

**PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
FACULDADE DE ODONTOLOGIA**

ELAINI SICKERT HOSNI

Líquen plano oral e o grau de ploidia de DNA determinado por citometria digital

PORTO ALEGRE

2008

ELAINI SICKERT HOSNI

Líquen plano oral e o grau de ploidia de DNA determinado por citometria digital

Tese apresentada como parte dos requisitos exigidos para a obtenção do título de Doutor em Odontologia, área de concentração em Estomatologia Clínica pela Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul.

Orientadora: Prof^a. Dr^a. Liliane Soares Yurgel

Co-Orientador: Prof^o. Dr^o. Vinicius Duval da Silva

PORTO ALEGRE

2008

Dados Internacionais de Catalogação na Publicação (CIP)

H818l Hosni, Elaini Sickert
Líquen plano oral e o grau de ploidia de DNA
determinado por citometria digital / Elaini Sickert Hosni. –
2008.
134 f. : il. color. ; 29 cm.

Tese (Doutorado) - Fac. de Odontologia, PUCRS,
2008.
Orientação: Prof^a. Dr^a. Liliane Soares Yurgel.
Co-Orientação: Prof. Dr. Vinicius Duval da Silva.

1. Odontologia. 2. Neoplasias Bucais. 3.
Citopatologia. 4. Patologia Bucal. I. Yurgel, Liliane
Soares. II. Silva, Vinicius Duval da. III. Título.

CDD 616.99431

Bibliotecária Responsável: Deisi Hauenstein CRB-10/1479



DEDICATÓRIA

Dedico esta tese aos meus pais e ao meu marido.

Aos meus pais, ***Realda*** e ***Ottokar***, pelo exemplo de vida, amor, estímulo e credibilidade sempre explícitos em minha criação. Agradeço por tudo, dedicando este trabalho.

Ao meu marido, ***João Carlos***, pela participação na realização dos meus sonhos com constante colaboração, incentivos e pela compreensão nos momentos em que não foi possível estarmos juntos. Esperando retribuir um pouco do todo a mim dispensado, agradeço, dedicando este trabalho.



AGRADECIMENTOS

AGRADECIMENTOS

A **Deus**, por se fazer presente em todos os momentos da minha vida.

À Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS) por poder ampliar meus conhecimentos através dos ensinamentos recebidos de seu brilhante quadro de Professores e por toda a colaboração e carinho de seus eficientes funcionários, em todos os Departamentos e/ou Serviços dessa Instituição.

À Universidade Federal de Pelotas (UFPeI), em nome do Magnífico Reitor Dr. Antonio César G. Borges, por ter viabilizado minha graduação em Odontologia, Especialização e Mestrado em Cirurgia Buco-Maxilo-Facial e por fazer parte do quadro de docentes dessa Instituição de Ensino, pela qual tenho grande admiração e orgulho.

À Fundação Coordenação de Aperfeiçoamento de Pessoal de Nível Superior – CAPES, pela concessão da bolsa de estudos (PICDT).

Ao Pró-Reitor de Pós-graduação da Universidade Federal de Pelotas, Prof. Dr. Mário Sérgio Medeiros Pires (gestão 2005/2007), pelo apoio, incentivo e por viabilizar a bolsa de estudos (PICDT) da CAPES.

Em especial, à Orientadora, Professora Dr^a. Liliane Soares Yurgel, pelos constantes ensinamentos e dedicação no desenvolvimento desta pesquisa e também pela amizade e carinho a mim dispensados durante o curso, tornando extremamente agradável o convívio, facilitando, dessa forma, a realização desta etapa, tornando-se um exemplo de vida a ser citado e seguido.

Ao Professor Dr. Vinícius Duval da Silva, meu co-orientador na tese, pelos ensinamentos e disponibilização dos equipamentos de citometria digital, que tornaram possível o desenvolvimento da técnica aplicada neste estudo.

À Dr^a. Nilza Pereira da Costa, Coordenadora do Programa de Pós-graduação em Odontologia até 2007, pelos grandes feitos durante sua gestão, seu grande senso humanitário e carinho em cada palavra ou gesto.

Ao Coordenador do Programa de Pós-graduação em Odontologia, Dr. José Antônio Poli de Figueiredo, pelo exemplo de dedicação à Odontologia.

Aos meus colegas Professores do Departamento de CTPBMF da Faculdade de Odontologia da UFPel, Prof.^a Dr^a. Cândida Beatriz Borges Zambrano, Prof.^a Dr^a. Carmen Helena Jacques Lemes, Prof.^a Cristina Braga Xavier, Prof. Dr. Marcos Antonio Torriani, Prof. Dr. Mário Sérgio Medeiros Pires e Prof. Dr. Paulo Jeovane de Figueiredo, e demais professores Substitutos, que, pela amizade e colaboração, por redobram seus esforços profissionais e, dessa forma viabilizar meu afastamento da UFPel para a realização do doutorado na PUCRS, contribuíram com meu crescimento profissional.

À Chefe do Serviço de Estomatologia do Hospital São Lucas da PUCRS de Porto Alegre, Professora Dr^a. Liliane Soares Yurgel, pelo grande empenho, extremo bom senso e humanitarismo em cada atitude de liderança, e por, nesse cargo, manter a harmonia e perfeitamente integrados o ensino, a pesquisa e a extensão, dessa forma tornando-se um exemplo profissional para mim.

Ao Chefe do Serviço de Patologia do HSL da PUCRS, Dr. Antônio Hartmann, pela pronta disponibilização na utilização das dependências físicas e equipamentos, e pelo agradável convívio e colaboração de todos os Doutores e funcionários desse setor.

Às professoras do Programa de Doutorado em Odontologia, concentração em Estomatologia Clínica, Dr^{as}. Karen Cherubini, Liliane Soares Yurgel e Fernanda Gonçalves Salum, pela atenção, pelos ensinamentos transmitidos com grande afincamento e pelos bons momentos de convívio.

À professora do Programa de Doutorado em Odontologia, concentração em Estomatologia Clínica, Dr^a. Maria Antonia Zancanaro de Figueiredo, que, mesmo em

pouco tempo de convívio, transmitiu muitos ensinamentos e mesmo “in London”, jamais se tornou ausente, e “via e-mail” sempre enviou carinho, coragem e me presenteou com sua amizade, determinação e exemplo de vida.

Às professoras do Programa de Doutorado em Odontologia, disciplina de Diagnóstico por Imagens, Dr^a. Nilza Pereira da Costa, Dr^a. Elaine Bauer Veeck, Dr^a. Helena Wilhelm de Oliveira, Dr^a. Maria Ivete Bolzan Rockenbach e Dr^a. Márcia Rejane Brücker e aos professores da disciplina de Genética da PUCRS, Dr. Eraldo Luiz Batista Júnior e Dr^a. Maria Martha Campos, pelo carinho e pela forma agradável de transmitir seus conhecimentos.

Ao técnico de laboratório Tiago Giulliani pela cooperação na realização das lâminas e realização da reação de Feulgen, também pelo carinho e amizade.

Aos colegas de turma de Doutorado Márcia Peter Maahs, Tissiana Rossi Schneider e Sergio Augusto Miguens Jr., pelo coleguismo e contribuições.

Em especial, ao meu amigo e colega Sergio Augusto Miguens Jr. que, pela sua fiel amizade, colaboração e suas constantes palavras de incentivo, tornou muito mais fácil a realização desta jornada.

Em especial, ao Dr. João Guilherme Gabriel, pela concessão das lâminas do grupo controle deste estudo, e pela disposição na transmissão de seus conhecimentos, sempre de forma serena e agradável.

Ao colega e amigo Dr. Alexandre Futterleib, por compartilhar os ensinamentos anteriormente adquiridos na mesma linha de pesquisa do meu estudo.

Ao amigo e colega Dr. Alisson André Robes da Fonseca, pela “palavra de apoio” que me fez investir no doutorado, no momento certo.

Às queridas e fiéis amigas Letícia, Carla e Karis pela grande amizade e constante companheirismo.

Ao Professor Estatístico Sérgio Kakuta Kato, da KLM Estatística e Pesquisa, pela disposição profissional, ensinamentos e colaboração na análise estatística deste estudo.

À Prof.^a Dr.^a. Nóris Eunice Wiener Pureza Duarte, pela realização da revisão da lingüística deste trabalho.

À Bibliotecária Deisi Hauenstein, pela formatação e revisão das normas da ABNT desta tese.

Aos funcionários da Secretaria de Pós-graduação da Faculdade de Odontologia da PUCRS Ana, Carlos, Davenir e Marcos, e aos funcionários da Secretaria do SEHSL, Fernando e Márcia, e ao técnico de Enfermagem Lindomar, pelas constantes colaborações, carinho e pela amizade que compartilhamos.

À minha irmã Leonora e aos meus sobrinhos Patrícia e William, por sempre me incentivarem a prosseguir.

Aos Professores Doutores membros das bancas examinadoras da pré-defesa e defesa desta tese, pelas contribuições no melhoramento do trabalho, e pelo tempo que dispuseram para tal.

Aos pacientes cujos casos clínicos forneceram o conjunto de dados e informações necessárias ao desenvolvimento deste estudo, o meu profundo respeito e gratidão.

E a tantos outros amigos, colegas e professores, que, de algum modo, e em algum momento de minha vida, colaboraram para que eu pudesse chegar até aqui e concluir esta etapa, representando para mim uma grande conquista, um ideal alcançado.

Não existe um caminho para a paz! A paz é o caminho!

Precisamos de uma paz real baseada na liberdade e igualdade de todas as raças e nações.

Violência é criada por desigualdade, a não violência, pela igualdade.

Creio poder afirmar, sem arrogância e com a devida humildade, que a minha mensagem e os meus métodos são válidos, em sua essência, para todo o mundo.

Mohandas Karamchan Gandhi – 1869/1948
Líder pacifista indiano



RESUMO

RESUMO

Esta pesquisa teve o objetivo de verificar o grau e a freqüência de ploidia de DNA, pela técnica de citometria digital, em lâminas coradas pelo método de Feulgen, com espécimes de biópsias de lesões de líquen plano oral do tipo reticular (LPOR) e atrófico-erosivo (LPOAE), e, ainda, analisar 14 padrões de medidas cariométricas das imagens dos núcleos de células epiteliais selecionados em cada um dos espécimes. Foram avaliadas 40 lâminas de biópsias de LPO, emblocadas em parafina, subdivididas em 20 amostras de líquen plano reticular (LPOR - grupo R) e 20 amostras de líquen plano atrófico-erosivo (LPOAE - grupo AE). O grupo R apresentou 18 casos diplóides e 2 casos aneuplóides. O grupo AE exibiu 10 casos diplóides, 1 tetraplóide e 9 aneuplóides. Concluiu-se que o grau de ploidia de DNA mais freqüente em lesões de LPO é o diplóide. O grau de ploidia diplóide está associado a forma clínica de LPOR, enquanto que o grau de ploidia aneuplóide está associado a forma clínica de LPOAE. Entre as 14 medidas cariométricas analisadas nos núcleos das células epiteliais de LPO, a densidade média, densidade mínima e *roundness* apresentaram diferença significativa entre os grupos R e AE.

Palavras-chave: Citometria digital. Feulgen. Ploidia de DNA. Líquen plano oral reticular. Atrófico-Erosivo.



ABSTRACT

ABSTRACT

The aim of this research was to investigate and quantify the frequency of the DNA ploidy, established by digital cytometry, in Feulgen's stained biopsies slides, in reticular (ROLP) and atrophic-erosive (AEOLP) oral lichen planus (OLP) forms, and still, to analyze 14 nuclear measures of the selected nuclei images of epithelial cells in each one of specimens. Forty slides of paraffin-embedded biopsies of OLP, had been evaluated, subdivided in 20 samples of Reticular Lichen Planus (ROLP - group R) and 20 samples of Atrophic-erosive (AEOLP - group AE). Group R presented 18 diploid and 2 aneuploid cases. Group AE showed 10 diploid, 1 tetraploid and 9 aneuploid cases. The more frequent DNA ploidy in LPO injuries, considering both clinical forms, was the diploid. The diploid DNA was associated with the reticular clinical form whereas the aneuploid DNA ploidy was associated with the atrophic-erosive form. Among the 14 nuclear measures analyzed, the mean density, minimum density and roundness had presented significant difference between the groups R and AE.

Keywords: Digital Cytometry. Feulgen. DNA Ploidy. Reticular Oral Lichen Planus. Atrophic-erosive.



LISTA DE FIGURAS

LISTA DE FIGURAS

Figura 1	A. Aspecto clínico de líquen plano reticular em mucosa jugal. B. Aspecto clínico de líquen atrófico-erosivo em mucosa jugal.....	55
Figura 2	Fotomicrografia de líquen plano oral reticular em mucosa jugal exibindo fina faixa de tecido conjuntivo fibroso revestida por epitélio pavimentoso estratificado com hiperkeratose, cristas interpapilares em forma de “dentes de serra”, degeneração da camada de células basais do epitélio (degeneração hidrópica), ceratinócitos degenerados (corpos de Civatte) na área de interface epitélio-conjuntivo e um infiltrado de linfócitos em banda imediatamente subjacente ao epitélio (HE, aumento de 100x)	57
Figura 3	Fotomicrografia de líquen plano oral atrófico-erosivo em mucosa jugal. Nota-se área da ulceração (HE, aumento de 100x).....	57
Figura 4	Fotomicrografia de lâmina de LPOR corada pela reação de Feulgen (100x). Devido a especificidade da coloração pelo DNA celular, apenas os núcleos são corados	59
Figura 5	Fotomicrografia de lâminas de LPOAE coradas pela reação de Feulgen (100x)	59
Figura 6	Fotomicrografias de lâminas coradas pela reação de Feulgen (400x) exibindo predominantemente campos com linfócitos	60
Figura 7	Seqüência de etapas referentes à preparação dos espécimes e coleta de dados	60
Figura 8	Seqüência de captação de fotomicrografias realizando movimentos em forma de varredura	62
Figura 9	Captura das imagens das lâminas de LPO coradas pelo método de Feulgen (Aumento de 400x) no software Image Pro-Plus	62
Figura 10	A, B, C, D. Campos de fotomicrografia de lâminas de espécimes de LPOR coradas pela reação de Feulgen (400x)	63
Figura 11	A, B, C, D. Campos de fotomicrografia de lâminas de espécimes de LPOAE coradas pela reação de Feulgen (400x)	63

Figura 12	Escolha do núcleo de células epiteliais em foco em um campo digitalizado (Aumento de 400x)	65
Figura 13	Seleção do núcleo com ferramenta (magic tool) no software Corel Photo-Paint 12	65
Figura 14	Cópia do núcleo selecionado	65
Figura 15	Colagem do núcleo selecionado no cariógrama	66
Figura 16	Cariograma completo (6 núcleos de células epiteliais e 2 núcleos de linfócitos)	66
Figura 17	Conversão do cariógrama para tons de cinza (8 bits)	66
Figura 18	Cariograma em tons de cinza (8 bits)	67
Figura 19	Seleção e quantificação de 14 características cariométricas no software Image Pro-plus	68
Figura 20	Exportação dos dados de 14 características cariométricas para o software Excel	68
Figura 21	Dados de 14 características cariométricas em planilha do software Excel	69
Figura 22	Classificação dos histogramas. A. Padrão diplóide. B. Padrão tetraplóide. C. Padrão aneuplóide	72



LISTA DE QUADROS

LISTA DE QUADROS

Quadro 1	Sexo e faixa etária nos grupos R e AE.....	75
Quadro 2	Dados da história médica de pacientes dos grupos R e AE.....	76
Quadro 3	Presença de outros problemas de saúde no grupo R.....	77
Quadro 4	Presença de outros problemas de saúde no grupo AE.....	78
Quadro 5	Tempo de evolução da lesão de LPOR informado pelos pacientes do grupo R na primeira consulta	117
Quadro 6	Tempo de evolução da lesão de LPOAE informado pelos pacientes do Grupo AE na primeira consulta	118
Quadro 7	Tempo de acompanhamento dos pacientes do Grupo R no SEHSL ..	119
Quadro 8	Tempo de acompanhamento dos pacientes do Grupo AE no SEHSL	120
Quadro 9	Grau de ploidia das lâminas do Grupo R	127
Quadro 10	Grau de ploidia das lâminas do Grupo AE	128
Quadro 11	Grupo R: sexo, grau de ploidia, local da biópsia de LPOR, hábitos/vícios (fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de boca) e desfecho	129
Quadro 12	Grupo AE: sexo, grau de ploidia, local da biópsia de LPOR, hábitos/vícios (fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de boca) e desfecho	130



LISTA DE TABELAS

LISTA DE TABELAS

Tabela 1	Relação entre o grau de ploidia e a forma clínica de líquen plano oral	82
Tabela 2	Medidas cariométricas dos grupos R e AE.....	83
Tabela 3	Presença de doenças e fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de boca nos Grupo R e AE	84



SUMÁRIO

SUMÁRIO

1	INTRODUÇÃO	28
2	REVISÃO DE LITERATURA	31
2.1	PLOIDIA DE DNA	31
2.2	DNA ANEUPLÓIDE	32
2.3	EMPREGO DA CITOMETRIA NA DETERMINAÇÃO DO GRAU DE PLOIDIA	33
2.4	CITOMETRIA NA IDENTIFICAÇÃO DE DNA ANEUPLÓIDE EM LESÕES MALIGNAS, PRÉ-MALIGNAS E CONDIÇÕES CANCERIZÁVEIS DA BOCA	35
2.5	CANCERIZAÇÃO EM LÍQUEN PLANO ORAL (LPO)	38
2.6	CITOMETRIA DIGITAL EM LÍQUEN PLANO ORAL	47
3	PROPOSIÇÃO	52
3.1	HIPÓTESE	52
3.2	OBJETIVO GERAL	52
3.3	OBJETIVOS ESPECÍFICOS	52
4	METODOLOGIA	54
4.1	DELINEAMENTO DA PESQUISA	54
4.2	APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA	54
4.3	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	54
4.3.1	População	54
4.3.2	Amostra	54
4.3.3	Critérios de inclusão	56
4.3.4	Critérios de exclusão	58
4.4	PROCEDIMENTOS	58
4.4.1	Coleta dos dados	58
4.4.2	Preparação dos espécimes	58
4.4.3	Citometria digital	60
4.4.3.1	<i>Captura das imagens</i>	61
4.4.3.2	<i>Segmentação dos núcleos e construção do kariograma</i>	64
4.4.3.3	<i>Citometria estática</i>	67
4.4.4	Determinação do grau de ploidia	69
4.5	ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS	72

4.5.1	Quantificação da freqüência de graus de ploidia de DNA nos grupos R e AE	72
4.5.2	Relação entre grau de ploidia e a forma clínica do líquen plano oral	73
4.5.3	Avaliação cariométrica nos grupos R e AE	73
4.5.4	Avaliação da presença de outras doenças e de fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de boca nos grupos R e AE ..	73
5	RESULTADOS	75
5.1	CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA	75
5.1.1	Idade e Sexo	75
5.1.2	História médica	75
5.1.3	Dados relativos à lesão	77
5.1.4	Dados relativos à presença de neoplasia maligna.....	80
5.1.5	Dados relativos a hábitos/vícios dos pacientes	80
5.1	FREQÜÊNCIA DOS GRAUS DE PLOIDIA DE DNA NOS GRUPOS R E AE	81
5.2	RELAÇÃO ENTRE O GRAU DE PLOIDIA E A FORMA CLÍNICA DO LPOR E LPOAE	81
5.3	MEDIDAS CARIOMÉTRICAS DOS NÚCLEOS DE CÉLULAS EPITELIAIS DOS GRUPOS R E AE	82
5.4	AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE OUTRAS DOENÇAS E DE FATORES DE RISCO PARA O DESENVOLVIMENTO DE CÂNCER DE BOCA NOS GRUPOS R E AE.....	83
6	DISCUSSÃO	86

7	CONCLUSÕES	102
	REFERÊNCIAS	104
	APÊNDICE A – Ficha-Padrão	116
	APÊNDICE B – Quadro 5. Tempo de evolução da lesão de LPOR informado pelos pacientes do grupo R na primeira consulta	117
	APÊNDICE C – Quadro 6. Tempo de evolução da lesão de LPOAE informado pelos pacientes do Grupo AE na primeira consulta	118
	APÊNDICE D – Quadro 7. Tempo de acompanhamento dos pacientes do Grupo R no SEHSL	119
	APÊNDICE E – Quadro 8. Tempo de acompanhamento dos pacientes do Grupo AE no SEHSL	120
	APÊNDICE F – Histogramas construídos a partir dos graus de ploidia dos núcleos celulares dos cariogramas das lâminas de cada caso do grupo R	121
	APÊNDICE G – Histogramas construídos a partir dos graus de ploidia dos núcleos celulares dos cariogramas das lâminas de cada caso do grupo AE	124
	APÊNDICE H – Quadro 9. Grau de ploidia das lâminas do Grupo R	127
	APÊNDICE I – Quadro 10. Grau de ploidia das lâminas do Grupo AE	128
	APÊNDICE J – Quadro 11. Grupo R: sexo, grau de ploidia, local da biópsia de LPOR, hábitos/vícios (fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de boca) e desfecho	129
	APÊNDICE K – Quadro 12. Grupo AE: sexo, grau de ploidia, local da biópsia de LPOR, hábitos/vícios (fatores de risco para o desenvolvimento de de câncer de boca) e desfecho	130

ANEXO A – Protocolo laboratorial para realização da coloração de Feulgen	132
ANEXO B – Carta de aprovação da Comissão Científica da Faculdade de Odontologia da PUCRS	133
ANEXO C – Carta de aprovação do CEP (Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São Lucas da PUCRS)	134



INTRODUÇÃO

1 INTRODUÇÃO

O líquen plano (LP) é uma doença mucocutânea, inflamatória crônica, relativamente comum, cuja etiologia ainda não foi totalmente esclarecida, e que tem sido considerada uma doença multifatorial, mediada por um mecanismo imunopatológico, envolvendo particularmente os linfócitos T (BARNES et al., 2005)

O aspecto clínico do líquen plano oral (LPO) é variável, e pode se apresentar na forma de placas brancas estriadas (LPO reticular), placas brancas (LPO em placa), pápulas brancas (LPO papular), áreas eritematosas ou atróficas com ou sem ulcerações (LPO atrófico-erosivo) ou bolhas (LPO bolhoso). As formas clínicas mais freqüentes são a reticular e a atrófica-erosiva (ANDREASEN, 1968; BORNSTEIN et al., 2006).

O líquen plano reticular não causa sintomas e envolve principalmente a mucosa jugal bilateral, e é assim chamado por seu padrão característico de linhas brancas entrelaçadas, denominadas estrias de Wickham. O líquen plano erosivo se apresenta com áreas atróficas e eritematosas, com ulceração central em graus variados e é mais significativo para o paciente, pois é sintomático. A periferia das regiões atróficas é cercada por finas estrias de Wickham. Esta forma é a mais relacionada à cancerização (BORNSTEIN et al., 2006).

Embora o líquen plano seja definido pela Organização Mundial da Saúde (OMS) como uma condição cancerizável (El Nagar e Reichart, 2005), existe muita controvérsia quanto ao potencial de malignização dessa lesão. Nas pesquisas sobre o potencial de transformação maligna de líquens seria necessária uma reavaliação crítica para observar se há relação anatômica entre ambas as lesões e se o paciente apresenta ou não, concomitante ao líquen, outros fatores predisponentes para o desenvolvimento de um carcinoma espinocelular.

A quantificação do grau de ploidia celular e a utilização do grau de ploidia aneuplóide como marcador de neoplasias, têm sido descritas tanto para diagnosticar

quanto para determinar o prognóstico e auxiliar no tratamento de lesões malignas e condições cancerizáveis (REMMERBACH et al., 2001).

Assim, a presença de aneuploidia em uma lesão de líquen plano oral pode colaborar para esclarecer o seu real potencial de transformação maligna.

É possível identificar o material nuclear (DNA) com o método de coloração de Feulgen, por esse ter afinidade aos componentes nucleares, e é possível determinar o grau de ploidia celular, pela utilização da citometria digital.

Com o presente estudo, pela técnica de citometria digital, objetiva-se verificar o grau e a frequência de ploidia de DNA, em lâminas com espécimes de biópsias de líquen plano oral da forma reticular e atrófica-erosiva e, ainda, analisar 14 padrões de medidas cariométricas das imagens dos núcleos de células epiteliais selecionados em cada um dos espécimes.



2 REVISÃO DE LITERATURA

2.1 PLOIDIA DE DNA

As células eucarióticas executam um ordenado conjunto de fases durante suas vidas, denominado “ciclo celular”, em que cada etapa depende diretamente da que a precede. O resultado final do ciclo é a divisão celular que preserva com fidelidade a informação genética contida na célula-mãe (SHERR, 1996).

Os métodos de quantificação do DNA celular resultam em padrões de distribuição conhecidos como ploidia do DNA que são apresentados na forma de histogramas (AUER; CASPERSSON; WALLGREN, 1980; BACUS; BACUS, 1994).

O grau de ploidia de uma célula é definido pela quantidade normal de DNA nuclear, de acordo com a fase do ciclo de vida em que a célula se encontra (HÖGMO et al., 1998).

O ciclo celular é composto por estágios, denominados G1 (Intervalo 1), S (Síntese), G2 (Intervalo 2) e M (Mitose). O estado G0 é definido como de repouso, e as células se encontram diplóides. O grau de ploidia celular nas fases G0 e G1 corresponde a uma contagem de 46 cromossomos, possui grau $2n$ de ploidia e é o momento diplóide da célula. Na fase S, em células normais, o grau de ploidia varia entre $2n$ e $4n$. Já no estágio G2, essas células apresentam grau $4n$ e são tetraplóides. Na fase M, a célula se divide, gerando duas células-filhas diplóides, que podem ficar em repouso (G0) ou reiniciar o ciclo de divisão. A distribuição do conteúdo de DNA em uma população de células é definida como diplóide quando o pico G0/G1 localiza-se na mesma faixa de conteúdo de DNA de uma população de células diplóides normais, utilizadas como referência, e as frações em fase S e G2/M são pequenas (STRACHAN, 2002).

2.2 DNA ANEUPLÓIDE

O termo aneuploidia ou DNA aneuplóide é usado para situações em que se encontram quantidades anômalas de DNA em um núcleo, em relação à fase do ciclo celular em que a célula se encontra, detectadas por estudo citométrico. Existem cada vez mais evidências de que há associação entre a aneuploidia de DNA e a agressividade dos tumores malignos (AUER; FALKMER; ZETTERBERG, 1991).

De acordo com sua natureza e demanda fisiológica, cada tecido possui diferentes proporções de células nas distintas fases do ciclo de vida celular. Porém, em tecidos displásicos e neoplásicos, essas proporções podem estar alteradas, e padrões atípicos de ploidia celular, principalmente padrões aneuplóides/não-diplóides, podem ser observados (GOULANDRIS et al., 1996).

Högmo et al. (1998) demonstraram que a presença de aneuploidia em lesões orais pré-neoplásicas está relacionada com transformação maligna. Salientaram que células epiteliais normais pré-mitóticas podem possuir conteúdo de DNA em torno de 4c, quando são chamadas tetraplóides, mas valores acima de 5c devem ser diferenciados. E quando o espécime contém um número de células excedendo 5c, igual ou maior que 1%, é considerado aneuplóide.

São inúmeros os fatores que podem alterar a quantidade de DNA nuclear, incluindo a replicação, a poliploidização, os ganhos e as deleções, as amplificações gênicas e as infecções por partículas virais, que, somados, podem alterar o tamanho ou o número das cromátides. Também a radioterapia, deficiência de vitamina B12, apoptose, autólise e necrose devem ser consideradas durante a avaliação do conteúdo de DNA (BÖCKING; GIROUD; REITH, 1995; GOLDBERG; DIAMANDIS, 1993).

O diagnóstico histopatológico tem sido considerado como o método padrão-ouro para o diagnóstico e classificação de neoplasmas e de e de lesões pré-neoplásicas. Porém o conteúdo de DNA das células tem sido citado como uma técnica eficiente para avaliar os aspectos biológicos de vários tumores, atuando

como um parâmetro prognóstico. Shirata et al. (2005) relataram que foi possível realizar um paralelismo entre o grau de ploidia e a graduação histológica em 82 amostras de neoplasias intra-epiteliais de cérvix uterino, emblocadas em parafina. A aneuploidia foi encontrada em 86% dos espécimes de cervicite grau 3; em 59% nos espécimes de cervicite grau 2 e em 26% nos espécimes de cervicite grau 1, e todas as amostras classificadas como cervicite crônica foram diplóides. A aneuploidia foi fortemente associada com as lesões mais severas, e a detecção de uma aneuploidia sub-localizada em lesões de baixo grau de classificação sugere o acompanhamento desses casos.

2.3 EMPREGO DA CITOMETRIA NA DETERMINAÇÃO DO GRAU DE PLOIDIA

O conteúdo nuclear do DNA pode ser medido em material histológico e citológico por técnicas de citometria digital e citometria de fluxo. A medida depende da disponibilidade de marcadores estequiométricos para o DNA, e os resultados são expressos em histogramas nos quais podem ser avaliados o grau de ploidia do DNA e o estado de proliferação celular. A citometria de fluxo analisa grande número de células ao mesmo tempo fornecendo dados do ciclo celular. A citometria digital é mais especificamente direcionada para uma população de interesse e pode medir precisamente eventos raros individuais. Existem sistemas rápidos e fáceis de usar, que podem aumentar a aceitação clínica da citometria do DNA (BINS; TAKENS, 1985; BARETON et al., 1993, 1995; SHANKEY et al., 1993; CAREY, 1994).

Por comparação cromodensitométrica, a citometria digital estima a quantidade de DNA de um núcleo, tendo como parâmetro os núcleos de células com a quantidade de DNA conhecida. Possibilita a determinação da atividade proliferativa celular, serve como fator prognóstico de tumores e permite a implementação de maior objetividade e reprodutibilidade na análise histopatológica. Para que seja possível realizá-la, é necessário que a coloração tecidual empregada seja de natureza estequiométrica, ou seja, diretamente proporcional à quantidade de DNA contida em uma célula (AUER; CASPERSSON; WALLGREN, 1980; AUER; FALKMER; ZETTERBERG, 1991; BAAK; JANSSEN, 2004).

A citometria digital é empregada na avaliação de lesões da cavidade bucal há mais de três décadas, sendo encontradas várias sinonímias na literatura, tais como citometria por imagem, assinatura digital, morfocitometria, citomorfometria e citometria nuclear (DOYLE; MANHOLD, 1975; PAPE; PFITZER, 1973).

A qualidade do espécime, seu processamento e fatores associados aos equipamentos, como calibração, magnificação, potência e estabilidade da fonte de luz, podem interferir nos resultados da citometria digital (BAAK; JANSSEN, 2004).

