ANNA TORREZANI

**Estudo da expressão de genes relacionados à resposta inflamatória e
autoimune em lesões de líquen plano oral do tipo reticular
por meio de PCR-*array***

São Paulo
2014

ANNA TORREZANI

**Estudo da expressão de genes relacionados à resposta inflamatória e
autoimune em lesões de líquen plano oral do tipo reticular
por meio de PCR-*array***

Versão Corrigida

Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutorado pelo Programa de Pós-Graduação em Diagnóstico Bucal.

Orientador: Prof. Dr. Celso Augusto Lemos Júnior

São Paulo

2014

Autorizo a reprodução e divulgação total ou parcial deste trabalho, por qualquer meio convencional ou eletrônico, para fins de estudo e pesquisa, desde que citada a fonte.

Catálogo da Publicação
Serviço de Documentação Odontológica
Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo

Torrezani, Anna.

Estudo da expressão de genes relacionados à resposta inflamatória e autoimune em lesões de líquen plano oral do tipo reticular por meio de PCR-array / Anna Torrezani; orientador Celso Augusto Lemos Junior. -- São Paulo, 2014.

77 p. : fig., tab. , graf. ; 30 cm.

Tese (Doutorado) -- Programa de Pós-Graduação em Odontologia – Diagnóstico Bucal. -- Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo.

Versão corrigida.

1. Líquen plano bucal. 2. Expressão gênica. 3. Reação em cadeia por polimerase. 4. Patologia bucal. I. Lemos Junior, Celso Augusto. II. Título.

Torrezani A. Estudo da expressão de genes relacionados à resposta inflamatória e autoimune em lesões de líquen plano oral do tipo reticular por meio de PCR-array. Tese apresentada à Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo para obtenção do título de Doutorado em Odontologia.

Aprovado em: ____/____/2014

Banca Examinadora

Prof.(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Prof.(a). Dr(a). _____

Instituição: _____ Julgamento: _____

Aos meus pais por sempre terem feito parte das minhas escolhas e decisões, sempre me apoiando de alguma maneira importante mesmo que em algum gesto ou simples palavras. Obrigada exponencialmente.

As minhas irmãs e sobrinhos, que também sempre me apoiaram em tudo e pude dividir muitas coisas simples e complexas, foram e serão sempre minhas confidentes.

Ao meu companheiro Ronaldo por ter feito parte das minhas escolhas e decisões há muitos anos, desde a graduação e que me apoia até hoje e entende o momento de ansiedade, tensão e estresse em finalizar uma tese.

Amo vocês por serem TUDO na minha vida!!!!

As minhas amigas, amigos e familiares, em especial a Regina Bragato Cuenca que mesmo de tão distante nos EUA sempre esteve presente.

As amigas e amigo de pós graduação, Ana Candido, Érica, Bianca, Carla, Gustavo e a Camila que agora já é docente em nossa escola. Não tenho palavras para descrever o quanto me ajudaram, estiveram e estão ao meu lado, e vocês sabem do que estou falando nesses 3 anos, não foi fácil diante de tantos acontecimentos e stress na vida pessoal. Momentos para serem eternos como “Jacarejar”, “Rechaud” e viagens em congressos.

Eternamente grata dos aprendizados, conversas e risadas.

Aproveito para dedicar em especial esta tese a uma amiga da pós que por causa maior teve que interromper a conclusão de seu doutorado, Vivian Pellegrini.

As e aos colegas de pós graduação.

Ao meu orientador Celso Lemos que não poupou esforços para que este trabalho fosse executado.

AGRADECIMENTOS

À disciplina de Estomatologia Clínica da Faculdade de Odontologia da USP, por ter me dado a oportunidade em realizar a pós-graduação.

À todos os professores da disciplina que sempre passaram conhecimentos.

À nossa secretária mãezona que sempre fez e faz de tudo pelos seus alunos, Nina, muito obrigada. Sempre solícita com sua porta aberta, cuidadosa, zelosa e correta.

À secretária do departamento Cecília, com o sorriso sempre no rosto e conversando para descontraír meus dias.

Ao Prof. Celso que me apoiou em mais esta jornada, não mediu esforços para que este trabalho fosse executado.

Ao Prof. Fabio Daumas por sempre solícito em email, reuniões e explicações, nunca soberbo, mas sim sempre disposto a passar conhecimentos. Obrigada.

Aos funcionários do laboratório de Biologia molecular, em especial a Edna que sempre me atendeu ao solicitar materiais e concluir meus experimentos em menos de um mês.

A Carla Siqueira que deu o “start” para eu iniciar neste mundo de moléculas, e como diz o ditado: “não tem medo quem não tem o conhecimento”, e eu me dispus a aprender um pouquinho deste mundo de siglas.

A Prof.^a Camila Gallo que esteve presente desde o começo deste projeto, sempre extremamente disponível para os meus apelos e medos com relação ao trabalho, me ensinou laboratório, e sempre repetindo as mesmas coisas até que eu aprendesse. Me ajudou muito neste trabalho todo.

A Cnpq pelo apoio financeiro.

A ciência não é uma ilusão, mas seria uma ilusão acreditar que poderemos encontrar noutra lugar o que ela não nos pode dar.

Sigmund Freud

RESUMO

Torrezani A. Estudo da expressão de genes relacionados à resposta inflamatória e autoimune em lesões de líquen plano oral do tipo reticular por meio de PCR-*array* [tese]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014.
Versão Corrigida

O líquen plano oral (LPO) é uma doença inflamatória crônica que afeta em torno de 1 a 2% da população mundial adulta, entre 30 e 60 anos, principalmente mulheres. As lesões podem estar presentes em diversos sítios, porém tem predileção pela mucosa jugal, gengiva e bordas laterais da língua, todas bilateralmente. As manifestações de LPO são frequentes, e podem se caracterizar clinicamente em seis tipos: reticular, em placas, papular, atrófico, erosivo-ulcerativo e bolhoso, porém o mais comum é o reticular. O presente estudo teve como objetivo avaliar a expressão de genes relacionados à resposta inflamatória e autoimunidade no líquen plano oral (LPO) em pacientes com a variante exclusivamente reticular comparado a controle saudável. Foram incluídos consecutivamente 10 pacientes com LPO que preencheram os critérios de inclusão adotados, sendo 9 mulheres e um homem, e 6 indivíduos controle, sendo 4 mulheres e 2 homens pareados por sexo, idade e uso de medicações sistêmicas. Amostras de mucosa bucal foram coletadas por meio de biópsia incisional em ambos os grupos de pacientes e submetidas à extração de RNA para posterior análise da expressão gênica por PCR-*array* selecionada para este estudo. Os resultados obtidos foram o aumento da expressão de 8 genes, CXCL 9 e CXCL 10 vão de acordo com a literatura, corroborando com nosso estudo e de certa forma reafirmar mais necessidade de estudos bem desenhados .

Palavras-chave: Líquen plano oral. Expressão gênica. Quimiocina CXCL9. Quimiocina CXCL10.

ABSTRACT

Torrezani A. Study of the expression of inflammatory response-related genes and autoimmune in lesions of oral lichen planus reticular type by PCR-array [thesis]. São Paulo: Universidade de São Paulo, Faculdade de Odontologia; 2014. Versão Corrigida

The oral lichen planus (OLP) is a chronic inflammatory disease that affects around 1-2% of the adult population between 30 and 60 years, mainly women. The lesions may be present in several sites, but has a predilection for the buccal mucosa, gums and lateral borders of the tongue, all bilaterally. The manifestations of OLP are frequent, and may be characterized clinically in six types: reticular, plaque-like, papular, atrophic, erosive-ulcerative and bullous, but the most common is the reticular . The present study aimed to evaluate the expression of genes related to inflammatory response and autoimmunity in oral lichen planus (OLP) in patients with exclusively reticular variant compared to healthy control. 10 consecutive patients with OLP who met the inclusion criteria, 9 women and one man, and six control subjects were included were 4 women and 2 being proportionally matched by sex, age and use of systemic medications men. Samples of oral mucosa were collected by incisional biopsy in both groups of patients and subjected to RNA extraction for analysis of gene expression by selected for this study-PCR array. The results were the overexpression of genes 8, where only two of them go according to the literature, corroborating our study and somehow reaffirm need for more well-designed studies.

Keywords: Lichen planus, oral. Gene expression. Chemokine CXCL9. Chemokine CXCL10.

LISTA DE FIGURAS

Figura 2.1 – Foto clínica de LPO, bilateral com as estrias de Wickham	18
Figura 4.1 - Biópsia incisional Líquen plano oral	31
Figura 4.2 – Histológico de LPO.....	31
Figura 4.3 – Maceração da amostra com trizol	32
Figura 4.4 – Gel de integridade do RNA	34
Figura 4.5 – Preparação da placa PAHS – 077Z	37

LISTA DE TABELAS

Tabela 5.1 – Características pacientes LPO e não LPO	38
Tabela 5.2 – Sintomas e medicações em uso de pacientes LPO e não LPO	38
Tabela 5.3 – Genes super-expressos e sub-expressos	41
Tabela 6.1 – Resultados comparativos neste estudo e a literatura	53

LISTA DE ABREVIATURA E SIGLAS

CCL	quimiocina ligante da família CC
CCR	receptor para quimiocina ligante da família CC
CD	grupamento de diferenciação
CE	carcinoma epidermóide
CL	células de Langerhans
CXCL	quimiocina (c-x-c) ligante
DNA	ácido desoxirribonucleico
DEPC	diethylpirocarbonato
ELC	molécula induzida pó Epstein-Barr-vírus ligando quimiocina 1
GVHD	doença do enxerto versus hospedeiro
H4	histamina 4
HCC	hemofiltrado CC quimiocina 4
HCV	hepatite vírus C
IFN	interferon
IFN- γ	interferon gama
IL 10	interleucina 10
IL-1R	receptor para interleucina 1
IP 10	interferon gama induzindo proteína 10
I-TAC	interferon alfa induzível por células T quimioatrativa
KNG 1	quininogênio 1
LE	líquen escleroso
LEC	quimiocina expressa no fígado
LP	líquen plano
LPO	líquen plano oral
MDC	quimiocina derivada de macrófago
MIG	monocina induzida por interferon gama
MIP 1 β	macrófago inflamatório proteína 1 β
MMP	matriz metaloproteínase
MYD88	fator de diferenciação mielóide 88
NF-KB	fator nuclear Kappa B
PCR	reação em cadeia polimerase

qPCR	reação em cadeia polimerase em tempo real (quantitativo)
RANTES	regulada sob ativação expressa e secretada por células T normais
RLC	reação liquenóide de contato
RLD	reação liquenóide a drogas
RNA	ácido ribonucléico
RNA _m	ácido ribonucleico mensageiro
RT-PCR	transcrição reversa prévia a reação em cadeia de polimerase
SNP	polimorfismos de nucleotídeo único
TARC	quimiocina do timo regulada por ativação
Th	linfócito T auxiliar
TIR	domínio citoplasmático comum ao TLR e ao IL-1R
TIRAP	proteína adaptadora contendo domínio TIR
TLR	receptores <i>Toll like</i>
TNF- α	fator de necrose tumoral α
TOLLIP	proteína de interação com toll

SUMÁRIO

1 INTRODUÇÃO	16
2 REVISÃO DA LITERATURA	18
2.1 Líquen Plano Oral.....	18
2.2 Técnicas de análise molecular	20
2.3 Quimiocina	22
2.4 Outros genes relacionados à resposta inflamatória	24
2.5 Quimiocinas e líquen plano oral	25
3 PROPOSIÇÃO	28
4 CASUÍSTICA MATERIAIS E MÉTODOS	29
4.1 Atendimento às normas de bioética	29
4.2 Casuística	29
4.2.1 Critério de inclusão do grupo de estudo	29
4.2.2 Critério de exclusão do grupo de estudo	30
4.2.3 Exame dos pacientes	30
4.2.4 Citologia esfoliativa	29
4.3 Material.....	31
4.3.1 Diagnóstico histopatológico.....	31
4.3.2 Tratamento do líquen plano oral.....	31
4.4 Métodos.....	32
4.4.1 Experimentos	32
4.4.2 Extração de RNA.....	32
4.4.3 Tratamento das amostras (digestão) com DNase e purificação do RNA	34
4.4.4 Reação de transcrição reversa – síntese do cDNA.....	35
4.4.5 PCR <i>array</i>	36

5 RESULTADOS.....	38
5.1 Características gerais dos pacientes	38
5.2 Medicamentos em uso	39
5.3 Avaliação de sinais e sintomas e funções hepáticas e renais	39
5.4 Avaliação da expressão das quimiocinas e seus receptores	39
6 DISCUSSÃO	43
6.1 Em relação às características das populações estudadas.....	43
6.2 Em relação aos genes diferencialmente expressos nas populações estudadas	45
7 CONCLUSÕES	54
REFERÊNCIAS.....	55
ANEXOS	61
APÊNDICES	64

1 INTRODUÇÃO

O líquen plano oral (LPO) é uma doença inflamatória crônica que afeta em torno de 1 a 2% da população geral adulta⁽¹⁾. É caracterizado por acometer, principalmente, mulheres com faixa etária entre 30 a 60 anos de idade, raro em jovens⁽²⁻⁴⁾. As lesões podem aparecer em vários sítios orais, com predileção pela mucosa jugal, gengiva e bordas laterais de língua, todas bilateralmente^(5, 6). As manifestações de LPO são frequentes, e podem se caracterizar clinicamente em seis tipos: reticular, em placas, papular, atrófico, erosivo-ulcerativo e bolhoso, porém o mais comum é o reticular⁽⁷⁾.

Histologicamente, é caracterizado por um denso infiltrado inflamatório linfocitário subepitelial com número aumentado de linfócitos intra-epiteliais e degeneração da camada basal de células. A apoptose de queratinócitos é evidenciada pela marcação de glóbulos eosinofílicos homogêneos denominados corpos de Civatte (corpos colóides, hialinos ou citóides) na região intraepitelial. Paraqueratose, acantose e projeções epiteliais em “dentes em serra” também podem ser visualizadas^(3, 8). A predominância desse tipo de células inflamatórias sugere anormalidades na imunidade mediada por células, mas a patogênese do LPO continua sem completa compreensão⁽⁹⁾. Outra sugestão de patogênese inclui estresse mental e anormalidades endócrinas⁽¹⁰⁾.

Estudos sugerem forte ligação entre líquen plano oral e o vírus da hepatite C e mostram que sua incidência parece ser maior na Itália, Japão e Brasil, variando de 0 a 60%, mas nada ainda completamente estabelecido^(11, 12).

Na maioria dos casos as lesões de LPO são crônicas e raramente apresentam remissão espontânea⁽¹³⁾. A evolução da doença frequentemente é marcada por períodos de exacerbação e remissão, acompanhados de alteração no aspecto clínico das lesões. Sendo assim, manifestações orais intensas normalmente são observadas em pacientes mais idosos^(14, 15). Períodos de exacerbação com alteração do aspecto clínico lesional podem estar correlacionados ao estresse⁽³⁾.

O potencial pré-maligno do LPO é muito controverso⁽¹⁶⁾, muitos estudos genéticos e moleculares estão sendo realizados no intuito de avaliar essa possível transformação maligna, embora nenhum deles tenha significado algo efetivo para a prática clínica^(12, 17).

A análise da expressão gênica em lesões locais e de células do sangue periférico dos pacientes tem identificado vários grupos de genes diferencialmente expressos, o que ajuda a criar novas hipóteses sobre a patogênese de doenças autoimunes e desordens inflamatórias^(18, 19). A técnica do PCR *array* permite a análise de parte da expressão gênica no sistema biológico complexo e tem sido amplamente utilizado para a investigação de diversas doenças humanas, incluindo as desordens na cavidade oral⁽²⁰⁾.

No campo da pesquisa de biologia molecular, o PCR em tempo real tem sido utilizado também para a validação de resultados de *array*, que é uma técnica de hibridização que permite a investigação da análise da expressão de milhares de genes ao mesmo tempo. O PCR utiliza matrizes contendo sondas complementares a diversos genes e permite, por técnicas de hibridização com o cDNA-alvo marcado com fluoróforo, avaliar a expressão gênica. Alguns *arrays* possuem todo o genoma de um organismo e podem ser utilizados para avaliar alterações da expressão gênica (transcriptoma). O problema é que o método é basicamente qualitativo e não permite uma análise estatisticamente confiável e de fácil correlação, além do alto custo. Por tal motivo o PCR em tempo real é utilizada como uma técnica de apoio para validar e quantificar os genes “escolhidos” nas análises de *array*⁽²¹⁾.

