeludo e as unhas também podem ser envolvidos [7]. O diagnóstico do LPC pode ser feito clinicamente ou por biópsia. Os aspectos histológicos clássicos são: hiperqueratose, hipergranulose, acantose, infiltrado linfocitário em banda e degeneração da camada basal do epitélio [38].

As lesões cutâneas da doença são autolimitadas em sua maioria e não produzem morbidade. Em contrapartida, as alterações orais tendem a ser crônicas e raramente apresentam remissão espontânea [10]. Desta forma, tem sido sugerido que a permanência das lesões de LPO pode ser um dos fatores de risco para o desenvolvimento de carcinoma de células escamosas [39]. Por outro lado, a possibilidade de transformação maligna de lesões de LPC é praticamente nula e raramente descrita, quando comparada às transformações malignas do LPO [18].

Alguns autores questionam o potencial de transformação maligna do LPO, especialmente devido à dificuldade em definir critérios histológicos de diagnóstico na presença de atipias epiteliais associadas, o que para alguns caracteriza uma forma de displasia chamada liquenóide, que pode ser considerada como fator confundidor [15, 11, 40].

Diversas séries, no entanto, parecem demonstrar a associação de LPO e CCEO. EISEN (2002) encontrou 6 (0,8%) CCEO dentre 723 indivíduos com LPO [10]. XUE *et al* (2005) encontraram a mesma taxa de malignização (0,8%) dentre 674 chineses com LPO [13]. CARBONE *et al* (2009) estudaram 808 pacientes com LPO dos quais 15 (1,8%) desenvolveram carcinomas orais, sendo que apenas 5 deles eram tabagistas [16]. No estudo coorte realizado por BOMBECCARI *et al* (2011), durante 81 meses, 8 dentre 327 pacientes desenvolveram CCEO sobre lesões de LPO [41].

Os mecanismos envolvidos na transformação maligna do LPO ainda não foram bem esclarecidos [15, 42]. A existência da resposta inflamatória crônica produz um processo repetitivo de proliferação e destruição de células basais, podendo gerar instabilidade genética [42]. Esta última aumenta o risco de erros genéticos e já foi associada ao desenvolvimento de alterações displásicas e de CCEO [43]. Em um estudo que utilizou citometria de DNA observou-se aneuploidia moderada em alguns casos de LPO do tipo erosivo [44].

Outros trabalhos sugerem que a liquefação da camada basal representa uma alteração do ciclo celular que pode estar relacionada ao potencial de transformação maligna do LPO [45, 46]. HIROTA *et al* (2002) avaliaram o índice mitótico e a expressão de Ki67, p53 e ciclina D1, dentre outros reguladores, e observaram paralisação do ciclo celular, bem como estímulo proliferativo e morte celular, concomitantemente, nas camadas basal e supra-basal no LPO [47]. Outro trabalho aponta que a metilação dos genes p16 e miR-137 pode desempenhar algum papel nessa desregulação do ciclo celular no LPO [48].

1.2.2 - P16

Em geral, durante o processo de malignização ocorrem alterações de moléculas reguladoras do ciclo celular, dentre as quais encontram-se os inibidores do ciclo celular da classe INK4 (p15INK4b, p16INK4a, p18INK4c e p19INKd), que são inibidores homólogos de quinases dependentes de ciclinas relacionadas à proliferação celular (CDK4 e CDK6). A proteína p16INK4a (P16) liga-se à CDK4 e à CDK6, evitando a ligação dessas quinases às ciclinas do tipo D. Conseqüentemente, há inibição da fosforilação mediada por CDK4/6 de membros da família retinoblastoma (Rb). Assim, a expressão de P16 produz um estado de

hipofosforilação das proteínas da família Rb e, dessa forma, interrompe o ciclo celular [49, 50]

Portanto, o gene que codifica a proteína P16 consiste em um importante supressor de câncer humano. Isso pode ser demonstrado pelo fato do locus 9p21 (INK4a/ARF/INK4b) - codificador da proteína P16, entre outros produtos – encontrar-se ausente em diversos tumores, incluindo melanoma, adenocarcinoma pancreático, glioblastoma, leucemias, câncer de pulmão de células não pequenas e carcinoma de bexiga [49]. Alterações no locus 9p21 e consequente supressão da expressão do gene P16 parecem representar um evento inicial no desenvolvimento de carcinomas orais [51-53].

MUIRHEAD *et al* (2006) encontraram uma relação inversa entre a expressão de P16 e de Rb em uma série de 45 CCEO [54]. Os autores sugeriram que a supressão do gene p16, e a consequente inibição da proteína P16, acarreta em ativação do Rb, que ocasiona a passagem para a fase S do ciclo celular no câncer de boca. Outros trabalhos com CCEO encontraram resultados semelhantes associados a alterações do gene P16 tais como metilação, mutação pontual e deleção [55, 56]. No entanto, a superexpressão de P16 também foi encontrada em alguns estudos envolvendo CCEO [57, 53, 50].

Nas neoplasias intraepiteliais cervicais, a inibição da proteína Rb pelo vírus do papiloma humano (HPV) resulta em níveis elevados de P16 devido à regulação por *feedback* negativo. Dessa forma, a expressão de P16 tem uma boa correlação com o grau de neoplasia intraepitelial cervical, sendo considerada um marcador sensível para essa lesão [27]. CHEAH *et al* (2012) demonstraram um aumento da expressão de P16 nas lesões precursoras do câncer de colo uterino, e sugeriram que a detecção por imunohistoquímica de P16 no colo do útero pode substituir a identificação do DNA do HPV de alto risco, além de funcionar com marcador de prognóstico para o carcinoma dessa região [26].

Por sua vez, CHEN *et al* (2012) encontraram superexpressão de P16 somente nos casos de CCEO que foram positivos para HPV por hibridização *in situ* [58]. Por analogia com o carcinoma cervical, deduziu-se que, nesses casos, o câncer bucal estaria associado ao HPV, principalmente nos pacientes não expostos aos fatores de risco como tabaco, álcool e betel [58, 59]. NEMES (2006), por outro lado, demonstrou a expressão de P16 em CCEO mesmo sem a identificação do DNA do HPV [60].

Existe controvérsia também em relação à expressão de P16 nas displasias orais (DO). Alguns trabalhos evidenciam uma relação direta entre a expressão aumentada de P16 e o grau de DO [61, 62]. Entretanto, outros estudos sugerem que a redução da expressão de P16 está relacionada às lesões displásicas orais [63, 64]. BRADDLEY *et al* (2006) e BUAJEEB *et al* (2009), por sua vez, não consideraram que a expressão de P16 fosse útil na diferenciação entre DO e lesões não displásicas na boca [65, 51].

Um estudo utilizando lesões displásicas da mucosa oral que progrediram para CCEO não identificou relação significativa entre a expressão de P16 e o surgimento do câncer de boca [59]. No entanto, esse mesmo trabalho evidenciou uma relação significativa ($p < 0.01$) na presença ou ausência de P16 nas lesões precursoras e no carcinoma escamoso delas resultante. Os autores concluíram que a não expressão de P16 em lesões displásicas não exclui a possibilidade de transformação maligna. Porém, sugeriram que a marcação forte por essa proteína pode indicar alto risco de cancerização, e ressaltaram a necessidade de mais estudos com P16.

A imunexpressão de P16 foi avaliada em outro interessante trabalho realizado por ANGIERO *et al* (2008), com casos de displasia e CCEO na cavidade oral [66]. Nesse estudo, a amostra foi dividida da seguinte forma: grupo 1 - 29 fragmentos de mucosa normal / hiperplasia ou displasia leve, grupo 2 - 14 peças com displasia moderada ou grave e grupo 3 - 11 amostras de carcinomas invasivos. A expressão da proteína P16 foi ausente no grupo

1, presente em 85,7% dos casos no grupo 2 (displasia moderada / severa) e em 54,5% das áreas de carcinoma de infiltração do CCEO no grupo 3.

Recentemente, DRAGOMIR *et al* (2012) observaram marcação nuclear e citoplasmática de P16 em 22 de 34 casos de CCEO [53]. O estudo demonstrou ainda uma marcação de P16 maior no epitélio displásico adjacente aos carcinomas que nos próprios tumores (intensidade média de 45,4% e 31,1% respectivamente). Os autores acreditam que o P16 seja um marcador específico para o epitélio oral displásico.

Três estudos bastante atuais avaliaram a expressão de P16 em lesões de LPO. No primeiro deles, POOMSAWAT *et al* (2011) estudaram 23 casos de LPO [29]. As células positivas para P16 apresentaram marcação nuclear e/ou citoplasmática. Para considerar um caso positivo nesse estudo, estabeleceu-se o parâmetro de, no mínimo, cinco células coradas dentre 500 células, contadas em cinco a oito campos de microscopia óptica (200 X) escolhidos aleatoriamente.

De acordo com esses critérios, os autores identificaram 15 (65%) casos de LPO positivos para P16, enquanto todos os casos do grupo controle, composto por dez fragmentos de mucosa oral normal, foram negativos ($p=0.0005$). Na maioria dos casos, a marcação do anticorpo P16 estava presente tanto no núcleo como no citoplasma, e variou em intensidade de fraca a forte. A média de células consideradas positivas no LPO foi de aproximadamente 2%. Os autores desse trabalho sugeriram que a fase G1 do ciclo celular encontra-se alterada e tal alteração pode estar relacionada ao potencial de malignização do LPO.

Em outro estudo recente, MONTEBUGNOLI *et al* (2011) avaliaram a expressão de P16 em 56 casos de LPO [28]. Os autores fizeram comparação com um grupo constituído por 36 casos de leucoplasia oral sem displasia, outro grupo heterogêneo de 23 lesões inflamatórias inespecíficas (incluindo ulcerações crônicas e hiperplaisas gengivais), além de um grupo controle com 14 fragmentos de mucosa oral normal. Os casos foram considerados positivos

para P16 quando apresentaram marcação >5% das células contadas em cinco campos diferentes de 0,12 mm² (ampliação de 400X).

As lesões de LPO foram subdivididas em reticulares e atróficas, sendo que, 57 e 79% dos casos foram considerados positivos, respectivamente. No entanto, essa diferença não foi considerada estatisticamente significativa. As leucoplasias foram subdivididas de acordo com a presença ou ausência de inflamação. No primeiro subgrupo, 42% dos casos foram positivos, enquanto no segundo todos foram negativos ($p < 0,05$). Dentre as lesões inflamatórias, 43% foram positivas, enquanto no grupo controle todos os casos foram negativos para P16.

A diferença entre LPO e leucoplasia em geral foi estatisticamente significativa ($p < 0,01$). Entretanto, a diferença entre os grupos de LPO / inflamação inespecífica e LPO / subgrupo de leucoplasia com inflamação não foi considerada significativa. Os achados de MONTEBUGNOLI *et al* (2011) permitem supor que a expressão de P16 seja influenciada pela presença de inflamação [28]. Os autores acreditam que nos casos de LPO isso pode estar relacionado à presença de TNF- α e interferon- γ , não sendo possível correlacionar a expressão de P16 com o potencial de malignização do LPO.

No estudo mais recente, SALEHINEJAD *et al* (2014) avaliaram a expressão de P16 em 15 casos de LPO, além de 45 CCEO (15 bem diferenciados, 15 moderadamente diferenciados e 15 indiferenciados) e de 8 fragmentos de mucosa normal [30]. As células positivas foram contadas em 5 campos com a maior população de células (*hot spots*), em microscopia ótica (400 X), e o resultado foi expresso como percentagem. Os casos positivos para P16 foram aqueles nos quais a marcação nuclear ou citoplasmática superou 70% das células contadas.

Considerando esses critérios, os autores encontraram 4 (26,7%) amostras positivas para LPO (>70%). Dentre os demais casos de LPO, 5 apresentaram marcação inferior a 10% e os

6 restantes apresentaram marcação positiva entre 10 e 70%. Os casos de CCEO e controle foram negativos para P16 nessa pesquisa e todos apresentaram marcação inferior a 10% das células contadas.

A expressão de P16 em células do epitélio oral normal, utilizadas como grupo controle em alguns trabalhos, variou de ausente a menor que 10% das células [59, 28-30]. Exceto por alguns dos casos não especificados pertencentes ao grupo de inflamação inespecífica do trabalho de MONTEBUGNOLI *et al* (2011), não existem relatos sobre a expressão de P16 no epitélio de hiperplasias fibrosas orais [28]. Por outro lado, ABRAHAO *et al* (2011) encontraram superexpressão de P16 em dois casos dentre 5 hiperplasias epiteliais orais [57].

1.2.3 - BUB3

BUB3 é uma proteína envolvida no controle da segregação dos cromossomas durante a divisão celular, o que é essencial para estabilidade genômica. No processo da mitose, durante a metáfase, desenvolve-se o fuso mitótico no equador da célula, onde ocorre a ligação das cromátides irmãs aos microtúbulos do fuso através dos cinetócoros. O fuso mitótico é responsável pela organização e correta separação dos cromossomas em divisão. Somente após essa organização, durante a anáfase, é que deve ocorrer a separação das cromátides irmãs e se iniciar a migração para os polos da célula em divisão. [31, 67]

O *checkpoint* mitótico (*spindle checkpoint assembly*) é um mecanismo que atua controlando a transição da metáfase para a anáfase. Esse mecanismo tem como objetivo

impedir ou retardar a segregação dos cromossomas até que a montagem do fuso mitótico e a adesão de cromossomos aos microtúbulos de forma bipolar ocorra adequadamente, através dos cinetócoros. Dessa forma, garante a separação correta de todos os cromossomos para as células filhas. [68, 69, 31, 70].

As proteínas BUBR1, BUB3, CDC20 e MAD2 fazem parte do complexo de proteínas do *checkpoint* mitótico (CPCM) e ficam localizadas nos cinetócoros dos cromossomos que ainda não se ligaram de forma bipolar ao fuso mitótico, sinalizando essa condição. As proteínas do CPCM são recrutadas em uma sequência interdependente, cujo objetivo final é ativar a CDC20. Esta última, por sua vez, ativa o complexo de promoção da anáfase / ciclossoma (APC/C), um tipo de ligase E3-ubiquitina que funciona como regulador chave da transição metáfase-anáfase [31].

Um estudo avaliou o papel dos genes BUB3, BUB1 e BUBR1 na interação cinetócoro-microtúbulo utilizando interferência de RNA e microscopia de alta resolução. Os autores observaram que em células com depleção de BUBR1 a ligação cinetócoro-microtúbulo foi totalmente comprometida. Por outro lado, nas células com depleção de BUB3 e BUB1 houve uma ligação defeituosa, com tendência unilateral [31].

Corroborando esse achado, em outro trabalho que utilizou diversas técnicas de biologia molecular, LARSEN, AL-BASSAM *et al.* (2007) observaram que mutações específicas em BUB3 podem desestabilizar interação com BUB1, permitindo o recrutamento de cinetócoros não aderidos [69]. Os autores sugeriram ainda que a alteração cromossomial nas células filhas decorrente dessa falha pode acarretar no desenvolvimento de neoplasias malignas.

Entretanto, a superexpressão do gene BUB3 também pode estar implicada na carcinogênese, como foi observado em tumores gástricos em um estudo realizado com PCR

e Ki67 [71]. Nesse trabalho, ficou evidenciada uma forte correlação entre a expressão de BUB1, BUBR1 e BUB3 e o índice de proliferação celular nos tumores, que foi avaliado pela imunexpressão de Ki67.

Em outro estudo que utilizou um modelo de tumorigênese em *Drosophila* foi observado que BUB3 e as demais proteínas do CPCM são essenciais para a vida da célula, uma vez que sua ausência causa a morte celular [72]. Por outro lado, a falta de BUB3 no cinetócoro, embora tenha produzido aneuploidia, não induziu isoladamente o desenvolvimento de neoplasia nesse modelo. A falta de proteínas do CPCM no cinetócoro interrompeu a sinalização e o consequente recrutamento de BUB3 no citosol. Porém, a depleção de BUB3 no cinetócoro e no citosol em células com apoptose inibida produziu tumor, independente da atividade de P53. Isso sugere que o BUB3 tem algum outro papel possivelmente associado ao controle do ciclo celular, além daquele que já desempenha no CPCM.