O método de eleição para coloração estequiométrica de DNA é a reação de Feulgen, introduzida por Feulgen e Rossenbeck, em 1924, em que ocorrem ligações químicas mol a mol, conferindo propriedades quantitativas a essa coloração. Há uma relação constante entre a quantidade de substrato e o número de moléculas de corante. Por meio de aparatos ópticos, aplicados à lei de Lambert-Beer, é possível determinar a concentração de substrato, com base na mensuração da quantidade de corante (DELAMATER; SCHAECHTER; HUNTER, 1955; SCHULTE; WITTEKIND, 1990).

Um dos pontos cruciais na determinação do grau de ploidia está centrado no estabelecimento do padrão diplóide, que pode ser obtido por referências celulares internas ou externas. As referências externas podem ser, entre outras, hepatócitos de ratos, linhagens de linfócitos e células da glia; e as internas, linfócitos do paciente, obtidos na própria lâmina histológica estudada ou de esfregaços sanguíneos, além de células de tecidos sadios obtidos por biópsias, incluindo a citologia esfoliativa. A comparação da densidade óptica integrada (IOD - *Integrated optical density*) das células de referência somáticas euplóides, como por exemplo, os linfócitos, que têm sempre padrão de ploidia $2n$, com a IOD de células em estudo, permite a estimativa do seu grau de ploidia (BÖCKING; GIROUD; REITH, 1995; DORMAN et al., 1990; GIROUD et al., 1998; HAROSKE et al., 1998, 2001; KISS et al., 1992).

Balbinotti, Silva e Prolla (2001) demonstraram a possibilidade de se montar um sistema de microfotometria para a avaliação da ploidia do DNA com

equipamentos disponíveis em nosso meio, abrindo campo para outros estudos e tornando possível acrescentar novos dados com potenciais aplicações para o diagnóstico e prognóstico de neoplasias malignas.

2.4 CITOMETRIA NA IDENTIFICAÇÃO DE DNA ANEUPLÓIDE EM LESÕES MALIGNAS, PRÉ-MALIGNAS E CONDIÇÕES CANCERIZÁVEIS DA BOCA

Em um dos primeiros trabalhos que se empregou a citometria digital para avaliação do grau de ploidia de lesões da cavidade bucal, Doyle e Manhold (1975) quantificaram o conteúdo de DNA de 10 carcinomas, 16 leucoplasias e 7 hiperplasias. As hiperplasias apresentaram padrão diplóide, bem como 30% dos carcinomas e 25% das leucoplasias. As demais lesões exibiram padrão aneuplóide.

Kinoshita et al. (1992), pela técnica de citometria digital, estabeleceram o padrão de distribuição do conteúdo de DNA de células de 16 espécimes de mucosa normal, 24 leucoplasias, 12 leucoplasias verrucosas e 76 carcinomas de células escamosas. Nos espécimes de mucosa normal, os picos modais dos valores de ploidia no histograma ficaram entre 1,5c e 2,4c. Nos carcinomas, a média do conteúdo de DNA foi de $3,44 \pm 0,69c$, o coeficiente de variação no conteúdo de DNA foi superior a de outras lesões, e a frequência de células com conteúdo de DNA acima do valor 4c foi de $26,2 \pm 19\%$. Nas leucoplasias, o pico modal dos valores de ploidia também ficou entre 1,5c e 2,4c e apenas um caso expressou valor modal acima de 2,5c, o qual se transformou em carcinoma após 15 meses. Dentre as leucoplasias verrucosas, um caso que expressou várias células acima do valor de 4c e outro que exibiu pico modal com valor de ploidia aumentado desenvolveram carcinoma.

Balsara et al. (1994) relacionaram o grau de ploidia, determinado por citometria digital, e a fração de células na fase S do ciclo celular de 68 carcinomas de boca. Observaram que lesões mais extensas expressavam padrões de ploidia piores e que tumores pobremente diferenciados ou com presença de metástases em

linfonodos eram predominantemente aneuplóides.

Baretton et al. (1995) determinaram, por citometria de fluxo, o grau de ploidia de 106 carcinomas espinocelulares da cavidade bucal. Sessenta e oito por cento dos casos apresentaram padrão não-diplóide. As lesões de língua e lábio apresentaram padrão diplóide com maior frequência do que lesões localizadas em outras regiões da boca. Em 21 dos tumores estudados, os autores compararam o grau de ploidia dos espécimes obtidos durante a biópsia e durante a cirurgia de remoção do tumor, constatando que houve discordância em apenas 1 caso. Os autores também compararam o grau de ploidia entre os tumores primários e suas metástases em linfonodos e, para esses casos, observaram uma discrepância de 17%, sendo que, na maioria das vezes, o tumor primário era não-diplóide e sua metástase era diplóide. Os autores não encontraram relação entre o padrão de ploidia e o estágio clínico ou a graduação histopatológica das lesões, bem como com o período livre de recidiva e o tempo de sobrevida dos pacientes. Quando repetiram a determinação do grau de ploidia, desta vez empregando a citometria digital, observaram concordância em 87% dos casos.

Högmo et al. (1998) estudaram, em 21 pacientes, o valor prognóstico do grau de ploidia pela técnica de citometria digital na progressão para carcinoma de lesões da cavidade bucal, incluindo lesões reacionais (hiperplásicas ou inflamatórias) com diferentes graus de displasia epitelial. Como grupo controle, selecionaram 29 casos de condições cancerizáveis, que acometiam os mesmos sítios anatômicos e possuíam os mesmos graus de displasia epitelial que as lesões do grupo de estudo, mas que não apresentaram progressão para carcinoma. Entre as lesões reacionais avaliadas, três lesões do grupo de estudo foram classificadas como aneuplóides, as demais eram diplóides. Dos 16 casos de carcinoma, 11 eram aneuplóides e cinco diplóides. As maiores aberrações no conteúdo de DNA foram encontradas nas lesões que progrediram para carcinomas invasivos.

Schimming et al. (1998) relacionaram o conteúdo de DNA de 52 carcinomas espinocelulares da cavidade bucal com suas características clinicopatológicas. Observaram metástase cervical em 61% dos pacientes cujos carcinomas apresentaram padrão aneuplóide e uma relação positiva entre o padrão aneuplóide

e sobrevida menor que 5 anos. Não encontraram relação entre a graduação histopatológica e o grau de ploidia das lesões.

Seoane et al. (1998) estudaram 31 espécimes de leucoplasia oral, das quais 10 sofreram transformação maligna após um período de 5 anos, sendo que 3 desses casos apresentaram padrão aneuplóide de DNA no exame de citometria de fluxo. O mesmo grupo de autores (SEOANE et al., 1999) analisou por, citometria de fluxo, 36 amostras de tecido neoplásico e observou aneuploidia de DNA em 15 espécimes (41%). Uma correlação estatisticamente significativa foi identificada entre o grau de malignidade e o índice de DNA; notaram que o grau de ploidia era mais elevado (aneuplóide) quando o grau de malignidade era alto. Concluíram que o uso da análise do DNA como um complemento aos estudos histopatológicos auxilia a diminuir o componente subjetivo de avaliação dos cânceres de cabeça e pescoço.

Remmerbach et al. (2001) avaliaram a precisão diagnóstica da citologia esfoliativa convencional em lesões brancas, ulceradas ou com suspeita clínica de malignidade e utilizaram a citometria digital do DNA como método adjuvante ao exame histopatológico, considerado como padrão-ouro. Analisaram 251 diagnósticos citológicos de lesões bucais com suspeitas de malignidade, incluindo 24 casos de líquen plano, dos quais 2 foram avaliados com citometria digital e apresentaram padrão poliplóide. Observaram uma prevalência de 96,4% de DNA aneuplóide em citologias de carcinomas espinocelulares *in situ* ou invasivos. Concluíram que a citometria digital do DNA é um exame adjuvante objetivo, de alta sensibilidade e grande especificidade na identificação precoce de neoplasias de células epiteliais.

Gabriel (2006) investigou o valor prognóstico do grau de ploidia, por citometria digital, em biópsias seqüenciais de 16 pacientes, que apresentavam lesões malignas e pré-malignas relacionando-as com o desfecho. O emprego do grau de ploidia, determinado por citometria digital, mostrou maior eficácia na predição da malignização de lesões pré-malignas da cavidade bucal, quando comparado ao emprego do grau de displasia epitelial como marcador prognóstico. Concluiu que a aneuploidia está fortemente relacionada aos casos de lesões que progrediram para carcinoma.

Abou-Elhamd e Habib (2007), na tentativa de identificar os mecanismos moleculares envolvidos na patogênese do carcinoma espinocelular da região de cabeça e pescoço e para determinar se o grau de ploidia de DNA pode ser usado para prever o resultado clínico, mediram o índice do DNA nuclear (ploidia) por citometria digital, em 41 espécimes de biópsias de pacientes com lesões pré-malignas e em 79 carcinomas espinocelulares, comparando os resultados com os de 50 controles. Em 46% das lesões pré-malignas o índice de DNA era diplóide; em 37%, tetraplóide e em 17%, aneuplóide, enquanto que nos carcinomas 90% eram aneuplóides e 10%, diplóides. A diploidia do DNA teve a propensão de ocorrer mais precocemente na progressão de lesões pré-malignas, e isso auxiliou na detecção precoce de carcinomas em pacientes que ainda apresentavam hábitos de risco para cancerização (fumantes, alcoólatras, pacientes com esofagite de refluxo). Acreditam que o conhecimento do grau de ploidia do DNA de células tumorais através da citometria por imagem pode facilitar a avaliação de lesões malignas e pré-malignas.

Futterleib (2007) comparou a precisão dos métodos de Papanicolaou por citomorfologia e de Feulgen por citometria digital na detecção de atipias celulares em exames citopatológicos da mucosa oral, onde incluiu 9 casos de líquen plano oral, dos quais 6 eram aneuplóides. Os resultados permitiram concluir que o método de Feulgen associado à citometria digital e de Papanicolaou por citomorfologia exibe precisão semelhante na detecção de atipias em exames citopatológicos da mucosa oral ($p=0,093$), e que as variáveis citométricas nucleares densidade ótica integrada, área e diâmetro são capazes de diferenciar lesões positivas e negativas para atipia.

2.5 CANCERIZAÇÃO EM LÍQUEN PLANO ORAL (LPO)

O líquen plano oral foi descrito, clinicamente, pela primeira vez, em 1869, por Erasmus Wilson e, histologicamente, por Dubrevilh, em 1906, sendo, de início, considerado como uma condição benigna inócua, e, depois, definido como uma lesão pré-maligna pela Organização Mundial da Saúde (WHO, 1978 apud PINDBORG, 1997). Atualmente a Organização Mundial da Saúde, considera líquen plano oral como uma condição cancerizável (EL NAGGAR; REICHART, 2005).

Entretanto, a relação entre LPO e a transformação maligna se mantém controversa (EISENBERG, 2000; EISENBERG; KRUTCHKOFF, 1992; GOMBOS et al., 1993; RAJENTHERAN et al., 1999; VAN DER MEIJ; SCHEPMAN; VAN DER WAAL, 2003; ZHANG et al., 1997).

Com o intuito de contribuir na elucidação dessa controvérsia, Andreasen e Pindborg (1963) realizaram uma revisão de literatura na qual encontraram 46 casos de desenvolvimento de câncer em lesões de LPO no período de 1910 (primeiro caso de transformação maligna de LPO publicado por Hallopeau) a 1961. O carcinoma apareceu em 16 casos nos quais o líquen era do tipo erosivo; em 11 casos no tipo em placa; em 5 casos no tipo reticular e em 14 casos em que não havia especificação do tipo de LPO.

Fulling (1973) encontrou uma incidência menor que 1% de transformação maligna em líquen plano oral, em 327 pacientes acompanhados durante o período de 1958 a 1969. Um paciente desenvolveu um carcinoma espinocelular no mesmo local do LPO após um período de cinco anos, e, em 2 outros pacientes, as lesões do LPO eram em áreas adjacentes ao câncer.

Kövesi e Bánóczy (1973) observaram o desenvolvimento de um caso (0,4%) de carcinoma dentre 326 pacientes com líquen plano oral, acompanhados entre 1960 e 1969. Frente a essa incidência, não foi possível confirmar o caráter pré-neoplásico do líquen plano oral ou se foi apenas uma coincidência.

Silverman e Griffith (1974) acompanharam 200 pacientes com líquen plano oral (LPO) por períodos variados de tempo (de menos de 1 ano a mais de 10 anos) entre 1955 e 1973 e em 5 casos houve desenvolvimento de carcinoma; 4 destes se desenvolveram no líquen plano erosivo, e 1 caso em líquen plano reticular, demonstrando que o risco foi significativamente mais elevado do que aquele encontrado na população em geral.

Silverman, Gorsky e Lozada-Nur (1985) realizaram um estudo prospectivo em 570 pacientes com líquen plano oral, para analisar a transformação maligna. Os

períodos de acompanhamento variaram de 6 meses a 10 anos. A transformação maligna ocorreu em 7 pacientes (1,2%) em um tempo médio de 3,4 anos após o início do líquen plano. O mesmo grupo de autores (SILVERMAN et al., 1991) realizou um estudo prospectivo em 214 pacientes com líquen plano oral e comparou os achados clínicos com os do grupo anteriormente estudado, obtendo resultados similares. Em 1991, a taxa de transformação maligna encontrada foi de 2,3% com uma média de 7¹/₂ anos após o diagnóstico de líquen. Combinando os dois grupos de pacientes observados, a taxa de transformação foi de 1,5%. Mais tarde, Lozada-Nur e Miranda (1997) realizaram uma nova revisão da literatura sobre LPO e compararam com dados dos trabalhos publicados anteriormente por seu grupo de pesquisa, e relataram uma prevalência relativa de transformação maligna de 1,2%.

Krutchkoff, Eisenberg e Conn (1985) defenderam que existe uma outra entidade distinta do LPO denominada de displasia liquenóide. Para evitar erros diagnósticos que pudessem conduzir a impressões equivocadas com relação ao comportamento natural de processos relativamente benignos, enumeraram critérios histológicos que definiriam a “displasia liquenóide”. Depois, Eisenberg e Krutchkoff (1992) avaliaram os critérios diagnósticos dessas lesões e sua importância em relação ao câncer oral, questionando se o LPO seria uma doença pré-maligna para, assim, ser tratado mais agressivamente, antecipando-se ao desenvolvimento do carcinoma espinocelular. Apóiam o conceito de displasia liquenóide como uma entidade categoricamente distinta de LPO, o que serviria como uma explicação razoável para a confusão e controvérsia do líquen plano e suas tendências comportamentais.

Massa et al. (1990) descreveram um caso de paciente ex-fumante que inicialmente apresentou LPO sem displasia, confirmado histologicamente, e que em biópsias consecutivas apresentou atipias e, na última, realizada 9 meses após a primeira, exibiu um carcinoma espinocelular invasivo. Salientam que fatores de risco para cancerização em pacientes com LPO devem ser eliminados, e áreas ulceradas, clinicamente suspeitas dentro de lesões de LPO, devem ser biopsiadas para detecção precoce de carcinoma bucal.

Sigurgeirsson e Lindelöf (1991), para examinar o risco de transformação maligna, acompanharam 2071 pacientes com líquen plano, por uma média de 9,9 anos. Oito carcinomas espinocelulares foram observados nessa população. Concluíram que os pacientes com líquen plano cutâneo não carregam um risco elevado de transformação maligna das lesões.

Yurgel e Lorandi (1992) revisaram os prontuários de 200 pacientes diagnosticados com LPO e acompanhados por um período de 13 anos. Destes, 4 desenvolveram carcinoma espinocelular, sendo 3 em língua e um em mucosa jugal. Dois destes casos apresentavam a forma erosiva, e 2 em placa. Um dos casos exibiu carcinoma no primeiro ano de controle, 2 em até 5 anos de acompanhamento, e o outro ao redor do oitavo ano de controle. Os autores concluíram que, mesmo nos casos bem documentados, não se pode assegurar se o carcinoma foi resultante de transformação direta do LPO, se foi uma coincidência, ou se a lesão, por acréscimo de fatores co-carcinógenos, evoluiu para carcinoma.

Barnard et al. (1993) examinaram os registros de 241 pacientes com LPO, confirmados histologicamente por um período de 10 anos, de 1982 a 1992. Nove pacientes (3,7%) desenvolveram carcinoma *in situ* ou invasivo bem-diferenciado em uma área de LPO. A maior parte dos carcinomas se desenvolveu em áreas de LPO atrófico e/ou erosivo, localizadas na língua, em pacientes com mais de 65 anos de idade. Os resultados apóiam um pequeno, mas clinicamente importante potencial de transformação maligna para o LPO.

Para Kilpi et al. (1996) existe uma controvérsia considerável sobre se LPO é intrinsecamente pré-maligno ou se é uma desordem que facilita o desenvolvimento de carcinoma espinocelular frente a fatores de risco externos. Para auxiliar a esclarecer essas dúvidas, investigaram a expressão da proteína c-erbB-2 em 6 biópsias iniciais de LPO sem displasia e compararam com biópsias subseqüentes dos mesmos pacientes. Esses resultados foram comparados com os achados de outras 26 biópsias de pacientes com LPO e grupos controle (pacientes com displasia sem LPO, pacientes com carcinoma espinocelular sem LPO, e pacientes com mucosa oral normal). Entre as 6 biópsias iniciais de pacientes com LPO, 5 deles expressaram a proteína c-erbB-2. Nenhum caso de LPO que subseqüentemente

mostrou displasia expressou a proteína e, nos casos de carcinoma, 2 deles foram negativos e 1 expressou a proteína. Dentro do outro grupo de LPO, 3 (3/26) foram negativas para a proteína c-erbB-2. Todos os espécimes do grupo controle expressaram a proteína. Os resultados indicaram a probabilidade da ausência da proteína c-erbB-2 ser a indicação para o potencial de transformação neoplásica em LPO que passe a apresentar displasia epitelial.

Com o objetivo de tornar mais compreensíveis as ligações entre líquen plano e carcinoma, Duffey, Eversole e Abemayor (1996) realizaram um estudo retrospectivo de 1987 a 1994, testando a hipótese de que LP encontrado em associação com carcinoma de célula escamosa oral deveria ser considerado uma “lesão sentinela”, indicando anormalidades genéticas e/ou anormalidades imunológicas ainda não definidas na mucosa oral, que predispõem à transformação maligna na mesma região. Identificaram 5 pacientes com LPO e carcinoma de célula escamosa oral, e revisaram seus prontuários. As lâminas foram reavaliadas por um patologista oral sênior, bem como fotos clínicas. Em dois desses casos, havia uma evidência histológica muito clara de progressão para o carcinoma. Em outros dois, a neoplasia na língua estava em justaposição direta com o LP da mucosa jugal, e, em um paciente, as lesões de LPO persistentes foram vistas em associação com áreas de displasia moderada e leve, sugerindo que LPO estava anatomicamente envolvido com os processos pré-malignos. Vários desses pacientes não tiveram exposição significativa a fatores de risco para o carcinoma.

Chiappelli et al. (1997) examinaram o inter-relacionamento entre os sistemas psicológico, endócrino e imunológico em pacientes com lesões de LPO, explorando os fatores de severidade das lesões em LPO erosivo e LPO não erosivo. Sugeriram um possível modelo imune-psico-neuroendócrino de patologia, no qual os estados de humor poderiam criar um impacto sobre o sistema neuroendócrino, ou seja, a elevação dos níveis de cortisol poderia influenciar as propriedades migratórias das sub-populações de linfócitos para o local da mucosa oral, conduzindo, assim, a uma propensão elevada para desenvolver a forma mais agressiva de LPO, isto é, o LPO erosivo.

Camisa, Hamaty e Gay (1998) relataram o caso de um paciente que desenvolveu o carcinoma no mesmo sítio anatômico em que há 7 anos teve diagnóstico histopatológico de LPO em placa. O sítio foi o dorso da língua que é um local considerado de baixo risco, atípico, para o desenvolvimento de carcinoma espinocelular.

Lo Muzio et al. (1998), numa avaliação clínica de 14 casos de LPO com evolução para carcinoma espinocelular oral, investigaram a possível associação de líquen, carcinoma e hepatite C crônica. Dez dos carcinomas (3,8%) se desenvolveram em área com lesões de líquen pré-existent; 3 (1,14%), em outros pontos e, em 1 caso, o diagnóstico das duas lesões foi sincrônico (0,38%). Em 3 pacientes o anticorpo anti-HCV foi positivo. Concluíram que esses dados, juntos com uma evidência histológica de progressão para o carcinoma, sugerem a probabilidade de, em alguns casos, o LPO ter uma propriedade intrínseca de predisposição à transformação neoplásica e acreditam ser necessário acompanhar os pacientes regularmente, principalmente aqueles com a forma clínica de líquen atrófico ou erosivo, e em placa em dorso da língua.

Rajentheran et al. (1999) investigaram o potencial de transformação maligna do LPO, e possíveis fatores associados com a transformação maligna, revisando, retrospectivamente, os registros de 832 pacientes com LPO confirmado histologicamente durante o período 1983-1996. Destes, 7 (0,8%) desenvolveram carcinoma espinocelular. Três pacientes tinham história de tabagismo e um, de etilismo. Dos 7 casos, 5 evoluíram de LPO erosivo, 1 de atrófico e 1 de LPO em placa. Concluíram que o risco da transformação maligna em LPO é real, mas não elevado. Aconselham que os profissionais devem ter mais atenção com os pacientes com LPO, pois a possibilidade de cancerização nestes é maior, e que tais pacientes são diferentes dos pacientes típicos que desenvolvem o carcinoma oral. Recomendam o acompanhamento dos pacientes por, no mínimo, 6 anos.

Chainani-Wu et al. (2001) conduziram um estudo retrospectivo descritivo usando dados de 229 pacientes com LPO, examinados no período de 1996 a 2000. A forma reticular estava presente em 56 pacientes (24,4%), a atrófica, em 77 (33,6%) e a forma erosiva, em 96 pacientes (41,9%). Durante o período de

acompanhamento, 4 pacientes (1,7%) desenvolveram carcinoma espinocelular em sítios com lesões de LPO confirmadas por exame histopatológico. Os sítios foram o lábio inferior, região retromolar mandibular, gengiva e tuberosidade. Os autores acreditam que o risco de cancerização em LPO é extremamente baixo e, por isso, não consideram LPO como uma condição cancerizável. Entretanto, reconheceram que o risco de desenvolver carcinoma é maior em pessoas com LPO quando comparado com aquelas que não têm LPO. Conseqüentemente, recomendaram um longo período de acompanhamento.

Mignogna et al. (2001), com o objetivo de descrever um guia clínico para avaliar o possível risco da transformação maligna em lesões de LPO, avaliaram 502 pacientes com LPO e, durante 5 anos de acompanhamento, detectaram 24 carcinomas: excluindo três casos em que os diagnósticos de LPO e de carcinoma espinocelular oral eram sincrônicos e três pacientes que tiveram uma história de uso de tabaco, a transformação maligna de LPO pareceria ser 3,7%. Os autores concluíram que os critérios clínicos usados nessa avaliação permitiram a detecção de 28,5% dos carcinomas espinocelulares orais *in situ*, 33,2% como carcinoma espinocelular oral microinvasivos, 28,5% como estágio I e 4,7% como estágio II, com uma melhoria notável no prognóstico, comparado a um estudo precedente (LO MUZIO et al., 1998), no qual foram adotados critérios diferentes do atual.

Femiano e Scully (2005b) tentaram evidenciar, por reação em cadeia de polimerase (PCR), a presença de vírus da hepatite C (HCV) no epitélio oral de 100 pacientes com e sem LPO. O PCR não detectou o genoma viral no epitélio oral dos pacientes com LPO e HCV positivos, mas houve um aumento nos níveis de TNF-alfa e uma redução de interleucinas (IL-1, INF- γ , e IL-8) quando comparado aos pacientes que tinham LPO e HCV negativos e aos controles negativos. Os resultados indicaram que os pacientes HCV positivos apresentaram uma redução de fatores pró-inflamatórios, mas um aumento nas citocinas imunomoduladoras, sugerindo a possibilidade que HCV exerça um efeito indireto no desenvolvimento de líquen plano.

Bascones et al. (2005), com intuito de estimar a importância quantitativa dos mecanismos de controle do ciclo celular, analisaram os fenômenos de interrupção,

senescência e apoptose do epitélio oral afetado por LPO, para verificar se esses fenômenos podem influenciar na transformação maligna. Através de alguns marcadores biológicos (TUNEL, caspase-3, Bax e p21), compararam os espécimes de biópsia de 32 pacientes com LPO e 20 controles com mucosa oral normal. Concluíram que células epiteliais afetadas por LPO têm uma resposta muito baixa para apoptose e mecanismos de interrupção do ciclo celular que possam produzir um substrato que favoreça a transformação maligna.

Manz, Paasch e Sticherling (2005) e Sengupta e Gangopadhyay (2006) relataram que, em contraste com o líquen plano (LP) cutâneo, que é raro, o LPO é mais freqüente e um maior número de casos sofre transformação maligna.

Xue et al. (2005) coletaram dados de 674 prontuários de pacientes com LPO, histologicamente confirmados, entre 1963 e 2003. A transformação maligna foi observada em 4 pacientes, em locais de lesões previamente diagnosticados como líquen plano erosivo ou atrófico.

Laeijendecker et al. (2005) realizaram um estudo retrospectivo de coorte em 200 pacientes com LPO, conduzido entre 1991 e 2003, para avaliar a intensidade dos fatores intrínsecos ou a contribuição dos extrínsecos na transformação maligna de LPO. Destes, 3 (1.5%) pacientes desenvolveram um carcinoma espinocelular oral no mesmo local do diagnóstico inicial do LPO após períodos entre 3 a 6 anos. Entretanto, em 2 desses pacientes foram observados fatores de risco externos (um tabagista há 20 anos e outro com tratamento imunossupressor sistêmico por 2 anos). Concluíram que, nesse estudo, a incidência exata da transformação maligna em LPO foi difícil de estabelecer por causa do número baixo de pacientes e da possível contribuição dos fatores de risco externos.

Bornstein et al. (2006) examinaram 145 pacientes diagnosticados clinicamente e histopatologicamente com LPO, entre os anos de 1995 e 2001, com o intuito de diagnosticar uma possível transformação maligna em um local previamente biopsiado de LPO. Durante o período de acompanhamento, 4 pacientes desenvolveram carcinoma espinocelular em região de LPO; e, em 3 desses casos, a displasia estava presente no diagnóstico inicial de LPO. Isso resultou em uma taxa

de transformação maligna de 2,84%; e se os 3 pacientes com displasia forem excluídos, a taxa cai para 0,71%.

Ingafou et al. (2006) coletaram dados de registros de 690 pacientes consecutivos com características clínicas de LPO, geralmente confirmadas de forma histopatológica e encontraram uma taxa de transformação maligna de 1,9%.

Gonzáles-Moles et al. (2006), para obter as bases moleculares em epitélio predisposto à transformação maligna, de pacientes com LPO, estudaram a expressão das proteínas p53, p21, ki-67, Bcl-2 e caspase-3 b em biópsias de 51 pacientes com LPO e em 26 controles. Concluíram que as células epiteliais no LPO não desenvolvem apoptose, mas, ao invés disso, impedem o ciclo ou um aumento da taxa de proliferação, o que poderá criar um substrato apropriado para a transformação maligna.

Hsue et al. (2007) acompanharam um grupo de pacientes com lesões epiteliais orais potencialmente malignas para estimar a taxa e o tempo de transformação maligna. Um total de 1458 pacientes com diagnósticos histológicos de várias lesões orais pré-malignas foi acompanhado de 1991 a 2001 e, entre elas, 143 casos de LPO (9,80%), com um acompanhamento médio de 42,64 meses. Três casos de LPO desenvolveram câncer oral no mesmo local das lesões iniciais.

Mithani et al. (2007) investigaram as alterações moleculares genéticas em lesões de LPO, leucoplasia, eritroplasia e as relacionaram com as alterações demonstradas em carcinomas espinocelulares orais com o objetivo de definir as mudanças que conduzem à transformação maligna. Acreditam que a distinção entre lesões orais benignas e potencialmente malignas são correntemente baseadas no exame histológico de espécimes de biópsia de lesões suspeitas, mas que na ausência de displasia ou de um franco carcinoma, a habilidade para quantificar o risco associado na diversidade de lesões orais clinicamente distintas é limitada, pois existe uma significativa sobreposição e sutileza no diagnóstico dessa diversidade de lesões. E inúmeros estudos demonstram alterações moleculares genéticas idênticas em lesões de LPO, leucoplasia e eritroplasia, que também são encontradas em carcinomas espinocelulares orais.

Ismail, Kumar e Zain (2007) realizaram uma ampla revisão da literatura inglesa até agosto de 2006 e encontraram, nos artigos publicados, uma variação de 0% a 5,3% na estratificação de risco, em lesões de LPO, e as taxas mais altas foram atribuídas às lesões de LPO atrófico e erosivo. Para eles, a incidência e os mecanismos exatos de transformação são ainda controversos.

2.6 CITOMETRIA DIGITAL EM LÍQUEN PLANO ORAL

O primeiro estudo de ploidia de DNA em LPO, com publicação, foi realizado por Pfitzer e Pape em 1975. Utilizaram citometria digital, em amostras citológicas, e analisaram os histogramas e a distribuição de frequência dos graus de ploidia de DNA em 22 lesões da cavidade bucal, dentre as quais estava incluído um caso de líquen plano que apresentou um padrão diplóide.

Em 1991, Biesterfeld et al. analisaram um número maior de casos de LPO. Com o intuito de averiguar se o padrão de distribuição de DNA dessa lesão mostrava anormalidades que pudessem provar que LPO é uma condição cancerizável, analisaram, por citometria digital e com técnica de segmentação celular, a distribuição de DNA em 29 casos de LPO, sendo 15 atróficos e 14 erosivos, todos negativos para o papilomavírus humano e nenhum suspeito de ser pré-neoplásico. As células foram coradas pela reação de Feulgen. O conteúdo de DNA de, pelo menos, 20 linfócitos por lâmina, corrigido por um fator de 1,25, serviu como uma referência para estabelecer o padrão diplóide (2c). Observaram que todos os 29 casos de LPO revelaram um padrão de distribuição diplóide; 25 (86%) deles revelaram células com conteúdos de DNA acima do nível G₂M de 4c, e 5 (17%) tiveram conteúdos de DNA acima de 8c, obtendo valores de até 11,5c. Nenhuma diferença foi encontrada entre o tipo erosivo e não erosivo. Concluíram que esses valores aumentados de DNA, em lesões consideradas não pré-malignas, devem ser interpretados como poliploidização euplóide e uma vez que, as mensurações de DNA foram realizadas para propósitos diagnósticos em lesões de líquen não suspeitas de transformação maligna.