Além disso, o PCR em tempo real também vem sendo utilizado recentemente sob a forma de um *array* compacto para a análise da expressão gênica de vias de sinalização ou conjunto de genes específicos, sendo denominado PCR *array*. Metodologia esta que foi proposta neste estudo para avaliação de genes relacionados à resposta inflamatória e autoimune em pacientes com líquen plano oral do tipo reticular.

2 REVISÃO DA LITERATURA

2.1 Líquen Plano Oral

O líquen plano oral (LPO) é uma doença mucocutânea inflamatória crônica mediada por células T, de causa desconhecida⁽²²⁾. Afeta comumente pessoas de meia-idade e idosos sendo mais prevalentes em pacientes do sexo feminino^(6, 23). Sua prevalência gira em torno de 0.5 a 4% da população geral⁽³⁾.

Clinicamente, caracteriza-se por erupções papulares em pele e afeta membranas de mucosas, particularmente mucosa oral e vaginal e, raramente, mucosas anal, ocular, de laringe e uretra⁽²⁴⁾. Lesões de líquen plano (LP) que acometem mucosa oral ocorrem em uma proporção entre 50 a 70% dos pacientes portadores de líquen plano⁽²⁵⁾. Já o contrário, ou seja, lesões de LPO em pele correspondem a 15% dos pacientes portadores de líquen plano oral⁽²⁴⁾. As formas clínicas da doença são: reticular, atrófica, papular, erosiva, placa e bolhosa, sendo a mais comum a forma reticular, podem ser isoladas ou múltiplas no mesmo paciente⁽⁷⁾. As lesões geralmente são bilaterais e simétricas(figura 2.1), o que serve de diferenciação para as reações liquenóides orais^(5, 26). Os locais mais acometidos são as mucosas jugais, gengiva, língua, mucosa labial e vermelhão do lábio^(1, 3).

Figura 2.1 – foto clínica de LPO, bilateral com as estrias de Wickham.

O diagnóstico do LPO é feito tanto clinicamente, quanto histologicamente. A análise histopatológica inclui alterações epiteliais como hipergranulose, hiperqueratose, acantose, atrofia e a presença de numerosos corpos eosinofílicos

chamados de Corpos de Civatte. Nota-se o apagamento da camada basal e uma infiltração superficial de infiltrado inflamatório linfocítico, principalmente justaepitelial^(3, 8, 14). Temos como diagnóstico diferencial do líquen plano oral, candidíase, lúpus eritematoso, leucoplasia pilosa, lesões traumáticas, reações liquenóides de contato, GVHD (doença do enxerto contra o hospedeiro) e carcinoma epidermóide incipiente^(25, 27).

O tratamento do LPO visa aliviar os sintomas e minimizar o desconforto do paciente. Nenhum tratamento é completamente eficaz devido sua etiopatogenia incerta⁽⁷⁾.

Sua etiopatogenia atual sugere que a doença está relacionada a uma alteração da imunidade mediada por células, desencadeada por fatores endógenos ou exógenos, que resulta em uma resposta alterada para auto-antígenos^(28, 29). Essa alteração da resposta imune resulta em apoptose dos queratinócitos na camada basal⁽³⁰⁾. Outra hipótese sobre a etiopatogenia do LPO é a desgranulação dos mastócitos e ativação das matrizes metaloproteinases⁽³⁾. Ultimamente, muitas famílias de metaloproteinases e diversos genes tem sido identificado como parte do processo de patogênese dessa lesão, abrindo um vasto campo de estudos para avaliar os biomarcadores relativos à atividade e prognóstico da doença^(3, 21).

A relação entre a hepatite C e o LPO ainda não está estabelecida, porém, nota-se uma diferença da prevalência de infecção pelo vírus HCV (hepatite vírus C) em regiões geográficas diferentes⁽³¹⁾. Alguns estudos concluíram que a infecção pelo HCV está associada com um risco estatisticamente significativo para o desenvolvimento do LPO, sugerindo a presença do vírus ou de certos tipos de líquen plano podem ser utilizados como marcadores preditivos de um ao outro em determinadas regiões geográficas⁽¹¹⁾.

Apesar dos diversos estudos genéticos e moleculares para se tentar desvendar a real etiopatogenia do líquen plano oral, ainda não se chegou a uma conclusão sólida que pudesse atuar na evolução da doença, na prática clínica e no prognóstico.

2.2 Técnicas de análise molecular

Alterações gênicas têm sido descritas para o líquen plano oral, porém, a adequada compreensão dos fenômenos celulares e moleculares permanece limitada. Portanto, uma varredura eficiente das alterações moleculares encontradas em LPO, obtido por meio de ferramentas de larga escala como análises conjunto de genes simultâneos (*PCR array*), e qRT-PCR (reação em cadeia da polimerase quantitativa precedida de transcrição reversa), pode revelar biomarcadores com elevada sensibilidade e especificidade clínicas⁽³²⁾.

A tecnologia de *microarray* permite identificar o nível de expressão de grande quantidade de genes em determinada amostra através de uma única reação de hibridização⁽³³⁾, para isso um grupo de sondas representadas por fragmentos de RNA é imobilizado e distribuído de forma organizada e documentada sobre um suporte sólido, e se hibridizará com o alvo de interesse. A partir dos resultados obtidos, aqueles genes com expressão alterada poderão ser futuramente utilizados como marcadores específicos para uma doença, bem como para uso de alvos terapêuticos ou no desenvolvimento de vacinas^(33, 34), no entanto embora esta ferramenta seja extremamente abrangente e eficaz na identificação de uma grande quantidade de genes, este não é o ponto crítico a ser desvendado, mas sim a informação quantitativa associada com um dado perfil de expressão⁽³⁴⁾. Sendo assim, a expressão dos genes identificados por *array* deve ser validada com metodologias complementares, como a RT-PCR convencional, ou ainda, em tempo real (qRT-PCR), possibilitando a quantificação dessa expressão⁽³⁵⁾.

A reação de amplificação em tempo real, uma variante da reação de PCR convencional, representa grande avanço nos métodos moleculares de auxílio diagnóstico, particularmente por facilitar sobremaneira as tarefas de quantificação da expressão gênica em determinado tecido ou amostra biológica. O método utiliza um sistema óptico capaz de detectar a fluorescência oriunda da reação de amplificação, para isso os sistemas de detecção da PCR em tempo real incluem moléculas capazes de emitir em um comprimento de onda específico, proporcionando o acompanhamento da reação ao longo dos ciclos, quando ocorre a amplificação do molde de DNA após (SYBR Green[®]) ou durante (TaqMan[®]) a síntese da dupla fita⁽³⁵⁾.

Em resumo, enquanto o elevado rendimento da análise por microarranjo constitui a ferramenta que permite uma análise em larga escala de padrões de expressão, a transcrição reversa seguida pela reação em cadeia da polimerase representa a ferramenta que proporciona a sensibilidade necessária para se validar os resultados para genes individuais⁽³⁶⁾.

Mais recentemente foi desenvolvida a técnica da PCR *array*, que permite a análise da expressão gênica pela técnica do PCR em tempo real de uma parte do sistema complexo biológico simultaneamente, como por exemplo de um conjunto de genes relacionados à uma via de sinalização ou a um tipo específico de resposta do organismo e tem sido amplamente utilizada para a investigação de diversas doenças humanas, incluindo as desordens na cavidade oral⁽²⁰⁾.

2.3 Quimiocinas

Em reações inflamatórias temos a presença das quimiocinas, que são produzidas por leucócitos, células endoteliais e células próprias do tecido, em resposta a estímulos externos. As quimiocinas são citocinas com habilidade de recrutar e ativar subpopulações específicas de leucócitos por quimiotaxia, atuando potentes mediadores ou reguladores da inflamação. As quimiocinas são divididas em quatro subfamílias dependendo da posição de seus resíduos de cisteína; essas famílias são CC, CXC, CX3C e XC, onde X= aminoácido e C= cisteína. Na subfamília CXC um aminoácido separa as primeiras 2 cisteínas, enquanto na subfamília CC os primeiros dois resíduos de cisteína são adjacentes um ao outro. Cada subfamília possui seu próprio receptor e tem funções diferenciadas uma da outra. As quimiocinas CXC são quimiotáticas para neutrófilos, enquanto a CC não agem neste último grupo celular, atraem monócitos e basófilos linfócitos⁽³⁷⁾.

O sistema de quimiocina humana inclui atualmente mais de 50 quimiocinas e 18 receptores de quimiocina. As quimiocinas excretadas afetam queratinócitos, e no infiltrado inflamatório associado, pode desempenhar um papel crucial no recrutamento seletivo de células T infiltrada através do seu receptor de quimiocina⁽³⁸⁾.

Algumas quimiocinas que estão envolvidas em processos inflamatórios, como as descritas abaixo:

- CCL 3 – também conhecida como proteína inflamatória de macrófago-1 α (MIP-1 α), envolvida no processo inflamatório agudo, no recrutamento e ativação de leucócitos, tem como receptor CCR 1, CCR4 e CCR 5. O CCR 1 está presente na superfície dos linfócitos do sangue periférico, monócitos e células NK, o CCR4 é um marcador seletivo para os linfócitos Th2 e, dentre suas funções, apresenta o tráfego de células dendríticas, recirculação de linfócitos T, transmigração de células através do timo e a migração de linfócitos T para o tecido linfóide, o CCR 5 é expresso preferencialmente em linfócitos Th1, macrófagos, em tecidos linfóides e não linfóides e em células dendríticas⁽³⁹⁻⁴¹⁾.

- CCL 4 - também conhecida como proteína inflamatória de macrófago-1 β (MIP-1 β), também está envolvida no processo inflamatório agudo, no recrutamento e ativação de leucócitos e também tem como receptor o CCR 5^(41, 42). As quimiocinas

CCL3 e CCL4, são expressas em resposta a um estímulo, como mediar inflamação, sendo consideradas indutivas e as que são expressas independente da presença ou não de inflamação, são denominada de quimiocinas constitutivas⁽⁴³⁾.

- CCL 11 – conhecida como proteína quimiotática de eosinófilos ou eotaxina, recruta eosinófilos e células inflamatórias, induz a liberação de histamina e leucotrienos, pode ser expressa em linfócitos T principalmente em situações de resposta alérgica. Seus receptores são o CCR 2, CCR 3 e CCR 5 que são expressos em eosinófilos e basófilos ^(38, 42).

- CCL 16 – conhecida como quimiocina expressada em fígado (LEC) e monotactina – 1 (MTN-1) é uma quimiocina que atrai especialmente monócitos induzida por IL-10, IFN- γ e LPS bacteriano. Tem como receptores o CCR 1, CCR2, CCR 5 e CCR8 que são expressos em monócitos, linfócitos B, linfócitos T ativados, células dendríticas e basófilos ^(44, 45).

- CCL 19 - conhecida como proteína inflamatória de macrófagos 3 beta (MIP-3 β), seu receptor é o CCR 7, expresso em linfócitos T e células dendríticas. O CCR7 apresenta dois subgrupos de linfócitos T de memória: os linfócitos negativos para CCR7 que têm função efetora de migrar para tecidos inflamados e os linfócitos positivos CCR7 que estimulam a produção de células efetoras através das células dendríticas. Ambos são indispensáveis na manutenção da memória imunológica. Junto aos seus ligantes facilitam o recrutamento e retenção de células para órgãos linfoides secundários, fator importante para exposição eficiente dos linfócitos T aos antígenos. A quimiocina CCL19 auxilia a ativação de integrina β 2 nos leucócitos circulantes e permite que os mesmos sejam capazes de aderir aos tecidos^(42, 46).

- CXCL 9 - conhecida como monoquina induzida por interferon gama (MIG), quimioatraente de células T e seu receptor é o CXCR3, que é expresso por células Th1. Este receptor, já foi descrito estar presente em queratinócitos na camada basal do epitélio e na lâmina própria da pele de pacientes com dermatoses inflamatórias e no líquen plano cutâneo ^(38, 47-49).

- CXCL 10 - conhecida como proteína induzida por interferon gama (IP-10) ou pequena citocina indutora B10, é um quimioatraente de monócitos, células T, células NK e células dendríticas promovendo a adesão de células T às células endoteliais e podendo participar da angiogênese e atividade anti-tumoral, também interage o

receptor CXCR3. Em estudos já foi demonstrado o CXCL 10 na degeneração da camada basal da epiderme de líquen plano (LP) ^(45, 48, 50, 51).

2.4 Outros genes relacionados à resposta inflamatória

- KNG 1 – quinínogênio é uma proteína de alto peso molecular, envolvido na angiogênese, têm sido estudados em modelos *in vivo* com relação a doenças inflamatórias crônicas como artrite reumatóide e doença de Crohn ⁽⁵²⁾.

- IL 10 - É uma citocina anti-inflamatória produzida primariamente por monócitos, macrófagos e linfócitos Th2, atuando na imunorregulação por regulação negativa da expressão de citocinas Th1, de antígenos do MHC de classe II, e de moléculas co-estimuladoras de macrófagos, também bloqueia a via de sinalização do NF-kB, suprimindo a inflamação ^(53, 54).

- Receptores *Toll-like* (TLR) são receptores transmembrana tipo I, que são agrupados em uma mesma família de genes com base na similaridade de sequência. Na nossa base bibliográfica hoje já se sabe que existem 10 membros, onde cada um é capaz de diferenciar produtos moleculares derivados de diferentes classes de microrganismos, tais como bactérias, fungos, protozoários e vírus. A ativação dos TLR culmina com a produção de citocinas inflamatórias e quimiocinas, propiciando resposta inflamatória aguda e, conseqüentemente, estímulo inicial da resposta imunológica adaptativa, visto que estes receptores estão presentes em células apresentadoras de antígenos tais como as células dendríticas ⁽⁵⁵⁾.

- Gene de resposta primária de diferenciação mielóide 88 (Myd88) é uma molécula adaptadora essencial para sinalização de alguns TLR resultando na transdução de sinais e na produção de citocinas pró-inflamatórias ⁽⁵⁶⁾.

- Interleucina 18 (IL18) e Proteína acessória do receptor da interleucina 18 (IL18RAP), onde a IL-18 é uma citocina pró-inflamatória que faz parte da superfamília da IL-1, conhecida como um importante regulador da imunidade inata e adquirida. Tem sua expressão em locais de inflamação crônica, em doenças autoimunes, outras doenças como as infecciosas ⁽⁵⁷⁾. A IL-18RAP é uma subunidade acessória do receptor da IL-18, indispensável para a funcionalidade deste e a

atuação e ativação da via do NF- κ B⁽⁵⁸⁾. Variantes neste gene estão relacionadas à susceptibilidade à doença celíaca⁽⁵⁹⁾.

- IL1A, IL-1 B, IL-1R1, IL-1RAP - A superfamília da IL-1 está relacionada com as respostas imunológicas da fase aguda da inflamação, sendo que a IL-1A e IL-1B são as moléculas efetoras e produzidas principalmente por macrófagos e monócitos, mas também por células endoteliais, células epidérmicas e fibroblastos^(60, 61). IL-1R1 é um receptor tipo 1 que ativa as vias de sinalização para a produção da resposta imunológica e a IL1RAP um receptor de tipo II que tem função reguladora^(60, 62).

- Proteína de interação *Toll* (TOLLIP) – é uma proteína adaptadora de inibição dos TLR e, conseqüentemente, de suas vias de sinalização⁽⁶³⁾.

- Fator de transcrição nuclear kappa B (NF- κ B) é um fator de transcrição que regula a expressão de diversas citocinas pró-inflamatória, imunorreguladora e angiogênica, dentre eles o fator de necrose tumoral alfa (TNF- α), interleucina-6 (IL-6), e interleucina 8 (IL-8)⁽⁶³⁾.

2.5 Quimiocinas e líquen plano oral

Histologicamente, o líquen plano oral é caracterizado por degeneração dos queratinócitos da camada basal do epitélio e um denso infiltrado linfocítico subepitelial. Analisando esta população, observou-se que as células T citotóxicas são as principais componentes deste infiltrado inflamatório. Por outro lado, está bem estabelecido na literatura que a expressão diferencial de quimiocinas, receptores de quimiocinas, e moléculas de aderência desempenham um papel importante na determinação específica do posicionamento de leucócitos dentro dos tecidos normais e inflamados^(38, 64). Desta forma, uma alteração na expressão destas moléculas pelos queratinócitos ou células dendríticas presentes no epitélio favoreceriam o acúmulo de células inflamatórias na região justaeptelial e o desenvolvimento do quadro.