1.2.4 - SOX4

O gene SOX4 é um membro da família de fatores de transcrição SOX (*sex-determining region Y-related high mobility group box*). Essa família desempenha um papel chave em muitos aspectos do desenvolvimento, tais como determinação do sexo, desenvolvimento neuronal, formação de testículos, diferenciação dos linfócitos e formação de cartilagem. [73, 74]

Nos vertebrados, mais de 20 genes foram identificados na família SOX e classificados nos grupos A a G, de acordo com as semelhanças na sequência de DNA. O grupo SOX-C foi relacionado a processos do desenvolvimento cardíaco embrionário, do sistema nervoso e dos timócitos, além da diferenciação de osteoblastos. O gene SOX4 faz

parte desse grupo e codifica uma proteína SOX4 de 474 aminoácidos com 3 domínios. Um deles parece promover a morte celular por apoptose. [73, 74]

Trabalhando com linhagens de células neoplásicas pulmonares e do cólon, PAN *et al* (2008) demonstraram relações importantes entre o SOX4 e o P53, um conhecido regulador do ciclo celular [32]. A depleção de SOX4 em células onde foi induzido dano no DNA acarretou na diminuição da atividade de P53. Os autores observaram que o SOX4 comportou-se como um sensor para o dano de DNA que ativa, em sequência, o P53. O estudo demonstrou também que ocorre interação entre P53 e SOX, considerada fundamental para as funções protetoras do P53. Por fim, a pesquisa evidenciou que SOX4 reduziu a degradação do P53.

Em um estudo conduzido por HUR (2010) envolvendo 58 amostras de carcinoma hepatocelular, a correlação entre SOX e P53 foi observada de forma semelhante ao anteriormente descrito [74, 75]. Nesse trabalho, foi encontrada maior expressão de SOX4 nas células neoplásicas que no tecido hepático normal. Não ficou evidenciada correlação significativa entre a expressão citoplasmática de SOX4 e o prognóstico (taxas de sobrevida livre de doença e de sobrevida global). Entretanto, curiosamente, verificou-se que os pacientes com superexpressão nuclear de SOX4 tiveram melhor prognóstico que aqueles com expressão nuclear negativa ou fraca. Os autores sugeriram que a localização nuclear de SOX4 pode funcionar como indicador para melhor prognóstico no carcinoma hepatocelular.

Evidências de que SOX4 aumenta os níveis de β -catenina foram obtidas em estudo com culturas de células [76]. Além disso, a depleção de SOX4 resultou, no mesmo trabalho, em uma redução significativa dos níveis de c-myc e ciclina D. Com isso, os autores sugeriram que SOX4 controla o nível de β -catenina endógena, cuja desregulação está vinculada a diversos tipos de câncer.

JAFARNEJAD *et al* (2010) também estudaram a expressão nuclear de SOX4 em melanomas [77]. Eles observaram uma correlação negativa na expressão de SOX4 entre os melanomas metastáticos e os melanomas primários, bem como entre os melanomas metastáticos e os nevos displásicos, com a menor expressão ocorrendo nos tumores metastáticos. A sobrevida em 5 anos foi menor nos tumores onde foi constatada baixa expressão de SOX4. Foi observado ainda um aumento significativo da migração celular, implicado na capacidade de invasão neoplásica, em duas linhagens de melanomas cultivadas após a depleção de SOX4.

Um estudo prospectivo entre 1997 e 2006, envolvendo 136 pacientes que foram submetidos à cirurgia para tratamento de tumor primário de vesícula biliar, avaliou a imunexpressão de SOX4 [73]. Os autores observaram que os tumores com maior expressão de SOX4 eram aqueles de menor grau histológico, em estágios mais iniciais e associados à maior sobrevida dos pacientes.

A superexpressão de SOX4 foi demonstrada por LIU *et al* (2006) em amostras de câncer de próstata comparadas às de tecido prostático normal adjacente, utilizando-se técnicas de *microarray* e imunistoquímica [78]. Nesse trabalho, os autores demonstraram, através do silenciamento de SOX4 pela transfecção de micro RNA de interferência de RNA, que ocorreu apoptose em células neoplásicas prostáticas. Portanto, sugere-se que SOX4 possa ser um alvo terapêutico para esses tumores. Além do mais, a transfecção estável de SOX4 em células prostáticas normais induziu a formação de colônias de células em agar mole, sugerindo que SOX4 pode ser um oncogene.

Em um estudo com mais de 400 casos de câncer colorretal, ficou demonstrada superexpressão de SOX4 em comparação com mucosa normal adjacente [79]. Observou-se ainda que, o aumento dos níveis de transcrição do gene SOX4 correspondeu ao aumento da expressão imunistoquímica da proteína SOX4 nesses tumores. Também foi percebido que

a marcação para SOX4 no tecido foi específica para células neoplásicas. Por fim, o estudo correlacionou a maior expressão do SOX4 com o pior prognóstico desses tumores.

A expressão imunohistoquímica de SOX4 em um trabalho com 57 casos de carcinoma urotelial da bexiga foi forte em 49 (86%), moderada em 4 (7%), fraca em 1 (2%) e ausente em 3 (5%) das amostras tumorais [80]. Por outro lado, SOX4 foi positivo em apenas 46% dos controles. A marcação imunohistoquímica de SOX4 foi observada tanto no núcleo como no citoplasma. No mesmo trabalho, a expressão do gene SOX4, avaliada por PCR em tempo real, foi moderadamente aumentada na maioria dos tumores. Contudo, em alguns deles foi diminuída, quando comparada ao tecido normal.

1.2.5 - Ki67

As células humanas estão equipadas com mecanismos de controle da divisão celular. Mutações no conteúdo genético destas células podem superar estas defesas e contribuir para a formação de tumores malignos. Existem várias moléculas, tais como p53, pRb, p21, p27, p16, topoisomerase II, ck-19 e ki67, que estão envolvidas no controle do ciclo celular. Algumas delas podem ser utilizadas como marcadores biológicos para tentar avaliar o risco de malignização em diferentes tecidos ou lesões precursoras. [66, 81, 82]

As lesões malignas podem surgir a partir de um descontrole na proliferação celular, em geral por uma alteração na regulação do ciclo celular [83]. Em um tecido normal, o ciclo inicia-se pela fase G1, onde ocorre um aumento celular e a célula prepara-se para realizar a cópia do seu DNA. A replicação ocorre na fase S, permitindo que a célula duplique seus cromossomos. Em seguida, começa a fase G2, durante a qual a célula prepara-se para a fase M, onde a célula divide-se ao meio produzindo duas células filhas, com o mesmo número de cromossomos. As células filhas imediatamente entram em fase G1 e podem

reiniciar o ciclo celular. Na fase G₀, a célula fica quiescente, em repouso, mas em qualquer momento pode entrar no ciclo e iniciar a multiplicação. [84]

O Ki67 é uma proteína de cerca de 395kD que pode ser detectada nas fases G₁, S, G₂ e M do ciclo celular, mas não na fase G₀. Isso significa que ela é detectada exclusivamente nos núcleos das células em divisão. Esse período definido de expressão nuclear torna a proteína Ki-67 um marcador confiável para células em proliferação. [85]

KANNAN *et al* (1996) avaliaram a expressão de Ki67 em 5 amostras de mucosa oral normal, 30 de leucoplasia e 15 de CCEO invasivo, e observaram que o índice de proliferação foi bem mais elevado nos CCEO (43%) que na mucosa oral normal (11%). Nas leucoplasias, a expressão de Ki67 foi intermediária, entretanto, não houve diferença significativa entre as lesões não-displásicas e lesões displásicas [83]. Os autores sugeriram que a correlação encontrada entre a progressão do tumor e a expressão do antígeno ki67 pode ser útil na carcinogênese oral.

A imunoexpressão de Ki67 em CCEO e em displasia na cavidade oral foi avaliada em outro trabalho, realizado por ANGIERO *et al* (2008) [66]. Nesse estudo, a amostra foi dividida em três grupos, a saber: 1 - Fragmentos de mucosa normal, hiperplasia ou displasia leve (n=29); 2 - Peças com displasia moderada ou grave (n=14) e 3 - Amostras de carcinomas invasivos (n=11). A imunoexpressão de Ki67 nos grupos 2 e 3 foi de 100% em ambos, enquanto que no grupo 1 não foi observada a expressão de Ki67. Foram usados como critérios para considerar positiva a amostra tanto o número relativo de núcleos corados como sua localização nos 2/3 superiores do epitélio nas lesões displásicas, enquanto que nos CCEO a avaliação foi feita nas áreas de infiltração.

No estudo realizado por HAMADAH *et al* (2010), os índices de proliferação celular foram determinados utilizando-se Ki67 através de imunistoquímica em lesões pré-

cancerosas orais, divididas em únicas e múltiplas [86]. Noventa e seis pacientes foram selecionados e 132 lesões foram excisadas e analisadas. Os índices de proliferação em lesões únicas foram maiores do que aqueles encontrados nas lesões múltiplas. Foi verificada ainda uma relação positiva entre o grau de displasias e a marcação para Ki67.

O Ki67 também foi utilizado para o diagnóstico diferencial entre sialometaplasia necrosante e CCEO. Um estudo realizado com 13 casos de sialometaplasia necrosante, 16 casos de CCEO bem diferenciados e 4 CCEO moderadamente diferenciados evidenciou marcação imunoistoquímica positiva de Ki67 em todos os 20 casos de neoplasia, enquanto que em nenhuma sialometaplasia necrosante a coloração foi positiva [87].

DWIVEDI *et al* (2013) estudaram 30 casos de leucoplasias (15 sem displasia ou com displasia leve e 15 com displasia moderada ou severa), 15 casos de CCEO (5 bem diferenciados, 5 moderadamente diferenciados e 5 pouco diferenciados) e 5 casos de mucosa bucal normal [88]. Os autores encontraram correlação positiva entre o índice de expressão de Ki67 e o grau de displasia, bem como a marcação supra basal do Ki67 e o grau de displasia. Outro trabalho recente com metodologia semelhante e amostra um pouco maior obteve resultados muito parecidos [89]. Ambos sugeriram que a análise da expressão imunoistoquímica de Ki67 pode ser usada de forma confiável para o diagnóstico das displasias do epitélio oral, bem como na determinação do prognóstico para CCEO.

Já o trabalho de TANIGUCHI *et al* (2002) utilizou amostras de LPO de 44 pacientes, além de mucosa bucal normal de 10 pacientes, com o objetivo de examinar se a atividade proliferativa do epitélio oral no LPO estava alterada [24]. A média (\pm desvio padrão) do índice proliferativo de Ki67 em espécimes de LPO ($42,04 \pm 33,56$) foi significativamente maior ($P = 0,03$) do que nas amostras de controle ($28,23 \pm 15,61$). Isso demonstra que o LPO pode

apresentar uma desordem proliferativa secundária, provavelmente devido à quebra repetida das células em divisão que conduzem a um estado elevado de proliferação.

ACAY *et al* (2006) avaliaram a marcação de Ki67 em 22 casos de LPO. As células que apresentavam cor nuclear castanha foram consideradas positivas [22]. Apenas um dos 22 casos de LPO foi negativo para Ki67. A expressão média foi superior a 60 células positivas para cada 500 células contadas (>12%). Os autores sugeriram, com base também na análise de expressão de P53, que o LPO pode apresentar potencial maligno.

A expressão de Ki67 em LPO foi também avaliada na pesquisa de ZANGARAN *et al* (2012) [25]. Os autores compararam 17 casos de hiperplasia epitelial (sem displasia), 20 casos de displasia epitelial (10 moderadas e 10 severas) e 20 casos de CCEO (10 bem diferenciados e 10 pouco diferenciados) com 16 casos de LPO, através de imunistoquímica.

As áreas de maior reação ao Ki67 foram identificadas e a proporção de células com marcação nuclear foi determinada após a contagem de 1.000 células. O índice de expressão no LPO (13,88%) foi maior que nas hiperplasias (5,14%) e menor que nas displasias (19,16%) e no CCEO (41,22%). A diferença só não foi considerada significativa entre LPO e displasia moderada. Portanto, sugeriu-se que o LPO tenha algum potencial de malignização. Isso posto, os autores recomendaram que os profissionais de saúde atentem cuidadosamente para as lesões de LPO, visando detectar potenciais mudanças sutis na fase inicial do processo de transformação maligna.

2 JUSTIFICATIVA

Considerando que o LPO é uma lesão comum na prática clínica e apresenta potencial de malignização, faz-se necessário estudar possíveis marcadores para prever o seu curso clínico. Embora a proteína P16 seja considerada um marcador confiável para malignização no colo uterino, ainda existem controvérsias em relação ao seu papel no processo de carcinogênese bucal. Até o momento, só foram realizados três estudos avaliando a imunexpressão dessa proteína em lesões de LPO. Da mesma forma, somente quatro estudos foram realizados, até o momento, avaliando a expressão de Ki67 em LPO. Além do mais, não existem estudos sobre a expressão de BUB3 e SOX4 em LPO. O melhor entendimento da expressão dessas proteínas poderá ser utilizado na busca de biomarcadores seguros para prever o risco de desenvolvimento de CCEO, em especial a partir do LPO.

3 OBJETIVOS

3.1 - Objetivo geral:

Verificar se existe diferença na imunexpressão de P16, BUB3, SOX4 e Ki67 entre LPO, LPC, hiperplasia Fibrosa oral (HFO) e displasia oral (DO).

3.2 - Objetivos específicos:

- 1- Verificar a imunexpressão de P16, BUB3, SOX4 e Ki67 em LPO;
- 2- Verificar a imunexpressão de P16, BUB3, SOX4 e Ki67 em LPC, HFO e DO;
- 3- Verificar se existe diferença na imunexpressão de P16, BUB3, SOX4 e Ki67 entre os tipos de LPO;
- 4- Verificar se a presença de inflamação pode alterar a imunexpressão de P16 em HFO e DO.
- 5- Identificar possíveis biomarcadores para malignização dentre as proteínas estudadas, para LPO e os demais grupos.

4 - MATERIAL E MÉTODO

4 - MATERIAL E MÉTODO

Este é um estudo retrospectivo, que incluiu casos de LPO, LPC, DO e HFO obtidos a partir de blocos de parafina contendo fragmentos de tecido previamente fixados em formol, retirados dos arquivos do Laboratório de Patologia do Hospital Universitário de Brasília (HUB-Unb). Os dados médicos de cada paciente, incluindo a idade, o sexo e a localização das lesões foram coletados a partir dos mesmos arquivos. Este trabalho foi aprovado pelo conselho de avaliação institucional do Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Medicina da UnB (CEPFM 042/2010).

4.1 - AMOSTRA

O diagnóstico dos casos de LPO e LPC foi determinado com base clínica e histológica. Todos os casos de LPO apresentavam, obrigatoriamente, envolvimento bilateral da cavidade bucal. Com base nos aspectos clínicos, as amostras de LPO foram divididas em três subtipos, a saber:

- 1) LPO RETICULAR (RET) - quando somente estrias ou placas esbranquiçadas foram relatadas;
- 2) LPO ERITEMATOSO (ERT) - quando áreas avermelhadas ou atróficas também foram descritas;
- 3) LPO EROSIVO (ERO) – quando ulcerações foram acrescentadas às demais características previamente descritas.

Os critérios histológicos utilizados para o diagnóstico de LPO foram previamente relatados por VAN DER MEIJ & VAN DER WAAL (2003) [36]. Resumidamente, considerou-se necessária a presença de um infiltrado linfocitário

bem definido, disposto em banda logo abaixo do epitélio, em associação à áreas de liquefação das células da camada basal. Além do mais, nenhum sinal de displasia epitelial poderia ser observado nesses casos. Os critérios histológicos adotados para o diagnóstico do LPC foram os mesmos descritos acima, sendo que a lesão, necessariamente, precisava envolver a pele.