Gombos et al. (1993), por citometria digital e com técnica de segmentação celular, avaliaram o potencial maligno intrínseco do LPO. Selecionaram 10 casos de pacientes com LPO, 3 da forma reticular, 2 em placa, 2 atróficos, 2 erosivos e 1 atrófico-erosivo. Oito casos apresentaram histogramas nos limites da normalidade, 1 caso expressou uma leve cota de aneuploidia, e o outro caso apresentou aneuploidia com claro valor pré-neoplásico. Concluíram que a utilização de citometria digital de DNA pode ser útil para determinar uma condição pré-maligna, como o LPO, em um estágio mais precoce possível.

Mollaoglu, Cowpe e Lewis (2001) relatam o caso de um paciente com uma lesão com diagnóstico clínico de LPO em que foram realizadas sucessivas citologias esfoliativas e citometria digital para identificar o grau de ploidia do DNA e a medida da área nuclear. Após um período de 8 semanas houve elevação do grau de ploidia (presença de aneuploidia), e optaram pela biópsia incisional que evidenciou um carcinoma espinocelular. Os autores acreditam que a associação da citologia com a citometria por imagem do DNA não são substitutos para a biópsia, mas podem atuar como excelentes auxiliares e indicadores do momento ideal para a realização de biópsia. A combinação da avaliação citológica, citométrica e histológica em lesões pré-malignas, como o LPO, produz a mais alta porcentagem de diagnósticos precoces do câncer oral. Concluíram que a citologia quantitativa é um auxiliar útil e simples para o exame clínico dos pacientes cujas lesões orais estão sendo monitoradas regularmente durante um longo período de tempo.

Mattila, Alanen e Syrjanen (2004) avaliaram a presença de aneuploidia no líquen plano oral atrófico-erosivo e a sua utilidade como um marcador prognóstico em 81 amostras de biópsias emblocadas em parafina. Aproximadamente 150 núcleos aleatórios das camadas epiteliais basal e/ou parabasal foram analisados com citometria digital, e os resultados foram correlacionados com histologia e com os dados clínicos. Aneuploidia foi detectada em 41% das amostras, sendo que os LPO com ulcerações localizados na língua tiveram valores significativamente mais elevados. Os autores concluíram que LPO ulcerado do tipo atrófico-erosivo na língua, e com displasia, possui risco elevado para desenvolver câncer, e a presença de aneuploidia pode ser útil em prognosticar esse risco.

Maraki, Becker e Boecking (2004) analisaram, com citometria digital, 23 lesões que exibiram alterações na citologia esfoliativa, incluindo positividade para células neoplásicas e, entre estas, 2 casos de LPO. O padrão aneuplóide foi encontrado em 19 lesões por citometria de imagem (15 carcinomas, 3 eritroplasias e 1 leucoplasia); as outras 4 lesões apresentaram DNA poliplóide. Concluíram que o emprego da citologia esfoliativa na determinação do grau de ploidia possui 100% de sensibilidade e 97,4% de especificidade diagnóstica, quando se usa o diagnóstico histopatológico como padrão ouro.

Femiano e Scully (2005a) avaliaram o grau de ploidia do DNA em biópsias de lesões de leucoplasia oral e de LPO e fizeram a correlação com o grau de displasia. Analisaram biópsias incisionais de um grupo de 40 pacientes com leucoplasia (20 homogêneas e 20 não-homogêneas) e 45 pacientes com LPO (25 erosivos e 20 reticulares), pela citometria digital de DNA, após análise histológica por hematoxilina e eosina. Oito das 20 leucoplasias não-homogêneas mostraram aneuploidia, 2, dos 25 casos de líquen plano erosivo, mostraram-se aneuplóides, e todos os demais casos de LPO, inclusive os reticulares, foram diplóides. Não houve concordância entre ploidia de DNA e o grau da displasia avaliado.

Maraki et al. (2006), com o objetivo de detectar ou excluir a possibilidade de transformação maligna em lesões de LPO, investigaram o valor diagnóstico da citologia esfoliativa e da citometria digital do DNA em 56 pacientes. Nos 6 casos em que a citologia foi suspeita de apresentar células neoplásicas, os conteúdos nucleares do DNA foram medidos, utilizando citometria digital e 2 deles eram aneuplóides. Quando realizaram a comparação entre o diagnóstico citológico, citometria de DNA e a histologia da biópsia, obtiveram concordância total (LPO sem displasia: 54 casos, e carcinoma de célula escamosa em LP: dois casos, com aneuploidia). Concluíram que a citologia com citometria de DNA é um método altamente sensível, específico, e não invasivo, que pode ser utilizado para acompanhamento periódico de lesões de LPO, com o objetivo de detectar precocemente ou de excluir a transformação maligna.

Rode et al. (2006), utilizando citometria digital, analisaram as mudanças da cromatina refletidas nos aspectos da textura nuclear e grau de ploidia de DNA de 28 pacientes com LPOR e compararam à mucosa bucal de 50 controles saudáveis e a mudanças associadas com cancerização observadas nas células da mucosa bucal de 50 pacientes com câncer no pulmão. Todos os espécimes de LPOR mostraram padrão diplóide. Concluíram que existem mudanças na cromatina no LPOR quando comparadas às células normais; porém, a estrutura da cromatina na forma reticular de LPO não expressa mudanças associadas com malignidade e é mais semelhante às células epiteliais normais.

Neppelberg e Johannessen (2007) acreditam que o LPO pode ser associado com um risco pequeno de transformação maligna. Avaliaram o grau de ploidia de DNA, por citometria de imagem, e outros marcadores biológicos de risco de cancerização (Cox-2, E-caderina) em 26 pacientes com LPO que haviam realizado duas biópsias, das quais 7 apresentaram displasia epitelial e, em 5 destas, houve progressão para carcinoma espinocelular. Também analisaram espécimes de 19 pacientes com LPO com somente uma biópsia realizada e, ainda, em 7 controles de mucosa normal. Um LPO com displasia epitelial foi classificado como tetraplóide, 25 biópsias de LPO como diplóides, e todos os carcinomas eram diplóides. Concluíram que nem a aneuploidia, nem a sobre expressão Cox-2, ou perda da expressão de E-caderina, são marcadores preditivos confiáveis do risco de cancerização em lesões de LPO.



3 PROPOSIÇÃO

3.1 Hipótese

É possível estabelecer uma relação entre os graus de ploidia de DNA e a forma clínica do líquen plano oral.

3.2 Objetivo Geral

Comparar a ploidia de DNA entre lesões de líquen plano oral do tipo reticular e atrófico-erosivo.

3.3 Objetivos Específicos:

- a) Verificar o grau e a frequência de ploidia de DNA, pela técnica de citometria digital, em lâminas com espécimes de biópsias de lesões de líquen plano oral do tipo reticular e atrófico-erosivo.
- b) Analisar 14 padrões de medidas cariométricas de núcleos de células epiteliais em espécimes de biópsias de líquen plano oral reticular e atrófico-erosivo da cavidade bucal, pelo método de citometria digital.



4 METODOLOGIA

4.1 DELINEAMENTO DA PESQUISA

O estudo foi classificado como retrospectivo relacional descritivo (FLETCHER; FLETCHER; WAGNER, 2003).

4.2 APROVAÇÃO DO PROJETO DE PESQUISA

O projeto do presente estudo foi aprovado pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS e pelo Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS (Anexos B e C).

4.3 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

4.3.1 População

Espécimes de biópsias de lesões da cavidade oral incluídos em parafina, do arquivo do Laboratório de Patologia do Serviço de Estomatologia do Hospital São Lucas (SEHSL) da Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul (PUCRS).

4.3.2 Amostra

A amostra foi intencional e constituída por 40 espécimes de biópsias de líquen plano oral, e por 8 biópsias de hiperplasias fibroepiteliais (grupo controle). As interpretações histopatológicas foram coletadas do Livro de Registro do Laboratório de Patologia do SEHSL.

O grupo de estudo foi constituído por biópsias de pacientes adultos de ambos os sexos, de acordo com os diagnósticos clínicos e histopatológicos de líquen plano oral e dividido em dois grupos de acordo com a classificação de Seoane et al. (2004) assim denominados:

Grupo R: constituído por 20 biópsias de líquen plano oral reticular. As biópsias foram coletadas de pacientes que apresentavam, na mucosa oral, somente lesões com aspecto clínico característico de líquen plano reticular (LPOR), ou seja, com presença de máculas, placas e/ou pápulas com linhas brancas entrelaçadas, reticulares (estrias de Wickham) (Figura 1 A).

Grupo AE: constituído por 20 biópsias de líquen plano oral atrófico-erosivo. As biópsias foram coletadas de pacientes que apresentavam, na mucosa oral, áreas ou máculas eritematosas em fundo atrófico com ulceração central, geralmente com estrias ceratóticas esbranquiçadas radiantes periféricas (estrias de Wickham). Necessariamente as áreas atrófica e ulcerada estavam presentes e eram incluídas na biópsia (Figura 1 B).

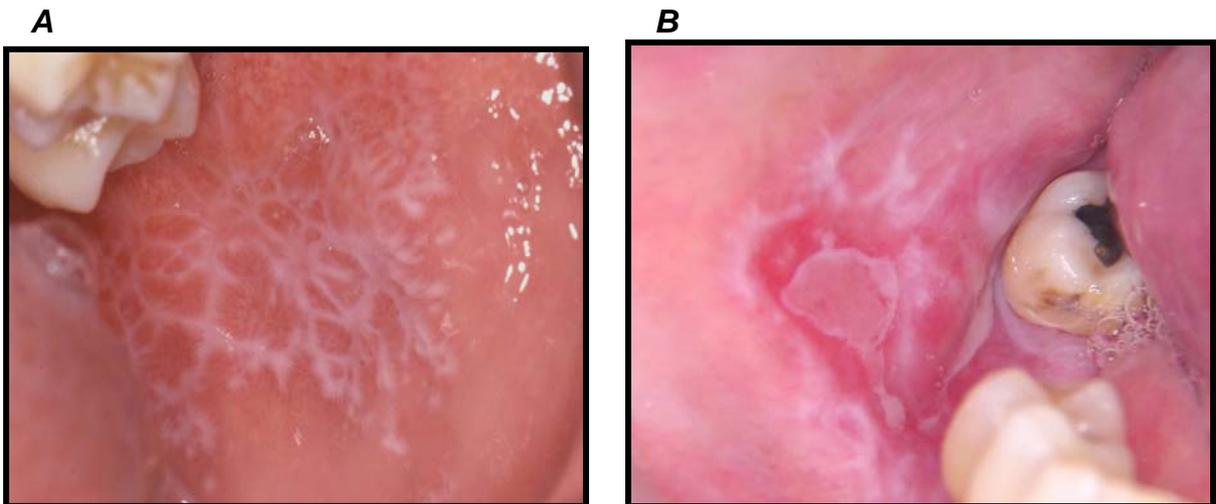


Figura 1 – A. Aspecto clínico de líquen plano reticular em mucosa jugal. **B.** Aspecto clínico de líquen plano atrófico-erosivo em mucosa jugal

Fonte: Serviço de Estomatologia do HSL da PUCRS, Porto Alegre, RS – 2008.

Grupo Controle: As 8 amostras de hiperplasia fibroepitelial constituíram o grupo controle e foram incluídas para o estabelecimento do fator de correção, necessário à técnica de citometria digital. Foram selecionados intencionalmente em lâminas nas quais o epitélio não apresentasse displasia e exibisse grau de ploidia diplóide. Esse fator de correção é o quociente entre o valor da média da IOD das células epiteliais com padrões de normalidade e o valor da média da IOD dos linfócitos de referência. Para tal foram utilizadas lâminas preparadas e analisadas sob técnica e condições idênticas às do grupo de estudo e já previamente analisadas por citometria digital (GABRIEL, 2006).

4.3.3 Critérios de inclusão

Foram incluídos espécimes de biópsias com fichas de biópsia completas, de pacientes com diagnóstico clínico de líquen plano reticular e erosivo, com algumas das seguintes características histopatológicas (NEVILLE et al., 2004):

- a) graus variáveis de ortoceratose e paraceratose na superfície do epitélio;
- b) cristas interpapilares ausentes ou hiperplásicas, em ponta ou em forma de "dentes de serra";
- c) degeneração hidrópica da camada de células basais do epitélio;
- d) infiltrado inflamatório intenso e em banda, principalmente de linfócitos T, imediatamente subjacente ao epitélio;
- e) presença de ceratinócitos apoptóticos, que podem ser vistos na área da interface epitélio-tecido conjuntivo, sendo chamados *corpos de Civatte* (Figura 2).
- f) presença de área ulcerada no epitélio de amostras de biópsia de lesões de LPO da forma atrófica-erosiva (Figura 3).

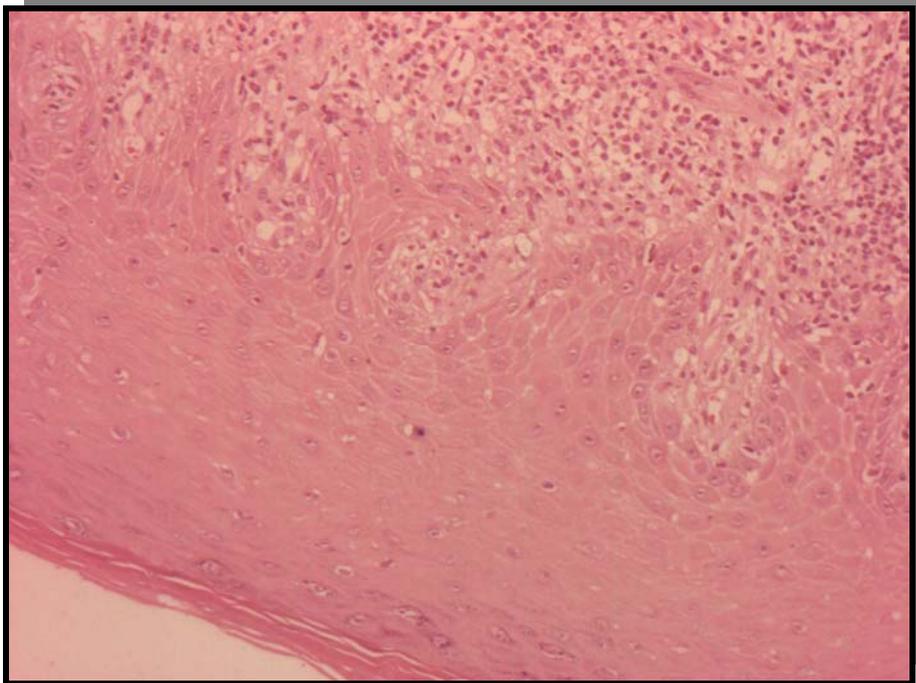


Figura 2 – Fotomicrografia de líquen plano oral reticular em mucosa jugal exibindo fina faixa de tecido conjuntivo fibroso revestida por epitélio pavimentoso estratificado com hiperqueratose, acantose, cristas interpapilares em forma de “dentes de serra”, degeneração da camada de células basais do epitélio (degeneração hidrópica), ceratinócitos degenerados (corpos de Civatte) na área de interface epitélio-conjuntivo e um infiltrado de linfócitos em banda imediatamente subjacente ao epitélio (HE, aumento de 100x)

Fonte: Serviço de Estomatologia do HSL da PUCRS, Porto Alegre, RS – 2008.

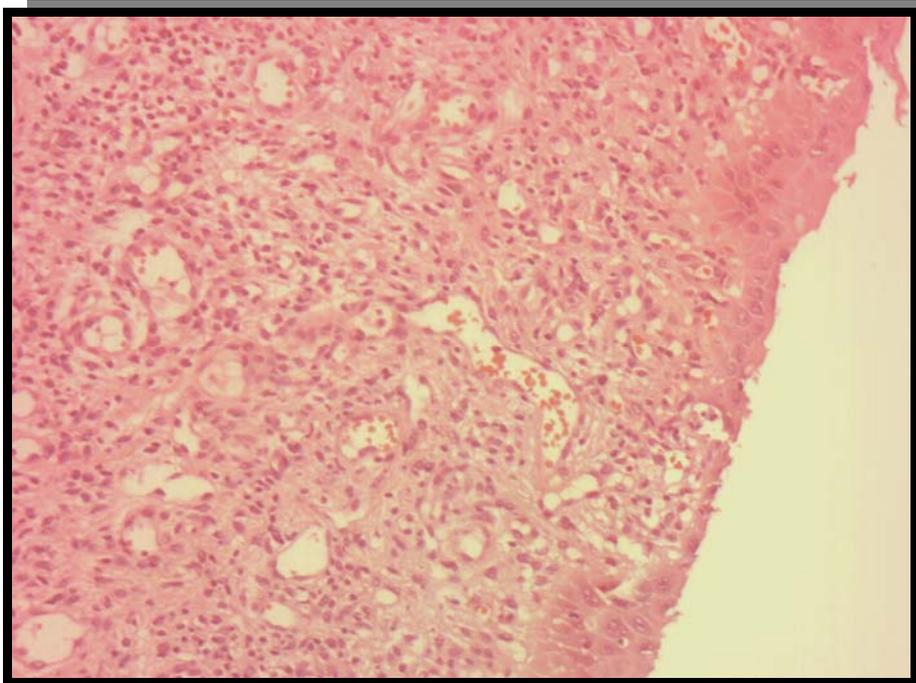


Figura 3 – Fotomicrografia de líquen plano oral atrófico-erosivo em mucosa jugal. Nota-se área da ulceração. (HE, aumento de 100x)

Fonte: Serviço de Estomatologia do HSL da PUCRS, Porto Alegre, RS – 2008.

4.3.4 Critérios de exclusão

Não foram incluídos na amostra espécimes de biópsias de pacientes que realizaram radioterapia ou quimioterapia.

4.4 PROCEDIMENTOS

4.4.1 Coleta dos dados

Para cada amostra foi elaborada uma ficha padrão para a coleta de dados (Apêndice A) em que foram anotados os dados pessoais, a história médica e os hábitos do paciente, dados relativos à lesão e aos resultados da pesquisa.

4.4.2 Preparação dos espécimes

Após a seleção dos espécimes incluídos em parafina, foram realizados cortes com 15 μ m de espessura, os quais foram montados em lâminas de vidro silanizadas, conduzidos à estufa e mantidos a 60°C por 20 minutos.

Essa espessura dos cortes é necessária para se obter núcleos de células epiteliais e imagens dos respectivos conteúdos de DNA na íntegra, para poder quantificar adequadamente o grau de ploidia.

Os cortes foram corados com coloração de Feulgen (Figuras 4 e 5) pelo emprego do *Kit* comercial (MERCK®, Darmstadt, Alemanha), de acordo com as instruções do fabricante (Anexo A). Para padronização dos procedimentos de coloração, todas as lâminas do grupo de estudo foram coradas em um único momento.

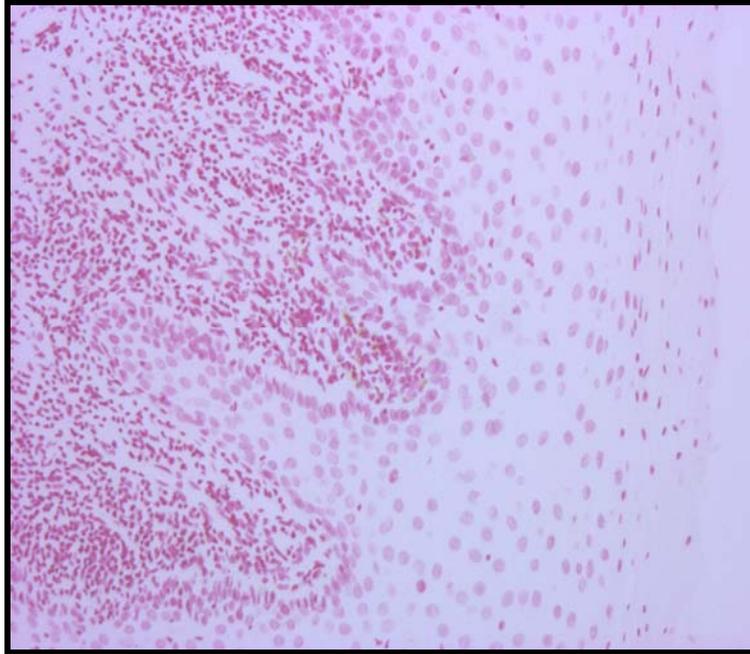


Figura 4 – Fotomicrografia de lâmina de LPOR corada pela reação de Feulgen (100x). Devido à especificidade da coloração pelo DNA celular, apenas os núcleos são corados
Fonte: Dados da Pesquisa

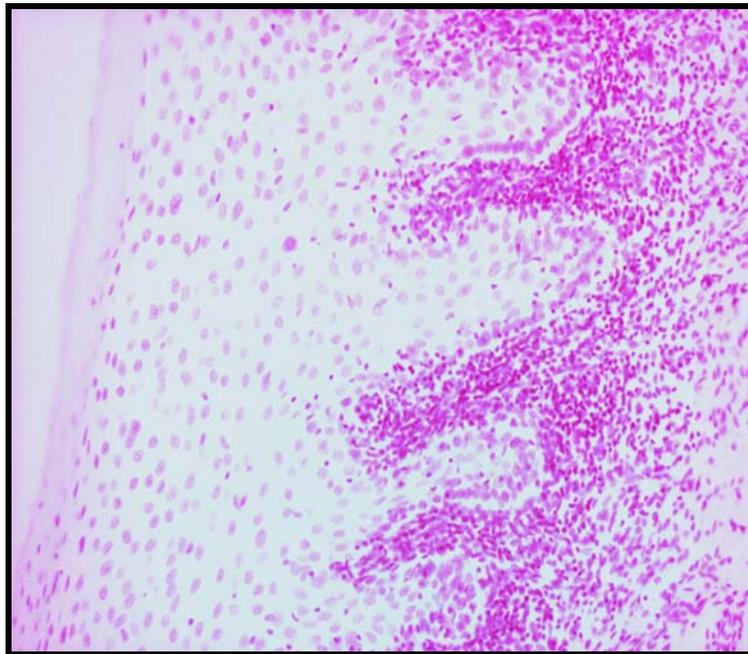


Figura 5 – Fotomicrografia de lâminas de LPOAE coradas pela reação de Feulgen (100x)
Fonte: Dados da Pesquisa

Os núcleos de células sangüíneas da série branca (linfócitos), destinados ao controle interno do grau de ploidia diplóide (2n) foram obtidos das mesmas lâminas das biópsias das lesões de líquen plano (Figura 6).

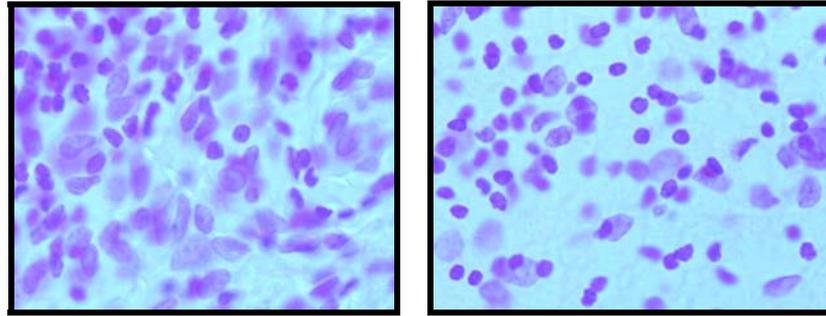


Figura 6 – Fotomicrografias de lâminas coradas pela reação de Feulgen (400x) exibindo predominantemente campos com linfócitos
 Fonte: Dados da Pesquisa

4.4.3 Citometria digital

Para a obtenção das medidas digitais, foram executadas as seguintes etapas: captura das imagens digitais, segmentação (seleção e recorte) da imagem dos núcleos de células epiteliais e construção de cariogramas, citometria estática dos cariogramas (Figura 7).

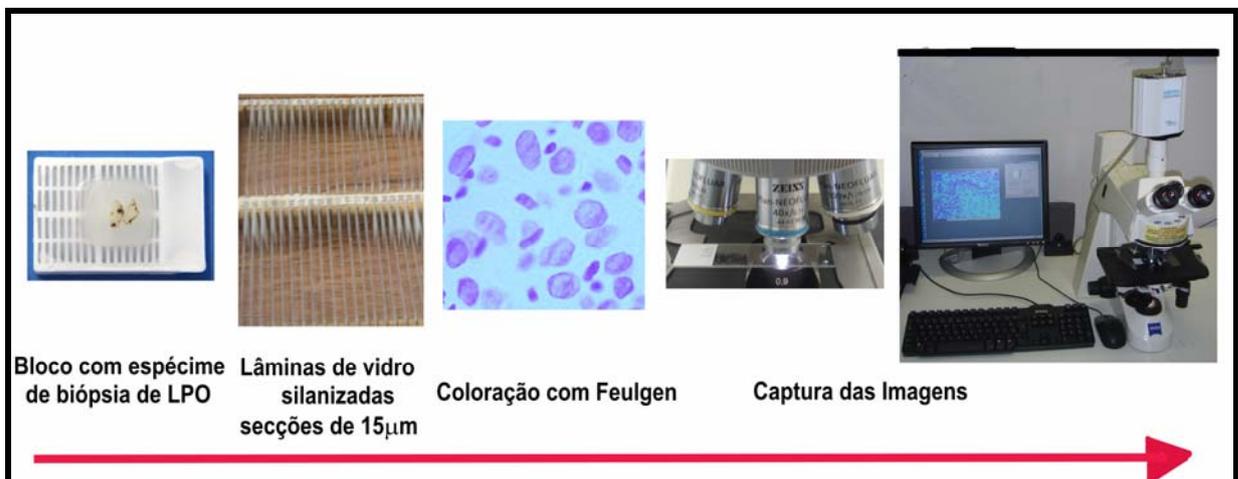


Figura 7 – Seqüência das etapas referentes à preparação dos espécimes e coleta de dados

Fonte: Dados da pesquisa.

4.4.3.1 Captura das imagens

A captura das imagens foi realizada na mesma semana em que foi realizada a coloração das lâminas pelo método de Feulgen.

Para a captura das imagens foram empregados os seguintes elementos: um componente óptico, um dispositivo CCD, placas digitalizadoras de imagem e um microcomputador.

O componente óptico utilizado para a captação das imagens foi o microscópio óptico convencional marca Olympus modelo BX 60 (Tóquio, Japão), dotado de sistema de iluminação Koehler, com fonte estabilizada e regulável de luz incandescente e condensador Abbé com abertura numérica de 0,9, fototubo, óptica plana com objetiva de 40 aumentos, ampliação de 1x e lentes de projeção com 10 aumentos, determinando resoluções finais de 400 aumentos.

O dispositivo CCD continha uma videocâmara Sony 3 CCD DXC 970MD (Sony, Park Ridge, NJ, EUA) conectada ao fototubo do microscópio para captura de imagens. As imagens foram monitoradas durante as sessões de captura em monitor de vídeo Sony (Park Ridge, NJ, EUA) Trinitron PVM 1954Q com tela de 17 polegadas.

Foram empregadas duas placas digitalizadoras de imagem PCI de captura estática, gerando quadros de 640x480 pixels, cores de 24 bits. As imagens foram gravadas em disco rígido, com cópias de segurança em DVD gravável. Os arquivos de imagem foram gravados no formato TIFF (*Tagged Image File Format*).

As placas de captura de imagem foram conectadas a um microcomputador padrão IBM-PC com processador Intel Pentium IV Duo Core 3200MHz (Intel, Santa Clara, CA, EUA), 1 GB de memória RAM, disco rígido de 250GB e monitor de 17 polegadas. O sistema operacional empregado foi o Microsoft Windows XP 2000 professional edition (Microsoft, Redmond, WA, EUA).

A partir de cada lâmina, foram capturadas imagens de 40 a 80 campos visuais consecutivos, obtidos seqüencialmente, desde uma das extremidades do epitélio, realizando movimentos de varredura e abrangendo as camadas basal, para-basal e espinhosa, até atingir a outra extremidade do epitélio do fragmento analisado (Figura 8), e para tal foi utilizado *software* Image Pro-Plus (Figura 9).

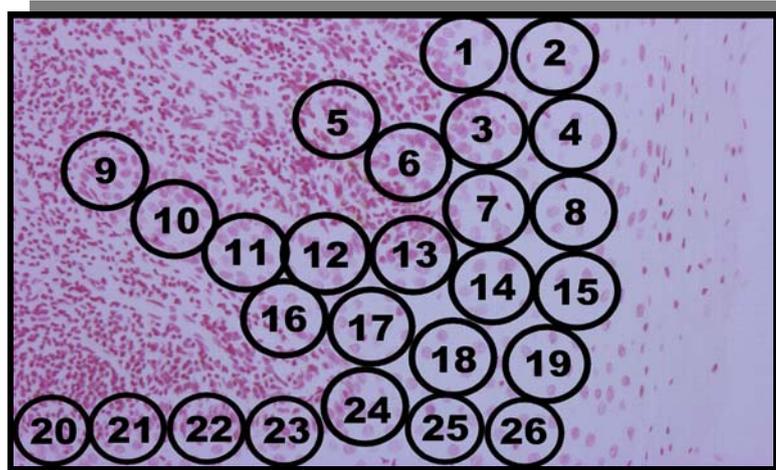


Figura 8 – Seqüência de captação de fotomicrografias coradas pelo método de Feulgen realizando movimentos em forma de varredura (Aumento de 400x)
 Fonte: Dados da pesquisa.

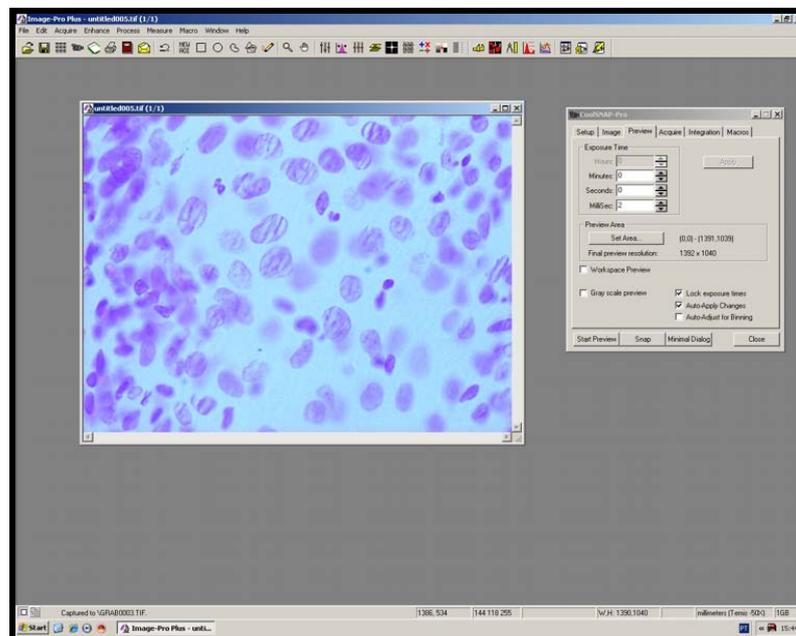


Figura 9 – Captura das imagens das lâminas de LPO coradas pelo método de Feulgen (Aumento de 400x) no *software* Image Pro-Plus
 Fonte: Dados da pesquisa.