Receptores de quimiocinas são diferencialmente expressos nas diversas subpopulações de células T tipo 1 (Th1) e tipo 2 (Th2), de acordo com o tipo de citocinas que estas células secretam.

Os linfócitos Th1, que secretam citocinas pró-inflamatórias estão associados por exemplo ao CXCR3 e CCR5, enquanto os linfócitos Th2, que secretam citocinas anti-inflamatórias, expressam CCR3, CCR4 e CCR8 ^(39, 65).

Estudos têm mostrado que os queratinócitos lesionados de LPO de diversas formas clínicas e outras dermatoses inflamatórias expressam MIG/CXCL9, IP-10 / CXCL10 e I-TAC/CXCL11, que são os ligantes de CXCR3⁽⁴⁹⁾. Em apoio a esta, a maioria das células T infiltradas no líquen plano cutâneo expressam CXCR3⁽⁶⁶⁾. Outros estudos têm mostrado que os queratinócitos lesionados do líquen plano oral expressam de maneira aumentada a quimiocina RANTES/CCL5 relacionada com o recrutamento de linfócitos, monócitos, linfócitos NK e eosinófilos, além de atuar no influxo de cálcio celular, degranulação e atividade citolítica, e seu receptor CCR1 (relacionados a linfócitos T de memória, teria um papel regulador/supressor da atividade Th1)⁽⁶⁷⁾. Corroborando com a hipótese de que a etiologia do LPO esteja relacionada a uma reação imunológica mediada pelo acúmulo e expansão de linfócitos Th1, possivelmente recrutados para a região epitelial por ação das quimiocinas⁽⁶⁸⁾.

Células de Langerhans (CL) são células dendríticas residentes em epitélio de mucosas e da pele⁽⁶⁹⁾.

Estudos preditivos demonstraram o aumento do número de CL expressavam o receptor CCR7 (que apresentem importante papel no tráfico de linfócitos T e B através do endotélio), no epitélio e no estroma do LPO, indicando que este tipo celular possa desempenhar um papel importante na patogênese do LPO, existem estudos que já apresentam resultados na literatura da expressão de quimiocinas e receptores de quimiocinas comparando epitélio saudável ao LPO, e sugeriram que o conhecimento mais avançado do papel das quimiocinas no LPO pode ser um indício da patogênese do LPO ⁽⁷⁰⁾.

A CXCL - 9 é quimioatraente de células T, induzida por IFN- γ e tem sua expressão aumentada em doenças cutâneas como dermatite atópica e psoríase^(38, 48). No LP (líquen plano) a literatura descreve a íntima relação com o IFN- γ e a forte expressão de CXCR3. A expressão dos seus ligantes CXCL-9 e CXCL-10 é observada no interior dos grânulos citolíticos de linfócitos na junção derme - epiderme e na degeneração da camada hidrópica em casos de líquen plano cutâneo (LPC), onde foi possível avaliar por imunohistoquímica a presença de CXCR3 e

células efetoras, que podem induzir a apoptose de queratinócitos e estar envolvida na inflamação crônica^(48, 49, 71).

Foi possível também encontrar na literatura um estudo que além do aumento da expressão de CXCL-9 e CXCL-10 em pacientes de LPO quando comparados a pacientes saudáveis, o aumento na expressão de outras quimiocinas como: CXCL11(ligante do receptor CXCR3), CCL17/TARC e CCL22/MDC (ligantes do receptor CCR4). No resultado geral do estudo LPO, houve aumento considerável nas transcrições de citocinas Th1, como o IFN- γ e de quimiocinas (CXCL9, CXCL10, CCL3, e CCL4), assim como de seus receptores CXCR3 e CCR5. Além disso, algumas citocinas Th2 também apresentava-se elevadas, como, IL-4 e as quimiocinas, CCL-17 e CCL- 22 e o receptor correspondente CCR4^(49, 72).

Em um estudo mais recente que comparou líquen plano cutâneo (LPC) e líquen escleroso (LE) também encontrou aumentada as mesmas quimiocinas descritas anteriormente, e temos mais bases de dados na literatura da expressão gênica no LPC⁽⁷²⁾.

3 PROPOSIÇÃO

Realizar um estudo caso-controle para avaliar, por meio de qRT-PCR *array* em tempo real, as diferenças na expressão de genes relacionados à resposta inflamatória e autoimunidade em líquen plano oral, da forma reticular em mucosa jugal quando comparados a indivíduos controle com mucosa bucal clinicamente saudável.

4 CASUÍSTICA, MATERIAL E MÉTODOS

4.1 Atendimento às normas de bioética

Os indivíduos incluídos no presente estudo foram selecionados entre os que buscavam tratamento ou se encontravam em acompanhamento no Ambulatório da Disciplina de Estomatologia Clínica da Faculdade de Odontologia da Universidade de São Paulo (FOUSP) – entre março de 2013 e maio de 2014. A participação no estudo foi efetivada mediante a concordância e assinatura do termo de consentimento livre e esclarecido (TCLE – Apêndice A), aprovado em 20/03/2013 pelo Comitê de Ética em Pesquisa da FOUSP, protocolo nº 224.096 (Anexo A).

4.2 Casuística

Seguindo o modelo de desenho de estudo do tipo caso-controle, os indivíduos foram incluídos em dois grupos: grupo caso, indivíduos que apresentavam LPO e controle indivíduos com mucosa jugal saudável e com medicamentos de uso diário como anti-hipertensivo, hipoglicemiantes via oral, anticoagulante e hipocolesterolemiantes, uso único ou concomitante.

4.2.1 Critérios de inclusão

Pacientes portadores de Líquen Plano Oral idiopático, da forma clínica reticular, em mucosa jugal.

Pacientes com mucosa saudável, decorrente de exodontia de terceiros molares, ou adjacente a lesões como controle da pesquisa.

Pacientes com idade ≥ 18 anos.

Matrícula no Ambulatório de Estomatologia Clínica da FOUSP.
Pacientes que concordarem em participar do estudo.

4.2.2 Critérios de exclusão do Grupo de Estudo

Pacientes com diagnóstico de reação liquenóide oral.
Pacientes com Líquen Plano Oral associado ao vírus HCV.
Pacientes com lesões sem uso de corticosteroides há pelo menos 15 dias.

4.2.3 Exame dos pacientes

Os pacientes foram submetidos a exame estomatológico, as informações de anamnese e exame físico foram anotadas em ficha desenvolvida especialmente para o presente projeto (Apêndice B).

Ao exame clínico intra bucal, foi realizada inspeção da cavidade oral a fim de avaliar a presença de lesões e/ou variações da normalidade. Os pacientes com suspeita de líquen plano oral e aqueles que estiverem em acompanhamento da lesão previamente diagnosticada foram classificados de acordo com o aspecto clínico e os espécimes foram coletados por biópsia incisional.

4.2.4 Citologia esfoliativa

Este exame tem por objetivo investigar a presença de infecção por *Candida* spp superposta à lesão oral prévio a realização da biópsia da lesão. Para os casos em que for comprovada a infecção, os pacientes receberam o tratamento com antifúngico tópico por um período de 15 dias antes da biópsia. O material obtido através de raspado da lesão foi dispensado em lâmina de vidro e fixado em álcool

absoluto. O processamento e análise das lâminas foram realizados no Laboratório de Anátomo-Patologia da Disciplina de Patologia Bucal da FOU SP.

4.3 Material

4.3.5 Diagnóstico histopatológico

Este exame foi realizado para confirmação do diagnóstico clínico de lesões sugestivas de LPO, sendo seu resultado histológico de acordo com a OMS e critérios de Van der Meij⁽⁷⁴⁾. O material foi obtido por meio de biópsia incisional realizada com uso de bisturi sob anestesia local, fixado em formol 10% e enviado ao Laboratório de Anátomo-Patologia da Disciplina de Patologia Bucal da FOU SP. O fragmento obtido com incisão elíptica do local com LPO reticular (figura 4.1), metade foi enviado para diagnóstico e a outra metade congelada a - 80°C para análise do estudo. Os pacientes controle tiveram o material obtido de mucosa saudável periférica de lesões em mucosa jugal e de extração de terceiros molares inclusos.

Figura 4.1 – Local da biópsia incisional

Figura 4.2 – Histológico LPO

4.3.6 Tratamento do Líquen Plano Oral

Os pacientes que apresentaram lesões sintomáticas de LPO foram tratados com medicação tópica, tais como corticóides (propionato de clobetasol 0,05% ou 0,1%) ou imunossupressor tópico (tacrolimus 0,1%). No caso de pacientes com

lesões assintomáticas foram dadas orientações gerais sobre a doença e efetuado controle clínico periódico segundo protocolo criado para pacientes com LPO da disciplina de Estomatologia clínica da FOU SP.

4.4 Método

4.4.1 Experimentos

Os experimentos foram realizados no Laboratório de Patologia Molecular da Disciplina de Patologia Bucal da FOU SP (Prof. Dr. Fábio Daumas Nunes).

4.4.2 Extração do RNA

O RNA total foi extraído utilizando-se o reagente TRIzol[®] (Invitrogen Corporation – Califórnia, EUA), uma solução monofásica de fenol e isotiocianato de guanidina para isolamento do RNA de células e tecidos. Cada amostra congelada foi completamente macerada em nitrogênio líquido, até a visualização de um pó branco, sem permitir o descongelamento e a consequente degradação do RNA (Figura 4.2).

Figura 4.2 - A: maceração em nitrogênio líquido do fragmento de tecido, B: aspecto após maceração e adição do reagente Trizol (Gallo, CB⁽⁷³⁾)

Em seguida, acrescentou-se 1mL de Trizol ao material macerado e após seu descongelamento, foi homogeneizado até a completa dissolução do material. Para cada mL de Trizol foram utilizados 200µL de clorofórmio (LAFAN Química Fina LTDA – São Paulo, Brasil), e o microtubo (Axygen Scientific – Califórnia, USA) devidamente selado foi vigorosamente agitado durante 30s para a mistura das soluções e acondicionada a -20°C durante 15min. Os tubos foram centrifugados (centrífuga Eppendorf AG modelo 5415R – Hamburg, Alemanha) a 10.000rpm durante 15min a 4°C.

Após a centrifugação, observava-se a formação de três fases, a fase aquosa (transparente) foi transferida para outro microtubo e a ela acrescentou-se 500µL de álcool isopropílico (LAFAN Química Fina LTDA – São Paulo, Brasil); após homogeneização foi armazenada a -20°C durante 30min. Em seguida os tubos foram submetidos à nova centrifugação a 10.000rpm durante 10min a 4°C, verificando-se então a presença do precipitado de RNA no fundo do microtubo.

O sobrenadante foi descartado e este precipitado lavado com 1 ml de etanol 75% (LAFAN Química Fina LTDA – São Paulo, Brasil) e novamente centrifugado a 5.000RPM durante 5min a 4°C, o sobrenadante foi descartado e o precipitado foi submetido à secagem, deixando-se os microtubos abertos por no máximo 10min.

Em seguida, acrescentou-se 25µL de água tratada com DEPC(diethylpirocarbonato) (Invitrogen Corporation – Califórnia, EUA) para a dissolução do precipitado de RNA total.

A pureza das amostras de RNA extraídas foi avaliada pelas leituras das absorbâncias de RNA, proteína e outros contaminantes, bem como a relação entre estas leituras (A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230}), determinadas por espectrofotômetro (NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific – Wilmington, Delaware, EUA). Foram consideradas adequadas às amostras cujo resultado da relação A_{260}/A_{280} e A_{260}/A_{230} fosse superior ao valor 1,8. Bem como a obtenção automática da concentração (quantificação) das amostras avaliadas por este equipamento.

A integridade do RNA foi verificada em gel denaturante de agarose (1,0%) corado com brometo de etídio, verificando-se a presença das bandas 28s e 18s, correspondentes ao RNA ribossômico que deveriam se apresentar nítidas e intensas numa relação de 2:1 (Figura 4.3).

Figura 4.3 – Bandas 18 e 28 S podemos verifica a qualidade do RNA total em gel de agarose 1 %.

4.4.3 Tratamento das amostras (digestão) com DNase e purificação do RNA

Previamente à síntese do cDNA para a realização da RT-PCR array, é indicado o tratamento da amostra de RNA total extraída, tanto para a eliminação de DNA genômico que eventualmente possa estar presente na amostra (RNase-Free DNase Set, Qiagen – Venlo, Holanda), quanto a eliminação de outros contaminantes, como sais e restos de reações enzimáticas, que possam estar associados a amostra e interferir no resultado da PCR (RNeasy MinElute Clean-up Kit – Qiagen).

A primeira etapa, digestão com DNase (RNase-Free DNase Set, Qiagen), confere resultados mais confiáveis, uma vez que a amplificação pela PCR será apenas do cDNA, refletindo a expressão do gene (RNA mensageiro) e não do gene constitutivamente presente no DNA das células humanas. A segunda etapa, purificação do RNA (RNeasy MinElute Clean-up Kit, Qiagen), elimina eficientemente os contaminantes proporcionando uma amostra de RNA de alta qualidade e concentrado, levando a resultados da PCR mais fidedignos.

Os dois processamentos descritos foram realizados de acordo com as indicações do fabricante para uma quantidade máxima de 45µg de RNA total extraído (a partir dos dados obtidos pela quantificação anteriormente por meio da análise pelo NanoDrop 2000, Thermo Fisher Scientific).

Para a digestão com DNase (RNase-Free DNase Set, Qiagen) acrescentou-se a 45µg de RNA de cada amostra, 10µL do tampão da reação (RDD buffer,

Qiagen) e 2,5µL da enzima DNase (DNase I RNase-Free, Qiagen) e num volume final de 100µL. Esta mistura foi acondicionada à temperatura ambiente por 10min para permitir a ação da enzima de degradação do DNA.

Em seguida as amostras foram diretamente a purificação do RNA (RNeasy MinElute Clean-up Kit, Qiagen), para os 100µL de RNA obtidos na etapa anterior foram adicionados 350µL do tampão RLT (RLT buffer, Qiagen) e 250µL de etanol absoluto (LAFAN Química Fina LTDA – São Paulo, Brasil). Esta mistura foi transferida a uma coluna para RNA (RNeasy MinElute Spin Columns, Qiagen) e centrifugada a 10.000rpm por 15s à temperatura ambiente.

O filtrado obtido após a centrifugação foi adequadamente descartado (pois contém tiocianato de guanidina) e a coluna para RNA foi adaptada num novo tubo coletor (Collection tubes, Qiagen), 500µL de tampão RPE (RPE buffer, Qiagen) foi depositado sobre a membrana da coluna e a coluna foi submetida à nova centrifugação a 10.000rpm por 15s à temperatura ambiente. O filtrado foi novamente descartado e para a lavagem do RNA foi acrescentado a coluna 500µL de etanol 80% (LAFAN Química Fina LTDA) e novamente a coluna foi submetida a nova centrifugação a 10.000rpm por 2min à temperatura ambiente.

Após este passo a coluna foi inserida num novo tubo coletor e centrifugada com as tampas abertas a 10.000rpm por 5min à temperatura ambiente, para a secagem da membrana da coluna que contém o RNA, eliminando completamente o etanol (que interfere nas reações subsequentes). Assim, a coluna foi inserida num microtubo de 1,5mL e 15µL de água livre de RNase (RNase-Free water, Qiagen) foi depositada sobre o centro da membrana e o conjunto centrifugado por 1min na velocidade máxima, resultando em aproximadamente 13µL de RNA limpo e concentrado, que foi novamente quantificado por meio do uso do NanoDrop 2000 (Thermo Fisher Scientific).

4.4.4 Reação de transcrição reversa – síntese do cDNA

A reação de transcrição reversa (RT) foi realizada utilizando-se kit específico que garante a eficiência da reação de PCR *array*, o RT² First Strand Kit (SABiosciences-Qiagen), que produz uma síntese rápida e eficiente do cDNA

utilizando hexâmetros aleatórios e oligo-dt como iniciadores da reação de transcrição reversa e demais componentes compatíveis com a reação subsequente.

Para tal, combinou-se 1 µg do RNA total, obtido após as etapas anteriores, com um mix de 4 µL de tampão BC3 (5X Buffer BC3, SABiosciences-Qiagen), 1 µL da solução P2 (Control P2, SABiosciences-Qiagen), 2 µL da enzima de transcrição reversa RE3 (RE3 Reverse Transcriptase Mix, SABiosciences-Qiagen). Esta mistura foi levada ao termociclador por 15min a 42°C e a atividade enzimática foi bloqueada por um segundo ciclo subsequente de 5min a 95°C, e o cDNA foi submetido as reações de PCRarray.