O diagnóstico de DO foi baseado apenas nos aspectos histológicos. Os critérios adotados já foram previamente definidos pela OMS [4]. Dessa forma, os casos de DO foram separados em três grupos, a saber:

- 1) DO Leve (DO-L) - quando as atipias celulares ou arquitetônicas estavam confinadas ao terço inferior (ou basal) do epitélio;
- 2) DO Moderada (DO-M) – quando as atipias celulares e arquitetônicas estavam confinadas aos terços médio e basal do epitélio;
- 3) DO Severa (DO-S) – quando as atipias celulares e arquitetônicas, além de envolver os terços médio e basal, alcançaram o terço superior do epitélio.

Os critérios histológicos utilizados para seleção dos casos de HFO foram proliferação constituída por tecido conjuntivo denso revestido por epitélio escamoso. O epitélio poderia apresentar hiperqueratose e/ou acantose. Entretanto, se algum sinal de displasia fosse encontrado, o caso em questão seria descartado. Para ser incluído nesse grupo, além dos aspectos histológicos acima descritos, o diagnóstico clínico precisava sugerir uma origem traumática para a lesão biopsiada.

Nos grupos de DO e HFO também foi investigado o infiltrado inflamatório próximo ao epitélio. Nesses casos, a inflamação foi classificada em ausente, leve, moderada ou intensa.

4.2 - IMUNOISTOQUÍMICA

As reações de imunoistoquímica foram realizadas utilizando-se um protocolo de estreptavidina-biotina. Os dados relativos ao fabricante, clone, diluição, tempo/temperatura de incubação e tampão de recuperação antigênica dos anticorpos primários encontram-se resumidos na Tabela 1. Todos os anticorpos primários foram diluídos em 1% de albumina de soro bovino tamponada. As demais etapas do processo estão descritas a seguir:

1. Desparafinização por passagem em xilol;
2. Reidratação em álcoois hidratados, água corrente e água destilada;
3. Recuperação antigênica: realizada com tampão de citrato (10mM - pH6,0) em panela de pressão, por 4 minutos (sob pressão), com as lâminas submersas neste tampão;
4. Resfriamento à temperatura ambiente, imersas no tampão citrato;
5. Lavagem das lâminas em água corrente e água destilada;
6. Bloqueio da peroxidase endógena: com peróxido de hidrogênio 0,3% – 2 banhos de 15 minutos, seguido de lavagem em água corrente e água destilada;
7. As lâminas foram colocadas em cubas com ranhuras em solução PBS (*Phosphate Bufferes Saline*) e então foram submetidas à imunocoloração;
8. As lâminas contendo as amostras foram incubadas com o anticorpo primário em câmara úmida *overnight* (18 horas) sob refrigeração (4° C);
9. As lâminas foram submetidas a lavagens com PBS a fim de retirar o excedente de anticorpo do material em 3 banhos de 5 minutos, cada;
10. Em seguida, fez-se a incubação com o anticorpo secundário biotilado (kit LSAB, Dako Cytomation) em câmara úmida a 37°C, por 1 hora;

11. As lâminas foram submetidas a lavagens com PBS em 3 banhos de 5 minutos, cada;
12. Subsequentemente, fez-se a incubação com o complexo streptavidina-peroxidase (kit LSAB, Dako Cytomation) em câmara úmida a 37°C, durante 30 minutos;
13. As lâminas foram submetidas a lavagens com PBS em 3 banhos de 5 minutos, cada;
14. Os anticorpos primários foram detectados utilizando-se o Kit Polyvalent HRP Plus (Spring Bioscience, Pleasanton, CA) e substrato cromogênico diaminobenzidina (DAB Dako Corporation, Carpinteria, CA) e peróxido de hidrogênio (0,1%) em PBS, com imersão das lâminas por 5 minutos;
15. Lavagem em água corrente e água destilada e contra coloração com Hematoxilina de Harris;
16. Lavagem em água corrente e banho em água amoniacal para azular as células: 1 mergulho;
17. Lavagens em água corrente e água destilada seguida de desidratação em banhos de álcoois (5 banhos) e diafanização em banhos de xilol (4 banhos).
18. Montagem com meio de montagem permanente (Entellan, Merck, Alemanha) e lamínula.

Tabela1 – Anticorpos Primários

Anticorpo	Clone	Fabricante	Diluição	Incubação	Recuperação antigênica	Controle Positivo
P16	G175-405	BD Pharmingen San Diego, CA, USA	1:200	18h/4 °C	Citrate pH 6,0	Carcinoma de colo de útero
BUB 3	EPR5319(2)	ABCAM Cambridge, MA, USA	1:500	18h/4 °C	Citrate pH 6,0	Glândula mamária
SOX 4	Policlonal	ABCAM Cambridge, MA, USA	1:800	18h/4 °C	Citrate pH 6,0	Glândula mamária
Ki67	SP6	BIOCARE Concord, CA, USA	1:50	18h/4 °C	Citrate pH 6,0	Tonsila palatina

4.3 AVALIAÇÃO DA EXPRESSÃO DE P16, BUB3, SOX4 E KI67

Após a reação de imunistoquímica, as lâminas histológicas de cada caso foram escaneadas através do digitalizador histológico ScanScope CS (Aperio Solutions ePathology, CA, EUA), em aumento de 40X (resolução: 0,25 μ /pixel), utilizando o ImageScope (programa Aperio Software, CA, EUA). Pelo menos cinco campos foram selecionados aleatoriamente para cada caso, fotografados e salvos como arquivos de imagem TIFF (Figs. 5 e 6).

As células epiteliais positivas e negativas foram contadas utilizando o programa ImageJ (Instituto Nacional de Saúde Mental, Bethesda, MD, EUA) células (Fig. 7) . A avaliação quantitativa foi realizada pela contagem total de 500 células (positivas + negativas) nas camadas basal e suprabasal do epitélio de cada amostra.

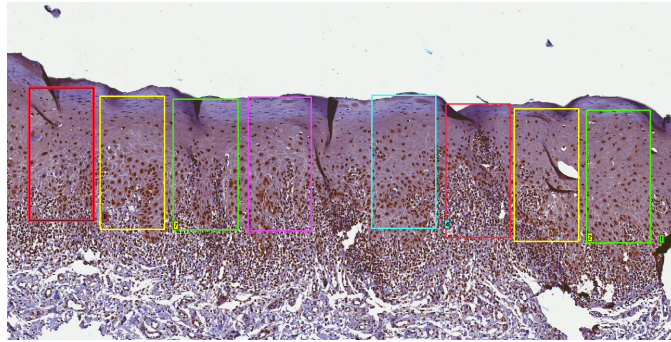


Figura 5 – Corte histológico escaneado, caso LPO 22/BUB3. Campos demarcados para fotografia (retângulos coloridos) – Aumento de 40X.

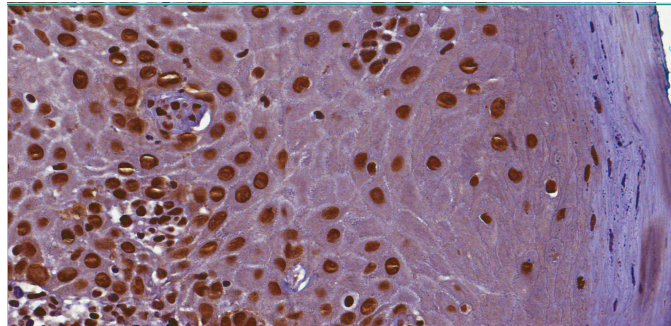


Figura 6 – Fotografia do campo 04, caso LPO 22/BUB3. Área selecionada para contagem de células - Aumento de 400x.

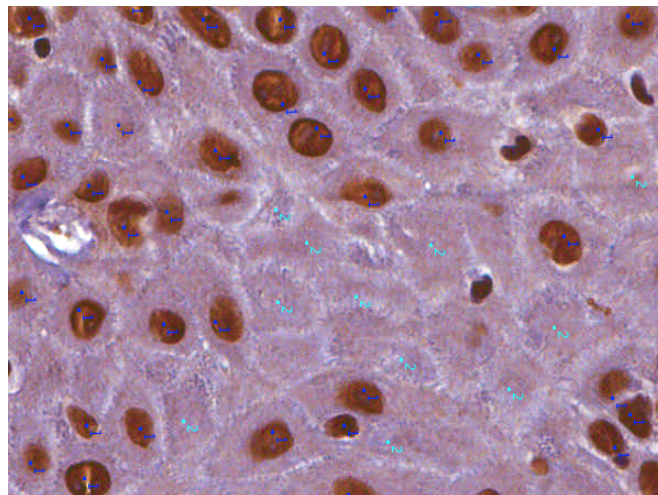


Figura 7 – Tela do programa Image J, área do campo 4, caso LPO 22/BUB3. 1 - células positivas, 2 - células negativas, zoom do programa a partir de aumento de 400X.

Após o procedimento de contagem, o índice de positividade (IP) foi obtido através da percentagem de células positivas para cada marcador e os resultados foram comparados. Para os anticorpos BUB3 e Ki67, as células epiteliais que exibiram coloração nuclear acastanhada foram consideradas como positivas. Para anticorpos os P16 e SOX4, as células que apresentaram coloração acastanhada tanto nuclear, como citoplasmática, foram consideradas positivas.

4.4 - ANÁLISE ESTATÍSTICA

Os dados foram analisados utilizando-se o programa *Statistical Package for the Social Sciences* (SPSS ® versão 20.0 para Windows, SPSS Inc. / IBM Group, Chicago, EUA). Todos os testes foram bicaudais e considerou-se o nível de significância estatística de 5%. O teste de Kolmogorov-Smirnov foi utilizado para verificar a distribuição de frequência das variáveis quantitativas. Teste de Kruskal-Wallis foi aplicado para verificar se houve diferença estatística entre os grupos. Em seguida, quando houve significância estatística, o teste *post hoc* de Dunn foi utilizado para identificar entre quais pares de grupos encontrava-se a diferença. O teste do qui-quadrado foi utilizado para variáveis categóricas. O teste de correlação de Spearman avaliou a expressão das quatro proteínas estudadas.

5 RESULTADOS

Um total de 120 casos, obtidos de blocos de parafina armazenados, foram igualmente distribuídos nos grupos de LPO, LPC, DO e HFO. A média de idade (\pm desvio padrão) geral foi de $49,3 \pm 14,8$ anos, e a proporção de mulheres para homens foi de 1,72. A mucosa jugal foi o local de onde a maioria das biópsias orais (LPO, DO, HFO) foram tomadas 25,6% (23/90). A localização das biópsias na boca não foi esclarecida em 33% dos casos. Quanto às lesões cutâneas (LPC), as biópsias nos membros superiores foram a maioria, correspondendo a 23,3% desse grupo. Maiores informações a respeito dos dados relativos à idade, gênero e localização encontram-se na Tabela 2. A localização das biópsias intraorais pode ser observada no Gráfico 1.

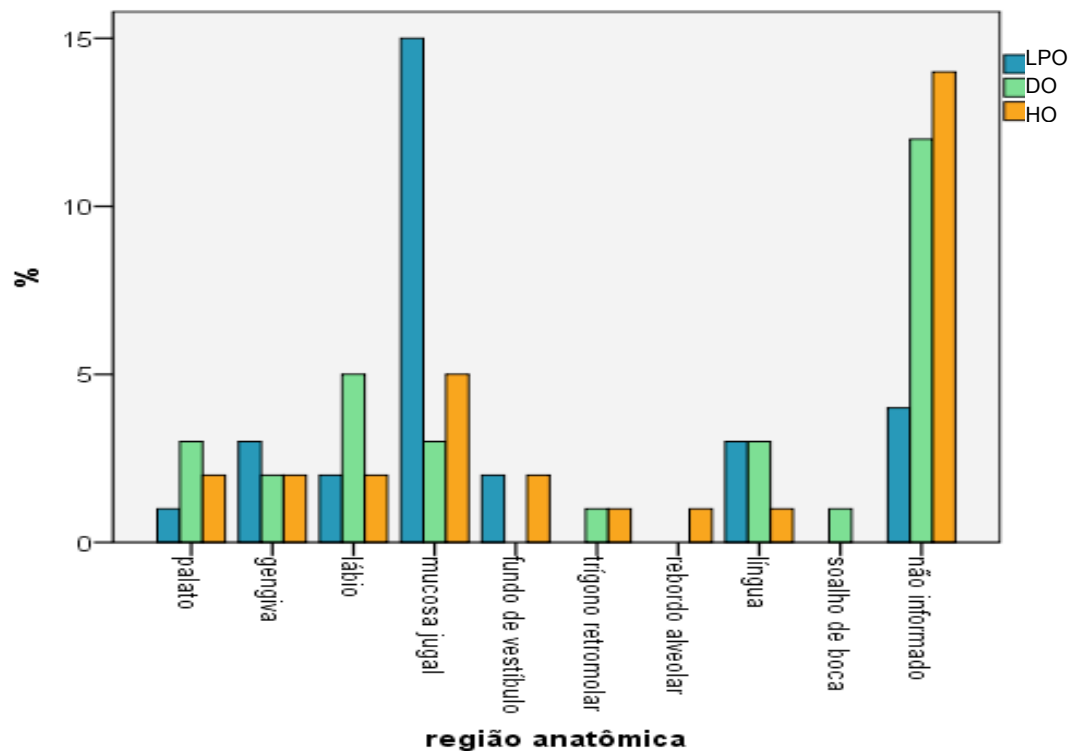
Tabela 2 – Dados Clínicos

	Mucosa da Boca			Pele
	LPO (N=30)	DO (N=30)	HFO (N=30)	LPC (N=30)
Idade	Média 51,8 (95%CI) (46,2 a 57,1)	49,4 (43,2 a 55,6)	49 (43,6 a 54,4)	47,2* (41,9 a 52,4)
Sexo				
Masculino (%)	9 (30)	12 (40)	11 (36,7)	12 (40)**
Feminino (%)	21 (70)	18 (60)	19 (63,7)	18 (60)
Local da Biopsia				
Mucosa jugal (%)	15 (50)	3 (10)	5 (16,7)	Membro sup. (%) 7 (23,3)
Lábios (%)	2 (6,7)	5 (16,7)	2 (6,7)	Tronco (%) 5 (16,3)
Gengiva (%)	3 (10)	2 (6,7)	2 (6,7)	Membro inf. (%) 4 (13,3)
Língua (%)	3 (10)	3 (10)	1 (3,3)	Pescoço (%) 3 (10)
Palato (%)	1 (3,3)	3 (10)	2 (6,7)	Penis (%) 1 (3,3)
Fundo de vestibulo (%)	2 (6,7)	-	2 (6,7)	Face (%) 1 (3,3)
Trígono Retromolar (%)	-	1 (3,3)	1 (3,3)	Cabeça (%) 1 (3,3)
Rebordo Alveolar (%)	-	-	1 (3,3)	Não Informado (%) 8 (26,7)
Soalho Bucal (%)	-	1 (3,3)	-	
Não informado (%)	4 (13,3)	12 (40)	14 (46,7)	
total	30 (100)	30 (100)	30 (100)	total 30 (100)

* p= 0,71 (ANOVA)

** P= 0,83 (Teste Qui Quadrado)

Gráfico 1 – Localização das biópsias da mucosa oral segundo a lesão



Os dados referentes à imunoposição de todas as proteínas estão sintetizados na Tabela 3 e detalhados nos apêndices 1 a 4. As figuras 8 a 11 ilustram algumas reações de imunohistoquímica realizadas na pesquisa em cada grupo da amostra.

Verificou-se que o IP de P16 apresentou diferença significativa entre os grupos estudados (Gráfico 2). O IP mais elevado foi observado no LPC, seguido por LPO, HFO e DO ($p < 0,001$). O teste *post hoc* mostrou que as diferenças estatísticas significativas encontravam-se entre os seguintes grupos: LPO/LPC; LPO/DO; LPC/DO e LPC/HFO. O IP de BUB3 também foi maior no LPC seguido de LPO, HFO e DO (Gráfico 3). Uma diferença estatística limítrofe para expressão de BUB3 foi observada entre os grupos ($p = 0,04$). No entanto, o teste *post hoc* mostrou que a diferença encontrava-se apenas entre LPC e DO ($p = 0,04$).