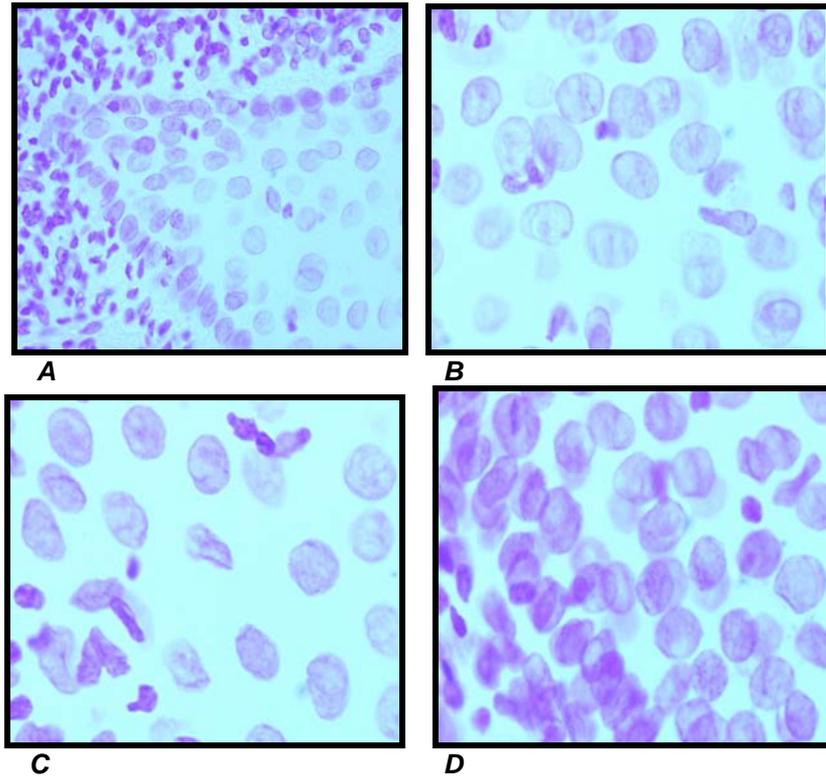


Figura 10 – A, B, C, D. Campos de fotomicrografia de lâminas de espécimes de LPOR coradas pela reação de Feulgen (400x)
 Fonte: Dados da pesquisa.

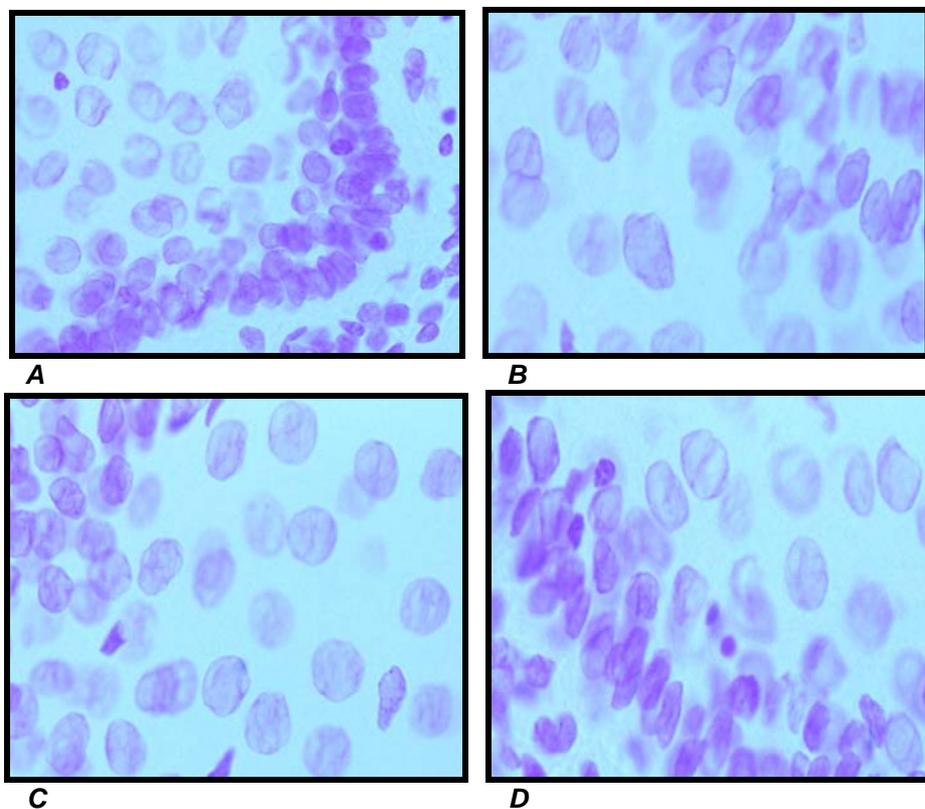


Figura 11 – A, B, C, D. Campos de fotomicrografia de lâminas de espécimes de LPOAE coradas pela reação de Feulgen (400x)
 Fonte: Dados da pesquisa.

4.4.3.2 Segmentação dos núcleos e construção do cariógrama

A especificidade da coloração de Feulgen pelo DNA celular faz com que apenas os núcleos fiquem corados (Figuras 10 e 11 – A, B, C, D).

A partir das imagens capturadas, foram selecionados as imagens dos núcleos de células epiteliais da região para-basal e da camada espinhosa que se encontravam no plano focal, e mediante o ajuste do micrométrico do microscópio óptico se apresentassem íntegros, sem contato ou sobreposição com imagens de núcleos vizinhos (Figura 12).

As imagens desses núcleos foram recortadas com auxílio do software Corel Photo-Paint versão 12 (Figuras 13 e 14) e agrupados em uma imagem no formato TIFF, com plano de fundo branco, resolução de 400 dpi e dimensões de 150x100mm (Figura 15). Desse modo, para cada lâmina, com sua seqüência de imagens capturadas, foi criada uma nova imagem, com um total de 60 imagens de núcleos de células epiteliais e mais 20 imagens de núcleos dos linfócitos, recortados das mesmas lâminas (Figura 16). Essa nova imagem foi denominada de cariógrama, que foi depois convertida para tons de cinza, no padrão 8 bits (Figuras 17 e 18).

Considerando todas as 40 lâminas de líquen plano oral, foram capturados, recortados e analisados dois mil e quatrocentos (2.400) imagens de núcleos de células epiteliais e oitocentos (800) núcleos de linfócitos. Das 8 lâminas do grupo controle foram utilizados quatrocentos e oitenta (480) imagens de núcleos de células epiteliais e cento e sessenta (160) linfócitos, perfazendo um número total de três mil oitocentos e quarenta (3.840) imagens de núcleos analisados na pesquisa.

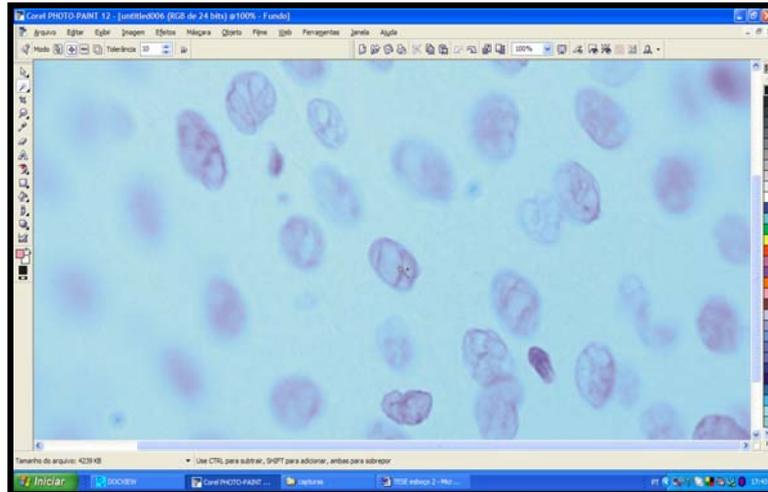


Figura 12 – Escolha do núcleo de células epiteliais em foco em um campo digitalizado (Aumento de 400x)
 Fonte: Dados da pesquisa.

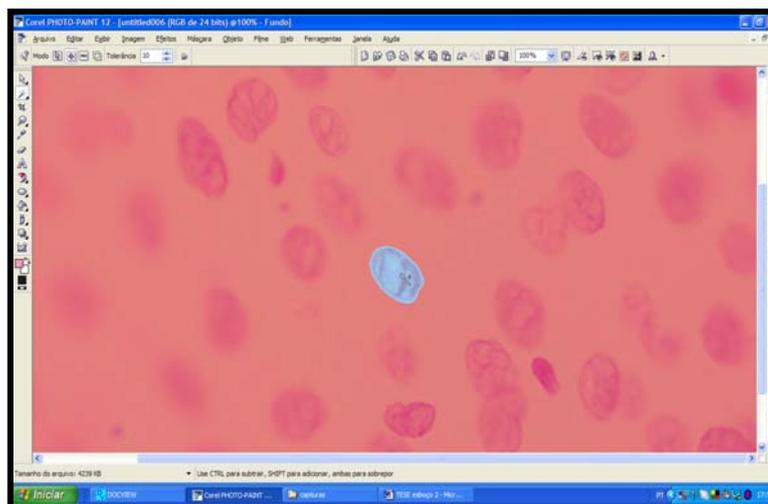


Figura 13 – Seleção do núcleo com ferramenta (*magic tool*) no software Corel Photo-Paint 12
 Fonte: Dados da pesquisa.

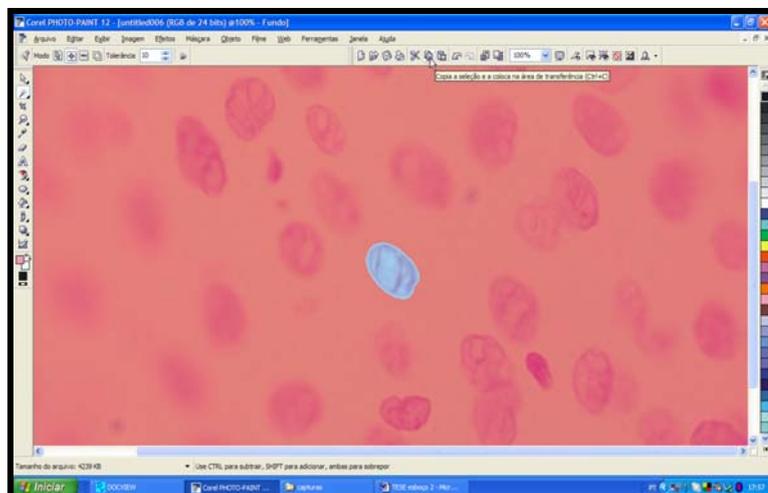


Figura 14 – Cópia do núcleo selecionado
 Fonte: Dados da pesquisa.

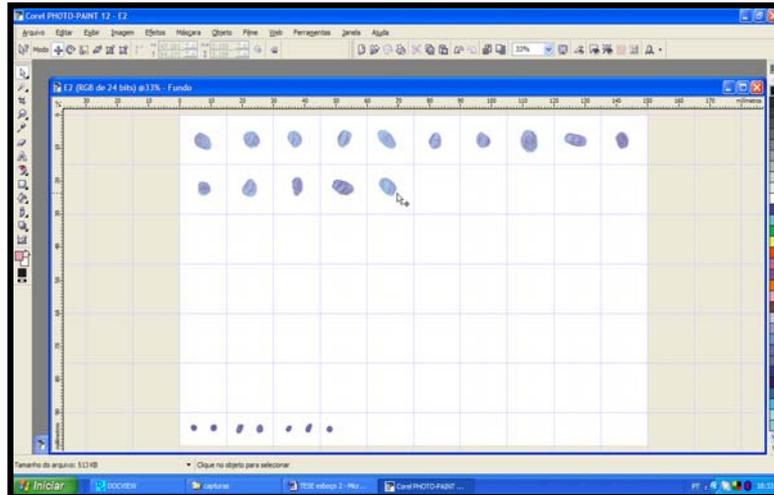


Figura 15 – Colagem do núcleo selecionado no cariógrama
 Fonte: Dados da pesquisa.

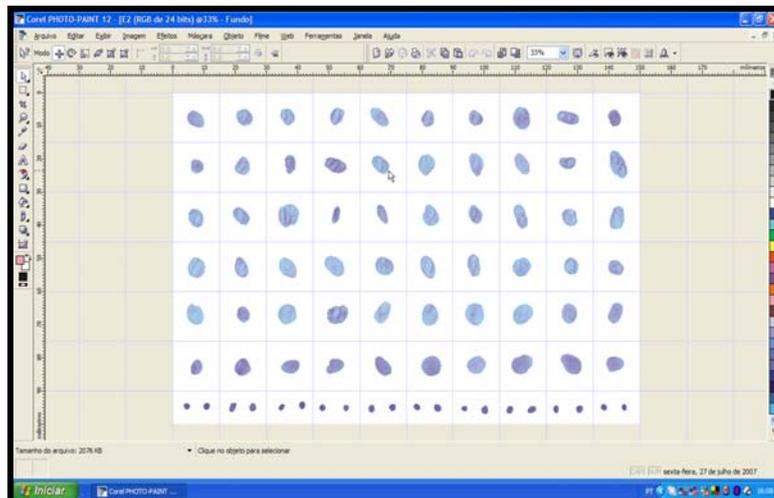


Figura 16 – Cariograma completo (60 núcleos de células epiteliais e 20 núcleos de linfócitos)
 Fonte: Dados da pesquisa.

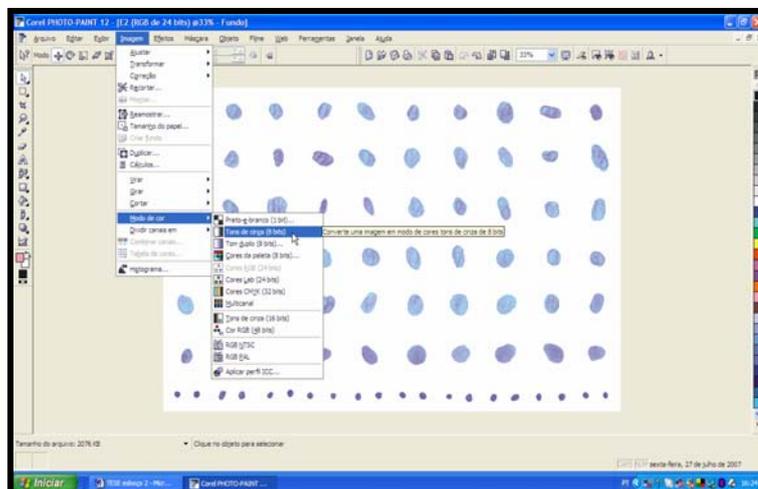


Figura 17 – Conversão do cariógrama para tons de cinza (8 bits)
 Fonte: Dados da pesquisa.

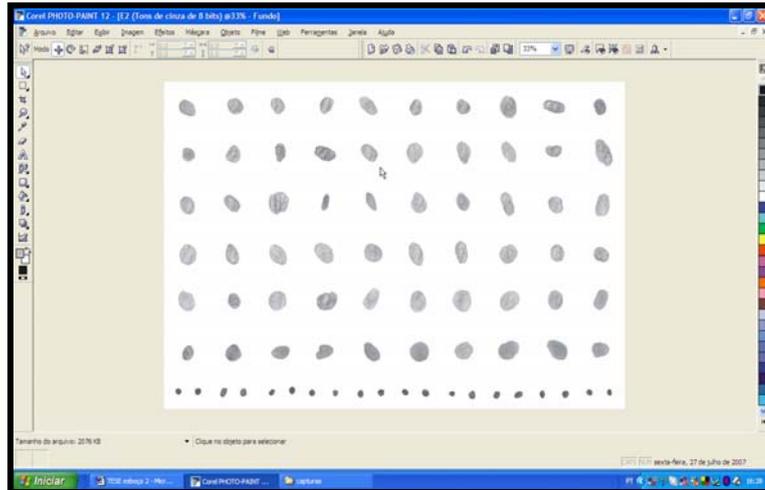


Figura 18 – Cariograma em tons de cinza (8 bits)
 Fonte: Dados da pesquisa.

4.4.3.3 Citometria estática

Para a análise citométrica foram criados 40 cariogramas para as células epiteliais e 40 cariogramas para os linfócitos. Cada um dos 80 cariogramas foi exportado para o *software* Image-Pro Plus (National Institute of Health, Bethesda, EUA), modificado pela Scion Corporation (Frederick, EUA).

Após esse processo, foram selecionadas 14 características cariométricas (área, densidade mínima, densidade média, densidade máxima, desvio padrão da densidade, dimensão fractal, IOD, diâmetro máximo, diâmetro mínimo, diâmetro médio, perímetro, *roundness*, *clumpness* e a soma das densidades nucleares) para o software quantificar, de cada núcleo de células epiteliais, e a IOD dos núcleos de linfócitos (Figura 19).

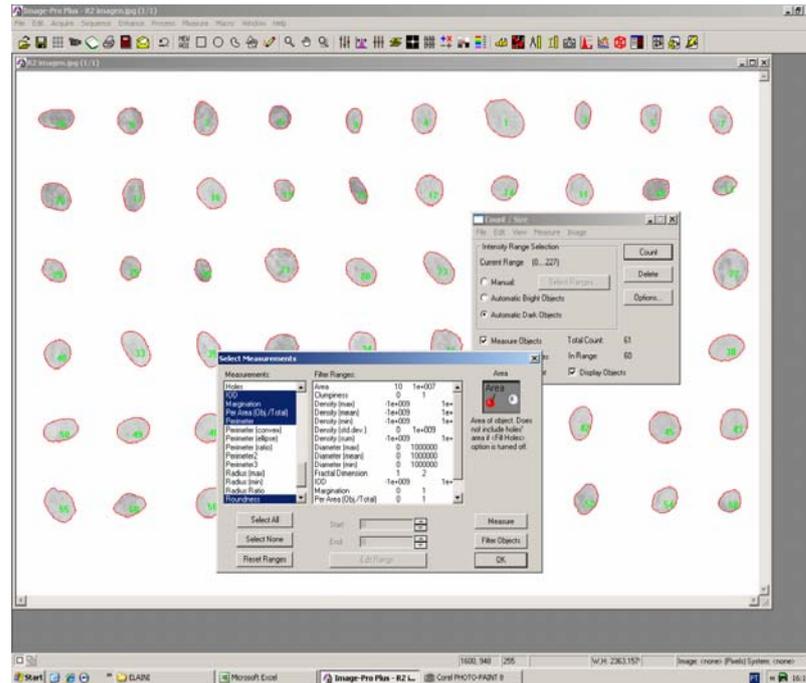


Figura 19 – Seleção e quantificação de 14 características cariométricas no *software Image Pro-plus*
Fonte: Dados da pesquisa.

As medidas obtidas a partir de cada cariograma foram exportadas para planilhas do software Microsoft Excel (Figuras 20 e 21).

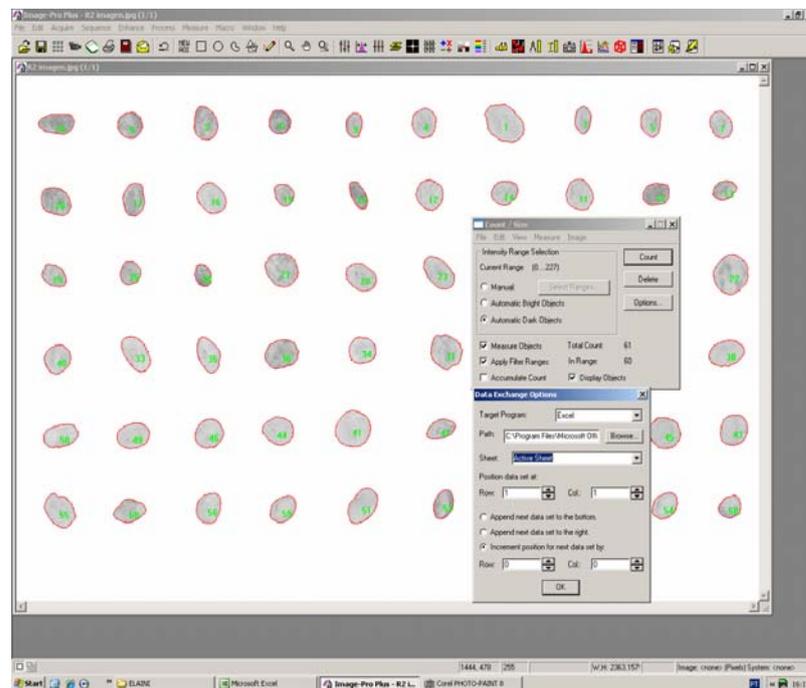


Figura 20 – Exportação dos dados de 14 características cariométricas para o *software Excel*
Fonte: Dados da pesquisa.

Objeto	Area	Density (nr Diameter	Diameter (Diameter (Perimeter	Roundness	Peri-Area	PerimeterG	IOD	Fractal Di	Density (nr Density (nr Density (nr Marginalo	Clumpens	Density (sum)							
1	10554	204.8324	137.8441	9.605E+02	114.2235	3.02E+02	1.099520	0.002036	410.4754	2161801	1.056003	184	227	6.460662	0.33979	0	2161801	
2	5965	185.6829	103.3683	73	76.55219	281.9398	1.056912	0.001608	298.3504	1113132	1.048515	150	227	12.37215	0.339804	0.011321	1113132	
3	3269	194.2663	82.05496	49.25444	82.87222	212.0021	1.094148	0.000876	222.0945	639383	1.038495	171	223	8.652262	0.340235	0	639383	
4	3014	188.8078	100.0346	74	69.36398	82.24171	201.7312	1.074467	0.001801	211.5488	569368	1.048671	157	209	8.968765	0.339647	0	569368
5	4365	200.1989	83.46653	61.81424	73.2539	241.9327	1.067075	0.001173	255.9556	873668	1.051565	161	227	9.036551	0.345597	0	873668	
6	5471	201.0053	90.96603	74.33035	82.86689	264.1897	1.015209	0.00147	261.2794	1099700	1.05911	180	227	7.890146	0.349204	0	1099700	
7	2872	187.8659	76.27562	88.00736	70.40288	227.4317	1.062304	0.001867	238.0861	662564	1.084719	133	222	13.22979	0.331807	0.008952	662564	
8	4804	179.9798	79.69443	75.96393	77.43403	245.6789	1.007161	0.001291	259.6936	864023	1.057474	142	227	13.28307	0.334804	0.005200	864023	
9	4518	201.8845	85.14693	65.39113	75.52037	247.5286	1.079162	0.001214	264.9362	912114	1.066596	172	227	8.56594	0.343831	0	912114	
10	5628	172.0081	113	89.08847	84.36621	286.3633	1.054526	0.001495	305.3504	990959	1.050389	148	225	13.88971	0.354212	0.003731	990959	
11	6244	180.5284	101.8627	75.9276	87.57159	265.3686	1.037994	0.001679	303.2793	1127219	1.060464	144	227	13.69919	0.344576	0.017464	1127219	
12	6229	204.6482	95.25428	82.30001	86.18846	287.8899	1.058806	0.001674	307.6641	1274760	1.057269	179	227	7.618266	0.342574	0	1274760	
13	6367	207.2502	97.30812	78.10249	89.96773	288.9997	1.043879	0.001711	307.6053	1321472	1.056104	186	227	8.048359	0.345259	0	1321472	
14	5462	193.6178	98.57117	87	83.20887	309.6763	1.041482	0.001466	285.3790	1001084	1.047827	156	227	12.81382	0.344727	0	1001084	
15	6126	205.1973	92.68643	83.24062	87.5189	280.2966	1.020265	0.001647	299.0783	1257449	1.061754	186	227	6.420844	0.338747	0	1257449	
16	4812	187.4279	87.59119	71.28114	78.08286	248.8603	1.024179	0.001293	304.8936	960023	1.053108	178	212	6.064094	0.339845	0	960023	
17	3137	184.5991	88.68844	81.87171	80.76027	216.1687	1.08539	0.000843	230.794	516222	1.041842	140	227	11.48373	0.347766	0	516222	
18	4548	170.2568	86.92525	63.15051	75.70390	245.9033	1.056031	0.001222	298.5951	774328	1.056547	146	226	13.35367	0.353587	0	774328	
19	3049	191.137	70.29224	87.28001	83.21864	205.3442	1.032774	0.000873	214.0681	821004	1.059983	166	227	11.11812	0.348175	0	821004	
20	3276	185.8916	77.25263	82.88687	83.186	209.4129	1.062554	0.00088	220.0861	608981	1.058427	159	227	12.07555	0.346243	0	608981	
21	8163	194.0584	100.0346	84.48388	100.9813	326.3076	1.039684	0.001799	344.6347	1989119	1.062422	161	227	10.29626	0.3295	0.00464	1989119	
22	10079	197.4295	120.689	104.69	112.3889	384.7169	1.05023	0.002708	391.0612	1989892	1.04822	162	227	11.68252	0.339259	0.000655	1989892	
23	7498	211.2671	101	91.24144	96.86397	316.7074	1.065076	0.002015	360.8195	1594001	1.059716	189	227	5.40397	0.339991	0	1594001	
24	6959	206.275	107.3013	80.69198	93.0371	306.0743	1.074363	0.001864	340.6764	1431342	1.062896	183	227	6.522626	0.340447	0	1431342	
25	6719	200.5017	116.9741	71.42129	93.44136	303.8773	1.084379	0.001805	321.12	1347171	1.042889	174	227	7.404014	0.343566	0	1347171	
26	2743	188.7116	69.77106	49.69206	57.8563	191.9621	1.089043	0.000737	203.3362	462776	1.059202	129	227	14.68833	0.34093	0.019231	462776	
27	3679	187.8652	71.8481	82.17177	87.4289	216.2175	1.011211	0.000899	228.0945	689394	1.05434	166	227	8.734371	0.343814	0	689394	
28	6148	202.6418	102.0033	72.05841	88.66814	292.6791	1.042424	0.001652	314.8357	1242153	1.069894	162	227	9.244957	0.346109	0.0025	1242153	
29	5939	205.8432	102.6499	66.18913	86.51811	287.7322	1.009312	0.001596	310.1484	1225603	1.05274	185	224	6.19171	0.336337	0	1225603	
30	4036	194.2032	84.05291	60.08033	70.95955	231.0005	1.052847	0.001804	245.1372	783804	1.057828	164	227	8.152921	0.339573	0	783804	
31	8146	198.6096	109.795	93.8616	120.7187	341.8892	1.044887	0.002189	387.9479	1817873	1.074834	171	227	8.872626	0.346431	0	1817873	
32	7881	200.4617	113.8464	84.05355	99.27719	328.0031	1.086337	0.002118	351.6053	1578939	1.050289	156	227	8.802009	0.345234	0.268841	1578939	
33	5579	209.9873	86.40023	78.05787	83.31378	267.7189	1.022352	0.001499	269.4215	1171575	1.052618	190	227	6.136194	0.34246	0	1171575	
34	5888	209.8417	112.9248	80.69352	96.86862	288.8086	1.025406	0.001585	309.4926	1236977	1.042185	181	227	7.57202	0.338176	0	1236977	
35	5770	203.7936	90.47099	70.74643	85.01392	271.5011	1.016617	0.00155	289.1788	1179859	1.060119	175	227	7.156691	0.336353	0	1179859	
36	6917	211.6517	118.4314	70.21396	84.12161	316.7382	1.054179	0.001859	356.5759	1463996	1.049362	187	227	6.508844	0.341854	0	1463996	
37	7418	186.7715	107.8564	82.71033	96.36359	311.4049	1.040289	0.001893	329.9088	1386471	1.061337	149	227	11.50789	0.348521	0.010485	1386471	
38	6887	184.6822	116.287	74.62516	93.8895	308.698	1.091691	0.001877	328.0073	1288036	1.054985	152	227	13.53263	0.343988	0	1288036	
39	6881	204.1228	114.56	75.58439	93.495	317.0721	1.052665	0.001849	344.7352	1404569	1.087815	191	220	4.562365	0.339403	0	1404569	
40	6489	205.8639	99.46356	76.24303	89.69763	291.6847	1.052056	0.001722	308.8935	1319382	1.057949	180	227	6.530046	0.334921	0	1319382	
41	5880	204.7053	102.2030	70.93659	84.53847	274.0169	1.054255	0.001526	292.8357	1162726	1.047454	187	219	6.88965	0.338122	0	1162726	
42	9654	211.1256	115.8836	105.5367	109.9148	353.7488	1.031509	0.002094	377.0195	2038207	1.051115	184	227	5.748732	0.340459	0	2038207	
43	6523	201.7593	87.90812	83.00489	90.1122	289.3438	1.021342	0.001763	307.2794	1316076	1.089026	182	227	6.537987	0.339906	0	1316076	
44	7481	198.2014	101.2373	80.58305	96.42241	310.3538	1.020701	0.002002	331.0783	1477093	1.061812	174	226	5.511873	0.339131	0	1477093	
45	6342	205.9138	88.48953	80.5295	89.07889	289.8902	1.048747	0.001704	308.9276	1306345	1.059169	183	216	4.484848	0.338777	0	1306345	

Figura 21 – Dados de 14 características cariométricas em planilha do software Excel
Fonte: Dados da pesquisa.

4.4.4 Determinação do grau de ploidia

O grau de ploidia foi estabelecido com base na medida denominada densidade óptica integrada (IOD). Essa medida é a soma dos valores dos tons de cinza dos pixels que constituem a imagem de um núcleo celular. A comparação da IOD das células em estudo com a IOD de células somáticas euplóides (linfócitos) permite a estimativa do grau de ploidia das células em estudo.

O estabelecimento do padrão diplóide individualizado para cada cariograma é a primeira etapa para a determinação do grau de ploidia. Essa fase foi realizada de acordo com a *European Society for Analytical Cellular Pathology (ESACP) consensus report on diagnostic DNA image cytometry* (BÖCKING; GIROUD; REITH, 1995).

Primeiramente, foi determinado o coeficiente de variação (CV= (desvio padrão/média) x 100) da IOD das imagens dos núcleos de 80 linfócitos (dois linfócitos a partir de 40 cariogramas).

Para obter o fator de correção, foram empregadas as imagens de 60 células das extremidades de cortes histológicos de hiperplasias fibroepiteliais (grupo controle) que foram capturadas realizando movimentos de letras gregas até atingir o número desejado. A seleção das células de referência também foi submetida ao cálculo do coeficiente de variação, em que imagens de núcleos celulares foram substituídas até que o valor do coeficiente de variação expressasse valor menor ou igual a 10% (GABRIEL, 2006).