4.4.5 PCR array

A metodologia de PCR array (RT2 Profiler PCR Arrays, SABiosciences-Qiagen) permite a análise de um painel de genes de uma via de sinalização biológica como a das quimiocinas e seus receptores, selecionada para no presente estudo (PAHS-077ZA, Inflammatory Response and Autoimmunity RT2 Profiler PCR Array, Lot. EA23.4-R1, RT² Profiler™ PCR Arrays, (Qiagen Sciences), que contém membros das subfamílias CC e CXC das quimiocinas e outros genes relacionados.

Desta forma, para a avaliação da expressão das quimiocinas e seus receptores em paciente que apresentam LPO (grupo caso) em relação a indivíduos saudáveis (grupo controle) foi preparado amostras de doentes individualmente e um *pool* de amostras de pacientes controle, combinando-se as amostras de cDNA sintetizadas anteriormente numa diluição de 1:10.

Para as placas de doentes e *pool* de saudáveis, foi preparado um mix com 102 µL do cDNA diluído, 1350 µL de SYBR Green Mastermix (2X RT² SYBR Green Mastermix, SABiosciences-Qiagen) e 1248 µL de água livre de RNase, conforme as orientações do fabricante, que foi distribuído nos 96 poços de cada placa de PCR array (volume de 25 µL), sendo 10 placas para o grupo caso (LPO) e uma para o *pool* do grupo controle (Figura 4.4).

Figura 4.4 - Preparação da placa PAHS-077ZA para PCR

A reação foi realizada no equipamento de PCR em tempo real 7500 Applied Biosystems Real-Time PCR System (Applied Biosystems, Life Technologies Corporation – California, EUA) segundo as concisões de ciclagem recomendada pelo fabricante: 10min a 95°C para a ativação da enzima *Taq* DNA polimerase, 40 ciclos de 15s a 95°C (desnaturação do DNA) e 1min a 60°C (associação dos iniciadores/extensão da nova fita de DNA-deteccção da fluorescência).

Para a análise dos resultados, os valores de Ct^1 do *pool* de amostra do grupo controle e do grupo caso foram transferidos para o software

SABiosciences Web-based PCR Array Data Analysis Software² disponível na internet para a análise dos dados.

¹ Ct ou *cycle threshold* é o número do ciclo em que a fluorescência gerada pela reação de amplificação cruza o limiar de fluorescência (*threshold*) de toda a reação. O Ct representa o início da fase exponencial da reação, ou seja, a existência de quantidade detectável de produto de amplificação (não corresponde a ruído de fundo). É inversamente proporcional ao nível de expressão relativa original do gene de interesse.

² www.sabiosciences.com/pcrarraydataanalysis.php

5 RESULTADOS

5.1 Características gerais dos pacientes

Tabela 5.1 – Características pacientes LPO (n = 10) e pacientes não LPO (n = 6)

Característica	Paciente LPO N	Paciente não LPO N
Sintomatologia	7	0
Fumante	0	1
Uso de medicação	6	6
Outras Lesões	0	0
Etnia		
Negro	3	1
Branco	7	5
Stress emocional	8	5

Tabela 5.2 – Sintomas e medicações em uso pacientes LPO (n = 10) e pacientes não LPO (n = 6)

	Paciente LPO	Paciente não LPO
Sintomas	Ardência (n=8)	nenhum
Medicações	Antihipertensivo Hipocolesterolemiantes Hipocligemico (oral) Hormônio tireoidiano	Antihipertensivo Hipocolesterolemiantes anticoagulante

Foram incluídos neste estudo 10 pacientes com LPO reticular, 9 mulheres e 1 homem, com idade variando entre 35 e 66 anos, sendo a média de idade de 52,5 anos. E, no grupo controle, 6 indivíduos saudáveis, 4 mulheres e 2 homens, com idade variando entre 53 e 74 anos com média de idade de 62,3 anos. Em relação a idade não observou diferença estatisticamente significativas entre grupo caso (LPO)

e controle (indivíduos saudáveis), sendo $p > 0.05$ ($p = 0.054$, teste T-student). As características clínicas gerais dos pacientes com LPO em relação aos indivíduos controle não, estão sumarizadas nas tabelas 5.1 e 5.2.

5.2 Medicamentos em uso

Os medicamentos em uso contínuo desses pacientes tanto caso quanto controle eram das seguintes classes; anti-hipertensivo, hipoglicemiantes via oral, anticoagulante e hipocolesterolemiantes, podendo ser apenas um desses, como também juntos.

5.3 Avaliação de sinais e sintomas e funções hepáticas e renais

Os sintomas apresentados como ardência foi minimizado com prescrição de corticosteroide ou imunossupressor.

Nenhum paciente sintomático teve alterações em funções hepáticas, renais pelo uso contínuo de corticoide tópico, isso pode ser avaliado com a solicitação de exames laboratoriais.

5.4 Avaliação da expressão de genes relacionados à resposta inflamatória e autoimunes

Para a análise da expressão de genes relacionados à resposta inflamatória e autoimunidade, por meio do RT-PCR *array* em tempo real, os valores de Ct do *pool* de amostra do grupo caso e do grupo controle, obtidos pela leitura da fluorescência gerada pela reação de amplificação no início da fase exponencial e captada pelo software do equipamento 7500 Applied Biosystems Real-Time PCR System, foram

transferidos para o *software* SABiosciences Web-based PCR Array Data Analysis Software.

O cálculo dos níveis de expressão gênica relativa entre as amostras do grupo caso e o *pool* do grupo controle foi realizado de acordo com o método comparativo Delta-Delta Ct ($2^{-\Delta\Delta C_t}$), considerando-se comparável a eficiência da reação de PCR em tempo real dos genes alvo e do gene controle, além da comprovação da eficiência da reação de transcrição genômica e do controle de contaminação por DNA genômico obtidas por meio de cálculos estabelecidos no *software* mencionado.

Dos 86 genes relacionados à resposta inflamatória e autoimunidade presentes no ensaio de PCR *array* PAHS-077Z da SABiosciences/Qiagen, foram encontrados 8 genes com aumento da expressão, 52 genes com baixa expressão e 24 co-expressos nas amostras de LPO em relação ao *pool* de amostras do grupo controle (Tabela 5.3), também evidenciados pelo gráfico de dispersão (*scatter plot*) obtido por meio do *software* (Gráfico 6.1). Nesta avaliação por pool de amostras não foi possível a comparação estatística entre os níveis de expressão.

Tabela 5.3 - Genes relacionados à resposta inflamatória e autoimunidades diferencialmente expressos entre o amostras de LPO em relação ao pool de amostras do grupo controle obtidos por meio do RT-PCR array

	GENE (SÍMBOLO/NOME)	FOLD- CHANGE
Expressão aumentada		
CCL3	Chemokine (C-C motif) ligand 3	10,19
CCL4	Chemokine (C-C motif) ligand 4	16,19
CCL11	Chemokine (C-C motif) ligand 11	3,14
CCL16	Chemokine (C-C motif) ligand 16	32,66
CC119	Chemokine (C-C motif) ligand 19	7,98
CXCL9	Chemokine (C-X-C motif) ligand 9	14,99
CXCL10	Chemokine (C-X-C motif) ligand 10	76,01
KNG1	Kininogen 1	47,45
Expressão diminuída		
TLR 7	Toll like receptor 7	- 8,49
TOLLIP	Toll interacting protein	- 9,34
TNFSF14	Tumor necrosis factor (ligand) superfamily, member 14	-7,31
NFKB1	Nuclear factor of kappa light polypeptide gene enhancer in B	- 217,90
MYD88	Myeloid differentiation primary response gene (88)	- 201,94
IL 1A	Interleukin 1 A	- 7,24
IL 1 B	Interleukin 1 B	- 6,47
ILR1	Interleukin receptor 1	- 3,68
IL1RAP	Interleukin 18 receptor accessory protein	- 27,31
IL8	Interleukin 8 (interferon-gamma-inducing factor)	- 27,47
IL18RAP	Interleukin 18 receptor accessory protein	- 180,97
IL 10	Interleukin 10 (interferon-gamma-inducing factor)	- 231,02
IL10RB	Interleukin 10 receptor, beta	-4,14
IL22	Interleukin 22	-15,23
IL22RA2	Interleukin 22 receptor alpha 2	-35,58
IL23A	Interleukin 23 alpha	-27,43
IL23R	Interleukin 23 receptor	-71,39
IL6R	Interleukin 6 receptor	-37,59
IL9	Interleukin 9	-183,36
ITGB2	Integrin, beta 2 (complement component 3 receptor 3 and 4	-13,55
BCL	B-cell CLL/lymphoma	-5,17
C3	Complement component 3	-28,12
C3AR1	Complement component 3a receptor 1	-56,47
CCL13	Chemokine (C-C motif) ligand 13	-11,38
CCL2	Chemokine (C-C motif) ligand 2	-5,80
CCL23	Chemokine (C-C motif) ligand 23	-25,60
CCL24	Chemokine (C-C motif) ligand 24	-19,94
CCL 5	Chemokine (C-C motif) ligand 5	-26,46
CCL7	Chemokine (C-C motif) ligand 7	-99,09
CCL8	Chemokine (C-C motif) ligand 8	-59,36
CCR1	Chemokine (C-C motif) receptor 1	-17,97
CCR2	Chemokine (C-C motif) receptor 2	-10,32
CCR3	Chemokine (C-C motif) receptor 3	-39,07
CCR7	Chemokine (C-C motif) receptor 7	-3,05
CD40LG	CD40 ligand	-9,64
CEBPB	CCAAT/enhancer binding protein (C/EBP), beta	-19,77
CRP	C-reactive protein, pentraxin-related	-113,48
CXCL5	Chemokine (C-X-C motif) receptor 5	-50,83
CXCR4	Chemokine (C-X-C motif) receptor 4	
FASLG	Fas ligand (TNF superfamily, member 6)	
FOS	FBJ murine osteosarcoma viral oncogene homolog

Gráfico 5.1 - Dispersão (Scatter plot) obtidos pelos resultados da expressão relativa dos genes relacionados à resposta inflamatória e autoimunidade por meio do RT-PCR *array*, evidenciando os genes super-expressos nas amostras de LPO em relação ao *pool* do grupo controle (acima da linha rosa superior), os genes sub-expressos (abaixo da linha rosa inferior) e os genes em que não houve diferença de expressão entre o grupo caso e controle (entre as linhas rosas)

6 DISCUSSÃO

6.1 Em relação às características das populações estudadas

O objetivo do nosso estudo compreendeu a avaliação da expressão de genes relacionados à resposta inflamatória e autoimune em pacientes com LPO quando comparados a pacientes com a mucosa clinicamente saudável, num desenho de estudo do tipo caso-controle. Obtivemos 10 pacientes com LPO, e apenas 6 pacientes controle, isso implica que o pareamento por características gerais como, sexo, idade, hábito de tabagismo e uso de anti-hipertensivos, hipoglicemiantes ou hipocolesterolêmicos dos pacientes incluídos foi proporcional e não pudemos ter uma amostra 1:1.

A análise estatística não apontou diferenças significativas com relação a idade dos grupos, desta forma certifica-se de que o grupo analisado é homogêneo em relação às suas características gerais e a presença ou não do agravo analisado, neste caso o LPO, seria o principal fator a produzir a diferença de expressão nos genes selecionados para a análise molecular.

O LPO engloba uma série de variantes clínicas, como reticular, em placas, papular, atrófico, erosivo-ulcerativo e bolhoso. Além das lesões que se assemelham clinicamente ao LPO, chamadas lesões liquenóides, como a reação liquenóide à drogas (RLD), reação liquenóide de contato (RLC) e reação liquenóide por doença do enxerto versus hospedeiro (RL por GVHD), sendo que estas condições podem ser diferenciadas dos casos de LPO idiopático pois apresentam um fator causal associado que pode ser identificado no paciente em questão, e tendem a cura após a remoção deste fator⁽⁷⁴⁾.

Para a análise deste estudo, optamos por selecionar pacientes com LPO que apresentassem lesões reticulares em mucosa jugal exclusivamente. Isto porque provavelmente estas diferentes variáveis clínicas apresentem diferentes respostas ao nível molecular, uma vez que observamos características clínicas que podem variar de aumento da queratinização do epitélio, nos casos das lesões papulares e estriadas, e adelgaçamento e até mesmo ausência de epitélio nas lesões atrófico-erosivas. Diferenças estas que inclusive suscitam a possibilidade de um eventual

potencial de transformação maligna maior nas lesões atrófico-erosivas em relação às reticulares⁽¹²⁾.

Desta forma, uma análise de um tipo exclusivo de lesão permitiria um melhor aprofundamento do conhecimento dos aspectos moleculares envolvidos na etiologia destas lesões. Assim, o diagnóstico dos pacientes com LPO incluiu criteriosamente características clínicas (estrias de Wickham) e histológica (hipergranulose epitelial, hiperqueratose, acantose, atrofia do epitélio e a presença de corpos eosinofílicos chamados de Corpos de Civatte), de acordo com os princípios da Organização Mundial da Saúde (OMS) modificados por Van der Meij⁽⁷⁴⁾, uma vez que não dispomos rotineiramente do exame de imunofluorescência direta (IFD), para distinguir de outras doenças imumomediadas e reação liquenóide.⁽⁷⁵⁻⁷⁷⁾ Embora, na literatura, alguns estudos deste tipo incluam outras formas do LPO como erosivo, por exemplo, em que o componente inflamatório é mais intenso e agudo^(49, 78, 79).

Em relação ao uso de medicação sistêmica, como anti-hipertensivos, hipoglicemiantes ou hipocolesterolêmicos, é importante a exclusão de casos que possam estar relacionados à RLD (reação liquenóide à drogas). Embora esta exclusão seja dificultada por se tratarem de medicamentos que raramente podem ser descontinuados por afetar a condição clínica do paciente de maneira importante. Desta forma, além do rigor nos critérios de diagnóstico dos casos de LPO, o grupo controle também foi pareado por esta condição. A sintomatologia apresentada pelos 7 pacientes de LPO era de ardência na ingestão de alimentos ou bebidas quente, porém não foi levada em consideração nos critérios de inclusão, mas tiveram a avaliação clínica para controle destes e prescrição de medicamentos. Acreditamos que talvez tenha alguma relação do stress emocional e resposta Th1, pois tivemos a resposta Th1 prevalente neste estudo e os pacientes com sintomas relatam algum acontecimento com impacto emocional e o surgimento da doença LPO.

No grupo controle, foram selecionados pacientes com lesões benignas em mucosa jugal e necessidade de exodontia, por aspectos éticos, a coleta realizada foi em mucosa adjacente à lesão que apresentasse clinicamente saudável e livre de sinais de inflamação. Além disso, deveriam apresentar características que proporcionassem a composição de um grupo semelhante ao grupo de casos (LPO), no que diz respeito às características gerais descritas anteriormente.

O espécime de mucosa jugal dos pacientes com LPO reticular foi obtido no ato da biópsia em formato elíptico, onde metade deste fragmento foi congelado

imediatamente em nitrogênio líquido, para posterior armazenamento em freezer à – 80°C até a realização dos experimentos no laboratório de Biologia molecular FOUSP e a outra metade do fragmento foi enviado para análise histológica e diagnóstico no laboratório de patologia bucal da FOUSP, já os pacientes controle com mucosa bucal saudável, foi um único fragmento elíptico congelado para a análise posterior.

6.2 Em relação aos genes diferencialmente expressos nas populações estudadas

A análise da expressão de genes relacionados à resposta inflamatória e autoimunidade em pacientes com LPO comparados a controles saudáveis pela técnica do PCR *array* identificou o aumento da expressão dos seguintes genes: CCL3, CCL4, CCL11, CCL16, CCL19, CXCL9, CXCL10, KNG1, que fazem parte basicamente do grupo das quimiocinas. E a diminuição da expressão dos genes: BCL6, C3, C3AR1, CCL2, CCL5, CCL7, CCL8, CCL13, CCL23, CCL24, CXCL5, CCR1, CCR2, CCR3, CCR7, CXCR1, CXCR4, CD40LG, CEBPB, CRP, FASLG, FLT3LG, FOS, HDAC4, IL-1A, IL-1B, IL-1R1, IL1F10, IL-1RAP, IL-6R, IL-8, IL-9, IL-10, IL-10RB, IL-18RAP, IL-22, IL-22RA2, IL-23A, IL-23R, ITGB2, LY96, MYD88, NFATC3, NFKB1, NR3C1, RIPK2, TLR1, TLR3, TLR5, TLR7, TNFSF14, TOLLIP.