O maior IP para SOX4 foi encontrado no LPC, seguido por HFO, DO e LPO respectivamente (Gráfico 4). Uma diferença estatística significativa foi encontrada na expressão SOX4 entre os grupos ($p < 0,001$). Após o teste *post hoc*, notou-se que a diferença encontrava-se apenas entre LPO/LPC ($p < 0,001$) e LPC/DO ($p = 0,001$). O IP do Ki67 foi maior na DO, seguido de LPO, LPC e HFO (Gráfico 5). Uma diferença significativa entre os grupos foi observada na expressão de Ki67 ($p < 0,001$). O teste *post hoc* mostrou que a diferença foi percebida entre LPO/HFO, LPC/DO e DO/HFO.

Gráfico 2 – Imunoexpressão de P16

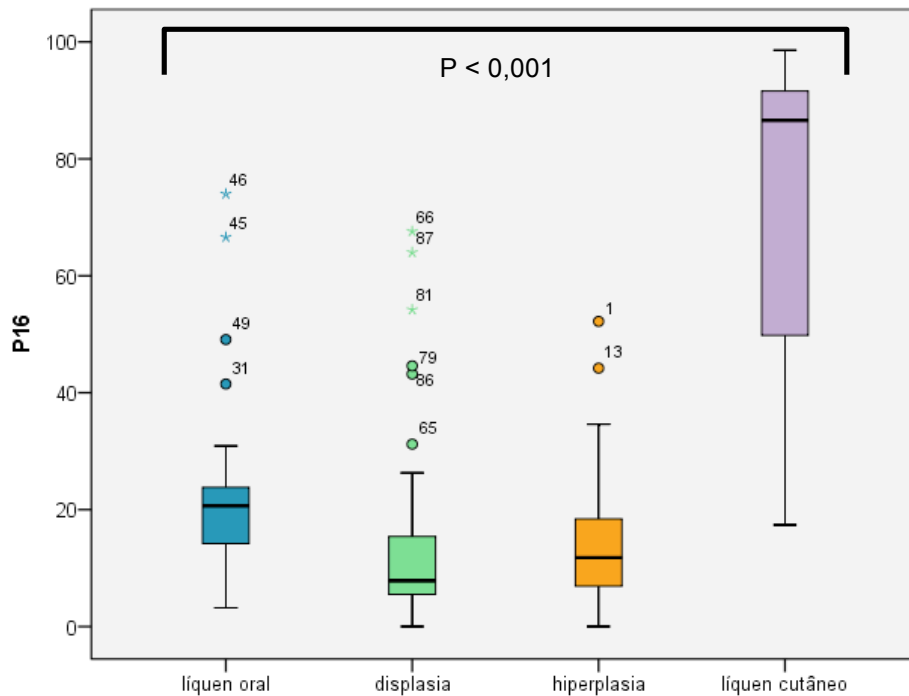


Gráfico 3 - Imunoexpressão de BUB3

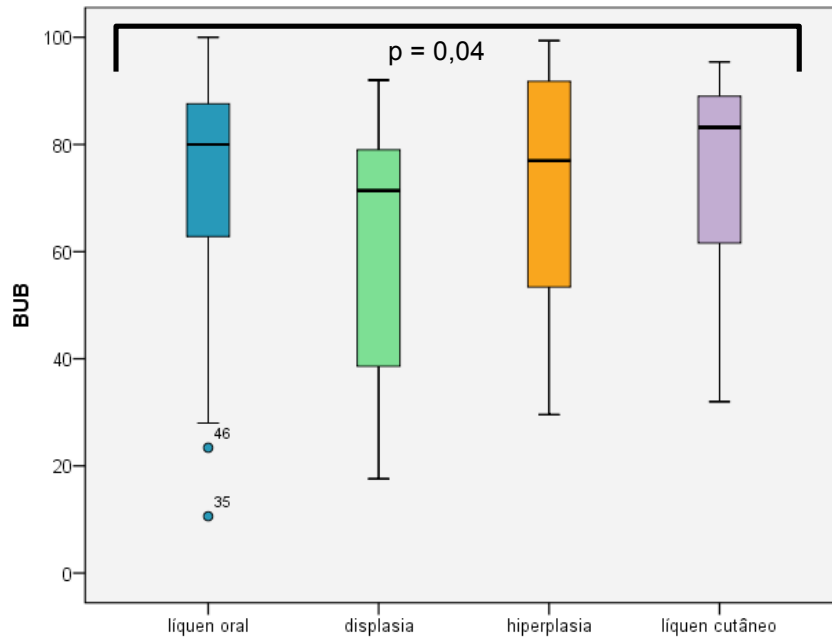


Gráfico 4 – Imunoexpressão de SOX4

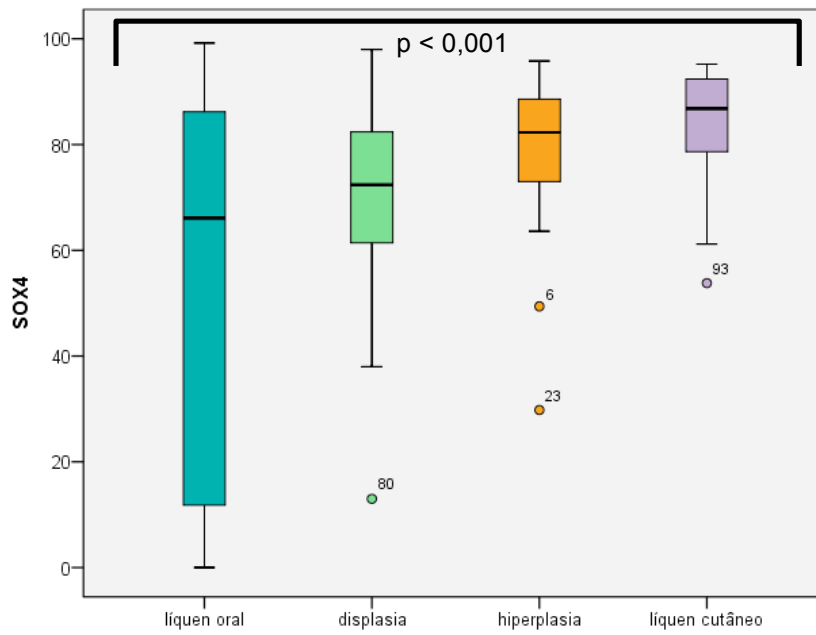
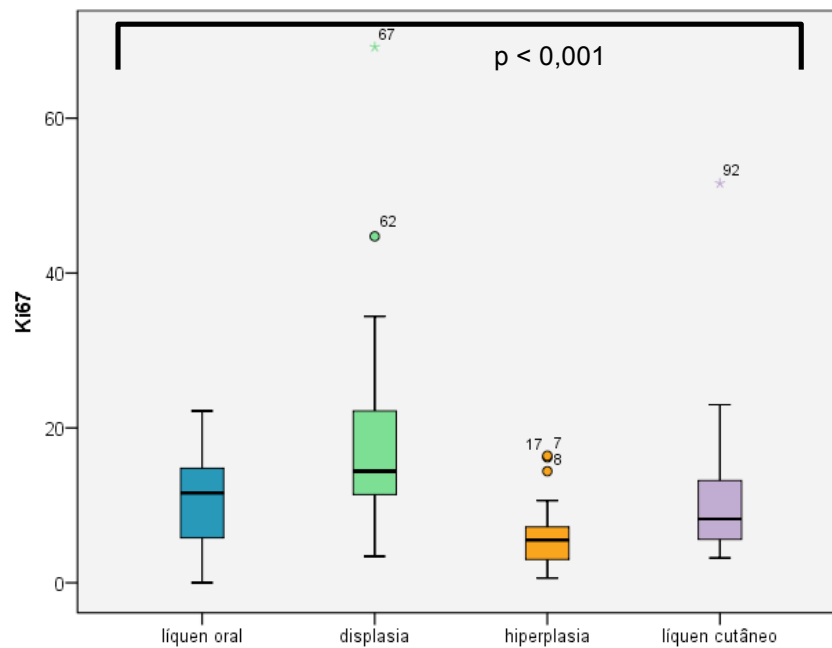


Gráfico 5 – Imunoexpressão de Ki67



A respeito do infiltrado inflamatório próximo ao epitélio, esse estava ausente em 9, leve em 18 e moderado em 3 dos casos de HFO. A inflamação estava ausente, leve e moderada em 4, 18 e 8 dos casos de DO, respectivamente. Não foi observada inflamação intensa em nenhum caso de HFO ou DO. O IP de P16 foi menor nas lesões com inflamação moderada, seguido por lesões com infiltração leve e ausente. No entanto, a diferença não foi estatisticamente significativa ($p = 0,1$). Já a expressão de BUB3 apresentou maior expressão de acordo com o grau de inflamação, mas também não foi encontrada diferença estatisticamente significativa nesses casos ($p = 0,1$).

A expressão de Ki67 variou de forma semelhante à de BUB3, de acordo com a presença/intensidade de inflamação. Mais uma vez não foi observada diferença significativa ($p = 0,47$). Por outro lado, a expressão de SOX4 foi estatisticamente

diferente de acordo com o grau de inflamação ($p = 0,039$). Essa diferença, no entanto, foi observada apenas entre DO com inflamação moderada e DO sem inflamação ($p = 0,043$).

Tabela 3 - Expressão de P16, BUB3, SOX4 e Ki67 no líquen plano oral (LPO), líquen plano cutâneo (LPC), displasia oral (DO) e hiperplasia oral (HFO).

	LPO [†]	LPC [†]	DO [†]	HFO [†]	Valor de p *	Valor de p **
P16	20,65 (14,02 – 23,95)	86,59 (49,80 – 91,80)	7,85 (5,22 – 18,12)	11,8 (6,82 – 18,5)	<	0,002 ^b < ^{a,d,e}
BUB3	80 (60,15 – 88,3)	83,20 (60,95 – 89,4)	71,4 (38,1 – 79,75)	77 (53,1 – 91,9)	0,04	0,04 ^d
SOX4	66,1 (11,2 – 86,2)	86,8 (78,65 – 92,4)	72,4 (61,05 – 82,55)	82,3 (71,95 – 88,65)	<	< ^a 0,001 ^d
Ki67	11,6 (5,6 – 15,15)	8,24 (5,40 – 13,45)	14,4 (11,25 – 22,80)	5,5 (3,00 – 7,45)	<	0,005 ^c < ^d 0,012 ^f

[†]Dados apresentados em índice de positividade (percentis 25 e 75)

^a LPO X LPC, ^b LPO X DO, ^c LPO X HFO, ^d LPC X DO, ^e LPC X HFO, ^f DO X HFO

* Teste de Kruskal-Wallis

** Teste *post hoc* de Dunn

Dentre as formas de LPO, foram encontrados os seguintes casos: 15 RET, 6 ERT e 5 ERO. Em quatro casos não foi possível identificar a forma clínica com clareza. Não houve diferença estatística na expressão imunoistoquímica das proteínas estudadas entre os subtipos de LPO.

No grupo de DO, 27 lesões mostraram displasia leve, enquanto apenas 3 apresentaram displasia moderada. Não foram encontrados casos de displasia severa. Não houve diferença estatística na expressão de P16, BUB3, SOX4 ou Ki67, de acordo com o grau de displasia epitelial.

No grupo de LPO, foi observada uma correlação positiva entre a expressão de SOX4 e BUB3 ($r = 0,492$; $p = 0,006$). Nos casos LPC, foi encontrada correlação

positiva moderada na expressão dos seguintes anticorpos: P16 e BUB3 ($r = 0,413$; $p = 0,023$), P16 e SOX4 ($r = 0,369$; $p = 0,045$), BUB e Ki67 ($r = 0,395$; $p = 0,031$) e BUB3 e SOX4 ($r = 0,414$; $p = 0,023$). Do mesmo modo, uma correlação positiva moderada também foi observada entre a expressão de BUB3 e Ki67 nos casos de DO ($r = 0,492$; $p = 0,006$). No entanto, foi encontrada correlação negativa moderada entre os mesmos anticorpos no grupo de HFO ($r = - 0,384$; $p = 0,036$). Além disso, esse grupo também mostrou uma correlação positiva moderada entre P16 e BUB3 ($r = 0,369$; $p = 0,45$). Nenhuma outra correlação foi considerada significativa entre os quatro grupos.

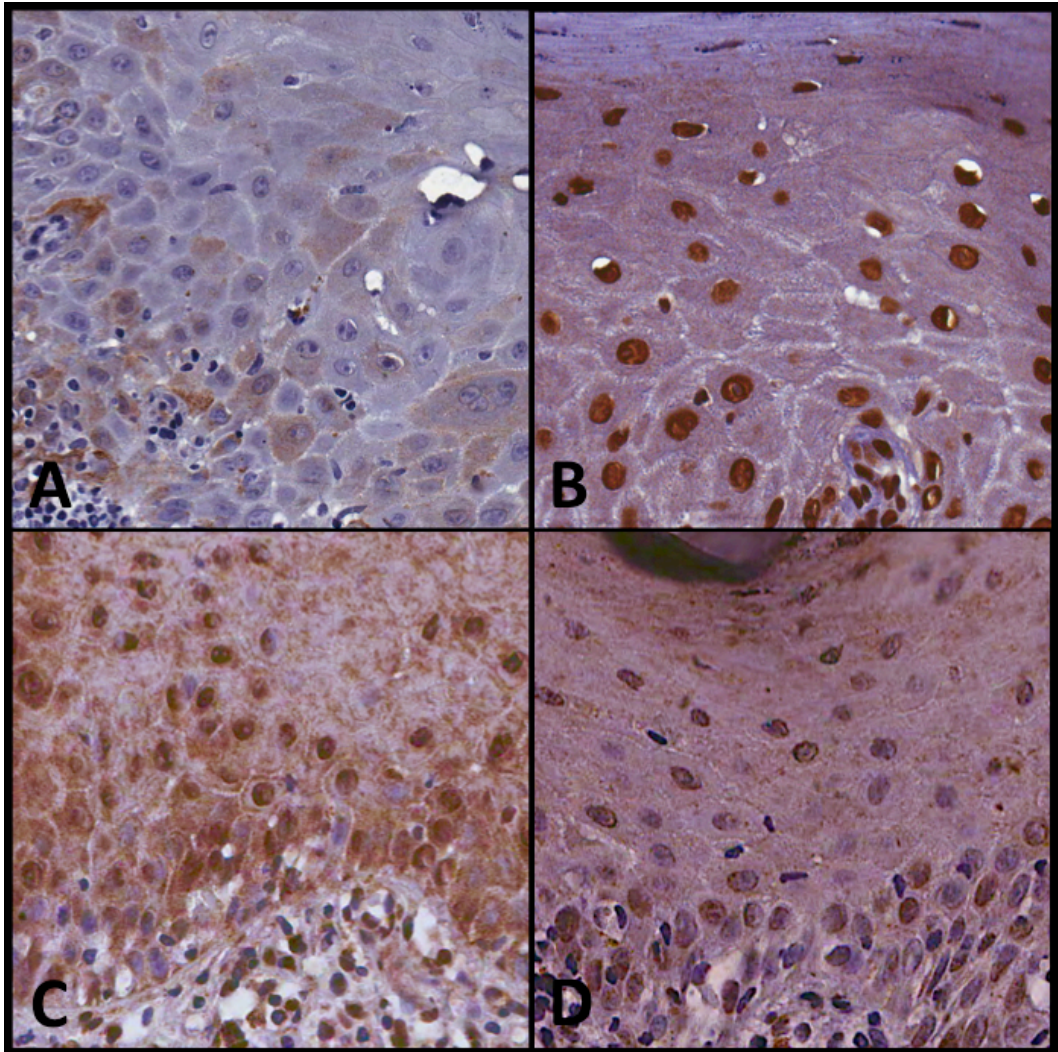


Figura 8 - Expressão de P16, BUB3, SOX4 e Ki67 em LPO, caso 22. A) P16 - imunomarcacão citoplasmática fraca; B) BUB3 - imunomarcacão nuclear forte; C) SOX4 - imunomarcacão moderada nuclear e citoplasmática; D) Ki67 - imunomarcacão nuclear fraca.