A divisão entre a média da IOD das células pela média da IOD dos linfócitos determinou o “fator de correção”.

$$\text{Fator de correção} = \frac{\text{Média da IOD das células padrão}}{\text{Média da IOD dos linfócitos}}$$

Em seguida, foi calculado o coeficiente de variação entre os núcleos de 20 linfócitos de cada cariograma, de modo que os grupos de núcleos de linfócitos que apresentavam o coeficiente de variação maior que 20% foram reavaliados, sendo excluídas as imagens de núcleos de linfócitos que apresentavam IOD com maior desvio da média. Novos núcleos foram selecionados para substituírem aqueles excluídos. Após a substituição, o coeficiente de variação foi recalculado, e, quando foi atingido valor menor ou igual a 20%, foi calculada a média do valor da IOD dos linfócitos referenciais.

Foi, então, determinado, o valor diplóide para cada lâmina, denominado valor $2n$, resultante da multiplicação do valor médio da IOD dos linfócitos de referência de cada cariograma pelo fator de correção.

$$\text{Valor Diplóide} = \text{Média da IOD dos linfócitos} \times \text{fator de correção}$$

O passo seguinte foi a padronização estatística dos valores da IOD das imagens dos núcleos de cada cariograma, sendo que os valores da IOD das 60 células de cada cariograma foram agrupados em 6 grupos.

Após a aplicação do fator de correção, os valores padronizados das IODs das imagens dos núcleos de cada cariograma foram comparados com o valor referencial $2n$ de cada lâmina, determinando-se, assim o valor da ploidia de cada célula.

A partir dos valores de ploidia de cada célula, foi construído um gráfico de distribuição (histograma) para cada cariograma (Apêndices F e G), que, posteriormente, foi submetido à classificação adaptada de Haroske et al. (1998) e modificada por Gabriel (2006) (Figura 19 A, B, C, D).

Os histogramas foram divididos nos seguintes grupos:

A - Diplóide: uma única linhagem celular apresentando padrão de DNA com valor modal concentrado em região diplóide ou peridiplóide, podendo apresentar pico contendo menos que 10% das células em região tetraplóide ou peritetraplóide.

B - Tetraplóide: uma única linhagem celular apresentando padrão de DNA com valor modal concentrado em região tetraplóide ou peritetraplóide, podendo apresentar linhagem adicional em região diplóide ou peridiplóide.

C - Aneuplóide: linhagens celulares apresentando padrão de DNA fora dos valores modais descritos previamente, (podem estar presentes picos não euplóides, linhagens diplóides, peridiplóides, tetraplóides e peritetraplóides) ou o número de núcleos que apresenta ploidia de DNA igual ou maior a $5c$ ou $9c$, excede 1% (KRISTENSEN et al., 2003).

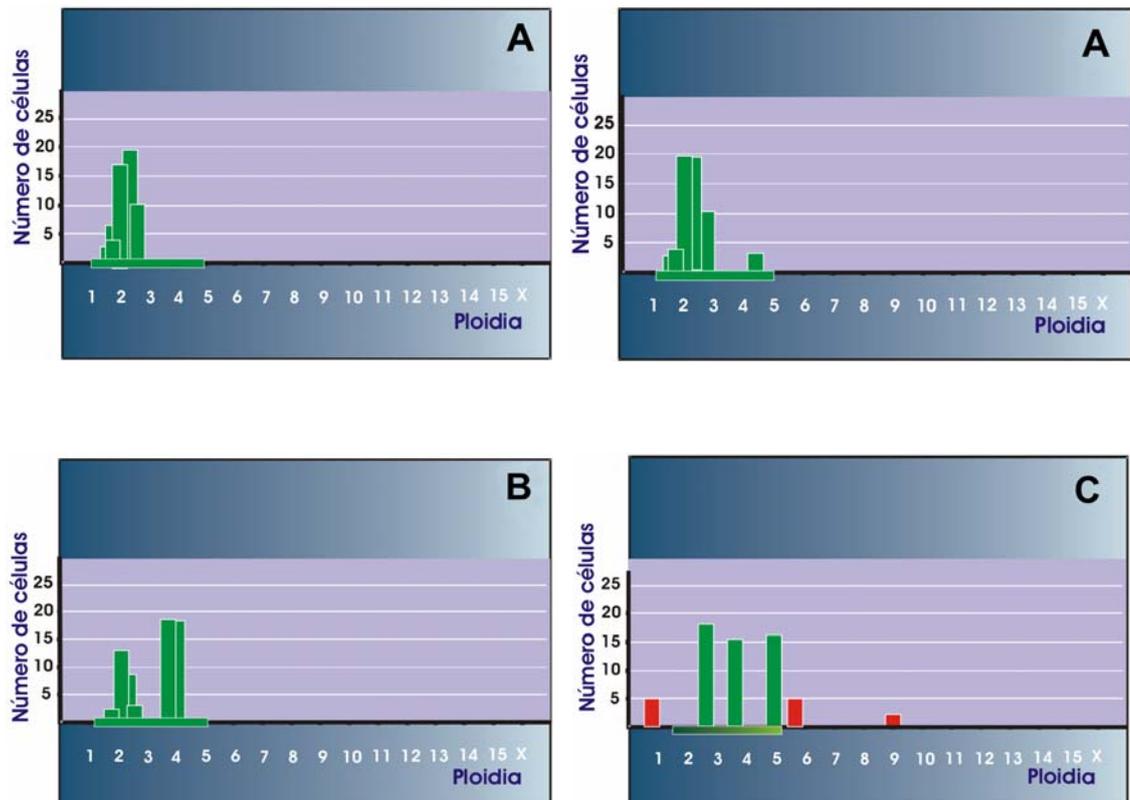


Figura 22 – Classificação dos histogramas. A: Padrão diplóide. B: Padrão tetraplóide. C: Padrão aneuplóide

Fonte: Haroske et al. (1998) e adaptado por Gabriel (2006)

4.5 ANÁLISE ESTATÍSTICA DOS DADOS

4.5.1 Quantificação da freqüência de graus de ploidia de DNA nos grupos R e AE

Para quantificar a freqüência dos graus de ploidia diplóide, tetraplóide e aneuplóide de cada um dos grupos estudados, além da análise descritiva dos casos, foi realizada a análise estatística pela aplicação do Teste χ^2 (Qui-Quadrado).

4.5.2 Relação entre grau de ploidia e a forma clínica do líquen plano oral

Para relacionar os graus de ploidia diplóide, tetraplóide e aneuplóide com a forma clínica de LPO, além da análise descritiva, empregou-se o Teste χ^2 (Qui-Quadrado), complementado pela Análise de Resíduos Ajustados.

4.5.3 Avaliação cariométrica nos grupos R e AE

Para analisar 14 características cariométricas dos grupos R e AE, foi realizada análise descritiva das medidas encontradas em cada caso e foi empregado o Teste de Student (*t-test*), para verificar o nível de igualdade entre as médias obtidas em cada característica dos dois grupos estudados.

4.5.4 Avaliação da presença de outras doenças e fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de boca nos grupos R e AE

Para verificar a relação entre a presença de fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de boca e de outras doenças associadas com os grupos R e AE, além da análise descritiva, empregou-se o Teste Exato de Fisher.



5 RESULTADOS

5.1 CARACTERIZAÇÃO DA AMOSTRA

5.1.1 Sexo e Idade

O grupo R foi constituído por 12 biópsias de pacientes do sexo feminino e 8 do sexo masculino, com faixa etária entre 18 e 78 anos de idade. O grupo AE foi constituído por 14 biópsias de pacientes do sexo feminino e 6 do sexo masculino, com faixa etária entre 23 e 73 anos de idade. A idade média encontrada, ao analisar-se os pacientes dos dois grupos, foi de 48 anos de idade com desvio padrão de 13,27 (Quadro 1).

Sexo e Faixa etária	grupo R	grupo AE
Sexo Feminino	12	14
Sexo Masculino	8	6
Faixa etária	entre 18 e 78 anos	entre 23 e 73 anos
Idade média	48 anos desvio padrão: 13,27	

Quadro 1. Sexo e faixa etária nos grupos R e AE

Fonte: Dados da pesquisa.

5.1.2 História médica

Nos pacientes biopsiados do grupo R os resultados do hemograma, leucograma, exames de Anti-DNA, contagem de células LE, anti-HCV, contagem de

plaquetas encontravam-se dentro dos parâmetros da normalidade. A velocidade de sedimentação globular (VSG) em 4 pacientes foi igual ou superior a 25 mm, na primeira hora. Um dos pacientes possuía FAN (Fator anti-nuclear) reagente, indicando uma possível doença reumática (Quadro 2).

Nos pacientes biopsiados do grupo AE os resultados do hemograma, leucograma, exames de Anti-DNA e a contagem de células LE encontravam-se dentro dos parâmetros da normalidade. Em dois deles, o anti-HCV era reagente, e um dos pacientes apresentava diminuição no número de plaquetas. A velocidade de sedimentação globular (VSG) em um paciente foi superior a 25 mm, na primeira hora. Dois pacientes possuíam FAN reagente (Quadro 2).

História médica	grupo R	grupo AE
Hemograma	Normal	Normal
Leucograma	Normal	Normal
Anti-DNA	Normal	Normal
Contagem células LE	Normal	Normal
Anti-HCV	Normal	2 R
Herpes (HPV)		2 R
Contagem plaquetas	Normal	1 Diminuição
VSG	4 = ou > 25mm primeira h	1 = ou > 25mm na primeira h
FAN	1 R	2 R

Quadro 2: Dados da história médica dos grupos R e AE

Fonte: Dados da pesquisa.

Nota: FAN: Fator Anti-Nuclear; DNA: *desoxyribonucleic acid* (ácido desoxiribonucléico); HCV: vírus da hepatite C; R: Reagente; VSG: velocidade de sedimentação globular.

No grupo R, 10 pacientes realizavam tratamento psicológico e/ou psiquiátrico; 4 eram portadores de Hipertensão Arterial Sistêmica (HAS); 3, cardíacos; 1, diabético compensado; 3 tinham gastrite e 1, hipertireoidismo. Nenhum paciente possuía

hepatite C, herpes, lúpus, alergias ou pênfigo. Um desses pacientes, além das lesões bucais de líquen, apresentava lesões de líquen plano na pele (Quadro 3).

Lâmina	Diabete	HAS	Tratamento Psicológico e/ou psiquiátrico	Cardiopatias	Lesões de LP na pele	FAN	Alterações hormonais
1	não	não	não	não	não	NR	não
2	não	não	não	não	não	NR	não
3	sim	não	sim	não	não	-	não
4	não	não	sim	não	não	-	não
5	não	não	não	não	sim	-	não
6	não	não	não	não	não	-	não
7	não	sim	sim	sim	não	NR	não
8	não	sim	sim	não	não	NR	não
9	não	sim	não	sim	não	-	não
10	não	não	sim	não	não	NR	não
11	não	não	não	não	não	NR	não
12	não	não	não	não	não	NR	não
13	não	não	sim	não	não	NR	hipertireoidismo
14	não	não	não	não	não	-	não
15	não	não	sim	não	não	NR	não
16	não	não	sim	não	não	NR	não
17	não	não	sim	sim	não	R	não
18	não	não	não	não	não	NR	não
19	não	não	sim	não	não	NR	não
20	não	sim	não	não	não	NR	não

Quadro 3 – Presença de outros problemas de saúde no grupo R

Fonte: Dados da pesquisa.

Nota: FAN: Fator Anti-Nuclear; HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica; R: Reagente; NR: Não Reagente.

No grupo AE, 8 realizavam tratamento psicológico e/ou psiquiátrico; 3 tinham problemas cardíacos; 2, HAS; 4, diabetes; 2, hepatite C; 2, herpes e 1, gastrite. Nenhum paciente possuía doenças como o lúpus, alergias ou pênfigo. Além das lesões bucais de líquen, 3 pacientes também apresentavam lesões de líquen plano na pele (Quadro 4).

5.1.3 Dados relativos à lesão¹

¹ Aparência clínica, tempo de evolução da lesão, informado pelo paciente na primeira consulta, sítio oral envolvido por lesões de LPO na primeira consulta, local da cavidade oral mais freqüentemente biopsiado e tempo de acompanhamento do paciente no SEHSL

No grupo R, durante o período de acompanhamento, a aparência clínica das lesões de LPOR permaneceu estável nos 20 pacientes.

No grupo AE, durante o período de acompanhamento, em 11 pacientes a aparência clínica apresentou períodos alternados com e sem ulcerações, e em 9 pacientes a aparência clínica se manteve estável.

Lâmina	Diabete	HAS	Tratamento Psicológico; psiquiátrico	Cardiopatias	Lesões de LP na pele	FAN	Herpes	Hepatite C
1	sim	não	sim	não	não	NR	não	não
2	não	não	sim	não	não	NR	não	não
3	não	não	não	não	não	-	não	não
4	sim	não	não	não	não	R	não	sim
5	não	não	não	não	não	-	não	não
6	não	não	não	não	não	-	não	não
7	não	não	não	não	não	-	não	não
8	sim	não	não	não	não	NR	sim	não
9	não	não	sim	não	não	-	não	não
10	sim	não	não	não	sim	-	não	sim
11	não	não	não	não	não	-	não	não
12	não	não	sim	não	sim	NR	não	não
13	não	não	não	não	não	R	não	não
14	não	não	sim	sim	não	-	não	não
15	não	não	não	não	não	NR	não	não
16	não	sim	sim	não	sim	NR	sim	não
17	não	não	não	não	não	NR	não	não
18	não	não	sim	não	não	-	não	não
19	não	não	não	sim	não	-	não	não
20	não	sim	sim	sim	não	-	não	não

Quadro 4 – Presença de outros problemas de saúde no grupo AE

Fonte: Dados da pesquisa.

Nota: FAN: Fator Anti-Nuclear; HAS: Hipertensão Arterial Sistêmica; R: Reagente; NR: Não Reagente.

No grupo R, o tempo de evolução da lesão, informado pelo paciente na primeira consulta, variou de 20 dias a 7 anos, sendo que 1 paciente não soube informar o início do surgimento das lesões e em 4 fichas esse dado não estava disponível (Apêndice B).

No grupo AE o tempo de evolução da lesão, informado pelo paciente na primeira consulta, variou de 1 mês e/ou ~ 1 mês a 10 anos. Em 7 fichas esse dado não estava disponível (Apêndice C).

De acordo com os dados clínicos obtidos dos pacientes biopsiados do Grupo R, em 2 casos havia somente um sítio envolvido por lesões na primeira consulta, sendo este a mucosa jugal unilateral. Nos demais pacientes (18) dois ou mais sítios da cavidade bucal estavam envolvidos simultaneamente. A maioria das lesões envolvia a mucosa jugal (17 casos: bilateral 10 e unilateral 7), seguida da língua (6 casos) e gengiva (6 casos).

Durante exame físico dos pacientes do grupo AE, na primeira consulta, 2 deles possuíam lesões de LPOAE no dorso da língua e 18 possuíam essas lesões em vários sítios da mucosa bucal, sendo que o sítio mais envolvido, em 18 casos, foi a mucosa jugal seguido da língua (borda, ventre e dorso) com 14 casos, e da gengiva, com 5 casos.

Nos pacientes com LPOR, o local da cavidade bucal mais freqüentemente biopsiado foi a mucosa jugal (14 casos), seguido da língua (2 casos), gengiva (2 casos), lábio inferior (1 caso) e rebordo alveolar (1 caso).

Nos pacientes com LPOAE, a língua foi o local mais freqüentemente biopsiado (11 casos, sendo 6 casos no ventre, 3 no dorso e 2 na borda lateral da língua). O segundo local mais biopsiado foi a mucosa jugal (6 casos). Em um paciente o lábio foi biopsiado, em outro o rebordo alveolar superior esquerdo, e em um terceiro a gengiva inferior do lado esquerdo.

No grupo R, o tempo de acompanhamento do paciente no SEHSL variou de menos de 1 mês até 12 anos e 3 meses (Apêndice D) até o momento da coleta de dados desta pesquisa (2006). Em uma ficha não havia informação sobre esse dado.

No grupo AE, o tempo de acompanhamento do paciente no SEHSL variou de 1 dia (somente o dia da biópsia) até 17 anos e 5 meses (Apêndice E). Muitos desses pacientes permanecem em acompanhamento no SEHSL.

5.1.4 Dados relativos à presença de neoplasia maligna

Entre os 40 pacientes biopsiados, 2 desenvolveram câncer de boca, entretanto o sítio anatômico não era o mesmo em que foi realizada a biópsia do líquen plano oral. Um pertencia ao grupo de pacientes do grupo R, no qual a biópsia foi realizada em dorso da língua e, 12 anos após, um carcinoma espinocelular se desenvolveu na borda de língua. O paciente era ex-tabagista e tinha o hábito de tomar chimarrão diariamente. Não exibiu displasia na biópsia de LPOR.

O outro paciente pertencia ao grupo AE, no qual foram realizadas 2 biópsias na mesma data, porém em sítios anatômicos diferentes da cavidade oral, sendo que na mucosa jugal foi confirmada, histologicamente, a lesão de LPOAE e, na língua, um carcinoma espinocelular grau II. O espécime de biópsia de LPOAE não exibiu displasia.

5.1.5 Dados relativos a hábitos/vícios dos pacientes

Entre os 20 pacientes biopsiados com LPOR (grupo R), 5 eram tabagistas; 6, ex-tabagistas; 1 consumia álcool diariamente; 10 pacientes possuíam o hábito de tomar chimarrão e 2 ingeriam bebidas quentes diariamente.

Entre os 20 pacientes biopsiados com LPOE (grupo AE), 5 eram tabagistas; 5, ex-tabagistas; 1, ex-etilista e 8 pacientes possuíam o hábito de consumir bebidas quentes diariamente.

5.1 FREQUÊNCIA DOS GRAUS DE PLOIDIA DE DNA NOS GRUPOS R E AE

Pelo método de citometria digital em lâminas coradas pela técnica de Feulgen, foi possível verificar e quantificar o grau de ploidia de DNA, nos 20 espécimes de biópsias de LPOR e nos 20 espécimes de biópsia de LPOAE.

Para cada uma das 40 lâminas, foram construídos histogramas, a partir dos quais as biópsias foram classificadas de acordo com seu grau de ploidia (Apêndices F e G).

No grupo R, 18 lâminas foram classificadas como diplóides; nenhuma, como tetraplóide e 2, como aneuplóides (Apêndice H).

No grupo AE, 10 lâminas foram classificadas como diplóides; 1, como tetraplóide e 9, como aneuplóides (Apêndice I).

5.2 RELAÇÃO ENTRE O GRAU DE PLOIDIA E A FORMA CLÍNICA DO LPOR E LPOAE

A forma de LPO reticular apresentou 18 casos com grau de ploidia diplóide, nenhum caso tetraplóide e 2 casos com grau de ploidia aneuplóide (Apêndice H).

A forma clínica de LPO atrófico-erosivo apresentou 10 casos com grau de ploidia de DNA diplóide; 1 tetraplóide e 9 aneuplóides (Apêndice I).

O emprego do Teste de associação χ^2 (Qui-quadrado), ($p=0,021$), complementado pela Análise de Resíduos Ajustados, ao nível de significância de 5% ($p<0,05$), demonstrou que o grau de ploidia diplóide está associado ao grupo R, enquanto que o grau aneuplóide está associado ao grupo AE (Tabela 1).

Tabela 1 – Relação entre o grau de ploidia e a forma clínica de líquen plano oral

Forma clínica	Grau de ploidia			n
	Diplóide	Tetraplóide	Aneuplóide	
Reticular	18*	0	2	20
Atrófico- erosivo	10	1	9*	20
Total	28	1	11	40

Fonte: Dados da pesquisa.

Nota: Teste de associação χ^2 : $p=0,021$

* Análise de Resíduos Ajustados: $p<0,05$

n: número de biópsias.

5.3 MEDIDAS CARIOMÉTRICAS DOS NÚCLEOS DE CÉLULAS EPITELIAIS DOS GRUPOS R E AE

Para verificar a capacidade das medidas nucleares de discriminar o grupo diagnóstico ao qual cada célula pertencia, foi empregado o Teste “t”, ao nível de significância de 5%, a partir do qual construiu-se uma tabela de comparação (Tabela 2).

Tabela 2 – Medidas cariométricas dos grupos R e AE

Medidas cariométricas	Grupo				p
	R	Desvio-padrão	AE	Desvio-padrão	
Área	Média 4954,28	Desvio-padrão 955,50	Média 4865,27	Desvio-padrão 925,06	0,769
Diâmetro máximo	92,76	9,35	93,67	7,83	0,743
Diâmetro médio	76,96	7,86	75,73	7,71	0,624
Diâmetro mínimo	64,86	7,41	62,38	7,65	0,312
Perímetro	257,56	26,02	257,53	24,66	0,997
IOD	971777,10	229777,57	864237,63	198607,15	0,126
Dimensão fractal	1,06	0,00	1,06	0,00	0,878
Densidade máxima	215,61	12,71	210,58	5,78	0,117
Densidade média	193,42	16,04	180,75	7,99	0,005*
Densidade mínima	163,98	18,22	152,87	12,09	0,030*
Soma da densidade	971777,10	229777,57	1048331,21	735429,73	0,667
Desvio padrão da densidade	8,54	1,79	9,28	1,29	0,144
Clumpness	0,016	0,011	0,016	0,011	0,982
Roundness	1,09	0,03	1,12	0,03	0,001*

Fonte: Dados da pesquisa.

Nota: $p=$ nível de significância de 5% ou $p<0,05$ do Teste “t”

IOD: densidade óptica integrada (*Integrated Optical Density*).

*Apresenta diferença estatisticamente significativa ($p<0,05$)

Verifica-se que as médias de densidade média e de densidade mínima no grupo R quando submetidos ao Teste “t” ($p < 0,05$), foram significativamente maiores do que no grupo AE. A média de *roundness* no grupo AE foi significativamente maior do que no grupo R.

Ao compararem-se as médias das medidas de área, densidade máxima, desvio padrão da densidade, dimensão fractal, IOD, diâmetro máximo, diâmetro mínimo, diâmetro médio, perímetro, perímetro 2, *clumpness* e a soma das densidades nucleares, pelos valores obtidos submetidos ao Teste “t” ($p < 0,05$), não houve diferença significativa em relação aos grupos R e AE.

5.4 AVALIAÇÃO DA PRESENÇA DE OUTRAS DOENÇAS E DE FATORES DE RISCO PARA O DESENVOLVIMENTO DE CÂNCER DE BOCA NOS GRUPOS R E AE

Entre os dados colhidos da história médica constatou-se que, os distúrbios psicológicos e ou psiquiátricos foram os problemas de saúde mais freqüentes nos pacientes dos grupos R e AE (Quadros 3 e 4).

E, pela utilização do Teste Exato de Fisher, ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$), verificou-se não haver associação da presença de outros problemas de saúde em relação aos diferentes grupos (R e AE) (Tabela 3).

Através do mesmo teste estatístico, ao nível de significância de 5% ($p < 0,05$), verificou-se não haver associação da presença de fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de boca em relação aos grupos R e AE (Tabela 3).

Tabela 3 – Presença de doenças e fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de boca nos Grupo R e AE

	Grupo		p
	R	AE	
Diabete	1	4	0,342
Lúpus	0	0	-
Alergias	0	0	-
Herpes	0	2	0,487
Pênfigo	0	0	-
Hepatite C	0	2	0,487
Hipertensão	4	2	0,661
Dist. psicológicas/psiquiátricas	10	8	0,751
Prob. cardíacos	3	3	1,000
Prob. hormonais	1	0	1,000
Lesões de pele	1	3	0,605
Tabaco	5	5	1,000
Ex-tabagista	6	5	1,000
Álcool	1	0	1,000
Ex-etilista	0	1	0,487
Chimarrão	10	6	0,333
n	20	20	

Fonte: Dados da pesquisa.

Nota: p= nível de significância de 5% ($p < 0,05$) do Teste Exato de Fisher



6 DISCUSSÃO

A controvérsia em torno da cancerização em lesões de líquen plano oral e a busca de um método de diagnóstico com menor subjetividade, de fácil execução, que permita identificar mais precocemente o câncer de boca, norteou a realização da presente pesquisa. A utilização da citometria digital como método de identificação do grau de ploidia e para a análise de medidas cariométricas foi escolhido pela possibilidade de realização de um estudo retrospectivo em peças emblocadas em parafina.

Os critérios sexo e faixa etária dos pacientes não foram levados em consideração no momento da escolha das biópsias a serem estudadas. Entretanto, na análise dos dados, observou-se que um maior número de pacientes do sexo feminino foi incluído no estudo, tanto no grupo de pacientes com LPOR quanto com LPOAE, denotando o que é descrito na literatura sobre a maior freqüência de ocorrência de LPO em pacientes do sexo feminino (CHAINANI-WU et al., 2001; ISMAEL; KUMAR; ZAIN, 2007; MOLLAOGLU; COWPE; LEWIS, 2001; SCULLY et al., 1998; SILVERMAN et al., 1991).

Este estudo envolveu biópsias de pacientes com uma ampla faixa de idade e a idade média de 48 anos de idade, foi menor do que aquela mais freqüentemente citada por outros autores (CHAINANI-WU et al., 2001; INGAFUO et al., 2006; MOLLAOGLU; COWPE; LEWIS, 2001; SCULLY et al., 1998; SILVERMAN et al., 1991).

Diabete mellitus, alergias, estresse, hepatite, doenças auto-imunes (lupus, colite ulcerativa, psoríase, artrite reumatóide) HAS, cardiopatias são doenças que vêm sendo investigadas como as que podem ter relação com LPO (CHIAPPELLI et al., 1997; CHAINANI-WU et al., 2001; DUFFEY; EVERSOLE; ABEMAYOR, 1996; NAGAO et al., 2005). Neste estudo, verificou-se não haver associação da presença dessas doenças em relação aos grupos R e AE. Deve-se considerar, no entanto, que esta investigação não era o objetivo principal do presente estudo.

Algumas pesquisas apontam a interação de doenças do sistema psicoimune como um fator condicionante da expressão da forma clínica e da severidade das lesões, e, na maior parte dos casos, relacionando-as a pacientes com a forma erosiva de LPO (CHIAPPELLI et al., 1997). Neste estudo foi observado que alterações psicológicas e ou psiquiátricas eram o problema de saúde mais freqüentemente citado durante as anamneses, tanto nos pacientes com LPOR como naqueles com LPOAE, e não houve diferenças estatísticas significativas entre os dois grupos em relação à presença dessas doenças.

No presente estudo, não se verificou uma associação entre a presença de fatores de risco e o desenvolvimento de câncer de boca nos diferentes grupos (R e AE). Duffey, Eversole e Abemayor (1996) e Laeijendecker et al. (2005) acreditam que a presença de fatores de risco para o desenvolvimento do carcinoma, como por exemplo o uso do tabaco, etilismo, doenças como a anemia ferropriva, tratamento imunossupressor sistêmico prolongado, coexistentes com as lesões de LPO, devem ser levadas em consideração. Nagao et al. (2005) e Gandara (2004) relatam, que não são necessariamente fatores isolados que causam a cancerização em lesões de LPO. Entretanto, podem ser fatores adicionais em uma mucosa que já apresenta alterações moleculares, aneuploidia, por exemplo, ou outras, que possam favorecer a transformação maligna, principalmente em mucosas atróficas, com epitélio mais fino como é o caso de lesões de LPOAE.

Entre as formas clínicas de LPO, a atrófica-erosiva é a forma que mais freqüentemente é associada à transformação maligna (BARNARD et al., 1993; INGAFU et al., 2006; SILVERMAN; GORSKY; LOZADA-NUR, 1985). Nesta pesquisa, o desenvolvimento de um carcinoma espinocelular na cavidade bucal foi observado em um caso de LPOR, e em outro de LPOAE, entretanto em sítios distintos das biópsias de LPO analisadas neste estudo. Apesar de haver trabalhos relatando casos de transformação de lesões de LPO em carcinomas espinocelulares e casos de cancerização na mucosa não afetada de pacientes com LPO (ANDREASEN; PINDBORG, 1963; BARNARD et al., 1993; BORNSTEIN et al., 2006; CAMISA; HAMATY; GAY, 1998; CHAINANI-WU et al., 2001; DUFFEY; EVERSOLE; ABEMAYOR, 1996; FULLING, 1973; HSUE et al., 2007; INGAFU et al., 2006; ISMAEL; KUMAR; ZAIN, 2007; KÖVESI; BÁNÓCZY, 1973; LAEIJENDECKER et al.,

2005; LO MUZIO et al., 1998; LOZADA-NUR; MIRANDA, 1997; MANZ; PAASCH; STICHERLING, 2005; MASSA et al., 1990; MIGNOGNA et al., 2001; RAJENTHERAN et al., 1999; SENGUPTA; DAS; GANGOPADHYAY, 2006; SIGURGEIRSSON; LINDELÖF, 1991; SILVERMAN et al., 1991; SILVERMAN; GORSKY; LOZADA-NUR, 1985; SILVERMAN; GRIFFITH, 1974; XUE et al., 2005) existem outros trabalhos que questionam ou negam que LPO é uma condição cancerizável e mantêm a controvérsia a respeito do tema (EISENBERG, 2000; EISENBERG; KRUTCHKOFF, 1992; GOMBOS et al., 1993; ZHANG et al., 1997; RAJENTHERAN et al., 1999; VAN DER MEIJ; SCHEPMAN; VAN DER WAAL, 2003). Entretanto, pelo fato de a seleção das amostras ter sido intencional no presente estudo, contabilizar esses 2 casos para definir uma taxa de transformação maligna em lesões de LPO, não representaria a realidade dos casos de cancerização da população estudada.