Os outros 24 genes que faziam parte da placa de PCR *array* analisada não apresentaram diferenças na expressão entre casos e controles (C4A, CD40, CSF1, CCL17, CCL21, CCL22, CCR4, CXCL1, CXCL2, CXCL3, CXCL6, CXCR2, IFN- γ , IL-1RN, IL-6, IL-18, LTA, LTB, NOS2, TIRAP, TLR2, TLR4, TLR6, TNF- α).

A análise com *pool* de amostras controle foi adotada tendo em vista o alto custo de cada placa de PCR *array*, porém esta é uma ferramenta que dificilmente compromete os resultados e já descrita na literatura¹.

Em relação às quimiocinas, alguns estudos prévios fizeram a avaliação de algumas delas no LPO^(38, 49, 80-84), sendo o estudo de Ichimura et al o mais abrangente visto que avaliaram o perfil da expressão da família de quimiocinas e seus receptores no epitélio de amostras de LPO por *microarray*⁽³⁸⁾. Estes autores observaram o aumento de expressão das quimiocinas CCL5, CCL18, CCL19,

CCL20, CXCL9, CXCL10, CXCL11, CXCL12, CXCL14, e dos receptores CCR6, CCR9, CXCR4 no LPO em relação à mucosa saudável. E não observaram alteração na expressão do CCR7, e das quimiocinas ligantes dos receptores CCR3 (CCL7, CCL13, CCL11) e CCR4 (CCL17 e CCL22).

Desta forma, podemos destacar a concordância com alguns resultados observados em nosso estudo, como o aumento na expressão de CCL19, CXCL9, CXCL10 e a expressão semelhante entre os grupos estudados (caso e controle) das quimiocinas CCL17, CCL22 e do receptor CCR4. Em contrapartida, alguns resultados foram opostos, como os casos da expressão das quimiocinas CCL5, CCL7, CCL13 e dos receptores CCR3, CCR7 e CXCR4, que se encontraram diminuídas em nosso estudo e aumentadas no estudo citado e da CCL11, em que a situação era inversa. Já a CCL16, com expressão aumentada em nosso estudo, não foi avaliada por nenhum outro publicado e avaliado neste trabalho.

Os resultados opostos observados podem ter origem no reduzido número de amostras incluídas na avaliação conduzida pelo grupo de Ichimura et al, que refere ter utilizado 3 amostras o epitélio da mucosa bucal de pacientes com LPO erosivo isolado por microdissecção a *laser* para a análise de *microarray*, porém não refere que a validação destes resultados foi realizada numa amostra ampla. Ou ainda, e mais provavelmente, pela diferença no tipo de LPO incluído no estudo, que correspondeu à gengiva inserida de pacientes que apresentavam LPO erosivo, diferentemente do nosso grupo de estudo que foi composto por paciente com LPO reticular exclusivamente ⁽³⁸⁾.

As quimiocinas CCL18, CCL20, CXCL12, CXCL14 e os receptores CCR6 e CCR9, altamente expressas nas amostras de epitélio da mucosa bucal de pacientes com LPO erosivo⁽³⁸⁾, não faziam parte do grupo de genes pré-selecionados pelo fabricante para a placa de PCR *array* utilizada, a PAHS-077Z - *Inflammatory Response & Autoimmunity PCR Array* (SaBiosciences, Qiagen), sendo necessária uma nova investigação para a compreensão do papel destas quimiocinas no LPO reticular exclusivamente.

Especialmente a atuação da quimiocina CCL20 e seu receptor CCR6, de acordo com o estudo de Ichimura et al⁽³⁸⁾, estes autores observaram, por meio de imunohistoquímica, um aumento na marcação de células CD1a+ Langerin+ que correspondem à células de Langerhans (LC) imaturas (células dendríticas epiteliais). E, segundo estes mesmos autores, o aumento da expressão do CCR6, receptor

presente em LC imaturas, e da CCL20, quimiocina envolvida na quimioatração deste tipo celular, implica que a interação CCL20/CCR6 seja responsável pela quimioatração de LC imaturas para o epitélio, culminando nas lesões de LPO. Estas células sofrem um processo de maturação, após a apresentação de um antígeno ainda não conhecido, e passam a expressar, além do clássico receptor CCR7, outras quimiocinas e receptores como CXCL9, CXCL10, CXCL11, CCR5 e CXCR3, que atuam na quimioatração de linfócitos Th1.

No nosso estudo a expressão do CCR7, presente em células dendríticas (DC) maduras, apresentava-se reduzida em relação aos indivíduos controles. Porém outros estudos apresentaram resultados opostos, com aumento da expressão, como os estudos de Santoro et al. e de Mukae et al^(70,83).

O estudo de Santoro et al⁽⁷⁰⁾ avaliou especificamente as distintas subpopulações de DC em amostras de LPO, incluindo casos de pacientes com hepatites B e C, por meio de imunohistoquímica e imunofluorescência indireta. Observando aumento na porcentagem de LC imaturas (CD1a+/Langerin+), como no estudo de Ichimura et al⁽³⁸⁾, assim como de LC maduras (DC-SIGN+), isto é, ativadas pela interação com o antígeno. Estas últimas concentravam-se principalmente na região de junção entre epitélio e lâmina própria, local fundamental na lesão de LPO, e expressavam o receptor para quimiocina CCR7, que confere o fenótipo migratório para este subtipo celular em estado ativado. E o estudo de Mukae et al⁽⁸³⁾ também observou a expressão do CCR7 nas DC maduras presentes na submucosa e vasos linfáticos, sem a presença deste tipo celular e do CCR7 infiltrados no epitélio de amostras de diversos tipos clínicos de LPO.

A expressão do CCR7 evidencia a presença de infiltrado de DC maduras. Entretanto, nossa análise, diferentemente das análises de Santoro et al⁽⁷⁰⁾ e Mukae et al⁽⁸³⁾ que se concentraram especificamente na população de DC, foi uma análise da expressão de diversos genes na mucosa bucal com LPO em geral, visto que as amostras obtidas por biópsia eram maceradas para a extração do mRNA, envolvendo assim distintas populações celulares como queratinócitos, fibroblastos, linfócitos de diferentes tipos, entre outros.

Muito provavelmente a avaliação neste panorama geral influenciou na expressão global do CCR7. Além disso, ambos os estudos citados avaliaram pacientes com LPO distintos dos nossos, ou pacientes que apresentavam condições sistêmicas associadas como a infecção por hepatite⁽⁷⁰⁾, ou incluindo os diversos

tipos clínicos de LPO⁽⁸³⁾. Indicando, finalmente, um papel pouco expressivo ou específico deste receptor na etiologia de cada tipo de LPO, ou do LPO com condições sistêmicas associadas, como no caso da hepatite.

Assim como o CCR7, a expressão aumentada do receptor CXCR4 e seu ligante CXCL12 nas camadas do epitélio da mucosa de pacientes com LPO erosivo também foi sugerida como um sinal da atuação de LC maduras ⁽³⁸⁾. Porém nosso estudo identificou expressão reduzida do CXCR4 no LPO reticular, corroborando com os resultados de Pekiner et al ⁽⁸²⁾, que observaram porcentagem significativamente reduzidas de linfócitos T CD8+ CD184+ (CXCR4) em análise por citometria de fluxo do sangue periférico de pacientes com LPO. Possivelmente este receptor desempenhe papel diferencial em virtude do tipo de LPO que o paciente apresenta. Entretanto, o sangue periférico como fonte de amostra para a avaliação de quimiocinas ou seus receptores em pacientes com LPO, no caso do último estudo citado, merece ressalva e será discutida posteriormente.

A sinalização da via do receptor de quimiocina CXCR3 e dos ligantes CXCL9, CXCL10 e CXCL11 está relacionada com diversos tipos de doenças autoimunes e representam um fenótipo de resposta imune do tipo Th1⁽⁸¹⁾, previamente relacionada à etiologia do LPO⁽⁶⁸⁾. Nosso estudo observou elevação considerável na expressão do CXCL9, aumentada em 15 vezes no LPO em relação ao controle saudável, e do CXCL10, aumentada em 76 vezes. A quimiocina CXCL11 e o receptor CXCR3 não constavam na placa de PCR *array* analisada e constituem campo para futuras investigações.

A literatura também demonstra que a via do CXCR3 desempenha importante papel na indução da infiltração dos linfócitos T no LPO, uma vez que os diversos estudos que a analisaram^(38,49,81), encontraram aumento na expressão das quimiocinas e receptores relacionados em diferentes tipos de LPO. Tanto na avaliação de amostras exclusivamente de LPO erosivo^(38,49), como nas de diversos tipos de LPO (reticular, placa, atrófico e erosivo) e de pacientes que apresentavam, além do líquen plano na cavidade bucal, o acometimento de outros locais (genital e pele)⁽⁸¹⁾. Mais ainda, no estudo de Ichimura et al ⁽³⁸⁾ a CXCL10 e a CXCL11 eram principalmente expressas por queratinócitos da camada basal, enquanto a CXCL9 era expressa pelo infiltrado inflamatório subepitelial, ou seja, nas principais áreas alteradas nesta doença.

Além da via do CXCR3, outras vias também parecem estar relacionadas ao LPO como a via do CCR5. Os ligantes CCL3 e CCL4 deste receptor apresentaram expressão elevada, em nosso estudo, nas amostras de LPO em relação ao controle saudável em 10 e 16 vezes, respectivamente. Assim como no estudo de Iijima et al⁽⁴⁹⁾, que avaliou apenas amostras de LPO erosivo por RT-PCR e imunohistoquímica.

Em nosso estudo não foi feita a análise da expressão do receptor CCR5, pois o mesmo não estava incluído na placa de PCR *array* utilizada e dentre os estudos analisados, Hu et al⁽⁸⁰⁾ investigou este receptor e observou um aumento na proporção de linfócitos T CD4+ CCR5+ no sangue periférico de pacientes com LPO reticular, atrófico e erosivo em relação a indivíduos controle saudáveis. Já Pekiner et al⁽⁸²⁾ não observaram diferença na expressão do receptor CCR5 em linfócitos T CD8+ do sangue periférico de pacientes com LPO em relação aos controles saudáveis em avaliação por citometria de fluxo. Revelando a necessidade de novas análises sobre o papel deste receptor no LPO, uma vez que seus ligantes apresentam expressão elevada.

Além disso, a avaliação da expressão de genes em sangue periférico deve ser analisada criteriosamente e confirmada localmente, desde que o LPO é considerado uma alteração imunológica local, embora possa se manifestar em outras localizações como pele, unhas e região genital. Porém, por outro lado, os autores ressaltam a facilidade de acesso e a simplicidade da coleta de amostras para estudos em larga escala⁽⁸⁰⁾.

Em relação ao ligante CCL5 da via do receptor CCR5, nosso estudo revelou uma expressão reduzida deste em amostras de pacientes com LPO reticular. Porém, outros estudos observaram aumento na expressão deste ligante em amostras de LPO erosivo⁽⁴⁹⁾, em amostras de LPO reticular e erosivo, e de RLC por amálgama, no soro de pacientes com diferentes formas clínicas de LPO^(49,84), em linfócitos T isolados de pacientes com LPO⁽⁶⁷⁾. Estes estudos citados diferem do nosso em relação ao tipo de LPO incluído no estudo, uma vez que a maior parte deles incluem pacientes que apresentam lesões de LPO erosivas. Bem como, pelo tipo de amostra coletada do indivíduo com LPO, que incluiu soro e linfócitos T isolados dos pacientes, que podem em conjunto explicar os resultados opostos aos nossos.

De qualquer forma, algumas contradições também podem ser observadas entre os estudos de Iijima et al⁽⁴⁹⁾ e Little et al⁽⁶⁷⁾. Embora ambos tenham observado aumento da expressão da CCL5, o primeiro estudo observou a expressão desta

quimiocina no infiltrado inflamatório mononuclear, linfocitário e DC presentes na lâmina própria, mas não nos queratinócitos⁽⁴⁹⁾. E o segundo observou esta expressão justamente nos queratinócitos⁽⁸⁴⁾.

Os estudos de Zhao et al⁽⁶⁷⁾ demonstraram que o aumento da expressão da CCL5 e de um outro receptor para esta quimiocina, o CCR1, e este aumento estaria relacionado à degranulação de mastócitos, que por sua vez secretariam TNF- α , uma citocina indutora da secreção de CCL5 por linfócitos T ativados, retroalimentando o processo. Já o estudo de Hu et al⁽⁸⁰⁾ correlacionou o aumento da expressão da CCL5 à redução na expressão do microRNA miR-125a, molécula esta que regula negativamente a expressão da CCL5 por linfócitos T ativados.

Em relação a expressão dos genes das interleucinas, uma outra categoria de citocinas, esperava-se que a expressão destas seguissem o aumento da relação Th1/Th2 previamente descrito⁽⁶⁸⁾. Porém esta prerrogativa não foi verdadeira para os casos de LPO reticular analisados, exceto no caso das citocinas da família da IL-10, (IL-10, IL-10RB, IL-22 e IL-22RA2) que apresentavam-se com a expressão reduzida nas amostras de LPO analisadas em nosso estudo. A IL-10 é uma interleucina conhecida pela atuação anti-inflamatória com importante ação supressora da resposta imune Th1, que apresenta-se exacerbada no LPO, como discutido anteriormente⁽⁹¹⁾.

Apenas um estudo avaliou a IL-10 no LPO⁽⁸⁹⁾, e observou aumento de sua expressão em amostras de soro e saliva de pacientes com LPO erosivo e reticular. resultado este oposto ao de nosso estudo, talvez pela diferença na tipo de amostra e de LPO avaliado.

Todos os genes da família da IL-1 avaliados por PCR *array*, ligantes, receptores e moléculas adaptadores dos receptores, apresentaram baixa expressão (IL-1 α , IL-1 β , IL-1F10, IL-1R1, IL-RAP e IL-18RAP) ou não apresentaram diferença na expressão (IL-1RN e IL-18) nas amostras de LPO reticular em relação aos controles saudáveis. Os genes anteriormente citados apresentam características pró-inflamatórias, tipo Th1, atuando principalmente na resposta inflamatória contra infecções. Sendo a IL-1 uma importante indutora da produção de proteína C reativa (CRP)⁽⁹²⁾, também pouco expressa pela amostras de LPO reticular neste estudo. E a IL-18 uma citocina indutora do IFN- γ ⁽⁹³⁾, discutido mais adiante.

Outras interleucinas pró-inflamatórias, e seus receptores, como IL-6R, IL-8, IL-9, IL-23 e IL-23R, também apresentaram expressão reduzida e a IL-6 não

apresentou expressão diferente entre as amostras de LPO reticular em relação aos controles saudáveis do nosso estudo. Os estudos previamente publicados que investigaram a expressão das interleucinas no LPO observaram aumento na expressão das interleucinas pró-inflamatórias IL-1 α ⁽⁹⁰⁾, IL-6^(90,94-96), IL-8^(79,90), IL-18⁽⁷⁹⁾. Entretanto, grande parte destes estudos fez a análise destas interleucinas em amostras de fluidos bucais⁽⁹⁰⁾, saliva não estimulada, soro^(79,89) ou queratinócitos bucais⁽⁹⁶⁾ obtidos de pacientes com LPO. Além disso, alguns estudos^(79,89,90) incluíram no grupo de pacientes LPO, casos de lesões erosivas, atróficas e ulceradas, diferença no critério de inclusão leva, por si só, a maior de produção de marcadores inflamatórios observada. Enquanto outras investigações^(94,96) não descreveram a população de LPO incluída na avaliação.

Ainda assim, alguns estudos mais claramente delineados, como o de Gu et al⁽⁹⁵⁾, em que amostras de queratinócitos lesionais foram coletadas por raspagem e analisadas por ELISA quanto a expressão de IL-6, é possível verificar que o aumento da expressão desta citocina pró-inflamatória era importante no grupo de pacientes LPO erosivo. Enquanto grupo de pacientes com LPO reticular não apresentavam diferenças na expressão da IL-6 em relação aos controles saudáveis, assim como observamos em nosso estudo.