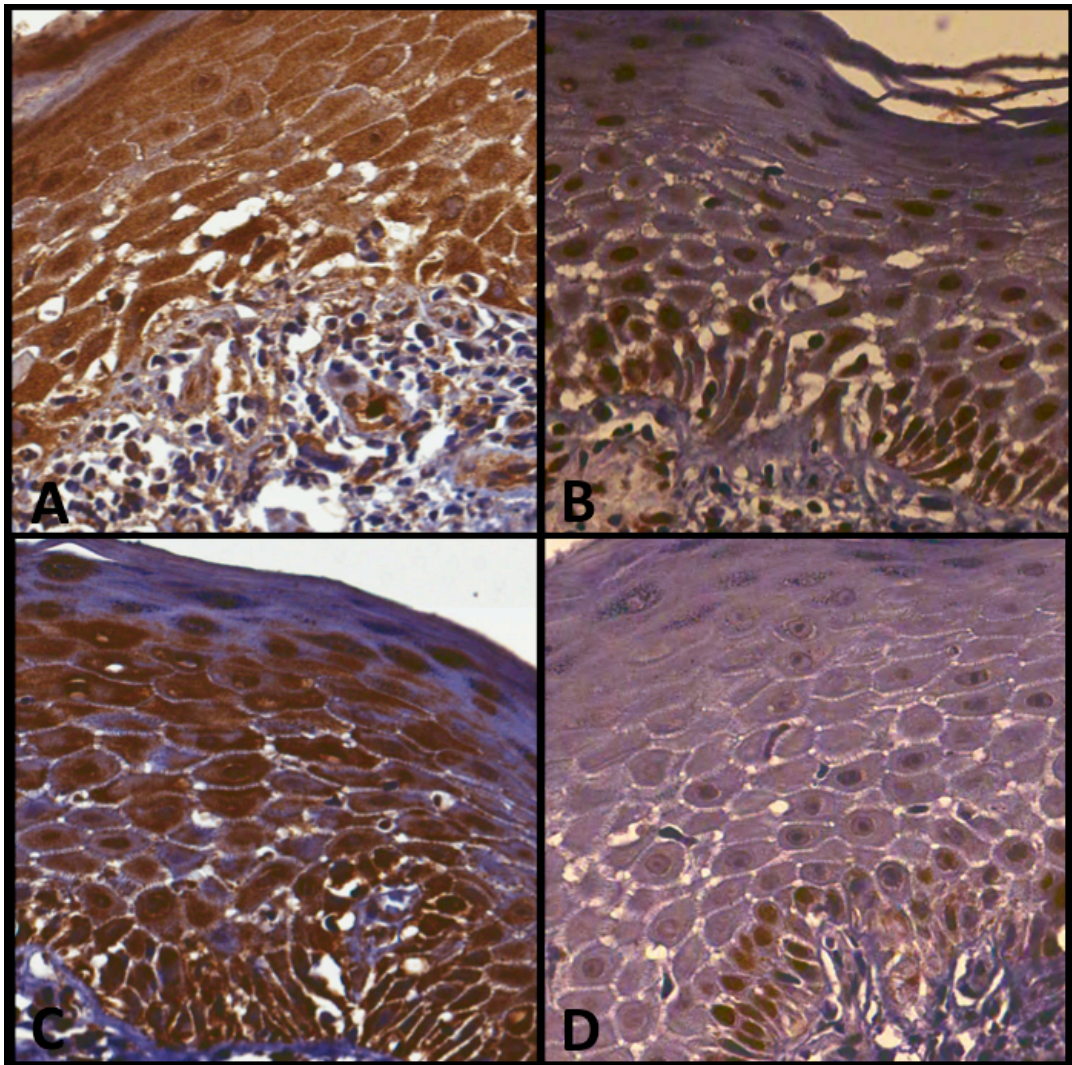


Figura 9 - Expressão de P16, BUB3, SOX4 e Ki67 em LPC, caso 12. A) P16 - imunomarcção nuclear e citoplasmática forte; B) BUB3 - imunomarcção nuclear forte; C) SOX4 - imunomarcção nuclear e citoplasmática forte; D) Ki67 - imunomarcção nuclear fraca na camada basal.

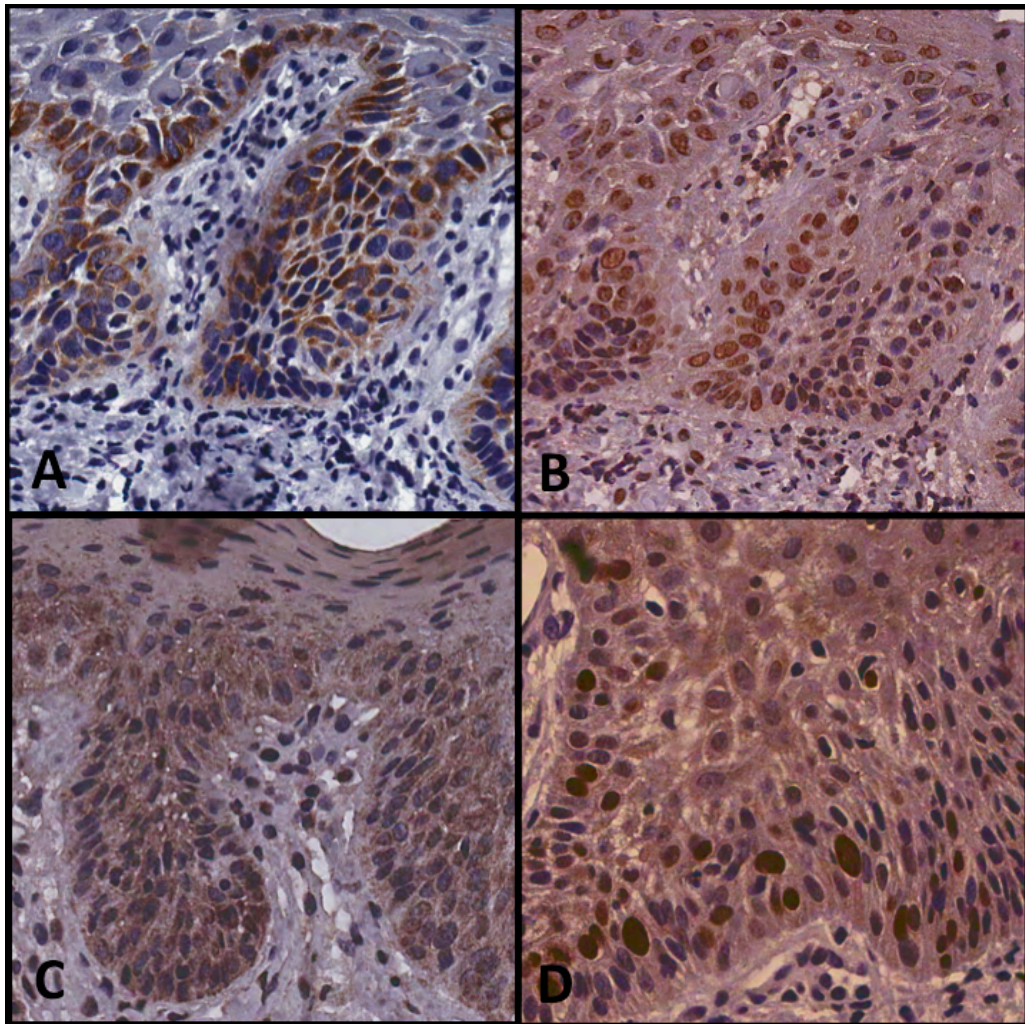


Figura 10 - Expressão de P16, BUB3, SOX4 e Ki67 em DO, caso 29. A) P16 - imunomarcacão nuclear e citoplasmática forte na camada basal; B) BUB3 - imunomarcacão nuclear forte; C) SOX4 - imunomarcacão nuclear e citoplasmática moderada; D) Ki67 - imunomarcacão nuclear forte na camada basal.

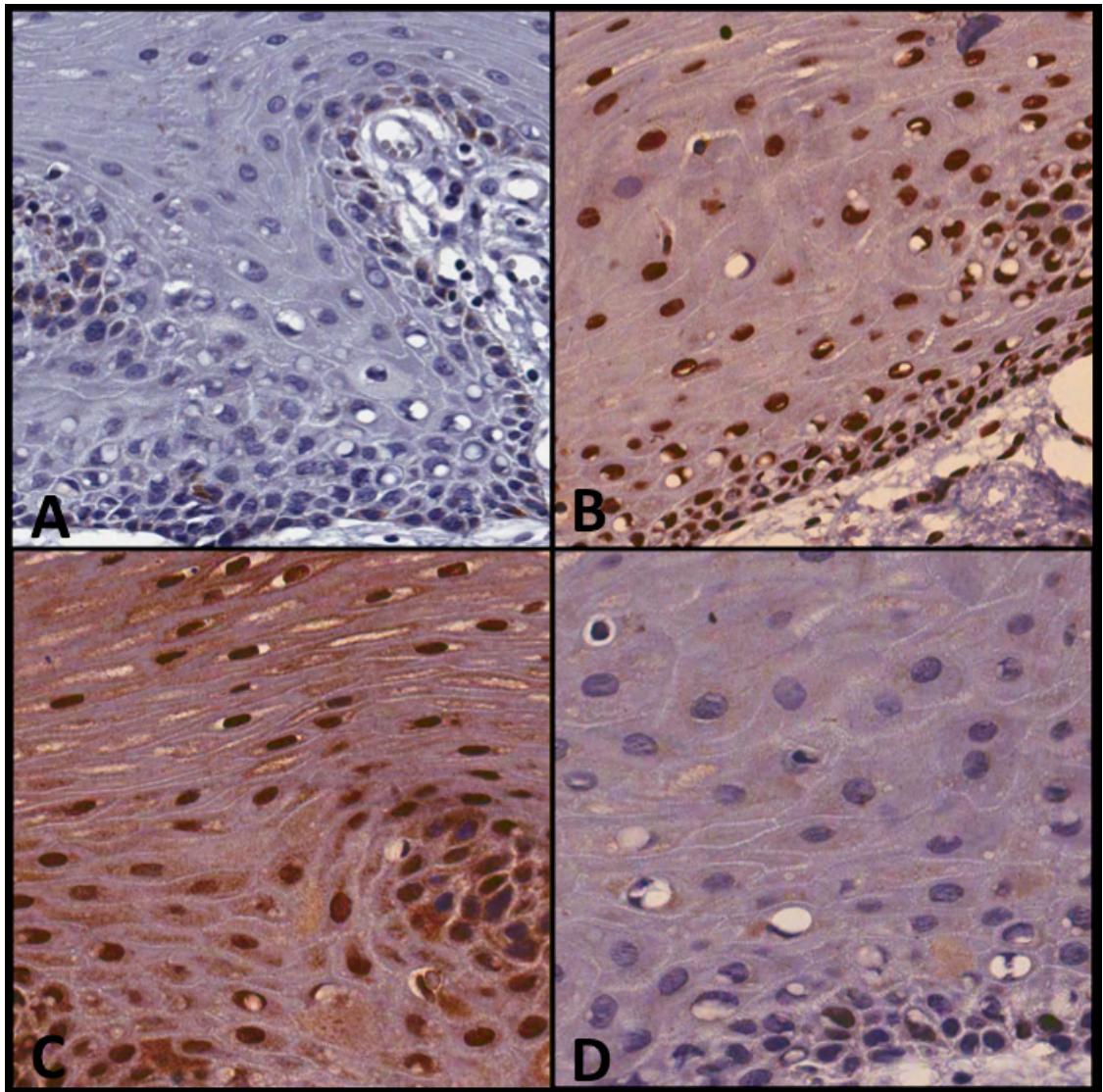


Figura 11 - Expressão de P16, BUB3, SOX4 e Ki67 em HFO, caso 23. A) P16 – imunomarcção citoplasmática incipiente; B) BUB3 - imunomarcção nuclear forte; C) SOX4 - imunomarcção nuclear e citoplasmática forte; D) Ki67 - imunomarcção nuclear fraca.

6 DISCUSSÃO

O presente trabalho foi desenvolvido com o objetivo principal de verificar se existe diferença na imunoexpressão de P16, BUB3, SOX4 e Ki67 entre LPO, LPC, HFO e DO. Os objetivos secundários foram avaliar se existe variação na imunoexpressão das mesmas proteínas, de acordo com os tipos de líquen ou a presença de inflamação e identificar possíveis marcadores biológicos.

A média de idade encontrada no grupo de LPO foi 51,8 anos. Os casos envolveram em sua maioria as mulheres (70%). Esses dados estão de acordo com aquilo que tem sido relatado na maioria das séries publicadas na literatura [41, 10, 13]. Deve ser mencionado ainda, que não houve diferença estatística em relação ao gênero e à idade dentre os grupos de LPO, LPC, HFO e DO (Tabela 2). Esse fato contribui para a validação dos resultados encontrados no presente trabalho.

O Ki67 é um anticorpo largamente utilizado em pesquisas relacionadas com proliferação celular, lesões precursoras e câncer, inclusive bucal [19, 5, 20, 21]. A expressão de Ki67 nos grupos estudados se comportou como o esperado. O grupo de DO, que possui o maior risco presumido de transformação maligna foi o que apresentou o maior IP de Ki67, seguido pelo grupo de LPO, que presumivelmente apresentaria um risco intermediário de malignização. Além do mais, não houve diferença estatística entre esses dois grupos.

Um aspecto interessante é que 8 dentre 30 casos de LPO da nossa série apresentaram IP acima da mediana encontrada para expressão de Ki67 (IP = 14,4) no grupo de DO. Isso pode sugerir que apenas alguns casos de LPO apresentem potencial de transformação maligna, não a maioria. Considerando que as amostras para pesquisa foram obtidas dos arquivos do laboratório, infelizmente não foi possível obter dados adicionais, tais como tabagismo, etilismo, história familiar de câncer, tempo de doença, dentre outros, que pudessem apontar possíveis

explicações para maior índice de proliferação celular nesses casos específicos, diferenciando-os dos demais. A expressão de Ki67 nos grupos de LPC e HFO foi bem menor e estatisticamente significativa quando comparada tanto com LPO quanto com DO. Vale notar que o IP de Ki67 no LPO foi mais que o dobro do encontrado no grupo de HFO.

A expressão de Ki67 encontrada em nosso grupo de LPO (IP = 11,6) foi semelhante ao que foi retratado em outros estudos (13 e 13,8%) [22, 25]. Além disso, MONTEBUGNOLI *et al* (2006) encontraram uma expressão ainda maior de Ki67 em sua série de LPO (>20%) [23]. Esses achados, em conjunto, parecem corroborar que o LPO apresenta um potencial de transformação maligna na boca. A expressão de Ki67 no presente trabalho pode também ser considerada como uma referência confiável para comparação com os anticorpos P16, BUB3 e SOX4, com a intenção de avaliar a possibilidade de utilizá-los como biomarcadores.

O P16 pertence à família de proteínas INK4a, que exerce papel importante no ciclo celular. P16 leva à inibição da fosforilação do Rb, interrompendo o ciclo celular [49, 50]. A superexpressão de P16 foi detectada em alguns casos de CCEO de forma semelhante ao que acontece na NIC e no câncer de colo uterino [57, 53, 50].

O aumento da expressão de P16 em NIC está bem estabelecido em associação com o HPV, que por sua vez, inibe a atividade da proteína do Rb devido a um processo de regulação por *feedback* negativo, o que leva ao aumento (ou acúmulo) de P16. Sua expressão já foi correlacionada com o grau de displasia em NIC e vem sendo utilizada com segurança como biomarcador para câncer de colo uterino [26, 27]. No entanto, o papel do P16 nas lesões precursoras de CCEO continua controverso.