No presente estudo foi adotada a terminologia citometria digital por ser a mais utilizada entre várias sinônimas encontradas na literatura (DOYLE; MANHOLD, 1975; PFITZER; PAPE, 1975). Procurou-se seguir as recomendações específicas para a garantia de qualidade da avaliação de núcleos por citometria digital recomendadas por Giroud et al. (1998), em relação à preparação do espécime, coloração das amostras, realização da técnica, processo de escalonamento e interpretação. A padronização da solução fixadora é importante para que seja mantida a integridade do DNA nos espécimes, por isso deu-se preferência à inclusão de biópsias mais recentes quando se fez a seleção da amostra no presente trabalho. A utilização da citometria digital como técnica de rotina é um tema que merece cuidado, principalmente pelo longo tempo envolvido desde a obtenção do corante e preparo das amostras, o tempo consumido em cada etapa da técnica até a interpretação final das amostras. A indisponibilidade do *Kit* de coloração de Feulgen no Brasil, o tempo relativamente longo na sua importação e o seu alto custo, a lentidão nos processos de captura, segmentação das imagens e construção dos cariogramas, o tempo necessário para a aplicação de cálculos para obtenção do valor diplóide de cada lâmina, a construção de histogramas e sua interpretação são atividades lentas, repetitivas e bastante trabalhosas, principalmente, quando se compara a técnica utilizada com a citometria de fluxo que possibilita uma avaliação bem mais rápida e de um número bem maior de células em um tempo pequeno, ou

seja, cerca de dez mil células por minuto. Estes achados condizem e podem ser somados com aqueles citados por Danque et al. (1993), que descreveram algumas desvantagens da citometria digital em relação à citometria de fluxo, tais como a lentidão do processo, a sensibilidade aos procedimentos de preparação da amostra e a menor representatividade da amostra. Concorde-se com Gabriel (2006) quanto às vantagens que o método de citometria digital utilizado em pesquisas apresenta, pelo fato de ser um processo não automatizado de seleção dos núcleos permitindo a visualização de detalhes citológicos da amostra, a identificação e seleção de uma população celular específica, a detecção de populações celulares pouco expressadas nos tecidos, a possibilidade de a análise poder ser realizada sobre cortes histológicos já preparados, a possibilidade de avaliação da textura de cromatina e a garantia de correta quantificação de parâmetros morfométricos. E a citometria digital pode ser aplicada em estudos retrospectivos de espécimes emblocados em parafina enquanto que a citometria de fluxo requer, preferentemente, a utilização de material fresco (BARETON et al., 1995). Atualmente existem sistemas rápidos e fáceis de usar, que podem aumentar a aceitação clínica da citometria do DNA, capazes de segmentar cerca de 5 mil imagens de núcleos celulares em poucos minutos (BARETON et al., 1993; BINS; TAKENS, 1985; CAREY, 1994; SHANKEY et al., 1993). Entretanto, a utilização de métodos automatizados de citometria digital ao mesmo tempo que apresentam a vantagem de aumentar a representatividade da amostra, tem a desvantagem de reduzir a especificidade e a sensibilidade no reconhecimento de pequenas populações de células alteradas, e, portanto, populações celulares aneuplóides podem ser mascaradas (BAAK; JANSEN, 2004). Entretanto, Cohen (1996) e Faranda et al. (1997) acreditam que, devido aos altos coeficientes de variação que ocorrem em amostras de tecidos incluídos em parafina, a citometria digital possui a limitação de ter um baixo potencial para discriminar picos peridiplóides. Portanto acredita-se que a maior desvantagem da técnica de citometria digital utilizada neste estudo consiste na lentidão do processo, e a maior vantagem é a possibilidade de estudar células específicas e que tenham significado diagnóstico mesmo quando presentes em número reduzido no fragmento e/ou espécime analisado.

A seleção de 60 núcleos de células epiteliais, para a montagem de cada

cariograma, e 20 núcleos de linfócitos de cada lâmina são apoiadas pelas recomendações do *European Society for Analytical Cellular Pathology (ESACP): Consensus report on diagnostic DNA image cytometry* (1997) (HAROSKE et al., 1998) que definem, como número mínimo, 50 células para a montagem de um histograma. Levando-se em consideração o grande número de células que constituem o fragmento de tecido epitelial fixado à cada lâmina analisada, o número de núcleos obtidos pode parecer pequeno, entretanto, são núcleos específicos de células do tecido epitelial obtidas somente das camadas para-basal e espinhosa e, de cada campo digitalizado, são selecionadas apenas 1 ou 2 núcleos que estão em foco no plano visual e que não tenham sobreposição de imagens. Uma vez que foram construídos 40 cariogramas, cerca de 3.200 células foram analisadas no grupo de estudo, sendo este um número considerado adequado para a utilização da técnica e validação das propriedades dos histogramas (HAROSQUE et al., 1998). Böcking, Giroud e Reith (1995) especificam que a captura de 20 a 40 campos consecutivos é suficiente para o estudo de citometria digital de uma lâmina de biópsia. Entretanto, nesta pesquisa padronizou-se a seqüência de captação de fotomicrografias de forma a fazer a captura de toda a porção de tecido epitelial do fragmento, e, a partir de cada lâmina, foram capturadas imagens de 40 a 80 campos visuais consecutivos, obtidos seqüencialmente, desde uma das extremidades do epitélio, realizando movimentos de varredura e abrangendo as camadas basal, para-basal e espinhosa, até atingir a outra extremidade do epitélio no fragmento analisado. Para isso, foi necessário a captura de um número maior de campos visuais consecutivos nos fragmentos do grupo R, e um número menor de campos, na maioria das lâminas do grupo AE, o que pode ser justificado pelo fato de o epitélio apresentar-se mais fino (atrófico) no LPOAE e hipertrófico nos casos de LPOR.

A seleção de núcleos foi realizada nas camadas para-basal e espinhosa, e de cada campo digitalizado foram selecionados apenas 1 ou 2 núcleos que estavam perfeitamente em foco, e que não tinham imagem sobreposta à de núcleos vizinhos, de forma a evitar a inclusão de porções (pixels) destes, o que poderia alterar a quantidade de material (DNA) analisado em cada núcleo e o grau de ploidia daquela lâmina.

Como a citometria por imagem do DNA resulta em valores de IOD nucleares

em unidades arbitrárias, equivalentes, mas não idênticas, ao conteúdo de DNA nuclear, a quantificação do DNA nuclear necessita de uma padronização dos valores da IOD pela comparação com aqueles das células com conteúdo de DNA conhecido, as denominadas células de referência e, por meio delas, a escala arbitrária é transformada em uma escala de unidade de referência, 2c, 4c, 8c, por exemplo, (SCHULTE et al., 1995).

Harosque et al. (1998) afirmam que um dos pontos cruciais na determinação do grau de ploidia está centrado no estabelecimento do padrão diplóide, que pode ser obtido por referências celulares internas ou externas. Ao empregar-se células de referência interna, linfócitos das próprias lâminas histológicas, por exemplo, são minimizados vieses relativos a possíveis discrepâncias entre as colorações das lâminas analisadas e entre peculiaridades do processamento e armazenamento dos espécimes (GABRIEL, 2006). Com esse embasamento, no presente trabalho, optou-se por empregar células de referência interna, linfócitos obtidos das próprias lâminas histológicas, pois estas compartilharam todas as etapas preparatórias com as células epiteliais analisadas no estudo e também pela disponibilidade significativa destas células em amostras de líquen plano, visto que a presença de uma banda de linfócitos subjacente ao epitélio é uma característica histológica de LP, o que facilita o encontro da célula na lâmina, entretanto a sua seleção deve ser cuidadosa para evitar captura de núcleos sobrepostos. O uso de citometria de DNA para a detecção de condições cancerizáveis requer o estabelecimento dos dados sobre a distribuição de DNA em tecidos normais de mesma origem. O epitélio normal de célula escamosa não queratinizada revela um padrão de distribuição diplóide, sem poliploidização (BIESTERFELD et al., 1991). A obtenção de um padrão diplóide com baixo coeficiente de variação é um fator que impõe dificuldades no desenvolvimento de pesquisas que empregam a técnica de citometria digital (FLEEGER; BAAK; SMEULDERS, 1988; SORENSEN; 1991). O coeficiente de variação para IOD das células de referência deve, preferencialmente, ser menor ou igual a 5%, pois, assim, obtém-se uma significância de 95% na definição do padrão diplóide (HAROSQUE et al., 2001). Entretanto, neste estudo os valores do coeficiente de variação calculados para os linfócitos de referência foram mais altos, e variaram entre 7,7 e 18%. Valores similares foram obtidos no estudo de Gabriel, 2006, em que estes ficaram entre 8 e 26%. O que pode ser justificado pelo fato de se ter trabalhado com a mesma

população que esse pesquisador, tendo sido as amostras de ambos os trabalhos obtidas em um arquivo de blocos de parafina, onde uma parte dos espécimes analisados está armazenada por um longo período, e possam ter sido obtidos, fixados e emblocados em parafina em uma época em que a solução de fixação não era padronizada, diferindo dos valores menores obtidos por Noguchi et al. (2002) em que os coeficientes de variação ficaram entre 4,9 e 10,8%. Os valores menores encontrados por esses autores podem ser devido ao fato de que todos os espécimes analisados por eles foram especificamente selecionados e armazenados pelos próprios pesquisadores que utilizaram uma solução de fixação padronizada em toda a sua amostra, uma vez que os parâmetros nucleares morfométricos, densitométricos e de textura podem ser influenciados pelo tipo de solução fixadora (Carnoy ou formol) e que existe a necessidade de padronização desse em toda a amostra (SERTH et al., 2000).

A citometria por imagem apresenta limitações em termos de precisão das medidas geradas, principalmente quando a citometria é aplicada em amostras de tecido emblocadas em parafina (HAROSKE et al., 2001). Dessa forma, os valores obtidos necessitam de um fator de correção, que é o quociente entre os valores da média da IOD das células não patológicas do tecido sob estudo e das células de referência utilizadas, e deve ser aplicado às medidas de DNA da amostra antes de se obter e/ou interpretar o histograma de DNA (SCHULTE et al., 1995). O valor do fator de correção aplicado às células de referência do grupo de estudo para o posterior cálculo para o estabelecimento do valor diplóide ($2n$) foi 5. Um fator de correção bem menor, 1,25, foi utilizado por Biesterfeld et al. (1991), entretanto não é especificado em seu trabalho o tempo de armazenamento, se houve padronização do agente de fixação dos espécimes, nem como foi obtido o fator de correção. O que impede comparar os valores utilizados nos dois estudos.

Harosque et al. (2001) justificam a utilização de histogramas para demonstrar os resultados da ploidia de DNA, por ser baseados em uma população, em um grupo ou conjunto de células com valores de ploidia de DNA semelhantes. Gabriel (2006) cita que, provavelmente, a falta da exatidão na determinação do grau de ploidia pela citometria digital foi um dos motivos que levou Auer, Caspersson e Wallgren (1980) a classificarem o grau de ploidia de uma lesão pelo padrão gráfico do histograma, e

não apenas pelos valores numéricos da ploidia de cada célula expressados em um cariograma.

Fundamenta-se esta pesquisa com a metodologia elaborada por Gabriel (2006), tanto na padronização estatística dos valores das IODs das células dos cariogramas e sua divisão em 6 grupos e utilização de uma fórmula (algoritmos), para a aplicação simultânea do fator de correção nas células de referência e obtenção do valor diplóide para cada cariograma, quanto na adoção dos modelos de histogramas adaptados e modificados a partir da classificação de Haroske et al. (1998). A utilização da mesma técnica, quantidade idêntica de células analisadas e a similaridade nos valores das IODs das células estudadas, viabilizaram a utilização dos mesmos métodos usados por Gabriel (2006). O grau de dificuldade na construção dos histogramas também foi percebido no presente estudo, o que levou à tentativa do uso de outros modelos (AUER; CASPERSSON; WALLGREN, 1980; AUER; FALKER; ZETTERBERG, 1991; PFIZER; PAPE, 1975). Entretanto, a seqüência metodológica adotada no presente estudo tornou mais práticos os processos de determinação do valor diplóide de cada lâmina, a construção e interpretação dos histogramas.

A natureza dos valores numéricos da IOD encontrados nas medições citométricas, resultantes da soma dos valores dos tons de cinza de cada pixel de um núcleo, gerava números exponenciais, sem a repetição de valores exatos, sendo que, cada núcleo apresentava um valor distinto e, no histograma, não se formavam picos expressivos. A padronização estatística dos valores das IODs e a reunião destes em 6 grupos geraram picos de ploidia representativos e permitiram a preservação de valores discrepantes da média, o que viabilizou sua interpretação, uma vez que se obteve melhor padrão gráfico dos histogramas.

No modo de interpretação das medições citométricas de DNA, a ocorrência de núcleos com conteúdos de DNA acima de 5c tem sido considerada como um marcador de neoplasia (BIESTERFELD et al., 1994). Portanto, uma lesão é definida como aneuplóide se os picos de ploidia de DNA estiverem fora da área de 2c, 4c ou 8c, ou se o número de núcleos com conteúdo de DNA acima de 5c ou 9c exceder 1% (HOGMO et al., 1998; KRISTENSEN; KILDAL; ABELER, 2003; NEPPEELBERG;

JOHANNENSSEN, 2007; PRADHAM et al., 2006). Dessa forma, o valor 5c nos histogramas do presente trabalho representou padrão de ploidia aneuplóide nos grupos estudados, uma vez que, quando presentes, excediam 1% do número total de células analisadas em cada lâmina.

Uma lesão é classificada como poliplóide quando o número de núcleos em 8c excede 10% do total, ou se o número de células que excede 9c é maior que 1% (KRISTENSEN; KILDAL; ABELER, 2003; PRADHAM et al., 2006). A poliploidização é um achado raro em tecidos não neoplásicos (BIESTERFELD et al., 1994), com a exceção dos megacariócitos e de alguns tecidos em maturação, que podem expressar poliploidia em situação fisiológica (até 64c), e de síndromes paraneoplásicas (até 128c). Maraki, Becker e Boecking (2004), em 2 casos de LPO, encontraram DNA poliplóide. Gabriel (2006) interpretou os eventos poliplóides como aneuploidia. A poliploidização pode ser euplóide ou aneuplóide. A poliploidização euplóide indica a presença de picos adicionais e simultâneos aos níveis de ploidia de 4c, 8c, 16c e assim sucessivamente nos graus de ploidia com valores múltiplos a 2c e com um pequeno número de núcleos nas correspondentes fases S. E a poliploidização aneuplóide indica a presença de picos adicionais nas regiões de duplicação das linhas de DNA aneuplóide.

No presente trabalho não houve a ocorrência de poliploidização, e a presença de picos acima de 5c nos histogramas representou padrão de ploidia aneuplóide em ambos os grupos de LPO estudados. Entretanto, Biesterfeldt et al. (1991) detectaram a poliploidização euplóide na maior parte dos casos de LPO das séries que analisaram. Os autores, contudo, não conseguiram uma explicação para esse fato, e classificaram os casos como diplóides, apesar de terem encontrado conteúdos de DNA acima de 8c e até 11,5c, acreditando que não havia suspeita de cancerização nas lesões que analisaram, mas que o padrão aneuplóide seria adotado no caso de serem lesões de líquen plano atrófico com suspeita de sofrer transformação maligna.

De acordo com sua natureza e demanda fisiológica, cada tecido possui diferentes proporções de células nas distintas fases do ciclo de vida celular. Porém, em tecidos displásicos e neoplásicos, essas proporções podem estar alteradas, e padrões atípicos de ploidia celular, principalmente padrões aneuplóides/não-

diplóides, podem ser observados (GOULANDRIS et al., 1996). Várias pesquisas identificaram a aneuploidia em tecidos tumorais (ABOU-ELHAMD; HABIB, 2007; BALSARA et al., 1994; BARETTON et al., 1995; GABRIEL, 2006; SHIRATA et al., 2005). Da mesma forma, quando lesões de condições cancerizáveis e com displasia exibem um padrão aneuplóide de DNA, estas podem ser definidas como lesões potencialmente malignas (MATTILA; ALANEN; SYRJANEN, 2004). Entretanto, Neppelberg e Johannessen (2007), em estudo realizado com lesões que incluíram LPO, relatam que a aneuploidia não se mostrou como um marcador confiável do risco de cancerização em lesões de LPO, mas, no mesmo estudo, esses autores também não identificaram aneuploidia em carcinomas.

Em lesões de condições cancerizáveis, o uso da análise do DNA como um complemento aos resultados obtidos por interpretação histopatológica auxilia a diminuir o componente subjetivo (SEOANE et al., 1999). A citometria digital do DNA é um exame adjuvante objetivo, de alta sensibilidade e grande especificidade na identificação precoce de neoplasias de células epiteliais (REMMERBACH et al., 2001). Se a identificação citométrica do DNA aneuplóide pode ser considerado um marcador de malignidade e é encontrado em lesões que clinicamente não são suspeitas de cancerização e, histologicamente, não apresentam nem displasia, significa que, durante um período de acompanhamento, um carcinoma *in situ* ou um carcinoma infiltrativo poderia ser identificado precocemente pelo método de citometria digital nessas lesões.

Se forem consideradas todas as biópsias estudadas, nos dois grupos, o grau de ploidia diplóide foi mais freqüente, entretanto, a presença de casos aneuplóides também foi observada em ambos, sendo a freqüência do grau aneuplóide estatisticamente mais significativa no grupo AE, e somente neste foi encontrado um caso tetraplóide. Embora para alguns autores o LPO seja definido como uma condição cancerizável, e a incidência de transformação maligna nessa lesão não seja elevada (BARNES et al., 2005), frente à presença de casos aneuplóides (27,5%), entre todos os casos de LPO analisados neste estudo, sugere-se a necessidade de um controle mais rigoroso do paciente com LPO.

Os resultados da presente pesquisa demonstraram, estatisticamente, uma

forte associação entre a forma clínica de líquen plano atrófico-erosivo e o padrão aneuplóide, e uma forte relação entre o grau diplóide e a forma de líquen plano oral reticular. Femiano e Scully (2005a), igualmente a este trabalho, encontraram o grau diplóide na maioria dos casos de LPO estudados, porém obtiveram o grau aneuplóide somente em 2 dos 25 casos de líquen plano erosivo que analisaram. Entretanto, esses autores utilizaram um diferente parâmetro de interpretação dos valores obtidos na citometria e, além disso, utilizaram, no preparo dos espécimes para a citometria digital, cortes com 6 μm de espessura, enquanto que neste trabalho foram analisados cortes histológicos de 15 μm , o que também poderia gerar resultados distintos, pois essa espessura dos cortes é necessária para se obterem núcleos de células epiteliais e imagens dos respectivos conteúdos de DNA na íntegra a fim de se poder quantificar adequadamente o grau de ploidia.

Acredita-se que toda vez que o padrão aneuplóide é observado em lesões potencialmente malignas, uma nova biópsia e exame histopatológico devem ser realizados para verificar a existência de displasia severa, carcinoma *in situ* ou invasivo e, de acordo com esses resultados, a terapia deve ser instituída. Mesmo com a existência de aneuploidia em uma condição cancerizável, alterações neoplásicas podem levar um período variável de tempo para se manifestar, e, portanto, é necessário realizar reavaliação clínica e histopatológica em intervalos menores nessas lesões.

Os estudos de ploidia de DNA por citometria digital em LPO são poucos, e alguns trazem um número de casos muito pequenos, o que dificulta a comparação com estes resultados. No estudo de Pfitzer e Pape (1975), foi analisado somente um caso de LPO atrófico, que apresentou grau diplóide. Igualmente no trabalho de Mollaoglu, Cowpe e Lewis (2001), um caso de LPO é descrito, em que, após um curto período de acompanhamento, exibiu aneuploidia e histologicamente evidenciou um carcinoma espinocelular. Nesses estudos, diferentemente do que ocorreu neste trabalho, foi utilizada a análise citométrica em monocamadas de células epiteliais, provenientes de esfregaços das lesões de LPO. Nesta pesquisa, a análise citométrica foi realizada em espécimes emblocados em parafina, objetivando um estudo retrospectivo. Entretanto, pela praticidade da citologia esfoliativa e por não se tratar de um método invasivo, concorda-se com esses autores que acreditam que a

combinação da avaliação citológica, citométrica e histológica em condições cancerizáveis, como o LPO, podem produzir alta porcentagem de diagnósticos precoces do câncer de boca.

O presente trabalho não teve por objetivo avaliar o grau de malignidade, que em citometria é definido pelo logaritmo de transformação de 2cDI (a média de desvio do valor 2c) e pelo 5cEX que é a porcentagem de núcleos acima de 5c. Entretanto, foram observados valores mais altos de ploidia nos padrões aneuplóides, ou seja, maior número de células excedentes de 5c foi encontrado nos casos do grupo AE e no caso 20 do grupo R, em que o paciente com LPOR apresentou um carcinoma espinocelular durante o período de acompanhamento. Resultados similares foram atingidos por Gombos et al. (1993) que, nos casos de LPO analisados por citometria digital, observaram valores mais expressivos de ploidia, até a aneuploidia, e de grau de malignidade em pacientes com a forma de líquen plano oral atrófico-erosivo.

A ausência ou presença de displasia não foi um fator determinante na escolha dos espécimes estudados, e, aleatoriamente nesta pesquisa, baseados na interpretação histopatológica das lâminas, que foi realizada por patologistas experientes do SEHSL, somente no grupo R foram incluídos 2 espécimes com displasia epitelial leve. Quando foi relacionada a presença de displasia nas lâminas do Grupo R ao grau de ploidia, um caso exibiu padrão diplóide e o outro padrão aneuplóide, o que não permite opinião sobre a relação entre displasia e aneuploidia.

A relação entre a aneuploidia e casos de displasia severa, em lesões malignas e pré-malignas, foi observada por Högmo et al. (1998) e por Gabriel (2006). E Mattila, Alanen e Syrjanen (2004), em amostras de biópsias subseqüentes de pacientes com LPOAE, detectaram 41% das amostras com padrão aneuplóide, sendo que os LPO com displasia, ulcerações e localizados na língua tiveram valores de ploidia mais elevados, entretanto, entre os 5 casos que apresentaram cancerização, 1 destes não tinha displasia, e o grau de ploidia era diplóide na primeira biópsia. Já Bornstein et al. (2006) relataram 4 casos de cancerização em região de LPO, sendo que 3 destes casos apresentaram displasia no diagnóstico inicial de LPO, o que demonstra a necessidade de um período longo de

acompanhamento dos pacientes com LPO e confirma a importância da realização de biópsias periódicas e consecutivas, principalmente em lesões de LPOAE, com displasia.

Maraki et al. (2006) avaliaram por citometria digital, 6 casos de LPOAE que, na citologia esfoliativa, mostraram suspeitas para células neoplásicas, e, em 2 desses casos, em que houve cancerização, o grau aneuplóide foi encontrado. O fato que se observa é que esses autores, tal como neste estudo, confirmaram casos de aneuploidia em lesões de LPOAE.

O número maior de casos de aneuploidia encontrado neste estudo pode ser também justificado porque se utilizou um único tingimento das lâminas analisadas, com o corante estequiométrico pelo método de Feulgen, pelo emprego do *Kit comercial MERCK*[®], de acordo com as instruções do fabricante e conforme recomendações da *European Society for Analytical Cellular Pathology (ESACP) consensus report on diagnostic DNA image cytometry* (BÖCKING; GIROUD; REITH, 1995). Já os autores anteriormente citados (MARAKI et al., 2006) realizaram um retingimento, ou seja, usaram a coloração de Feulgen em lâminas citológicas, anteriormente preparadas de acordo com o método de Papanicolaou, e avaliaram com técnica automatizada de citometria um mínimo de 300 células epiteliais malignas ou displásicas em cada espécime descartando aqueles espécimes com menos de 50 células diagnosticamente relevantes o que, talvez, poderia alterar o coramento dos núcleos com Feulgen e a quantificação citométrica do DNA.

O padrão tetraplóide é encontrado em tecido normal, lesões de condições cancerizáveis e de neoplasias, mas é considerado um padrão mais ligado à euploidia (GABRIEL, 2006; PRADHAM et al., 2006). Nesta pesquisa, o padrão tetraplóide foi observado em um caso do grupo controle, isto é, em lâmina com células epiteliais normais, e em uma lesão de LPOAE, e nesse caso, não foi observada cancerização em 1 ano de acompanhamento no SEHSL. Diferentemente deste estudo Neppeelberg e Johannenssen (2007) observaram uma lesão com padrão tetraplóide em lesões LPO em um paciente que desenvolveu um carcinoma espinocelular dois anos após a identificação desse grau de ploidia.

Ao contrário deste estudo, em que foram analisadas as formas de LPOAE e o LPOR, Rode et al., (2006), utilizando citometria digital, analisaram aspectos da textura nuclear e o grau de ploidia de DNA somente na forma de LPOR e compararam a células da mucosa bucal de controles normais e a células da mucosa bucal de pacientes com câncer no pulmão. Todas as amostras de LPOR mostraram padrão diplóide, enquanto que, neste estudo, foram encontrados dois casos com aneuploidia em LPOR, sendo que em um deles se observou um número expressivo de células acima de 5c. Entretanto, os referidos autores observaram mudanças na estrutura da cromatina do LPOR quando comparadas às células normais; porém, não expressaram mudanças associadas com malignidade quando comparadas às alterações da estrutura da cromatina observadas nas células da mucosa de pacientes com câncer de pulmão. Neste trabalho, não foram analisados aspectos da textura nuclear, mas avaliadas e comparadas 14 medidas cariométricas dos núcleos de células epiteliais de ambos os grupos estudados.

Verificou-se que as médias das medidas de densidade média e de densidade mínima no grupo R foram significativamente maiores do que no grupo AE e a média das medidas de *roundness* no grupo AE foi significativamente maior do que no grupo R. Portanto, a média das medidas nucleares de densidade média, densidade mínima e *roundness* apresentou diferença significativa em relação aos grupos R e AE. Para as demais variáveis não houve diferença significativa entre os grupos. Resultados distintos foram observados por Gabriel (2006). Avaliando 17 características cariométricas, verificou que 8 delas (área, densidade média, dimensão fractal, IOD, diâmetro máximo, diâmetro mínimo, diâmetro médio e perímetro) permitiram discriminar a qual grupo diagnóstico cada lesão pertencia. Para ele é possível que se estabeleçam modelos de interpretação histopatológica, baseados em medidas morfológicas do núcleo celular, que garantam a uniformização de diagnósticos e a implementação de maior objetividade na análise histopatológica. Entretanto o autor analisou núcleos celulares de distintas lesões (cancerizáveis e neoplasias), diferentemente deste estudo em que foram incluídas apenas lesões de LPO. Quando Futterleib (2007) comparou a acurácia dos métodos de Papanicolaou por citomorfologia e de Feulgen por citometria digital na detecção de atipias celulares em exames citopatológicos da mucosa bucal, incluiu 9 casos de líquen plano oral e

observou que as variáveis citométricas nucleares, densidade ótica integrada, área e diâmetro foram capazes de diferenciar lesões positivas e negativas para atipia.

Portanto, pelos resultados do presente estudo, ao considerar-se a aneuploidia como um marcador de neoplasia, pode se presumir que a forma clínica de LPOAE tem maior propensão à transformação maligna do que a forma clínica de LPOR. Porém um estudo de seguimento dos casos analisados, de longo prazo, se faz necessário para confirmar essa questão. A identificação de marcadores de neoplasia em lesões cancerizáveis e a associação de técnicas podem servir para estabelecer protocolos diagnósticos, prognósticos e de tratamento precoce de lesões malignas, com conseqüente benefício aos pacientes.



7 CONCLUSÕES

Com a metodologia empregada e com base nos resultados da presente pesquisa, conclui-se que:

- a) o grau de ploidia de DNA mais freqüente em lesões de líquen plano oral é o diplóide;
- b) o grau de ploidia diplóide está associado a forma clínica de líquen plano oral reticular, enquanto que o grau de ploidia aneuplóide está associado a forma clínica de líquen plano oral atrófico-erosivo;
- c) entre as 14 medidas cariométricas analisadas nos núcleos das células epiteliais de líquen plano oral, a densidade média, densidade mínima e *roundness* apresentaram diferença significativa entre os grupos.



REFERÊNCIAS²

ABOU-ELHAMD, K. E.; HABIB, T. N. The flow cytometric analysis of premalignant and malignant lesions in head and neck squamous cell carcinoma. **Oral Oncology**, Oxford, v. 43, n. 4, p. 366-372, Apr. 2007.

ANDREASEN, J. O. Oral lichen planus: a clinical evaluation of 115 cases. **Journal of Oral Surgery**, Chicago, v. 25, n. 1, p. 31-42, Jan. 1968.

ANDREASEN, J. O.; PINDBORG, J. J. Development of cancer in oral lichen planus: a review of the literature. **Nordisk Medicin**, Hlsingborg, v. 70, p. 861-884, Aug. 1963.

AUER, G. U.; CASPERSSON, T. O.; WALLGREN, A. S. DNA content and survival in mammary carcinoma. **Analytical and Quantitative Cytology**, St. Louis, v. 2, n. 3, p. 161-165, Sept. 1980

AUER, G. U.; FALKMER, U. G.; ZETTERBERG, A. D. Image cytometric nuclear DNA analysis in clinical tumour material. In: BAAK, J. P. A. (Ed.). **Manual of quantitative pathology in cancer diagnosis and prognosis**. BerlinSpringer-Verlag; 1991. p. 211-232.

BAAK, J. P.; JANSSEN, E. DNA ploidy analysis in histopathology. **Histopathology**, Oxford, v. 44, n. 6, p. 603-614, June 2004.

BACUS, J. W; BACUS, J. V. A method of correcting DNA ploidy measurements in tissue sections. **Modern Pathology**, Baltimore, v. 7, n. 6, p. 652-664, Aug. 1994.

BALBINOTTI, R. A.; SILVA, V. D.; PROLLA, J. C. Desenvolvimento e aplicação de método para estudo da ploidia do DNA em carcinomas de estômago e cólon. **Revista Científica AMECS**, Porto Alegre, v. 10, n. 1, p. 17-23, jan./jun. 2001.

BALSARA, B. R. et al. Flow cytometric DNA analysis of squamous cell carcinomas of the oral cavity correlation with clinical and histopathological features. **European Journal of Cancer. Oral Oncology. Part B**, Oxford, v. 30B, n. 2, p. 98-101, 1994.

BARETTON, G. et al. DNA-Zytometrie am paraffin-eingebetteten Tumorgewebe.

² Tese de acordo com Padrão ABNT (Associação Brasileira de Normas Técnicas), NRB nº 6023, nº 6024, 6027, 6028, 10520, e 14724.

Vergleich der durchflubzytometrie (FCM) under der bildanalytischen zytometrie(ICM). **Zentralblatt für Pathologie**, München, v. 139, n. 6, p. 419-425, 1993.

_____. Prognostic significance of DNA ploidy in oral squamous cell carcinomas: a retrospective flow and image cytometric study with comparison of DNA ploidy in excisional biopsy specimens and resection specimens, primary, tumors, and lymph node metastases. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontics**, St Louis, v. 79, n. 1, p. 68-76, Jan. 1995.

BARNARD, C. et al. Oral cancer development in patients with oral lichen planus. **Journal of Oral Pathology Medicine**, Copenhagen, v. 22, n. 9, p. 421-424, Oct. 1993.

BARNES, L. et al. (Ed.). **World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours**. Lyon: IARC, 2005.

BASCONES, C. et al. Apoptosis and cell cycle arrest in oral lichen planus hypothesis on their possible influence on its malignant transformation. **Archives of Oral Biology**, Elmsford, v. 50, n. 10, p. 873-881, Oct. 2005.