Por sua vez, outros genes que codificam citocinas pró-inflamatórias como o IFN- γ e a família do TNF- α (Fas-L, LTA, LTB, TNF- α e TNFSF14) não apresentaram diferenças na expressão entre os grupos caso e controle avaliados, exceto Fas-L e o TNFSF14, que apresentaram expressão reduzida. Embora estes últimos genes não tenham sido correlacionados ao LPO por nenhuma investigação previamente publicada, muitas outras relataram aumento na expressão do IFN- γ ⁽¹⁾ e TNF- α ^(90,96) no LPO. Novamente, como no caso das interleucinas, em análises que envolviam casos de LPO atrófico/erosivo⁽⁹⁰⁾ e amostras provenientes de fluidos bucais⁽⁶⁷⁾, e queratinócitos bucais⁽⁹⁶⁾ obtidos de pacientes com LPO.

E da mesma maneira, o estudo de Tao et al⁽¹⁾ que avalia a expressão do IFN- γ em amostras de saliva não estimulada e tecido de pacientes com LPO reticular e erosivo, demonstrou que o aumento da expressão desta citocina pró-inflamatória pode ser observado nas amostras de tecido dos casos de LPO erosivo. Enquanto as amostras de LPO reticular não apresentavam esta expressão exacerbada de IFN- γ em relação aos controles saudáveis, como também não observamos. Além disso, este estudo demonstra claramente a não correspondência entre a quantificação da

expressão de IFN- γ entre tecido e saliva, explicando os resultados diversos anteriormente descritos.

Um dos genes avaliados na placa de PCR *array*, selecionada para este estudo, o cininogênio 1 (KNG1) apresentou um marcante aumento em sua expressão nas amostras de LPO reticular em relação aos controles (cerca de 47 vezes). Sendo este um gene principalmente relacionado à expressão de cofatores da coagulação sanguínea, como a bradicinina⁽⁹⁹⁾, sua expressão parece surpreendentemente e simultaneamente sem sentido. Porém, já foi demonstrado que este tipo de gene tem sua expressão induzida por processos inflamatórios, e embora não tenha sido avaliado anteriormente em LPO, este gene já foi analisado no eritema multiforme⁽⁹⁷⁾, que também apresenta natureza imunomediada, parece ser mais uma consequência deste processo inflamatório do que sua causa.

Com relação a família dos receptores *Toll-like* (TLR), os TLR1, TLR3, TLR5, TLR7, a molécula adaptadora dos TLR MYD-88 e a molécula inibitória dos TLR (TOLLIP) apresentaram expressão reduzida as amostras de LPO reticular em relação aos controles saudáveis do nosso estudo. Enquanto os TLR2, TLR4, TLR6 e a molécula adaptadores dos TIRAP não exibiram diferenças na expressão entre os grupos caso e controle estudados. Poucos estudos⁽⁹⁸⁾ avaliaram a participação dos TLR e de suas moléculas adaptadoras ou inibidoras no LPO. Células epiteliais orais presentes na saliva de pacientes com LPO apresentam expressão gênica reduzida de TLR2⁽⁹⁸⁾. A análise da expressão gênica e proteica em amostras de LPO, por RT-PCR e imunohistoquímica, também demonstrou redução na expressão do TLR2 em conjunto com o aumento do TLR4⁽⁸⁵⁾. Nosso estudo entretanto não observou diferenças na expressão de nenhum dos dois TLR estudados, e a ausência de detalhamento dos critérios de inclusão e de diagnóstico do LPO dos indivíduos incluídos nestes estudos, o tipo de amostra estudada como as células descamadas presentes na saliva no caso da investigação de Srinivasan et al⁽⁹⁸⁾ podem estar relacionadas aos resultados diferentes daqueles do presente estudo.

O fator de transcrição do DNA de uma das vias de sinalização dos receptores TLR, o NF- κ B, também apresentou expressão reduzida no LPO reticular. A redução na expressão do fator de transcrição NF- κ B é coerente com os outros resultados apresentados por nosso estudo, uma vez que toda a sinalização pró-inflamatória avaliada (IL-1, IL-6, IL-8, IL-9, IL-18, IL-23, IFN- γ , TNF- α) é estimulada pela

sinalização deste fator de transcrição⁽⁷⁹⁾ tem a expressão reduzida ou não alterada de maneira importante no LPO reticular.

Desta forma, a diminuição da expressão de genes de citocinas anti-inflamatórias, como a IL-10, em conjunto com o aumento da expressão dos genes da via do CXCR3 confere ao LPO um fenótipo predominantemente Th1 (no caso da IL-10) e autoimune (no caso da via do CXCR3) e a avaliação de alterações genéticas (mutações) e epigenéticas (alteração na metilação e nas histonas e atuação de microRNAs específicos) neste conjunto de genes constituem amplo campo de pesquisa na compreensão dos eventos moleculares que culminariam com a infiltração de linfócitos T, principalmente do tipo Th1, e a manutenção desta inflamação cronicamente na região subepitelial induzida principalmente por alterações nestas quimiocinas e receptores presentes em células dendríticas e linfócitos T citotóxicos. Assim como o desenvolvimento e teste de fármacos bloqueadores desta via para o tratamento desta condição.

6.1 Tabela comparativa dos resultados encontrados neste estudo e a literatura

	Tipo LPO	Sítio	Análise	Aumento Expressão	Diminuição Expressão
Torrezani 2014	Reticular (n=10)	Mucosa bucal	PCR array	CCL 2,4,11, 16, 19 CXCL 9 e 10 KNG1	CCL 5.7.11 CXCR 4 IL, TLR, TOLLIP,....
Ichimura 2005	Erosivo (n=3)	Gengiva inserida	Microarray Imunohistoquímica RT-PCR	CCL 5,18,19,20, CXCL9,10,11,12,14 CL	CCL11
Santoro 2005	(HCV e HBV) ? (n=16)	Mucosa ?	IFI Imunohistoquímica	CCR7 CL	-----
Pekiner 2012	Reticular, Erosivo Bolhoso (n =30)	Língua Gengiva Mucosa	Citometria de fluxo	IL 10	CXCR 4 IL 2
Iijima 2003	Erosivo (n=15)	Mucosa bucal	RT-PCR Imunohistoquímica	CCL 3, 4, 5, 17,22 CXCL9, 10	-----
Zhao 2001	?	?	RT-PCR Imunohistoquímica	CCL 5 CCR1	-----
Hu 2012	Reticular, atrófico Erosivo (n= 22)	?	RT-PCR Citometria de fluxo	CCR 5 CCL5	-----

7 CONCLUSÕES

Os resultados obtidos com a metodologia utilizada nesse estudo nos permitiu concluir que:

1. Os genes com expressão elevada nas amostras de pacientes com LPO reticular foram representados pelo grupo das quimiocinas, indicando que estas citocinas quimiotáticas sugerem desempenhar um importante papel na indução da infiltração de linfócitos T no LPO reticular.
2. Entre as quimiocinas com expressão aumentada no LPO destaca-se a via do receptor CXCR3, representado pelas quimiocinas CXCL9, CXCL10, as mais importantes de acordo com os indícios apontados pela literatura atual e que caracteriza um fenótipo autoimune aos diversos tipos clínicos de LPO. Ambas tiveram aumento na sua expressão, logo temos o aumento de leucócitos também.
3. Dentre as interleucinas e outras citocinas inflamatórias analisadas em que observamos ambas com expressão reduzida no LPO, destaca-se que a polarização de respostas imune Th1 relacionadas ao LPO possam ter origem na baixa expressão de citocinas anti-inflamatórias como a IL-10, importante regulador da homeostase Th1/Th2, no caso do LPO reticular em detrimento de uma expressão elevada de citocinas pró-inflamatórias.
4. Não observamos aumento de CCR 3 e 4, mas este resultado é coerente, pois ambos são resposta Th2, que são anti-inflamatórias, e mesmo não visto clinicamente, outros marcadores Th1 que são pró-inflamatórias estavam aumentados.

REFERÊNCIAS³

1. Tao XA, Li CY, Xia J, Yang X, Chen XH, Jian YT, Cheng B. Differential gene expression profiles of whole lesions from patients with oral lichen planus. *J Oral Pathol Med*. 2009 May;38(5):427-33.
2. Scully C, Laskaris G. Mucocutaneous disorders. *Periodontol* 2000. 1998 Oct;18:81-94.
3. Sugerman PB, Savage NW, Walsh LJ, Zhao ZZ, Zhou XJ, Khan A, Seymour GJ, Bigby M. The pathogenesis of oral lichen planus. *Crit Rev Oral Biol Med*. 2002;13(4):350-65.
4. Carrozzo M, Gandolfo S. The management of oral lichen planus. *Oral Dis*. 1999 Jul;5(3):196-205.
5. van der Waal I. Oral lichen planus and oral lichenoid lesions; a critical appraisal with emphasis on the diagnostic aspects. *Med Oral Patol Oral Cir Bucal*. 2009 Jul 1;14(7):E310-4.
6. Ebrahimi M, Nylander K, van der Waal I. Oral lichen planus and the p53 family: what do we know? *J Oral Pathol Med*. 2011 Apr;40(4):281-5.
7. Scully C, Porter SR. The clinical spectrum of desquamative gingivitis. *Semin Cutan Med Surg*. 1997 Dec;16(4):308-13.
8. Eversole LR. Immunopathogenesis of oral lichen planus and recurrent aphthous stomatitis. *Semin Cutan Med Surg*. 1997 Dec;16(4):284-94.
9. Fujita H, Kobayashi T, Tai H, Nagata M, Hoshina H, Nishizawa R, Takagi R, Yoshie H. Assessment of 14 functional gene polymorphisms in Japanese patients with oral lichen planus: a pilot case-control study. *Int J Oral Maxillofac Surg*. 2009 Sep;38(9):978-83.

³ De acordo com o Estilo Vancouver.

10. Koch P, Bahmer FA. Oral lesions and symptoms related to metals used in dental restorations: a clinical, allergological, and histologic study. *J Am Acad Dermatol*. 1999 Sep;41(3 Pt 1):422-30.
11. Shengyuan L, Songpo Y, Wen W, Wenjing T, Haitao Z, Binyou W. Hepatitis C virus and lichen planus: a reciprocal association determined by a meta-analysis. *Arch Dermatol*. 2009 Sep;145(9):1040-7.
12. Lodi G, Scully C, Carrozzo M, Griffiths M, Sugerman PB, Thongprasom K. Current controversies in oral lichen planus: report of an international consensus meeting. Part 2. Clinical management and malignant transformation. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2005 Aug;100(2):164-78
13. Rad M, Hashemipoor MA, Mojtahedi A, Zarei MR, Chamani G, Kakoei S, Izadi N. Correlation between clinical and histopathologic diagnoses of oral lichen planus based on modified WHO diagnostic criteria. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2009 Jun;107(6):796-800.
14. Sugerman PB, Savage NW. Oral lichen planus: causes, diagnosis and management. *Aust Dent J*. 2002 Dec;47(4):290-7.
15. Escudier M, Ahmed N, Shirlaw P, Setterfield J, Tappuni A, Black MM, Challacombe SJ. A scoring system for mucosal disease severity with special reference to oral lichen planus. *Br J Dermatol*. 2007 Oct;157(4):765-70. Epub 2007 Aug 17.
16. van der Meij EH, Schepman KP, van der Waal I. The possible premalignant character of oral lichen planus and oral lichenoid lesions: a prospective study. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2003 Aug;96(2):164-71.
17. Lanfranchi-Tizeira HE, Aguas SC, Sano SM. Malignant transformation of atypical oral lichen planus: a review of 32 cases. *Med Oral*. 2003 Jan-Feb;8(1):2-9.
18. Centola M, Frank MB, Bolstad AI, Alex P, Szanto A, Zeher M, Hjelmervik TO, Jonsson R, Nakken B, Szegedi G, Szodoray P. Genome-scale assessment of molecular pathology in systemic autoimmune diseases using microarray technology: a potential breakthrough diagnostic and individualized therapy-design tool. *Scand J Immunol*. 2006 Sep;64(3):236-42.

19. Mandel M, Achiron A. Gene expression studies in systemic lupus erythematosus. *Lupus*. 2006;15(7):451-6.
20. Hoheisel JD. Microarray technology: beyond transcript profiling and genotype analysis. *Nat Rev Genet*. 2006 Mar;7(3):200-10.
21. Provenzano M, Mocellin S. Complementary techniques: validation of gene expression data by quantitative real time PCR. *Adv Exp Med Biol*. 2007;593:66-73.
22. Schlosser BJ. Lichen planus and lichenoid reactions of the oral mucosa. *Dermatol Ther*. 2010 May-Jun;23(3):251-67
23. Eisen D. The clinical features, malignant potential, and systemic associations of oral lichen planus: a study of 723 patients. *J Am Acad Dermatol*. 2002 Feb;46(2):207-14.
24. Eisen D. The evaluation of cutaneous, genital, scalp, nail, esophageal, and ocular involvement in patients with oral lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 1999 Oct;88(4):431-6..
25. MMS Nico JF, SV Lourenço. Oral lichen planus. *Anais brasileiros de dermatologia* [Internet]. 2011; 86(4):[633-43 pp.]. Available from: <http://www.scielo.br/pdf/abd/v86n4/v86n4a02.pdf>.
26. Ismail SB, Kumar SK, Zain RB. Oral lichen planus and lichenoid reactions: etiopathogenesis, diagnosis, management and malignant transformation. *J Oral Sci*. 2007 Jun;49(2):89-106.
27. Scully C, Carrozzo M. Oral mucosal disease: Lichen planus. *Br J Oral Maxillofac Surg*. 2008 Jan;46(1):15-21. Epub 2007 Sep 5.
28. Thornhill MH. Immune mechanisms in oral lichen planus. *Acta Odontol Scand*. 2001 Jun;59(3):174-7.
29. Carrozzo M, Uboldi de Capei M, Dametto E, Fasano ME, Arduino P, Broccoletti R, Vezza D, Rendine S, Curtioni ES, Gandolfo S. Tumor necrosis factor-alpha and interferon-gamma polymorphisms contribute to susceptibility to oral lichen planus. *J Invest Dermatol*. 2004 Jan;122(1):87-94.

30. Tanda N, Mori S, Saito K, Ikawa K, Sakamoto S. Expression of apoptotic signaling proteins in leukoplakia and oral lichen planus: quantitative and topographical studies. *J Oral Pathol Med*. 2000 Sep;29(8):385-93
31. Nagao Y, Sata M. Hepatitis C virus and lichen planus. *J Gastroenterol Hepatol*. 2004 Oct;19(10):1101-13.
32. Ginos MA, Page GP, Michalowicz BS, Patel KJ, Volker SE, Pambuccian SE, Ondrey FG, Adams GL, Gaffney PM. Identification of a gene expression signature associated with recurrent disease in squamous cell carcinoma of the head and neck. *Cancer Res*. 2004 Jan 1;64(1):55-63.33.
33. Somoza-Martín JM, García-García A, Barros-Angueira F, Otero-Rey E, Torres-Español M, Gándara-Vila P, Reboiras-López MD, Blanco-Carrión A, Gándara-Rey JM. Gene expression profile in oral squamous cell carcinoma: a pilot study. *J Oral Maxillofac Surg*. 2005 Jun;63(6):786-92.
34. Brentani RR, Carraro DM, Verjovski-Almeida S, Reis EM, Neves EJ, de Souza SJ, Carvalho AF, Brentani H, Reis LF. Gene expression arrays in cancer research: methods and applications. *Crit Rev Oncol Hematol*. 2005 May;54(2):95-105.
35. Rodini CO, Xavier FC, Paiva KB, De Souza Setúbal Destro MF, Moyses RA, Michaluart P, Carvalho MB, Fukuyama EE; Head And Neck Genome Project Gencapo, Tajara EH, Okamoto OK, Nunes FD. Homeobox gene expression profile indicates HOXA5 as a candidate prognostic marker in oral squamous cell carcinoma. *Int J Oncol*. 2012 Apr;40(4):1180-8.
36. Bustin SA, Nolan T. Pitfalls of quantitative real-time reverse-transcription polymerase chain reaction. *J Biomol Tech*. 2004 Sep;15(3):155-66.
37. Mélik-Parsadaniantz S, Rostène W. Chemokines and neuromodulation. *J Neuroimmunol*. 2008 Jul 31;198(1-2):62-8.
38. Ichimura M, Hiratsuka K, Ogura N, Utsunomiya T, Sakamaki H, Kondoh T, Abiko Y, Otake S, Yamamoto M. Expression profile of chemokines and chemokine receptors in epithelial cell layers of oral lichen planus. *J Oral Pathol Med*. 2006 Mar;35(3):167-74.