A expressão de P16 no LPO foi previamente comparada à mucosa oral normal, à leucoplasias sem displasia (com ou sem inflamação), ao CCEO e a algumas lesões inflamatórias em três estudos recentes [28-30]. Em todos houve casos positivos para P16 no LPO, enquanto a mucosa oral normal e as lesões sem inflamação foram negativas, incluindo CCEO. Por outro lado, no estudo de MONTEBUGNOLI *et al.* (2011), as lesões consideradas inflamatórias e as leucoplasias em que havia inflamação apresentaram expressão de P16 semelhante ao LPO [28]. Os autores sugeriram então que a inflamação pode ser a razão da superexpressão de P16. Entretanto, vale ressaltar que os grupos pesquisados nesses estudos não eram homogêneos.

No presente trabalho, os critérios de seleção dos grupos foram bem definidos. As lesões com baixo risco de transformação maligna (HFO) foram separadas das lesões displásicas do epitélio (DO), com conseqüente potencial de malignidade, como descrito anteriormente. Os resultados aqui encontrados mostraram uma expressão intensa de P16 no LPC, intermediária no LPO, seguida pela HFO, e a menor expressão de P16 ocorreu no grupo de DO.

A expressão de P16 nos trabalhos anteriores apresentou diferenças. POOMSAWAT *et al* (2011) consideraram 15 dentre 23 casos de LPO positivos (65,2%), MONTEBUGNOLI, VENTURI *et al* (2011) relataram 36 de 56 (64%) casos positivos, enquanto SALEHINEJAD *et al* (2014) encontraram apenas 4 de 15 (26,7%) casos [28-30]. Entretanto, o critério de positividade utilizado em cada estudo foi a expressão de P16 > 1%, > 5% e > 70%, respectivamente. Em nossa amostra, 29 dentre 30 casos de LPO apresentaram expressão de P16 > 5%, enquanto um único caso apresentou expressão de P16 maior que 70%.

As discrepâncias nos resultados entre os estudos também podem estar relacionadas com os diferentes clones dos anticorpos utilizados em cada pesquisa. Isso, além das outras diferenças metodológicas já mencionadas, torna a comparação entre resultados seriamente prejudicada. Por esta razão, optou-se no presente estudo por simplesmente expressar dados em IP, o que corresponde à porcentagem de células com resultados positivos. Consideramos nosso método mais fácil de ser reproduzido, além de permitir uma melhor comparação de resultados no futuro.

Dentre as formas de LPO, a ERT e especialmente a ERO foram consideradas com maiores chances de desenvolvimento CCEO em diferentes trabalhos [16, 10, 13]. No entanto, semelhante ao observado em um estudo anterior, não houve diferença significativa entre os subtipos de LPO quanto à expressão de P16 em nosso estudo [28]. O mesmo ocorreu com as demais proteínas estudadas no presente trabalho.

Com exceção de alguns casos não bem especificados, não existem relatos sobre a expressão de P16 no epitélio bucal em hiperplasias fibrosas [79]. No presente estudo, a IP P16 foi de 11,8 em 30 HFO. A expressão de P16 em epitélio de lesões semelhantes deve ser explorada em pesquisas futuras e poderá ser comparada aos dados aqui relatados. A expressão P16 em LPC foi extremamente elevada (IP = 86,59). Uma diferença em relação ao LPO era esperada, uma vez que o comportamento clínico e o potencial de malignidade são diferentes entre eles. Ainda assim, a expressão P16 no LPC foi surpreendentemente alta. Como esse é um estudo pioneiro na avaliação de P16 em LPC, não existem dados para comparação que permitam compreender melhor a alta expressão de P16 nessas lesões.

Existe grande controvérsia quanto à imunoexpressão de P16 em DO. Alguns trabalhos mostram uma relação direta entre a expressão elevada de P16 e o grau de displasia epitelial [61, 62]. No entanto, outros trabalhos sugerem que a expressão reduzida de P16 é que estaria associada à displasia epitelial na mucosa oral. [63, 64].

Em nosso estudo, a expressão de P16 teve diferença estatisticamente significativa entre os grupos, sendo que a DO apresentou o menor IP para P16. Ainda assim, não poderíamos afirmar que a expressão de P16 é um marcador confiável de transformação maligna das lesões da mucosa oral, considerando que HFO mostrou expressão mais intensa do que DO, mas menor expressão do que LPO. Estes resultados estão de acordo com os dados de outros estudos que desencorajam o uso de P16 com essa finalidade [65, 51, 59, 30].

A presença e o grau de inflamação foram avaliados nas amostras HFO e DO, no entanto, não foi observada influência da inflamação na expressão de P16 em nosso estudo, como foi sugerido por MONTEBUGNOLI, VENTURI *et al* [28]. O aumento da expressão de P16 em casos de líquen pode estar associado com alterações no controle do ciclo celular e apoptose, previamente observadas nestas lesões [48]. A possível influência do HPV sobre a expressão de P16, em algumas das lesões aqui estudadas, deve ser investigada em pesquisas futuras.

O BUB3 é membro do complexo de proteínas do *checkpoint* mitótico, essencial para estabilidade genômica, que está associado à correta segregação cromossômica durante a mitose. O *checkpoint* mitótico controla a transição da metáfase para anáfase durante a divisão celular, evitando a segregação cromossômica até que a ligação bipolar dos cromossomos aos microtúbulos do fuso celular ocorra adequadamente [70, 67, 31, 69, 68].

O BUB3 permite a localização de BUB1 no cinetócoro durante a mitose. Isto é necessário para ativar *checkpoint* mitótico [90]. Mutações específicas no gene BUB3 podem desestabilizar a interface BUB3-BUB1, desativando o *checkpoint* e conseqüentemente o controle sobre o fuso, levando a falhas na segregação cromossômica, fenótipos alterados nas células filhas e ao desenvolvimento de câncer [69].

Alguns estudos têm relacionado a expressão desregulada de BUB3 a diferentes tipos de câncer [71, 91, 68]. A baixa expressão do gene BUB3 pode levar à segregação cromossômica anormal e permitir que mutações oncogênicas específicas apareçam [68]. Por outro lado, a superexpressão do gene BUB3 também foi correlacionada à alta expressão de Ki67 em câncer gástrico [71].

O presente trabalho é pioneiro na avaliação da expressão imunoistoquímica de BUB3 em LPO, LPC, HFO e DO. Cabe destacar que não houve diferença significativa quanto à expressão de BUB3, exceto entre LPC e DO. Apesar da DO apresentar o menor IP, os dados não são suficientes para sugerirem com certeza um papel protetor para BUB3.

A maior parte das pesquisas publicadas envolvendo BUB3 utilizam diversas técnicas de biologia molecular [92, 68, 31, 93, 67, 90, 70, 94, 95]. Os resultados aqui encontrados utilizando-se imunoistoquímica, uma técnica clinicamente aplicável com menor custo, poderão ser utilizados como referência em futuros trabalhos. Mais estudos devem ser realizados para melhor elucidar o possível uso de BUB3 como um marcador biológico para o CCEO em diferentes lesões orais. A inclusão de displasia de alto grau e CCEO deve ser considerada para atingir este propósito.

Assim como BUB3, nenhum estudo avaliou a expressão de SOX4 em LPO até o momento. SOX4 é um gene da família SOX (*sex-determining region Y-related*

high mobility group box) que parece estar envolvido em uma variedade de processos fisiológicos tais como desenvolvimento cardíaco e do sistema nervoso, além de diferenciação de osteoblastos e de timócitos. Diferentes tipos de câncer também têm sido associados à expressão desregulada de SOX4. [79, 80, 75, 77, 96, 73]

O SOX4 interage e estabiliza o P53, *in vitro* e *in vivo*. Dessa forma, SOX4 interrompe o ciclo celular e promove apoptose, funcionando como um supressor do crescimento tumoral [32]. A atividade supressiva foi observada em tumores de bexiga e melanomas, onde o prognóstico foi melhor quanto maior a expressão SOX4 nos casos estudados [80, 73, 77]. No entanto, SOX4 também foi relatado como um oncogene em células de neoplasia de próstata em humanos. Nesses casos, a expressão imunohistoquímica de SOX4 foi positivamente correlacionada ao grau de neoplasia prostática [78].

WATANABE *et al* (2013) estudaram 50 casos de CCEO e encontraram correlação significativa entre a expressão de SOX4 e o estadiamento do tumor [97]. A expressão de SOX4 nos CCEO pouco diferenciados foi maior do que a observada nos tumores bem diferenciados. Além disso, foi encontrada expressão elevada de SOX4 nas metástases para linfonodos. Os autores sugeriram que SOX4 pode apresentar algum papel na diferenciação do câncer de boca.

No presente estudo, a expressão de SOX4 foi elevada em todos os grupos. Os valores de IP foram mais baixos na DO e no LPO, sem diferença estatística entre esses dois grupos. Isso pode indicar um efeito protetor de SOX4 em lesões da mucosa bucal e no LPC, semelhante ao sugerido por JAFARNEJAD *et al* (2010) em melanomas [77]. Novas pesquisas utilizando SOX4, com maior número de casos comparando LPO, DO e CCEO, precisam ser realizadas para testar essa hipótese.

No grupos de LPO e LPC foi observada correlação positiva entre a expressão de SOX4 e BUB3, o que pode sugerir que ambos apresentem comportamento semelhante, reforçando a tendência de funcionarem como fatores de proteção para CCEO. Por outro lado, a expressão de BUB3 e Ki67 apresentou correlação positiva moderada em DO e negativa em HFO.

Os resultados aqui apresentados reforçam a hipótese de que o LPO tem um potencial intermediário de transformação maligna quando comparado a DO e HFO. A expressão de P16 observada no presente estudo contribui para a hipótese de que tal marcador não se comporta de forma confiável para o câncer de boca, diferente do que ocorre no colo uterino. Os resultados também sugerem que a inflamação adjacente ao epitélio não influencia a expressão de P16. A expressão de BUB3 e SOX4 observada aqui levanta a hipótese de que ambos possam atuar como fatores protetores em relação ao câncer de boca, apontando a necessidade de mais estudos com o objetivo de investigar essa possibilidade.

7 - CONCLUSÃO

7 – Conclusão

Foram encontradas diferenças estatisticamente significativas na imunoexpressão de P16 entre alguns dos grupos estudados, porém, tais achados não indicam que a proteína P16 se comporte como marcador confiável.

Não foi encontrada diferença na imunoexpressão de P16, BUB3, SOX4 e Ki67 entre os tipos de LPO. Não houve diferença significativa na imunoexpressão de P16 em HFO e DO na presença ou ausência de inflamação.

Uma diferença significativa foi observada na expressão de Ki67 entre os grupos, exceto entre LPO e DO, sugerindo um potencial parecido de malignização entre esses dois grupos.

Foi encontrada diferença estatística para expressão de BUB3 e de SOX4 apenas entre poucos grupos. Tanto SOX4 como BUB3 apresentaram expressão que pode sugerir um papel como fator de proteção nas lesões estudadas.

8 – REFERÊNCIAS

8 – REFERÊNCIAS

1. J. Ferlay, H. R. Shin, F. Bray, D. Forman, C. Mathers and D. M. Parkin. Estimates of worldwide burden of cancer in 2008: GLOBOCAN 2008. *Int J Cancer*. 2010;127(12):2893-917. doi:10.1002/ijc.25516.
2. C. G. Cowan, T. A. Gregg, S. S. Napier, S. M. McKenna and F. Kee. Potentially malignant oral lesions in northern Ireland: a 20-year population-based perspective of malignant transformation. *Oral Dis*. 2001;7(1):18-24.
3. A. K. R. El Naggari, P. A. Proliferative verrucous leukoplakia and precancerous conditions. *Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours.*, vol 9. Lyon: IARC Press; 2005. p. 180-1.
4. N. P. Gale, B Z; Sidransky, D; El Naggari, A; Westra, W; Califano, J; Johnson, N; MacDonald, D G. . Epithelial precursor lesions. *Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours. World Health Organization Classification of Tumours.* , vol 9. Lyon: IARC; 2005. p. 177-9.
5. M. W. Lingen, A. Pinto, R. A. Mendes, R. Franchini, R. Czerninski, W. M. Tilakaratne et al. Genetics/epigenetics of oral premalignancy: current status and future research. *Oral Dis*. 2011;17 Suppl 1:7-22. doi:10.1111/j.1601-0825.2011.01789.x.
6. D. Eisen. The evaluation of cutaneous, genital, scalp, nail, esophageal, and ocular involvement in patients with oral lichen planus. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 1999;88(4):431-6.
7. P. Omal, V. Jacob, A. Prathap and N. G. Thomas. Prevalence of oral, skin, and oral and skin lesions of lichen planus in patients visiting a dental school in southern India. *Indian J Dermatol*. 2012;57(2):107-9. doi:10.4103/0019-5154.94276.
8. B. J. Schlosser. Lichen planus and lichenoid reactions of the oral mucosa. *Dermatol Ther*. 2010;23(3):251-67. doi:10.1111/j.1529-8019.2010.01322.x.
9. E. Eisenberg. Oral lichen planus: a benign lesion. *J Oral Maxillofac Surg*. 2000;58(11):1278-85. doi:10.1053/joms.2000.16629.
10. D. Eisen. The clinical features, malignant potential, and systemic associations of oral lichen planus: a study of 723 patients. *J Am Acad Dermatol*. 2002;46(2):207-14.
11. E. H. van der Meij, K. P. Schepman and I. van der Waal. The possible premalignant character of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: a prospective study. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2003;96(2):164-71. doi:10.1016/S1079210403003056.
12. G. Lodi, C. Scully, M. Carrozzo, M. Griffiths, P. B. Sugerman and K. Thongprasom. Current controversies in oral lichen planus: report of an international consensus meeting. Part 2. Clinical management and malignant transformation. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2005;100(2):164-78. doi:10.1016/j.tripleo.2004.06.076.
13. J. L. Xue, M. W. Fan, S. Z. Wang, X. M. Chen, Y. Li and L. Wang. A clinical study of 674 patients with oral lichen planus in China. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 2005;34(8):467-72. doi:10.1111/j.1600-0714.2005.00341.x.
14. E. H. van der Meij, H. Mast and I. van der Waal. 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. doi:10.1016/j.oraloncology.2006.09.006.
15. B. T. Accurso, B. M. Warner, T. J. Knobloch, C. M. Weghorst, B. S. Shumway, C. M. Allen et al. Allelic imbalance in oral lichen planus and assessment of its classification as a premalignant condition. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics.* 2011;112(3):359-66. doi:10.1016/j.tripleo.2011.03.042.
16. M. Carbone, P. G. Arduino, M. Carrozzo, S. Gandolfo, M. R. Argiolas, G. Bertolusso et al. Course of oral lichen planus: a retrospective study of 808 northern Italian patients. *Oral Dis.* 2009;15(3):235-43. doi:10.1111/j.1601-0825.2009.01516.x.
17. B. Sigurgeirsson and B. Lindelof. Lichen planus and malignancy. An epidemiologic study of 2071 patients and a review of the literature. *Arch Dermatol.* 1991;127(11):1684-8.
18. B. Manz, U. Paasch and M. Sticherling. Squamous cell carcinoma as a complication of long-standing hypertrophic lichen planus. *Int J Dermatol.* 2005;44(9):773-4. doi:10.1111/j.1365-4632.2004.02202.x.
19. R. T. Allison and T. Best. p53, PCNA and Ki-67 expression in oral squamous cell carcinomas: the vagaries of fixation and microwave enhancement of immunocytochemistry. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology.* 1998;27(9):434-40.
20. C. Perisanidis, B. Perisanidis, F. Wrba, A. Brandstetter, S. El Gazzar, N. Papadogeorgakis et al. Evaluation of immunohistochemical expression of p53, p21, p27, cyclin D1, and Ki67 in oral and oropharyngeal squamous cell carcinoma. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology.* 2012;41(1):40-6. doi:10.1111/j.1600-0714.2011.01071.x.
21. G. Pitiyage, W. M. Tilakaratne, M. Tavassoli and S. Warnakulasuriya. Molecular markers in oral epithelial dysplasia: review. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology.* 2009;38(10):737-52. doi:10.1111/j.1600-0714.2009.00804.x.
22. R. R. Acay, C. R. Felizzola, N. de Araujo and S. O. de Sousa. Evaluation of proliferative potential in oral lichen planus and oral lichenoid lesions using immunohistochemical expression of p53 and Ki67. *Oral Oncol.* 2006;42(5):475-80. doi:10.1016/j.oraloncology.2005.09.012.
23. L. Montebugnoli, A. Farnedi, C. Marchetti, E. Magrini, A. Pession and M. P. Foschini. High proliferative activity and chromosomal instability in oral lichen planus. *Int J Oral Maxillofac Surg.* 2006;35(12):1140-4. doi:10.1016/j.ijom.2006.07.018.
24. Y. Taniguchi, T. Nagao, H. Maeda, Y. Kameyama and K. A. Warnakulasuriya. Epithelial cell proliferation in oral lichen planus. *Cell Prolif.* 2002;35 Suppl 1:103-9.
25. M. Zargarani, S. Jamshidi, N. Eshghyar and A. Moghimbeigi. Suitability/unsuitability of cell proliferation as an indicator of malignant potential in oral lichen planus: an immunohistochemical study. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2013;14(11):6979-83.
26. P. L. Cheah, L. M. Looi, K. H. Teoh, K. S. Mun and A. R. Nazarina. p16(INK4a) is a useful marker of human papillomavirus integration allowing risk stratification for cervical malignancies. *Asian Pac J Cancer Prev.* 2012;13(2):469-72.