BIESTERFELD, S. et al. DNA-cytometric detection of euploid polyploidization in oral lichen ruber planus. **Analytical and Quantitative Cytology and Histology**, St. Louis, v. 13, n. 1, p. 7-10, Feb. 1991.

_____. Polyploidy in non-neoplastic tissues. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 47, n. 1, p. 38-42, Jan. 1994.

BINS, M.; TAKENS, F. A method to estimate the DNA content of whole nuclei from measurements made on thin tissue sections. **Cytometry**, New York, v. 6, n. 3, p. 234-237, May 1985.

BÖCKING, A.; GIROUD, F.; REITH, A. Consensus report of the European Society for Analytical Cellular Pathology task force on standardization of diagnostic DNA image cytometry. **Analytical and Quantitative Cytology and Histology**, St. Louis, v. 17, n. 1, p. 1-7, Feb. 1995.

BORNSTEIN, M. M. et al. Oral lichen planus and malignant transformation: a retrospective follow-up study of clinical and histopathologic data. **Quintessence International**, Berlin, v. 37, n. 4, p. 261-271, Apr. 2006.

CAMISA, C.; HAMATY, F.; GAY, D. J. Squamous cell carcinoma of the tongue arising in lichen planus: a case report and review of the literature. **Cutis**, New York, v. 62, n. 4, p. 175-178, Oct. 1998.

CAREY, F. A. Measurement of nuclear DNA content in histological and cytological specimens: principles and applications. **The Journal of Pathology**, London, v. 172, n. 4, p. 307-312, Apr. 1994.

CHAINANI-WU, N. et al. Oral lichen planus patient profile, disease progression and treatment responses. **JADA**, São Paulo, v.132, n. 7, p. 901-909, July 2001.

CHIAPPELLI, F. et al. Cellular immune correlates of clinical severity in oral lichen planus: preliminary association with mood states. **Oral Diseases**, Hampshire, v. 3, n. 2, p. 64-70, June 1997.

COHEN, C. Image cytometric analysis in pathology. **Human Pathology**, Philadelphia, v. 27, n. 5, p. 482-493, May 1996.

DANQUE, P.O. et al. Image analysis versus flow cytometry for DNA ploidy quantitation of solid tumors: a comparison of six methods of sample preparation. **Modern Pathology**, Baltimore, v. 6, n. 3, p. 270-275, May 1993.

DELAMATER, E. D.; SCHAECHTER, M.; HUNTER, M. E. A chemically specific double-staining technique for desoxyribosenucleic acid and other aldehydelyielding or aldehyde-containing substances. **The Journal of Histochemistry and Cytochemistry**, Baltimore, v. 3, n. 1, p. 16-21, Jan. 1955.

DORMAN, A. et al. Ploidy of smooth muscle tumours: retrospective image: analysis study of formalin fixed, paraffin wax embedded tissue. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 43, n. 6, p. 465-468, June 1990.

DOYLE, J. L.; MANHOLD, J. H. Jr. Feulgen microspectrophotometry of oral cancer and leukoplakia. **Journal of Dental Research**, Chicago, v. 54, n. 6, p. 1196-1199, Nov./Dec. 1975.

DUFFEY, D. C.; EVERSOLE, L. R.; ABEMAYOR, E. Oral lichen planus and its association with squamous cell carcinoma: an update on pathogenesis and treatment implications. **The Laryngoscope**, St. Louis, v. 106, n. 3, p. 357-362, Mar. 1996.

EISENBERG, E. Clinical controversies in oral and maxillofacial surgery part one: oral

lichen planus a benign lesion. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Philadelphia, v. 58, p. 1278-1285, 2000.

EISENBERG, E.; KRUTCHKOFF, D. Controversies in oral pathology. Lichenoid lesions of oral mucosa. Diagnostic criteria and their importance in the alleged relationship to oral cancer. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, St. Louis, v. 73, n. 6, p.699-704, June 1992.

EL NAGAR, A. K.; REICHARDT, P. A. Proliferative verrucous leucoplasia and precancerous conditions. In: BARNES, L. et al. (Ed.). **World Health Organization Classification of Tumours. Pathology and Genetics of Head and Neck Tumours**. Lyon: IARC, 2005. p. 180-181.

FARANDA, A. et al. Image and flow cytometric analyses of DNA content in human solid tumors: a comparative study. **Analytical and Quantitative Cytology and Histology**, St. Louis, v. 19, n. 4, p. 338-344, Aug. 1997.

FEMIANO, F.; SCULLY, C. DNA cytometry of oral leukoplakia and oral lichen planus. **Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal**, Valencia, v.10, Suppl 1, p. E40-4, Apr. 2005a.

_____. Functions of the cytokines in relation oral lichen planus-hepatitis C. **Medicina Oral Patologia Oral y Cirugia Bucal**, Valencia, v 10, p. E40-E44, 2005b.

FLEEGER, J. C.; BAAK, J. P.; SMEULDERS, A. W. Analysis of measuring system parameters that influence reproducibility of morphometric assessments with a graphic tablet. **Human Pathology**, Philadelphia, v. 19, n. 5, p. 513-517, May 1988.

FLETCHER, R. H.; FLETCHER, S. W.; WAGNER, E. H. **Epidemiologia clínica: elementos essenciais**. 3. ed. Porto Alegre: Artes Médicas, 2003.

FULLING, H. J. Cancer development in oral lichen planus: a follow-up study of 327 patients. **Archives of Dermatology**, Chicago, v. 108, n. 5, p. 667-669, Nov. 1973.

FUTTERLEIB, A. **Acurácia das técnicas de Papanicolaou por citomorfologia e de Feulgen por citometria digital no diagnóstico de atipias em exames citopatológicos da mucosa oral**. 2007. Tese (Doutorado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre, 2007.

GABRIEL, J. G. **Progresso de lesões cancerizáveis da cavidade bucal: análise por citometria digital**. 2006. Tese (Doutorado em Odontologia) - Faculdade de Odontologia, Pontifícia Universidade Católica do Rio Grande do Sul, Porto Alegre 2006.

GANDARA, B. **Oral lichen planus: a potential premalignant lesion**. Washington, DC: e-PIE, Apr. 2004. Disponível em: <<http://www.dental.washington.edu/oralpath/newsletter/april-04/case.htm>>. Acesso em: 2 out. 2007. Clinical Case Discussions.

GIROUD, F. et al. 1997 ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry. Part II: specific recommendations for quality assurance. **European Society for Analytical Cellular Pathology**, Amsterdam, v. 17, n. 4, p. 201-208, 1998.

GOLDBERG, D. M.; DIAMANDIS, E. P. Models of neoplasia and their diagnostic implications: a historical perspective. **Clinical Chemistry**, Baltimore, v. 39, n. 11 pt. 2, p. 2360-2374, Nov. 1993.

GOMBOS, F. et al. La valutazione quantitativa Del DNA nei casi di lichen del cavo orale potenzialmente cancerosi. **Minerva Stomatologica**, Turin, v. 42, n. 6, p. 257-64, Giugno 1993.

GONZLEZ-MOLES, M. A. et al. Cell cycle regulating mechanisms in oral lichen planus: molecular bases in epithelium predisposed to malignant transformation. **Archives of Oral Biology**, Elmsford, v. 51, n. 12, p. 1093-1103, Dec. 2006.

GOULANDRIS, N. et al. Deoxyribonucleic acid measurements in transitional cell carcinomas: comparison of flow and image cytometry techniques. **Journal of Urology**, Hagerstown, v. 156, n. 3, p. 958-90, Sep. 1996.

HAROSKE, G. et al. 1997 ESACP consensus report on diagnostic DNA image cytometry: part I: basic considerations and recommendations for preparation, measurement and interpretation. **Analytical Cellular Pathology**, Amsterdam, v. 17, n. 4, p. 189-200, 1998.

_____. Fourth updated ESACP (European Society for Analytical Cellular Pathology) consensus report on diagnostic DNA image cytometry. **Analytical Cellular Pathology**, Amsterdam, v. 23, n. 2, p. 89-95, 2001.

HÖGMO, A. et al. Preneoplastic oral lesionsthe clinical value of image cytometry

DNA analysis, p53 and p21/WAF1 expression. **Anticancer Research**, Athens, v. 18, n. 5B, p. 3645-3650, Sept./Oct. 1998.

HSUE, S. S. et al. Malignant transformation in 1458 patients with potentially malignant oral mucosal disorders: a follow-up study based in a Taiwanese hospital. **Journal of Oral Pathology Medicine**, Copenhagen, v. 36, n. 1, p. 25-29, Jan. 2007.

INGAFOU, M. et al. Oral lichen planus: a retrospective study of 69 british patients. **Oral Diseases**, Hampshire, n. 12, n. 5, p. 463-468, Sept. 2006.

ISMAIL, S. B.; KUMAR, S. K. S.; ZAIN, R. B. Oral lichen planus and lichenoid reactions: etiopathogenesis, diagnosis, management and malignant transformation. **Journal of Oral Science**, Tokyo, v. 49, n. 2, p. 89-106, June 2007.

KILPI, A. et al. Studies of the inflammatory process and malignant potencial of oral mucosal lichen planus. **Australian Dental Journal**, North Sydney, v. 41, n. 2, p. 87-90, Apr. 1996.

KINOSHITA, Y. et al. Diagnostic significance of nuclear DNA content and nuclear area in oral hyperplasia, dysplasia, and carcinoma. **Journal of Oral and Maxillofacial Surgery**, Philadelphia, v. 50, n. 7, p. 728-733, July 1992.

KISS, R. et al. Methods in pathology: modification of tumor ploidy level via the choice of tissue taken as diploid reference in the digital cell image analysis of Feulgen-stained nuclei. **Modern Pathology**, Baltimore, v. 5, n. 6, p. 655, 1992.

KÖVESI, G.; BÁNÓCZY, J. Follow-up studies in oral lichen planus. **International Journal of Oral Surgery**, Copenhagen, v. 2, n. 1, p. 13-19, 1973.

KRISTENSEN, G. B. et al. Large-scale genomic instability predicts long-term outcome for women with invasive stage I ovarian cancer. **Annals of Oncology**, London, v. 14, n. 10, p. 1494-1500, Oct, 2003.

KRUTCHKOFF, D. J.; EISENBERG, E.; CONN, F. Lichenoid dysplasia: a distinct histopathologic entity. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology**, St. Louis, v. 60, n. 3, p. 308-315, Sept. 1985.

LAEIJENDECKER, R. et al. Premalignant nature of oral lichen planus. **Acta Dermato-Venereologica**, Stockolm, v. 85, n. 6, p. 516-520, 2005.

LO MUZIO, L. et al. The possible association between oral lichen planus and oral squamous cell carcinoma: a clinical evaluation on 14 cases and a review of the literature. **Oral Oncology**, Oxford, v. 34, n. 4, 239-246, July 1998.

LOZADA-NUR, F.; MIRANDA, C. Oral lichen planus: epidemiology, clinical characteristics, and associated diseases. **Seminars in Cutaneous Medicine and Surgery**, Philadelphia, v. 16, n. 4, p. 273-277, Dec. 1997.

MANZ, B.; PAASCH, U.; STICHERLING, M. Squamous cell carcinoma as a complication of long-standing hypertrophic lichen planus. **International Journal of Dermatology**, Philadelphia, v. 44, n. 9, p. 773-774, Sept. 2005.

MARAKI, D.; BECKER, J.; BOECKING, A. Cytologic and DNA-cytometric very early diagnosis of oral cancer. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, Copenhagen, v. 33, n. 7, p. 398-404, Aug. 2004.

MARAKI, D. et al. Cytologic and DNA-cytometric examination of oral lesions in lichen planus. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, Copenhagen, v. 35, n. 4, p. 227-32, Apr. 2006.

MASSA, M. C. et al. Malignant transformation of oral lichen planus: case report and review of the literature. **Cutis**, New York, v. 45, n. 1, p. 45-47, Jan. 1990.

MATTILA, R.; ALANEN, K.; SYRJANEN, S. DNA content as a prognostic marker of oral lichen planus with a risk of cancer development. **Analytical and Quantitative Cytology and Histology**, St. Louis, v. 26, n. 5, p. 278-284, Oct. 2004.

MIGNOGNA, M. D. et al. Clinical guidelines in early detection of oral squamous cell carcinoma arising in oral lichen planus: a 5-year experience. **Oral Oncology**, Oxford, v. 37, n. 3, p. 262-267, Apr. 2001.

MITHANI, S. K. et al. Molecular genetics of premalignant oral lesions. **Oral Diseases**, Hampshire, v. 13, n. 2, p. 126-133, Mar. 2007.

MOLLAOGLU, N.; COWPE, J. G.; LEWIS M. A. O. Quantitative cytological assessment of a persistent oral lesion that underwent malignant transformation: a case report. **Cytopathology**, Oxford, v. 12, n. 1, p. 62-67, Feb. 2001.

NAGAO, T. et al. Incidence rates for oral leukoplakia and lichen planus in a Japanese population. **Journal of Oral Pathology and Medicine**, Copenhagen, v. 34, n. 9, p.

532-539, Oct. 2005.

NEPPELBERG, E.; JOHANNESSEN, A. C. DNA content, Cyclooxygenase-2 expression and loss of E-cadherin expression do not predict risk of malignant transformation in oral lichen planus. **European Archives of Oto-Rhino-Laryngology**, Heidelberg, v. 264, n. 10, p. 1223-1230, Oct. 2007.

NEVILLE, B. W. et al. **Patologia oral e maxilofacial**. 3. ed. Rio de Janeiro Guanabara Koogan, 2004.

NOGUCHI, M. et al. Invasive front in oral squamous cell carcinoma image and flow cytometric analysis with clinicopathologic correlation. **Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology, and Endodontics**, St. Louis, v. 93, n. 6, p. 682-687, June 2002.

PAPE, H. D.; PFITZER, P. The nuclear DNA-content of turnover cells in the oral cavity. **Journal of Maxillofacial Surgery**, Stuttgart, v. 1, n. 2, p. 117-121, June 1973.

PFITZER, P.; PAPE, H. D. Investigation of DNA-content of leukoplakia cells or oral mucosa. **Journal of Maxillofacial Surgery**, Stuttgart, v. 3, n. 2, p. 119-124, June 1975.

PINDBORG, J. J. et al. **Histological typing of cancer and precancer of the oral mucosa**. 2. ed. Berlin Springer, 1997.

PRADHAN, M. et al. Image cytometry DNA ploidy correlates with histological subtypes in endometrial carcinomas. **Modern Pathology**, Baltimore, v. 19, n. 9, p. 1227-1235, Sept. 2006.

RAJENTHERAN, R. et al. Malignant transformation of oral lichen planus. **European Journal of Surgical Oncology**, London, v. 25, n. 5, p. 520-523, Oct. 1999.

REMMERBACH, T. W. et al. Cytologic and DNA-cytometric early diagnosis of oral cancer. **Analytical Cellular Pathology**, Amsterdam, v. 22, n. 4, p. 211-221, 2001.

RODE, M. et al. Image cytometric evaluation of nuclear texture features and DNA content of the reticular form of oral lichen planus. **Analytical and Quantitative Cytology**, St. Louis, v. 25, n. 5, p. 262-268, Oct. 2006.

SCHIMMING, R. et al. Prognostic relevance of DNA image cytometry in oral cavity carcinomas. **Analytical and Quantitative Cytology and Histology**, St. Louis v. 20, n. 1, p. 43-51, Feb. 1998.

SCHULTE, E. K. W.; WITTEKIND, D. H. Standardization of the Feulgen reaction: the influence of chromatin condensation on the kinetics of acid hydrolysis. **Analytical Cellular Pathology**, Amsterdam, v. 2, n. 3, p. 149-157, Apr. 1990.

SCHULTE, E. K. W. et al. DNA densitometry. In: HAMILTON, C. P. W.; ALLEN, D. **Quantitative clinical pathology**. Oxford: Blackwell Science, 1995. p. 140-169.

SCULLY, C. et al. Update on oral lichen planus: etiopathogenesis and management. **Critical Review in Oral Biology and Medicine**, Boca Raton, v. 9, n. 1, p. 86-122, 1998.

SENGUPTA, S.; DAS, J. K.; GANGOPADHYAY, A. A malignant transformation of hypertrophic lichen planus. **Indian Journal of Dermatology, Venereology and Leprology**, Bombay, v. 72, n. 6, p. 470-470, Nov./Dec. 2006.

SEOANE, J. et al. Flow cytometric analysis of nuclear DNA content in oral leukoplakia. **Clinical Otolaryngology and Allied Sciences**, Oxford, n. 23, n. 2, p. 136-140, Apr. 1998.

_____. Flow cytometric DNA ploidy analysis of oral cancer comparison with histologic grading. **Oral Oncology**, Oxford, v. 35, n. 3, p. 266-272, May 1999.

_____. Oral lichen planus: a clinical and morphometric study of oral lesions in relation to clinical presentation. **Brazilian Dental Journal**, Ribeirão Preto, v. 15, n. 1, p. 9-12, 2004.

SERTH, J. et al. Quantitation of DNA extracted after micropreparation of cells from frozen and formalin-fixed tissue sections. **The American Journal of Pathology**, Philadelphia, v. 156, n. 4, p. 1189-1196, Apr. 2000.

SHANKEY, T. V. et al. Guidelines for implementation of clinical DNA cytometry. **Cytometry**, New York, v. 14, n. 5, p. 472-477, 1993.

SHERR, C. J. Cancer cell cycles. **Science**, Washington, v. 274, p. 1672-1677, 1996. Disponível em: <<http://www.sciencemag.org/cgi/content/full/274/5293/1672>>. Acesso em: 15 abr. 2006.

SHIRATA, N. K. et al. DNA ploidy in cervical lesions assessed by computed image analysis: relation to histopathology. **Phatologica**, Genova, n. 95, n. 2, p. 88-91, Apr. 2005.

SIGURGEIRSSON, B.; LINDELÖF, B. Lichen planus and malignancy: an epidemiologic study of 2071 patients and a review of the literature. **Archives of Dermatology**, New York, 127, n. 11, p. 1684-1688, Nov. 1991.

SILVERMAN, S, Jr. et al. A prospective study of findings and management in 214 patients with oral lichen planus. **Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology**, St. Louis, v. 76, n. 6, p. 665-670, Dec. 1991.

SILVERMAN, S. Jr., GORSKY, M.; LOZADA-NUR, F. A prospective follow-up study of 57 patients with oral lichen planus persistence, remission, and malignant association. **Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology**, St. Louis, v. 60, n. 1, p. 30-34, July 1985.

SILVERMAN, S., Jr.; GRIFFITH, M. Studies on oral lichen planus. **Oral Surgery, Oral Medicine, and Oral Pathology**, St. Louis, v. 37, n. 5, p. 705-710, May 1974.

SMITH, P.S.; PARKINSON, I.H.; LEONG, A.S.-Y. Principles of ploidy analysis by static cytometry. **Journal of Clinical Pathology**, London, v. 49, n. 2, p. M104-M111, Apr. 1996.

SORENSEN, F. B. Stereological estimation of the mean and variance of nuclear volume from vertical sections. **Journal of Microscopy**, Oxford, v. 162, n. pt. 2, p. 203-229, May 1991.

STRACHAN, T. **Genética molecular humana**. 2. ed. Porto Alegre: Artmed, 2002.

VAN DER MEIJ, E. H.; SCHEPMAN, K. P.; VAN DER WAAL, I. 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**, St. Louis, v. 96, n. 2, p. 164-171, Aug. 2003.

XUE, J. L. et al. A clinical study of 674 patients with oral lichen planus in China. **Journal Oral Pathology Medicine**, Copenhagen, v. 34, n. 8, p. 467-672, Sept. 2005.

YURGEL, L. S.; LORANDI, C. S. Líquen plano bucal: epidemiologia e uso de ácido retinóico. Aspectos histológicos dos efeitos desta droga quando aplicada em língua

de rato. **Odonto Ciência**, Porto Alegre, v. 7, n. 14, p.111-135, 1992.

ZHANG, L. et al. Molecular analysis of oral lichen planus: a premalignant lesion?
American Journal of Phathology, Philadelphia, v.151, n. 2, p. 323-327, Aug. 1997.



APÊNDICE A – Ficha-Padrão

1- Dados Pessoais			
Nº da Ficha :			
Nome:		Idade:	Sexo:
Endereço:		Telefone:	
2- Dados relativos à lesão			
Localização:		Diagnóstico clínico:	
Aspecto clínico:			
Evolução clínica:		Tempo de evolução da lesão:	
Data da primeira consulta:		Data da última consulta:	
Tempo de acompanhamento clínico no Serviço de Estomatologia do HSL:			
3- Dados relativos à biópsia			
Local da biópsia na cavidade oral:			
Número do Anátomo Patológico:		Data da biópsia:	
Características histopatológicas (microscópico):			
Diagnóstico histopatológico:			
Realização de nova biópsia:	Sim:	Não	Data: / /
Evolução histopatológica:			
4- História médica (Doença associada)		Sim:	Não
Diabete			
Lupus			
Alergias			
Herpes			
Pênfigo			
Hepatite C			
Hipertensão			
Tratamento psicológico e/ou psiquiátrico			
Problemas cardíacos			
Problemas hormonais			
Outros problemas de saúde, quais:			
5- Exames complementares na data da biópsia			
Eritrograma	Leucograma	Plaquetas	VSG
Glicemia de jejum	Anti-HCV	Anti-DNA	FAN
Contagem de Células LE			
6- Hábitos/vícios		quantidade	tempo
Tabaco			
Ex-tabagista			
Etilista			
Ex-etilista			
Chimarrão			
Café			
Outros			
7- Citometria Digital	Diplóide	Tetraplóide	Aneuplóide

APÊNDICE B – Quadro 5. Tempo de evolução da lesão de LPOR informado pelos pacientes do grupo R na primeira consulta

Caso ou Paciente	Lâmina do grupo R	Tempo de evolução na 1ª. consulta
1	R2	~ 2 anos
2	R3	> 1 mês
3	R4	~ 6 meses
4	R5	5 meses
5	R6	> 1 ano
6	R7	~ 1 ano
7	R8	4 meses
8	R9	20 dias
9	R11	não disponível
10	R12	não disponível
11	R13	~ 6 anos
12	R14	> 1 ano
13	R15	não sabe
14	R17	não disponível
15	R19	~ 1 ano
16	R20	~ 2 anos
17	R21	~ 2 meses
18	R22	7 anos
19	R24	~ 4 meses
20	R25	não disponível

Quadro 5 – Tempo de evolução da lesão de LPOR informado pelos pacientes do grupo R na primeira consulta

Fonte: Dados da pesquisa.

APÊNDICE C – Quadro 6. Tempo de evolução da lesão de LPOAE informado pelos pacientes do Grupo AE na primeira consulta

Caso ou Paciente	Lâmina do grupo AE	Tempo de evolução na 1ª consulta
1	AE1	Dado não disponível
2	AE2	1 mês
3	AE3	9 meses
4	AE4	~ 6 meses
5	AE5	2 anos
6	AE6	3 meses
7	AE7	Dado não disponível
8	AE8	Dado não disponível
9	AE9	Dado não disponível
10	AE12	Dado não disponível
11	AE13	6 meses
12	AE15	2 anos
13	AE16	> 1 ano
14	AE17	7 meses
15	AE18	~ 1 mês
16	AE19	10 anos
17	AE20	~ 3 anos
18	AE21	Dado não disponível
19	AE23	8 meses
20	AE25	Dado não disponível

Quadro 6 – Tempo de evolução da lesão de LPOR informado pelos pacientes do grupo R na primeira consulta

Fonte: Dados da pesquisa.

**APÊNDICE D – Quadro 7. Tempo de acompanhamento dos pacientes
do Grupo R no SEHSL**

Caso ou Paciente	Lâmina do grupo R	Tempo de acompanhamento no SEHSL
1	R2	7 anos e 7 meses
2	R3	6 meses
3	R4	Dado não disponível
4	R5	1 mês
5	R6	8 anos e 5 meses
6	R7	6 meses
7	R8	12 anos e 1 mês
8	R9	4 anos e 8 meses
9	R11	5 anos e 4 meses
10	R12	9 meses
11	R13	9 meses
12	R14	5 anos e 9 meses
13	R15	12 anos e 3 meses
14	R17	5 anos e 1 mês
15	R19	4 anos e 2 meses
16	R20	3 meses
17	R21	1 mês
18	R22	< 1 mês
19	R24	2 anos e 2 meses
20	R25	9 anos e 7 meses

Quadro 7 – Tempo de acompanhamento dos pacientes do Grupo R no SEHSL
Fonte: Dados da pesquisa.

APÊNDICE E – Quadro 8. Tempo de acompanhamento dos pacientes do Grupo AE no SEHSL

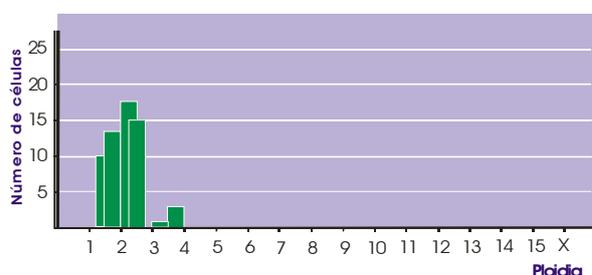
Paciente	Lâmina do grupo AE	Tempo de acompanhamento no SEHSL
1	AE1	5 anos e 1 mês
2	AE2	1 ano e 3 meses
3	AE3	1 mês
4	AE4	5 anos e 6 meses
5	AE5	10 anos
6	AE6	1 dia
7	AE7	5 meses
8	AE8	3 anos e 11 meses
9	AE9	5 anos e 2 meses
10	AE12	3 anos e 1 mês
11	AE13	1 dia
12	AE15	10 anos e 1 mês
13	AE16	1 ano
14	AE17	3 meses
15	AE18	5 meses
16	AE19	17 anos e 5 meses
17	AE20	12 anos e 2 meses
18	AE21	1 ano e 1 mês
19	AE23	4meses
20	AE25	4 anos e 3 meses

Quadro 8 – Tempo de acompanhamento dos pacientes do Grupo AE no SEHSL

Fonte: Dados da pesquisa.

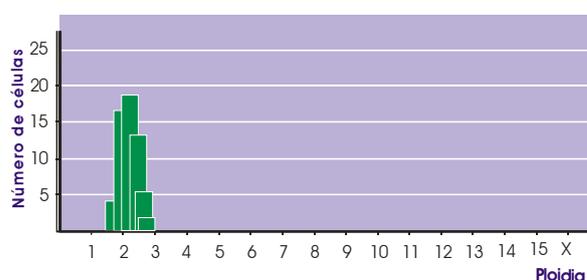
APÊNDICE F - Histogramas construídos a partir dos graus de ploidia dos núcleos celulares dos cariogramas das lâminas de cada caso do grupo R