39. D'Ambrosio D, Iellem A, Bonecchi R, Mazzeo D, Sozzani S, Mantovani A, Sinigaglia F. Selective up-regulation of chemokine receptors CCR4 and CCR8 upon activation of polarized human type 2 Th cells. *J Immunol*. 1998 Nov 15;161(10):5111-5.
40. Murdoch C, Finn A. Chemokine receptors and their role in inflammation and infectious diseases. *Blood*. 2000 May 15;95(10):3032-43.
41. Murphy PM, Baggiolini M, Charo IF, Hébert CA, Horuk R, Matsushima K, Miller LH, Oppenheim JJ, Power CA. International union of pharmacology. XXII. Nomenclature for chemokine receptors. *Pharmacol Rev*. 2000 Mar;52(1):145-76.
42. Rossi D, Zlotnik A. The biology of chemokines and their receptors. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:217-42
44. Gonçalves RM, Teixeira AL, Campos WR, Oréfice F. [The role of chemokines in uveitis]. *Arq Bras Oftalmol*. 2007 Mar-Apr;70(2):363-70.
45. Guerreiro R, Santos-Costa Q, Azevedo-Pereira JM. [The chemokines and their receptors: characteristics and physiological functions]. *Acta Med Port*. 2011 Dec;24 Suppl 4:967-76. Epub 2011 Dec 31.
46. Charo IF, Ransohoff RM. The many roles of chemokines and chemokine receptors in inflammation. *N Engl J Med*. 2006 Feb 9;354(6):610-21.
47. Bacon K, Baggiolini M, Broxmeyer H, Horuk R, Lindley I, Mantovani A, Matsushima K, Murphy P, Nomiyama H, Oppenheim J, Rot A, Schall T, Tsang M, Thorpe R, Van Damme J, Wadhwa M, Yoshie O, Zlotnik A, Zoon K; IUIS/WHO Subcommittee on Chemokine Nomenclature. Chemokine/chemokine receptor nomenclature. *J Interferon Cytokine Res*. 2002 Oct;22(10):1067-8.
48. Wenzel J, Tüting T. An IFN-associated cytotoxic cellular immune response against viral, self-, or tumor antigens is a common pathogenetic feature in "interface dermatitis". *J Invest Dermatol*. 2008 Oct;128(10):2392-402.

49. Iijima W, Ohtani H, Nakayama T, Sugawara Y, Sato E, Nagura H, Yoshie O, Sasano T. Infiltrating CD8+ T cells in oral lichen planus predominantly express CCR5 and CXCR3 and carry respective chemokine ligands RANTES/CCL5 and IP-10/CXCL10 in their cytolytic granules: a potential self-recruiting mechanism. *Am J Pathol.* 2003 Jul;163(1):261-8.
50. Angiolillo AL, Sgadari C, Taub DD, Liao F, Farber JM, Maheshwari S, Kleinman HK, Reaman GH, Tosato G. Human interferon-inducible protein 10 is a potent inhibitor of angiogenesis in vivo. *J Exp Med.* 1995 Jul 1;182(1):155-62.
51. Melchjorsen J, Sørensen LN, Paludan SR. Expression and function of chemokines during viral infections: from molecular mechanisms to in vivo function. *J Leukoc Biol.* 2003 Sep;74(3):331-43.
52. Colman RW. Regulation of angiogenesis by the kallikrein-kinin system. *Curr Pharm Des.* 2006;12(21):2599-607.
53. Lu R, Zhang J, Sun W, Du G, Zhou G. Inflammation-related cytokines in oral lichen planus: an overview. *J Oral Pathol Med.* 2013 Dec 16.
54. Fiorentino DF, Zlotnik A, Mosmann TR, Howard M, O'Garra A. IL-10 inhibits cytokine production by activated macrophages. *J Immunol.* 1991 Dec 1;147(11):3815-22.
55. Muzio M, Poltarutti N, Bosisio D, Prahladan MK, Mantovani A. Toll like receptor family (TLT) and signalling pathway. *Eur Cytokine Netw.* 2000 Sep;11(3):489-90.
56. Kawai T, Akira S. The role of pattern-recognition receptors in innate immunity: update on Toll-like receptors. *Nat Immunol.* 2010 May;11(5):373-84.
57. Gracie JA, Robertson SE, McInnes IB. Interleukin-18. *J Leukoc Biol.* 2003 Feb;73(2):213-24.
58. Subramaniam S, Stansberg C, Cunningham C. The interleukin 1 receptor family. *Dev Comp Immunol.* 2004 May 3;28(5):415-28.

59. Hunt KA, Zhernakova A, Turner G, Heap GA, Franke L, Bruinenberg M, Romanos J, Dinesen LC, Ryan AW, Panesar D, Gwilliam R, Takeuchi F, McLaren WM, Holmes GK, Howdle PD, Walters JR, Sanders DS, Playford RJ, Trynka G, Mulder CJ, Mearin ML, Verbeek WH, Trimble V, Stevens FM, O'Morain C, Kennedy NP, Kelleher D, Pennington DJ, Strachan DP, McArdle WL, Mein CA, Wapenaar MC, Deloukas P, McGinnis R, McManus R, Wijmenga C, van Heel DA. Newly identified genetic risk variants for celiac disease related to the immune response. *Nat Genet.* 2008 Apr;40(4):395-402.
60. Stylianou E, Saklatvala J. Interleukin-1. *Int J Biochem Cell Biol.* 1998 Oct;30(10):1075-9.
61. Arend WP. The balance between IL-1 and IL-1Ra in disease. *Cytokine Growth Factor Rev.* 2002 Aug-Oct;13(4-5):323-40..
62. Singh R, Wang B, Shirvaikar A, Khan S, Kamat S, Schelling JR, Konieczkowski M, Sedor JR. The IL-1 receptor and Rho directly associate to drive cell activation in inflammation. *J Clin Invest.* 1999 Jun;103(11):1561-70.
63. Bulut Y, Faure E, Thomas L, Equils O, Arditi M. Cooperation of Toll-like receptor 2 and 6 for cellular activation by soluble tuberculosis factor and *Borrelia burgdorferi* outer surface protein A lipoprotein: role of Toll-interacting protein and IL-1 receptor signaling molecules in Toll-like receptor 2 signaling. *J Immunol.* 2001 Jul 15;167(2):987-94.
64. Moser B, Loetscher P. Lymphocyte traffic control by chemokines. *Nat Immunol.* 2001 Feb;2(2):123-8.
65. Sallusto F, Mackay CR, Lanzavecchia A. Selective expression of the eotaxin receptor CCR3 by human T helper 2 cells. *Science.* 1997 Sep 26;277(5334):2005-7.
66. Flier J, Boorsma DM, van Beek PJ, Nieboer C, Stoof TJ, Willemze R, Tensen CP. Differential expression of CXCR3 targeting chemokines CXCL10, CXCL9, and CXCL11 in different types of skin inflammation. *J Pathol.* 2001 Aug;194(4):398-405.
67. Zhao ZZ, Sugerman PB, Walsh LJ, Savage NW. Expression of RANTES and CCR1 in oral lichen planus and association with mast cell migration. *J Oral Pathol Med.* 2002 Mar;31(3):158-62.
68. Carrozzo M, Thorpe R. Oral lichen planus: a review. *Minerva Stomatol.* 2009 Oct;58(10):519-37.

69. Banchereau J, Briere F, Caux C, Davoust J, Lebecque S, Liu YJ, Pulendran B, Palucka K. Immunobiology of dendritic cells. *Annu Rev Immunol*. 2000;18:767-811.
70. Santoro A, Majorana A, Roversi L, Gentili F, Marrelli S, Vermi W, Bardellini E, Sapelli P, Facchetti F. Recruitment of dendritic cells in oral lichen planus. *J Pathol*. 2005 Mar;205(4):426-34.
71. Wenzel J, Scheler M, Proelss J, Bieber T, Tüting T. Type I interferon-associated cytotoxic inflammation in lichen planus. *J Cutan Pathol*. 2006 Oct;33(10):672-8.
72. Terlou A, Santegoets LA, van der Meijden WI, Heijmans-Antonissen C, Swagemakers SM, van der Spek PJ, Ewing PC, van Beurden M, Helmerhorst TJ, Blok LJ. An autoimmune phenotype in vulvar lichen sclerosus and lichen planus: a Th1 response and high levels of microRNA-155. *J Invest Dermatol*. 2012 Mar;132(3 Pt 1):658-66.
73. Gallo CdB. Expressão de receptores Toll-Like (2, 4 e 7) em células do sangue e da mucosa oral de pacientes portadores de ulceração aftosa recorrente. www.teses.usp.br/teses/disponiveis/23/23139/tde-20012009-160251: Universidade de São Paulo; 2008.
74. van der Meij EH, van der Waal I. Lack of clinicopathologic correlation in the diagnosis of oral lichen planus based on the presently available diagnostic criteria and suggestions for modifications. *J Oral Pathol Med*. 2003 Oct;32(9):507-12.
75. Lee HY, Blazek C, Beltraminelli H, Borradori L. Oral mucous membrane pemphigoid: complete response to topical tacrolimus. *Acta Derm Venereol*. 2011 Sep;91(5):604-5.
76. Fistarol SK, Itin PH. Anti-inflammatory treatment. *Curr Probl Dermatol*. 2011;40:58-70.
77. Laskaris G, Sklavounou A, Angelopoulos A. Direct immunofluorescence in oral lichen planus. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol*. 1982 May;53(5):483-7.
78. Xavier GM, de Sá AR, Guimarães AL, da Silva TA, Gomez RS. Investigation of functional gene polymorphisms interleukin-1beta, interleukin-6, interleukin-10 and tumor necrosis factor in individuals with oral lichen planus. *J Oral Pathol Med*. 2007 Sep;36(8):476-81.

79. Zhang Y, Lin M, Zhang S, Wang Z, Jiang L, Shen J, Bai J, Gao F, Zhou M, Chen Q. NF-kappaB-dependent cytokines in saliva and serum from patients with oral lichen planus: a study in an ethnic Chinese population. *Cytokine*. 2008 Feb;41(2):144-9.
80. Hu JY, Zhang J, Cui JL, Liang XY, Lu R, Du GF, et al. Increasing CCL5/CCR5 on CD4+ T cells in peripheral blood of oral lichen planus. *Cytokine*. 2013;62(1):141-5.
81. Danielsson K, Boldrup L, Rentoft M, Coates PJ, Ebrahimi M, Nylander E, Wahlin YB, Nylander K. Autoantibodies and decreased expression of the transcription factor ELF-3 together with increased chemokine pathways support an autoimmune phenotype and altered differentiation in lichen planus located in oral mucosa. *J Eur Acad Dermatol Venereol*. 2013 Nov;27(11):1410-6.
82. Pekiner FN, Demirel GY, Borahan MO, Ozbayrak S. Evaluation of cytotoxic T-cell activation, chemokine receptors, and adhesion molecules in blood and serum in patients with oral lichen planus. *J Oral Pathol Med*. 2012;41(6):484-9.
83. Mukae S, Okazaki Y, Tsuda H, Nagai K, Matsumoto N, Ochiai T, et al. Detection of fascin and CCR-7 positive mature dendritic cells in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med*. 2009;38(4):334-42.
84. Little MC, Griffiths CE, Watson RE, Pemberton MN, Thornhill MH. Oral mucosal keratinocytes express RANTES and ICAM-1, but not interleukin-8, in oral lichen planus and oral lichenoid reactions induced by amalgam fillings. *Clin Exp Dermatol*. 2003;28(1):64-9.
85. Janardhanam SB, Prakasam S, Swaminathan VT, Kodumudi KN, Zunt SL, Srinivasan M. Differential expression of TLR-2 and TLR-4 in the epithelial cells in oral lichen planus. *Arch Oral Biol*. 2012 May;57(5):495-502.
86. Stanimirovic D, Zeljic K, Jankovic L, Magic M, Hadzi-Mihajlovic M, Magic Z. TLR2, TLR3, TLR4 and CD14 gene polymorphisms associated with oral lichen planus risk. *Eur J Oral Sci*. 2013 Oct;121(5):421-6.
87. El Tawdy A, Rashed L. Downregulation of TLR-7 receptor in hepatic and non-hepatic patients with lichen planus. *Int J Dermatol*. 2012 Jul;51(7):785-9.
88. Rivas MN, Koh YT, Chen A, Nguyen A, Lee YH, Lawson G, Chatila TA. MyD88 is critically involved in immune tolerance breakdown at environmental interfaces of Foxp3-deficient mice. *J Clin Invest*. 2012 May 1;122(5):1933-47.

89. Zhang Y, Liu W, Zhang S, Dan H, Lu R, Wang F, Wang J, Zhou M, Zeng X, Lin M, Chen Q, Zhou Y. Salivary and serum interleukin-18 in patients with oral lichen planus: a study in an ethnic Chinese population. *Inflammation*. 2012 Apr;35(2):399-404.
90. Rhodus NL, Cheng B, Myers S, Bowles W, Ho V, Ondrey F. A comparison of the pro-inflammatory, NF-kappaB-dependent cytokines: TNF-alpha, IL-1-alpha, IL-6, and IL-8 in different oral fluids from oral lichen planus patients. *Clin Immunol*. 2005 Mar;114(3):278-83.
91. Simark-Mattsson C, Bergenholtz G, Jontell M, Eklund C, Seymour GJ, Sugerman PB, Savage NW, Dahlgren UI. Distribution of interleukin-2, -4, -10, tumour necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta mRNAs in oral lichen planus. *Arch Oral Biol*. 1999 Jun;44(6):499-507.
92. Sainz J, Pérez E, Gómez-Lopera S, Jurado M. IL1 gene cluster polymorphisms and its haplotypes may predict the risk to develop invasive pulmonary aspergillosis and modulate C-reactive protein level. *J Clin Immunol*. 2008 Sep;28(5):473-85.
93. Du G, Ye L, Zhang G, Dong Q, Liu K, Tian J. Human IL18-IL2 fusion protein as a potential antitumor reagent by enhancing NK cell cytotoxicity and IFN-gamma production. *J Cancer Res Clin Oncol*. 2012 Oct;138(10):1727-36.
94. Fayyazi A, Schweyer S, Soruri A, Duong LQ, Radzun HJ, Peters J, Parwaresch R, Berger H. T lymphocytes and altered keratinocytes express interferon-gamma and interleukin 6 in lichen planus. *Arch Dermatol Res*. 1999 Sep;291(9):485-90.
95. Gu GM, Martin MD, Darveau RP, Truelove E, Epstein J. Oral and serum IL-6 levels in oral lichen planus patients. *Oral Surg Oral Med Oral Pathol Oral Radiol Endod*. 2004 Dec;98(6):673-8.
96. Yamamoto T, Osaki T, Yoneda K, Ueta E. Cytokine production by keratinocytes and mononuclear infiltrates in oral lichen planus. *J Oral Pathol Med*. 1994 Aug;23(7):309-15.
97. Lang DM, Sugimoto SL, Curd JG, Christiansen SC, Zuraw BL. High-molecular-weight kininogen is cleaved in active erythema multiforme. *J Allergy Clin Immunol*. 1989 Apr;83(4):802-10.

98. Srinivasan M, Kodumudi KN, Zunt SL. Soluble CD14 and toll-like receptor-2 are potential salivary biomarkers for oral lichen planus and burning mouth syndrome. *Clin Immunol*. 2008 Jan;126(1):31-7.
99. Cagliani R, Forni D, Riva S, Pozzoli U, Colleoni M, Bresolin N, Clerici M, Sironi M. Evolutionary analysis of the contact system indicates that kininogen evolved adaptively in mammals and in human populations. *Mol Biol Evol*. 2013 Jun;30(6):1397-408.