27. R. Gupta, R. Srinivasan, R. Nijhawan, V. Suri and R. Uppal. Protein p 16INK4A expression in cervical intraepithelial neoplasia and invasive squamous cell carcinoma of uterine cervix. *Indian J Pathol Microbiol.* 2010;53(1):7-11. doi:10.4103/0377-4929.59174.
28. L. Montebugnoli, M. Venturi, D. B. Gissi, E. Leonardi, A. Farnedi and M. P. Foschini. Immunohistochemical expression of p16(INK4A) protein in oral lichen planus. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics.* 2011;112(2):222-7. doi:10.1016/j.tripleo.2011.02.029.
29. S. Poomsawat, W. Buajeeb, S. O. Khovidhunkit and J. Punyasingh. Overexpression of cdk4 and p16 in oral lichen planus supports the concept of premalignancy. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology.* 2011;40(4):294-9. doi:10.1111/j.1600-0714.2010.01001.x.
30. J. Salehinejad, N. Sharifi, M. Amirchaghmaghi, N. Ghazi, M. T. Shakeri and A. Ghazi. Immunohistochemical expression of p16 protein in oral squamous cell carcinoma and lichen planus. *Annals of diagnostic pathology.* 2014;18(4):210-3. doi:10.1016/j.anndiagpath.2014.03.009.
31. E. Logarinho, T. Resende, C. Torres and H. Bousbaa. The human spindle assembly checkpoint protein Bub3 is required for the establishment of efficient kinetochore-microtubule attachments. *Mol Biol Cell.* 2008;19(4):1798-813. doi:10.1091/mbc.E07-07-0633.
32. X. Pan, J. Zhao, W. N. Zhang, H. Y. Li, R. Mu, T. Zhou et al. Induction of SOX4 by DNA damage is critical for p53 stabilization and function. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2009;106(10):3788-93. doi:10.1073/pnas.0810147106
0810147106 [pii].
33. J. B. Epstein, L. S. Wan, M. Gorsky and L. Zhang. Oral lichen planus: progress in understanding its malignant potential and the implications for clinical management. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics.* 2003;96(1):32-7. doi:10.1067/moe.2003.S1079210403001616.
34. C. Scully and M. Carrozzo. Oral mucosal disease: Lichen planus. *The British journal of oral & maxillofacial surgery.* 2008;46(1):15-21. doi:10.1016/j.bjoms.2007.07.199.
35. E. Torrente-Castells, R. Figueiredo, L. Berini-Aytes and C. Gay-Escoda. Clinical features of oral lichen planus. A retrospective study of 65 cases. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal.* 2010;15(5):e685-90.
36. E. H. van der Meij and I. van der Waal. Lack of clinicopathologic correlation in the diagnosis of oral lichen planus based on the presently available diagnostic criteria and suggestions for modifications. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology.* 2003;32(9):507-12.
37. D. R. Bajaj, N. A. Khoso, B. R. Devrajani, B. L. Matlani and P. Lohana. Oral lichen planus: a clinical study. *Journal of the College of Physicians and Surgeons--Pakistan : JCPSP.* 2010;20(3):154-7. doi:03.2010/JCPSP.154157.
38. F. Baderca, R. Lighezan, A. Alexa, D. Zahoi, M. Raica, D. Izvernariu et al. Atypical variant of lichen planus mimicking normal skin histology. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie.* 2011;52(4):1355-60.

39. G. K. Patel, R. J. Turner and R. Marks. Cutaneous lichen planus and squamous cell carcinoma. *Journal of the European Academy of Dermatology and Venereology : JEADV*. 2003;17(1):98-100.
40. I. van der Waal. Potentially malignant disorders of the oral and oropharyngeal mucosa; present concepts of management. *Oral Oncol*. 2010;46(6):423-5. doi:10.1016/j.oraloncology.2010.02.016.
41. G. P. Bombeccari, G. Guzzi, M. Tettamanti, A. B. Gianni, A. Baj, F. Pallotti et al. Oral lichen planus and malignant transformation: a longitudinal cohort study. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2011;112(3):328-34. doi:10.1016/j.tripleo.2011.04.009.
42. M. A. Gonzalez-Moles, C. Scully and J. A. Gil-Montoya. Oral lichen planus: controversies surrounding malignant transformation. *Oral Dis*. 2008;14(3):229-43. doi:10.1111/j.1601-0825.2008.01441.x.
43. D. Eisen. The clinical manifestations and treatment of oral lichen planus. *Dermatol Clin*. 2003;21(1):79-89.
44. F. Femiano and C. Scully. DNA cytometry of oral leukoplakia and oral lichen planus. *Medicina oral, patologia oral y cirugia bucal*. 2005;10 Suppl 1:E9-14.
45. C. Bascones, M. A. Gonzalez-Moles, G. Esparza, M. Bravo, A. Acevedo, J. A. Gil-Montoya et al. Apoptosis and cell cycle arrest in oral lichen planus Hypothesis on their possible influence on its malignant transformation. *Archives of oral biology*. 2005;50(10):873-81. doi:10.1016/j.archoralbio.2005.02.005.
46. C. Bascones-Ilundain, M. A. Gonzalez-Moles, G. Esparza, J. A. Gil-Montoya and A. Bascones-Martinez. Significance of liquefaction degeneration in oral lichen planus: a study of its relationship with apoptosis and cell cycle arrest markers. *Clinical and experimental dermatology*. 2007;32(5):556-63. doi:10.1111/j.1365-2230.2007.02457.x.
47. M. Hirota, T. Ito, K. Okudela, R. Kawabe, T. Yazawa, H. Hayashi et al. Cell proliferation activity and the expression of cell cycle regulatory proteins in oral lichen planus. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 2002;31(4):204-12.
48. J. Dang, Y. Q. Bian, J. Y. Sun, F. Chen, G. Y. Dong, Q. Liu et al. MicroRNA-137 promoter methylation in oral lichen planus and oral squamous cell carcinoma. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 2013;42(4):315-21. doi:10.1111/jop.12012.
49. W. Y. Kim and N. E. Sharpless. The regulation of INK4/ARF in cancer and aging. *Cell*. 2006;127(2):265-75. doi:10.1016/j.cell.2006.10.003.
50. A. Namazie, S. Alavi, O. I. Olopade, G. Pauletti, N. Aghamohammadi, M. Aghamohammadi et al. Cyclin D1 amplification and p16(MTS1/CDK4I) deletion correlate with poor prognosis in head and neck tumors. *Laryngoscope*. 2002;112(3):472-81. doi:10.1097/00005537-200203000-00013.
51. W. Buajeeb, S. Poomsawat, J. Punyasingh and S. Sanguansin. Expression of p16 in oral cancer and premalignant lesions. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 2009;38(1):104-8. doi:10.1111/j.1600-0714.2008.00710.x.

52. J. Califano, P. van der Riet, W. Westra, H. Nawroz, G. Clayman, S. Piantadosi et al. Genetic progression model for head and neck cancer: implications for field cancerization. *Cancer research*. 1996;56(11):2488-92.
53. L. P. Dragomir, C. Simionescu, C. Margaritescu, A. Stepan, I. M. Dragomir and M. R. Popescu. P53, p16 and Ki67 immunoexpression in oral squamous carcinomas. *Romanian journal of morphology and embryology = Revue roumaine de morphologie et embryologie*. 2012;53(1):89-93.
54. D. M. Muirhead, H. T. Hoffman and R. A. Robinson. Correlation of clinicopathological features with immunohistochemical expression of cell cycle regulatory proteins p16 and retinoblastoma: distinct association with keratinisation and differentiation in oral cavity squamous cell carcinoma. *Journal of clinical pathology*. 2006;59(7):711-5. doi:10.1136/jcp.2005.030502.
55. L. Ai, K. K. Stephenson, W. Ling, C. Zuo, P. Mukunyadzi, J. Y. Suen et al. The p16 (CDKN2a/INK4a) tumor-suppressor gene in head and neck squamous cell carcinoma: a promoter methylation and protein expression study in 100 cases. *Mod Pathol*. 2003;16(9):944-50. doi:10.1097/01.MP.0000085760.74313.DD.
56. Y. Dong, J. Wang, F. Dong, X. Wang and Y. Zhang. The correlations between alteration of p16 gene and clinicopathological factors and prognosis in squamous cell carcinomas of the buccal mucosa. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 2012;41(6):463-9. doi:10.1111/j.1600-0714.2012.01132.x.
57. A. C. Abrahao, B. V. Bonelli, F. D. Nunes, E. P. Dias and M. G. Cabral. Immunohistochemical expression of p53, p16 and hTERT in oral squamous cell carcinoma and potentially malignant disorders. *Braz Oral Res*. 2011;25(1):34-41.
58. S. F. Chen, F. S. Yu, Y. C. Chang, E. Fu, S. Nieh and Y. S. Lin. Role of human papillomavirus infection in carcinogenesis of oral squamous cell carcinoma with evidences of prognostic association. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology*. 2012;41(1):9-15. doi:10.1111/j.1600-0714.2011.01046.x.
59. L. Montebugnoli, F. Cervellati, R. Cocchi, A. Farnedi, M. G. Pennesi, F. Flamminio et al. Immunohistochemical expression of p16(INK4A) protein as a helpful marker of a subset of potentially malignant oral epithelial lesions: study on a series with long-term follow-up. *Histopathology*. 2010;57(4):528-34. doi:10.1111/j.1365-2559.2010.03671.x.
60. J. A. Nemes, L. Deli, Z. Nemes and I. J. Marton. Expression of p16(INK4A), p53, and Rb proteins are independent from the presence of human papillomavirus genes in oral squamous cell carcinoma. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2006;102(3):344-52. doi:10.1016/j.tripleo.2005.10.069.
61. L. L. Cunningham, Jr., G. M. Pagano, M. Li, R. Tandon, S. W. Holm, D. K. White et al. Overexpression of p16INK4 is a reliable marker of human papillomavirus-induced oral high-grade squamous dysplasia. *Oral surgery, oral medicine, oral pathology, oral radiology, and endodontics*. 2006;102(1):77-81. doi:10.1016/j.tripleo.2005.11.028.
62. O. Gologan, E. L. Barnes and J. L. Hunt. Potential diagnostic use of p16INK4A, a new marker that correlates with dysplasia in oral squamoproliferative lesions. *Am J Surg Pathol*. 2005;29(6):792-6.

63. L. A. Kresty, S. R. Mallery, T. J. Knobloch, H. Song, M. Lloyd, B. C. Casto et al. Alterations of p16(INK4a) and p14(ARF) in patients with severe oral epithelial dysplasia. *Cancer research*. 2002;62(18):5295-300.
64. V. Papadimitrakopoulou, J. Izzo, S. M. Lippman, J. S. Lee, Y. H. Fan, G. Clayman et al. Frequent inactivation of p16INK4a in oral premalignant lesions. *Oncogene*. 1997;14(15):1799-803. doi:10.1038/sj.onc.1201010.
65. K. T. Bradley, S. D. Budnick and S. Logani. Immunohistochemical detection of p16INK4a in dysplastic lesions of the oral cavity. *Mod Pathol*. 2006;19(10):1310-6. doi:10.1038/modpathol.3800649.
66. F. Angiero, A. Berenzi, A. Benetti, E. Rossi, R. Del Sordo, A. Sidoni et al. Expression of p16, p53 and Ki-67 proteins in the progression of epithelial dysplasia of the oral cavity. *Anticancer research*. 2008;28(5A):2535-9.
67. V. Sudakin, G. K. Chan and T. J. Yen. Checkpoint inhibition of the APC/C in HeLa cells is mediated by a complex of BUBR1, BUB3, CDC20, and MAD2. *The Journal of cell biology*. 2001;154(5):925-36. doi:10.1083/jcb.200102093
154/5/925 [pii].
68. E. Hernando, I. Orlow, V. Liberal, G. Nohales, R. Benezra and C. Cordon-Cardo. Molecular analyses of the mitotic checkpoint components hsMAD2, hBUB1 and hBUB3 in human cancer. *Int J Cancer*. 2001;95(4):223-7.
69. N. A. Larsen, J. Al-Bassam, R. R. Wei and S. C. Harrison. Structural analysis of Bub3 interactions in the mitotic spindle checkpoint. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 2007;104(4):1201-6. doi:10.1073/pnas.0610358104.
70. S. Vigneron, S. Prieto, C. Bernis, J. C. Labbe, A. Castro and T. Lorca. Kinetochores localization of spindle checkpoint proteins: who controls whom? *Mol Biol Cell*. 2004;15(10):4584-96. doi:10.1091/mbc.E04-01-0051.
71. H. Grabsch, S. Takeno, W. J. Parsons, N. Pomjanski, A. Boecking, H. E. Gabbert et al. Overexpression of the mitotic checkpoint genes BUB1, BUBR1, and BUB3 in gastric cancer--association with tumour cell proliferation. *J Pathol*. 2003;200(1):16-22. doi:10.1002/path.1324.
72. S. Morais da Silva, T. Moutinho-Santos and C. E. Sunkel. A tumor suppressor role of the Bub3 spindle checkpoint protein after apoptosis inhibition. *The Journal of cell biology*. 2013;201(3):385-93. doi:10.1083/jcb.201210018
jcb.201210018 [pii].
73. C. Wang, H. Zhao, J. Lu, J. Yin, L. Zang, N. Song et al. Clinicopathological significance of SOX4 expression in primary gallbladder carcinoma. *Diagn Pathol*. 2012;7:41. doi:10.1186/1746-1596-7-41
1746-1596-7-41 [pii].
74. E. H. Hur, W. Hur, J. Y. Choi, I. K. Kim, H. Y. Kim, S. K. Yoon et al. Functional identification of the pro-apoptotic effector domain in human Sox4. *Biochem Biophys Res Commun*. 2004;325(1):59-67. doi:S0006-291X(04)02267-3 [pii]
10.1016/j.bbrc.2004.09.215.
75. W. Hur, H. Rhim, C. K. Jung, J. D. Kim, S. H. Bae, J. W. Jang et al. SOX4 overexpression regulates the p53-mediated apoptosis in hepatocellular carcinoma: clinical implication and functional analysis in vitro. *Carcinogenesis*. 2010;31(7):1298-307. doi:10.1093/carcin/bgq072
bgq072 [pii].
76. A. K. Lee, S. G. Ahn, J. H. Yoon and S. A. Kim. Sox4 stimulates ss-catenin activity through induction of CK2. *Oncol Rep*. 2011;25(2):559-65. doi:10.3892/or.2010.1091.