CASO 1



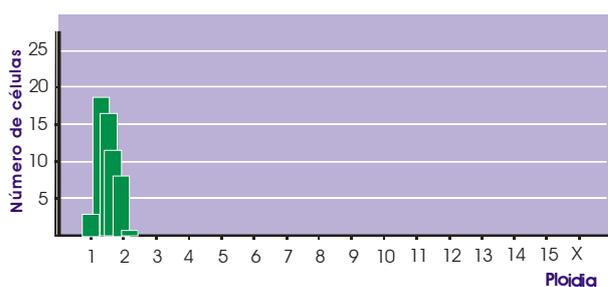
Histograma R2: padrão diplóide

CASO 2



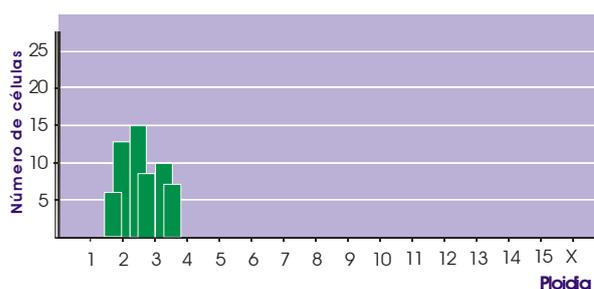
Histograma R3: padrão diplóide

CASO 3



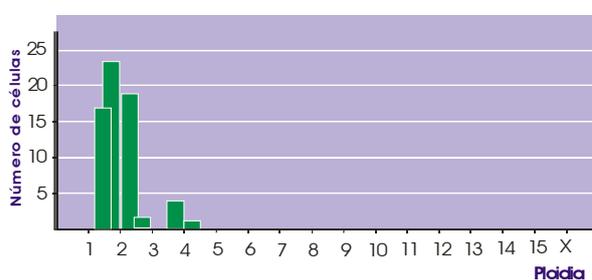
Histograma R4: padrão diplóide

CASO 4



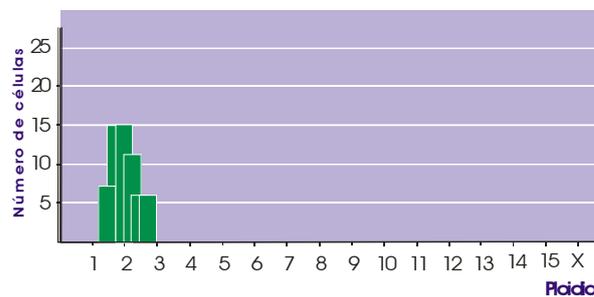
Histograma R5: padrão diplóide

CASO 5



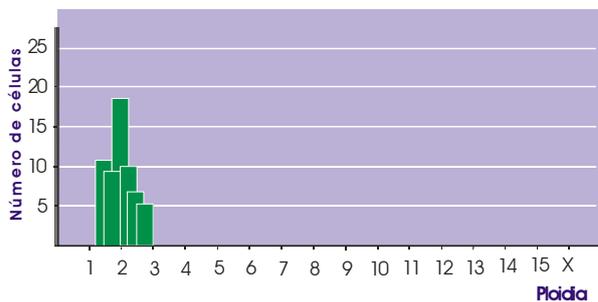
Histograma R6: padrão diplóide

CASO 6



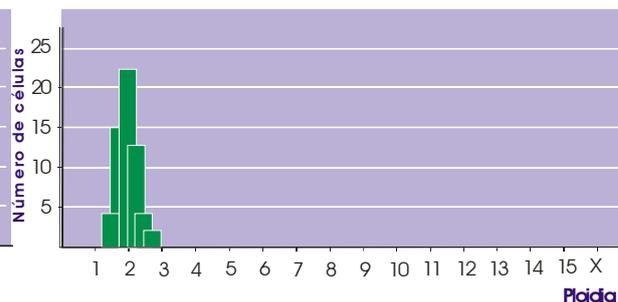
Histograma R7: padrão diplóide

CASO 7



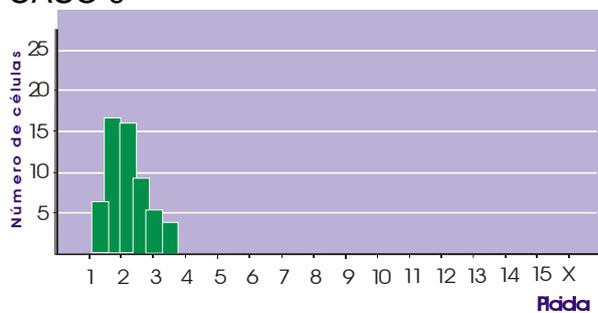
Histograma R8: padrão diplóide

CASO 8



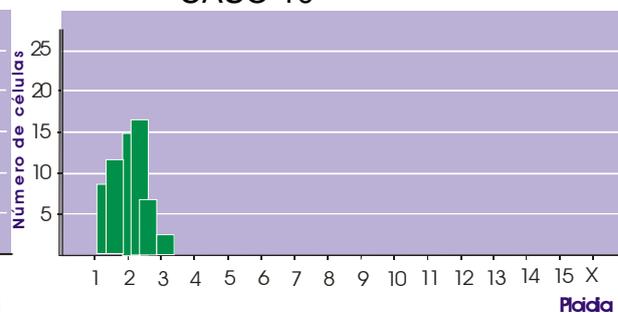
Histograma R9: padrão diplóide

CASO 9



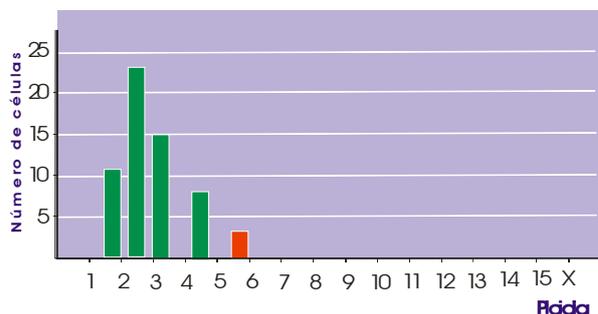
Histograma R11: padrão diplóide

CASO 10



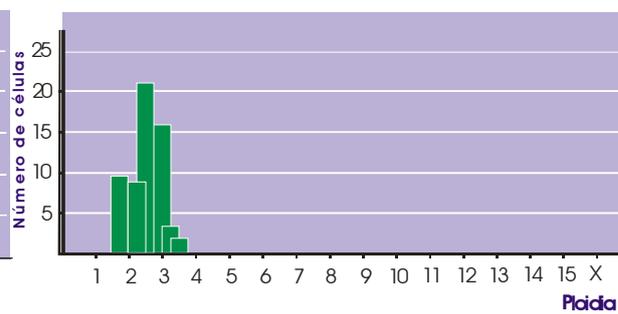
Histograma R12: padrão diplóide

CASO 11



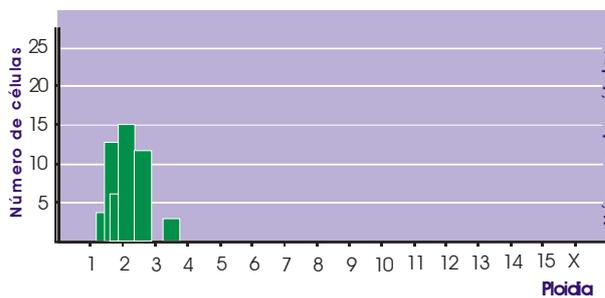
Histograma R13: padrão aneuplóide

CASO 12



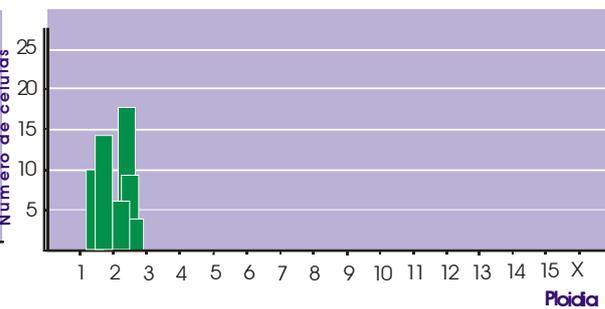
Histograma R14: padrão diplóide

CASO 13



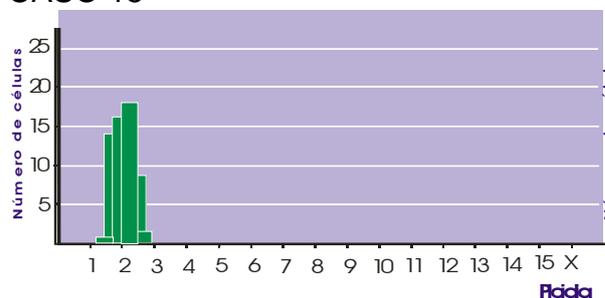
Histograma R15: padrão diplóide

CASO 14



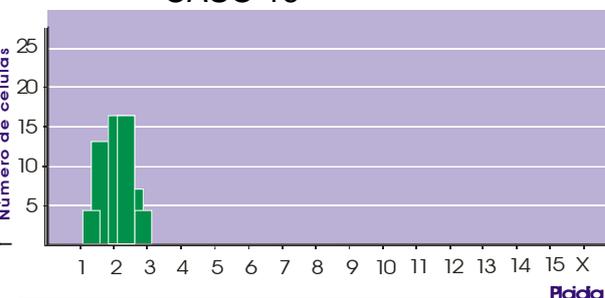
Histograma R17: padrão diplóide

CASO 15



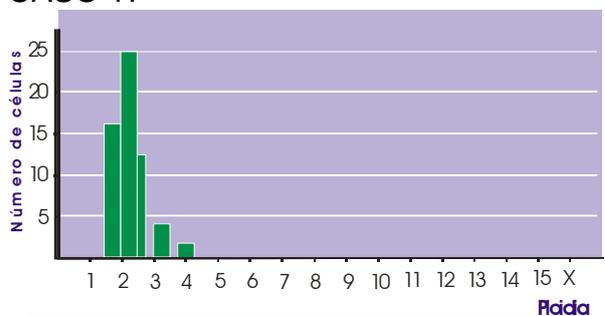
Histograma R19: padrão diplóide

CASO 16



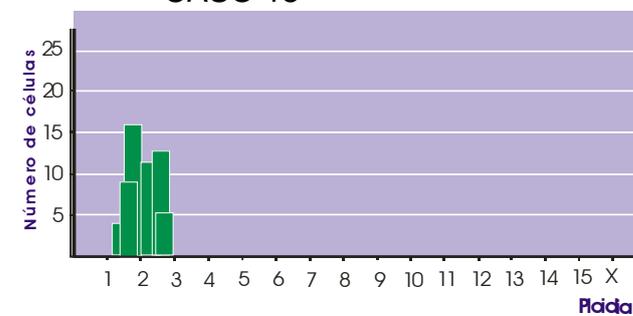
Histograma R20: padrão diplóide

CASO 17



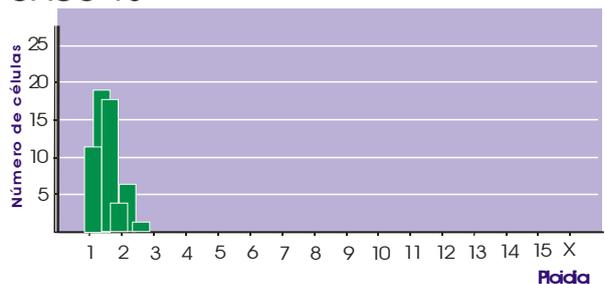
Histograma R21: padrão diplóide

CASO 18



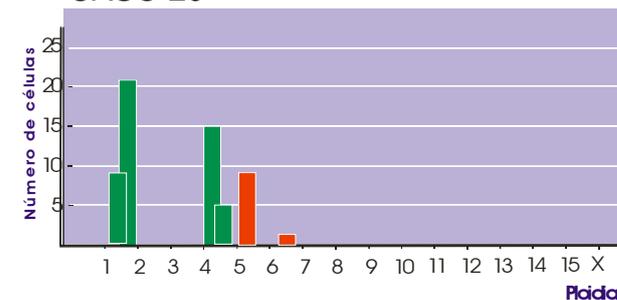
Histograma R22: padrão diplóide

CASO 19



Histograma R24: padrão diplóide

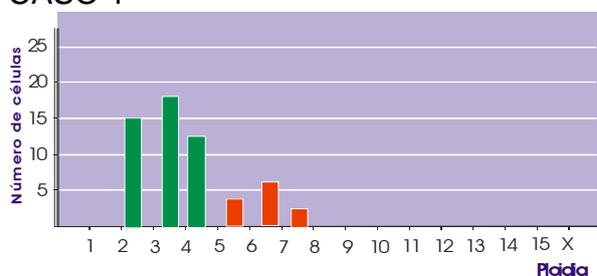
CASO 20



Histograma R25: padrão aneuplóide

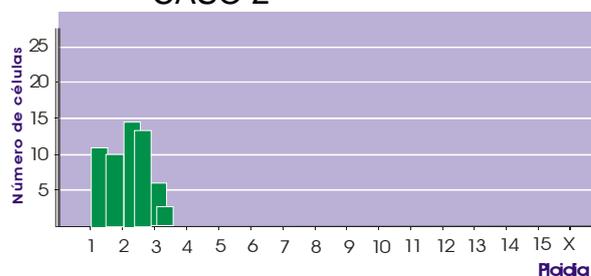
APÊNDICE G - Histogramas construídos a partir dos graus de ploidia dos núcleos celulares dos cariogramas das lâminas de cada caso do grupo AE

CASO 1



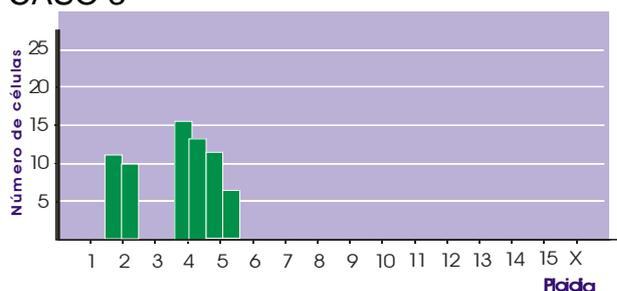
Histograma AE1: padrão aneuplóide

CASO 2



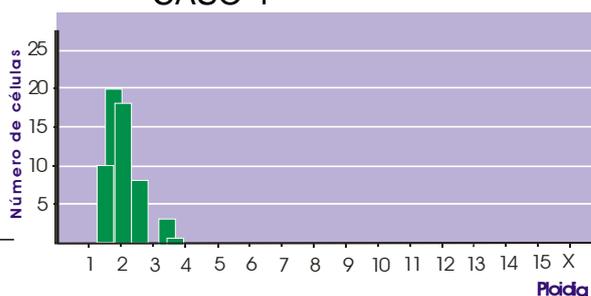
Histograma AE2: padrão diplóide

CASO 3



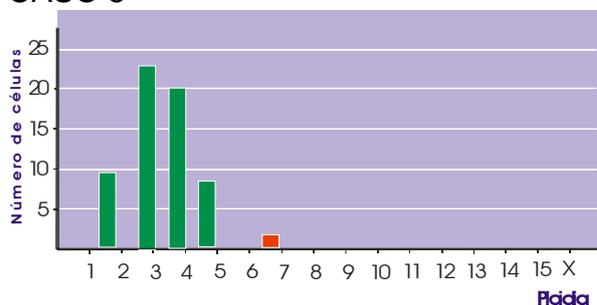
Histograma AE3: padrão tetraplóide

CASO 4



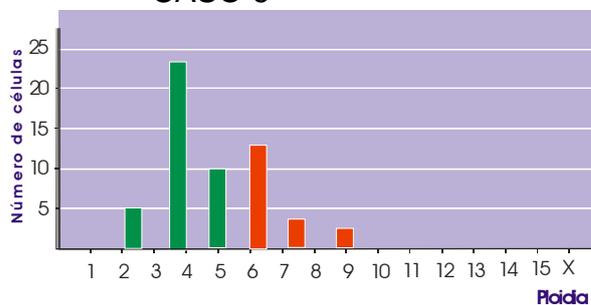
Histograma AE4: padrão diplóide

CASO 5



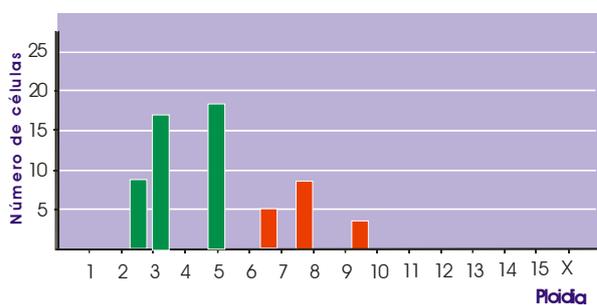
Histograma AE5: padrão aneuplóide

CASO 6



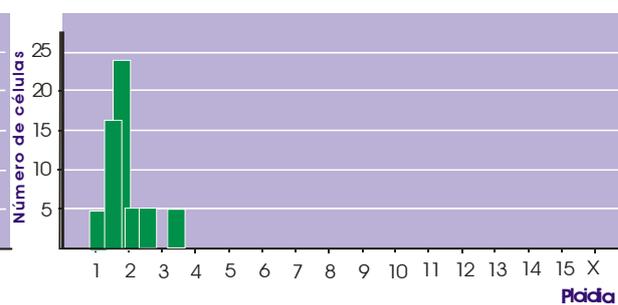
Histograma AE6: padrão aneuplóide

CASO 7



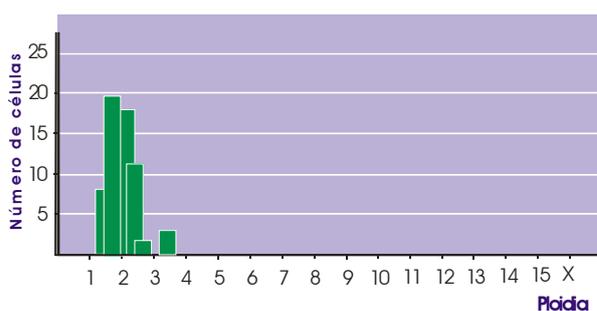
Histograma AE7: padrão aneuplóide

CASO 8



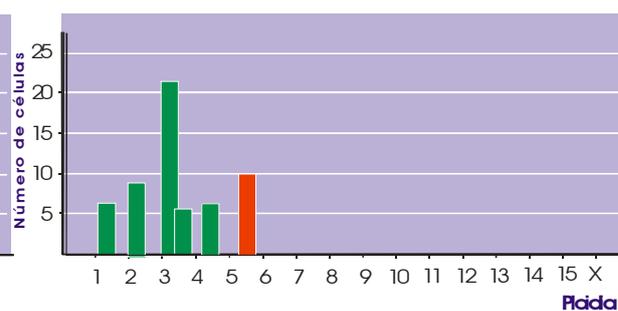
Histograma AE8: padrão diplóide

CASO 9



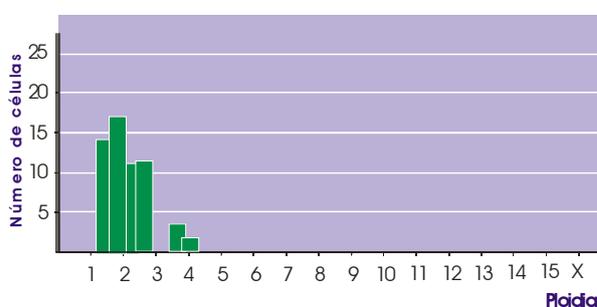
Histograma AE9: padrão diplóide

CASO 10



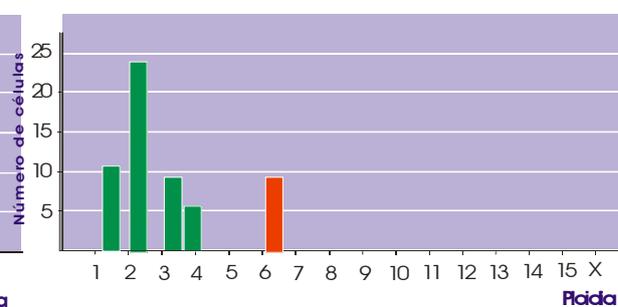
Histograma AE12: padrão aneuplóide

CASO 11



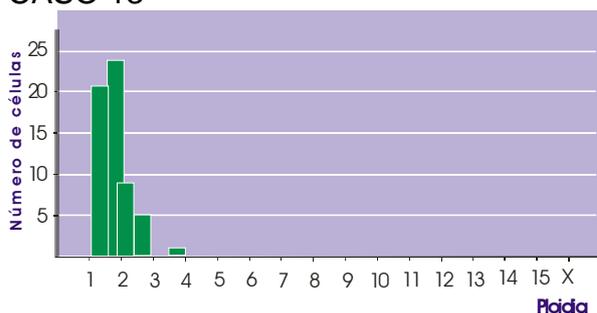
Histograma AE13: padrão diplóide

CASO 12



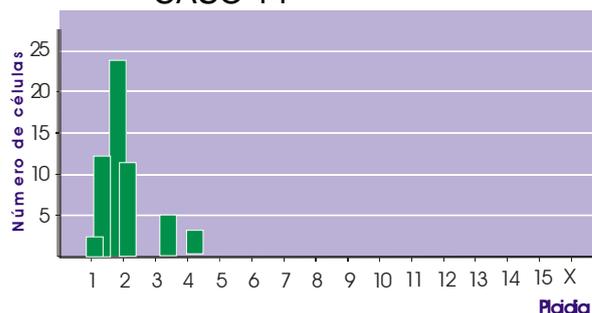
Histograma AE15: padrão aneuplóide

CASO 13



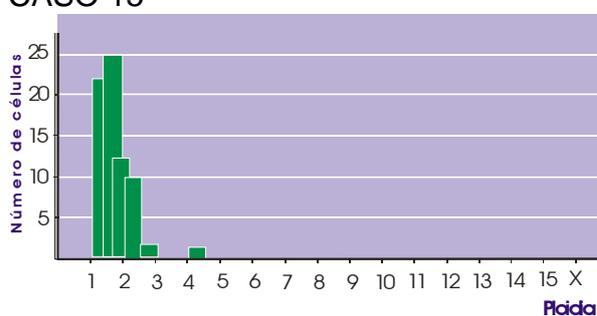
Histograma AE16: padrão diplóide

CASO 14



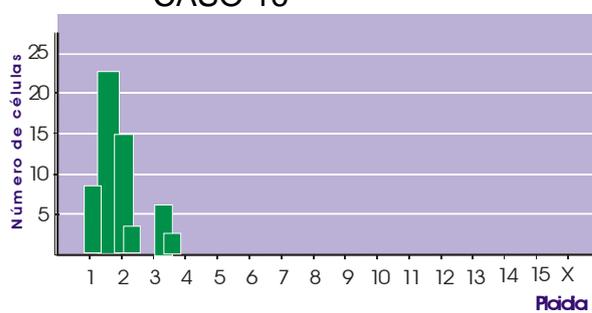
Histograma AE17: padrão diplóide

CASO 15



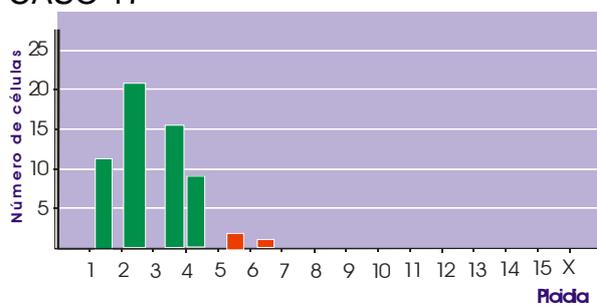
Histograma AE18: padrão diplóide

CASO 16



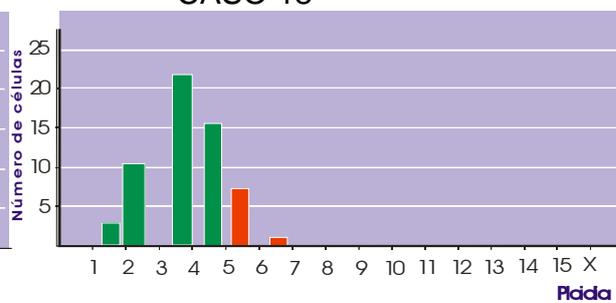
Histograma AE19: padrão diplóide

CASO 17



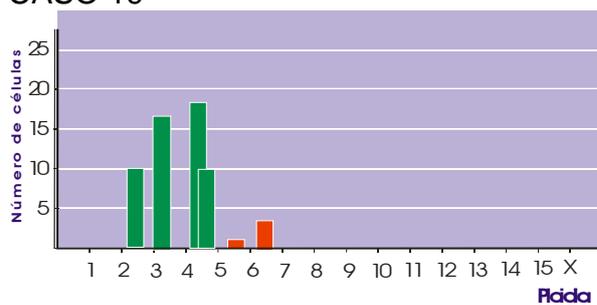
Histograma AE20: padrão aneuplóide

CASO 18



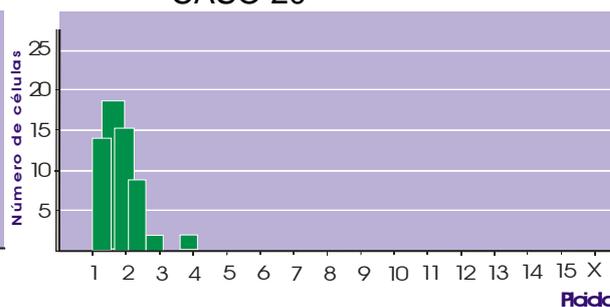
Histograma AE21: padrão aneuplóide

CASO 19



Histograma AE23: padrão aneuplóide

CASO 20



Histograma AE25: padrão aneuplóide

APÊNDICE H – Quadro 9. Grau de ploidia das lâminas do Grupo R

Lâmina	Grau de ploidia
1	diplóide
2	diplóide
3	diplóide
4	diplóide
5	diplóide
6	diplóide
7	diplóide
8	diplóide
9	diplóide
10	diplóide
11	aneuplóide
12	diplóide
13	diplóide
14	diplóide
15	diplóide
16	diplóide
17	diplóide
18	diplóide
19	diplóide
20	aneuplóide
20 lâminas	2 aneuplóides
	18 diplóides

Quadro 9 – Grau de ploidia das lâminas do Grupo R
 Fonte: Dados da pesquisa.

APÊNDICE I – Quadro 10. Grau de ploidia das lâminas do Grupo AE

Lâmina	Grau de ploidia
1	aneuplóide
2	diplóide
3	tetraplóide
4	diplóide
5	aneuplóide
6	aneuplóide
7	aneuplóide
8	diplóide
9	diplóide
10	aneuplóide
11	diplóide
12	aneuplóide
13	diplóide
14	diplóide
15	diplóide
16	diplóide
17	aneuplóide
18	aneuplóide
19	aneuplóide
20	diplóide
20 lâminas	10 diplóides
	1 tetraplóide
	9 aneuplóides

Quadro 10 – Grau de ploidia das lâminas do Grupo AE

Fonte: Dados da pesquisa.

APÊNDICE J – Quadro 11. Grupo R: sexo, grau de ploidia, local da biópsia de LPOR, hábitos/vícios (fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de boca) e desfecho

Lâmina	Sexo	Grau de ploidia	Local da biópsia de LPOR	Hábitos/vícios	VSG	Desfecho
1	M	diplóide	mucosa jugal E	ex-tabagista, etilista	7	
2	F	diplóide	mucosa jugal E	não	8	
3	M	diplóide	lábio inferior	não	40	
4	F	diplóide	mucosa jugal D	ex-tabagista, chimarrão	-	
5	M	diplóide	mucosa jugal E	chimarrão	2	
6	F	diplóide	mucosa jugal E	tabagista; chimarrão	-	
7	F	diplóide	mucosa jugal D	tabagista; chimarrão	12	
8	F	diplóide	mucosa jugal E	não	2	
9	M	diplóide	rebordo alv. Inf.	não	15	
10	M	diplóide	gengiva sup. E	tabagista; chimarrão	3	
11	F	aneuplóide	dorso da língua	chimarrão; café quente	3	
12	F	diplóide	mucosa jugal D	tabagista; chimarrão	3	
13	F	diplóide	mucosa jugal D	não	25	
14	F	diplóide	mucosa jugal D	tabagista; chimarrão	4	
15	F	diplóide	gengiva vest. 43/44	chimarrão	16	
16	M	diplóide	mucosa jugal E	ex-tabagista; chimarrão	2	
17	M	diplóide	mucosa jugal D	ex-tabagista	2	
18	F	diplóide	mucosa jugal E	não	30	
19	F	diplóide	mucosa jugal D	ex-tabagista; Chá/café	75	
20	M	aneuplóide	dorso da língua	ex-tabagista; chimarrão	8	carcinoma espinocelular grau II: borda de língua/2006

Quadro 11 – Grupo R: sexo, grau de ploidia, local da biópsia de LPOR, hábitos/vícios (fatores de risco para carcinoma) e desfecho

Fonte: Dados da pesquisa.

Nota: VSG: velocidade de sedimentação globular; D: direito; E: esquerdo; M: masculino; F: feminino

APÊNDICE K – Quadro 12. Grupo AE: sexo, grau de ploidia, local da biópsia de LPOR, e hábitos/vícios (fatores de risco para o desenvolvimento de câncer de boca) e desfecho

Lâmina	Sexo	Grau de ploidia	Local da biópsia de LPOR	Hábitos/vícios	VSG	Desfecho
1	M	aneuplóide	dorso da língua	ex-tabagista	6	
2	M	diplóide	borda lateral da língua	chimarrão; ex-tabagista	2	
3	M	tetraplóide	mucosa jugal D	ex-tabagista	-	
4	F	diplóide	borda da língua D	chimarrão diário	35	
5	M	aneuplóide	dorso da língua	não	-	
6	F	aneuplóide	ventre da língua E	não	-	
7	M	aneuplóide	ventre da língua D	chimarrão	2	
8	F	diplóide	ventre da língua D	ex-tabagista	2	
9	F	diplóide	mucosa jugal D	não	-	
10	M	aneuplóide	ventre da língua E	tabagista; ex-etilista	5	
11	F	diplóide	ventre da língua E	não	-	
12	F	aneuplóide	rebordo alveolar superior E	tabagista; café quente	7	
13	F	diplóide	mucosa jugal E	tabagista	15	
14	F	diplóide	mucosa jugal D	não	-	
15	F	diplóide	dorso da língua	ex-tabagista	2	
16	F	diplóide	Gengiva inferior E	não	21	
17	F	aneuplóide	lábio	tabagista	8	
18	F	aneuplóide	mucosa jugal D (1988)	chimarrão	-	carcinoma espinocelular grau II na língua (1988)
19	F	aneuplóide	mucosa jugal E	tabagista	-	
20	F	diplóide	ventre da língua	café quente	10	

Quadro 12 – Grupo AE: sexo, grau de ploidia, local da biópsia de LPOR, e hábitos/vícios (fatores de risco para carcinoma) e desfecho

Fonte: Dados da pesquisa.

Nota: VSG: velocidade de sedimentação globular; D: direito; E: esquerdo; M: masculino; F: feminino



ANEXO A – Protocolo laboratorial para realização da coloração de Feulgen de acordo com instruções do *Kit* comercial MERCK®

1. REAGENTES

Reagente 1: Ácido clorídrico 5 M

Reagente 2: Reativo de Schiff

Reagente 3: Disulfito sódico concentrado

2. PREPARAÇÃO

Solução de lavagem de disulfito sódico

Para preparar aproximadamente 100 ml de solução:

Disulfito sódico concentrado (reagente 3)	5 ml
Água destilada	95 ml
HCl (reagente 1)	1 ml

3. Preparação das amostras: para espécimes fixados em formalina e incluídos em parafina

Desparafinizar e re-hidratar os espécimes convencionalmente
Lavar com água corrente

4. Reação de Feulgen

HCl (reativo 1) a 22 °C ($\pm 0,5$ °C)	50 min
Água destilada	2 min
Água destilada	2 min
Reagente de Schiff's	60 min
Solução de lavagem de disulfito sódico	3 min
Solução de lavagem de disulfito sódico	3 min
Água destilada	2 min
Água destilada	2 min
Etanol 50%	1 min
Etanol 70%	1 min
Etanol 80%	1 min
Etanol 99%	1 min
Xileno	1 min
Montar com Entellan® e lamínula	

**ANEXO B – Carta de aprovação da Comissão Científica da Faculdade de
Odontologia da PUCRS**



*Comissão Científica e de Ética
Faculdade da Odontologia da PUCRS*

Porto Alegre 23 de agosto de 2006

O Projeto de: Tese

Protocolado sob nº: 0052/06
Intitulado: Líquen plano oral e o grau de ploidia de dna determinado por citometria digital
Pesquisador Responsável: Profa. Dra. Liliane Soares Yurgel
Pesquisadores Associados: Elaini Sickert Hosni; Vinícius Duval da Silva
Nível: Doutorado

Foi **aprovado** pela Comissão Científica e de Ética da Faculdade de Odontologia da PUCRS em 23 de junho de 2006.

Este projeto deverá ser imediatamente encaminhado ao CEP/PUCRS.

Profa. Dra. Marília Gerhardt de Oliveira
Presidente da Comissão Científica e de Ética da
Faculdade de Odontologia da PUCRS

Av. Ipiranga, 6681, Prédio 06 sala 209
Porto Alegre /RS – Brasil – Cx. Postal:1429
90619-900

Fone/Fax: (51) 3320-3538
e-mail: odontologia-pg@pucrs.br

ANEXO C – Carta de aprovação do CEP (Comitê de Ética em Pesquisa do Hospital São Lucas da PUCRS)



PONTIFÍCIA UNIVERSIDADE CATÓLICA DO RIO GRANDE DO SUL
PRÓ-REITORIA DE PESQUISA E PÓS-GRADUAÇÃO
COMITÊ DE ÉTICA EM PESQUISA - CEP - PUCRS



Ofício 1197/06-CEP

Porto Alegre, 16 de outubro de 2006.

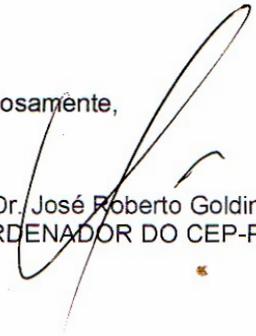
Senhor(a) Pesquisador(a):

O Comitê de Ética em Pesquisa da PUCRS apreciou e aprovou seu protocolo de pesquisa, registro CEP 06/03400, intitulado: **“Líquen plano oral e o grau de ploidia de DNA determinado por citometria digital”**.

Sua investigação está autorizada a partir da presente data.

Relatórios parciais e final da pesquisa devem ser encaminhados a este CEP.

Atenciosamente,


Prof. Dr. José Roberto Goldim
COORDENADOR DO CEP-PUCRS

Ilmo(a) Sr(a)
Dr(a) Liliane Soares Yurgel
N/Universidade