ANEXO A – Parecer do Comitê de Ética em Pesquisa

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

PARECER CONSUBSTANCIADO DO CEP**DADOS DO PROJETO DE PESQUISA**

Título da Pesquisa: Estudo da expressão gênica em lesões de líquen plano oral

Pesquisador: CELSO AUGUSTO LEMOS JÚNIOR

Área Temática:

Versão: 2

CAAE: 12072313.7.0000.0075

Instituição Proponente: Universidade de São Paulo

Patrocinador Principal: Financiamento Próprio

DADOS DO PARECER

Número do Parecer: 224.096

Data da Relatoria: 20/03/2013

Apresentação do Projeto:

Pacientes adultos portadores de líquen plano oral serão classificados de acordo com o aspecto clínico e espécimes serão coletados por biópsia incisional da lesão sob anestesia local previamente. Duas amostras das lesões serão armazenadas uma em solução tampão (formol 10%) e outra em tubo criogênico, sendo imediatamente colocados em nitrogênio líquido, como meio de transporte e, depois armazenados em freezer a -80 °C para posterior análise. Pacientes saudáveis, não portadores das lesões de líquen plano oral serão o controle. Os pacientes controle, não portadores das lesões de líquen plano, serão recrutados a partir da necessidade de exodontia de dentes inclusos onde uma amostra de mucosa normal também será obtida e congelado conforme a orientação anterior. Este fragmento de mucosa será originado da incisão para confecção de retalho mucoso no acesso cirúrgico do dente. Estas amostras também serão congeladas

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3091-7980

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

conforme o grupo anterior. Os pacientes que tiverem seu diagnóstico histopatológico confirmado de LPO sofrerão tratamento e acompanhamento de longo prazo para controlar a doença e seus sintomas. Estas amostras de tecido com lesão e sadio serão utilizadas para análise de dos mecanismos moleculares, alterações de DNA e RNA comparativamente com os grupo controle.

Objetivo da Pesquisa:

Identificar o nível de expressão de gênica por meio de análise do DNA e RNA e a quantidade de genes em determinada amostra através de uma única reação de hibridização. A partir dos resultados obtidos, aqueles genes com expressão alterada nos tecidos poderão ser futuramente utilizados como marcadores específicos para cada tipo de lesão, bem como para uso como alvos terapêuticos ou no desenvolvimento de vacinas.

Avaliação dos Riscos e Benefícios:

Os riscos e benefícios foram adequadamente descritos.

Comentários e Considerações sobre a Pesquisa:

As sugestões do parecer anterior foram aceitas e as modificações necessárias foram realizadas.

Considerações sobre os Termos de apresentação obrigatória:

Os termos obrigatórios foram apresentados e estão adequados.

Recomendações:

Tendo em vista a legislação vigente, devem ser encaminhados ao CEP-FOUSP relatórios parciais anuais referentes ao andamento da pesquisa e relatório final ao término do trabalho. Qualquer modificação do projeto original deve ser apresentada a este CEP, de forma objetiva e com justificativas, para nova apreciação. Segundo Carta Circular nº. 039/2011/CONEP/CNS/GB/MS, de 30 de setembro de 2011, contudo não cabe ao Sistema CEP/CONEP legislar sobre o acesso e USO DO PRONTUÁRIO médico (entenda-se odontológico também), porém cabe determinar o cumprimento do sigilo e da confidencialidade, além de exigir que toda pesquisa envolvendo seres humanos trate os mesmos em sua dignidade, respeite-os em sua autonomia e defenda-os em sua vulnerabilidade, conforme Resolução CNS 196/96, itens III.1.2.a2 e IV.1.2.g2. O CEP-FOUSP solicita Carta de autorização pelo uso de prontuários do responsável pela instituição, ressaltando o cumprimento destas normativas.

Conclusões ou Pendências e Lista de Inadequações:

Não há pendências nem inadequações.

Situação do Parecer:

Aprovado

Endereço: Av Prof Lineu Prestes 2227

Bairro: Cidade Universitária

CEP: 05.508-900

UF: SP

Município: SÃO PAULO

Telefone: (11)3091-7980

Fax: (11)3091-7814

E-mail: cepfo@usp.br

FACULDADE DE
ODONTOLOGIA DA
UNIVERSIDADE DE SÃO

Necessita Apreciação da CONEP:

Não

Considerações Finais a critério do CEP:

SAO PAULO, 20 de Março de 2013

Assinador por:
Maria Gabriela Haye Blazevic
(Coordenador)

APÊNDICE A - TCLE

Anexo 1 – Pacientes com LPO
UNIVERSIDADE DE SÃO PAULO
FACULDADE DE ODONTOLOGIA
DEPARTAMENTO DE ESTOMATOLOGIA
DISCIPLINA DE ESTOMATOLOGIA CLÍNICA

Anexo 1 – Pacientes com Líquen Plano Oral

TÍTULO: Estudo da expressão gênica em lesões de líquen plano oral.

Professor Orientador Responsável : Celso Augusto Lemos Junior

Pesquisador Responsável : Anna Torrezani

Local da pesquisa: Faculdade de Odontologia da USP – Clínica de Estomatologia - Av. Professor Lineu Prestes, 2227 - Cidade Universitária - São Paulo – SP

TERMO DE CONSENTIMENTO LIVRE E ESCLARECIDO (TCLE)

1. CONVITE

Convido o/a Sr (a) a participar desta pesquisa que consta o detalhamento abaixo com o objetivo de estudarmos a doença Líquen Plano Oral.

Fique claro desde este instante que não é obrigatório a participação para que seja atendido(a) e tenha tratamento em nosso ambulatório.

A participação é voluntária e este Termo de Consentimento pode ser retirado a qualquer momento, sem sofrer prejuízo na continuidade do tratamento.

2. DADOS DE IDENTIFICAÇÃO DO SUJEITO DA PESQUISA OU RESPONSÁVEL LEGAL:

Nome: _____

Identidade no.: _____

Data de Nascimento: ____/____/____ Sexo: () M () F

Endereço: _____

Bairro: _____ Cidade: _____ CEP: _____

Telefones: _____

3. INFORMAÇÕES SOBRE A PESQUISA CIENTÍFICA:

Este documento contém informações sobre esta pesquisa da qual o Sr. (a) poderá participar. Por favor, leia atentamente e, em caso de dúvida, estaremos à disposição para esclarecimentos.

3.1 OBJETIVOS DA PESQUISA

O objetivo desta pesquisa é avaliar se existem alterações genéticas nas células dos pacientes portadores de feridas na boca decorrentes de uma doença inflamatória crônica chamada Líquen Plano Oral (LPO) em comparação com a mucosa de pacientes sem ferida na boca.

A análise do fragmento de bochecha, língua ou gengiva que for removido para biópsia dos pacientes com hipótese clínica de líquen plano oral será verificada a existência ou não de alterações genéticas que possam estar relacionados à doença quando comparadas ao fragmento da gengiva de pacientes sem feridas que irão ser submetidos a extração do dente do siso.

3.2. PROCEDIMENTOS

O Sr (a) será examinado para sabermos exatamente o tipo de problema que apresenta. Serão coletadas Informações sobre seu estado de saúde geral, uso de remédios, problemas emocionais, história familiar de doenças e hábitos nocivos (cigarro e álcool).

Se o Sr.(a) apresentar lesão clínica suspeita de lesão de líquen plano oral será necessário a realização de uma biópsia sob anestesia local para confirmação do diagnóstico clínico. A biópsia é um exame feito para remover uma pequena parte da lesão (ferida). É um exame rápido. O fragmento removido será primariamente utilizado para diagnóstico em microscópio pelo laboratório de patologia da FOU SP e parte desse fragmento removido será utilizado para avaliar as alterações genéticas. Após confirmação do diagnóstico, o Sr./Sra no microscópio, o Sr(a) receberá atendimento e tratamento por medicamentos específicos além da limpeza dos dentes quando necessário para diminuição da inflamação (vermelhidão) da gengiva.

A coleta de tecido normal será realizada em pacientes que necessitem de extração do dente do siso incluso (3º molar que ainda não nasceu). A cirurgia de remoção do dente do siso inclui o corte da gengiva, será removido então no mesmo procedimento cirúrgico um fragmento dessa gengiva normal para comparação com o fragmento de mucosa dos pacientes que apresentam alteração de LPO.

Após confirmação do LPO, caso necessário, será tratado por medicamentos específicos além da limpeza dos dentes quando necessário para diminuição da inflamação (vermelhidão) da gengiva. O senhor será mantido sob controle clínico em acompanhamentos quinzenais, mensais, trimestrais e semestrais por longa data, e quando apresentar dor ou ardência será prescrito remédio de aplicação em cima da lesão para controlar o desconforto de dor e/ou ardência.

Se o Sr. não for portador de lesão suspeita de líquen plano mas apresentar a necessidade de extração de dente do siso incluso (3º molar que ainda não nasceu) será realizada a remoção do dente incluso. A cirurgia de remoção do dente inclui o corte da gengiva e então no mesmo procedimento cirúrgico um fragmento dessa gengiva normal será utilizado para comparação com o fragmento de mucosa dos pacientes que apresentam alteração de líquen plano oral.

3.3 RISCOS E DESCONFORTOS

A biópsia para confirmação do diagnóstico clínico é necessária em pacientes com suspeita de líquen plano oral. A remoção do dente do siso quando necessária é recomendada. O risco que o Sr (a) estará exposto será o mesmo de qualquer cirurgia menor realizada na boca como sangramento que são clinicamente controlados. Os desconfortos decorrente da biópsia em geral são bastante leves como leve dor no dia da realização, sendo controlada com analgésicos convencionais. Durante a extração do dente do siso, a remoção do fragmento de gengiva, não interfere na reparação esperada de uma cirurgia de remoção do dente do siso convencional. O desconforto decorrente da cirurgia do dente com remoção do fragmento de gengiva é o mesmo desconforto esperado da remoção do dente sem retirada do fragmento de gengiva. Todos os procedimentos ambulatoriais para controle da dor serão realizados.

3.4 TEMPO

O tempo a ser despendido para a participação nesta pesquisa são de 3 (três) comparecimentos, para coleta do material obtido através da biópsia com a retirada de um fragmento da bochecha do Sr (a) que levará em torno de 30 minutos, na semana seguinte remoção dos pontos e controle pós operatório (cerca de 15 minutos de atendimento) e entrega do laudo da biópsia assim que ficar pronto (cerca de 30 minutos de atendimento).

Os pacientes com as lesões de Líquen plano oral terão assistência e tratamento por longo período indeterminado, pois esta doença é crônica (não tem cura) e estaremos dispendo de avaliações quinzenais, mensais, trimestrais, semestrais e anuais de acordo com os sintomas de dor e desconforto e quanto a necessidade de prescrição de medicamento para o seu bem estar. Cada sessão de atendimento demorará em média 30 minutos.

Os pacientes que não apresentarem a doença serão apenas 3 (três) comparecimentos, sendo a da coleta de material obtido através da biópsia que levará em torno de 30 minutos, na semana seguinte remoção dos pontos e controle pós operatório (cerca de 15 minutos de atendimento) e entrega do laudo da biópsia assim que ficar pronto (cerca de 30 minutos de atendimento). Não necessitará mais de retorno.

3.5 BENEFÍCIOS AO PACIENTE

O Sr(a) poderá não ter benefício direto com a pesquisa, porém poderá ser esclarecido sobre a doença de boca que o Sr(a) possui e caso seja necessário, o tratamento adequado será aplicado.

O Sr(a) será esclarecido sobre a doença de boca que o Sr(a) possui e caso seja necessário, o tratamento adequado será aplicado. As perguntas que serão feitas ao Sr(a) contribuirá para um melhor tratamento e conhecimento dessa doença de boca. O tratamento será por medicamentos tópicos que deverão ser comprados pelo Sr(a). O resultado terapêutico esperado com o uso da medicação é o desaparecimento ou diminuição das feridas da boca. Essa melhora resultará em um maior conforto e bem estar facilitando a alimentação e higienização.

3.6. AJUDA DE CUSTO

Não existirá nenhum tipo de ajuda de custo para o transporte, alimentação, medicação ou qualquer outra necessidade. O que pode ocorrer para pacientes que residem em outro município e não apresentem meio de transporte, será feita uma carta de solicitação a Secretaria de Saúde do município para a disponibilização de transporte a este paciente em todas as consultas.

3.7 GARANTIAS AO PACIENTE

Como participante desta pesquisa, o Sr(a) terá acesso aos resultados dos exames realizados. Os resultados deste trabalho poderão ser apresentados em congressos ou publicados em revistas científicas, sendo sua identidade sempre preservada.

3.8 DIREITO DE DESISTIR

Está assegurada a liberdade do(a) Sr(a) de retirar seu consentimento a qualquer momento e de deixar de participar da pesquisa, sem que isto lhe traga qualquer prejuízo.

3.9 REUTILIZAÇÃO DOS DADOS OU MATERIAL BIOLÓGICO

O/A Sr (a) autoriza a utilização dos dados ou material biológico (especificar) em

outras pesquisas:

() NÃO autorizo a utilização de dados em outra pesquisa.

() SIM autorizo a utilização de dados ou em outra pesquisa

Para utilizar os dados em outra pesquisa o sujeito da pesquisa quer ser consultado:

() NÃO quero ser consultado da utilização dos meus dados em outra pesquisa, desde que a nova pesquisa seja aprovado pelo Comitê de Ética em Pesquisa,

() SIM quero ser consultado da utilização dos meus dados em outra pesquisa

Caso seja necessário, o contato com os pesquisadores responsáveis poderá ser feito pelo telefone: **Dr. Celso Augusto Lemos Junior** (Tel: 11 30917883) ou **Dra Anna Torrezani** (Tel: 11 996095536)

4. AUTORIZAÇÃO

Declaro que, tendo lido o termo de informação e consentimento para a pesquisa clínica, concordo em participar deste estudo. Sei que minha participação é voluntária e que posso interrompê-la a qualquer momento sem penalidades. Autorizo a utilização dos dados obtidos pelos pesquisadores para a publicação em revistas científicas e apresentações em Congressos.

Declaro ainda ter recebido uma cópia do termo de informação e autorização para participar da pesquisa.

Sigilo: As informações obtidas não serão utilizadas para divulgar a sua identidade. O material genético será utilizado exclusivamente nesta pesquisa.

“Se houver dúvidas sobre a ética da pesquisa entre em contato com o Comitê de Ética em Pesquisa da Faculdade de Odontologia (Av. Lineu Prestes 2227, 05508-000 São Paulo, telefone 30917960 ou pelo e-mail cepfo@usp.br)”.

Pesquisadores: _____

Anna Torrezani

CROSP: 90519

Prof. Dr. Celso A. Lemos Junior

CROSP: 50648

Após ler estas informações e de ter minhas dúvidas suficientemente esclarecidas pelo pesquisador concordo em participar de forma voluntária nesta pesquisa.

São Paulo, ____/____/____

Nome: _____ tel. _____

RG. _____ Ass. _____

APÊNDICE B – FICHA CLÍNICA

FICHA CLÍNICA

	Diagnóstico:
	nº AP:
	Data Coleta:

Tipo de Doença Líquenóide Oral (DLO):

1. (.....) Líquen Plano Cutâneo-Mucoso (LPMC)
2. (.....) Líquen Plano Oral idiopático (LPO)
3. (.....) Reação Líquenóide, especificar:.....
4. (.....) Lesão Líquenóide Oral (LLO)

Tipo de lesão:

1. (.....) Reticular
2. (.....) Erosivo-Ulcerado
3. (.....) Atrófico
4. (.....) Placa
5. (.....) Papular
6. (.....) Gengivite descamativa

Localização:

1. (.....) Mucosa jugal
2. (.....) Borda de língua
3. (.....) Dorso de língua
4. (.....) Gengiva
5. (.....) Palato duro
6. (.....) Palato mole
7. (.....) Lábio
8. (.....) Assoalho bucal
9. Outros.....
10. As lesões são:
 - a. (.....) bilaterais
 - b. (.....) unilaterais

Sintomatologia:

1. (.....) Dor
2. (.....) Ardência
3. (.....) Desconforto
4. (.....) Dificuldade na alimentação
5. (.....) Ausência

Hábitos:

1. Tabagismo:
 - a. (.....) sim,cigarros/dia, háanos
 - b. (.....) ex-fumante háanos, fumoucigarros/dia, poranos
 - c. (.....) não

2. Etilismo:

- a. (.....) sim, tipo:.....,qtdade/dia:.....
- a. (.....) ex-etilista háanos, tipo:.....qtdade/dia:....., por
.....anos
- b. (.....) não

Doenças Sistêmicas:

- 1. (.....) Diabetes
- 2. (.....) Hipertensão
- 3. (.....) Hipotireoidismo
- 4. Outras:.....
.....

Medicação em uso:

- (.....) Anti-hipertensivo
- (.....) Hipoglicemiante
- (.....) Anti-depressivo

Hepatite C:

- 1. (.....) Reagente
- 2. (.....) Não reagente

Perfil emocional:

Relaciona o desencadeamento da DLO a algum evento estressante ou outro aspecto emocional:

- (.....) sim
- (.....) não