77. S. M. Jafarnejad, A. A. Wani, M. Martinka and G. Li. Prognostic significance of Sox4 expression in human cutaneous melanoma and its role in cell migration and invasion. *Am J Pathol.* 2010;177(6):2741-52. doi:10.2353/ajpath.2010.100377 S0002-9440(10)62903-3 [pii].
78. P. Liu, S. Ramachandran, M. Ali Seyed, C. D. Scharer, N. Laycock, W. B. Dalton et al. Sex-determining region Y box 4 is a transforming oncogene in human prostate cancer cells. *Cancer research.* 2006;66(8):4011-9. doi:10.1158/0008-5472.CAN-05-3055.
79. C. L. Andersen, L. L. Christensen, K. Thorsen, T. Schepeler, F. B. Sorensen, H. W. Verspaget et al. Dysregulation of the transcription factors SOX4, CBFβ and SMARCC1 correlates with outcome of colorectal cancer. *Br J Cancer.* 2009;100(3):511-23. doi:10.1038/sj.bjc.6604884 6604884 [pii].
80. S. Gunes, Z. Yegin, Y. Sullu, R. Buyukalpelli and H. Bagci. SOX4 expression levels in urothelial bladder carcinoma. *Pathol Res Pract.* 2011;207(7):423-7. doi:10.1016/j.prp.2011.05.005.
81. R. Todd, P. W. Hinds, K. Munger, A. K. Rustgi, O. G. Opitz, Y. Suliman et al. Cell cycle dysregulation in oral cancer. *Critical reviews in oral biology and medicine : an official publication of the American Association of Oral Biologists.* 2002;13(1):51-61.
82. K. A. Warnakulasuriya, M. Tavassoli and N. W. Johnson. Relationship of p53 overexpression to other cell cycle regulatory proteins in oral squamous cell carcinoma. *Journal of oral pathology & medicine : official publication of the International Association of Oral Pathologists and the American Academy of Oral Pathology.* 1998;27(8):376-81.
83. S. Kannan, G. J. Chandran, K. R. Pillai, B. Mathew, K. Sujathan, K. R. Nalinakumary et al. Expression of p53 in leukoplakia and squamous cell carcinoma of the oral mucosa: correlation with expression of Ki67. *Clinical molecular pathology.* 1996;49(3):M170-5.
84. T. Scholzen and J. Gerdes. The Ki-67 protein: from the known and the unknown. *Journal of cellular physiology.* 2000;182(3):311-22. doi:10.1002/(SICI)1097-4652(200003)182:3<311::AID-JCP1>3.0.CO;2-9.
85. C. Schluter, M. Duchrow, C. Wohlenberg, M. H. Becker, G. Key, H. D. Flad et al. The cell proliferation-associated antigen of antibody Ki-67: a very large, ubiquitous nuclear protein with numerous repeated elements, representing a new kind of cell cycle-maintaining proteins. *The Journal of cell biology.* 1993;123(3):513-22.
86. O. Hamadah, M. L. Goodson and P. J. Thomson. Clinicopathological behaviour of multiple oral dysplastic lesions compared with that of single lesions. *The British journal of oral & maxillofacial surgery.* 2010;48(7):503-6. doi:10.1016/j.bjoms.2009.08.027.
87. T. Dadfarnia, B. S. Mohammed and M. A. Eltorkey. Significance of Ki-67 and p53 immunoexpression in the differential diagnosis of oral necrotizing sialometaplasia and squamous cell carcinoma. *Annals of diagnostic pathology.* 2012;16(3):171-6. doi:10.1016/j.anndiagpath.2011.08.011.
88. N. Dwivedi, S. Chandra, B. Kashyap, V. Raj and A. Agarwal. Suprabasal expression of Ki-67 as a marker for the severity of oral epithelial dysplasia and oral squamous cell carcinoma. *Contemporary clinical dentistry.* 2013;4(1):7-12. doi:10.4103/0976-237X.111586.
89. S. S. Birajdar, M. Radhika, K. Paremala, M. Sudhakara, M. Soumya and M. Gadivan. Expression of Ki-67 in normal oral epithelium, leukoplakic oral epithelium

- and oral squamous cell carcinoma. *Journal of oral and maxillofacial pathology : JOMFP*. 2014;18(2):169-76. doi:10.4103/0973-029X.140729.
90. S. S. Taylor, E. Ha and F. McKeon. The human homologue of Bub3 is required for kinetochore localization of Bub1 and a Mad3/Bub1-related protein kinase. *The Journal of cell biology*. 1998;142(1):1-11.
91. N. Haruki, H. Saito, T. Harano, S. Nomoto, T. Takahashi, H. Osada et al. Molecular analysis of the mitotic checkpoint genes BUB1, BUBR1 and BUB3 in human lung cancers. *Cancer Lett*. 2001;162(2):201-5. doi:S0304383500006753 [pii].
92. L. M. Greene, G. Campiani, M. Lawler, D. C. Williams and D. M. Zisterer. BubR1 is required for a sustained mitotic spindle checkpoint arrest in human cancer cells treated with tubulin-targeting pyrrolo-1,5-benzoxazepines. *Mol Pharmacol*. 2008;73(2):419-30. doi:10.1124/mol.107.039024.
93. Y. Niikura, H. Ogi, K. Kikuchi and K. Kitagawa. BUB3 that dissociates from BUB1 activates caspase-independent mitotic death (CIMD). *Cell Death Differ*. 2010;17(6):1011-24. doi:10.1038/cdd.2009.207 cdd2009207 [pii].
94. H. Windecker, M. Langegger, S. Heinrich and S. Hauf. Bub1 and Bub3 promote the conversion from monopolar to bipolar chromosome attachment independently of shugoshin. *EMBO Rep*. 2009;10(9):1022-8. doi:10.1038/embor.2009.183 embor2009183 [pii].
95. Y. M. Yoon, K. H. Baek, S. J. Jeong, H. J. Shin, G. H. Ha, A. H. Jeon et al. WD repeat-containing mitotic checkpoint proteins act as transcriptional repressors during interphase. *FEBS Lett*. 2004;575(1-3):23-9. doi:10.1016/j.febslet.2004.07.089.
96. Y. W. Huang, J. C. Liu, D. E. Deatherage, J. Luo, D. G. Mutch, P. J. Goodfellow et al. Epigenetic repression of microRNA-129-2 leads to overexpression of SOX4 oncogene in endometrial cancer. *Cancer research*. 2009;69(23):9038-46. doi:10.1158/0008-5472.CAN-09-1499 0008-5472.CAN-09-1499 [pii].
97. M. Watanabe, Y. Ohnishi, M. Wato, A. Tanaka and K. Kakudo. SOX4 expression is closely associated with differentiation and lymph node metastasis in oral squamous cell carcinoma. *Med Mol Morphol*. 2014;47(3):150-5. doi:10.1007/s00795-013-0057-5.

9 - APÊNDICE

9.1 - APÊNDICE 1

Dados relativos ao grupo de LPO

caso	Sexo	Idade	localização	P16	BUB	Ki67	SOX 4	FORMA
1	F	74	Língua	41,50	62,80	14,20	8,20	RET
2	M	59	Lábio inf	7,10	84,40	16,20	20,20	RET
3	M	46	Mucosa jugal	13,40	45,00	8,60	1,80	ERT
4	F	60	Mucosa jugal	22,00	90,40	5,00	17,80	ERT
5	F	44	Língua	22,30	10,60	20,20	0,00	RET
6	F	27	Mucosa jugal	16,10	52,20	13,60	7,60	RET
7	F	40	Mucosa jugal	20,50	77,60	0,00	13,60	ERO
8	M	49	Mucosa jugal	20,80	80,00	18,54	5,00	RET
9	F	83	Mucosa jugal	30,90	78,80	19,60	65,00	ERO
10	F	60	Mucosa jugal	11,40	100,00	18,00	66,60	ERO
11	M	47	Gengiva	21,20	99,60	11,80	86,20	RET
12	F	39	Mucosa jugal	20,20	92,20	22,20	95,20	RET
13	F	57	Mucosa jugal	14,20	84,20	8,80	85,80	-
14	F	52	Mucosa jugal	16,00	84,40	18,60	86,20	RET
15	F	70	Mucosa jugal	66,60	92,60	4,60	65,60	ERO
16	M	33	Mucosa jugal	74,00	23,40	13,20	37,40	RET
17	F	41	-	25,60	51,20	8,00	93,20	-
18	M	37	Palato	3,20	28,00	1,80	9,40	RET
19	F	28	Mucosa jugal	49,10	34,60	3,80	11,80	ERO
20	M	36	-	13,50	74,60	13,86	7,60	RET
21	F	55	-	22,80	87,60	1,00	59,40	RET
22	F	49	Gengiva	6,40	84,80	7,60	69,00	ERT
23	M	52	Língua	24,40	63,60	13,00	68,80	RET
24	F	52	Mucosa jugal	23,80	64,00	6,00	71,40	ERT
25	F	75	Fundo de vestíbulo	19,20	87,40	14,80	76,20	ERT
26	M	63	Lábio	16,20	82,00	2,40	84,80	-
27	F	32	Gengiva	21,60	74,40	5,80	99,20	ERT
28	F	69	-	22,60	80,00	11,40	87,80	-
29	F	52	Fundo de vestíbulo	13,00	92,20	10,80	87,40	RET
30	F	69	Mucosa jugal	17,60	90,60	14,00	98,80	RET

9.2 – APÊNDICE 2

Dados relativos ao grupo de LPC

Caso	Sexo	Idade	localização	P16	BUB	Ki67	SOX4
1	M	58	Coxa	76,60	94,80	18,60	78,00
2	F	61	Ombro	87,80	92,40	51,60	89,00
3	M	17	-	87,80	44,00	11,80	53,80
4	M	51	-	98,20	87,60	15,40	92,40
5	F	61	Tronco	92,40	90,60	19,00	74,25
6	F	39	Coxa	98,60	95,40	14,20	86,40
7	F	62	-	93,20	92,40	6,40	93,80
8	M	58	Penis	91,60	82,80	13,20	92,20
9	M	55	-	98,20	79,60	3,20	89,40
10	M	46	Pescoço	49,40	32,00	7,80	61,20
11	F	18	-	91,00	85,00	23,00	91,00
12	F	38	Antebraço	78,20	81,60	7,00	93,80
13	F	51	Face	73,20	91,60	9,08	92,60
14	M	57	-	74,00	85,60	11,40	86,60
15	F	44	Antebraço	91,40	89,00	6,40	94,20
16	M	43	Face	78,20	92,40	9,00	89,20
17	F	74	Cabeça	97,40	84,20	5,60	92,60
18	M	42	-	39,60	86,00	12,20	78,00
19	F	44	Perna	88,20	84,00	4,20	90,40
20	M	46	Região suprapúbica	62,40	59,00	4,80	84,60
21	F	50	Braço	17,40	56,00	16,80	78,60
22	F	47	Coxa direita	49,80	75,80	12,40	87,00
23	F	14	Região abdominal inferior à direita	27,40	61,60	8,68	78,67
24	M	57	Região axilar	89,20	69,20	3,60	80,80
25	F	26	Antebraço direito	85,39	59,00	7,40	84,60
26	F	59	Dorso da mão	88,00	58,20	3,60	80,80
27	F	57	Pescoço	24,60	83,60	4,00	95,20
28	F	41	Abdome	93,40	75,20	4,60	92,40
29	M	47	Pescoço	49,80	64,80	7,20	76,60
30	F	53	Braço	24,80	54,40	6,20	83,00

9.3 – APÊNDICE 3

Dados relativos ao grupo de Displasia Oral

Caso	Sexo	Idade	Localização	P16	BUB	Ki67	SOX 4	Grau DO	Inflamação
1	F	57	Palato	9,10	58,40	12,60	85,00	leve	leve
2	F	54	Mucosa Jugal	4,40	78,20	44,74	73,80	leve	moderada
3	M	42	Mucosa Jugal	9,40	76,80	13,40	73,20	leve	leve
4	F	79	Língua	0,00	77,80	15,80	67,00	leve	moderada
5	M	65	Língua	31,20	32,60	10,00	46,80	leve	leve
6	M	15	Gengiva	67,60	59,40	11,40	43,40	leve	leve
7	F	50	Lábio	7,40	92,00	69,20	67,00	moderada	moderada
8	F	53	Palato	5,50	19,40	10,40	64,20	leve	leve
9	M	53	Trígono retromolar	7,90	72,20	7,80	77,40	leve	leve
10	F	9	Língua	0,20	70,60	12,00	82,00	leve	leve
11	F	30	Mucosa jugal	0,00	58,20	34,40	38,00	leve	leve
12	M	46	-	0,00	38,60	12,80	62,00	leve	moderada
13	F	34	-	0,00	17,60	16,20	82,40	leve	leve
14	F	34	-	6,30	27,20	4,60	60,00	leve	leve
15	M	43	Palato	5,60	49,80	10,80	83,00	moderada	leve
16	M	53	-	7,80	86,00	14,40	61,40	leve	leve
17	F	62	-	7,60	22,80	3,40	56,20	leve	moderada
18	M	22	Lábio	7,70	82,31	14,60	71,60	leve	moderada
19	F	57	-	43,20	36,60	24,60	59,20	leve	moderada
20	M	70	-	26,30	40,40	22,20	13,00	moderada	moderada
21	M	73	Lábio	54,20	82,00	24,60	83,20	leve	leve
22	F	48	-	14,60	91,40	21,20	82,40	leve	ausente
23	F	63	-	0,20	77,40	13,20	84,40	leve	leve
24	F	65	-	6,80	83,80	19,00	81,60	leve	ausente
25	F	56	Soalho bucal	11,60	87,60	14,40	83,80	leve	leve
26	F	29	-	44,60	73,20	15,00	71,40	leve	ausente
27	F	53	-	64,00	29,60	8,40	85,66	leve	ausente
28	M	50	Lábio	13,20	54,40	29,20	67,20	leve	leve
29	M	60	Lábio	10,60	73,00	34,40	80,00	leve	leve
30	F	57	Gengiva	15,40	79,00	13,80	98,00	leve	leve

9.4 – APÊNDICE 4

Dados relativos ao grupo de Hiperplasia Oral

Caso	Sexo	Idade	localização	P16	BUB	Ki67	SOX4	Inflamação
1	M	69	Palato	52,20	77,40	5,20	87,00	moderada
2	M	54	-	15,00	68,20	4,20	78,40	leve
3	F	15	Gengiva	8,80	42,69	5,80	88,60	leve
4	F	65	Freio Labial	4,80	52,20	0,60	63,60	leve
5	F	49	-	0,00	79,00	3,00	66,80	ausente
6	M	27	Língua	17,40	77,00	3,00	49,40	leve
7	F	52	Palato	11,00	35,20	16,40	92,00	leve
8	F	52	Mucosa jugal	0,80	30,20	14,40	65,60	ausente
9	F	53	-	7,40	29,60	7,20	73,00	leve
10	F	54	-	24,80	71,80	9,40	92,60	leve
11	F	54	Fundo de vestibulo	18,40	53,40	6,60	68,80	leve
12	M	56	Mucosa jugal	24,50	66,80	10,20	79,80	ausente
13	F	31	Mucosa alveolar	44,20	87,40	4,00	95,20	leve
14	M	37	-	11,60	92,20	1,40	83,40	ausente
15	F	66	-	12,00	98,00	7,00	82,80	ausente
16	F	66	Mucosa jugal	15,50	83,40	4,76	86,00	leve
17	F	52	-	9,80	74,40	16,20	87,40	leve
18	F	49	Mucosa jugal	17,80	93,80	2,40	76,80	moderada
19	F	28	Gengiva	34,60	83,80	8,20	84,40	leve
20	F	50	Trígono retromolar	21,10	94,80	6,20	85,40	leve
21	F	60	Rebordo alveolar	14,00	96,80	1,40	90,00	moderada
22	M	58	Mucosa jugal	7,00	39,40	5,80	65,40	leve
23	M	42	-	0,30	36,20	10,60	29,80	leve
24	F	64	Lábio inferior	6,90	79,60	2,80	77,60	ausente
25	M	71	-	6,60	62,40	5,00	88,80	ausente
26	M	43	-	7,20	99,40	7,00	90,20	ausente
27	F	46	-	18,80	91,80	6,80	81,80	leve
28	M	54	-	4,00	75,40	2,60	95,80	leve
29	M	22	-	13,60	96,20	3,60	79,60	ausente
30	F	32	-	1,00	77,00	3,20	73,40	leve